



CENTRO DE INVESTIGACIONES
BIOLÓGICAS DEL NOROESTE, S. C.

Programa de Estudios de Posgrado

**Índices hematológicos y celulares como bioindicadores de
estrés en *Oreochromis aureus* Steindachner (tilapia) de cultivo.**

Tesis

Que para obtener el grado de

Doctor en Ciencias

Uso, Manejo y Preservación de los Recursos Naturales
(Orientación en Acuicultura)

P r e s e n t a

Raquel Silveira Coffigny

La Paz, Baja California Sur, Septiembre del 2005

ACTA DE LIBERACION DE TESIS

En la Ciudad de La Paz, B. C. S. ,siendo las 10:00 horas del día 27 del

Mes de Septiembre del 2005, se procedió por los abajo firmantes, miembros de la Comisión Revisora de Tesis avalada por la Dirección de Estudios de Posgrado del Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S. C., a liberar la Tesis de Grado titulada:

Índices hematológicos y celulares como bioindicadores de estrés en *Oreochromis aureus* Steindachner (tilapia) de cultivo.

Presentada por el alumno:

Raquel Silveira Coffigny

Aspirante al Grado de DOCTOR EN CIENCIAS EN EL USO, MANEJO Y PRESERVACION DE LOS RECURSOS NATURALES CON ORIENTACION EN **Acuicultura**

Después de intercambiar opiniones los miembros de la Comisión manifestaron su **APROBACION DE LA TESIS**, en virtud de que satisface los requisitos señalados por las disposiciones reglamentarias vigentes.

LA COMISION REVISORA

Dr Felipe Ascencio Valle
DIRECTOR DE TESIS

Dra Norma Hernández Saavedra
CO-TUTOR

Dra María Antonia Guzmán Murillo
CO-TUTOR

Dr Illie Sava Racotta Dimitrov
CO-TUTOR

Dr Angel Isidro Campa Córdova
CO-TUTOR

DRA. THELMA ROSA CASTELLANOS CERVANTES

**DIRECTORA DE ESTUDIOS DE POSGRADO
CONFORMACIÓN DEL COMITÉ**

Esta tesis fue dirigida por:

- Dr Felipe Ascencio Valle

El comité tutorial:

- Dra. Norma Y. Hernández Saavedra
- Dra Maria Antonia Guzmán Murillo
- Dr Ilie Sava Racotta Dimitrov
- Dr José Miguel Figueredo Ross

El comité revisor de tesis:

- Dr Felipe Ascencio Valle
- Dra. Norma Y. Hernández Saavedra
- Dra. Maria Antonia Guzmán Murillo
- Dr Ilie Sava Racotta Dimitrov
- Dr Angel Isidro Campa Córdova

El comité sinodal :

- Dr Felipe Ascencio Valle
- Dra. Norma Y. Hernández Saavedra
- Dra. Maria Antonia Guzmán
- Dr Ilie Sava Racotta Dimitrov
- Dr Angel Isidro Campa Córdova
- Dr Roberto Carlos Vázquez Juárez (suplente)

Dra Thelma Rosa Castellanos Cervantes

Directora de Estudios de Posgrado

RESUMEN GENERAL

Los peces del género *Oreochromis* constituyen la segunda producción más importante de peces de agua dulce a nivel mundial, para garantizar la eficiencia de esta producción es necesario disponer de herramientas de diagnóstico que permitan evaluar su estado de salud en condiciones de cultivo. En el presente estudio se propone valorar en *Oreochromis aureus* (tilapia), el efecto de estresores biológicos, ambientales y físicos sobre los parámetros hematológicos y las proteínas de estrés, con el fin de emplearlos como bioindicadores de estrés, también se compara el estado fisiológico de *O. aureus* con otras especies e híbridos del género. Para ello se determinaron los índices de referencia para la hemoglobina, hematocrito, eritrocitos y constantes corpusculares de *O. aureus* y se identificaron seis tipos de células en sangre periférica: eritrocitos, trombocitos, monocitos, neutrófilos, linfocitos maduros y jóvenes. Los estresores biológicos *Corynebacterium sp.* y *Aeromonas hydrophila* provocan disminución de la Hemoglobina, Hemoglobina Corpuscular Media (HCM), la Concentración de Hemoglobina Corpuscular Media (CHCM), el Volumen Corpuscular Medio (VCM) y el conteo de eritrocitos y se observó además poiquilocitosis. Se determinó que para ambos patógenos los peces mostraron neutrofilia, aumento de los linfocitos jóvenes y disminución de linfocitos maduros; en ambos casos *O. aureus* presentó anemia microcítica hipocrómica. El anestésico MS 222 provoca incremento del hematocrito a las 2h post-anestesia que luego disminuye a las 24 horas. El anestésico benzocaína provocó linfocitopenia y neutrofilia a partir de las 2 horas post-anestesia, pero alcanza valores semejantes al control a las 24 horas. El nitrito en concentraciones de 30 mg/L provoca disminución del hematocrito, la hemoglobina, el VCM y la HCM; mientras que la CHCM aumenta. En *O. aureus* expuestas a concentraciones subletales de plomo se observó disminución del contenido de hemoglobina, el número de eritrocitos y la CHCM, poiquilocitosis y fragmentación de eritrocitos; se observó además aumento de linfocitos jóvenes y neutrófilos, así como disminución de linfocitos maduros y trombocitopenia. El empleo de altas dosis de verde malaquita provocó, aumento del hematocrito, así como disminución de la CHCM. En el conteo diferencial de células blancas se halló aumento significativo del porcentaje de neutrófilos. *Oreochromis aureus* expuestas a Triclorfon presentaron neutrofilia, disminución de los linfocitos maduros y trombocitopenia. La respuesta de la expresión de las proteínas de estrés Hsp 70 en tilapia *O. aureus* sometida a estrés físico, aparece a las 2 horas con un aumento de estas proteínas en hígado mientras que la respuesta de los indicadores

hematológicos comienzan a las 24 horas. En la comparación interespecies de tilapia se observó diferencias significativas entre los parámetros hematológicos de las 3 especies estudiadas. *O. hornorum* presentó valores menores de todos los indicadores analizados con respecto a *O. aureus* con excepción de la HCM, que fue similar en ambas especies, al compararla con *O. niloticus* se encontró que los valores de Hb fueron semejantes, con mayor VCM y valores mas bajos de HCM y CHCM. El híbrido *O. aureus x O. niloticus* presentó mayor valor del Ne y Hb que el parental *O. niloticus*, pero menor que *O. aureus*, mientras que el VCM fue menor que para *O. niloticus* pero mayor que en *O. aureus*. Los valores de HCM y CHCM no difirieron de forma significativa para *O. niloticus* y el híbrido *O. aureus x O. niloticus*, mientras *O. aureus* presentó los mayores valores de estos dos indicadores.

Con estos resultados podemos enriquecer la investigación aplicada y básica, y contribuir a las necesidades prácticas del cultivo con una herramienta que ayude a determinar el estado fisiológico óptimo en los peces y con ello mitigar las pérdidas económicas por enfermedades o cambios ambientales.

Palabras claves: Estrés, parámetros hematológicos, *Oreochromis aureus*, proteínas de estrés

ABSTRACT

Tilapia, several species and their hybrids of *Oreochromis*, are the second most important group of farm raised fish in the world, reason why it is necessary to have diagnosis tools to evaluate its health state in culture conditions. Since haematological variables can be used to assess the health state in cultured fishes, a haematological characterization of clinically healthy *Oreochromis aureus* was done to establish the reference indices of this species. Fish were subjected to different stressed conditions (biological, environmental and physical stressors). The reference indices for the haemoglobin, haematocrit, and red blood cell count and erythrocyte indexes were determined. Six types of cells in peripheral blood were identified: mature and young erythrocytes, thrombocytes, monocytes, neutrophil and lymphocytes. The biological stressors *Corynebacterium* sp. and *Aeromonas hydrophila* caused decrease of the haemoglobin, Mean Corpuscular Haemoglobin (MCH), Mean Corpuscular Haemoglobin Concentration (MCHC), Mean Corpuscular Volume (MCV) and Red Blood Cell Count (RBCC) and poikilocytosis. It was observed that for both pathogens the fish showed neutrophilia, increase of the young lymphocytes and reduction of mature lymphocytes. Anesthetic MS 222 caused haematocrit increase and MCHC diminution after 2h post-anesthesia and to the 24 hours was observed haematocrit diminution. Anesthetic benzocaine caused in *O. aureus*, lymphocytopenia and neutrophilia. A decrease of the haemoglobin, erythrocyte counts and haematocrit was observed in fish with nitrite intoxication, but 48h the haematocrit and MCV increased significantly. In *O. aureus* exposed to sublethal lead concentrations was observed haemoglobin, RBCC and MCHC diminution; in the white cells it was observed young lymphocytes and neutrophil increase, as well as mature lymphocytes diminution and thrombocytopenia. The use of high doses of green malachite caused, haematocrit increase, as well as MCHC, was observed neutrophilia. *Oreochromis aureus* exposed to Trichlorphon presented neutrophilia, mature lymphocytes diminution and thrombocytopenia. The stress proteins

Hsp 70 expression response in *O. aureus* under physical stress, appears at 2 hours with an increase of these proteins in liver and hematological indicators response begin at 24 hours. In the comparison of *O. aureus* with other tilapia species, the values of the haematological indexes analyzed were significantly different when the three *Oreochromis* species were analyzed. Hybrid *O. aureus* x *O. niloticus* showed higher erythrocyte and haemoglobin concentration than the parental *O. niloticus* but lower concentration than *O. aureus*, while the average corpuscle value was lower than that of the *O. niloticus* and higher than that of *O. aureus*. The values of the mean corpuscular haemoglobin and mean corpuscular haemoglobin concentration were not significantly different for *O. niloticus* and hybrid *O. aureus* x *O. niloticus*, while *O. aureus* exhibited the highest values in these two indexes.

With these results we can enrich the applied investigation and basic, and contribute to the practical necessities of the culture with a tool that helps to determine the optimal physiological state in the fish and with it to mitigate the economic losses by diseases or environmental changes.

Key words: haematological variables, *Oreochromis aureus*, stress protein, stress.

A mi esposo Santiago y a mi hijo Randi.

A mi mamá y hermanas.

A mi padre, sé que se sentiría orgulloso.

***La posibilidad de realizar un sueño es
lo que hace que la vida sea interesante.***

Paulo Coelho

AGRADECIMIENTOS

Mi más profundo agradecimiento al Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste BCS, particularmente al Dr Mario Martínez, y a todos aquellos que comenzaron con esta idea por habernos dado la oportunidad de esta extraordinaria experiencia de colaboración ente dos instituciones y dos países.

A la doctora Dra Thelma Rosa Castellanos Cervantes y demás trabajadores de Posgrado por su apoyo en la continuidad y efectividad de esa idea.

Al Dr Felipe Ascencio Valle, por su apoyo y dirección en la realización del presente estudio.

A los miembros del Comité tutorial: Dra Norma Hernández Saavedra, Dra María Antonia Guzmán Murillo, Dr Ilie Racotta, Dr José Miguel Figueredo Ross, por su valioso apoyo.

Agradezco el apoyo recibido por el Consejo Nacional de Ciencias y Tecnología (CONACyT), como becario número 182842, durante la realización de esta tesis y por la oportunidad que me dio de conocer este maravilloso país.

Mi agradecimiento a la Embajada de Cuba en México por su apoyo durante toda nuestra estancia en este país.

Al Centro de Investigaciones Pesqueras de Cuba, en particular a los trabajadores de la División de Inocuidad de Alimentos y Sanidad, les agradezco por apoyarme en la realización del trabajo cuando estoy con ellos y sobretodo cuando no estoy.

A todos mis colegas del grupo LARESA, en especial a Mercedes Martínez, Raico Laria y Yanis Cruz, por su ayuda incondicional.

Agradezco infinitamente a los trabajadores de la Empresa de Acuicultura del Dique - Cotorro, en especial a su Director Ing. Néstor Rodríguez Coto, mi vecino y amigo.

Al laboratorio de Patogénesis Microbiana del CIBNOR, de manera muy especial a María de Jesús Romero Geraldo. A César Angulo y a Mauricio. A todos ellos muchas gracias por el tiempo que me dedicaron y por la ayuda recibida, para la realización de mi trabajo de tesis.

LISTA DE PUBLICACIONES

Esta tesis esta basada en los siguientes artículos y manuscritos, las cuales serán referidas a continuación con los números romanos(I-III):

- I. Silveira-Coffigny Raquel, Prieto-Trujillo Adela, Ascencio- Valle Felipe. "Effects of different stressors in haematological variables in cultured *Oreochromis aureus* S." ***Comparative Biochemistry and Physiology Part C Vol 139, 245-250.***

- II. Silveira-Coffigny Raquel, Cruz- Quintana Yanis, Martínez-Pérez Mercedes, Ascencio- Valle Felipe "Características morfológicas y citoquímicas de las células sanguíneas de la sangre periférica de *Oreochromis aureus* S.", ***Revista Electrónica de Medicina Veterinaria*** (Aceptado)

- III. Silveira-Coffigny Raquel, Martínez-Perez Mercedes, Laria-Lamela Raico,Ascencio- Valle Felipe. Comparison of erythrocytes indexes between *Oreochromis* genus species and hybrids". ***Journal of Fish Biology*** (sometido)

LISTA DE TABLAS

	Pág
Tabla 1. Perspectivas de crecimiento de la producción de tilapia en Cuba hasta año 2008.	9
Tabla 2. Algunos ejemplos de respuesta secundaria empleados como indicadores de estrés	18
Tabla 3. Índices de referencia de parámetros hematológicos para <i>O. aureus</i> .	30
Tabla 4. Parámetros hematológicos de <i>O. aureus</i> inoculadas con <i>Corynebacterium sp.</i>	37
Tabla 5. Parámetros hematológicos de <i>O. aureus</i> inoculadas con <i>Aeromonas hydrophila</i>	42
Tabla 6. Indicadores sanguíneos de <i>O. aureus</i> expuesta a MS-222	46
Tabla 7. Indicadores sanguíneos de <i>O. aureus</i> expuesta Benzocaína	49
Tabla 8. Parámetros sanguíneos de <i>O. aureus</i> contaminados con nitrito	52
Tabla 9. Parámetros sanguíneos de <i>O. aureus</i> contaminados con plomo	55
Tabla 10. Parámetros sanguíneos de <i>O. aureus</i> expuestos a verde malaquita	59
Tabla 11. Parámetros sanguíneos de <i>O. aureus</i> sometidos a exposición fuera del agua.	70
Tabla 12. Parámetros hematológicos de las especies <i>O. aureus</i> , <i>O. hornorum</i> , <i>O. niloticus</i> .	77

LISTA DE FIGURAS

	Pág
Figura 1. Frotis de sangre periférica normal de <i>O. aureus</i>	31
Figura 2. Frotis de sangre periférica normal de <i>O. aureus</i>	31
Figura 3 Frotis de sangre periférica normal de <i>Oreochromis aureus</i> , teñida con Schiff- PAS	32
Figura 4.. Frotis de sangre periférica normal de <i>Oreochromis aureus</i> , teñida con Sudán Black	33
Figura 5. Frotis de sangre periférica de <i>O. aureus</i> inoculadas con <i>Corynebacterium sp.</i>	38
Figura 6. Frotis de sangre periférica de <i>O. aureus</i> sometida a 15 mg/L de plomo	55
Figura 7. Frotis sanguíneo de <i>O. aureus</i> expuesta a verde malaquita	59
Figura 8. Variación de los porcentajes de leucocitos de <i>O. aureus</i> expuestos a Triclorfon	62
Figura 9. Frotis de sangre periférica de <i>O. aureus</i> expuestas a Triclorfon	62
Figura 10 Frotis sanguíneo de <i>O. aureus</i> después de 24 h de estrés físico	71
Figura 11 Análisis RT-PCR semicuantitativo de HSP70 en hígado de tilapia bajo estrés físico.	72
Figura 12 Cambios en los índices hematológicos entre el híbrido <i>O. aureus</i> x <i>O. niloticus</i> y los parentales <i>O. aureus</i> y <i>O. niloticus</i>	79

LISTA DE ABREVIACIONES

ADN :	Acido ácido RNA - por sus siglas en inglés -
ARN:	Acido ribonucleico - por sus siglas en inglés -
CHCM:	Concentración de Hemoglobina Corpuscular Media
fl:	Femtolitro
Hb:	Hemoglobina
HCM:	Hemoglobina Corpuscular Media
Hsp:	Heat shocks proteins- por sus siglas en inglés- Proteínas de estrés
Hto:	Hematócrito
LC50:	Concentración letal media
NoE :	Conteo de Eritrocitos
PCR :	Reacción en cadena de la polimerasa
pg:	picogramo
RT-PCR:	Reacción en cadena de la polimerasa por transcripción reversa.
VCM:	Volumen Corpuscular Medio

GLOSARIO DE TÉRMINOS Y DEFINICIONES

Amitosis : División celular directa por estrangulación sencilla del núcleo, sin cariocinesis: la amitosis es una forma atípica de mitosis

Anemia hemolítica: Aquella que presenta un conjunto de trastornos que provocan la destrucción eritrocitaria mediante mecanismos muy diversos. La hemólisis puede ser *intravascular*, cuando los hematíes se lisan en la circulación y su contenido se libera directamente al plasma, o *extravascular*, más frecuente, cuando los hematíes son lisados por los macrófagos del hígado o del bazo.

Anemia microcítica hipocrómica: Anemia que se caracteriza por la presencia de eritrocitos anormalmente pequeños. La anemia está descrita en un sistema de clasificación, en función del contenido de hemoglobina de los eritrocitos (normocrómica o hipocrómica) y en función de las diferencias de tamaño de éstos (macrocítica, normocítica o microcítica).

Anemia: Trastorno que se caracteriza por la disminución de la concentración de hemoglobina por debajo de unos límites que se consideran normales.

Anorexia: Falta de apetito que origina una negativa del sujeto a tomar alimentos. Las causas son numerosas y variadas (todos los factores que pueden interferir en los mecanismos reguladores del hambre o del apetito pueden provocarla) y aparece

en enfermedades que afectan a órganos y aparatos diversos

Concentración de Hemoglobina Corpuscular

Media: Es la concentración de hemoglobina comparado con el hematócrito.

Epizootico: Sinónimo de epidemia, aplicado a enfermedades animales

Eritroblastos: formas jóvenes recién salidas de los órganos hematopoyéticos. Se debe a anemias, hemorragias, o hemólisis (rotura de hematíes) por diversas causas.

Eritrocitosis: Aumento patológico del número de hematíes circulantes

Esplenomegalia: Aumento anormal del tamaño del bazo

Esquitocitos: Aparece cuando los hematíes son de diferentes formas (bastones, media luna, en forma de casco, con espinas, etc...). Se suele deber a enfermedades que atacan los hematíes como la anemia hemolítica

Exoftalmia Situación saliente anormal del globo ocular

Fórmula de leucocitos o leucocitaria: Mide el porcentaje presente de cada tipo de leucocitos en el total de glóbulos blancos. Al ser un porcentaje al aumentar un grupo de leucocitos disminuye otro,

aunque en ocasiones sólo existe un aumento o disminución de un tipo concreto.

Hemoconcentración Aumento de la concentración de la sangre por disminución de su contenido líquido.

Hemoglobina Corpuscular Media: Contenido promedio de la hemoglobina en cada eritrocito (Hemoglobina/número de hematíes). Su valor normal se expresa en picogramos

Leucopenia : Disminución de la cifra de leucocitos en la sangre periférica.

Linfocitosis: elevación del número de linfocitos en la sangre periférica

Linfopenia Disminución del número de linfocitos en la sangre periférica

Neutrofilia:Un aumento del número de leucocitos neutrófilos en la sangre periférica

Neutropenia disminución del número de leucocitos neutrófilos en la sangre periférica

Poiquilocitosis Grado anormal de variación en la forma de los eritrocitos sanguíneos.

Trombocitopenia: Situación hematológica anormal en la que el número de trombocitos está disminuido

Volumen Corpuscular Medio: Es una forma de expresar el tamaño de los eritrocitos, se expresa en femtolitros por hematíe.

TABLA DE CONTENIDO

Pág.

Acta de Revisión de tesis	
Conformacion del comité	
Resumen	
Abstract	
Dedicatoria	
Agradecimientos	
Lista de publicaciones	
Lista de tablas	
Lista de figuras	
Lista de abreviaciones	
Glosario de Términos y Definiciones	
1. INTRODUCCIÓN	1
2. ANTECEDENTES	4
2.1 Posición taxonómica	4
2.1 Características biológicas de la especie.	4
2.3 Historia de su dispersión geográfica	5
2.4 Importancia económica y Producción mundial	6
2.5 Producción en Latinoamérica y Cuba.	7
2.6 Manejo de la tilapia como especie de cultivo.	9
2.7 Hábitat	10
2.9 Condiciones medioambientales óptimas y efecto de su variación en el cultivo.	10
2.10 Características de cultivo.	12
2.11 Enfermedades y manejo de salud.	13
2.12 Estrés en peces	15
2.14 Respuesta de los peces al estrés.	16
2.15 Los parámetros hematológicos como indicadores de estrés.	20
2.16 Indicadores de estrés y métodos para su evaluación.	21

	Pág.
3. HIPÓTESIS. OBJETIVOS GENERALES Y ESPECÍFICOS	24
4. MATERIALES Y MÉTODOS GENERALES	25
5. DESARROLLO	
5.1 Parámetros hematológicos de referencia de <i>O.aureus</i>	28
5.2 Variaciones hematológicas provocadas por estresores biológicos, ambientales y físicos en <i>O. aureus</i> .	35
5.2.1 <u>Estresores biológicos</u>	
5.2.1.1 Inoculación experimental con la bacteria patógena <i>Corynebacterium sp.</i>	35
5.2.1.2 Inoculación experimental con la bacteria patógena <i>Aeromonas sp</i>	40
5.2.2 <u>Estresores ambientales</u>	
5.2.2.1 Efecto de anestésicos: MS-222, benzocaína.	44
5.2.2.2 Efecto de contaminantes ambientales: nitrito, plomo.	50
5.2.2.3 Efecto del uso de medicamentos: Verde Malaquita y Triclorfon	57
5.2.3 <u>Estresores físicos</u>	
5.2.3.1 Relación entre los parámetros hematológicos y las proteínas de estrés (HSP-70).	65
5.3 Comportamiento fisiológico de <i>O. aureus</i> en relación con otras especies e híbridos del género	75
6 DISCUSIÓN GENERAL	82
7 CONCLUSIONES	91
8 PERSPECTIVAS	94
9 BIBLIOGRAFIA CONSULTADA	95
10 ANEXOS	
Artículos publicados y sometidos.	116

1. INTRODUCCIÓN

La producción mundial de tilapia, sobrepasa el millón de toneladas métricas, por lo que constituye la segunda más importante producción de peces de agua dulce, después de las carpas (FAO, 2004). Esta especie se caracteriza por su fácil reproducción en condiciones de cautiverio, por su tolerancia a cambios ambientales, por su rápido crecimiento, resistencia a las enfermedades y por la calidad y sabor de su carne.

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 se desarrollan estrésos que pueden comprometer el crecimiento y salud de los animales y predisponerlos a las enfermedades, por lo que el estrés es un problema para las prácticas actuales de la acuicultura (Subashinge y col. 1996)

Una de las formas que se han adoptado en los últimos años para medir el efecto del estrés, son los bioindicadores que no son más que indicadores puntuales y selectos de estrés en todos los niveles de organización biológica y pueden evaluar y predecir los efectos de las modificaciones ambientales antes de que el daño sea irreversible. Estas alteraciones inducen cambios estructurales y funcionales que se manifiestan en forma de lesiones al nivel de tejidos, trastornos en la regulación hormonal, en la osmoregulación y en la respuesta inmune (Romano 1998)

La intensidad del estrés no puede ser medida, sin embargo, las respuestas al estímulo pueden ser determinadas cuantitativamente y estas mediciones abarcan los cambios en el comportamiento individual, la respuesta fisiológica primaria, secundaria y terciaria, y la respuesta celular como indicadores de estrés y estos han sido estudiados en diferentes especies de peces.

Múltiples factores influyen en la respuesta y aunque el grado de la misma puede ser interpretado como indicador de la magnitud del estrés, las respuestas en sus diferentes niveles dependen mucho de la capacidad de cada individuo o de una especie en particular.

Dentro de los indicadores de respuesta secundaria se encuentran los parámetros hematológicos, que han sido empleados en peces para medir su estado fisiológico y son utilizados con frecuencia para valorar la efectividad del control de enfermedades infecciosas, desbalances nutricionales, efectos tóxicos, condiciones anóxicas, y otros estresores biológicos, físicos o ambientales que se presentan durante los cultivos (Hrubec y col. , 2000 Aydin y col. , 2000).

Existen investigaciones sobre la respuesta fisiológica al estrés en peces, pero basados fundamentalmente en la determinación de un indicador de respuesta primaria, el cortisol y un indicador clásico de la respuesta secundaria, la glucosa (Vijayan y col 1994, Barton 2002, Barton y col. 2002, Iwama y col. 2004). Los parámetros hematológicos, como indicadores de la respuesta al estrés en peces, han sido menos estudiados a pesar de que pueden ser validados y empleados en condiciones de campo, lo que puede ser una herramienta útil para el manejo de salud de las poblaciones de cultivo (Morgan e Iwama, 1997).

La respuesta generalizada al estrés a nivel celular, es caracterizada por una familia de proteínas que han sido nombradas proteínas de choque térmico o proteínas de estrés (*Heat shocks proteins Hsps*-- por sus siglas en inglés), son proteínas celulares altamente conservadas y han sido identificadas en todos los organismos(Feder y Hopffman,1999) y también en peces (Iwama y col. 1998). La posible función de las *Hsps* en varios aspectos de la fisiología de los peces ha sido revisada por Basu y col. 2002. La más estudiada de estas proteínas es la Hsp70 y la misma ha sido identificada en la tilapia (Vijayan y col. 1997)

Al establecer en *Oreochromis aureus* (tilapia), los indicadores hematológicos de estrés y la posible relación entre éstos, económicos y de fácil determinación en condiciones de campo, con

indicadores celulares de estrés, más confiables y reproducibles, permitirá evaluar a niveles subclínicos el impacto de los cambios originados por efecto del estrés sobre los peces sometidos a cultivo y pondremos a disposición de los acuicultores de tilapia una herramienta económica, útil y eficaz para conocer el estado de salud de las poblaciones en cultivo y realizar las operaciones de manejo sanitario del cultivo de forma segura.

2. ANTECEDENTES.

2.1 Ubicación taxonómica

Oreochromis aureus Steindachner (1864)

Eukaryota; Metazoa; Chordata; Craniata; Vertebrata; Euteleostomi; Actinopterygii; Neopterygii; Teleostei; Euteleostei; Neoteleostei; Acanthomorpha; Acanthopterygii; Percomorpha; Perciformes; Labroidei; Cichlidae; Oreochromis

Nombre común: Tilapia aurea, Tilapia azul.

2.2 Características biológicas de la especie.

La tilapia es un pez teleósteo originario de África, habita la mayor parte de las regiones tropicales del mundo, donde las condiciones son favorables para su reproducción y crecimiento. Posee un tamaño máximo reportado de 45.7 centímetros de largo total (IGFA, 2001); y un peso de 2,010 g. Habita en ambientes bentopelágicos, de agua dulce y salobre; a un rango de profundidad promedio de 5 m.

Posee un total de 14-17 espinas dorsales; de 12-15 rayos dorsales; 3-3 espinas anales; 9-11 rayos anales y 28-31 vértebras. Posee opérculos en 2-3 series horizontales. La papila genital del macho maduro es cónica o con la pestaña bifida estrecha. Los machos maduros asumen un intenso azul metálico luminoso en la cabeza, un color bermellón en la aleta dorsal y un color rosa más intenso en la zona caudal. Las hembras maduras toman un color más pálido en las aletas dorsales y en la zona caudal adquieren un color anaranjado.

Habita en clima subtropical, en rangos de temperaturas que van de 8° a 30°C (Trewavas, 1983).

Se reproduce en el agua dulce y salobre (Page y Burr, 1991). Se alimenta de fitoplancton y de

pequeñas cantidades de zooplancton. Los juveniles tienen una dieta más variada que incluye cantidades grandes de copépodos y cladóceros (de Moor y Bruton, 1988).

2.3 Historia de la dispersión geográfica del género *Oreochromis*

Las tilapias fueron introducidas en América desde su origen africano, a lo largo de los trópicos por gerentes de las pesquerías, después de la Segunda Guerra Mundial. En muchos casos, se importaron principalmente para controlar plagas acuáticas y mosquitos y sólo secundariamente como alimento de consumo humano. Los aspectos genéticos y sus posibles problemas no fueron considerados debido al pobre desarrollo de la acuicultura en esos momentos. Sin embargo en la actualidad, la pureza genética y el deterioro de las poblaciones de tilapia se han convertido en una gran preocupación tanto para los productores como para los investigadores (Pullin 1988).

Oreochromis mossambicus fue la primera especie en ser ampliamente distribuida, pero no controló las plagas acuáticas adecuadamente. En muchos países, era ignorada como especie de consumo debido a su cabeza grande, color oscuro, pobre porcentaje de carne, lento crecimiento así como por la tendencia a reproducirse en pequeñas tallas. Como resultado, la mayoría de las poblaciones de *O. mossambicus* no fueron manejadas adecuadamente, escaparon al medio salvaje y se deterioraron (Castillo, 2003).

A partir de 1980, se consideró que *O. mossambicus* se había adaptado al medio natural de las áreas tropicales y se pensaba que había impactado algunos ecosistemas acuáticos nativos (Randall 1987), particularmente en el Pacífico tropical (Lobel 1980). Sin embargo, *O. mossambicus* contribuyó positivamente a la nutrición humana en Sri Lanka (Desilva y Senaratne 1988) e Indonesia (Costa-Pierce y col. 1988). Es la única especie de tilapia disponible en algunos

estados de E.E.U.U. y como especie exótica ha provocado experiencias negativas en su introducción y dispersión.

El deterioro de la especie y el rechazo por los consumidores condujeron a un cambio a nivel mundial y se comenzó la introducción con fines de cultivo de *O. niloticus* (Pullin 1988). Aunque esta especie es ahora cultivada en muchos países y algunos acuacultores hicieron un buen manejo de la misma, es probable que una situación similar referida a los aspectos genéticos, también exista para *O. niloticus*. Los problemas genéticos existen porque las poblaciones originales se importaron del medio natural de África (Eknath y col. 1991; Pullin y col. 1991; Pullin 1988).

2.4 Importancia económica y Producción mundial

La producción mundial acuícola de la tilapia se duplicó entre 1986 y 1992 y en la actualidad es superada solo por las carpas chinas y los salmónidos. En 1995, China fue el primer país productor de tilapia en el mundo, con 160.000 toneladas métricas por año, seguido de Filipinas con 63.000 Tm , en la actualidad se le conoce como uno de los peces más importantes en los países latinoamericanos (Costa-Pierce 1997). Por lo menos 75 países producen tilapia, y la Republica Popular China es el mayor productor (Engle 1997a).

La producción acuícola de tilapia y otros cíclidos ha tenido un aumento espectacular, totalizó aproximadamente 1 265 800 toneladas en el año 2000. El comercio internacional, aunque es limitado, está creciendo, sobre todo entre los productores centroamericanos (Costa Rica, Ecuador y Colombia) y los Estados Unidos; así como entre los productores asiáticos (Taiwán Provincia de China, Indonesia y Tailandia) y los Estados Unidos y el Japón. También hay un comercio más modesto entre Jamaica y el Reino Unido (Helga, 2004).

