



INIA
Instituto Nacional
de Investigaciones
Agrícolas

**INSTITUTO NACIONAL
DE INVESTIGACIONES AGRÍCOLAS**

Evaluación del estado de salud de peces en cultivo

I. Técnicas hematológicas



**Raquel Salazar-Lugo
Luisa Carmen Centeno Albino
Yanet Antón Marín**

PUBLICACIÓN TÉCNICA

El Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas es un instituto autónomo, creado de acuerdo a la Gaceta Oficial N° 37.022 del 25 de agosto de 2000, adscrito al Ministerio de Agricultura y Tierras por decreto N° 5.379 de Gaceta Oficial N° 38.706 del 15 de junio de 2007.

De acuerdo con el Reglamento de Publicaciones del Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas, aprobado por la Junta directiva en su sesión N° 126, según resolución N° 1456 de fecha 18 de febrero de 2010, esta es una Publicación Técnica.

Publicación Técnica: contienen información proveniente de la evaluación de los resultados de investigación e innovación o la puesta en práctica de los mismos, presentados en forma descriptiva o de monografía. Son escritas por investigadores o técnicos y están destinadas fundamentalmente a investigadores, técnicos y estudiantes de educación técnica y superior. Incluye temas tales como: utilización de nuevas vacunas o la obtención y rendimientos de una nueva variedad; medidas sanitarias para la prevención de enfermedades; prácticas agropecuarias; manejo de medicamentos; pasos para tomar muestras, bien sea de suelos o de sangre, y estudios agroecológicos. Toman la forma de folletos. No tienen periodicidad.

Salazar-Lugo, R; Centeno Albino, LC; Antón Marín. Y. 2020. Evaluación del estado de salud de peces en cultivo: I. Técnicas hematológicas. Maracay, Venezuela, Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas. 78 p.



**INSTITUTO NACIONAL
DE INVESTIGACIONES AGRÍCOLAS**

Evaluación del estado de salud de peces en cultivo

I. Técnicas hematológicas

Raquel Salazar-Lugo*
Luisa Carmen Centeno Albino**
Yanet Antón Marín*

* Universidad de Oriente (UDO). Postgrado Biología Aplicada. Escuela de Ciencias. Laboratorio de Proteínas e Inmunotoxicidad. Cumaná. Venezuela.

** INIA. Laboratorio de Patología de Organismos Acuáticos. Cumaná. Venezuela.

© Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas - INIA, 2020

Dirección: Edificio Sede Administrativa INIA. Avenida Universidad, vía El Limón, Maracay, estado Aragua. Venezuela.

Teléfonos:

Oficina de Publicaciones No Periódicas (+58) 0243 2404770

Zona Postal: 2103. Municipio Mario Briceño Iragorry.

Página web: <http://www.inia.gob.ve>

Equipo editorial Publicaciones No Periódicas INIA

Gerente de Investigación: Nohelia Rodríguez

Coordinación Gestión de la Información: Zulay Melo

Editora Jefe de Publicaciones No Periódicas: Jessie Vargas

Editor: Elio Pérez

Diseño, diagramación y montaje: Sonia Piña y Yilber Mendoza

Para esta publicación

Editor responsable: Elio A. Pérez S.

Diseño gráfico: Elio A. Pérez S., Yilber Mendoza y Sonia Piña

Revisor Técnico: Carlos Moreno

Fotos Tapa: Grupo de Piscicultura del INIA Barinas y Delta Amacuro

Hecho el Depósito de Ley

Versión digital

Depósito Legal: AR2020000062

ISBN: 978-980-318-356-1

Esta obra es propiedad del Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas, publicada para el beneficio y la formación plena de la sociedad, por ello se permite el uso y la reproducción total o parcial de la misma, siempre que se cite al autor y la institución, conforme a las normas de citación vigentes y no se haga con fines de lucro.

A la memoria de Nathaly García

Colaboradores

Mairin Lemus (UDO-Biología)

Evelin Rojas Villarroel (LUZ-Facultad de Veterinaria)

Luz Marina Rojas (UDO-IIBCA)

Yvis Blanco (UDO-Sucre)

Alida León (UDO-Sucre)

María Carolina Cordero (UDO-Sucre)

América Vargas (UDO-Sucre)

Zuleika Romero (UDO-Sucre)

José Luis Pérez (INIA-Delta Amacuro)

Cecilio Matute (INIA-Delta Amacuro)

Contenido

Introducción	9
<i>Capítulo I</i>	
Cómo enfrentar un problema de enfermedad en peces cultivados	11
Reconocimiento de enfermedad	12
Diagnóstico diferencial de lesiones	15
Anamnesis o historial clínico	17
<i>Capítulo II</i>	
Muestreo de peces	21
Manipulación de los peces	22
Manipulación con sacrificio	23
Manipulación sin sacrificio	24
Sedación o anestesia	25
Toma de muestra de sangre	29
Diferentes anticoagulantes	29
Recomendaciones para la toma de muestra de sangre	30
Extracción de sangre de la vena caudal	30
Extracción de sangre del corazón	31

Capítulo III	
Pruebas hematológicas	33
Determinación de parámetros sanguíneos	33
Hemoglobina	34
Determinación de la concentración de hemoglobina	36
Error en la determinación de la concentración de hemoglobina	39
Hematocrito	41
Error en la determinación del microhematocrito	42
Contaje de células sanguíneas	46
Recuento eritrocitario y leucocitario	46
Índices hematimétricos	50
Volumen corpuscular medio (VCM)	50
Hemoglobina corpuscular media (HCM)	51
Concentración de hemoglobina corpuscular media (CHCM)	52
Morfología celular	53
Preparación y coloración de frotis sanguíneos	54
Preparación de frotis sanguíneos	54
Coloración de frotis sanguíneos	56
Bibliografía consultada	75

Introducción

La piscicultura en Venezuela se inicia en el año 1937 con la introducción de la especie exótica trucha arco iris, *Oncorhynchus mykiss*, por parte del Ministerio de Agricultura y Cría (MAC), después se introdujo la carpa, *Cyprinus carpio*, la tilapia del Mozambique, *Oreochromis mossambicus*, y la tilapia roja, *Oreochromis* sp. para cultivos comerciales. En el año 1982 se inicia la instalación de granjas piscícolas de forma comercial con fines de cultivo a gran escala, con especies autóctonas, como la cachama, *Colossoma macropomum*, y el morocoto, *Piaractus brachypomus*, (MAC-SARPA, 1995; Parra, 2005).

Actualmente, la piscicultura se presenta como una alternativa viable, debido a la gran diversidad de especies continentales que existen en el país y por la posibilidad de aprovechar al máximo este recurso como contribución al logro de la soberanía alimentaria del país.

Recientemente se están utilizando cada vez más los exámenes hematológicos para complementar el diagnóstico de enfermedades infecto-contagiosas, así como para controlar el estado fisiológico y nutricional de los peces, habiéndose comprobado plenamente el valor de estas pruebas en la práctica. Los métodos más comúnmente empleados son los que miden los valores de hemoglobina, el hematocrito y el recuento eritrocitario, respectiva-



mente, además de estudios rutinarios sobre la morfología y distribución de los elementos celulares de la sangre periférica.

El grupo de investigaciones en Ecología y Salud de los laboratorios: Proteína e Inmunotoxicidad de la Universidad de Oriente y Patología de Organismos Acuáticos del Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas, presentan esta publicación como resultado de más de 10 años de experiencias recopiladas en el laboratorio experimental, donde se han estandarizado metodologías parasitológicas, hematológicas, inmunológicas y bioquímicas, las cuales dan información sobre el estado de salud de los peces dulceacuícolas bajo condiciones de cultivo.

En este tomo se presentan las pruebas hematológicas que fueron desarrolladas, tomando como modelo a la cachama, *Colossoma macropomum*. Este pez ha cobrado importancia como una de las especies de cultivo más promisorias en el país, además de su papel relevante en pesquerías artesanales en pobladores de áreas de influencia de la cuenca del Orinoco. La cachama se caracteriza por ser un pez omnívoro y resistente a la manipulación, lo que permite utilizarlo como modelo para conocer el estado de salud del ecosistema que habita.

Aunque muchas de las pruebas están establecidas en la literatura, en su mayoría los ensayos han sido modificados para lograr resultados eficientes. Esta publicación sintetiza nuestra experiencia que se pone a la disposición de las nuevas generaciones de técnicos, estudiantes, trabajadores de la ciencia e investigadores interesados en el tema.

Capítulo I

Cómo enfrentar un problema de enfermedad en peces cultivados

El aumento de la población mundial ha traído como consecuencia una alta demanda de alimentos, es por ello, que los peces se han convertido en una de las principales fuentes de proteínas. Esta situación ha dado lugar al desarrollo de técnicas de producción cada vez más intensivas, generando condiciones de cultivo más perjudiciales para los peces, además de las circunstancias inherentes al proceso mismo de explotación, que ya de por sí son estresantes por la manipulación, transporte y sobrealimentación, entre otras, donde se crea un ambiente nocivo para los peces, que los hace más susceptibles y los expone a una gran cantidad de patologías. Por esta razón, en la acuicultura, el éxito financiero de una empresa piscícola puede estar en riesgo, si no se realiza el debido manejo de la salud de los organismos que la sustentan.



Reconocimiento de enfermedad

Cuando se presentan anormalidades en los peces cultivados, el conocimiento de la conducta y la anatomía externa normal del pez, permiten identificar la presencia de enfermedades; por lo tanto, el piscicultor debe realizar observaciones del comportamiento de los peces, durante sus actividades rutinarias y saber diferenciar entre peces sanos y enfermos (Cuadro 1), de tal manera que pueda detectar posibles problemas de salud y tomar las medidas oportunas para controlar o disminuir los efectos producidos, en estos casos debe contactar a un especialista lo antes posible.