El mayor exportador, Taiwán provincia de China, suministra al Japón filetes de tilapia de alta calidad para su mercado de sashimi, así como tilapia congelada al mercado de los Estados Unidos (40 000 toneladas en 2001). Taiwán Provincia de China exporta aproximadamente el 70 por ciento de la producción interna de tilapia. Tailandia e Indonesia exportan menos de 5 por ciento de su producción. Viet Nam ha entrado recientemente en el mercado internacional de la tilapia, y China exportó 12 500 toneladas a los Estados Unidos en 2001. Ahora también Zimbabwe produce filetes frescos y congelados para el mercado de la Unión Europea(Helga, 2004).

En los Estados Unidos, la tilapia es ahora en peso, el tercer producto de la acuicultura más importado (56 000 toneladas en 2001), después del camarón y el salmón. Las importaciones en los Estados Unidos han crecido rápidamente y se prevé que seguirán haciéndolo en el futuro. Es probable que los precios de la tilapia bajen a largo plazo, lo que haría aumentar las exportaciones a los Estados Unidos, así como a Europa, que es todavía un mercado subdesarrollado para la especie (Castillo, 2003).

2.5 Producción en Latinoamérica y Cuba.

El cultivo de tilapias y su consumo ha ido creciendo aceleradamente en los países latinoamericanos, en los Estados Unidos su carne es muy apreciada en todas las presentaciones, pero especialmente en forma de filete.

En países latinoamericanos los esquemas de producción se llevan a cabo bajo el sistema intensivo. En Costa Rica, la tilapia ocupa los primeros lugares en el renglón de las exportaciones, de igual forma en países centroamericanos como Honduras, este cultivo se acrecienta cada día más. En el año 2000, México fue el mayor productor de tilapia de latinoamérica, con 102,000 TM (Fitzsimmons 2001), sin embargo los volúmenes de producción de tilapia en México han disminuído.

La producción de tilapia en países como Colombia, Ecuador, Perú, Brasil y Venezuela, se hace en modelos de producción que van desde extensivo hasta intensivos, pasando por la modalidad de semiintensivo.

En Perú y Venezuela se sostiene una fuerte polémica con respecto al impacto ecológico que la especie pueda tener en el ecosistema acuático de esos países, se conoce que en la zona de Tumbes existen proyectos que están produciendo la tilapia roja para el mercado de los Estados Unidos(Castillo, 2003).

En el Ecuador la industria de la tilapia toma mayor importancia día a día, la crisis en la producción del camarón, obligaron a estos tradicionales camaroneros a buscar alternativas que les permitieran recuperar la rentabilidad, que ya no les permitía obtener la industria del crustáceo(Castillo, 2003)..

El verdadero auge de la producción de tilapia en estos países se generó a partir de los años 80's con el ingreso de la tilapia roja (*Oreochromis sp.*), con ella se iniciaron las empresas que producen con criterios de exportación, con tecnologías de alta densidad y generando un valor agregado al producto primario, es así como se inició uno de los renglones más productivos en las economías primarias de los países latinoamericanos. (Castillo, 2003).

Cuba fue el tercer productor de tilapia en Latinoamérica en el año 2002, el destino principal de esta producción es el mercado interno. Sin embargo los niveles de producción han bajado, por lo que se ha propuesto un plan de desarrollo para los años 2005 al 2008 (Tabla1) que contempla un incremento anual de la producción de semillas (MIP, 2003).

Tabla 1: Perspectivas de crecimiento de la producción de tilapia en Cuba hasta el año 2008.

	2004	2005*	2006*	2007*	2008*
Captura total (Ton)					
Alevines de Tilapia (MM)	3.2	3.5	4.2	4.6	5.2
Tilapia	46	42	65	44	45

Esta estrategia de desarrollo pretende también incrementar el nivel de captura en el cultivo extensivo a partir de un manejo sostenible que tiene como principal objetivo la implementación la veda de la tilapia, todas estas acciones contribuirán en el mediano y largo plazo a incrementar las ventas en el mercado interno y posteriormente las exportaciones(MIP, 2003).

2.6 Manejo de la tilapia como especie de cultivo

Es un pez de buen sabor y rápido crecimiento, se puede cultivar en estanques y en jaulas, soporta altas densidades, resiste condiciones ambientales adversas, tolera bajas concentraciones de oxígeno, es capaz de utilizar la productividad primaria de los estanques y puede ser manipulado genéticamente.

Actualmente se cultivan con éxito unas diez especies. Como grupo las tilapias representan uno de los peces más ampliamente producidos en el mundo. Las especies más cultivadas son *Oreochromis aureus*, *Oreochromis niloticus*, *Oreochromis mossambicus*, así como varios híbridos de éstas especies. La menos deseable es *Oreochromis mossambicus*; tanto *Oreochromis aureus* como *Oreochromis niloticus*, crecen más rápido y alcanzan mayor tamaño que *Oreochromis mossambicus* aunque requieren mayor tamaño para su reproducción (Alamilla, 2004)

2.7 Hábitat

Son especies aptas para el cultivo en zonas tropicales y subtropicales. Debido a su naturaleza híbrida, se adapta con gran facilidad a ambientes de aguas poco estancadas, estanques, lagunas, reservorios y en general a medios confinados (Nicovita, 2003).

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

Oxígeno: La tilapia es capaz de sobrevivir a niveles bajos de oxígeno disuelto (1,0 mg/L), pero para mantener un cultivo exitoso de tilapia, los valores de oxígeno disuelto deberían estar por encima de los 4mg/L, ya que valores menores, reducen el crecimiento e incrementan la mortalidad. La exposición prolongada a bajos niveles de oxígeno, disminuye la tasa de crecimiento, aumenta la conversión alimenticia (relación alimento consumido/aumento de peso), provoca inapetencia y letargia, causa enfermedad a nivel de branquias, produce inmunosupresión aumentando la susceptibilidad a enfermedades y disminuye la capacidad reproductiva (Nicovita, 2003, Alamilla, 2004).

Temperatura: El rango normal de temperatura para *Oreochromis aureus* es de 18 a 32 °C, sin embargo para obtener el óptimo crecimiento, la tilapia debe cultivarse en el rango de 26 a 30°C. Los cambios de temperatura afectan directamente la tasa metabólica, mientras mayor sea la temperatura, mayor tasa metabólica y por ende, mayor consumo de oxígeno. Las temperaturas letales en cultivo, se ubican entre los 10-11 °C. Su alimentación cesa por debajo de los 16-17°C y las enfermedades o muertes se producen cuando se las maneja por debajo de los 16-17°C. La reproducción se inhibe cuando las temperaturas se sitúan por debajo de los 20°C. Para su crecimiento, se necesita entre 29 y 31°C; cuando los peces son alimentados a saciedad, el crecimiento se manifiesta 3 veces superior que a los 20- 22°C. Cuando la temperatura excede los 37-38°C se producen problemas por estrés. (Nicovita, 2003, Alamilla, 2004).

pH: El rango óptimo está entre 6.5 a 9.0, ya que valores por encima o por debajo, causan cambios de comportamiento en los peces, tales como letargia, inapetencia, retardo en el crecimiento y retraso en la reproducción. Valores de pH cercanos a 5 producen mortalidad en un período de 3 a 5 horas, por fallas respiratorias; además, causan pérdidas de pigmentación e incremento en la secreción de mucus de la piel. Cuando se presentan niveles de pH ácidos, se afectan las células de los arcos branquiales y por ende, disminuyen los procesos de respiración, causando la muerte por anoxia (asfixia por falta de oxígeno). El pH en el agua fluctúa en un ciclo diurno, principalmente influenciada por la concentración de CO₂, por la densidad del fitoplancton, la alcalinidad total y la dureza del agua. El pH para tilapia debe de ser neutro o muy cercano a él, con una dureza normalmente alta para proporcionar una segregación adecuada del mucus en la piel. (Nicovita, 2003).

Amonio: Es un producto de la excreción que se elimina, en forma no ionizada (gaseosa), tanto por las branquias como por la orina de los peces y por la descomposición de la materia orgánica (degradación de la materia vegetal y de las proteínas del alimento no consumido). Los valores de amonio no ionizado deben fluctuar entre 0.0 1 ppm a 0.1 ppm siendo críticos los valores cercanos a 2 ppm. Los niveles de tolerancia para la tilapia se encuentran en el rango de 0.6 a 2.0 ppm.

El amonio es un elemento tóxico y su toxicidad aumenta cuando la concentración del oxígeno disuelto baja y al aumentar la temperatura, lo que incrementa el pH causando mortalidades. La alta concentración de amonio en el agua causa bloqueo del metabolismo, daño en las branquias, afecta el balance de sales, produce lesiones en órganos internos, inmunosupresión y susceptibilidad a las enfermedades, reducción del crecimiento y la sobrevivencia, exoftalmia y ascitis. (Nicovita, 2003).

Nitritos: parámetro de vital importancia por su gran toxicidad y por ser un poderoso agente contaminante. Se generan en el proceso de transformación del amonio a nitrato. La toxicidad de

los nitritos depende de la cantidad de cloruros, temperatura y concentración de oxígeno en el agua. Se consideran óptima para el cultivo de esta especie en agua dulce la concentración de 27mg/L (Popma y Masser, 1999).

Dióxido de carbono: Es un producto de la actividad biológica y metabólica, su concentración depende de la fotosíntesis. Debe mantenerse en un nivel inferior a 20 ppm, porque cuando sobrepasa este valor se presenta letargia e inapetencia (Nicovita, 2003).

2.9 Características del cultivo.

Debido a que las formas en que es cultivada una especie acuática inciden en las condiciones fisiológicas de la misma y que las diferentes formas de cultivo implican posible estrés, resulta conveniente conocer las formas en que puede ser cultivada la tilapia. La tilapia puede ser cultivada en jaulas, *raceways*, tanques, estanques, lagunas, reservorios o represas, canales de regadío, etc., siendo los estanques el medio más común. Por lo general, este organismo se utiliza para monocultivo, aunque también se ha utilizado en policultivo especialmente cuando la tilapia es la especie de importancia secundaria.

Las principales características de las tilapias que las hacen animales de elección para el cultivo según Nicovita (2003), son:

Fácil aceptación en el mercado, curva de crecimiento rápido, hábitos alimenticios adaptados a dietas suplementarias que aumenten los rendimientos (facilidad de administrar alimentos balanceados), tolerancia a altas densidades de siembra, tolerancia a condiciones extremas: resistencia a concentraciones bajas de oxígeno, niveles altos de amonio y valores bajos de pH.

De acuerdo a Nicovita (2003), para la alimentación de la tilapia en sus diferentes estadios, se debe considerar los niveles de proteína necesarios para obtener un máximo crecimiento. Puesto que según el autor citado antes, el nivel de proteínas requerido para el máximo crecimiento disminuye

con el incremento del peso del organismo. Además en la elaboración de las dietas para el cultivo intensivo de tilapia, el contenido de proteína puede llegar a representar más del 50% del costo total del alimento. El nivel de proteína requerido para un máximo crecimiento, estará influenciado por múltiples factores como son:

- a. El contenido de energía en la dieta
- b. El estado fisiológico del pez (edad, peso y madurez)
- c. Factores ambientales (temperatura del agua, salinidad y oxígeno disuelto).
- d. La calidad de la proteína (nivel y disponibilidad de aminoácidos esenciales).
- e. Tasa de alimentación.

2.10 Enfermedades y manejo de salud en los cultivos de tilapia (Nicovita, 2003).

Dentro de la tecnología de cultivo, la sanidad acuícola ocupa un lugar de interés debido a la necesidad que existe de poner en práctica los procedimientos para prevenir y controlar las enfermedades que potencialmente limitan la producción. Es conocido que las enfermedades son causa de pérdidas económicas importantes y son responsables de mortalidades masivas en las fases de cría de alevines de la tilapia.

En todos los casos los peces no mueren, por causa de agentes patógenos, sino que también pueden verse afectados por factores físicos, químicos, biológicos o de manejo. Por lo que con el fin de evitar la mortalidad o el desarrollo de enfermedades que puedan alcanzar la proporción de epidemia, es necesario brindar un medio adecuado, con el objeto de prevenirlas antes de tener que aplicar tratamientos correctivos.

En algunas ocasiones los organismos pueden presentar comportamientos que pueden alertarnos sobre algún factor que está causando tensión o sobre el desarrollo de una infección. Dentro de estos signos anormales se cuentan los siguientes:

- Letargia y pérdida del apetito.
- Pérdida del equilibrio, nado en espiral o vertical.
- Agrupamiento en la superficie y respiración agitada.
- Producción excesiva de mucus, lo que da al pez una apariencia opaca.
- Coloración anormal.
- Erosión en la piel o en las aletas.
- Branquias inflamadas, erosionadas o pálidas.
- Abdomen inflamado, algunas veces lleno de fluido o sangre, ano inflamado y enrojecido.
- Exoftalmia

Los organismos patógenos mas frecuentemente diagnosticados en la tilapia son:

Bacterias: Las más comunes que pudieran presentarse durante el cultivo son las de los géneros *Aeromonas*, *Pseudomonas*, *Streptococcus*, *Corynebacterium*, *Vibrio*, *Flexibacter*, *Cytophaga*, *Mycobacterium* y *Nocardia*. Estas bacterias producen enfermedades como septicemias hemorrágicas bacterianas, enfermedad bacteriana del riñón, vibriosis, la enfermedad del pedúnculo caudal, enfermedad bacteriana de las branquias.

Hongos: Los más importantes están representados por los géneros *Saprolegnia*, *Ichthyophonus*, *Branchiomyces* y *Dermocystidium*, estos organismos son los responsables de enfermedades fúngicas de la piel, branquias, hígado, corazón y otros órganos que se infectan a través de la corriente sanguínea. Los hongos pueden causar la muerte por anoxia de gran número de huevos, crías, alevines y adultos.

Ectoparásitos: Los alevines y larvas de tilapia son severamente afectados por parásitos ciliados como *Epistylis*, *Chilodonella*, *Costia*, *Trichodina*, *Ichthyophthirius*, *Trichophyra* y *Apiosoma*, los que provocan mortalidades de hasta el 50%. Los monogeneos como *Gyrodactilus* y *Cichlidogyrus* los

cuales provocan úlceras y lesiones, destruyendo tanto aletas como branquias; principalmente en los alevines y en menor grado en los adultos, debido a su actividad de nutrición y por la acción de los ganchos y del órgano de fijación.

Los géneros *Lernaea* y *Argulus* se encuentran entre los copépodos ectoparásitos más peligrosos. Ellos, a través de un órgano de fijación succionan la sangre y ocasionan una pequeña hemorragia en el área afectada y producen heridas que quedan expuestas a la infección por patógenos oportunistas, lo que finalmente les puede producir la muerte.

2.11 Estrés en peces

El estrés es definido generalmente como “el estado o condición en el que la homeostasis de un individuo es alterada como resultado de un estímulo externo, llamado estresor”. Los estresores provocan cambios en el estado fisiológico del animal y este cambio es interpretado como la respuesta de estrés (Reddy and Lettherland, 1998).

Los estresores pueden agruparse en 3 grupos: ambientales, físicos y biológicos (Pickering, 1981, Wedemeyer y col. 1990).

Estresores ambientales:

Son los más comunes, incluyen principalmente las condiciones adversas provocadas por cambios en la composición química del agua. Cambios en los parámetros de calidad del agua tales como oxígeno disuelto, amonio, dureza, pH, contenido de gases o la presión parcial de los mismos, así como la temperatura cuando alcanzan valores extremos pueden provocar estrés en los peces. Altas concentraciones de metales en el agua, tales como cobre, cadmio, hierro y zinc también pueden causar estrés y muerte en los peces. Contaminantes tales como el arsénico, cloro, cianuro, fenoles, y bifenoles policlorinados son estresores potentes para todos los salmónidos.

Otros estresores ambientales potenciales son los insecticidas, herbicidas, fungicidas y foliantes (Iwama y col, 1997, Iwama 2002)

Estresores físicos:

Son todos aquellos cambios asociados a la manipulación, confinamiento, transportación y otras formas de alteración física. Ejercitar los peces hasta el agotamiento o mantenerlos en una red fuera del agua por un período de tiempo, pueden constituyen los modelos más comunes para inducir la respuesta de estrés para estudios fisiológicos en peces (Iwama, 2002).

Estresores biológicos:

Son aquellos que se manifiestan como caracteres hereditarios dominantes que pueden desarrollarse dentro de los tanques experimentales o en ambientes naturales. Los patógenos son considerados estresores biológicos (Iwama, 2002).

Como respuesta a esta variedad de estresores, los peces manifiestan toda una serie de cambios bioquímicos y fisiológicos para compensar los cambios que se le imponen y de esta forma combatir el estrés.

2.12 Respuesta de los peces al estrés.

La respuesta generalizada al estrés en los peces tiene diferentes niveles de organización que son definidos por Iwama y col. (2004), de la siguiente manera:

Cambios en el comportamiento:

Una de las demostraciones inmediatas de un estado de estrés en peces es la respuesta de cambio del comportamiento. Las actividades tales como alimentación, evitar la depredación, captura de presas, migración, y preferencia por el habitat son críticas para la supervivencia de un organismo y de la población, y los cambios en la forma de enfrentar estas actividades, son

utilizados comúnmente como indicadores de la acción de estresores ambientales (Little, 2002). Dependiendo de la naturaleza y de la magnitud del estresor, los peces pueden necesitar minutos o semanas para recuperar las condiciones pre-estrés. Los cambios en el comportamiento más importantes para la supervivencia del organismo, tienden a requerir menos tiempo para la recuperación de los indicadores normales (Schreck y col. 1997). En su revisión sobre este tema, Schreck y col. (1997) precisan que la respuesta más común, para mitigar la exposición al estresor, puede ser evadir el estrés o cambiar el comportamiento. Sin embargo, cuando esto no es posible, los cambios inducidos que se producen pueden entonces ser nocivos en cuanto a la respuesta del animal a su ambiente.

Las respuestas relacionadas con el cambio de comportamiento y las respuestas fisiológicas frente a un estresor están muy relacionadas, debido a que la respuesta de adaptación a un estresor mediante cambio del comportamiento, puede disminuir la demanda energética en los sistemas fisiológicos que deben responder a ella (Iwama y col., 2004)

Respuesta fisiológica al estrés:

En respuesta al estrés ocurren una serie de cambios bioquímicos y fisiológicos para compensar los impactos y se clasifican en primarios, secundarios y terciarios.

Respuesta primaria: Es la respuesta inicial que representa la percepción de un estado de excitación y se inicia una respuesta endocrina/neuroendocrina que forma parte de la respuesta generalizada al estrés en los peces (Gamperl y col. 1994). Esta respuesta incluye la rápida liberación a la circulación, de hormonas de estrés como las catecolaminas (CATS) y el cortisol. Las CATS son liberadas por el tejido cromafín de la glándula interrenal situada en el riñón anterior de los teleósteos y por terminales nerviosos del sistema nervioso simpático (Randall y Perry 1992). Balm y col. 1994, plantean que el cortisol es liberado del tejido interrenal, en el riñón

anterior, como respuesta de algunas hormonas pituitarias, principalmente de la hormona adrenocorticotrópica (ACTH)

Respuesta secundaria: Esta respuesta esta dada por varios efectos bioquímicos y fisiológicos asociados con el estrés, y mediado por hormonas de estrés que activan procesos metabólicos que provocan la alteración de los indicadores hematológicos y la química de la sangre (Vijayan y col. 1994).

Los indicadores de respuesta secundaria al estrés según Barton e Iwama (1991) dividen en 4 tipos (Tabla2):

Tabla 2. Algunos ejemplos de respuesta secundaria que han sido empleados como indicadores de estrés en peces

METABÓLICOS	HEMATOLÓGICOS	HIDROMINERALES	ESTRUCTURALES
Glucosa	Hematócrito	Cloruro plasmático	Cantidad y tamaño de las células
Ácido láctico	Hemoglobina	Sodio plasmático	interrenales
Glicógeno hepático y muscular	Eritrocitos	Potasio	Diámetro nuclear de las células
Carga energética adenilato hepático y muscular	Leucocrito	Proteínas	interrenales
	Leucocitos	Osmolaridad.	Morfología del tejido gástrico
Colesterol	Linfocitos: Eritrocitos		Índices órgano somáticos
	Trombocitos		Factor de condición
	Tiempo coagulación		

Respuesta terciaria: Esta respuesta afecta al individuo o a la población de peces. Si los peces son incapaces de aclimatarse o adaptarse al estrés, los cambios pueden afectar al organismo y esa exposición crónica al estrés, dependiendo de la intensidad y duración del mismo, puede provocar disminución del crecimiento y de la resistencia a enfermedades, disminución de la eficiencia reproductiva, de la eclosión, cambios en el comportamiento natatorio y de otras características

inherentes al individuo o a la población. Al nivel de la población, disminuye el reclutamiento y la productividad puede alterar la abundancia y diversidad de determinada especie en una comunidad. La susceptibilidad de los peces a diferentes estresores también provoca cambios genéticos, ya que son diferentes las respuestas al estrés entre las especies y entre diferentes poblaciones de una misma especie (Iwama y col. 2004).

Respuesta celular al estrés:

La respuesta celular está caracterizada por una familia de proteínas conocidas como *heat shock proteins* (*Hsp*). Las *Hsp* son proteínas celulares altamente conservadas que han sido detectadas en todos los organismos (Feder and Hoffmann 1999, Iwama y col. 1998). En estudios realizados en especies tomadas como modelos se identificaron 3 familias: *Hsp-90* (85-90 kDa), *Hsp70* (68-73 kDa) y un grupo de bajo peso molecular (16-24 kDa). En las células no estresadas hay una producción constitutiva de estas proteínas que son necesarias en el metabolismo de las proteínas para mantener la homeostasis celular (Fink y Goto, 1998) La *Hsp70* tiene la función de contribuir en el mantenimiento de las cadenas polipeptídicas, actuando como chaperonas moleculares y favorecen la reparación y degradación de las proteínas desnaturalizadas. La *Hsp-90* actúa en la formación de varios componentes del citoesqueleto, las enzimas y los receptores de las hormonas esteroides. Las de bajo peso molecular tienen diversas funciones que son muy específicas para una especie dada y no se parecen a otras *Hsps*, estas proteínas no tienen una función constitutiva conocida y son inducidas solamente durante el estrés. De forma colectiva estas proteínas tienen como importancia básica la división celular y el crecimiento en el proceso celular (Iwama y col, 2004)

Basu y col. 2002, explican la función que tienen las *Hsps* en varios aspectos de la fisiología de los peces, incluyendo el desarrollo y el envejecimiento, la fisiología del estrés y la endocrinología, la inmunología, consideraciones ambientales, la aclimatación y la tolerancia al estrés.

En peces se han realizado diversos estudios sobre el efecto de los cambios bruscos de temperatura en la expresión de las *Hsps*, sin embargo cada día se profundiza más en los efectos de estas proteínas en la fisiología y el rol protector de las mismas después de la exposición de los peces a estresores ambientales. Forsyth y col. 1997, y Ackerman e Iwama 2001 establecieron el incremento de los niveles de varias *Hsps* en tejidos de peces expuestos a patógenos bacterianos. Duffy y col. 1999 estudiaron la expresión de las proteínas frente a contaminantes ambientales como los metales pesados, Vijayan y col. 1998 observaron la variación frente a efluentes industriales y a hidrocarburos aromáticos, Hassanein y col. 1999 estudiaron las *Hsp* bajo el efecto de pesticidas en *Oreochromis niloticus*.

2.13 Los parámetros hematológicos como indicadores de estrés.

Los cambios en la composición de la sangre han sido empleados para evaluar las condiciones clínicas y fisiológicas de animales y humanos. Los parámetros sanguíneos tienen la ventaja, de que las muestras son relativamente fáciles de obtener y en determinadas circunstancias no se requiere del sacrificio de los animales. Sin embargo los indicadores sanguíneos difieren de una especie a otra y dentro de una misma especie pueden ocurrir cambios debido a factores ambientales. Debido a ello, a pesar de la gran cantidad de especies de peces que existen hay relativamente poca información sobre la composición sanguínea de los mismos. Antes de que los parámetros sanguíneos de una especie sean empleados para evaluar sus variaciones fisiológicas, tienen que establecerse los índices de referencia y realizar estudios paralelos en poblaciones impactadas y no impactadas de la misma especie (Leatherland y col. 1998)

El valor hematócrito, el contenido de hemoglobina, la fragilidad de los eritrocitos y algunos aspectos relacionados con la coagulación sanguínea, han sido empleados para evaluar la condición de salud en los peces. Los cambios en la hemoglobina, número de eritrocitos y valor hematócrito son indicativos de que ha ocurrido una hemodilución o una hemoconcentración debido a una deficiencia en la capacidad osmoreguladora que realizan los peces después de un estrés agudo. El aumento del conteo de eritrocitos puede ser ocasionado por una contracción esplénica o el aumento de tamaño de los eritrocitos por la acción de la epinefrina para facilitar la transferencia gaseosa (Nikinmaa, 1990). La disminución indica anemia o una reducción de los eritrocitos circulantes como resultado de una infección (Cardwell y Smith, 1971)

La presencia de células blancas circulantes, responsables de la producción de anticuerpos, es un buen indicador de salud en los peces. La disminución de estas células ocurre comúnmente durante la respuesta al estrés (Houston, 1990). Por ejemplo, la proporción de células en el conteo diferencial de leucocitos ha sido empleada para evaluar el efecto de compuestos terapéuticos como el permanganato de potasio en el bagre del canal *Ictalurus punctatus* (Darwish y col. 2001)

2.14 Indicadores de estrés y métodos para su evaluación.

Existe gran variedad de métodos disponibles para evaluar el efecto del estrés en los peces, sin embargo la posibilidad de realización de estos ensayos en peces esta limitada debido por una parte a lo complejo de estas determinaciones y a la poca cantidad de laboratorios que han desarrollado estos ensayos (Leatherland 1998) y por otra parte, a que estas técnicas son apropiadas solo para desarrollarlas en condiciones de laboratorios clínicos o de investigación, porque involucra procedimientos relativamente sofisticados y equipos costosos (Adams 1990a, Wedemeyer y col. 1990, Morgan e Iwama, 1997).

La evaluación del estrés en los peces fuera del laboratorio es una preocupación tanto para los acuicultores como para los biólogos. Sin embargo, existen varios métodos de campos descritos para el monitoreo de variables asociadas con el estrés en los peces que incluyen indicadores fisiológicos, físicos y hematológicos.

En el caso de los indicadores hematológicos, la variación de las células blancas circulantes en la sangre pueden ser determinadas por examen microscópico de frotis de sangre fijados (Houston, 1990). Un método que aunque menos preciso, también es útil y mas rápido, es la determinación del leucocrito o paquete de células blancas obtenidas en un tubo de microhematócrito (Mc Leay y Gordon,. 1977).

La determinación de hemoglobina, basada en el método de la cianometahemoglobina es el mas preciso (Houston, 1990), sin embargo el empleo del hemoglobinómetro para la evaluación del contenido de hemoglobina en sangre basado en el método de la oxihemoglobina puede ser tan exacto como el método basado en ensayos de laboratorio, solo requiere de gran destreza manual del analista, porque depende de su agudeza y discriminación visual (Morgan e Iwama, 1997).

El conteo del número de eritrocitos puede realizarse por métodos turbidométricos, este método fue establecido para sangre humana, sin embargo los eritrocitos de peces son más grandes que los humanos y además son nucleados, por lo que los conteos pueden estar sobrestimados (Iwama y col. 1995). El conteo usando cámara de Neubauer es preciso y accesible en condiciones de campo (Morgan e Iwama, 1997).

El hematócrito se realiza comúnmente en tubos capilares en centrifugas especiales que pueden ser empleadas en las granjas de cultivo y luego realizar la medición con lectores especiales o directamente con una regla (Morgan e Iwama, 1997)

La proporción de células blancas en la sangre (neutrófilos, linfocitos, monocitos, trombocitos), se determina con el examen de frotis sanguíneos fijados y coloreados y es este el método mas

preciso para este tipo de determinación, aunque requiere de la preparación de los analistas, Wedemeyer y Yasutake (1977), Doggett y col., (1987), Houston (1990) y Rowley (1990) describieron métodos detallados para el conteo de células.

En una revisión realizada por Lewis y col. (1999), indican que las proteínas de estrés pueden ser determinadas por varios métodos que incluyen *western blotting*, *slot blotting*, y métodos para su detección por anticuerpos, para su uso como biomarcadores de contaminación ambiental. Sagol y col. (2002), empleó un método de inmunoperoxidasa streptavidina biotina para detección de anticuerpos de *Hsp* en humanos. La técnica de *PCR* semicuantitativo fue empleada por Zao y col. (1995), para evaluar la expresión del RNAm de las proteínas de estrés (*Hsp70*) en conejos. En ratas ha sido empleada la técnica de *RT-PCR* semicuantitativo para la detección del mRNA de *Hsp70* (constitutiva e inducible) por Maloyan y col. (1999). La técnica de *PCR* en tiempo real también ha sido empleada para la detección y cuantificación de *Hsp* en peces (Sathiyaa y Vijayan 2003, Sathiyaa, 2001).

Sobre la base de lo descrito anteriormente y teniendo en cuenta la importancia que desde el punto de vista económico tiene el cultivo y desarrollo de la producción de la tilapia, nos propusimos profundizar sobre el conocimiento de esta especie y poner en manos de productores y técnicos dedicados al cultivo una herramienta útil y práctica para el manejo del estado de salud de sus animales y con ello obtener mejores rendimientos de producción.

3. HIPÓTESIS. OBJETIVOS GENERALES Y ESPECÍFICOS.

Hipótesis

Las variaciones en los parámetros hematológicos que ocurren en la tilapia bajo condiciones de estrés en cultivo, pueden utilizarse como bioindicadores de cambios originados por estrés.

Objetivo general

Establecer los indicadores hematológicos en tilapia que permitan identificar el índice de condición de estrés en la especie y su relación con los agentes causales de este, así como la relación de los mismos con indicadores celulares de estrés.

Objetivos específicos

- Establecer los índices hematológicos de referencia para la especie *Oreochromis aureus* en condiciones de cultivo.
- Establecer a escala experimental las variaciones hematológicas provocadas por estresores biológicos, ambientales y físicos.
- Establecer la relación entre los indicadores hematológicos y los indicadores celulares (*Hsp*) de estrés

4. MATERIALES Y MÉTODOS GENERALES.

Animales de ensayo, toma de muestra, análisis hematológicos. Procesamiento estadístico.

Los peces de la especie *Oreochromis aureus* fueron obtenidos de un sistema de cultivo semi-intensivo del centro de Desarrollo en Acuicultura de la Habana, Cuba. Los peces examinados presentaron una longitud total que osciló entre 16 - 24 cm y entre 75 – 275 g de peso.

Los peces fueron cultivados bajo condiciones óptimas para la especie de oxígeno (5-7 mg/L), pH (5.7-7.1), temperatura (25-27°C) y alimentación (4% de biomasa diario). Durante los bioensayos se mantuvieron dichas condiciones. La toma de muestra y los análisis hematológicos fueron realizados en las instalaciones de investigación del propio Centro de Desarrollo de Acuicultura en la Habana, Cuba. Se realizó una cuidadosa manipulación para minimizar el estrés, para lo cual los peces fueron capturados con redes y anestesiados en MS-222 a 80 mg/L (Prieto y col. 1986).

La sangre fue extraída de la arteria caudal con jeringuillas plásticas con agujas 21G previamente heparinizadas y fue vertida en tubos plásticos conteniendo heparina a razón de 0,5 mL por cada 3-4 mL de sangre.