Otra forma para identificar anormalidades en los peces cultivados consiste en la observación de los cambios de comportamiento, la misma puede ser realizada por los piscicultores o técnicos piscícolas.

Es de gran importancia observar a los peces y estar atentos a los cambios notables, principalmente, relacionados con el nado y la respiración, así como los aspectos siguientes:

Distribución de los peces en el agua: los peces en las unidades de cultivo suelen nadar en grupo cuando están bien de salud. Si se observan algunos peces aislados y que nadan de forma separada, quizás estén enfermos. Si los peces están en la superficie boqueando, con los opérculos muy abiertos y en la cabecera del estanque puede ser un síntoma por la falta de oxígeno.

Tipo de natación: un pez enfermo normalmente nadará de forma lenta y errática. Si nada en espiral puede indicar algún problema del sistema nervioso central (nerviosa viral). Si se “rasca”



Cuadro 1. Diferencias en el comportamiento y la apariencia física externa de un pez sano y uno enfermo.

Aspecto a considerar	Pez sano	Pez enfermo
Natación	Normal (característico de cada especie).	Irregular, errático, puede ser dando giros, con hundimiento de costado en la superficie.
Consumo de alimento	Voracidad característica de la especie. Sea en la superficie o en el fondo, con actividad estimulada en los horarios de rutina de alimentación.	No consume alimento o queda volumen importante de alimento no consumido.
Reacción de fuga	Responde a los ruidos y estímulos.	No responde a los ruidos al acercamiento de personas al estanque.
Coloración	Pigmentación definida de acuerdo con la especie.	Colores claros en caso de anemias, falta de oxígeno y oscurecimiento en algunas enfermedades infecciosas. Petequias (puntos hemáticos).
Piel	Suave, sin descamación ni hematomas, con secreción de mucus.	Descamaciones evidentes; úlceras o hematomas con hipersecreción de mucus.

.../... **Continúa**



.../... Continuación cuadro 1.

Aspecto a considerar	Pez sano	Pez enfermo
Ojos	Brillantes con córnea transparente.	Opacos
Branquias	Con una coloración rojo brillante y con lamelas completas.	Coloración anormal (rosa pálidas, cianótica, hemorrágicas, entre otros), con lamelas discontinuas (deshilachadas) con lesiones, o con presencia evidente de parásitos.
Aletas	Integras, sin hemorragias subcutáneas, ni presencia de parásitos.	Con heridas o lesiones aparentes, con presencia de parásitos adheridos.
Ano y papilas genitales	No deben presentar hemorragias ni estar congestionadas.	Salientes con signos de hemorragias.



contra las paredes de la red o el estanque podría tratarse de un problema parasitario externo.

Actividad respiratoria: normalmente los peces afectados por un problema infeccioso suelen tener su actividad respiratoria más reducida que sus compañeros sanos. Por otro lado, si necesita aumentar su aporte de oxígeno sanguíneo estará “hiperventilando” (por ejemplo, bajón de oxígeno en la unidad o infección severa bacteriana branquial).

Mortalidad: no solo hay que observar porque se mueren los peces, sino de cómo se mueren. Se tiene que estudiar la evolución en el tiempo de las mortalidades, como en aquellos casos donde mueren muchos peces, de un día para otro, muy raras veces ocurre por algún proceso infeccioso, este tipo de mortalidad suele ser debida a alteraciones del medio ambiente o por problemas de estrés sobreagudos, falta de oxígeno, temporales, presencia de agentes químico, entre otros. En general, los procesos agudos pueden ser causados por virus y algunas bacterias, mientras que los procesos crónicos por parásitos y bacterias. Es importante conocer la epidemiología de cada enfermedad y saber cuál es el patrón de mortalidad característico que suele provocar.

Diagnóstico diferencial de lesiones

Para identificar correctamente las causas de una enfermedad en peces cultivados, así como diferenciar entre las características de los peces sanos y enfermos y conocer sus cambios de comportamientos, es muy importante identificar los cambios y lesiones que se pueden presentar en los peces bajo condiciones de



cultivo, por lo tanto, es primordial hacer un buen diagnóstico diferencial, a través del conocimiento de los cambios y lesiones que se describen a continuación:

Cambios de forma y color: deformidades, melanosis (oscurecimiento), aclaración, hinchazón, dilatación abdominal, adelgazamiento corporal. La cachama suele oscurecerse cuando se encuentra estresada, ya sea por la manipulación, o por cambios en los parámetros físico-químicos del agua.

Alteraciones en piel: manchas de color, despigmentación, hiperpigmentación, pérdida de escamas, presencia de hemorragias petequiales (puntiformes) y equimosis (extendidas), burbujas, forúnculos, nodulaciones, masas algodonosas y filamentosas, erosiones, úlceras y parásitos macroscópicos.

Alteraciones de las aletas: deshilachamiento, erosiones, pérdida parcial o total.

Alteraciones de los ojos: manchas de color en la superficie, opacidad corneal, burbujas, exoftalmia (inflamación), endoftalmia (hundimiento), masas extrañas en el interior.

Alteraciones de las branquias: ausencia de arcos o filamentos, palidez (anemia), inflamación, exceso de mucosidad, hemorragias, manchas de color (blanco, amarillo, negro), erosiones, necrosis.

Alteraciones internas: líquido en cavidad abdominal (ascitis), líquido en tubo digestivo, inflamación, congestión, hemorragias, nodulaciones, abscesos, granulomas, parásitos macroscópicos.



Anamnesis o historial clínico

La anamnesis se define como el estudio que se realiza para conocer los antecedentes patológicos de un animal enfermo.

Para realizar la inspección sanitaria de un criadero de peces, es necesario efectuar una selección sistemática de los animales y elaborar un informe detallado sobre el comportamiento de los mismos, para preparar una historia clínica detallada, donde se indique todos los datos básicos de interés para el patólogo.

Es importante elaborar un historial lo más completo posible de la finca, como ubicación, especie cultivada, superficie, manejo y producción o rendimiento obtenido, por lo que el encargado o propietario de la granja debe llevar un libro de registros, donde anote todas las actividades fuera de rutina, situaciones anómalas, como los descensos bruscos de temperatura, las lluvias prolongadas, las floraciones de algas anormales, los datos del clima, el ingreso de nuevos peces a la unidad de producción, el comportamiento anormal de los organismos, entre otros. Esta información permitirá, en conjunto con la descripción de las actividades de manejo, contar con un panorama claro de eventos ambientales o de rutina, que pueden estar relacionados con la aparición de una determinada enfermedad.

La información debe ser recopilada directamente con la observación de los peces, pero también es fundamental considerar los aportes del personal que está cada día en contacto con ellos, ya que los observan diariamente. Cualquier variación de la normalidad de los peces debe ser registrada y notificada inmediatamente; motivo por el cual es fundamental la formación y educación en salud animal del personal que trabaja con los peces, dentro de un programa rutinario de gestión sanitaria en piscicultura.



Para la recopilación de la información se deben considerar algunas preguntas o situaciones relacionadas con:

Instalaciones

- Características del sistema de cultivo: estanques de tierra o lagunas, jaulas, sistema de recirculación de agua en tanques, entre otros.
- Localización geográfica.
- Situación dentro de la granja de las unidades afectadas.
- Toma de agua para los cultivos.

Problema observado

- Historiales de enfermedades previas.
- Especies afectadas: si se tiene más de una en la instalación.
- Rango de tallas afectadas: tamaño y edad.
- Alimentación: tipo y pautas.
- Problema específico que se ha observado: mortalidad, mal crecimiento, anorexia.
- Día donde ha comenzado el problema.
- Condiciones ambientales y climatológicas previas al problema.
- Historial previo de situación de estrés: movimientos, clasificaciones, entre otros.
- Tratamientos terapéuticos y vacunaciones administradas.



- Temperatura: niveles de riesgo, variaciones bruscas.
- Evolución en el tiempo de la mortalidad: aguda, crónica, intermitente.

Sobre los peces

- Respuesta a estímulos: alimentación y captura.
- Distribución de los peces en el agua: aislados, en grupo o cardumen, en superficie, otras.
- Alteraciones de la natación: ataxia, errática, en círculos o “rascado”.
- Alteraciones de la actividad respiratoria: rápida, lenta.
- Alteraciones en el aspecto externo.
- Se observa alguna lesión interna.

Y finalmente, alguna sospecha por parte de los cuidadores de los animales.

Es importante recordar que los peces enfermos pierden el apetito y no suelen comer. El monitoreo de los parámetros productivos, como el crecimiento y la conversión alimenticia, es fundamental a la hora de detectar un problema de salud. Si en el muestreo mensual de biomasa se observa un crecimiento no óptimo en los peces, es necesario realizar la evaluación sanitaria para descartar la presencia de alguna patología.

Capítulo II

Muestreo de peces

El muestreo es un aspecto importante en el diagnóstico y evaluación sanitaria de los peces en cultivo. En aquellos casos donde la población de peces es grande se debe seleccionar una muestra adecuada, ya que, al realizar los estudios a partir de una muestra, solo se obtiene una estimación de la situación real de la población de peces. Una muestra representativa de la población debe ser de 10% de la misma. Por ejemplo, si se quiere evaluar un estanque con una población estimada de 100 peces, se deben tomar al azar 10 ejemplares.