Análisis hematológicos:

Las variables hematológicas evaluadas fueron: Hemoglobina (Hb), Hematócrito (Hto), Conteo de Eritrocitos (No E), Volumen Corpuscular Media (VCM), Hemoglobina Corpuscular Media (HCM), Concentración de Hemoglobina Corpuscular Media (CHCM). La concentración de hemoglobina fue determinada por el método de la cianometahemoglobina (Blaxhall y Disley, 1973). El hematócrito fue determinado como el volumen porcentual de células rojas en un microcapilar después de la centrifugación a 5000g por 5 min. El conteo de células rojas (NoE) se realizó manualmente con un hematocitómetro Neubauer usando solución Hayems como diluyente (Shaperclaus, 1979). El NoE, VCM, HCM y el CHCM fueron calculados, según las siguientes fórmulas:

NoE (cel/mm³) = Número de eritrocitos contados x 10 000/ mm³ (el conteo se realiza en cámara Neubauer)

VCM (fl) = Hematócrito x 10 / Recuento de Eritrocitos

HCM (pg) = Hemoglobina (g/dL) /Recuento de Eritrocitos

CHCM(g%) = HB (g/dL)x100/Hematócrito

Para los estudios morfológicos, la sangre fue fijada en metanol absoluto por 5 min y teñida con May-Grunwald y Giemsa (Schaepferclaus, 1992). Las muestras fueron observadas al microscopio biológico con objetivo 100x de aumento y 100 células blancas fueron categorizadas basado en su morfología (Dogett y col. 1987, Rowley, 1990). Para dar los rangos de referencia del diámetro de cada célula, se midieron 20 células blancas de cada tipo identificado, en 20 peces diferentes. Fueron observados 30 campos del microscopio de cada frotis examinado y la frecuencia de eritrocitos inmaduros y maduros fue registrada (100 x número de eritrocitos inmaduros o deformes/ número total de eritrocitos)

Para el estudio citoquímico, los frotis sanguíneos fueron sometidos a los siguientes métodos: Acido Periódico Schiff- PAS (Prophet y col. 1993) para la identificación de glucógeno y Sudán Negro B (Lison, 1960) para la identificación de lípidos

Procesamiento estadístico: La mayoría de los parámetros evaluados en nuestro estudio no tenían una distribución normal ni fue posible su transformación, por lo que las pruebas estadísticas empleadas fueron no paramétricas. Se empleó el análisis de varianza Kruskal-Wallis para $P \leq 0.01$ para establecer la diferencia entre los parámetros, con respecto al tiempo de exposición a los estresores ensayados y al control, si no se encontró diferencia significativa entre los controles solo se tomo un grupo de ellos para el análisis estadístico. Para determinar la diferencia significativa se aplicó la prueba de comparación múltiple de Student-Newman-Keuls para $P \leq 0.05$. Los resultados fueron expresados en medianas y rangos (25%-75%). Hrubec y col. (2000)

plantean que es incorrecto asumir que estos parámetros biológicos están distribuidos normalmente, por lo tanto los métodos no paramétricos son más exactos.

5. DESARROLLO

5.2 Parámetros hematológicos de referencia para la especie *Oreochromis aureus*.

Antecedentes

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. Por esto muchos fisiólogos de peces han retomado los estudios de la hematología, ya que ha probado ser una herramienta de diagnóstico valiosa en la evaluación de salud humana. Aunque la hematología de peces continúa ofreciendo el potencial de una herramienta valiosa, el progreso en establecer los rangos normales de los parámetros de la sangre ha sido lento y la literatura en esta área es aislada y a menudo incompleta.

Solo se han establecido para algunos teleósteos, algunos valores normales para un reducido número de parámetros hematológicos, debido a la carencia de las técnicas estandarizadas de colecta de muestras de sangre y medición de los parámetros (Blaxhall, 1972). Los análisis hematológicos son empleados como indicador para evaluar el estado de salud en los peces con el fin de detectar los cambios fisiológicos provocados por contaminantes, patógenos, cambios ambientales, etc. (Blaxhall, 1972, Duthie y Tort, 1985, Morgan y Iwama, 1997).

Los estudios hematológicos en peces resultan ahora mas útiles, debido al desarrollo creciente en la piscicultura y al mayor conocimiento de la contaminación de recursos dulceacuícolas naturales en las zonas tropicales. Tales estudios se han utilizado generalmente como indicadores eficaces y sensibles de los cambios fisiológicos y patológicos en peces (Iwama y col. , 1976; Chekrabarty y Banerjee, 1988).

Para poder emplearlos como herramienta de diagnóstico es necesario analizar dichos indicadores en peces saludables y en óptimas condiciones ambientales para establecer los valores de referencia de la especie.

El objetivo de este trabajo fue establecer los indicadores de referencia hematológicos de *Oreochromis aureus* de cultivo.

Materiales y Métodos

Se analizaron 100 peces, las muestras fueron tomadas a razón de 20 peces diarios, en el propio tanque de cultivo para establecer los índices hematológicos en condiciones controladas de producción. Para la comparación de los resultados obtenidos los animales se agruparon por clases de largo total a intervalos de 2 cm y por clases de peso a intervalos de 50g, se empleo en analisis de varianza de Kruskal-Wallis para $P \leq 0.01$.

Para establecer los intervalos de la referencia hematológicos de *Oreochromis aureus* se siguió la metodología propuesta en el año 1992 por el Comité para los Estándares del Laboratorio Clínico (NCCLS- siglas en inglés) y según lo sugerido en estas pautas, los datos se organizaron en orden ascendente y se eliminaron el 2.5% de los valores inferiores y superiores (2.5 y 97.2 percentil respectivamente) cubriendo así el 95% de los valores centrales. Los valores restantes proporcionaron el intervalo de la referencia, tomando el valor más bajo y el más alto.

Tsang y col. 1998, Hrubec y col. 2000, plantean que establecer valores hematológicos de referencia como ± 2 SD de la media son válidos solamente cuando los valores hematológicos siguen una distribución normal y en nuestro caso la mayoría de los indicadores no cumple este requisito, ni fue posible su transformación. Las técnicas para determinar correctamente intervalos de referencia han sido establecidas y las sugerencias para su uso e interpretación han sido discutidas ampliamente por el NCCLS(1992). Desgraciadamente, los valores de referencia no se utilizan de forma rutinaria en la medicina acuícola y el número de estudios en los cuales han sido

determinados para peces, es limitado. La mayoría de valores de la sangre determinados para los peces han sido publicados y expresados como \pm DS de la media.

Resultados

En la Tabla 3 se muestran los resultados parámetros hematológicos normales obtenidos para *O. aureus*.

Tabla 3. Índices de referencia de parámetros hematológicos para *Oreochromis aureus*. Mediana, rangos (25%-75%)

Parámetro	Mediana	Valor mínimo	Valor máximo
Hemoglobina (g)	6.2	4.6	8
Hematócrito (%)	26	15	33
Eritrocitos ($10^6/\text{mm}^3$)	1.18	0.7	1.72
VCM (fl)	226.24	150.9	297
HCM (Pg)	54.4	38.2	86.6
CHCM (g %)	24	15.7	37.2
Monocitos (%)	8	2	13
Linfocitos Jóvenes (%)	6.0	1	10
Linfocitos Maduros (%)	17.0	12	25
Trombocitos (%)	66.0	55	74
Neutrófilos (%)	4.0	1	7

No se hallaron diferencias significativas $p \leq 0.01$ entre los parámetros sanguíneos con respecto al peso o largo total de los animales. En relación con la morfología de los elementos celulares se identificaron seis tipos de células: eritrocitos, trombocitos, monocitos, neutrófilos, linfocitos maduros y jóvenes.

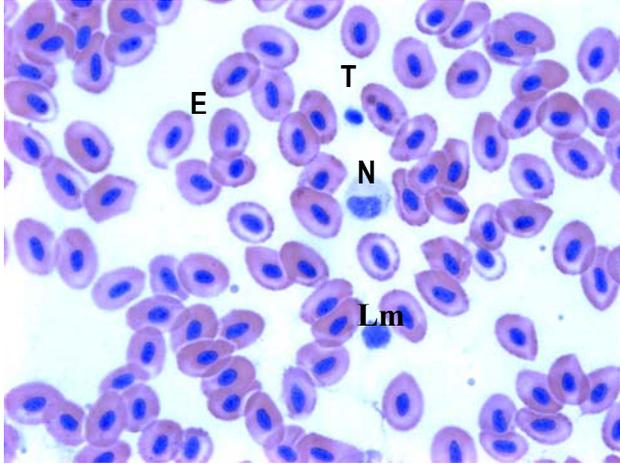


Fig.1 Frotis de sangre periferica normal de *O. aureus*. Tinción May- Grumwald-Giemsa. E- Eritrocitos, N - neutrófilo, T- trombocitos, Lm- Linfocitos maduros. Aumento 1000x

Los eritrocitos son nucleados, de forma elíptica y miden $7.25 \times 13.05 \mu\text{m}$. El núcleo también tiene forma elíptica, esta localizado en el centro de la célula, es de color púrpura con citoplasma acidófilo (Fig 1- E)

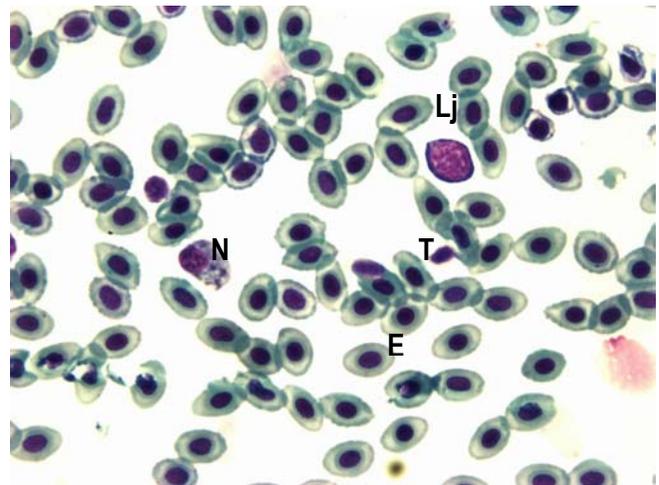


Fig.2 Frotis de sangre periferica normal de *O. aureus*. Tinción May-Grumwald-Giemsa. E- Eritrocitos, N- neutrófilo, T- trombocitos, Lj- Linfocitos jóvenes. Aumento 1000x

Los trombocitos presentaron un diámetro de $4.9 \times 5.8 \mu\text{m}$, son elípticos al igual que el núcleo que se localiza en el centro de la célula, el citoplasma es ligeramente basófilo. Estas células también se presentan con forma esférica. (Fig 1- T)

Las células blancas predominantes son los linfocitos maduros, estas células son pequeñas (4.7-5.2 μm), tienen forma irregular, poseen un núcleo redondeado rojo violeta y citoplasma azul (Fig 1-Lm). Las células jóvenes son de mayor tamaño (5.8-6.7 μm) con núcleo rojo - violeta y el citoplasma azul pálido(Fig 2-Lj). Los neutrófilos de 9.3- 10.6 μm de diámetro tienen forma redondeada y núcleo denso color rojo violeta, el citoplasma es rosado grisáceo (Fig 1-N).

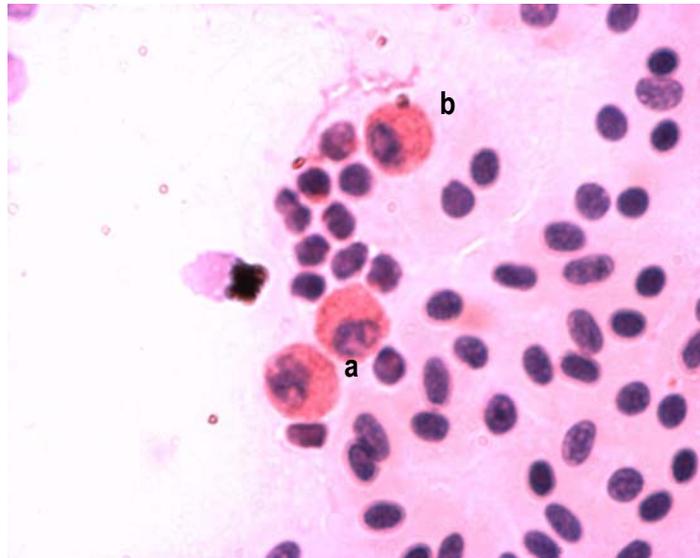


Fig. 3 Frotis de sangre periférica normal de *Oreochromis aureus* , teñida con Schiff- PAS. Neutrófilos (a) y monocito (b) positivos a Schiff- PAS

Los monocitos (9.5-10,9 μm) tienen forma redondeada con núcleo rojo - violeta generalmente excéntrico y citoplasma color gris humo (Fig 2- M)

En los hallazgos citoquímicos encontramos que entre todos los tipos celulares analizados, los neutrófilos y los monocitos presentan glucógeno en el citoplasma (Fig 3), y se observaron gránulos que indican la presencia de lípidos en el citoplasma de los neutrófilos(Fig.4).

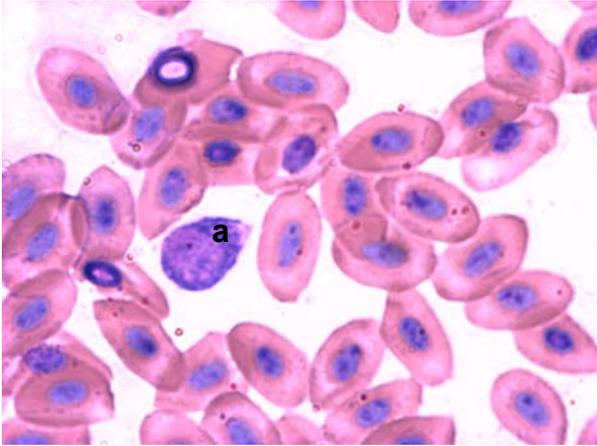


Fig.4 Frotis de sangre periférica normal de *Oreochromis aureus* , teñida con Sudán Black. Neutrófilo (a) con gránulos lipídicos positivo a Sudan Black . Aumento 1000x

Discusión

Al establecer los índices de referencia de *O. aureus* se obtuvo que los valores de hematócrito y número de eritrocitos son más altos que los registrados como normales para *Tilapia aurea* en Israel por Badawi y Said (1971) mientras que el de hemoglobina es mas bajo, lo que se refleja en los valores de HCM y CHCM. Estos autores establecieron como norma para esta especie: $1.29 \times 10^6 / \text{mm}^3$ el número de eritrocitos, 27.5% el hematócrito y 8.2 mg/L la hemoglobina. Resultados similares fueron obtenidos al establecer los parámetros hematológicos normales del híbrido *Aristhychthys nobilis* x *Hippophthalmichthys molitrix* (Silveira, 1987) bajo condiciones ambientales análogas. Pieterse y col. (1981) atribuye variaciones de este tipo al hecho de que se trata de poblaciones bajo diferentes condiciones de cultivo.

Con relación a las células blancas, las características morfológicas y de tinción observadas en nuestro estudio coinciden con las realizadas para peces por Ivanova (1983) así como por la que describe Ezzat y col. (1974) para *Tilapia zilli* quien también encontró que los linfocitos maduros eran las células predominantes para esa especie.

Por otra parte Hrubec y col. (2000), para el híbrido de *Oreochromis* observaron características morfológicas y tintoriales similares. Sin embargo para *O. aureus* no se observan los eosinófilos y basófilos identificados por Ueda y col. 1997 para *O. niloticus*. Los basofilos y eosinófilos tampoco fueron identificados en la sangre de la trucha arcoiris (Klontz, 1972), y la trucha marrón (Blaxhall y Daisley, 1973).

La citoquímica constituye un complemento indispensable para estudiar la presencia de ciertos componentes bioquímicos (enzimas o sustancias diversas) en el interior de las células sanguíneas circulantes en sangre periférica. Con el método *Sudán Black*, para la identificación de lípidos, también obtuvieron una reacción positiva solamente en los neutrófilos de *Pleuronectes platessa* (Ellis, 1976), de *Oreochromis mossambicus* (Doggett y col.1987) y de *Halobatrachus didactylus* (Sarasquete y Gutiérrez, 1982) en los neutrófilos y eosinófilos de *Oreochromis niloticus* (Ueda y col. 1997), débil y difusa en linfocitos, monocitos y trombocitos y fuerte en los gránulos de los neutrófilos de *Xiphophorus helleri* (Schütt y col. 1997). Fernández y col. (2001), indican que los neutrófilos en peces presentan tinción positiva por reacción al negro de Sudán. Las reservas adecuadas de lípidos son necesarias por los organismos para mediar los efectos del estrés (Lee y col. 1983) y para servir como almacenadores intermediarios de la energía durante períodos de condiciones ambientales adversas o de falta prolongada de alimentos (Adams y Mclean, 1985)

En relación con el método *PAS*, en diversas especies, la morfología y la positividad al *PAS* se asemejan a nuestros resultados. Fernández y col. (2001) plantean que los monocitos y neutrófilos, se tiñen positivamente por reacción al *PAS* tal y como en los neutrófilos y algunos monocitos de *Oreochromis niloticus* (Ueda y col., 1997); neutrófilos de *Pleuronectes platessa* (Ellis, 1976); *Halobatrachus didactylus* (Sarasquete & Gutiérrez, 1982) y *Oreochromis mossambicus* (Doggett y col.1987), La identificación del glucógeno en las células sanguíneas es importante, pues su

presencia está íntimamente ligada al abastecimiento de energía para la realización de la fagocitosis (Lee y col.1983).

5.2 Variaciones hematológicas provocadas por estresores biológicos, ambientales y físicos.

5.2.1 Estresores Biológicos: Inoculación experimental con patógenos bacterianos:
Corynebacterium sp., *Aeromonas sp*

5.2.1.1 Inoculación experimental con la bacteria *Corynebacterium sp.*

Antecedentes

Las enfermedades infecto contagiosas han sido un problema para el desarrollo de la acuicultura a escala mundial; pero no es hasta el surgimiento de los sistemas de cultivo intensivo que se focaliza la importancia económica de las pérdidas por este concepto, ya sea en términos de mortalidad o en costo de los tratamientos.

Dentro de los patógenos de mayor riesgo epizootico para el cultivo de la tilapia se encuentra una bacteria Gram positiva cuyas características bioquímicas y culturales permiten considerarlo dentro del género *Corynebacterium sp.* Entre los principales signos clínicos que provoca en los animales afectados están: anorexia, úlceras en la piel, exoftalmia, oscurecimiento de la piel, alteraciones en el movimiento natatorio y esplenomegalia.

Este microorganismo ocasiona mortalidades superiores al 70 % de la población infectada, mediante el desarrollo del proceso patológico conocido como Enfermedad Corinebacterica de la Tilapia, de ahí que nos propusiéramos conocer la influencia de este patógeno en los indicadores hematológicos de *O. aureus* de cultivo.

Materiales y Métodos.

Se inocularon 25 *O. aureus* (5 réplicas de 5 animales cada una) con 0.2 mL de una suspensión bacteriana de *Corynebacterium sp*, dejándose un control sin inocular y un control inoculado con solución salina peptonada estéril (0.1% peptona y 1.5% salina) a razón de 0.2 mL/g de peso corporal. La preparación del inóculo y diseño del experimento se realizó según Rodríguez y Prieto (1987) y consistió en que una cepa de *Corynebacterium sp* aislada de un proceso infeccioso natural en *O. aureus*, y mantenida en agar sangre humana al 5% se propagó en este mismo agar y luego de comprobada sus características culturales y bioquímicas, se incubó 24 horas a 36°C, se cosechó con salina peptonada estéril 0.1%, luego se lavó dos veces con salina peptonada a 3000 rpm durante 15 minutos. Se resuspendió el pellet en solución salina peptonada y se ajustó a una densidad óptica de 0.30 a 420 nm que correspondió a una carga bacteriana de 0.20×10^9 UFC/mL .

Se tomaron muestras de sangre a las 24, 48, 72, 96 horas y 20 días post inoculación, así como al control sin inocular

Resultados

En el ensayo de inoculación experimental de *O. aureus* con *Corynebacterium sp* no se observaron signos clínicos típicos de la enfermedad en ninguno de los peces inoculados. No se detectó mortalidad ni morbilidad en los peces de control no inyectados ni en los inyectados con solución salina peptonada.

Tabla 4. Parámetros hematológicos (mediana) de *O. aureus* inoculadas con *Corynebacterium sp.* de animales de ensayo y el control y rangos de referencia(25, 75 percentiles) de la especie

Parámetros	Índice referencia	Control	24 h	48h	72h	96h	20 días
Hemoglobina (g)	4.6-8.0	5,14 ^a	5,04 ^a	3,50 ^b	3,32 ^b	3,24 ^b	3,18 ^b
Hematócrito (%)	15-33	29 ^a	29 ^a	27 ^a	24 ^b	24 ^b	21 ^b
Eritrocitos (10 ⁶ /mm ³)	0.7-1.72	1,16 ^a	1,15 ^a	1,16 ^a	1,14 ^a	1,15 ^a	1,04 ^b
VCM (fl)	150.9-297	242,88 ^a	250,75 ^a	240,50 ^a	206,07 ^b	204,80 ^b	213,23 ^c
HCM (Pg)	38-86	44,38 ^a	43,74 ^a	30,18 ^b	28,96 ^b	28,02 ^b	30,66 ^b
CHCM (g %)	16-37	17,85 ^a	17,34 ^a	12,30 ^b	13,84 ^b	14,04 ^b	14,94 ^b
Monocitos (%)	2-13	7	7	11	11	9	7
Linfocitos Jóvenes (%)	1-10	8 ^a	6 ^a	8 ^a	12 ^b	9 ^a	17 ^b
Linfocitos Maduros (%)	12-25	20 ^a	18 ^a	11 ^b	6 ^c	10 ^b	7 ^c
Trombocitos (%)	55-74	63	62	61	60	62	65
Neutrófilos (%)	1- 7	3 ^a	2 ^a	10 ^b	8 ^b	9 ^b	12 ^b

Se observó (Tabla 4), a partir de las 48 h, una disminución significativa con respecto al control ($P \leq 0.05$) de la hemoglobina, el HCM y CHCM, esta disminución significativa se observó también en el VCM, el hematócrito a las 72 horas post-inoculación y el conteo de eritrocitos a los 20 días post-inoculación.

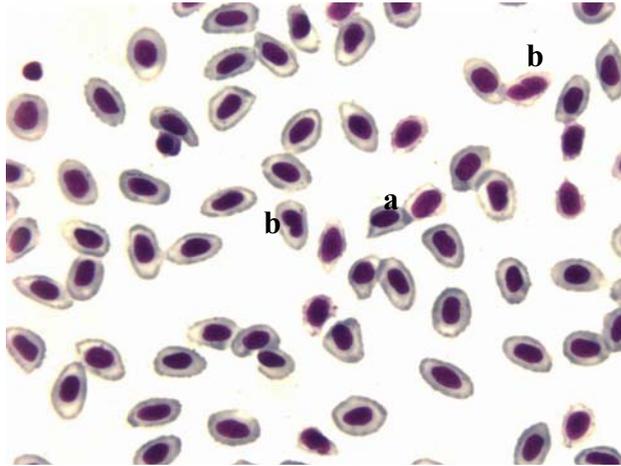


Fig.5 Frotis de sangre periférica de *O. aureus* inoculadas experimentalmente con *Corynebacterium* sp. Tinción May- Grumwald-Giemsa. Eritrocitos deformes (a), Eritrocitos con núcleos segmentados(b) Aumento 1000x.

En los frotis se observó aumento de neutrófilos (células fagocíticas) desde las 48 horas, de los linfocitos jóvenes a partir de las 48 horas y comenzó una disminución de linfocitos maduros a las 48 horas y 7.14% de eritrocitos inmaduros, 20% deformes y microcitos y 7% de eritrocitos con núcleos segmentados. (Fig 5). Estos cambios a partir de las 48 horas en Hb, HCM, CHCM estuvieron por debajo de los valores de referencia de la especie. Todas estas variaciones nos indica un proceso de anemia microcítica hipocrómica, que comenzó a las 48 horas de inoculación con el patógeno que afecta sin dudas el estado de salud de los animales de ensayo.

Discusión

Corynebacterium sp. es una bacteria gram-positiva del género *Corynebacterium* que ha provocado mortalidades en los sistemas de cultivo de tilapia en Cuba.

En la inoculación experimental realizada provocó en los animales una infección subclínica, de ahí que no se detectaran los signos clínicos del proceso infeccioso. De acuerdo al comportamiento de las constantes corpusculares y los hallazgos detectados en los eritrocitos en los frotis sanguíneos,

podemos además clasificar esta anemia como microcítica hipocrómica. Nakayasu y col. 2002, describen también anemia microcítica hipocrómica en *Paralichthys olivaceus* por la disminución del VCM y la anomalía estructural de los eritrocitos.

Oncorhynchus keta infectados con el Virus de la Necrosis Eritrocítica presentaron disminución del número de eritrocitos, hematócrito y hemoglobina; y aumento en la fragilidad de los eritrocitos con respecto al control sin inocular. Los valores hematológicos indicaron que los eritrocitos de estos peces infectados tenían VCM más alto, la CHCM más baja, y ligeramente más baja la HCM (Haney y col. 1992)

Tavares y col. 2004, encontraron cambios significativos con respecto al control en el conteo de eritrocitos, el VCM, la HCM y la CHCM, en *O. niloticus* inoculadas experimentalmente con la bacteria gram positiva *Mycobacterium marinum*, estos autores tampoco observaron signos clínicos de la enfermedad.

Barham y col. (1980) y Brenden y Huizinga (1986) también demostraron que los peces infectados tienen más eritrocitos inmaduros circulantes que los sanos. La disminución de los eritrocitos y el hematócrito de tilapia inoculadas con *M. marinum* podrían sugerir, un proceso similar al que ocurre en las aves (Hawkey y col. , 1990), como una tendencia a desarrollar anemia microcítica hipocrómica.

No hay estudios disponibles que permitan comparar las alteraciones del valor de la sangre en *O. aureus* infectada experimentalmente con *Corynebacterium sp*, pero el patrón de cambios en general, es semejante al observado en otras infecciones bacterianas (Brenden y Huizinga 1986; Yildiz1998).

5.2.1.2 Inoculación experimental con la bacteria *Aeromonas hydrophila*

Antecedentes

A la enfermedad causada en los peces por *Aeromonas hydrophila* se le conoce "Septicemia hemorrágica", "Septicemia motil por *Aeromonas*", "Enfermedad ulcerativa", entre otras. Los muchos sinónimos de esta enfermedad se relacionan con las lesiones causadas por esta bacteria que incluye lesiones septicémicas cuando las bacterias o las toxinas bacterianas están presentes dentro de órganos de los peces o en las úlceras de la piel de los animales afectados.

Aeromonas hydrophila es una bacteria gram-negativa, móvil, en forma de bacilo, que se puede aislar comúnmente en los cuerpos de agua dulce y es también un habitante normal del aparato gastrointestinal de los peces (Huss, 1998). La enfermedad afecta sobre todo peces de agua dulce tales como bagres, carpas, tilapias y muchas otras especies tropicales u ornamentales.

Dada la alta incidencia de esta enfermedad en los cultivos de tilapia, el objetivo del presente estudio fue caracterizar los indicadores hematológicos de peces afectados por *Aeromonas hydrophila*

Materiales y Métodos

Se inocularon 25 animales (5 réplicas de 5 animales cada una) con 0.2 mL de una suspensión bacteriana de *Aeromonas hydrophila*, dejándose además un control sin inocular y otro que se inoculó con solución salina peptona estéril (0.1% peptonada y 1.5% salina) a razón de 0/2 mL/g de peso corporal. El inóculo se preparó por siembra de la bacteria aislada de un proceso patológico en agar triptonsoya (TSA), incubación por 24 horas a 35°C, se cosechó con salina peptonada estéril 0.1% y se lavó 3 veces por centrifugación a 5000 rpm por 10 minutos con salina peptona estéril 0.85%, luego se resuspendió el pellet en solución salina peptona y se ajustó a una

densidad óptica de 0.30 a 420 nm que correspondió a una carga bacteriana de 10^{10} UFC/mL . Se administró en una dosis de 0.2 mL por g de peso del pez con una concentración según la escala de Mc Farland de 10^{10} bacterias/ mL por vía intraperitoneal.

Se tomaron muestras de sangre a las 24, 48, 72, 96 horas y 20 días post inoculación y al control

Resultados

En la inoculación con *Aeromonas hydrophila* se observó disminución de la Hb, la HCM y la CHCM a partir de las 48 h, se observó además una disminución con respecto al control ($P \leq 0.05$) del número de eritrocitos a partir de las 24 horas y se mantuvo hasta los 20 días post-inoculación (Tabla 5).

Se observó un aumento de los linfocitos jóvenes con respecto al control ($P \leq 0.05$) desde las 72 horas de inoculación, mientras que el porcentaje de linfocitos maduros disminuyó significativamente con respecto al control ($P \leq 0.05$) desde las 48 horas, y aumento de los neutrófilos con respecto al control ($P \leq 0.05$) desde las 48 horas de aplicado el inóculo bacteriano. Se apreció además abundancia de eritrocitos inmaduros y poiquilocitosis. Se observaron valores fuera de los rangos de referencia de la especie, para la hemoglobina a partir de las 72 horas, la HCM y CHCM a partir de las 48 horas y para linfocitos maduros y jóvenes a partir de las 72 horas y los neutrófilos desde las 48 horas.

Tabla 5. Valores (mediana) de los parámetros hematológicos de *O. aureus* inoculadas con *Aeromonas hydrophila*. Control sin inocular y rangos de referencia de la especie.

Parámetros	Índice referencia	Control	24 h	48h	72h	96h	20 días
Hemoglobina (g)	4.6-8.0	5.3 ^a	4.8 ^a	5.2 ^a	4.1 ^b	3.3 ^c	3.3 ^c
Hematócrito (%)	15-33	28.0	29	28	28	27	25
Eritrocitos (10 ⁶ /mm ³)	0.7-1.72	1.25 ^a	1.14 ^b	1.15 ^b	0.99 ^c	0.98 ^c	0.95 ^c
VCM (fl)	150.9-297	245.4 ^a	258.3 ^a	236.8 ^a	206.6 ^c	203.5 ^c	211.1 ^b
HCM (Pg)	38-86	42.9 ^a	43.75 ^a	29.8 ^b	34.0 ^b	32.6 ^b	34.7 ^b
CHCM (g %)	16-37	17.6 ^a	17.03 ^a	12.5 ^b	13.7 ^b	14.1 ^b	15.5 ^b
Monocitos (%)	2-13	7	7	8	8	9	7
Linfocitos Jóvenes (%)	1-10	8 ^a	6 ^a	8 ^a	12 ^b	9 ^a	16 ^b
Linfocitos Mad. (%)	12-25	20 ^a	18 ^a	14 ^b	6 ^c	7 ^c	5 ^c
Trombocitos(%)	55-74	59	67	58	56	57	53
Neutrófilos (%)	1- 7	5 ^a	5 ^a	16 ^b	18 ^b	18 ^b	19 ^b

Discusión

Aeromonas hydrophila es probablemente la especie bacteriana patógena más común en los peces de agua dulce. Es una bacteria móvil, gram negativa, habita el medio ambiente acuático y patógeno oportunista que invade los peces estresados e inmunocomprometidos y provocan las llamadas septicemias hemorrágicas en los organismos acuáticos.

Rehulka (2002), encontro en *Oncorhynchus mykiss* infectados con *Aeromonas hydrophila*, una reducción de los valores de número de eritrocitos (0.1 a 0.9 x10⁶cel/ml) , hematócrito (9 a 28.3%) y hemoglobina (1.4 a 4.5 g/dl) Waagbo y col. (1998) encontraron en *Salmo salar* con “Hitra disease” disminución de los valores de Hb, NoE y Hto asociados con síntomas de anemia severa.

Harbell y col. (1979) encontró los mismos resultados en *Oncorhynchus kisutch* infectado experimentalmente con *Vibrio anguillarum* altamente virulento. También Cardwell y Smith (1971) encontraron un efecto progresivo en los valores de Hto y Hb en juveniles de salmón chinook con vibriosis. Para una infección severa con *Aeromonas* en salmón del atlántico, Foda (1973) reportó una disminución de la Hb y Amend y Smith (1974) reportaron una disminución del número de eritrocitos, el valor hematócrito y la hemoglobina en truchas arcoiris infectadas con el virus IHN. Una disminución de la Hb, Ne y Hto junto a otros signos de anemia fue también descrita por Hoffmann y Lommel (1984) en casos de la enfermedad proliferativa del riñón.