Existen dos métodos para realizar un muestreo:

Muestreo no probabilístico: la selección de la muestra se realiza por “conveniencia” del especialista. Se seleccionan los peces en función de determinados parámetros que se consideren importantes, como tamaño, mortalidad, peso, entre otros, dependiendo del tipo de estudio a realizar. Generalmente, se hace cuando se sospecha del brote de una enfermedad, por lo que se recogen peces sintomáticos, por ejemplo, en caso de sospechar de un brote de *Vibrio*. El técnico evidentemente recogerá peces con hemorragias en la piel y órganos internos. Este tipo de selección permite diagnosticar la presencia de la enfermedad, pero no va a permitir determinar qué cantidad de población se encuentra afectada.



Se recomienda no seleccionar peces que presenten una sintomatología muy avanzada. Frecuentemente, estos peces presentan problemas secundarios que dificultaran mucho el diagnóstico, como infecciones por bacterias, entre ellas las del género *Pseudomonas*, *Aeromonas* o de la familia Vibrionaceae, entre otras.

Muestreo probabilístico: la selección se realiza mediante un proceso aleatorio o al azar. Se colectan peces al azar, que representen 10% de la población.

Antes de proceder a la toma de muestras para realizar el análisis, ya sea hematológico, bioquímico o histológico, es necesario saber muy bien sobre los aspectos relacionados con la manipulación de los animales, la sedación o anestesia y la toma de muestra de sangre.

Manipulación de los peces

Los peces son animales muy sensibles a la manipulación, por lo que requieren de mucho cuidado para evitar daños permanentes al momento de la revisión y evaluación sanitaria, por lo tanto, se debe considerar el tipo de evaluación a realizar al momento del diagnóstico. En algunos casos se requiere que los peces se mantengan vivos y en óptimas condiciones, mientras que en otros es necesario trabajar con peces muertos. La manipulación de los peces va a depender si los peces serán sacrificados o permanecerán vivos, en ese caso se habla de manipulación con sacrificio o manipulación sin sacrificio, respectivamente.



Manipulación con sacrificio

Esta técnica consiste en el sacrificio del pez para su análisis, el cual se debe realizar lo antes posible para su diagnóstico. El sacrificio se puede realizar de la forma siguiente:

- Mediante una sobredosis de anestésico.
- Mediante decapitación: seccionando la médula espinal a la salida del cráneo. Esta operación se puede realizar mediante un instrumento afilado, como un cuchillo, bisturí o tijeras. En estos casos, se aconseja sedar primero al pez con una dosis baja de anestésico o colocándolo brevemente en agua fría.
- Mediante concusión: golpeando la base del cráneo mediante un golpe seco con una superficie roma y dura (canto de una mesa, madera).
- Por frío: sumergiendo al pez en agua cercana a 0 °C.

Cada uno de los métodos presenta las ventajas e inconvenientes siguientes:

Sobredosis de anestésico: es el método recomendado para asegurar un sacrificio ajustado a los cánones de ética en el manejo animal. Los animales mueren sin sufrimiento en un plazo de tiempo razonablemente corto. También se evitan algunas alteraciones debidas al manejo (hemorragias). Entre los inconvenientes que se presentan están el costo del anestésico (poco significativo si se usan productos asequibles, como el fenoxietanol o aceite de clavo) y el desprendimiento de algunos parásitos durante el proceso de la anestesia, que pueden ser pasados por alto.

Decapitación y concusión: son métodos rápidos y económicos si se efectúan con eficacia, aunque son menos recomendables



desde el punto de vista del bienestar animal. Estas técnicas producen artefactos en las muestras para histopatología (telangiectasias) debido a la dilatación de vasos causada por la sobrepresión sanguínea ejercida durante la operación de sacrificio.

Por frío: consiste en añadir hielo al agua o refrigerarla. Es el método utilizado habitualmente, ya que permite sacrificar gran cantidad de peces en poco tiempo, disminuyendo relativamente el estrés y permite bajar rápidamente su temperatura. Este método se basa en disminuir a temperatura ambiente, para que disminuya el metabolismo del pez, ya que los peces son organismos poiquilothermos, que no regulan su temperatura interna y su temperatura corporal varía según la temperatura del ambiente.

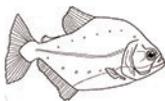
Manipulación sin sacrificio

Cuando se deban obtener muestras de los peces que no vayan a ser sacrificados se debe ser muy cuidadoso en el manejo de estos.

A continuación, se indican algunas de las medidas a tomar:

Sedación o anestesia: para asegurar una buena manipulación de los peces es muy importante tranquilizarlos o anestesiarnos previamente, con ello se evita producir lesiones por la manipulación del pez y, de esta manera, se puede obtener más fácilmente muestras de sangre o biopsias y se evita, en parte, la generación de respuesta de estrés debida al manejo que pueden comprometer seriamente su recuperación y alterar los parámetros a evaluar.

Manejo: para manipular los peces se debe recordar que ellos tienen una piel muy sensible, debido a la presencia de mucus, la delgadez de la epidermis y la falta de queratina. Por esta razón,



durante la manipulación de los peces los peores enemigos son la abrasión de la piel, pérdida de mucus y la deshidratación.

Durante la manipulación de los peces se recomienda lo siguiente:

- Utilizar guantes de plástico o látex.
- En caso de no disponer guantes, se recomienda humedecer las manos unos 30 s, con el fin de reblandecer la queratina de la piel de la mano y hacerla menos áspera.
- Evitar realizar las operaciones de manejo sobre superficies rugosas o absorbentes para no causar la pérdida de mucus.
- Evitar el uso de esponjas, toallas o papeles.
- Utilizar plásticos y bases de goma.
- Mantener húmeda la superficie del pez para evitar la deshidratación.
- Humedecer el cuerpo del pez cada 2 o 3 min. e incluso se puede rodear al mismo con un plástico fino (tipo plástico transparente de uso alimentario) para evitar su desecación, en el caso que la operación dure varios minutos.

Sedación o anestesia

Generalmente, el mismo tipo de producto anestésico tiene propiedades de sedación, utilizado en dosis menores o con menores tiempos de inducción. Normalmente, estos productos se añaden al agua directamente.



Para una correcta sedación de los peces, estos se deben anestesiar en un pequeño volumen de agua y para su recuperación se debe dejar un recipiente con suficiente cantidad de agua sin anestésico. La recuperación del pez se acelera forzando la natación a contracorriente, colocándolos debajo de un chorro de agua o burbujeo fuerte.

Importante

- La solución anestésica debe estar a la misma temperatura que el agua de origen.
- El anestésico se debe mezclar muy bien con el agua, ya que muchos anestésicos son bastante hidrófobos, es decir, no presentan afinidad o atracción con el agua.
- Observar los distintos movimientos de los peces durante la inducción de la sedación, lo que indicará el plano de sedación o anestesia en que se encuentran.

En el Cuadro 2 se presenta el comportamiento de los peces durante la sedación.

Para las manipulaciones habituales, como la toma de sangre es suficiente con una anestesia ligera. Mientras que para la toma de biopsias se recomienda una anestesia profunda o quirúrgica.

Los productos que se utilizan mayormente como anestésico son el MS-222, Benzocaína, Quinaldina, Fenoxietanol y aceite de clavo (Eugenol). En el Cuadro 3 se especifica la dosis aproximada de aplicación para estos anestésicos.



Cuadro 2. Comportamiento de peces durante la sedación.

Estadio	Plano	Estado	Comportamiento
I	1	Sedación ligera	Tras un pequeño período de aparente excitación, los peces reducen sus movimientos.
	2	Sedación profunda	Los peces están prácticamente quietos y solo responden a estímulos fuertes. La analgesia es ligera.
II	1	Anestesia ligera	Los peces empiezan a perder el equilibrio, pero luchan por no ponerse de costado. La analgesia es total.
	2	Anestesia profunda	Los peces se echan de costado, al levantarlos, la cola y las aletas caen hacia abajo. Respiración esporádica.
III		Anestesia quirúrgica	Completa ausencia de tono muscular y respuesta a estímulos.
IV		Colapso medular	Cese de la respiración durante varios minutos. Paro cardíaco. Muerte del animal.



Cuadro 3. Dosis aproximada para anestésiar peces por producto.

Producto	Dosis
MS-222	10-250 mg/l
Benzocaína	10-500 mg/l
Quinaldina	1-100 mg/l
Fenoxietanol	0,1-0,4 mg/l
Aceite de clavo (Eugenol)	0,1-0,5 mg/l

¿Cuándo se debe efectuar una evaluación hematológica de los peces?

- Al realizar un cambio de dieta.
- Al sospechar la presencia de enfermedad que aún no se manifiesta.
- Al evaluar peces provenientes de ambientes contaminados.
- Al evaluar un nuevo grupo o muestra de peces.
- Como medida de control en cultivos intensivos.



Toma de muestra de sangre

Para la toma de muestra de sangre se debe utilizar agujas y jeringas desechables de 3 ml, con agujas de 21 G 0,80 mm x 40 mm (1 1/2"), previamente lavadas con heparina sódica. En caso de trabajar con alevines, se debe utilizar una mezcla de heparina sódica y citrato de sodio a 3,5%, para evitar que se coagule la muestra.

Diferentes anticoagulantes

Los anticoagulantes más utilizados son:

EDTA ($C_{10}H_{16}N_2O_8$) o sal disódica, dipotásica o tripotásica del ácido etilendiamino tetraacético: actúa mediante un efecto quelante sobre el calcio (Ca^{++}), impidiendo el proceso de la coagulación al fijarlo. Las sales de potasio tienen la ventaja, respecto a las de sodio, de ser más fácilmente solubles en sangre cuando se usa a partir del producto sólido; sin embargo, las tres sales afectan el tamaño del eritrocito, especialmente después del almacenamiento de la sangre anticoagulada por espacio de algunas horas. La cantidad de EDTA dihidratado agregada a la sangre debe ser de 1,5 - 2,2 mg/ml de sangre total. Esta cantidad es un compromiso entre la cantidad requerida para evitar la coagulación y la cantidad a la cual se producen las alteraciones celulares.