Sin embargo Rehulka (2002) no apreció diferencias significativas entre el control y peces infectados en cuanto al VCM, la HCM y la CHCM, indicando que la anemia era debido a la pérdida de sangre por las lesiones en piel.

Brenden and Huizinga (1986) observaron un predominio de neutrófilos en la sangre de *Carassius auratus* L., después de 12 h de la inoculación experimental con *Aeromonas hydrophila*. Los neutrófilos, constituyen 4.5 a 18% de los leucocitos de la sangre, con un rango amplio entre las distintas especies. El citoplasma contiene numerosos gránulos, son pobremente fagocíticos, en el sentido que ingieren poco material extraño, pero poseen la mayoría de las enzimas presentes en los mamíferos y por lo tanto su rol primario sería la lisis extracelular por secreción de estas enzimas y otras sustancias antimicrobianas. Pueden producir severos daños tisulares por liberación de los radicales libres del oxígeno (Tyzard 1992)

El aumento del número de monocitos se explica debido a que son la principal célula fagocítica en los peces, por su capacidad de ingerir y digerir material extraño, inerte o antigénico, así como restos celulares resultantes de la respuesta inflamatoria u otros procesos degenerativos y al igual

que los neutrófilos, también tienen gran capacidad microbicida intra y extracelular (Fernandez y col, 2002).

5.2.2 Estresores Ambientales:

5.2.2.1 Efecto de los anestésicos: MS 222, benzocaína

Efecto del MS 222 sobre los indicadores hematológicos de *O. aureus*

Antecedentes

La manipulación a que son sometidos los peces para la toma de muestra puede ocasionarles alteraciones fisiológicas que pueden provocar cambios sobre los elementos de la sangre, Wurts (1995), Munday y Wilson, 1997; Slady y col., 2001; Woody y col. , 2001 plantean que también los anestésicos pueden causar estrés aunque su uso es benéfico porque controlan la excitabilidad de los peces. De igual forma son empleados cuando se realizan estudios hematológicos e histológicos para evitar alteraciones por sobre excitación o muerte de los animales (Roberts, 1989). No obstante ese posible estrés puede reducirse, si se emplean anestésicos inocuos a la especie en dosis y tiempos adecuados.

Para seleccionar correctamente que anestésico usar en los peces, es necesario conocer las características, propiedades y el uso que se les da a los mismos, ya que su acción depende de distintos factores.

El MS 222 es probablemente el anestésico de más amplio uso en los peces. En 1962 fue identificado como metasulfonato del ácido meta-amino benzoico de etil-éster. Es un compuesto sólido, que en solución al 10% mantiene su estabilidad durante tres días, pero decrece a un 5% después de transcurrido 10 días. Su exposición a la luz provoca un cambio de color tornándose amarillo-marrón, sin afectar su actividad.

Se han realizado muchos estudios sobre el efecto de este compuesto sobre la fisiología de los peces (Hatting 1977, Cho y Heath, 2000), sin embargo cada anestésico debe ser ensayado en cada especie antes de su empleo, ya que la respuesta de cada especie ante la concentración usada para inducir el estado de anestesia deseado es diferente y la respuesta fisiológica también es diferente.

El objetivo de la presente investigación es valorar el efecto sobre los parámetros sanguíneos de *Oreochromis aureus* del anestésico local MS 222.

Materiales y métodos

Se realizaron análisis hematológicos a 20 ejemplares de *O. aureus*, la concentración de MS 222 empleada fue de 90 ppm; superior a la establecida como óptima para inducir estado de anestesia en esta especie (80 ppm) por Prieto y col. (1986). Esta sustancia fue disuelta en una pequeña cantidad de agua y añadida al tanque antes de colocar los peces. Se tomaron muestras de sangre durante el periodo de anestesia y para la reuperación fueron transferidos a recipientes con agua sin anestésico, en donde se les tomó muestras de sangre a las 2 y 24 horas de recuperación. El grupo control fue constituido por peces sin anestesiar.

Resultados

Al emplear el MS 222 (Tabla 6) se observó que hay cambios significativos con respecto al control ($P \leq 0.05$) con incremento de hematócrito y disminución de la CHCM y aumento de linfocitos jóvenes a las 2h post-anestesia. Sin embargo a las 24 horas se observó una disminución del hematócrito ($P \leq 0.05$).

Tabla 6. Valores (medianas) de indicadores sanguíneos de *Oreochromis aureus* expuesta a 90 ppm de MS-222. Comportamiento a las 2 y 24 horas de recuperación de la anestesia

Parámetros sanguíneos	Índices de referencia	Control	Anestesiados	2h post- anestesia	24 h post-anestesia
Hematócrito %	15-33	32 ^b	30 ^b	40 ^a	35 ^{bc}
Hemoglobina g/dL	4.6-8.0	5.6	5.6	5.4	5.3
No Eritrocitos 10 ⁶ /mm ³	0.7-1.72	1.4	1.5	1.6	1.7
HCM (pg)	38-86	46.9	44.0	32.9	34.1
VCM (fL)	150.9-297	242.8	200.2	229.4	223.5
CHCM (pg)	16-37	21.4 ^a	22.0 ^a	13.41 ^b	15.6 ^b
Monocitos (%)	2-13	5	4	5	4
Linfocitos Jóvenes (%)	1-10	8 ^b	7 ^b	14 ^a	15 ^a
Linfocitos Maduros (%)	12-25	25	24	25	25
Trombocitos (%)	55-74	59	62	55	55
Neutrófilos (%)	1- 7	4	3	4	3

DISCUSIÓN.

El MS 222 es absorbido a través de las branquias y actúa sobre el sistema nervioso central y el sistema cardiovascular. Es metabolizado por el hígado, riñones, sangre y músculo, siendo la conjugación y la hidrólisis las principales rutas metabólicas.

El aumento del valor hematócrito, en dependencia del aumento de la concentración de anestésico, fue establecido por Soivo y col.1977, que indican que en trucha arco iris este valor aumenta a partir de los 5 minutos iniciales de anestesia con MS 222 y disminuyen hasta valores normales a las 4 horas de recuperación. Como en nuestro estudio, Hatting 1977, también encontró aumento del hematócrito en peces de agua dulce anestesiados con MS 222.

Ryan (1992) establece que cuando se emplean concentraciones altas, el incremento del valor hematócrito se debe al aumento del tamaño de los eritrocitos y a medida que esas concentraciones aumentan, entonces el aumento del hematocrito es provocado por eritrocitosis, es decir el aumento absoluto de la cantidad de eritrocitos en sangre periférica.

Cho y Heath 2000, compararon el efecto del MS 222 en el hematócrito y el conteo diferencial de células blancas de juveniles de *Oncorhynchus tshawytscha* tratados y no tratados con este anestésico y encontraron disminución del valor hematócrito 2 h después de la recuperación de anestesia así como aumento del número de trombocitos en los animales tratados.

Las variaciones en el porcentaje relativo de linfocitos en la sangre de los peces es una alteración observada comúnmente en peces bajo estrés (Sopinska, 1984). El cambio *O. aureus* observado en el recuento diferencial de leucocitos es el aumento de los linfocitos jóvenes y respecto a esta alteración. Vosylienė y Kazlauskienė (1999), refieren que es común el aumento de células sanguíneas jóvenes, en sangre periférica de *Carassius auratus* después de la exposición de estos peces a diferentes estresores.

Efecto de la benzocaína sobre los indicadores hematológicos de *O. aureus*

Antecedentes

La reducción del metabolismo de los peces, del estímulo visual, del consumo de oxígeno y de la excreción del amoníaco son algunas de las ventajas de usar anestésicos en la práctica acuícola (Schreck, 1982; Wurts, 1995). Por otra parte, varios otros estudios precisan los efectos negativos, o la ineficacia, de usar los anestésicos durante el transporte de algunas especies de peces (Strange y Schreck, 1978; Robertson y col., 1988).

La benzocaína y el MS 222 son similares en su acción y estructura química, pueden ser considerados anestésicos de acción local. El empleo de la benzocaína como anestésico de peces esta bien establecido aunque la respuesta a un anestésico depende de la especie, la edad, el nivel de fatiga y la condición de los animales y de factores ambientales, por esta razón es necesaria la evaluación de cada anestésico para cada especie.

La benzocaína (aminobenzoato de etilo) se encuentra dentro de la serie de anestésicos locales poco solubles en agua, es un ester del ácido para-aminobenzoico que carece del grupo amino terciario o secundario terminal. Con el presente trabajo estamos evaluando el efecto de dosis altas de benzocaína en los parámetros hematológicos de *O. aureus*

Materiales y métodos

Se realizaron análisis hematológicos a 45 ejemplares de *O. aureus*, la concentración de benzocaína probada fue de 100 ppm, superior a la establecida por Rodríguez y col. (1989) como óptima para inducir estado de anestesia en esta especie (85 ppm). Esta sustancia fue disuelta en una pequeña cantidad de agua y añadida al tanque antes de colocar los peces. Se tomaron muestras de sangre durante el periodo de anestesia y para la reuperación fueron transferidos a recipientes con agua sin anestésico, en donde se les tomó muestras de sangre a las 2 y 24 horas de recuperación. El grupo control fue constituido por peces sin anestesiarse.

Resultados

En *O. aureus* anestesiadas con benzocaína no se observaron cambios en los parámetros hematológicos estudiados (Tabla 7).

El porcentaje relativo de linfocitos maduros disminuyó ($P < 0.05$) a partir de las 2 horas de recuperación de la anestesia. Sin embargo, el porcentaje relativo de neutrófilos aumentó ($P < 0.05$) también a partir de las 2 horas de recuperación, tanto con respecto al control como a los índices de referencia de la especie. También se observaron cambios significativos con respecto al control

de los linfocitos jóvenes que disminuyen ($P < 0.05$) a las 2 horas, pero alcanza los valores del semejantes al control a las 24 horas, mientras que los trombocitos aumentan a partir de las 2 horas ($P < 0.05$), en el caso de los linfocitos jóvenes y trombocitos los cambios de los valores se mantuvieron dentro de los índices de referencia de la especie.

Tabla 7. Valores (medianas) de indicadores sanguíneos de *Oreochromis aureus* expuesta a 100 ppm de Benzocaína. Comportamiento a las 2 y 24 horas de recuperación de la anestesia. IR- Índices de referencia(rangos)

Parámetros sanguíneos	IR	Control	Anestesiados	2h post- anestesia	24 h post-anestesia
Hematócrito %	15-33	24	24.8	26.6	22.8
Hemoglobina g/dL	4.6-8.0	5.56	6.20	5.68	5.20
No Eritrocitos $10^6/\text{mm}^3$	0.7-1.72	1.33	1.34	1.20	1.21
HCM (pg)	38-86	42.0	44.3	46.9	42.8
VCM (fL)	150.9-297	180.1	184.8	221.3	187.4
CHCM (pg)	16-37	23.4	25.6	21.7	23.4
Monocitos (%)	2-13	5	5	5	6
Linfocitos Jóvenes (%)	1-10	6 ^a	7 ^a	3 ^b	5 ^a
Linfocitos Maduros (%)	12-25	22 ^a	24 ^a	9 ^b	8 ^b
Trombocitos (%)	55-74	63 ^a	59 ^a	68 ^b	66 ^b
Neutrófilos (%)	1- 7	4 ^a	5 ^a	14 ^b	15 ^b

Discusión

La benzocaína también es ampliamente usada como anestésico de peces y químicamente es semejante al MS 222 ya que ambos son derivados del ácido para-aminobenzoico.

Muchos estudios han demostrado los efectos contradictorios de los anestésicos dependiendo del producto empleado, la especie del pez, el equipo de transporte empleado entre otros (Strange y Schreck, 1978; Tomasso y col., 1980; Mishra y col., 1983; Robertson y col., 1988). Según

McDonald y Milligan (1997), el estrés provoca la hemoconcentración en muchos peces de agua dulce, lo que se observa por el aumento del valor del hematócrito.

Labeo umbratus mostró reducción del hematócrito después del estrés de la captura y del transporte (Hattingh y Van Pletzen, 1974). Sin embargo, a pesar de la ausencia de diferencias significativas en el valor hematócrito, entre los niveles iniciales y los niveles obtenidos en el muestreo siguiente, leves variaciones fueron observadas durante el período de la recuperación, que puede ser resultado de la presencia de los mecanismos adaptativos (Wedemeyer, 1997). Falanghe y col. 2002 no encontraron diferencias significativas en el valor hematócrito de *Brycon cephalus* después de anestesiados con benzocaína.

Wedemeyer (1970) realizó una comparación entre benzocaína y MS 222 como anestésicos para los salmónidos y demostró que la benzocaína era ligeramente menos dañina porque inducía menos cambios metabólicos. Soivio y col. (1977) demostraron pocas diferencias entre los dos aunque ambos causaron hiperglicemia, en menor grado la benzocaína que el MS 222.

Falanghe y col. 2002 encontraron que después del empleo de benzocaína para el transporte de *Brycon cephalus* disminuyó el número de linfocitos mientras que aumentó el porcentaje de neutrófilos, resultados semejantes a los encontrados en nuestro ensayo con *O. aureus* empleando el mismo anestésico.

5.2.2.2 Efecto de contaminantes ambientales: nitrito, plomo

Contaminación experimental con nitrito y su efecto en los parámetros sanguíneos de *O. aureus*.

Antecedentes

La presencia de nitrito en el agua ha sido investigada con frecuencia en los últimos años, dada las características de este compuesto como contaminante potencial de fuerte acción tóxica, de gran interés en la acuicultura.

El nitrito es un producto intermedio de la nitrificación de amonio que puede alcanzar concentraciones tóxicas en los sistemas acuícolas cuando ocurren desbalances entre las bacterias nitrificantes (Scarano y col., 1984)

Los límites inferiores de la acción tóxica del nitrito en los peces no están definidos claramente. Las variaciones en los reportados de toxicidad aguda de éste compuesto son causadas presumiblemente por las diferencias de especie, talla, por el efecto químico del agua, así como por la protección que proporciona el ión cloro (Wedemeyer y Yasutake, 1977)

Muchos investigadores han reportado la toxicidad del nitrito en los peces debido a que se difunde hacia los eritrocitos donde la hemoglobina se oxida a metahemoglobina con la subsiguiente reducción de la capacidad de transporte de oxígeno y de la afinidad por el oxígeno (Scarano y Saroglia, 1984; Scarano y col., 1984; Tomasso, 1986). En la mayoría de los casos sólo se ha realizado ésta variación de la sangre por ser considerada la más importante y no se ha profundizado en otros efectos que pueda causar el nitrito sobre los demás parámetros hematológicos.

Por lo anterior, con la presente investigación nos propusimos conocer la variación de diferentes índices hematológicos de *Oreochromis aureus* expuestas a altas concentraciones de nitrito.

Materiales y métodos

Se utilizaron en el ensayo grupos de 6 peces distribuidos en 5 tanques de fibra de vidrio. La concentración utilizada fue 30 mg/L NO₂ en 4 tanques y se dejó uno como control, la concentración apropiada para el cultivo de tilapia en agua dulce es 27mg/L (Popma y Masser, 1999). Para obtener las concentraciones de nitrito deseadas en los tanques experimentales se le adicionó el nitrito de sodio (Na NO₂) y la concentración obtenida fue confirmada al inicio y final del experimento por el Método de sulfanilamida naftilendiamina. Se realizaron muestreos de 6 peces a las 2, 6, 24 y 48 horas. En la exposición a altas concentraciones de nitrito no hubo mortalidades.

Resultados

Se observó disminución del hematócrito ($P \leq 0.05$) con respecto al control, desde las 2 horas de tratamiento (Tabla 8) y de la hemoglobina desde las 24 horas de tratamiento. La CHCM aumenta con respecto al control ($P \leq 0.05$) desde las 2 horas de tratamiento. El VCM disminuye respecto al control ($P \leq 0.05$) a partir de las 2 horas de tratamiento, mientras que la HCM disminuye a partir de las 24 horas. Como se observa en la tabla, los valores de hematócrito, hemoglobina y del VCM estaban fuera de los índices de referencia de la especie. No se observaron cambios significativos en el conteo diferencial de leucocitos.

Tabla 8. Valores medios de los parámetros sanguíneos de *Oreochromis aureus* contaminados con nitrito según los distintos tiempos de exposición. Valores medios del control e índices de referencia de la especie. Superíndices no coincidentes difieren entre sí para $P \leq 0.05$.

Parámetros	IR	Control	2h	6h	24h	48h
Ht (%)	15-33	25 ^a	13.2 ^b	16 ^c	13.8 ^b	17.6 ^c
Hb (g%)	4.6-8.0	5.34 ^a	4.37 ^a	5.2 ^a	4.2 ^b	4.2 ^b
Eritrocitos($10^6/\text{mm}^3$)	0.7-1.72	1.05	0.9	1.12	0.9	0.9
CHCM (g%)	16-37	21.63 ^c	32.4 ^a	32.7 ^a	30.2 ^a	25.3 ^b
VCM (fl)	150.9-297	238.1 ^a	151.9 ^c	148.3 ^c	149.4 ^c	193.2 ^b
HCM (pg)	38-86	50.9 ^a	52.6 ^a	47.8 ^a	45.6 ^b	45.9 ^b
Monocitos (%)	2-13	5	4	6	4	5
Linfocitos Jóvenes (%)	1-10	8	8	8	7	8
Linfocitos Maduros (%)	12-25	23	24	24	23	24
Trombocitos (%)	55-74	60	62	62	61	61
Neutrófilos (%)	1- 7	3	3	3	3	3

Discusión

El nitrito es un producto intermediario en la oxidación de amonio a nitrato, es más tóxico en peces de agua dulce que en peces marinos. Los peces dulceacuícolas toman el nitrito a través de las

branquias lo cual afecta los tejidos y el sistema inmune del organismo. Esta respuesta es similar al mecanismo de bioacumulación de los contaminantes, no sólo en el plasma sino también en branquias, hígado, cerebro, y músculos (Margiocco y col. 1983)

El nitrito es tóxico para muchas especies de peces por su efecto en la hemoglobina, sin embargo la tilapia es más tolerante a la toxicidad por nitrito que muchas especies de agua dulce, sin embargo Popma y Masser 1999, refieren que para la tilapia bajo determinadas condiciones, la LC₅₀ a las 96 h es de 89 mg/L, aunque la concentración apropiada para el cultivo en agua dulce es 27 mg/L, por otro lado Palachek y Tomasso 1984 plantean una LC₅₀ a las 96 h para *Tilapia aurea* de 16,2 ± 2.3 mg/L. Atwood y col. 2001 establecieron que para la tilapia la tolerancia al nitrito depende de la talla, ya que en animales de 4.4g de peso la LC₅₀ a las 96h es de 81mg/L mientras que para animales de 90g la LC₅₀ es de 8 mg/L.

Las concentraciones de nitrito en el agua empleadas en nuestro experimento, indujeron un proceso de anemia microcítica en *O. aureus*, provocada por un trastorno en la síntesis de hemoglobina debido a la disminución de oxígeno en la sangre. Cuando el nitrito entra en el flujo sanguíneo, reacciona con la hemoglobina y forma un compuesto llamado metahemoglobina. Este compuesto reduce la capacidad de la sangre para transportar oxígeno a través del organismo (Brown y Mc Leay, 1975; Watanabe y Yasutake, 1978; Tomasso, 1986). Desde el punto de vista tóxico la metahemoglobina aparece cuando la hemoglobina es oxidada a una tasa superior a la capacidad enzimática normal para reducir la hemoglobina.

Contaminación experimental con plomo y su efecto en los parámetros sanguíneos de *O. aureus*.

Antecedentes

Los efectos tóxicos de metales pesados en peces son multidireccionales, y se manifiestan por los numerosos cambios en los procesos fisiológicos y químicos de sus sistemas corporales (Dimitrova

y col., 1994). La toxicidad subletal produce efectos hematológicos y neurológicos (Hodson y col., 1984). Como se conoce, el plomo causa la destrucción de los eritrocitos maduros y por tanto inhibición de la formación de hemoglobina. Esto provoca anemia por exposición a altos niveles de plomo o eritropoyesis compensatoria cuando la exposición es ligera (Hodson, 1976; Hodson y col., 1977; Hodson y col., 1978a, b). Los efectos neurológicos incluyen el deterioro del comportamiento, el oscurecimiento de la región caudal (colas negras), y eventuales curvaturas espinales (Hodson y col., 1978a, 1979, 1980). El plomo puede también afectar el metabolismo de la glucosa según lo demostrado por Salmerón-Flores y col. (1990), quienes divulgaron el incremento de la concentración de la glucosa en sangre en *Sarotherodum aureus* en respuesta a la exposición de plomo.

Materiales y métodos

Para evaluar el efecto del plomo en *O. aureus* 4 grupos de 5 peces cada uno, fueron colocados en recipientes de fibras de vidrio de 100L de capacidad y expuestos a una concentración subletal de 15 mg/L de acetato de plomo [Pb (CH₃COO)₂]. Khallaf y col 1999, establecen 30 mg/L como dosis subletal de acetato de plomo para la tilapia. El contaminante fue diluido y adicionado al agua antes de colocar los peces en los tanques. Un grupo de 5 animales mantenido en iguales condiciones, pero sin la adición de la solución de plomo fue mantenido como control y muestreado al final del experimento. Se tomaron muestras de sangre a las 24, 48, 72 y 96 horas de exposición.

Resultados.

Como se observa en la Tabla 9 el contenido de hemoglobina disminuye significativamente con respecto al control ($P \leq 0.05$) desde las 48h, el número de eritrocitos y la CHCM disminuyen significativamente con respecto al control ($P \leq 0.05$) a partir de las 72 horas.

Se observó además lisis de los eritrocitos, aumento del número de eritroblastos a partir de las 24 horas, los eritrocitos mostraron esquistocitosis o fragmentación (Fig.6). En las células blancas se observó aumento significativo con respecto al control de linfocitos jóvenes y neutrófilos, así como disminución significativa con respecto al control ($P \leq 0.05$) de linfocitos maduros y trombocitos.

Tabla 9. Valores (medianas) de los parámetros sanguíneos de *Oreochromis aureus* contaminados con plomo según los distintos tiempos de exposición. Valores (medianas) del control e índices de referencia de la especie. Superíndices no coincidentes difieren entre si para $P \leq 0.05$.

Parámetros	IR	Control	24h	48h	72h	96h
Ht (%)	15-33	19	18	18	19	19
Hb (g%)	4.6-8.0	5.6 ^a	4.7 ^a	4.5 ^a	2.9 ^b	2.8 ^b
Eritrocitos($10^6/\text{mm}^3$)	0.7-1.72	1.2 ^a	0.9 ^a	0.7 ^a	0.56 ^b	0.6 ^b
CHCM (g%)	16-37	19.7 ^a	25 ^a	25 ^a	15.2 ^b	14.7 ^b
VCM (fl)	150.9-297	237.5	211.1	250.0	321.4	350.0
HCM (pg)	38-86	46.7	52.2	62.5	55.0	46.0
Monocitos (%)	2-13	5	4	6	5	5
Linfocitos Jóvenes (%)	1-10	9 ^b	8 ^b	15 ^a	14 ^a	15 ^a
Linfocitos Maduros (%)	12-25	15 ^b	24 ^a	20 ^b	12 ^c	12 ^c
Trombocitos (%)	55-74	64 ^a	58 ^c	50 ^b	52 ^b	47 ^b
Neutrófilos (%)	1- 7	6 ^a	6 ^a	11 ^c	21 ^b	23 ^b

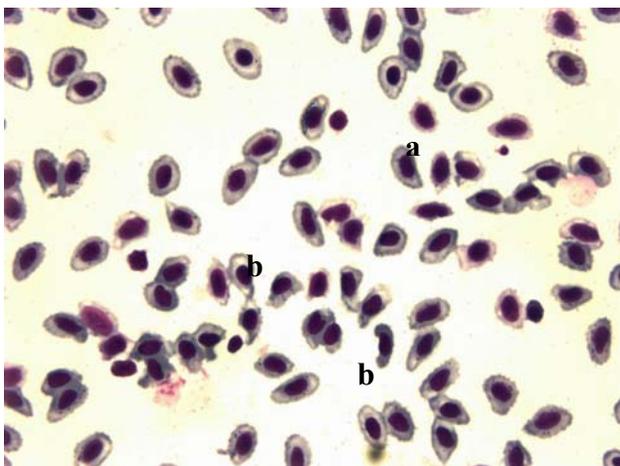


Fig.6 Frotis de sangre periférica de *O. aureus* sometida a exposición de 15 mg/L de plomo. Se observan microcitos(a), eritrocitos fragmentados(b). Aumento 1000x.Tinción May-Gruwald-Giemsa

Discusión

La toxicidad subletal del plomo produce efectos neurológicos y hematológicos en los peces (Hodson y col., 1984). En *Anguilla anguilla* el plomo causa en el conteo diferencial de células sanguíneas un incremento del número de linfocitos, pero no se observan cambios en la concentración de hemoglobina ni en el conteo de eritrocitos de peces expuestos con respecto al control (Santos y Hall, 1990).

La disminución de los niveles de Hb, conteo de eritrocitos y concentración de hemoglobina corpuscular media en la sangre, ha sido descrita también por Srivastava y Agrawal, 1979 para *Colisia fasciatus* expuestas a concentraciones subletales de plomo, quien identificó el proceso como anemia hemolítica ya que observó como en nuestro caso, lisis de los eritrocitos. Mc Donald y col. (1998) indican que la presencia de esquitocitos o eritrocitos fragmentados en sangre son comunes en la anemia hemolítica.

Como respuesta a este signo se observó en *O. aureus*, un aumento de la cantidad de eritrocitos jóvenes a partir de las 24 horas de exposición al tóxico, manteniendo esta característica hasta las 72 horas. Albahary (1972) señaló que esta reacción ocurre en respuesta a la producción de una eritropoyesis compensatoria, la cual puede resultar del incremento de la fragilidad o grado de destrucción de los eritrocitos circulantes.

La disminución de la hemoglobina y de la CHCM ocurre debido al que el plomo inhibe parcialmente el proceso enzimático de la biosíntesis del HEM constituyente de la hemoglobina (Sonnenwirth y Jarret, 1983), según Basley (1999) este metal causa anemia por inhibición de la síntesis de hemoglobina.

El aumento del número de neutrófilos y las alteraciones morfológicas de las células rojas, son características que se observan asociadas a la anemia hemolítica (Davidson y Bernard, 1982),

5.2.2.3 Efecto del uso de sobredosis de medicamentos: Verde Malaquita y Triclorfon

Efecto del verde malaquita sobre los índices sanguíneos de *O. aureus*

Antecedentes

El verde malaquita es un colorante orgánico de amplio uso como ectoparasitocida y fungicida en el cultivo de peces (Alderman 1985; Fitzpatrick y col. 1995). La literatura relacionada con la toxicidad y uso de verde malaquita como terapéutico es muy variada.

Algunos autores refieren concentraciones para el tratamiento de huevos y de diferentes especies de peces a diferentes tiempos de tratamiento que van desde 50 µg/L hasta 200 µg/L, sin embargo para *Centrarchidae* se refiere una LC-50 de 20 µg/L mientras que para *Salmonidae* la LC-50 es de 100 µg/L (Van Duijn 1973; Schaeperclaus 1992; Amlacher 1986; Bills y col. 1977). Sin embargo Molnar (1995) establece concentraciones de 0,5 a 10 mg/l para el tratamiento de ectoparasitos en *Cyprinus carpio*.

Esto indica la alta toxicidad de este compuesto para algunas especies, por lo que su uso debe ser manejado con cuidado, ya que pueden constituir una fuente adicional de estrés para los animales en cultivo, además en la trucha arcoiris ha sido reportado que provoca carcinogenesis, mutagénesis, fracturas cromosomales, teratogenicidad y reducción de la fertilidad después de tratamientos con verde malaquita (Amlacher, 1961; Nelson, 1974; Bills y col., 1977; Schnick y Meyer, 1978; Meyer y Jorgensen, 1983).

Dado los efectos de este compuesto terapéutico y profiláctico de uso en el cultivo de la tilapia, el objetivo de este estudio fue evaluar el efecto de altas dosis de este compuesto sobre los indicadores sanguíneos de *O. aureus*.

Materiales y métodos

Se colocaron grupos de 6 animales en tanques de fibra de vidrio, la unidad experimental consistió en un control y 5 réplicas. La concentración ensayada fue de 1,0 mg/L de Verde Malaquita (p,p-benzidenebis- N,N-dymethylanilina). Esta sustancia fue disuelta en una pequeña cantidad de agua y añadida al tanque antes de colocar los peces. Se tomaron muestras de 6 peces a las 2, 6, 24 y 48 horas de exposición.

Resultados

Como se observa en la Tabla 10, el empleo de altas dosis de verde malaquita provocó aumento del hematócrito, así como disminución de la CHCM a partir de las 24 horas de exposición con respecto al control ($P \leq 0.05$).

Se observó además, abundancia de eritroblastos y presencia de eritrocitos triangulares (Fig.7) y en el conteo diferencial de células blancas se halló aumento significativo, con respecto a control ($P \leq 0.05$), del porcentaje de neutrófilos y disminución de linfocitos maduros y trombocitopenia.

Tabla 10 Valores (medianas) de los parámetros sanguíneos de *Oreochromis aureus* expuestos al verde malaquita en distintos tiempos. Valores (medianas) del control e índices de referencia de la especie. Superíndices no coincidentes difieren entre si para $P \leq 0.05$.

Parámetros	IR	Control	2h	6h	24h	48h
Ht (%)	15-33	31 ^a	29 ^a	28 ^a	37 ^b	38 ^b
Hb (g%)	4.6-8.0	5.6	6.3	6.5	4.9	5.4
Eritrocitos($10^6/\text{mm}^3$)	0.7-1.72	1.4	1.5	1.6	1.6	1.4
CHCM (g%)	16-37	19.3 ^a	22.0 ^a	21.9 ^a	13.2 ^b	14.8 ^b
VCM (fl)	150.9-297	235.7	213.3	170.5	218.7	269.2
HCM (pg)	38-86	46.6	40.0	41.2	32	39.2
Monocitos (%)	2-13	7	5	6	7	7
Linfocitos Jóvenes (%)	1-10	8	6	8	7	8
Linfocitos Maduros (%)	12-25	20 ^a	18 ^a	19 ^a	14 ^b	12 ^b
Trombocitos (%)	55-74	61 ^a	67 ^a	60 ^a	56 ^b	56 ^b
Neutrófilos (%)	1- 7	5 ^a	5 ^a	7 ^{ab}	16 ^{ac}	19 ^c

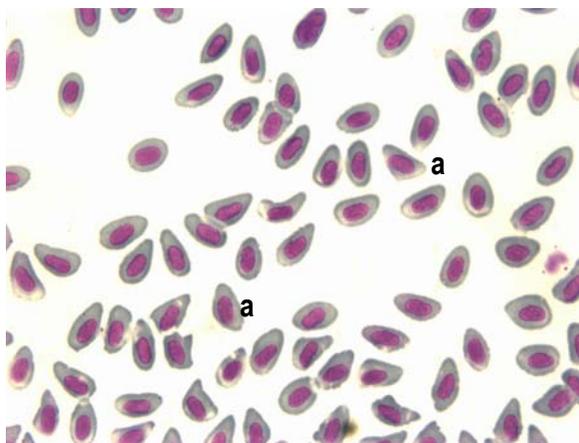


Fig. 7. Frotis sanguíneo de *O. aureus* expuesta a verde malaquita. Eritrocitos triangulares(a). Tinción MayGrunwald-Giemsa. Aumento 1000x

Discusión

El efecto del verde malaquita sobre los indicadores sanguíneos ha sido estudiado para diferentes especies: reducción del hematócrito y respuesta anémica ha sido indicada en trucha arcoiris y

Clarias gariepinus (Tanck y col., 1995; Musa y Omoregie, 1999). *H. fossilis* mostró disminución del conteo de eritrocitos, de la hemoglobina y del hematócrito con incremento del conteo total de leucocitos y aumento del tiempo de coagulación de la sangre después de la exposición al verde malaquita (Srivastava y col., 1996). En *Cyprinus carpio* la exposición por 6 días al verde malaquita provocó disminución del Hto, del VCM y aumento de la CHCM (Svobodova y col., 1997).

Sin embargo, aumento del hematócrito, como en nuestro caso, fueron observados en la trucha arcoiris tratada con verde malaquita (Alderman y Clifton-Hadley, 1993). En *Ictalurus punctatus* (bagre del canal) se encontró aumento de los eritrocitos y de la hemoglobina después de 3 días de tratamiento, pero con eritrocitosis y leucopenia después de 7 y 21 días respectivamente. (Grizzle, 1977).

Hvalek y Bulkey, 1980 encontraron neutrofilia en la sangre de trucha arcoiris a partir de las 24 horas, pero ésta disminuía a los 4 días post-tratamiento.

Efecto del Triclorfon sobre los índices sanguíneos de *O. aureus*

Antecedentes

El triclorfon (ácido dimetilfosfónico, 2,2,2-tricloro-1-hidroxietil éster), también comercializado como Masoten, (Bayvet), Dylox, (Mobay), o Neguvon, (Bayer) es un pesticida organofosforado de uso agrícola, inhibidor de la acetilcolinesterasa por lo que su uso no está permitido, a pesar de ello es empleado ampliamente en la acuicultura por su efectividad para el tratamiento de ectoparasitosis por tremátodos monogéneos, copépodos, etc en peces de cultivo (Kabata 1985; Post 1987; Dunier y col. 1991; Baticados y Paclibare 1992; Subasinghe 1992; Tonguthai y Chanratchakool 1992).

A pesar del amplio uso que tiene este producto en la acuicultura existe muy poca información sobre el efecto de este compuesto en el estado fisiológico de los peces, de ahí nuestro interés en

establecer la acción de este órgano fosforado de uso acuícola sobre los parámetros sanguíneos de *O. aureus*.

Materiales y métodos

Se colocaron grupos de 6 animales en tanques de fibra de vidrio, la unidad experimental consistió en un control y 5 réplicas. Las concentraciones ensayadas fueron 27,5 mg/L de Triclorfon((2,2,2-trichloro-1-hydroxyethyl)-phosphonic acid dimethyl ester). Herwig (1979) refiere concentraciones de 27,5 mg/L como LC 50 a las 96 h. Esta sustancia fue disuelta en una pequeña cantidad de agua y añadida al tanque antes de colocar los peces. Se tomaron muestras de 6 peces a las 2, 6, 24 y 48 horas de exposición.

Resultados

El Triclorfon no ocasionó cambios en la Hb, Hto y NoE ni en las constantes corpusculares, aunque si se observó diferencia significativa con respecto al control ($P \leq 0.05$) a partir de las 24h, con aumento de los neutrófilos, disminución de los linfocitos maduros y disminución de los trombocitos (Fig 8); así como abundancia de eritroblastos y presencia de eritrocitos triangulares, amitosis. También se observó la presencia de eosinófilos en sangre periférica(Fig 9) células poco comunes en esta especie.

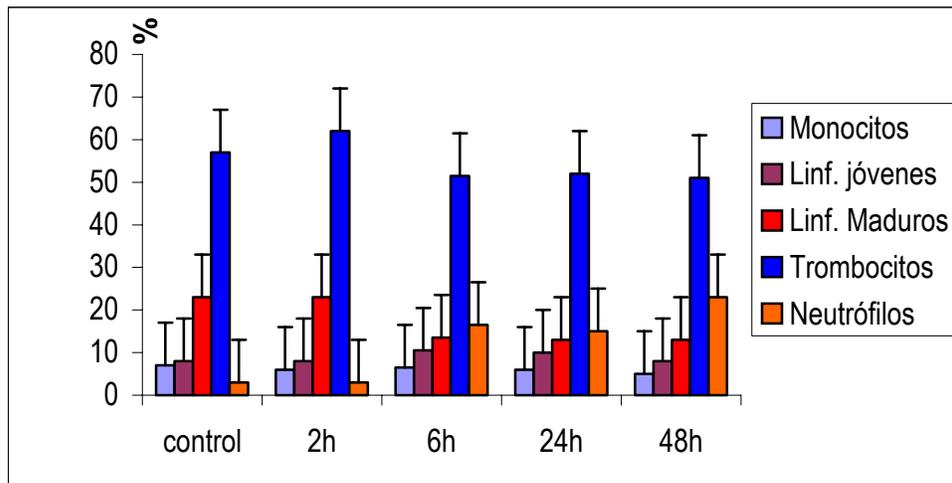
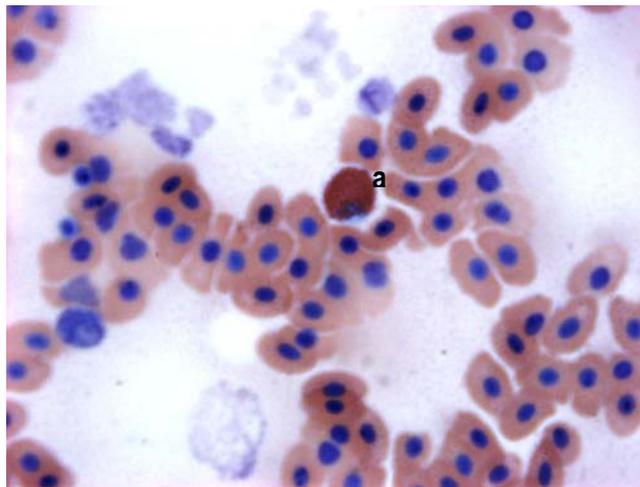


Fig. 8. Variación de los porcentajes de leucocitos de *O.aureus* expuestos a Triclorfon (27,5 mg/L), a diferentes tiempos de exposición

Fig.9 Frotis de sangre periférica de *O. aureus* expuestas a Triclorfon. Tinción May-Grunwald-Giemsa. Eosinófilo (a.) Aumento1000x.



Discusión

Siwicki y col. 1990 encontraron leucopenia y disminución de la capacidad fagocítica de los neutrófilos que *Cyprinus carpio*, después de una exposición con triclorfon. Cossarini-Dunier y col. 1990 no encontraron diferencias estadísticamente significativas en la respuesta humoral y en el

valor del hematócrito de *Cyprinus carpio* en respuesta a concentraciones que van desde 10 hasta 20 000 ppm de triclorfon.

La principal respuesta hematológica de *Cyprinus carpio* expuesta a un pesticida organofosforado (Diazinon) fue la disminución significativa del número de eritrocitos, el valor hematócrito y la concentración de hemoglobina comparados con el grupo control (Svoboda y col., 2001). Anees (1978) encontró disminución de la hemoglobina y el conteo de eritrocitos en *Channa punctatus* después de una exposición aguda a Diazinon.

Otros organofosforados también provocan cambios que evidencian la disminución de la hematopoyesis seguido de la inducción de anemia en los peces. También se observaron cambios en el perfil de eritrocitos de *Clarias batrachus* por efecto de una exposición aguda al dichlorvos (Benarji y Rajendranath 1990), al triclorfon en *Piaractus mesopotamicus* (Tavares y col. 1999), al malathion en *Cyprinion wabsoni* (Khattak y Hafeez 1996), formothion en *Heteropneustes fossilis* (Singh y Srivastava 1994) y a la solución del organofosforado Ekolux en *Oreochromis mossambicus* (Sampath y col. 1993).

Otro tipo de respuesta hematológica al efecto de organofosforados es el incremento del Volumen Corpuscular Medio asociado con el incremento del valor hematócrito y disminución de la Concentración de Hemoglobina Corpuscular Media. Este tipo de respuesta fue observada en carpa común después de un efecto agudo de phenitrothion, imidan y dichlorvos (Svobodova 1971, 1975).

Sin embargo, después de 96 h de exposición al pesticida diazinon los valores de VCM, HCM, CHCM, en la sangre de la carpa común regresaron a los valores del control(Svoboda, 2001).

En nuestro caso no se observó este tipo de respuesta de los índices eritrocíticos, debido posiblemente a la concentración empleada, ya que la misma coincide con la dosis terapéutica

empleada para esta especie, sin embargo esta concentración sí provoca cambios a nivel de conteo diferencial de leucocitos en sangre.

Una disminución significativa del conteo de leucocitos y linfopenia fue observada en la exposición de la carpa común al diazinon (Svoboda, 2001). La linfopenia fue reportada también por el efecto del methylparathion en *Heteropneustes fossilis* por Nath y Banerjee (1996)

Hiruni y Pathiratne 2005 encontraron que *Cyprinus carpio* expuestas a triclorfon mostraron leucocitopenia con linfocitopenia, aunque los valores de hematócrito no variaron con respecto al control. Estos autores indican que la leucopenia, se mantuvo hasta 7 días después de trasladados los animales a agua sin el medicamento.

Ghosh y Banerjee (1993) reportaron linfopenia aumento de neutrófilos y eosinófilos en *Heteropneustes fossilis* después del efecto de dimethoate en la concentración LC 50 a las 96h. La disminución de la inmunidad no específica puede ocurrir en peces después de una exposición a pesticidas organofosforados, debido a la disminución del conteo de leucocitos, linfopenia y aumento de los granulocitos (neutrófilos y eosinófilos)

Muchos investigadores reportan linfopenia y granulocitosis después de la exposición de peces a diversos contaminantes (Wlasow 1985; Murad y Houston 1988; Schwaiger y col. 1993; Thakur y Sahai 1993, Alkahem 1994; Svobodova y col. 1996).

En este trabajo, la disminución significativa de los linfocitos con respecto al control a partir de las 24h, el aumento de los neutrófilos y la presencia de eosinófilos en sangre periférica es una evidencia, como fue señalado por Ghosh y Banerjee (1993), de la disminución del nivel de inmunidad inespecífica de los peces después de la exposición a sustancias tóxicas.

5.2.3 Estresores físicos.

5.2.3.1 Relación entre los parámetros hematológicos y las proteínas de estrés (HSP70) en peces sometidos a manipulación y exposición al aire.

Antecedentes

En general, se ha establecido, principalmente en salmónidos, que la respuesta común ante cualquier estresor es la secreción de catecolaminas y cortisol, seguido por los cambios secundarios en los metabolitos de la sangre y del tejido, (Barton y Iwama 1991; Wendelaar Bonga 1997), así como cambios en algunas enzimas claves del metabolismo intermediario (Robertson, y col. 1987; Morales y col. 1990; Vijayan y col. 1990,1991; Vijayan y Moon 1992; Vijayan y col. 1997). Otras especies de teleósteos están capacitadas para responder a los estímulos de estrés de la misma manera, pero debido a la escasez de estudios, esta asunción no es siempre cierta (Pankhurst y col. 1992; Vijayan y Moon 1994).

Además de las respuestas más comunes ya mencionadas, las proteínas de estrés (*Hsps*), son parte muy importante de los mecanismos defensivos, están presentes en la respuesta adaptativa a un diverso campo de condiciones ambientales que causan estrés fisiológico y se les encuentra desde arqueobacterias, eubacterias, levaduras, plantas, invertebrados y vertebrados, incluyendo humanos (Feder y Hoffman, 1999).

Los parámetros sanguíneos de los peces indican su estado fisiológico y pueden emplearse para valorar la efectividad del control de enfermedades infecciosas, desbalances nutricionales, cambios ambientales y otras situaciones de estrés que se presentan en los cultivos de organismos acuáticos (Morgan and Iwama, 1997).

Los estresores físicos más comunes en los peces son: manipulación, confinamiento, transporte, u otras formas de alteración física. Además el estrés físico de persecución de los peces hasta el

cansancio o mantenerlos en una red expuestos al aire por un período de tiempo ha sido utilizado como protocolo estándar en el diseño de estudios fisiológicos.

En el presente estudio nos propusimos establecer la relación entre los indicadores celulares y hematológicos de estrés mediante un protocolo estándar de estrés físico.

Materiales y métodos

40 tilapias clínicamente sanas fueron colocadas en tanques experimentales de 90 litros a razón de 10 animales por tanques y fueron expuestas al aire por 30 minutos y manipuladas para la captura, fueron devueltas a sus respectivos tanques y después se realizó la toma de muestras de sangre a las 2 h, 24 h, 48 h, 72 h y 96 h para análisis hematológicos e hígado de 6 animales por grupo experimental a las 2 h, 48 h y 72 h para la determinación de HSP. Se trabajó además con un grupo de igual cantidad de animales como control.

Para la cuantificación de la expresión de las Hsp70 se realizó un RT-PCR semicuantitativo siguiendo el protocolo estandarizado por Marone y col., 2001.

Las muestras de hígado fueron colocadas inmediatamente en solución TRIPURE (Roche Diagnostics Cat. No 11 667 165 001) para la extracción del RNA.

Extracción de RNA.

100 mg de hígado de animales estrésados y del control fueron homogenizados durante 20 seg usando 1mL de TRIPURE en un homogenizador FASTPREP F-120(Bio 101 Thermo Savant). Una vez homogenizado el tejido, la mezcla se deja reposar por 15 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente se le añaden 0.2 ml de cloroformo por cada ml de TRIPURE agregado, se agita vigorosamente por 15 segundos y se incuba 15 minutos a temperatura ambiente. Se centrifuga a 12,000 x g por 15 minutos a 4° C. Se transfiere la fase acuosa a un nuevo tubo, al cual se le agrega isopropanol (0.5 ml por ml de TRIPURE), se agita suavemente y se incuba 15 minutos a temperatura ambiente. Se realiza otra centrifugación a 12,000 x g por 10 minutos a 4° C

y se descarta el sobrenadante, el pellet es lavado con etanol al 75%, se centrifuga a 7500 x g 5 minutos a 4° C y se descarta el sobrenadante, el pellet se seca a temperatura ambiente, finalmente el pellet se resuspende en agua DEPC libre de RNAsas (para obtener el agua DEPC, en 100ml de agua ultra pura, se disuelven 200 µl de dietilpirocarbonato (DEPC) y se agita durante toda la noche, luego se esteriliza en autoclave por 20 minutos). El RNA obtenido se conservó en alícuotas de 20 µL a -20°C.

Tratamiento del RNA con DNAsa I

A los tubos que contenían el RNA se les agrego 5µl de agua DEPC, 6.5µl de buffer 10x, 0.5µl de RNAsin (Promega) y 3.0µl de DNase I (Invitrogen). Los tubos fueron incubados 30 minutos a 37°C, posteriormente se les añadió 6.5µl de LiCl 4M; luego se añadieron 65µl de fenol-cloroformo y se homogenizo en vortex, para luego centrifugar por 10 minutos a temperatura ambiente. La interfase fue transferida a un tubo eppendorf estéril, se le agregaron 2.5 volúmenes de etanol absoluto, y se dejo precipitar por 18 horas a -20°C. Se centrifugo a 12000 rpm 15 minutos a 4°C, el sobrenadante se desecha y al pellet se le agregan 900µl de etanol al 70%, se vuelve a centrifugar a 12000 rpm 15 minutos a 4°C y se descarta el sobrenadante, al pellet se le agregaron 50µl de agua DEPC para su resuspensión. Se midió la concentración final de RNA en cada muestra en un Bio Photometer Eppendorf

Obtención del cDNA

Luego de la desnaturalización de 1 µL RNA de la muestra que equivale a 0.9305 µg/mL con 4µL de H₂O miliQ a 95°C por 5 minutos, se pasó a un baño de hielo y se procedió a la obtención del cDNA a través del protocolo siguiente: 1µL de la muestra de RNA , se le adicionó 2 µL de oligoDT , 2 µL de DTT (0.1M), 1 µL de dNTP (10 mM), 1 µL de Transcriptasa Reversa(200 U/µL) y 4 µL de Buffer 5x y 10 µL de agua miliQ para un volumen total de reacción de 20 µL. La reacción se realizó en un termociclador tipo Gene Amp PCRSystem 2700 Applied Biosystems. La síntesis de

la cadena de cDNA se realizo de reacción fueron 25°C-10 min, 42°C- 60 min, 70 °C- 15 min.

Caracterización de Hsp70

Para la determinación de la presencia de Hsp70 en tilapia se emplearon primers (oligonucleotidos) específicos que amplifican fragmentos de 283 pares de bases (Molina y col. 2002) los cuales fueron sintetizados por SIGMA-GENOSYS, dichos primers son los siguientes:

<u>Primer</u>	<u>Tm</u>	<u>Secuencia (5'-3')</u>
H70pf2	59.5	TCTGCAGCTAAAGGTGTAGC
H70pr2	69.4	TTGAAGGGCCAGTGCTTCATG

Para la reacción de PCR se tomaron 3µL cDNA, 15 µL de agua miliQ, 6 µL de Taq&GO mastermix (Q Bio Gene) ,3 µL de primer forward (H70pf2), 3 µL de primer reverse (H70pr2), para un volumen total de 30 µL. La amplificación por PCR fue realizada en un termociclador tipo Gene Amp PCRSystem 2700 Applied Biosystems, se probaron diferentes ciclos con diferentes Tm para la estandarización de la reacción de PCR:

- 1 ciclo de 93 °C por 5 min, 30 ciclos 93 °C por 30 seg, 56 °C por 30 seg, 72 °C por 1min
- 35 ciclos 93 °C por 30 seg, (Tm=58 °C y 60 °C) por 30 seg , 72 °C por 1min con una extensión final de 72°C por 5 min.

El protocolo estandarizado fue: 93 °C por 5 min., 35 ciclos 93 °C por 30 seg, 60 °C por 30 seg, 72 °C por 1min con una extensión final de 72°C por 5 min.

Caracterización de β-actina

Como control interno fue amplificada para cada muestra, la proteína constitutiva β-actina y se emplearon *primers* específicos de tilapia de 218 bp (Yada *et. al* 2000) los cuales fueron sintetizados por SIGMA-GENOSYS, dichos primers son los siguientes:

Primer	Tm	Secuencia (5'-3')
β -actf1	66.1	CATGAAGTGCGACGTTGACA
β -actr1	66.4	CACATCTGCTGGAAGGTGGA

Para la reacción de PCR se tomaron 3 μ L del cDNA, 15 μ L de agua mQ, 6 μ L de Taq&GO mastermix (Q Bio Gene), 3 μ L de primer forward (β -actf1), 3 μ L de primer reverse (β -actr1), para un volumen total de 30 μ L. La amplificación por PCR fue realizada en un termociclador Gene Amp PCRSystem 2700 Applied Biosystems, se probaron protocolos de 30 y 35 ciclos y temperaturas de annealing: 56°C, 58°C, 57°C y 62°C

El protocolo estandarizado fue: 93 °C por 5 min., 93 °C por 30 seg, 62 °C por 30 seg, 72 °C por 1min con una extensión final de 72°C por 5 min.

La identidad de los amplicones empleados fue confirmada por secuenciación, para lo cual previamente se purificaron los fragmentos de *Hsp70* y β -actina con el *kit* de purificación de PCR *QIAquick*, siguiendo el protocolo indicado por los fabricantes.

Las imágenes de los geles de agarosa teñidos con bromuro de etidio fueron visualizadas en un fotodocumentador UVP BioDoc-It system y la cuantificación de las bandas fue realizada mediante el *software Quantity One software* (Biorad, Hercules, California, USA). Las mediciones de cada banda se hicieron por triplicado y luego promediadas para el análisis estadístico. La intensidad de las bandas fue expresada como unidades de intensidad (INT).

Para el análisis estadístico se empleó Anova de una vía, para establecer la diferencia entre los grupos experimentales y cuando se encontró diferencia significativa se aplicó la prueba de comparación múltiple de Student-Newman-Keuls para $P \leq 0.05$. Los datos fueron expresados como Media \pm DS. Valores de $P \leq 0.05$, se consideraron estadísticamente significativos.

Resultados.

El comportamiento de los índices sanguíneos en animales sometidos a estrés por manipulación de captura y exposición fuera del agua, pero devueltos a los tanques y analizados en intervalos de tiempo se muestra en la Tabla 11.

En este caso se observó que los valores de hemoglobina y de HCM disminuyen significativamente ($P \leq 0.05$) a partir de las 24 horas y del VCM a partir de las 72 horas. En los frotis sanguíneos se observó deformación de los eritrocitos (Fig.10) Se observó que a partir de las 24 h los monocitos y linfocitos disminuyen, mientras que los neutrófilos aumentan, habiendo diferencia significativa respecto al control.

Tabla 11. Valores (medianas) de los parámetros sanguíneos de *Oreochromis aureus* sometidos a estrés por exposición fuera del agua 30 min y analizados a las 2, 24, 48, 72 y 96 horas después de ser devueltos al agua y del control no estresado. *Superíndices no coincidentes difieren entre si para $P \leq 0.05$*

Parámetros	Índices de Referencia	Control	2h	24h	48h	72 h	96h
Ht (%)	15-33	28.6	24.4	25.6	22.6	23	21.4
Hb (g%)	4.6-8.0	5.28 ^a	5.79 ^a	4.49 ^b	3.77 ^b	2.49 ^b	2.31 ^b
Eritrocitos($10^6/\text{mm}^3$)	0.7-1.72	1.01	0.95	1.19	1.09	1.65	1.26
CHCM (g%)	16-37	18.3	24.7	17.9	16.8	11.4	10.7
VCM (fl)	150.9-297	284.4 ^a	266.5 ^a	237.8 ^a	207.0 ^a	142.2 ^c	170.5 ^b
HCM (pg)	38-86	52.6 ^a	64.4 ^a	38.8 ^b	34.5 ^b	15.4 ^c	18.3 ^c
Monocitos (%)	2-13	5 ^a	6 ^a	3 ^b	2 ^b	2 ^b	3 ^b
Linfocitos Jóvenes (%)	1-10	7	8	7	7	7	8
Linfocitos Maduros (%)	12-25	21 ^a	23 ^a	15 ^b	13 ^b	13 ^b	15 ^b
Trombocitos (%)	55-74	64	62	61	53	56	58
Neutrófilos (%)	1- 7	3 ^a	3 ^a	13 ^c	24 ^b	23 ^b	15 ^b

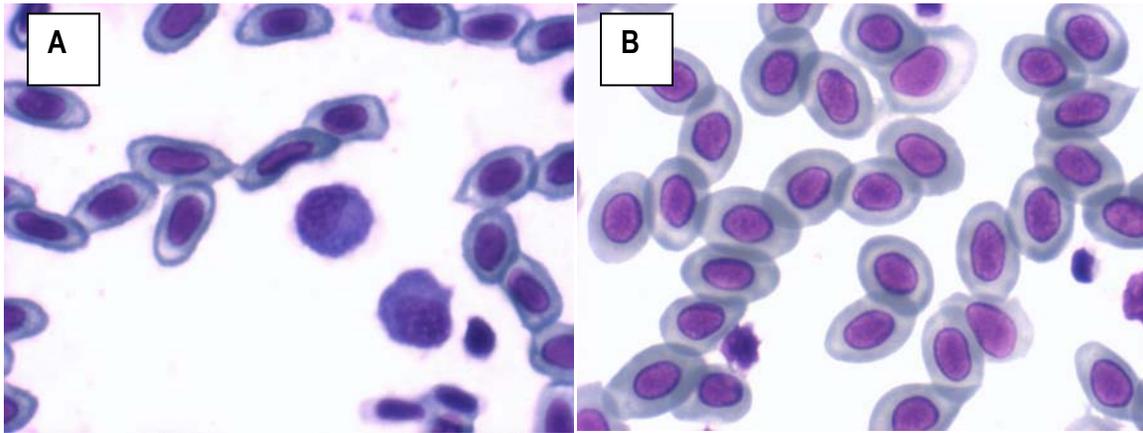


Fig 10. Frotis sanguíneos de *O. aureus* después de 24 h de estrésados por manipulación y exposición al aire (A- Eritrocitos deformes y presencia de neutrófilos, B-Animales de control). Tinción May-Grunwald- Giemsa. Aumento 1000x

Como se observa en la Fig 11, cada barra muestra las cantidades relativas de mRNA Hsp70 normalizados a β -actina, en los diferentes grupos experimentales. Los niveles de Hsp70 en las muestras de hígado de *Oreochromis aureus* aumentan significativamente con respecto al control a las 2h y a las 72 horas después de haber suspendido la exposición al estresor, con una disminución significativa a las 48 h con respecto a las 2h y las 72 h.

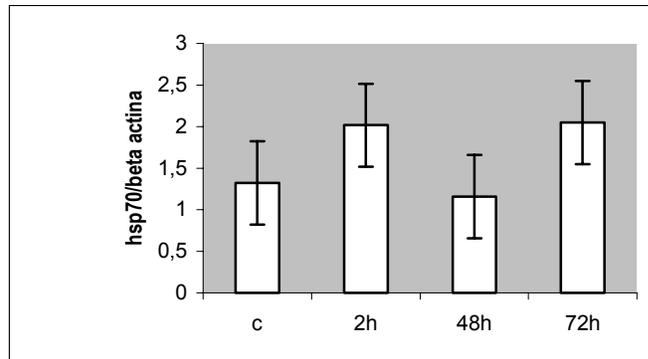
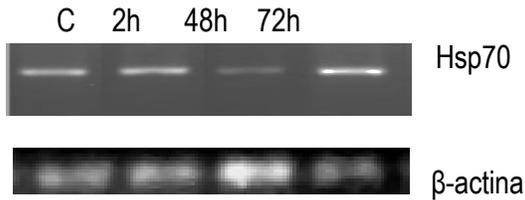


Fig. 11. Análisis RT-PCR semicuantitativo de Hsp70 en hígado de tilapia: animales de control y después de haber sido sometidos a estrés físico (2h, 48h, 72h) . Valores (media± desviación estandar). Arriba las bandas de β -actina y Hsp70 obtenidas en el gel de agarosa 2%

Discusión

La concentración del hematócrito y de la hemoglobina se han utilizado ampliamente como indicadores hematológicos de la respuesta secundaria al estrés en los peces (Barton y Iwama 1991;Wendelaar- Bonga1997). Sin embargo, los datos disponibles con respecto a la influencia de varios estresores en ambos parámetros son variables y parecen ser dependientes de la duración del estresor (agudo o crónico).

Tavares – Dias y col. (2001) encontraron disminución significativa del conteo de eritrocitos, la hemoglobina y el hematócrito mientras que el VCM aumentó, después del estrés por manipulación y exposición al aire en *Colossoma macropomum* (tambaqui),. En estudios similares realizados con *Salmo trutta* (Pickering y col., 1982) e *Ictalurus punctatus* (Ellsaesser y Clem, 1986) no se observaron cambios significativos en el conteo de eritrocitos. Vijayan y Leatherland, 1989 y

Pulsford y col., 1994 plantean que algunas fuentes de estrés inducen la liberación de eritrocitos del bazo.

En nuestro estudio el efecto del estrés físico sobre los índices eritrocíticos está dado por la disminución significativa de la hemoglobina y del VCM y aumento de la HCM a partir de las 24 horas.

En ensayos realizados por Valenzuela y col. 2002, en respuesta al estrés hipóxico, las truchas reaccionaron con disminución del consumo de oxígeno e incrementos en el número de eritrocitos, observaron además que el VCM y la HCM disminuyeron. Esos autores sugieren que los peces se adaptan al estrés hipóxico reduciendo el consumo de oxígeno (respuesta oxiconformadora) e incrementando el número de eritrocitos en circulación.

En la morfología de los eritrocitos de la sangre de los animales estudiados, se observó poiquilocitosis, lo que coincide con Harms y col. (1996) que observaron fragmentos de eritrocitos y anisocitosis en *Morone saxatilis* sometido a estrés por captura. Montero y col., 1999 describen aumento en la fragilidad de los eritrocitos en juveniles de *Sparus auratus* sometidas a estrés por alta densidad de siembra, todos estos cambios morfológicos están asociados con la poiquilocitosis.

Morales y col. (2005) al evaluar el hematócrito y la hemoglobina, en *Dentex dentex* L. después de la manipulación y exposición al aire, no encontraron diferencias significativas con respecto a animales no estresados, por lo que asumieron que *D. dentex* es tolerante a estos estresores.

En *Oncorhynchus tshawytscha* W., 5 h después de la manipulación no se observaron cambios en el hematócrito (Mazur y Iwama 1993); mientras que en *Morone saxatilis* W, el hematócrito era más alto durante el estrés de actividad física por persecución, que durante el descanso (Young y Cech 1994). Un aumento significativo en el hematócrito fue observado en la trucha arco iris y en la trucha *Salvelinus fontinalis*, después de la manipulación (Benfey y Biron 2000). Varios estudios

han demostrado que en *Pleuronectes platessa*, *Scophthalmus maximus* y trucha, no se producen cambios en la hemoglobina como consecuencia del estrés por manipulación (Bourne 1986, Waring y col. 1996, Benfey y Biron 2000)

Barton y Zitzow (1995) observaron incremento en los linfocitos en *Stizostedion vitreum*, una hora después de la manipulación y linfopenia tres horas después, pero no encontraron cambios significativos en la cantidad de neutrófilos. Tavares – Dias y col. (2001) encontraron aumento de los neutrófilos y linfocitos, y no observaron cambios en los niveles de monocitos en *Colossoma macropomum* (tambaqui), sometidos a estrés por manipulación de captura y exposición al aire. En nuestro estudio se observó aumento de neutrófilos y disminución de monocitos y linfocitos maduros

Delaney y Klesius, 2004, evaluaron la respuesta celular al estrés midiendo niveles de la proteína Hsp70 en los tejidos del riñón, sangre, cerebro, hígado, músculo y cerebro de juveniles de *Tilapia nilótica*, bajo hipoxia durante 48 h. Niveles altos de Hsp70 fueron detectados en sangre, cerebro, y músculo en los peces expuestos a hipoxia comparado con el control, mientras que no se observaron diferencias en riñón e hígado.

Maloyan y col. 1999, encontraron una variación temporal de la Hsp72 en ratas después del estrés por variación de temperatura, con disminución de esta proteína a las 24 horas, aumento a las 48 horas; sin embargo a los 30 días, esta proteína fue indetectable.

En el presente estudio también se observa una variación temporal de la Hsp70 en hígado, pero la tendencia general es el aumento de la concentración de esta proteína con respecto al control.

Welker y col. 2005, estudiaron la respuesta celular del estrés (proteínas de estrés Hsp60 y Hsp70) por hipoxia en juveniles de *Ictalurus punctatus*, y no encontraron aumentos significativos, con respecto al control, de los niveles de expresión de las proteínas de estrés.

Luckstadt y col. 2004, estudiaron el efecto de la hipoxia en *O. niloticus niloticus* y encontraron altos niveles de Hsp70 en el hígado de animales estresados, pero no encontraron diferencias significativas en los estudios realizados a animales durante las siguientes 8 horas. Currie y col. (2000), observaron aumento de las Hsp70 en sangre, cerebro, hígado y músculo de *Oncorhynchus mykiss* bajo estrés por cambio de temperatura.

Aunque no hemos encontrado estudios donde se relacionen los indicadores fisiológicos (hematológicos) de estrés con la respuesta celular de estrés. De acuerdo a los resultados obtenidos en el presente estudio, la respuesta de las proteínas de estrés HSP 70 en tilapia *O. aureus* sometida a manipulación y exposición al aire, aparece a partir de las 2 horas con un aumento de estas proteínas en hígado mientras la respuesta de los indicadores hematológicos (hemoglobina, CHCM, HCM, VCM y neutrófilos) comienzan a partir de las 24 horas después, de que los animales fueron estresados.