Heparina sódica: es un anticoagulante fisiológico que impide que la protrombina se transforme en trombina. Su estructura es un mucopolisacárido ácido. La proporción adecuada es de 15 - 20 UI = Unidades Internacionales (0,1 - 0,2 mg) de heparina por milímetro de sangre.



Citrato trisódico ($C_6H_5O_7Na_3$): actúa impidiendo que el calcio se ionice, evitando así la coagulación.

Hay que tener presente que 10 μ l de anticoagulante pueden anticoagular hasta 2,5 ml de sangre.

En el caso de juveniles de cachama o cachama jóvenes el uso de la heparina sódica ha dado mejor resultado en la evaluación de los parámetros hematológicos.

Recomendaciones para la toma de muestra de sangre

La toma de muestra sanguínea es determinante para la evaluación y diagnóstico de los peces, esta se debe realizar con el menor estrés posible para el pez (manipulación, toma rápida de la muestra, menor exposición al aire, mantenerlo húmedo). Cualquier error durante la toma de muestra de sangre puede conducir a un diagnóstico errado.

Extracción de sangre de la vena caudal

Al trabajar con peces juveniles y adultos es fácil tomar la muestra de sangre de la vena caudal, ya que no es necesario adormecer al pez, se puede colocar en el mesón y tapar los ojos con una toallita húmeda para calmarlo, para luego proceder a tomar la muestra.

La forma más adecuada de realizar la punción es en la zona ventral de la cola, justo después de la aleta anal y en dirección dorsal, avanzando hasta contactar con la columna vertebral, se rota ligeramente la aguja y se recoge la sangre. También se pue-



de hacer la punción a unos 60° desde una zona próxima a la línea lateral (Figura 1).

En el caso de peces de especies pequeñas o en alevines de especies de peces de gran tamaño, resulta difícil obtener suficiente cantidad de sangre para realizar todos los exámenes hematológicos, motivo por el cual solo se puede preparar frotis sanguíneos y realizar determinaciones de hematocrito. En estos casos, la superficie del pez se seca cuidadosamente con una toalla de papel y se corta el pedúnculo caudal, procediendo de forma inmediata a tomar la muestra de sangre con una jeringa heparinizada de 3 cc.

Extracción de sangre del corazón

La punción se realiza en la zona ventral de la región de transición entre la cabeza y la cola, específicamente entre las aletas pectorales y la zona de los opérculos. Se debe proceder de manera rápida para llegar al ventrículo, donde se extrae la sangre de forma fácil. Si se hace la punción ligeramente, por delante de la aleta pectoral, se consigue tomar la sangre del seno venoso.



Figura 1. Extracción de sangre de la vena caudal.

Capítulo III

Pruebas hematológicas

En las poblaciones de peces naturales (ríos, arroyos, lagos, entre otros), como en la explotación en cautiverio (piscicultura), es prioritario determinar los agentes o factores que afectan el bienestar de ellos, ya que la presencia de agentes patógenos o tóxicos, así como las anomalías causadas por estos agentes, se ven muchas veces reflejadas por la inmunosupresión o alteración de los elementos constituyentes de la sangre, por lo que, realizar las pruebas hematológicas adecuadas, ayuda a la valoración del estado de salud general de los peces.

Los parámetros hematológicos son utilizados como indicadores rápidos para detectar cualquier alteración fisiológica que afecte la salud de la población de peces. Por esta razón, es importante realizar las pruebas hematológicas de manera oportuna para evitar una epidemia y pérdidas en la producción piscícola.

Determinación de parámetros sanguíneos

La determinación de los parámetros hematológicos, como la concentración de hemoglobina, el porcentaje de hematocrito, el



contaje de leucocitos, entre otros, permiten tener una idea general del estado de salud de los peces. Los cultivadores piscícolas deben conocer y manejar estos parámetros, ya que son de suma utilidad y se constituyen en prioridad para realizar el diagnóstico respectivo. Igualmente, es importante conocer los constituyentes celulares de la sangre, así como todas sus posibles alteraciones fisiológicas o patológicas, que permitan relacionarlas con procesos de enfermedad y obtener un diagnóstico acertado.

Hemoglobina

La hemoglobina es una proteína que se encuentra en el interior de los eritrocitos, su determinación permite medir la cantidad de esta en la sangre, además, tener una idea de la capacidad que tiene el fluido sanguíneo de transportar oxígeno a las diferentes partes del cuerpo.