De acuerdo a lo señalado por Iwama y col. (2004), la complejidad de la información disponible hace difícil concluir que las *Hsps* son indicadores generales de la respuesta al estrés en peces. Por lo tanto, son necesarias investigaciones adicionales que aclararán la relación entre las respuestas celulares y fisiológicas del estrés. De acuerdo a estos autores el nivel de conocimiento alcanzado sobre la respuesta celular al estrés en peces, imposibilita el uso de *Hsps* como indicadores de estrés.

5.3. Comportamiento fisiológico de *O. aureus* en relación con otras especies e híbridos del género sometidos a cultivo.

Antecedentes

En los dos últimos decenios, se han aplicado comercialmente, diversas técnicas genéticas como la domesticación, la selección, el cruzamiento intraespecífico, la hibridación interespecífica, la inversión del sexo y el mejoramiento genético y la poliploidía y la transgenesis con el fin de

mejorar los peces y crustáceos cultivados. Sin embargo, el efecto de estos cambios genéticos sobre la fisiología de los peces ha sido poco estudiado.

El análisis de la sangre periférica de los peces se ha utilizado con fines de diagnóstico para evaluar su estado fisiológico y el efecto de sustancias tóxicas, determinar la resistencia no específica de los progenitores y su descendencia, establecer la calidad del alimento suministrado, evaluar el efecto de estrés y determinar la variabilidad entre especies (Svobodová y Vysuková, 1991, Langston y col. 2002, Flajshans y Vajcová 2003, Silveira y col. 2004).

Vijayam y Moon, 1994 plantean que en peces, son disímiles las respuestas al estrés entre las especies así como entre las diferentes cepas dentro de una misma especie en cuanto a su tolerancia a cambios ambientales. Leatherland y col. 1998, indica que las características de la sangre difieren entre especies así como dentro de individuos de una misma especie; por lo que resulta de interés establecer las diferencias de los indicadores hematológicos entre especies parentales y sus híbridos con el fin de su utilización como herramienta de diagnóstico en condiciones de estrés.

Blaxhall 1972 plantea que pueden ocurrir variaciones en los componentes de la sangre debido a diferencias genéticas. Badawi y Said 1971 compararon la sangre de 4 especies de tilapias y encontraron diferencias para el contenido de hemoglobina, el conteo de eritrocitos y el valor hematócrito. Langstons y col. 2002 encontraron que distintas cepas de *Hipoglossus hippoglossus* mostraron diferentes respuestas a cambios de temperatura con respecto al conteo diferencial de células sanguíneas. Parson 1993 al comparar triploides y diploides de *Pomoxis annularis* encontró cambios en el número de eritrocitos, la hemoglobina y el volumen corpuscular medio.

Balfry y col. 1997 establecieron las variaciones entre algunos parámetros de la sangre de diferentes cepas de *O. niloticus* inoculadas experimentalmente con *Vibrio parahaemolyticus*.

Tavares-Diaz y col. 2002 también encontraron cambios en los parámetros hematológicos de *Rhamdia quelem* con respecto a otras especies del mismo genero. Palikova y col. 1999 evaluaron las diferencias morfológicas de la sangre de tres especies de esturiones.

Son escasos los estudios que se han realizado donde se comparen los parámetros de la sangre entre especies e híbridos del genero *Oreochromis* por lo que el objetivo del presente trabajo es comparar las variables hematológicas de *Oreochromis hornorum*, *Oreochromis aureus*, *O. niloticus* y el híbrido *O. aureus x O. niloticus.*, lo que contribuirá a entender mejor la variación del comportamiento de estas especies bajo condiciones de cultivo

Materiales y métodos

Se realizaron análisis hematológicos a 30 animales por grupo de las especies *Oreochromis aureus*, *O. hornorum* y *O. niloticus* y los híbridos *O. niloticus x O. aureus*.

Resultados

En la Tabla 12 se observan los valores de los índices hematológicos cuando comparamos las tres especies del genero *Oreochromis*, Los indicadores analizados en las tres especies fueron significativamente diferentes ($p \leq 0,05$).

Para *O. hornorum* se encontró una disminución significativa de todos los indicadores sanguíneos analizados con respecto a *O. aureus* con excepción de la cantidad de hemoglobina en cada eritrocito (HCM) que fue similar en ambas especies, al compararla con *O. niloticus* se encontró que los valores de Hb fueron semejantes, pero el resto de los indicadores fueron significativamente diferentes, con mayor tamaño de cada eritrocito (VCM) y valores de HCM y CHCM menores.

Tabla 12. Valores de los parámetros hematológicos de las especies *O. aureus*, *O. hornorum*, *O. niloticus*. Valores (medianas y rangos-25/75 percentil) con diferentes superíndices difieren significativamente para $P \leq 0.05$

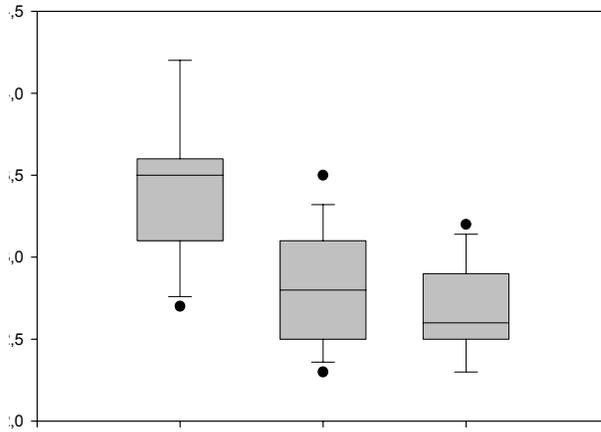
	<i>O. aureus</i>	<i>O. hornorum</i>	<i>O. niloticus</i>
Hb(g/dL)	3.41 ^a (3.1-3.6)	2.9 ^b (2.6-3.1)	2.69 ^b (2.5-2.8)
Eritrocitos (10 ⁶ /mm ³)	1.52 ^a (1.4-1.5)	1.4 ^b (1.3-1.5)	1.30 ^c (1.2-1.3)
Hematócrito (%)	22.9 ^a (21.2-24.7)	18 ^b (17-20)	21.8 ^{ac} (20.2-23.0)
VCM (fL)	151.5 ^a (150.5-152.5)	143.8 ^b (143.6-145.0)	170.8 ^c (169.0-172.0)
CHCM (g/dL)	15.1 ^a (13.9-15.9)	14.5 ^b (13.7-14.7)	13.2 ^c (12.4-14.0)
HCM (pg)	22.6 ^a (21.3-24.1)	22.3 ^a (20.7-24.0)	20.4 ^b (18.5-22.9)

De las especies analizadas, la que mayor volumen corpuscular medio presenta es *O. niloticus*, con menor número de eritrocitos y menor HCM

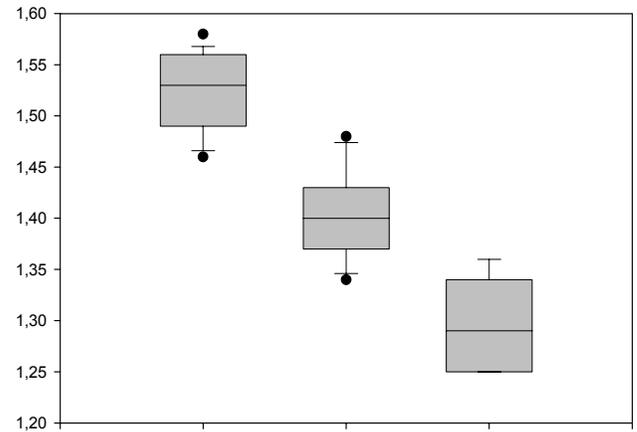
Como se observa en la Fig 12, el híbrido *O. aureus* x *O. niloticus* presentó mayor valor del Ne y Hb que el parental *O. niloticus*, pero menor que *O. aureus*, mientras que el VCM fue menor que para *O. niloticus* pero mayor que en *O. aureus*. Los valores de HCM y CHCM no difirieron de forma significativa para *O. niloticus* y el híbrido *O. aureus* x *O. niloticus*, mientras *O. aureus* presentó los mayores valores de estos dos indicadores.

Discusión

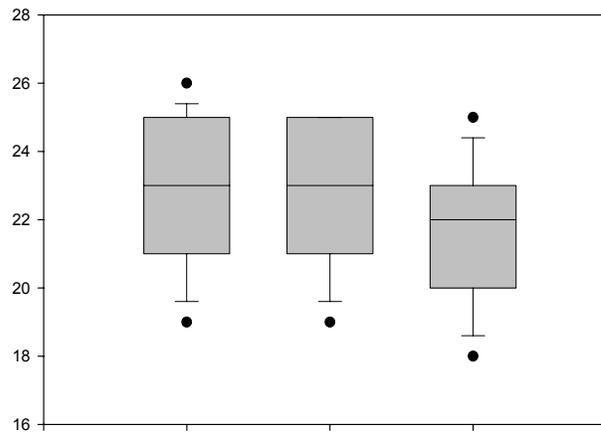
Schreck y col. 2001, establecen que diferentes especies de peces tienen diferentes tolerancias al estrés, por lo que es importante conocer los cambios que en el ámbito de parámetros sanguíneos pueden ocurrir entre especies de un mismo género, así como en los híbridos que se obtienen mediante las distintas posibilidades que nos brinda la genética en el campo de la acuicultura.



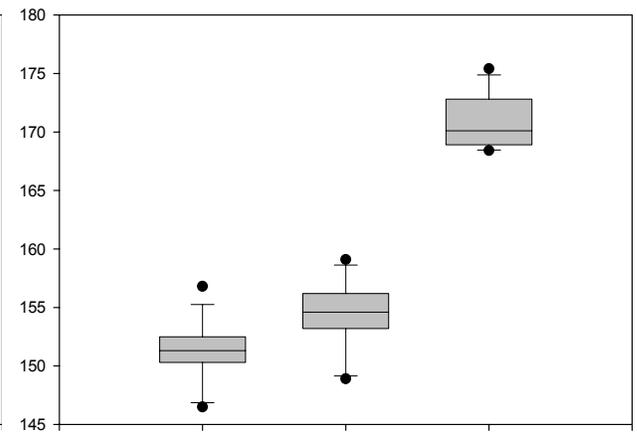
Haematocrit (%)



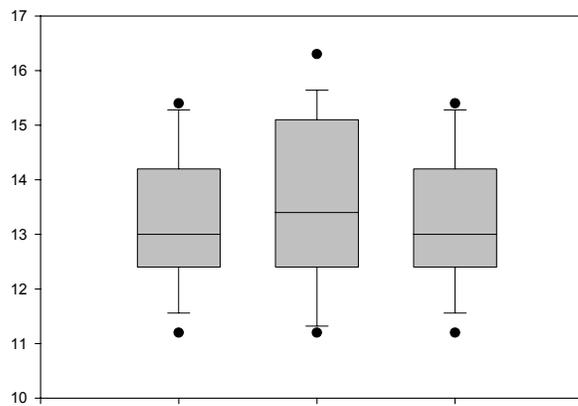
Mean Corpuscular Volume (fL)



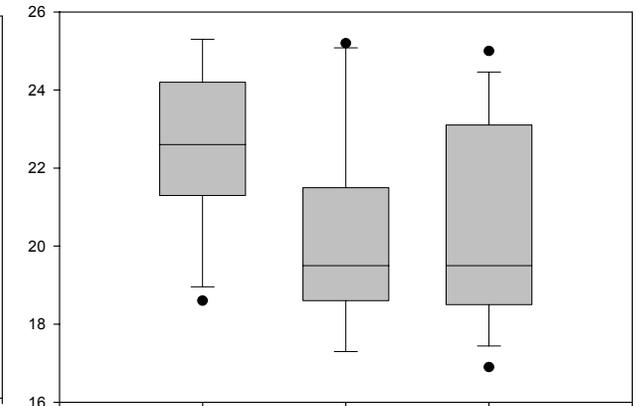
Mean Corpuscular Haemoglobin Concentration(g%)



Mean Corpuscular Haemoglobin (pg)



O. aureus *O. aureus x*
O. niloticus *O. niloticus*



O. aureus *O. aureus x*
O. niloticus *O. niloticus*

Fig 12. Valores de la mediana para P<0.05 (25%-75%) de índices hematológicos de híbrido y parentales

Badawi y Said 1971, al igual que en nuestro caso, encontraron variación en el conteo de eritrocitos, el contenido de hemoglobina y el valor hematócrito al comparar 4 especies de tilapia. Estos autores encontraron mayores valores de Hb, Ht y número de eritrocitos en *Tilapia aurea* que en *Tilapia nilotica*, lo que coincide con los resultados obtenidos en el presente estudio al comparar estas dos especies. Cnaani y col. 2002 también encontraron diferencias significativas para el valor hematócrito al comparar *O. aureus*, *O. mossambicus*, *O. niloticus* y *O. niloticus* roja.

Hussein y col. 1996 reportan para *O. niloticus* valores semejantes a los obtenidos en nuestro estudio para el número de eritrocitos (1.31) y el valor hematócrito (20%), sin embargo es mayor la concentración de Hb (6.0 g/l).

O. aureus presentó valores significativamente mayores de Hb que *O. niloticus*, con una mayor cantidad de Hb en cada eritrocito y mayor MCHC, lo que indica que *O. aureus* tiene mayor capacidad para el transporte de oxígeno a través del organismo lo que le proporciona una mayor posibilidad de adaptarse a cambios ambientales. Este comportamiento fue observado por Glazova (1976) al establecer características sanguíneas en diferentes peces tropicales.

Al comparar los resultados obtenidos en el presente estudio para el híbrido *O. niloticus* x *O. aureus* con los resultados de Hrubec y col. 2000 al establecer los intervalos de referencia hematológicos para el híbrido (*Oreochromis nilotica* x *O. mossambicus* x *O. aureus*) observamos que estos autores encontraron mayores valores de hematócrito (27-37%), de hemoglobina (7.0-9.8 g/dl) del número de eritrocitos ($1.91-2.93 \times 10^6/\mu\text{L}$), de la HCM (28.3-42,3 pg), y la CHCM (22-29 g/dl) solo para el VCM (115-183 fl) los valores hallados para el híbrido de nuestro estudio estaban dentro del rango de referencia dado para este híbrido por esos autores.

La combinación de diversos programas de mejoramiento genético, los métodos tradicionales y la ingeniería biotecnológica y genética probablemente permitirá obtener los mejores genotipos para la acuicultura, por lo que es importante conocer el efecto de estos cambios en la fisiología de los peces y el impacto que el estrés puede causarles, lo que contribuirá sin dudas al desarrollo de estrategias de manejo que minimicen el impacto del estrésor.

Los resultados del presente estudio indican la existencia de diferencias entre los índices hematológicos de especies e híbridos del genero *Oreochromis*.

6. DISCUSIÓN GENERAL.

En la práctica acuícola, la adaptación del animal a las condiciones de cultivo, representa un objetivo básico. Esta adaptación permitirá su mantenimiento en cautiverio, así como su crecimiento y reproducción. Los posibles agentes estrésantes que pueden influir en el éxito del cultivo son múltiples y de variado origen: alimentación deficiente, alta densidad de cultivo, baja oxigenación del agua, condiciones físico-químicas del agua no óptima, fotoperíodo y/o termoperíodo no adecuado, vibraciones y ruidos, contaminantes, etc.

La existencia de un estrés en el cultivo origina las respuestas primarias, secundarias y terciarias típicas de una situación de estrés. Al final, los animales mostrarán un retraso o nulo crecimiento por la existencia de un metabolismo alterado, fallos en la reproducción por un mal funcionamiento del sistema reproductor y una alta susceptibilidad a agentes patógenos, debido a una disminución en el sistema inmunitario. De lo anteriormente expuesto, es lógico comprender que en la acuicultura es prioritario eliminar cualquier fuente de estrés.

Oreochromis aureus es una de las especies dulceacuícolas más exitosa en acuicultura, se cultiva en sistemas intensivos y semiintensivos, donde las altas densidades de siembra y limitada calidad del agua, propician que los animales se encuentren bajo estrés constante, sobretodo cuando no se realiza un manejo adecuado del sistema. Según Pickering (1981) pocos conceptos suscitaron tantas controversias como el de estrés, y como resultado, existen numerosas definiciones en los trabajos científicos. El estrés, es definido generalmente como el estado o condición en el que la homeostasis de un individuo es alterada como resultado de un estímulo externo, llamado estrésor. Los estrésos provocan cambios en el estado fisiológico del animal y este cambio es interpretado como la respuesta al estrés (Reddy and Lettherland, 1998).

En el medio acuático, el sistema homeostático de los peces es afectado continuamente por los cambios de diversos agentes naturales y de origen antropogénico y es imposible crear experimentalmente todas las variables que pueden afectar a los peces en su entorno, no obstante los estudios del laboratorio pueden revelar las particularidades de la acción de diversos estímulos. Estos estudios permiten que modelemos el efecto del ambiente sobre la fisiología de los peces y que entendamos mejor los mecanismos de la acción específica de diversos factores (Vosylieniė y Kazlauskieniė 1999).

Si bien la intensidad del estrés no puede ser medida, entonces son las respuestas al estímulo las que se determinan cuantitativamente. La evaluación de la respuesta al estrés por un biomarcador debe ser rápida, rentable y compatible con los tamaños de muestra necesarios para análisis estadísticos rigurosos. También sería ventajoso si tales biomarcadores fueran no destructivos (Adams, 2002)

En peces, numerosos trabajos reportan mediciones de los cambios en el comportamiento individual, de la respuesta fisiológica primaria, secundaria y terciaria, y de la respuesta celular como indicadores de estrés que, cuando van más allá de la tolerancia, ocasionan la muerte o en casos menos severos, afectan el crecimiento (McCormick y col. 1998), predisponen a enfermedades (Robertson y col., 1987, Kaatari y Tripp, 1987) o imposibilitan la resistencia a nuevas situaciones de estrés (Schreck, 2000). Sin embargo, los efectos del estrés a nivel poblacional, respuesta terciaria, aunque difíciles de comprobar, son los que tienen mayores relevancias ecológicas. Estos se manifiestan por la reducción en los procesos de desove (Billard y col. , 1981, Hontela, 1997), pobre calidad de la progenie y disminución de la población (Schreck y col. , 2001).

Múltiples factores influyen en la respuesta y aunque el grado de la misma puede ser interpretado como indicador de la magnitud del estrés, las respuestas en sus diferentes niveles dependen

mucho de la capacidad de cada individuo o de una especie en particular (Pankhurst y Van Der Kraak, 2000).

La respuesta fisiológica primaria, afecta los parámetros bioquímicos, que son determinados en las concentraciones de hormonas en el plasma (Mazeaud y col. , 1977, McCormick y col. , 1998) y por estudios histopatológicos, que se evalúan a través de la actividad secretoria de las células corticotrofas de la hipófisis (Hontela y col. , 1992), o de las células interrenales, por el diámetro del núcleo, tamaño celular o contenido de ácido ribonucleico (Yang y Albright, 1995).

Las respuestas secundarias, están referidas a cambios metabólicos, que pueden ser bioquímicos (Wells y col. , 1984, Pottinger, 1998), fisiológicos (Hemre y Krogdahl, 1996) o hematológicos (Pickford y col. , 1971, Soivo y Oikari, 1976), siendo difícil afirmar que una etapa inicia cuando la anterior está finalizando, ya que probablemente muchos acontecimientos ocurren en forma simultánea, y permanecen alterados aún cuando el responsable de la modificación esté en niveles normales.

Los estudios hematológicos en peces resultan ahora mas útiles, debido al desarrollo creciente de la piscicultura y al mayor conocimiento de la contaminación de recursos dulceacuícolas naturales en las zonas tropicales. Tales estudios se han utilizado generalmente como indicador eficaz y sensible de los cambios fisiológicos y patológicos en peces (Iwama y col. , 1976; Chekrabarty y Banerjee, 1988).

Una de las dificultades en la determinación del estado de la salud de una población de peces, es la falta de referencias confiables de la condición normal de salud, por lo que fue necesario establecer en nuestro caso los parámetros hematológicos normales de *O. aureus*, además se identificaron seis tipos de células en sangre periférica: eritrocitos, trombocitos, monocitos, neutrófilos, linfocitos maduros y jóvenes.

Al establecer los índices de referencia de *O. aureus* se obtuvo que los valores de hematócrito y número de eritrocitos son más altos que los registrados como normales para *Tilapia aurea* en Israel por Badawi y Said (1971) mientras que el de hemoglobina es más bajo, lo que se refleja en los valores de HCM y CHCM. Pieterse y col. (1981) atribuye variaciones de este tipo al hecho de que se trata de poblaciones bajo diferentes condiciones de cultivo.

En las inoculaciones experimentales con *Corynebacterium sp* y con *Aeromonas hydrophila* se observó a partir de las 48 h disminución de la hemoglobina, HCM, CHCM y el conteo de eritrocitos hasta los 20 días post-inoculación y en los animales inoculados con *Corynebacterium sp* se apreció además disminución significativa del VCM y el hematócrito a las 72 horas post-inoculación. Se observó que para ambos patógenos los peces mostraron neutrofilia, aumento de los linfocitos jóvenes y disminución de linfocitos maduros desde las 48 horas y poiquilocitosis. En ambos casos *O. aureus* manifestó anemia microcítica hipocrómica. Nakayasu y col. 2002, describen también anemia microcítica hipocrómica en *Paralichthys olivaceus* por la disminución del VCM, y la anomalía estructural de los eritrocitos. El patrón de cambios hematológicos observados en general, es semejante al observado en otras infecciones bacterianas estudiadas en peces (Brenden y Huizinga 1986; Yildiz, 1998).

El anestésico MS 222 provoca en *O. aureus* incremento del hematócrito y disminución de la CHCM después de las 2h post-anestesia y a las 24 horas se observó una disminución del hematócrito, mientras que el anestésico benzocaína provoca en *O. aureus*, linfocitopenia y neutrofilia a partir de las 2 horas de recuperación de la anestesia, pero alcanza valores semejantes al control a las 24 horas. La benzocaína y el MS 222 son similares en su acción y estructura química. La respuesta a un anestésico depende de la especie, la edad, el nivel de fatiga, la condición de los animales y de factores ambientales; por esta razón es necesaria la evaluación

de cada anestésico para cada especie (Robertson y col., 1988). Wedemeyer (1970) realizó una comparación entre benzocaína y MS 222 como anestésicos para los salmónidos y demostró que la benzocaína era ligeramente menos dañina porque inducía menos cambios metabólicos.

La importancia del estado hematológico de un organismo como indicador biológico fue establecida y se demostró que varios parámetros hematológicos son muy sensibles a la intoxicación con los metales (Folmar, 1993; Golovina, 1996). Vosylienė y Kazlauskienė (1999) indicaron diversas respuestas hematológicas de la trucha arco iris sometidas a diversos estímulos: los productos químicos (estrés ambientales) indujeron un aumento en el conteo de eritrocitos, concentración de la hemoglobina y hematócrito. Los patrones de cambios en los parámetros hematológicos de la sangre encontrados por otros autores dependieron de la concentración de productos químicos, de la duración de la exposición y de la especie de pez.

Un aumento en el conteo de eritrocitos, hematócrito, y concentración de la hemoglobina fue determinado después de la exposición a corto plazo de la carpa al sulfato de cobre (Svobodova y col., 1994), después de la exposición a largo y a corto plazo de la trucha de arroyo y del siluro marrón (*Ictalurus nebulosus*) (McKim y col., 1970) y trucha arco iris expuestas al ión cobre (Wilson y Taylor, 1993; Waiwood, y col. 1980) y después de la exposición de la tilapia (*Oreochromis mossambicus*) al cobre y al mercurio (Cyriac y col., 1989).

El plomo puede afectar la síntesis de la hemoglobina y el tiempo de vida media de los glóbulos rojos, este metal origina en los peces la formación de una película coagulante y les provoca alteraciones hematológicas. En nuestro trabajo comprobamos que en *O. aureus* el plomo provoca disminución del contenido de hemoglobina, el número de eritrocitos y la CHCM con respecto al control. En las células blancas se observó aumento de linfocitos jóvenes y neutrófilos, así como disminución de linfocitos maduros y trombocitopenia.

El nitrito es tóxico para muchas especies de peces por su efecto en la hemoglobina, sin embargo la tilapia es más tolerante a la toxicidad por nitrito que muchas especies de agua dulce (Popma y Masser 1999). El nitrito en *O. aureus* del presente estudio en concentraciones de 30 mg/L provoca con respecto al control, disminución del hematócrito y de la hemoglobina. La CHCM aumenta y el VCM disminuye respecto al control a partir de las 2 horas de tratamiento, mientras que la HCM disminuye a partir de las 24 horas. Esta disminución de oxígeno en la sangre se debe a que el nitrito oxida la hemoglobina formando metahemoglobina, una forma no capacitada para el transporte de oxígeno a través del organismo (Brown y Mc Leay, 1975; Watanabe y Yasutake, 1978; Tomasso, 1986).

El verde malaquita provoca reducción del hematócrito y anemia en trucha arcoiris y *Clarias gariepinus* (Tanck y col., 1995; Musa y Omoregie, 1999). *H. fossilis* mostró disminución del conteo de eritrocitos, de la hemoglobina y del hematócrito con incremento del conteo total de leucocitos (Srivastava y col., 1996). En *Cyprinus carpio* provocó disminución del Hto, del VCM y aumento de la CHCM (Svobodova y col., 1997).

Sin embargo, aumento del hematócrito, como en nuestro caso, fueron observados en la trucha arcoiris tratada con verde malaquita (Alderman y Clifton-Hadley, 1993). En *Ictalurus punctatus* (bagre del canal) se encontró aumento de los eritrocitos y de la hemoglobina después de 3 días de tratamiento, pero con eritrocitosis y leucopenia después de 7 y 21 días respectivamente. (Grizzle, 1977).

También comprobamos que *Oreochromis aureus* expuestas a Triclorfon (27,5 mg/L) presentaron aumento de los neutrófilos, disminución de los linfocitos maduros y disminución de los trombocitos a partir de las 24h. Hiruni y Pathiratne 2005 encontraron que *Cyprinus carpio* expuestas a Triclorphon mostraron leucopenia con linfocitopenia. Estos autores indican que la leucopenia, se mantuvo hasta 7 días después de trasladados los animales a agua sin el medicamento.

El actual estudio confirmó que los parámetros hematológicos son indicadores sensibles de la respuesta del organismo de los peces a los productos químicos. Mientras tanto, las particularidades de alteraciones en estos parámetros dependieron de la duración de la exposición así como de la naturaleza de los productos químicos.

El efecto de un estrésor físico en *O. aureus* y su acción sobre indicadores hematológicos y celulares (Hsp70), demostró una diferencia significativa en los niveles de expresión de Hsp70 en hígado de tilapia (*O. aureus*) expuestas a un estrésor físico muy común en la acuicultura, como es la manipulación por captura y la exposición al aire. Mientras que los valores de hemoglobina disminuyen significativamente y el conteo de eritrocitos aumenta, con respecto al control a partir de las 72 horas. Se halló también que a partir de las 24 horas los monocitos y los linfocitos maduros disminuyen, con aumento de los neutrófilos.

Al estudiar la respuesta celular al estrés en organismos acuáticos es muy importante establecer si los procedimientos tales como manipulación, muestreo y otros estrésors físicos están afectando la respuesta de la Hsp. Mientras que los procedimientos de la manipulación y de muestreo pueden afectar indicadores comunes de la respuesta fisiológica de estrés en peces, tales como niveles del cortisol en el plasma, se ha demostrado ya en trucha arco iris que la manipulación no altera los niveles de Hsp70 hepático (Vijayan y col., 1997), ni los niveles de Hsp60 en hígado, músculo, branquias y corazón (Washburn y col., 2002).

Zarate y Bradley (2003) indicaron que las formas comunes de estrés en las prácticas de cultivo (exposición a la anestesia, formalina, hipoxia, hiperoxia, captura, alta densidad de siembra, deficiente alimentación y baja temperatura) no alteraron los niveles de Hsp30, Hsp70 y Hsp90 en branquias del salmón (*Salmo salar*) y con esos estudios demostraron que los estrésors comunes no provocan cambios en los niveles de expresión de esta proteína, por lo

que Hsp puede no ser un indicador sensible ante estrésores físicos que intervienen en operaciones de la acuicultura.

Algunos estudios recientes han explorado la posible relación directa entre las respuestas fisiológicas (cortisol) y celulares(HSP) de estrés en peces. Iwama y col. 2003 plantean que aunque estamos lejos de entender esta relación, se ha demostrado que las hormonas esteroides, incluyendo cortisol, pueden tener una influencia directa en la respuesta celular al estrés. Los altos niveles del cortisol en el plasma atenuaron la respuesta de Hsp30 en branquias en la trucha (*Oncorhynchus clarki*); Ackerman y col. , 2000), de Hsp70 en hígado y branquias en trucha arco iris, de Hsp70 en branquias en tilapia (Basu y col. , 2001), así como de la expresión de mRNA de la Hsp90 en cultivos primarios de los hepatocitos de la trucha arco iris (Sathiyaa y col. , 2001) y de la Hsp70 en cultivos primarios de los hepatocitos de la trucha arco iris (Boone y Vijayan, 2002).

En la comparación de las diferentes especies de tilapia se observó que para *O. hornorum* hay una disminución significativa de todos los indicadores sanguíneos analizados con respecto a *O. aureus* y en el caso del híbrido *O. aureus x O. niloticus* con sus parentales, éste presentó mayor valor del Ne y Hb que el parental *O. niloticus*, pero menor que *O. aureus*. Los resultados obtenidos confirman lo expresado por Leatherland y col. 1998 y Blaxhall 1972 que indican que las características de la sangre difieren entre especies de un mismo género, así como entre individuos sometidos a cambios genéticos; por lo que resulta de interés establecer las diferencias de los indicadores hematológicos entre especies parentales y sus híbridos con el fin de su utilización como herramienta de diagnóstico en condiciones de estrés.

En el presente estudio se analizó para *Oreochromis aureus* el efecto de estrésores físicos, biológicos y ambientales en la respuesta secundaria al estrés de un grupo de indicadores hematológicos, fáciles de determinar, factibles económicamente y que pueden ser estandarizados

y empleados en condiciones de campo, por lo que es posible su empleo en los muestreos de rutina en los centros de cultivo de esta especie.

7. CONCLUSIONES

- Se establecen los parámetros sanguíneos de referencia para *Oreochromis aureus* de cultivo. Se identificaron seis tipos de células en sangre periférica: eritrocitos, trombocitos, monocitos, neutrófilos, linfocitos maduros y jóvenes.
- La inoculación experimental con *Corynebacterium sp.* provoca a partir de las 48 h disminución de la hemoglobina, el Hemoglobina Corpuscular Media y Concentración de Hemoglobina Corpuscular Media, y disminución significativa del Volumen Corpuscular Medio, el hematócrito a las 72 horas post-inoculación y el conteo de eritrocitos a los 20 días post-inoculación, indicativo de anemia microcítica hipocrómica. Se observó aumento de neutrófilos y linfopenia desde las 48 horas.
- En la inoculación con *Aeromonas hydrophila* se observó disminución de la hemoglobina, la Hemoglobina Corpuscular Media y la Concentración de Hemoglobina Corpuscular Media a partir de las 48 h, y del número de eritrocitos a partir de las 24 horas y se mantuvo hasta los 20 días post-inoculación. Se observó aumento de neutrófilos y linfopenia desde las 48 horas.
- El anestésico MS 222 provoca cambios incremento del hematócrito y disminución de la Concentración de Hemoglobina Corpuscular Media después de las 2h post-anestesia y a las 24 horas se observó una disminución del hematócrito
- El anestésico benzocaína provoca en *O. aureus*, linfocitopenia y neutrofilia a partir de las 2 horas de recuperación de la anestesia, pero alcanza valores semejantes al control a las 24 horas,
- El nitrito en concentraciones de 30 mg/L provoca con respecto al control, disminución del hematócrito de la hemoglobina. La Concentración de Hemoglobina Corpuscular Media

- aumenta y el Volumen Corpuscular Medio disminuye respecto al control a partir de las 2 horas de tratamiento, mientras que la Hemoglobina Corpuscular Media disminuye a partir de las 24 horas.
- La exposición de *O. aureus* a concentraciones subletales de plomo, provoca disminución del contenido de hemoglobina, del número de eritrocitos y de la Concentración de Hemoglobina Corpuscular Media. En las células blancas se observó aumento de linfocitos jóvenes y neutrófilos, así como disminución de linfocitos maduros y trombocitos.
 - El empleo de altas dosis de verde malaquita provocó aumento del hematócrito, así como disminución de la Concentración de Hemoglobina Corpuscular Media a partir de las 24 horas de exposición con respecto al control. En el conteo diferencial de células blancas se halló aumento significativo con respecto a control del porcentaje de neutrófilos.
 - *Oreochromis aureus* expuestas a Triclorfon (27,5 mg/L) presentaron un aumento de los neutrófilos, una disminución de los linfocitos maduros y una disminución de los trombocitos a partir de las 24h,
 - La respuesta de las proteínas de estrés HSP 70 en tilapia *O. aureus* sometida a estrés por exposición al aire, aparece a partir de las 2 horas, mientras la respuesta de los indicadores hematológicos (hemoglobina, Concentración de Hemoglobina Corpuscular Media, Hemoglobina Corpuscular Media, Volumen Corpuscular Medio y neutrófilos) comienzan a partir de las 24 horas.
 - En la comparación de *O. aureus* con otras especies del género se observó que para *O. hornorum* se encontró una disminución significativa de todos los indicadores sanguíneos analizados con respecto a *O. aureus* con excepción de la cantidad de hemoglobina en cada eritrocito, que fue similar en ambas especies, al compararla con *O. niloticus* se

encontró que los valores de Hb fueron semejantes, pero el resto de los indicadores fueron significativamente diferentes, con mayor tamaño de cada eritrocito y valores de Hemoglobina Corpuscular Media y Concentración de Hemoglobina Corpuscular Media menores.

- El híbrido *O. aureus* x *O. niloticus* presentó mayor valor del número de eritrocitos y de la hemoglobina que el parental *O. niloticus*, pero menor que *O. aureus*, mientras que el Volumen Corpuscular Medio fue menor que para *O. niloticus* pero mayor que en *O. aureus*. Los valores de Hemoglobina Corpuscular Media y Concentración de Hemoglobina Corpuscular Media no difirieron de forma significativa para *O. niloticus* y el híbrido *O. aureus* x *O. niloticus*, mientras *O. aureus* presentó los mayores valores de estos dos indicadores.

8.PERSPECTIVAS

Los resultados de este estudio contribuyen al conocimiento de los índices hematológicos en tilapia aurea (*O. aureus*), de cultivo semintensivo. Se establecieron los indicadores hematológicos de la especie para los índices eritrocíticos y el contero diferencial de células blancas y luego fue comparado el comportamiento frente a estresores biológicos, ambientales y físicos. Con estos resultados podemos enriquecer la investigación aplicada y básica, y contribuir a las necesidades prácticas del cultivo con una herramienta que ayude a mantener el estado fisiológico óptimo en los peces y con ello mitigar las pérdidas económicas por enfermedades o cambios ambientales.

Desde el punto de vista veterinario, es importante saber que los indicadores hematológicos pueden ser empleados como instrumento de diagnóstico presuntivo en la rutina diaria en las granjas de cultivo de *Oreochromis aureus* (tilapia), ya que están influenciados por diversos factores, y esta práctica contribuirá a detectar a tiempo cualquier cambio en el estado fisiológico de los mismos.

Sin embargo, es necesario continuar estudios de profundización en esta temática en esta especie y en otras de interés.

9. BIBLIOGRAFÍA CONSULTADA

- Ackerman, P.A. and Iwama, G.K. 2001. Physiological and cellular stress responses of juvenile rainbow trout to vibriosis 2001. *Journal of Aquatic Animal Health* 13:173–180.
- Ackerman, P. A., Forsyth, R. B., Mazur, C. F. and Iwama, G. K. 2000. Stress hormones and the cellular stress response in salmonids. *Fish Physiol. Biochem.* 23, 327-336.
- Adams, S. M. (Ed). 2002. Biological indicators of aquatic ecosystem stress. American Fisheries Society, Bethesda, Maryland. <http://www.fisheries.org> (consultado 23 febrero 2005).
- Adams, S. M. y R. B. Mclean, 1985. Estimation of largemouth bass, *Micropterus salmoides* Lacepede, growth using the liver somatic index and physiological variables. *J. Fish Biol.*, 26: 111-126.
- Adams, S.M. 1990a. Biological indicators of stress in fish. *American Fisheries Society Symposium*, 8, pp1-191.
- Alamilla T. H. 2004 Cultivo de tilapia disponible en <http://www.zoetecnocampo.com> (consultado enero 2004)
- Albahary C. 1972. Lead and hemopoiesis. The mechanism and consequences of the erythropathy of occupational lead poisoning. *Am J Med* 52:367-378.
- Alderman D.J. (1985) Malachite green: a review. *Journal of Fish Diseases* 8, 289-298.
- Alderman, D.J., Clifton-Hadley, R.S., 1993. Malachite green: a pharmacokinetic study in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). *J. Fish Dis.* 16 (4), 297–311.
- Alkahem, H. F. 1994: The toxicity of nickel and the effects of sublethal levels on haematological parameters and behaviour of the fish, *Oreochromis niloticus*. *J. Univ. Kuwait. Sci.* 21: 243–252.
- Amend DF, Smith LS. 1974. Pathophysiology of infectious hematopoietic necrosis virus disease in rainbow trout (*Salmo gairdneri*): Early changes in blood and aspects of the immune response after injection of IHN virus. *J Fish Res Board Can* 21:1371– 1378.
- Amlacher, E, 1961. The effects of malachite green of fish, fish parasites (*Ichthyophthirius*, *Trichondina*), small crustaceans and water plants. *Deutsche Fisher. Zeitung* 8, 12–15.
- Amlacher, E. 1986. Enfermedades de los Peces. Editorial Acribia. España. 319p.
- Anees, M. A. 1978: Haematological abnormalities in a freshwater teleost, *Channa punctatus* (Bloch), exposed to sublethal and chronic levels of three organophosphorus insecticides. *Int. J. Ecol. Environ. Sci.* 4: 53–60.

- Atwood H. L., Q. C. Fontenot and J. R. Tomasso, J. J. Isely 2001. Toxicity of Nitrite to Nile Tilapia: Effect of Fish Size and Environmental Chloride. *North American Journal of Aquaculture*: Vol. 63, No. 1, pp. 49–51.
- Aydin, S., N. Gutelpeand H. Yildiz. 2000. Natural and experimental infections of *Campylobacter cryaerophila* in rainbow trout, gross pathology, bacteriology, clinical pathology and chemotherapy. *Fish Pathology* 35(3): 117-123.
- Badawi N.K., M.M.Said 1971: A comparative study of the blood of four Tilapia species (Pisces). *Marine Biology*. 8(3):202-204.
- Balfry SK, Shariff M, Iwama GK 1997 Strain differences in non-specific immunity of tilapia *Oreochromis niloticus* following challenge with *Vibrio parahaemolyticus* DAO 30:77-80 (1997).
- Balm, P. H. M., Pepels, P., Helfrich, S., Hovens, M. L. M. and Wendelaar Bonga, S. E. (1994). Adrenocorticotrophic hormone in relation to interrenal function during stress in tilapia (*Oreochromis mossambicus*). *Gen. Comp. Endocrinol.* 96,347 –360.
- Barham, W. T.; Smit, G. L. and Schoonbee, H. J. (1980), The effect of bacterial infection on erythrocyte fragility and sedimentation rate of rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson. *Journal of Fish Biology*, 16, 177-180.
- Barton, B. A., R. E. Zitzow. 1995. Physiological responses of juvenile walleyes to handling stress with recovery in saline water. *The Progressive Fish-Culturist* 57:267-276.
- Barton, B., Iwama, G. 1991. Physiological changes in fish from stress in aquaculture with emphasis on the response and effects of corticosteroids. *Rev. of Fish Disease*, 3-26.
- Basu N, Nakano T., Grau E.G., Iwama G.K. 2001. The effects of cortisol on heat shock protein 70 levels in two fish species. *Gen. Comp. Endocrinol.* 124, 197-105.
- Basu, N., Todgham, A. E., Ackerman, P. A., Bibeau, M. R., Nakano, K., Schulte, P. M. and Iwama, G. K. (2002). Heat shock protein genes and their functional significance in fish. *Gene* 295,173 –183
- Baticados M.C.L. y Paclibare J.O. (1992) The use of chemotherapeutic agents in aquaculture in the Philippines. In: *Diseases in Asian Aquaculture II* (ed. by M. Shariff, R.P. Subasinghe y J. Richard Arthur), pp.531-546. Fish Health Section, Asian Fisheries Society, Manila, Philippines.
- Beasley V. 1999. Toxicants with Mixed Effects on the Central Nervous System (Part I) In: *Veterinary Toxicology*, V. Beasley (Ed.) Publisher: International Veterinary Information Service (www.ivis.org), Ithaca, New York, USA. (9-Aug-1999)

- Benarji, G., Rajendranath, T. 1990: Haematological changes induced by an organophosphorus insecticide in a freshwater fish *Clarias batrachus* (Linnaeus). *Trop. Freshwat. Biol.* 2: 197–202.
- Benfey, T.J. y M. Biron, 2000. Acute stress response in triploid rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and brook trout (*Salvelinus fontinalis*). *Aquaculture* 184: 167-176.
- Billard, R., Bry, C., Gillet, C. 1981. Stress environment and reproduction in teleost fish. In: *Stress and Fish*. Pickering ed. London, Academic Press. 185-201.
- Bills T.D., Marking L.L. y Olson L.E. (1977) Effects of residues of the polychlorinated biphenyl Aroclor 1254 on the sensitivity of rainbow trout to selected environmental contaminants. *Progressive Fish-Culturist* 39, 150-159.
- Blaxhal P.C. y Daisley K.W. (1973) Routine haematological methods for use with fish blood. *Journal of Fish Biology* 771- 781.
- Blaxhall P.C. 1972 Haematological assesment of health of freshwater fish. A review of selected literature. *Journal of Fish Biology*. 4(4): 593-604.
- Blaxhall PC, Daisley KW (1973). Routine haematological methods for use with fish blood. *J. Fish Biol.* 5: 771 – 781.
- Boone, A. N. y Vijayan, M. M. 2002. Constitutive heat shock protein 70 (HSC70) expression in rainbow trout hepatocytes: effect of heat shock and heavy metal exposure. *Comp. Biochem. Physiol. C* 132, 223-233.
- Bourne, P.K. 1986. Changes in hematological parameters associated with capture and captivity of the marine teleost, *Pleuronectes platessa* L. *Comp. Biochem. Physiol.* 85A:435-443.
- Brenden, R. A. y Huizinga, H. W. (1986), Pathophysiology of experimental *Aeromonas hydrophila* infection in goldfish, *Carassius auratus*. *Journal of Fish Diseases*, 9, 163-167.
- Brown D.A.: D.J. Mc Leay 1975: Effect of nitrite on methemoglobin and total hemoglobin of juvenile rainbow trout. *Prog. Fish-Culturist*. 37 (1):36-38.
- Cardwell R.D. y Smith L.S., 1971. Hematological manifestations of vibriosis upon juvenile chinook salmon. *Progressive Fish Culturist*, 33, 232-235.
- Castillo Campo I. F 2003. Tilapia roja 2003, una evolución de 22 años, de la incertidumbre al éxito. Disponible en <http://www.red-arpe.cl/documentos.php> (consultado enero 2005)
- Cnaani. A, M. Ron, E. Seroussi, G. Hulata 2002. Genetic analysis of inmunological traits in Tilapia. Naga, The ICLARM Quaterly. Vol. 25 No. 2

- Cossarini-Dunier M, Demael A, Siwicki AK. 1990 In vivo effect of the organophosphorus insecticide trichlorphon on the immune response of carp (*Cyprinus carpio*). I. Effect of contamination on antibody production in relation to residue level in organs. *Ecotoxicol Environ Saf.* Feb;19(1):93-8.
- Costa-Pierce, B. A. and R.W. Doyle. 1997. Genetic identification and status of tilapia regional strains in southern California. Pages 1-17 in B. A. Costa-Pierce and J.E. Rakocy, eds. *Tilapia aquaculture in the Americas*, Vol. 1. World Aquaculture Society, Baton Rouge, Louisiana, United States.
- Costa-Pierce, B.A., S. Zainal and P. Effendi, 1988. "ICLARM and South-South Technology Transfer: Philippine Aquaculture Technology and Indonesia". *Naga* 11(4): 10-11.
- Currie S., C.D. Moyes y B L Tufths 2000 The effects of heat shock and acclimation temperature on hsp70 and hsp30 mRNA expression in rainbow trout: *in vivo* and *in vitro* comparisons *Journal of Fish Biology* (56, 398–408.
- Cyriac P.J., Antony A. and Nambisan P.N.K. 1989. Haemoglobin and hematocrit values in the fish, *Oreochromis mossambicus* (Peters) after short term exposure to copper and mercury. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*43: 315-320.
- Chekrabarty P, Benerjee V (1988). Effects of sublethal toxicity of three organophosphorus pesticide on the peripheral haemogram of the fish, (*Channa punctatus*). *Environ. Ecol.* 6: 151 – 158.
- Cho, G.K., Heath, D.D., 2000. Comparison of tricaine methanesulphonate (MS222) and clove oil anaesthesia effects on the physiology of juvenile chinook salmon *Oncorhynchus tshawytscha* (Walbaum). *Aquac. Res.* 31,537–546.
- Darwish A.M., B.R.Griffin, D.L:Straus, A:J:Mitchell 2001. Histological and Hematological evaluation of Potassium permanganate exposure in channel catfish. *J. Aquatic Animal health* 14(2): 134-144.
- Davidson J, Henry JB. 1982. Diagnóstico clínico por el laboratorio. La Habana: Editorial Científico-Técnica. 825pp.
- de Moor, I.J. and M.N. Bruton, 1988. *Atlas of alien and translocated indigenous aquatic animals in southern Africa*. A report of the Committee for Nature Conservation Research National Programme for Ecosystem Research.. South African Scientific Programmes *Report No. 144.* 310 p. Port Elizabeth, South Africa.
- Delaney, M.A., Klesius, P.H. 2004. Hypoxic conditions induce hsp70 production in the blood, brain and head kidney of juvenile Nile tilapia *Oreochromis niloticus*(L.). *Aquaculture*. Disponible en: http://www.ars.usda.gov/research/publications/publications.htm?SEQ_NO_115=140771 (consultado 21 Julio 2005)

- Desilva, S.S. and K. Senaratne, 1988. "Oreochromis mossambicus is not universally a Nuisance Species: The Sri Lankan Experience". Pages 445-450 in R.S.V. Pullin, T.
- Dimitrova, M. S., Tishinova, T. y Velcheva, V., 1994, Combined effects of zinc and lead on the hepatic superoxide dismutase-catalase system in carp. *Comp. Biochem. Physiol.*, 108C: 43-46.
- Doggett, T. A.; Wrathmell, A. B. y Harris, J. E. 1987. A cytochemical and light microscopical study of the peripheral blood leucocytes of *Oreochromis mossambicus*, Cichlidae. *J. Fish Biol.*, 31:147-53.
- Duffy L.K., Scofield E., Rodgers T., Patton M., Bowyer R.T. 1999 Comparative baseline levels of mercury, hsp70 and hsp60 in subsistence fish from the Yukon-Kuskokwin delta region of Alaska. *Com. Biochem. Physiol. Toxicol. Pharmacol.* 124:181-186.
- Dunier M., Siwicki A.K. y Demael A. 1991 Effects of organophosphorus insecticides: effects of trichlorfon and dichlorvos on the immune responses of carp (*Cyprinus carpio*) III In vitro effects on lymphocyte proliferation and phagocytosis and in vivo effects on humoral responses. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 22,79-87.
- Duthie, G. G. y Tort, L. (1985). Effects of dorsal aortic cannulation on the respiration and haematology of Mediterranean living *Scyliorhinus canicula*. *Comp. Biochem. Physiol.* 81A, 879-885.
- Eknath, A.E., J.M. Macaranas, L.Q. Agustin, R.R. Velasco, M.C.A. Ablan, M.J.R. Pante and R.S.V. Pullin. 1991. "Biochemical and Morphometric Approaches to Characterize Farmed Tilapias". *Naga* April 1991: 7-9.
- Ellis, A. E. 1976. Leucocytes and related cells in the plaice *Pleuronectes platessa*. *J. Fish. Biol.* 8:143-156.
- Ellsaesser, C.F., Clem, L.W., 1986. Haematological and immunological changes in channel catfish stressed by handling and transport. *J. Fish Biol.* 28, 511-- 521.
- Engle, C.R. 1997a. Economics of tilapia aquaculture. Pages 229-243 in B.A. Costa-Pierce, and J.E. Rakocy, editors. *Tilapia aquaculture in the Americas*, Volume One. World Aquaculture Society Baton Rouge, Louisiana.
- Ezzat A.A., M.B. Shabana, A.M. Farghaly (1974) Studies on the blood characteristics of *Tilapia zilli* (Gervasi) I. Blood cells. *J. Fish. Biology* 6, 1-12.
- Falanghe Carneiro Paulo César , Elisabeth Criscuolo Urbinati y Maurício Laterça Martins. 2002 Transport with different benzocaine concentrations and its consequences on hematological parameters and gill parasite population of matrinxã *Brycon cephalus* (Günther, 1869) (Osteichthyes, Characidae) ,*Acta Scientiarum* v. 24, n. 2, p. 555-560.

- FAO, 2004 *The State of World Fisheries and Aquaculture (Sofia)2004*. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome, Italy.
- Feder, M.E. and G.E. Hofmann. 1999. Heat shock proteins, molecular chaperones and the stress response: Evolutionary and ecological physiology. *Ann. Rev. Physiol.* 61: 243-282.
- Fernández AB, de Blas I, Ruiz I. El sistema inmune de los teleósteos (I): Células y órganos. *Revista AquaTIC*, nº 16, Abril 2002. [Disponible el 3/08/2004 en URL: <http://www.revistaaquatic.com/aquatic/art.asp?t=hyc=146>]
- Fiege, U., Morimoto, R., Yahara, I., Polla, B. S. (eds.) 1996. *Stress-inducible cellular responses*. Birkhauser Verlag, Basel, Boston, Berlin Lakhotia, S. C., 1998. Stress biology: a challenging area in integrated biology. *Biology International*, 36: 18-30.
- Fink, A. L. and Goto, Y. (1998). *Molecular Chaperones in the Life Cycle of Proteins: Structure, Function, and Mode of Action*. New York: Marcel Dekker.
- Fitzpatrick M.S., Schreck C.B., Chitwood R.L. y Marking L.L. (1995) Evaluation of three candidate fungicides for treatment of adult spring chinook salmon. *Progressive Fish-Culturist* 57, 153-155.
- Fitzsimmons, K. 2001. Tilapia markets in the Americas: 2001 and beyond. *Global Aquaculture Advocate* 4(4):75-78.
- Flajshans M, Vajcová V. 2003, The haematology of gynogenetic tench, *Tinca tinca* L., and of recessively homozygous colour strains. *J. Appl. Ichthyol.* 19:170-3.
- Foda, A 1973: Changes in hematocrit and hemoglobin in Atlantic salmon (*Salmo salar*) as a result of furunculosis disease. *J Fisheries Res Board of Canada* 30: 467-468.
- Folmar L.C. 1993. Effects of chemical contaminants on blood chemistry of teleostean fish: a bibliography and synopsis of selected effects. *Environ.Toxicol.Chem.* 12: 337-375.
- Forsyth R.B., Candido E.P.M., Babich S.L. and Iwama G.K. 1997. Stress protein expression in coho salmon with Bacterial Kidney Disease. *Journal of Aquatic Animal Health*.
- Gamperl A.K., M.M. Vijayan, and R. G. Boutilier 1994. Experimental control of stress hormone levels in fishes: techniques and applications. *Rev. Fish. Biol. Fish.* 4, 215-255.
- Ghosh, K., Banerjee, V. 1993: Alteration in blood parameters in the fish *Heteropneustes fossilis* exposed to dimethoate. *Environ. Ecol.* 11: 979–981.
- Glazova N.T.1976 Physiological and biochemical characteristics of blood tropical fishes Pacific Ocean. *Journal of Ichthyology (Voprosy Ikhtiologii)*16(6): 107-118.

- Golovina N.A. 1996. Morphofunctional characteristics of the blood of fish-objects of aquatic culture. Thesis for doctor .s degree in biological sciences. 53 pp. (in Russian).
- Grizzle, J.M., 1977. Hematological changes in fingerling channel catfish exposed to malachite green. *Prog. Fish Cult.* 39 (2), 90–93.
- Haney DC, DA Hursh, MC Mix and JR Winton 1992. Physiological and Hematological Changes in Chum Salmon Artificially Infected with Erythrocytic Necrosis Virus. *J. Aquat. Anim. Health* 4, 48 57.
- Harbell, S.C, Hodgins, H. O., Schiewe, M. H 1979: Studies on the pathogenesis of vibriosis in coho salmon, *Oncorhynchus kisutch* (Walbaum). *J Fish Dis* 2: 391- 404.
- Harms, C.E., C.V. Sullivan, R.G. Hodson, and M.K. Stoskopf. 1996. Clinical pathology and histopathology characteristics of net stressed striped bass with “red tail.” *J. Aquatic Animal Health.* 8: 82-86.
- Hassanein H.M.A., Banhawy M.A., Soliman F.M., Abdel-Rehim S.A., Muller W.E.G., Schroeder H.C. 1999 Induction of hsp70 by the herbicide oxyfluoren (goal) in the Egyptian Nile fish. *Oreochromis niloticus*. *Arch. Env. Contam. Toxicol.* 37, 78-84.
- Hattingh J, Van Pletzen AJJ (1974). The influence of capture and transportation on some blood parameters of freshwater fish. *Comp. Biochem. Physiol.* 49a: 607 – 609.
- Hawkey, C.; Kock, R. A.; Henderson, G. M. and Cindery, R. N. (1990), Haematological changes in domestic fowl (*Gallus gallus*) and cranes (Gruiformes) with *Mycobacterium avium* infection. *Avian Pathology*, 19, 223-234.
- Hemre, G., Krogdahl, A. 1996. Effect of handling and fish size on secondary changes in carbohydrate metabolisms in Atlantic salmon, *Salmo salar* L. *Aquaculture Nutrition* 2, 249-252.
- Helga J. 2004. Mercado mundial de tilapia. Rome, Septiembre 2004, disponible en http://www.globefish.org/files/Tilapiaspanish_161.pdf (consultado Enero 2005).
- Herwig, N. 1979. Handbook of Drugs and Chemicals Used in the Treatment of Fish Diseases. Charles C. Thomas Publisher, Spring Field, Illinois. 272 p.
- Hiruni U. Ch. y A. Pathiratne. 2005 Influence of low concentrations of Trichlorfon on haematological parameters and brain acetylcholinesterase activity in common carp, *Cyprinus carpio* L. *Aquaculture Research*, 2005, 36, 144-149.
- Hlavek R.R. Bulkley R.V.1980: Effects of malachite green on leucocyte abundance in rainbow trout *Salmo gairdneri* (Richardson). *J. Fish Biology* 17(4): 431-444.

- Hodson, P. V., 1976, d-amino levulinic acid dehydratase activity of fish blood as an indicator of a harmful exposure to lead. *J. Fish. Res. Board Can.*, 33: 268-271.
- Hodson, P. V., Blunt, B. R. y Spry, D. J., 1978a, Chronic toxicity of waterborne and dietary lead to rainbow trout (*Salmo gairdneri*) in lake Ontario water. *Water Res.*, 12: 869-878.
- Hodson, P. V., Blunt, B. R. y Spry, D. J., 1978b, pH-induced changes in blood lead of lead-exposed rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *J. Fish Res. Board Can.*, 35: 437-445.
- Hodson, P. V., Blunt, B. R., Jensen, D. y Morgan, S., 1979, Effect of fish age on predicted and observed chronic toxicity of lead to rainbow trout in lake Ontario water. *J. Great Lakes Res.*, 5: 84-89.
- Hodson, P. V., Blunt, B. R., Spry, D. J. y Austen, K., 1977, Evaluation of erythrocyte d-amino levulinic acid dehydratase activity as a short-term indicator in fish of a harmful exposure to lead. *J. Fish. Res. Board Can.*, 34: 501-508.
- Hodson, P. V., Hilton, J. W., Blunt, B. R. y Slinger, S. J., 1980, Effect of dietary ascorbic acid on chronic lead toxicity to young rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, 37: 170-176.
- Hodson, P. V., Whittle, D. M., Wong, P. T. S., Borgmann, U., Thomas, R. L., Chau, Y. K., Nriagu, J. O. y Hallet, D. J., 1984, Lead contamination of the Great Lakes and its potential effects on aquatic biota. In: J. O. Nriagu y M. S. Simmons (eds.), *Toxic contaminants in the Great Lakes*. John Wiley and Sons, Indianapolis, In.
- Hoffmann, R, Lommel, R 1984: Haematological studies in proliferative kidney disease of rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson. *J Fish Dis* 7: 323-326.
- Hontela, A. 1997. Endocrine and physiological responses of fish to xenobiotics: role of glucocorticosteroid hormones. *Reviews in Toxicology* 1: 1-46.
- Hontela, A., Rasmussen, J., Audet, C., Chevalier G. 1992. Impaired Cortisol Stress Response in Fish from Environments Polluted by PAHs, PCBs, and Mercury. *Archive Environmental Contam. Toxicology*. 22:278-283.
- Houston, A.H. 1990. Blood and circulation. In *Methods for Fish Biology*. Scherck, C.B. y Moyle P:B(eds) pp 273-334. American Fisheries Society. Maryland.
- Hrubec T.C., J.L. Cardinale, S.A. Smith 2000. Haematology and Plasma chemistry reference intervals for cultured Tilapia (*Oreochromis hybrid*). *Vet. Clin. Pathol.* 19(1): 7-12.
- Huss, H.H. (ed.) 1998. El pescado fresco: su calidad y cambios de su calidad. *FAO Documento Técnico de Pesca*. No. 348. Roma, FAO. 202p.

- Hussein SY, El -Nasser MA, Ahmed SM 1996. Comparative studies on the effects of the herbicide atrazine on freshwater fish *Oreochromis niloticus* and *Chrysichthyes auratus* Assiut, Egypt. *Bull Environ Contam Toxicol* 57:503-510.
- IGFA, 2001. *Database of IGFA angling records until 2001*. IGFA, Fort Lauderdale, USA..
- intoxication. *Bull. VUR Vodnany* 7: 29-36.
- Ivanova I.I.1981: *Atlas de células sanguíneas de peces*. Ed. Liogskaya promichlennost. Moskva 184 pp .
- Iwama G. K., Luis O. B. Afonso, Anne Todgham, Paige Ackerman y Kazumi Nakano 2004. Are hsp suitable for indicating stressed states in fish? *The Journal of Experimental Biology* 207, 15-19
- Iwama G. K. 2002. Stress in fish: a tribute to Dave Randall, mentor and friend. International Congress on the Biology of Fish July 21-26, 2002 - University of British Columbia, Vancouver .CANADA. Disponible en: <http://www-heb.pac.dfo-mpo.gc.ca/congress/2002/Randall/randall.htm> (consultado 10 Agosto, 2004).
- Iwama G.K, L.O.B. Afonso, y M.M. Vijayan, 2004: Stress in Fish. AquaNet Workshop on Fish Welfare, September 2. Disponible en <http://www.aquanet.ca/English/research/fish/iwama.pdf> (consultado 15 Julio, 2005).
- Iwama GK, Greer GL, Larkin DA (1976). Changes in some hematological characteristics of coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*) in response to acute exposure to dehydroabietic acid (DHAA) at different exercise levels. *J. Fish. Res. Bd Can.* 33: 285 –289.
- Iwama, G.K., Morgan, J.D., and Barton, B.A. 1995. Simple field methods for monitoring stress and general condition of fish. *Aquacult. Res.* 26: 273.282.
- Iwama, G.K., Thomas, P.T., Forsyth, R.B., and M.M. Vijayan. 1998. Heat shock protein expression in fish. *Rev. Fish Biol. Fish.* 8: 35-56.
- Kaatari, S., Tripp, R. 1987. Cellular mechanisms of glucocorticoid immunosuppression in salmon. *Journal Fish Biology* 31 A: 129-132.
- Kabata Z. (1985) *Parasites and Diseases of Fish Cultured in the Tropics*. Taylor y Francis, London, UK,318 pp.
- Khallaf, E.E.; Ane-Na-Ei, A.A.; Abdelmeguid, N.E. And Yossif, G.A..1999 Experimental studies on the effect of toxicity of lead acetate on the growth and gonado-somatic index of *Oreochromis niloticus* (Linnaeus, 1757) *J. Egypt. Ger. Soc. Zool.*, vol. 30(b), 1-11,
- Khattak, I. U. D., Hafeez, M. A. 1996: Effect of malathion on blood parameters of the fish, *Cyprinion watsoni*. *Pak. J. Zool.* 28: 45–49.

- Klontz, G. W. 1972. Haematological techniques and immune response in rainbow trout. In: Diseases of fish (Ed. Mawdesley-Thomas, L.E.), Symp. Zool. Soc. Lond. No. 30. New York and London: Academic Press. pp. 89-99.
- Lakhotia, S. C. and Singh, A. K., 1998. A novel set of heat shock polypeptides in malpighian tubules of *Drosophila melanogaster*. *J. Genet.*, 68: 129-137.
- Langston Al, Hoare R, Stefansson M, Fitzgerald R, *et al* 2002. The effect of temperature on non-specific defence parameters of three strains of juvenile Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus* L.). *Fish Shellfish Immunol.*; 12:61-76.
- Leatherland J. F., J.S. Ballantyne, G. Van der Kraak 1998 Diagnostics assessment of no-infectious disorders of captive and wild fish populations and the use of fish as the sentinel organisms for environmental studies. In *Fish Diseases and Disorders: Volume 2: Non-infectious disorders*. CAB International.(eds. Leatherland J. F and P.T.K. Woo) p. 335-365
- Lee, G. R.; Bithell, T. C.; Foerster, J.; Athens, J. W. y Lukens, J. N.1983 *Wintrobe _ Hematologia clinica*. São Paulo, Manole.
- Lewis S.; Handy R.D.; Cordi B.; Billingham Z; Depledge M.H.1999 Stress proteins (HSP's): Methods of Detection and Their Use as an Environmental Biomarker. *Ecotoxicology* Volume 8, Number 5, October 1999, pp. 351-368(18).
- Lison, L. Lipides et lipoproteines.In: LISON, L. *Histochemie et cytochimie animales. Principes et méthodes*. Paris, Gauthier-Villars, 1960. V. 2. pp 449-530,
- Little, E.E., Behavioral measures of environmental stressors in fish, in *Biological Indicators of Stress in Fish*, 2nd Ed., Adams, S.M., Ed., American Fisheries Society, Bethesda, 2002, 431.
- Lobel, P.S. 1980. "Invasion by the Mozambique Tilapia (*Sarotherodon mossambicus*; Pisces; Cichlidae) of a Pacific Atoll Marine Ecosystem". *Micronesica* 16: 349-355.
- Lückstädt Christian, Ralph O. Schill, Ulfert Focken, Heinz-R. Köhler y Klaus Becker 2004.Stress protein Hsp70 response of Nile Tilapia *Oreochromis niloticus niloticus* (Linnaeus, 1758) to induced hypoxia and recovery *Verhandlungen der Gesellschaft für Ichthyologie Band 4, 2004, 137-141*.
- Maloyan Alina, Aaron Palmon y Michal Horowitz, 1999. Heat acclimation increases the basal HSP72 level and alters its production dynamics during heat stress. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* Vol 276 No 5, R1506-R1515.
- Margiocco, C., Arillo, A., Mensi, P., y Schenone, G. 1983. Nitrite bioaccumulation in *Salmo gairdneri* Rich. and hematological consequences. *Aquat. Toxicol.* 3: 261–270.

- Marone M., S. Mozzetti, D. De Ritis, L. Pierelli, G. Scambia. 2001 Semiquantitative RT-PCR analysis to assess the expression levels of multiple transcripts from the same sample *Biol. Proced. Online* 3(1): 19-25
- Mazeaud, M., Mazeaud, F., Donaldson, E. 1977. Primary and secondary effects of stress in fish:some new data with a general review. *Transactions of the American Fisheries Society*. 106, 201-212.
- Mazur, C.F. and G.K. Iwama, 1993. Effect of handling and stocking density on haematocrit, plasma cortisol and survival in wild and hatchery-reared chinook salmon, *Onchorhynchus tshawytscha*. *Aquaculture*, 112: 291-299
- Mc Leay D.J. y M.R. Gordon,. 1977. Leucocrit: a simple hematological technique for measuring acute stress in salmonid fish., including stressful concentrations of pulp mill effluent. *Journal of the Fisheries Research Board of Canada*.
- McCormick, S., Shrimpton, J., Carey, J., O'dea, M., Sloan, K., Moriyama, S., Björnson, B. 1998. Repeated acute stress reduces growth rate of Atlantic salmon parr and alters plasma levels of growth hormone, insulin-like growth factor I and cortisol. *Aquaculture* 168: 221-235.
- McDonald, G. , J. Paul, B. Cruickshank. 1998. *Atlas de hematología*. Editorial Medica Panamericana SA. 5ta edicion. 277p
- McDonald, G. y Milligan, L. 1997. "Ionic, Osmotic and Acid-Base Regulation in Stress." *In Fish Stress and Health in Aquaculture* (ed. By Iwama, G.W. Pickering, A.D. Sumpter, J.P. and Schreck, C.B.), pp. 119-144. University Press, Cambridge, UK.
- McKim J.M., Christensen G.M. and Hunt E.P. 1970.Changes in the blood of brook trout after short-term and long-term exposure to copper. *J. Fish. Res. Board Can.* 27: 1883-1889.
- Meyer, F.P., Jorgensen, T.A., 1983. Teratological and other effects of malachite green on the development of rainbow trout and rabbits. *Trans. Am. Fish. Soc.* 112 (6), 818–824.
- MIP- Ministerio Industria Pesquera .Cuba. Informe anual 2003. MIP Ciudad Habana. Cuba
- Mishra BK, Kumar D, Mishra R (1983) Observations on the use of carbonic acid anaesthesia in fish fry transport. *Aquaculture*. 32(3-4):405-408.
- Molina A., Biemar, F., Muller, F., Iyengar, A., Prunet, P., Maclean, N., Martial, J. A. y Muller, M. 2000 Cloning and expression analysis of an inducible HSP70 gene from tilapia fish. *FEBS Letters*, Volume 474, Issue 1, Pages 5-10 .
- Molnar, K., 1995. Effect of exposure to malachite green solution on common carp fry with *Dactylogyrus vastator* infection. *Acta. Vet. Hung.* 43 (2–3), 277–286.

- Montero, D., Blazer, V.S., Socorro, J., Izquierdo, M.S. y Tort, L. (1999) Dietary and culture influences on macrophage aggregate parameters in gilthead seabream (*Sparus aurata*) juveniles. *Aquaculture*, 179, 523–534
- Morales A.E., García-Rejón L. y de la Higuera M. 1990. Influence of handling and/or anaesthesia on stress response in rainbow trout. Effects on liver primary metabolism. *Comparative Biochemistry and Physiology* 95A, 87–93.
- Morales Amalia E, Gabriel Cardenete, Emilia Abellan, Laura García-Rejon. 2005. Stress-related physiological responses to handling in common dentex (*Dentex dentex* Linnaeus, 1758) *Aquaculture Research*, Vol. 36, 33-40.
- Morgan J.D. e Iwama G.K. (1997) Measurements of stressed states in the field. In *Fish stress and health in aquaculture* Ed. G.K. Iwama, A.D. Pickering, J.P. Sumpter, C:B: Schreck Society for Experimental Biology Seminar series; 62.
- Morimoto RI, Tissieres A, Georgopoulus C. 1990. The stress response, functions of the proteins and perspectives. En: Morimoto RI, Tissieres A, Georgopoulus C (eds.). *Stress proteins in biology and medicine*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, USA. págs. 1-36.
- Morimoto, R. I., Tissieres, A., Georgopolous, C. (eds.) 1994. *The biology of heat shock proteins and molecular chaperones*. Cold Spr. Harb. Press, Cold Spr. Harb. N.Y.
- Munday, P.L.; Wilson, S.K. Comparative efficacy of clove oil and other chemicals in anaesthetization of *Pomacentrus amboinesnsis*, a coral reef fish. *Journal of Fish Biology*, v.51, p.931-938, 1997.
- Murad, A., Houston, A. H. 1988: Leucocytes and leucopoietic capacity in goldfish, *Carassius auratus*, exposed to sublethal levels of cadmium. *Aquat. Toxicol.* 13: 141–154.
- Musa, S.O. y Omoregie, E. (1999). Haematological changes in the mudfish, *Clarias gariepinus* (Burchell) exposed to malachite green. *Journal of Aquatic Sciences*, 14: 37 - 42.
- Nakayasu Ch., T. Yoshinaga, A. Kumagai 2002. Hematological characterization of anemia recently prevailing in wild Japanese flounder in Japan. *Fish Pathology*, 37(1), 38-40.
- Nath, R., Banerjee, V. 1996: Effect of pesticides methylparathion and cypermethrin on the air-breathing fish *Heteropneustes fossilis*. *Environ. Ecol.* 14: 163–165.
- National Committee for Clinical Laboratory Standards. 1992. *How to Define, Determine, and Utilize Reference Intervals in the Clinical Laboratory; Proposed Guidelines*. Villanova, Pa: NCCLS; Document C28-P.

- Neiland J.B.1974: Iron and its role in microbial physiology p4-34 in J.B Neilands. *Microbials iron metabolism. Academic Press. N. York.*
- Nelson, N.C., 1974. A review of the literature on the use of malachite green in fisheries. US National Technical Information Service, Washington, DC, Document No. PB 235-450, 88 pp.
- Nicovita. Manual de crianza tilapia. Disponible en http://www.nicovita.com.pe/pdf/esp/manuales/man_tilapia_01.pdf (consultado Diciembre 2003)
- Nikinmaa M (ed) 1990 Vertebrate red blood cells: adaptations of function to respiratory requirements. *Zoophysiology*, 28, 1-262
- Nover, L. and Scharf, K.-D., 1997. Heat stress proteins and transcription factors. *Cell. Mol. Life Sci.*, 53: 80-103
- Omeregje, E., Ofojekwu, P.C., Anosike, J.C., Adeleye, A.O., 1998. Acute toxicity of malachite green to the Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* (L.). *J. Aquat. Trop.* 13 (4), 223-237.
- Page, L.M. and B.M. Burr, 1991. *A field guide to freshwater fishes of North America north of Mexico.* Houghton Mifflin Company, Boston. 432p.
- Palachek, RM, Tomasso, JR 1984: Toxicity of nitrite to channel catfish (*Ictalurus punctatus*), tilapia (*Tilapia aurea*), and largemouth bass (*Micropterus salmoides*): evidence for a nitrite exclusion mechanism. *Can J Fish Aquat Sci* 41:1739-1744.
- Palíková M., J. Mares, J. Jirásek 1999. Characteristics of Leukocytes and Thrombocytes of Selected Sturgeon Species from Intensive Breeding. *Acta Vet. Brno*, 68: 259–264.
- Pankhurst, N., Van Der Kraak, G. 2000. Evidence that acute stress inhibits ovarian steroidogenesis in rainbow trout in vivo, through the action of cortisol. *General and Comparative Endocrinology* 117: 225-237.
- Pickering, A. 1981. The concept of biological stress. In Pickering, A. Ed. *Stress and Fish.* Academic Press, London : 1-9.
- Pickering, A., Pottinger, T., Christie, P. 1982. Recovery of the brown trout, *Salmo trutta* L., from acute handling stress: a time course study. *Journal of Fish Biology* 20:229-244.
- Pickford, G., Srivastava, A., Slicher, A., Pang, P. 1971. The stress response in the abundance of circulating leucocytes in the killifish, *Fundulus heteroclitus*. *J. Exp. Zool.* 177: 97-108
- Pieterse J.J.; G.L.Smith; K. Van Vliet; H.J. Schoenbee; J.Hatting 1981: Observation on the blood the chinese silver carp (*Hippophthalmichthys molitrix*) .*J Fish biology* 18: 455-459.

- Popma T., Masser M., 1999. Tilapia: life history and biology. Southern Regional Aquaculture Center Publication 283.
- Post G. (1987) Textbook of Fish Health. T. F. H. Publications, Neptune City, NJ, USA, 288pp.
- Pottinger, T. 1998. Changes in blood cortisol, glucose and lactate in carp retained in anglers keep nets. *Journal of Fish Biology*. 53: 728-742.
- Prieto Adela, Emma Fajer, Raquel Silveira 1986. Utilización de Ms-222 en el trabajo con alevines de Tilapia. *Rev. Salud Animal*. 8:35-38.
- Prophet EB, Mills B, Arrington JB, Sobin LH, eds. 1993. Laboratory methods in histotechnology. *American registry of pathology*. Washington, D.C.: Armed Forces Institute of Pathology, :160.
- Pulsford, A.L., Lemaire-Gony, S., Tomlinson, M., Collingwood, N., Glynn, P.J., 1994. Effects of acute stress on the immune system of the dab, *Limanda limanda*. *Comp. Biochem. Physiol.* 109C, 129-139.
- Pullin, R.S.V. (editor). 1988. *Tilapia Genetic Resources for Aquaculture*. ICLARM Conference Proceedings 16, 108 p.
- Pullin, R.S.V., A.E. Eknath, T. Gjedrem, M.M. Tayamen, J.M. Macaranas and T.A. Abella. 1991. "The Genetic Improvement of Farmed Tilapia (GIFT) Project: The Story So Far. *Naga* 14(2): 3-6.
- Randall J.E. and Perry S. F. 1992 Catecholamines. In *Fish Physiology* . pp 255-300. Edited for Hoar WS, Randall D.J. and Farrell T.P. Academic Press. New York.
- Randall, J.E. 1987. "Introductions of Marine Fishes to the Hawaiian Islands". *Bulletin of Marine Science* 41(2): 490-502.
- Ranzani-Paiva, Maria José Tavares, Ishikawa, Carlos Massatoshi, Eiras, Augusta Cocuzza das *et al.* 2004. Effects of an experimental challenge with *Mycobacterium marinum* on the blood parameters of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* (Linnaeus, 1757). *Braz. arch. biol. technol.* vol.47, no.6, p.945-953
- Reddy P.K., Leatherland J.F. 1998 Stress Physiology in *Fish Diseases and Disorders* (eds J.F. Leatherland y P.Y. Woo) Cab. International .
- Rehulka J. 2002. *Aeromonas* Causes Severe Skin Lesions in Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*): Clinical Pathology, Haematology and Biochemistry. *Acta Vet. Brno*, 71: 351-360.
- Roberts, R.J. (ed.). 1989. Fish Pathology, 2nd edition. Bailliere Tindall, London.
- Robertson, L., P. Thomas, C.R. Arnold y J.M. Trant. (1987). Plasma cortisol and secondary stress responses of red drum to handling, transport, rearing density, and a disease outbreak. *Progressive Fish Culturist* 49(1): 1—12.

- Robertson, L.; Thomas, P. y Arnold, C. R. (1988). Plasma cortisol and secondary stress responses of cultured red drum (*Sciaenops ocellatus*) to several transportation procedures. *Aquaculture*. 68 : 115-130.
- Rodríguez M. C., Raquel Silveira, Adela Prieto 1989. Uso de la benzocaína en la narcotización de post-larvas de Tilapia.. *Rev. Cub. Invest. Pesqueras*. Vol 1 No 1.
- Romano LA. Bioindicadores de Contaminación Acuática en Peces. *Revista AquaTIC*, nº 7, Junio 1999. [Disponible el 19/08/2005 en URL: <http://www.revistaaquatic.com/aquatic/art.asp?t=hyc=67>]
- Ross, L.G., Ward, K.M.H., Ross, B., 1985. The effects of formaline, malachite green and suspended solids on the respiratory activity of rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson. *Aquacult. Fish. Manage.* 16, 129–138.
- Rowley A (1990) Collection, separation, and identification of fish leukocytes. In: Stolen JS, Fletcher TC, Anderson DP, Roberson BS, van Muiswinkel WB (eds) *Techniques in fish immunology* FITC 1. SOS, Fairhaven, pp 113-136.
- Ryan S. 1992. The dynamics of MS 222 anaesthesia in a marine teleost (*Pagrus auratus*: Sparidae). *Comp Biochem Physiol* 101C:593-600.
- Sagol Ö.; Tuna B.; Çoker A.; Karademir S.; Obuz F.; Astarcioglu H.; Küpelioglu A.; Astarcioglu I.; Topalak Ö. 2002 Immunohistochemical Detection of PS2 Protein and Heat Shock Protein-70 in Pancreatic Adenocarcinomas. Relationship with Disease Extent and Patient Survival .*Pathology Research and Practice*, Volume 198, Number 2, pp. 77-84(8)
- Salmerón-Flores, P., Melendez-Camargo, M. E. y Martínez-Tabche, L., 1990, Efecto hepatotóxico y nefrotóxico del plomo sobre la tilapia (*Sarotherodon aureus*). *An. Esc. Nac. Cienc. Biol. Mex.*, 33: 147-156.
- Sampath, K., Velammal, S., Kennedy, I.J., James, R. 1993: Haematological changes and their recovery in *Oreochromis mossambicus* as a function of exposure period and sublethal levels of Ekalux. *Acta Hydrobiol.*35: 73–8.
- Santos MA, Hall A 1990 Influence of inorganic lead on the biochemical blood composition of the eel, *Anguilla anguilla* L. *Ecotoxicol Environ Saf.*;20(1):7-9.
- Sarasquete, M. C. y Gutiérrez, M. Citomorfología y citoquímica de la sangre del pez sapo marino, *Halobatrachus didactylus* (Schneider, 1801). *Inv. Pesq.*, 46(2):171-84, 1982.

- Sathiyaa, R., Campbell, T. and Vijayan, M. M. 2001. Cortisol modulates HSP90 mRNA expression in primary cultures of trout hepatocytes. *Comp. Biochem. Physiol. B* 129, 679-685.
- Scarano, G., Saroglia, M.G. 1984. Recovery of fish from functional and haemolytic anaemia after brief exposure to a lethal concentration of nitrite. *Aquaculture*, v.43, p.421-426,
- Scarano, G., Saroglia, M.G., Gray, R.H., Tibaldi, E., 1984. Hematological response of seabass *Dicentrarchus labrax* to sublethal nitrite exposure. *Trans. Am. Fish. Soc.* 113, 360–364.
- Scotts A.L; W.A. Rogers 1981: Haematological effect of prolonged sublethal hypoxia on channel catfish *Ictalurus punctatus* (Rafinesque). *J.Fish Biology* 18:591-601.
- Schäperclaus W. 1979: *Enfermedades de los peces*. Akademie Verlag. Berlin. Tomo 1, 570 p.
- Schäperclaus W. 1992. Fish diseases (English translation of “Fischkrankheiten”, 5th corrected and substantially enlarged edition 1986). Rotterdam: AA Balkema.
- Schnick, R.A., Meyer, F.P., 1978. Registration of thirty three-fishery chemicals: status of research and estimated costs of required contract studies. *Invest. Fish. Contr.* 86, 19.
- Schreck C. B., Wilfrido Contreras-Sanchez and Martin S. Fitzpatrick . 2001 Effects of stress on fish reproduction, gamete quality, and progeny. *Aquaculture Vol* 197, n. 1, p. 3-24
- Schreck, C. 2000. Accumulation and long-term effects of stress in fish. In: *The Biology of Animal Stress*. Eds. G. MOBERG and J. MENCH. p 147-158.
- Schreck, C.B., 1982. Stress and rearing of salmonids. *Aquaculture* 28, 241– 249.
- Schreck, C.B., Olla, B.L., y Davis. M.W 1997. Behavioral responses to stress, in *Fish Stress and Health in Aquaculture*, Iwama, G.K., Pickering, A.D., Sumpter, J.P., and Schreck, C.B. Eds., Cambridge University Press, Cambridge, ,119.
- Schütt, D.A.; Lehmann, J.; Goerlich, R. y Hamers, R. 1997. Haematology of swordtail, *Xiphophorus helleri*. I: blood parameters and light microscopy of blood cells. *J. Appl. Ichthyol.*, 13:83-9,.
- Schwaiger, J., Hoffmann, R., Negele, R. D. 1993: Haematology in evaluation of experimental intoxication of fish. In : *Ichthyohaematology*, 3rd Conference, Research Institute of Fish Culture and Hydrobiology Vodnany, Czech Republic, Litomy. pp. 155–160.
- Silveira, R. 1987: Parámetros hematológicos normales del híbrido *Arischthyis nobilis* x *Hippophthalmichthys molitrix* cultivados en estanques de tierra. *Boletín técnico* 24 ENACUI.
- Silveira–Coffigny R., A. Prieto-Trujillo, F. Ascencio-Valle 2004. Effects of different stressors in haematologicals variables in cultured *Oreochromis aureus* S. *Comp. Bioch Physiol. C* 139: 245-250.

- Singh, N. N., Srivastava, A. K. 1994: Formothion induced haematological changes in the freshwater Indian catfish *Heteropneustes fossilis*. *J. Ecotox. Environ. Monit.* 4: 137–140.
- Siwicki AK, Cossarini-Dunier M, Studnicka M, Demael A.1990 In vivo effect of the organophosphorus insecticide trichlorphon on immune response of carp (*Cyprinus carpio*). II. Effect of high doses of trichlorphon on nonspecific immune response. *Ecotoxicol Environ Saf.* (1):99-105.
- Slady, K.K.; Swanson, C.R.; Stoskopf, M.K.; Loomis, M.R.;Lewbart, G.A. 2001. Comparative efficacy of tricaine methanesulfonate and clove oil for use as anesthetics in red pacu (*Piaractus brachypomus*). *American Journal of Veterinary Research*, 3:337-342.
- Soivio, A., Nyholm, K., Huhti, M., 1977. Effects of anaesthesia with MS 222, neutralized MS 222 and benzocaine on the blood constituents of rainbow trout, *Salmo gairdneri*. *J. Fish Biol.* 10, 91– 101.
- Soivo, A., Oikari, A. 1976. Haematological effects of stress on teleost, *Esox luciuss*, L. *Journal of Fish Biology* 8: 397-411.
- Sonnenwirth, AC y Jarret, L; *Métodos y diagnósticos del laboratorio clínico*, Cap.4 por Galen, S; Ed. Médica Panamericana 8ª Edición, 1983
- Srivastava, A. K. y Agrawal, S. J., 1979, Haematological anomalies in a freshwater teleost, *Colisa fasciatus*, on acute exposure to cobalt. *Acta Pharmacol. Toxicol.*, 44: 197-199.
- Srivastava, A.K., Roy, D., Sinha, R., Singh, N.D., Srivastava, S.J.,1996. Dyes induced changes in the haematological parameters of a freshwater catfish, *Heteropneutes fossilis*. *Ecol. Environ. Conserv.* 2, 155–158.
- Strange, R.J., y Schreck, C.B. (1978). Anaesthetic and handling stress on survival and cortisol concentration in yearling chinook salmon. *Journal of the Fisheries Research Board of Canada*, 35, 345-349.
- Subasinghe R.P. 1992. The use of chemotherapeutic agents in aquaculture in Sri Lanka. In: Diseases in Asian Aquaculture II (ed. by M. Sharij, R.P. Subasinghe y J. Richard Arthur), pp. 547-553. Fish Health Section, Asian Fisheries Society, Manila, Philippines.
- Subasinghe, R.P., Arthur, J.R and M. Shariff (eds.), 1996. Health management in Asian aquaculture. Proceedings of the regional expert consultation on aquaculture health management in Asia and the Pacific. Serdang (Malasia), 22-24 de mayo de 1995. *FAO Fish. Tech. Pap.*, (360): 142 p.
- Svoboda M., Lusková V., Drastichová J., Jlábek, V. 2001: The effect of diazinon on haematological indices of common carp (*Cyprinus carpio* L.). *Acta Vet. Brno* 70: 457-465

- Svobodová Z., L. Groch, M. Flajšhans, B. Vykusová, J. Máchová 1997: The Effect of Long-term Therapeutic Bath of Malachite Green on Common Carp (*Cyprinus carpio* L.). *Acta vet. Brno*, 66:111-117.
- Svobodova, Z., Vykusova, B., y Machova, J. 1994. The effects of pollutants on selected haematological and bio-chemical. In: Sublethal and chronic effects of pollutants on freshwater fish. (Eds. Muller R., Lloyd R.), Fishing News Books: 39-52
- Svobodová Z.;B. Vysuková 1991: Diagnostics; prevention and therapy of fish disease and intoxications. Manual for international training course on Fresh – Water fish diseases and Intoxications. Vodnany. Czechoslovaquia. 270 pp.
- Svobodova, Z. 1975: Changes in the blood picture of the carp intoxicated with organophosphate pesticides. *Acta Vet. Brno* 44: 49–52.
- Svobodova, Z., Machova, J., Kolarova, J., Vykusova, B., Piaska, V. 1996: The effect of selected negative factors on haematological parameters of common carp, *Cyprinus carpio* L. and tench, *Tinca tinca* L. Proc. Sci. Papers to the 75th Anniversary of Foundation of the RIFCH Vodnany, pp. 95–105.
- Tanck, M.W.T., Hajee, C.A.J., Olling, M., Haagsma, N., Boon, J.H., 1995. Negative effect of malachite green on haematocrit of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum). *Bull. Eur. Assoc. Fish. Pathol.* 15 (4), 134–136.
- Tavares, D. M., Martins, M. L., Nascimento, K.S. 1999: Evaluation of the haematological parameters in *Piaractus mesopotamicus* Holmberg (Osteichthyes, Characidae) with *Argulus* sp. (Crustacea, Branchiura) infestation and treatment with organophosphate. *Rev. Bras. Zool.* 16: 553–555.
- Tavares-Dias Marcos, Elziane Ferreira Da Silva Sandrim, Flávio Ruas De Moraes, Paulo César Falanghe Carneiro 2001. Physiological responses of “tambaqui” *Colossoma macropomum* (Characidae) to acute stress. *Boletim do Instituto de Pesca, São Paulo*, 27 (1): 43 – 48.
- Tavares-Dias Marcos, José Fernando Bibiano Melo, Gilberto Moraes, Flávio Ruas de Moraes. 2002 Haematological characteristics of brazilian teleosts.VI. Parameters of jundiá *Rhamdia quelen* (PIMELODIDAE) *Ciência Rural*, v.32, n.4, p.693-698, 2002.
- Thakur, N., Sahai, S. 1993: Differential leucocyte counts of some fishes during malathion intoxication. *Environ. Ecol.* 11: 875–878.

- Tizard, I. 1992. The phylogeny of the immune system. *In: Veterinary Immunology an introduction*. W.B. Saunders Company (Ed.). Harcourt Brace Jovanovich, Inc. USA. 457-469.
- Tomasso J.R. 1986: Comparative toxicity of nitrite to freshwater fishes. *Aquatic Toxicology* 8(2): 129-137
- Tomasso, J.R. Davis, K.B. y Parker, N. C. 1980. "*Plasma Corticosteroid and Electrolyte Dynamics of Hybrid Striped Bass During Netting and Hauling.*" *Proceedings of the World Mariculture Society*, 11, 303-310,
- Tonguthai K. y Chanratchakool P. 1992 The use of chemotherapeutic agents in aquaculture in Thailand. *In: Diseases in Asian Aquaculture II* (ed. by M. Sharij, R.P. Subasinghe y J. Richard Arthur), pp. 555-565. Fish Health Section, Asian Fisheries Society, Manila, Philippines.
- Trewavas, E., 1983. Tilapiine fishes of the genera *Sarotherodon*, *Oreochromis* and *Danakilia*. *British Museum of Natural History, London, UK*. 583 p.
- Tsang C.W., Ross Lazarus, Wayne Smith, Paul Mitchell, Jerry Koutts, y Leslie Burnett. 1998. Hematological indices in an older population sample: derivation of healthy reference values. *Clinical Chemistry* 44:196-101.
- Ueda, I. K.; Matushima, E. y Egami, M. I. 1997. Estudio hematológico de la sangre periférica de *Oreochromis niloticus* (Linneus, 1758) (Cichlidae, Teleostei). *Braz. J. Vet. Res. An. Sci.*, 34(5):270-5,
- Valenzuela Ariel, Alveal Katherine y Tarifeno E. 2002. Respuestas hematológicas de truchas (*Oncorhynchus mykiss* WALBAUM 1792) a estrés hipoxico agudo: serie roja. *Gayana (Concept.)*, , vol.66, no.2, p.255-261.
- Van Duijn C. Jr (1973) *Diseases of Fishes*, 3rd edn. Butterworths, London.
- Vijayan M.M , Pereira C., Kruzynski G. and Iwama G.K. 1998 Sublethal concentrations of contaminant induce expression of hepatic heat shock protein 70 in 2 salmonids. *Aquatic Toxicology* 40, 101-108.
- Vijayan M.M., Ballantyne J.S. y Leatherland J.F. (1990) High stocking density alters the energy metabolism of brook charr, *Salvelinus fontinalis*. *Aquaculture* 88, 371-381.
- Vijayan M.M., Ballantyne J.S. y Leatherland J.F. (1991) Cortisol-induced changes in some aspects of the intermediary metabolism of *Salvelinus fontinalis*. *General and Comparative Endocrinology* 82, 476-486.
- Vijayan, M.M. y T.W. Moon. 1994. The stress response and the plasma disappearance of corticosteroid and glucose in a marine teleost, the sea raven. *Can. J. Zool.* 72, 379-386.

- Vijayan M.M., P. K. Reddy, J. F. Leatherland y T. W. Moon 1994 The effects of cortisol on hepatocyte metabolism in rainbow trout: a study using the steroid analogue RU486. *Gen. Comp. Endocrinol.* 96:75-84.
- Vijayan M.M., Pereira C., Forsyth R.B., Kennedy C.K e Iwama G.K. 1997 Handling stress does not affect the expression of hepatic heat shock protein 70 and conjugation enzymes in rainbow trout treated with β - naphthoflavone. *Life Science* 61:117-127.
- Vijayan M.M., Pereira C., Grau E.G. e Iwama G.K. (1997) Metabolic responses associated with confinement stress in tilapia: the role of cortisol. *Comparative Biochemistry and Physiology* 116C, 89–95.
- Vijayan MM, JF Leatherland. 1989. High stocking density affects cortisol secretion and tissue distribution in brook charr *Salvelinus fontinalis*. *J. Endocrinol.* 124: 311-318.
- Vosylieniė M.Z., Kazlauskienė N. 1999 Alterations in fish health state parameters after exposure to different stressors *Acta Zoologica Lituanica. Hydrobiologia.* Volumen 9. Numerus 2 83-94.
- Waagbø, R, Sandnes, K, Espelid, S, Lie, O 1988: Haematological and biochemical analyses of Atlantic salmon, *Salmo salar* L., suffering from coldwater vibriosis ('Hitra disease'). *J Fish Dis* 11: 417-423.
- Waiwood K.G. 1980. Changes in hematocrit of rainbow trout exposed to various combinations of water hardness, pH and copper. *Trans. Amer. Fish.* 109: 461-463.
- Waring, CP, Stagg, RM and Poxton, MG (1996). Physiological responses to handling in the turbot. *Journal of Fish Biology* 48: 161-173.
- Watanabe G.A.; W.T. Yasutake 1978: Prevention and treatment of nitrite toxicity in juvenile steelhead trout. *J.Fish Res. Board Canada.*35 (6):822-827.
- Wedemeyer G. 1970. Stress of anesthesia with tricaine and benzocaine in rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *Journal of the Fisheries Research Board of Canada* 27, 909–914.
- Wedemeyer G.A., Barton B:A., Mc Leay D:J. 1990. Stress and acclimation in *In Methods for Fish Biology*. Scherck, C.B. y Moyle P:B(eds) pp 273-334. American Fisheries Society. Maryland.
- Wedemeyer G.A.y W.T.Yasutake(1977) Clinical methods for the assesment of the effects of enviromental stress on fish health. Pp 1-18. U.S. Fish and Wildlife Service *Technical Paper* 89, U.S. Fish and Wildlife Service, Washington DC.
- Wedemeyer, G. A. (1997). Effects of rearing conditions on the health and physiological quality of fish in intensive culture. In *Fish Stress and Health in Aquaculture* (G. K. Iwama, A. D. Pickering, J. P. Sumpter y C. B. Schreck, eds) pp. 35–71.Cambridge: Cambridge University Press.

- Welker, T.L., Klesius, P.H., Arias, C.R., Small, B.C. 2005. Effect Of Hypoxia On Stress And Heat Shock Protein Expression In Channel Catfish (*Ictalurus Punctatus Rafinesque*). Aquaculture America Conference. Disponible en: http://www.ars.usda.gov/research/publications/publications.htm?SEQ_NO_115=168266 (consultado 25 Julio 2005)
- Wells, R., Tetens, V., Devries, A. 1984. Recovery form stress following capture and anesthesia of antarctic fish: haematology and blood chemistry. *Journal of Fish Biology* 25, 567-576.
- Wendelaar Bonga, S. 1997 The stress response in fish. *Physiological Review* 77, 3:591-625.
- Wilson R.W., Taylor E.V. 1993. The physiological responses of fresh-water rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* during acutely lethal copper exposure. *J. Comp. Physiol. B.* 163: 38-47.
- Wasow, T., 1985. The leukocyte system in rainbow trout, *Salmo gairdneri* Rich., affected by prolonged subacute phenol intoxication. *Acta Ichthyol. Piscator.* 15: 83–94.
- Woody, C.A.; Nelson, J.; Ramstad, K. 2002 Clove oil as an anaesthetic for adult sockeye salmon: field trails. *Journal of Fish Biology.* 60:340–347.
- Wurts W.A. 1995. Using salt to reduce handling stress in channel catfish. *World Aquaculture* 26(3).
- Yada T., K. Uchida, S. Kajimura, T. Azuma, T. Hirano y E. G. Grau 2002. Immunomodulatory effects of prolactin and growth hormone in the tilapia, *Oreochromis mossambicus*. *J. Endocrinology.* 173, 483-492
- Yang, C., Albright, L. 1995. Elevation of plasma cortisol and hipertrophic response of Interrenal and cromaffin tissues of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum) to the harmful diatom *Chaetocerus concavicornis*. *Journal of Fish Disease,* 18:165-174.
- Yildiz H.Y. (1998) Effects of experimental infection with *Pseudomonas fluorescens* on different blood parameters in carp (*Cyprinus carpio* L). *Journal of Israeli Aquaculture-Bamidgeh* 50, 82–85.
- Young P.S. y Cech J.J. Jr. 1994. Optimum exercise conditioning speed for growth, muscular development, and swimming performance in young-of-the-year striped bass (*Morone saxatilis*). *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Science* 51, 1519-1527.
- Zarate, J. and Bradley, T. M. (2003). Heat shock proteins are not sensitive indicators of hatchery stress in salmon. *Aquaculture* 223, 175-187.
- Zhao Y., Wein A.J., Levin R.M. 1995. Assessment of stress gene mRNAs (HSP-27, 60 and 70) in obstructed rabbit urinary bladder using a semi-quantitative RT-PCR method. *Mol Cell Biochem.* 148(1):1-7.