La concentración de hemoglobina se determina empleando el método de la cianometahemoglobina, donde se utiliza la solución de Drabkin como reactivo fundamental (Cuadro 4), que debe ser de color amarillo transparente (Figura 2). En este método, la hemoglobina es oxidada, por acción del ferrocianuro de potasio, a metahemoglobina, mientras que el cianuro de potasio proporciona los iones de cianuro para formar la cianometahemoglobina. El color anaranjado que se desarrolla se compara colorimétricamente con una solución patrón de cianometahemoglobina. Es importante considerar que la reacción de la hemoglobina es rápida y estable.



Cuadro 4. Composición de la solución de Drabkin.

Compuesto	Cantidad
Bicarbonato de sodio	1 g
Ferricianuro de potasio	0,2 g
Cianuro de potasio	0,052 g
Agua destilada	1 000 ml

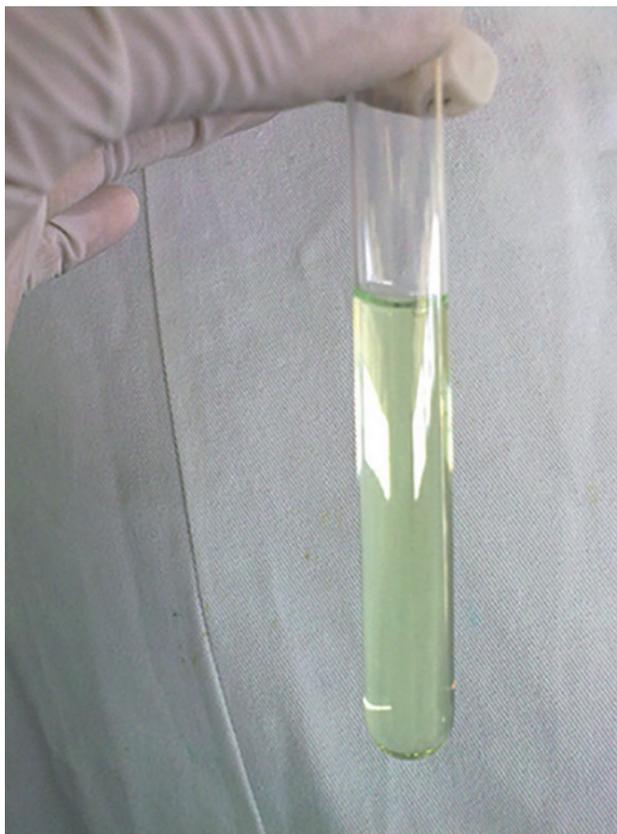


Figura 2. Coloración ideal del reactivo de Drabkin.



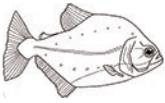
La solución de Drabkin se debe guardar en un frasco de vidrio color ámbar y en la nevera. El reactivo contiene cianuro, por lo que se debe evitar inhalar y tener contacto con los ojos o la ropa, tampoco se debe mezclar con ácidos y no se debe usar si su color es diferente al amarillo o está turbio o decolorado (amarillo muy pálido).

Determinación de la concentración de hemoglobina

La determinación de la concentración de hemoglobina, junto con otros parámetros, como el hematocrito, puede indicar la existencia de una alteración de la actividad hematopoyética, deficiencias nutricionales, presencia de enfermedades infecciosas u otros problemas de salud. La concentración de hemoglobina varía en muchas especies de peces. En relación con el sexo del pez, en las hembras los valores son menores. Su determinación brinda información sobre las correlaciones que se pueden constituir entre la salud del pez y otros parámetros hematológicos y bioquímicos.

La concentración de la hemoglobina de una muestra problema se determina de la manera siguiente:

- Conectar el espectrofotómetro.
- Homogeneizar bien la sangre, mediante agitación suave, con un sistema automático (rodillos/disco giratorio), durante un tiempo mínimo de 5 min. o agitar manualmente por inversión del tubo, repetir 20 veces.
- Pipetear (con propipeta) 5 ml de reactivo de Drabkin en un tubo de ensayo limpio.
- Añadir con la micropipeta 20 μ l de sangre homogeneizada al tubo que contiene 5 ml de reactivo de Drabkin. Al realizar esta



operación, es fundamental eliminar el exceso de sangre que quede en las paredes externas del capilar; antes de introducirlo en el reactivo y procurar que no quede sangre adherida a las paredes internas de la pipeta.

- Agitar el tubo mediante inversión, cuatro o cinco veces, con el fin de conseguir homogeneizar bien la mezcla sangre-reactivo, esperando 5 min. para que se produzca la hemólisis total y se complete la transformación de toda la hemoglobina en cianometahemoglobina.
- Leer la absorbancia de la solución a 540 nm, utilizando como blanco un tubo con solución de Drabkin.
- El resultado se expresa en gramos de hemoglobina por 100 dl de sangre total.

Para determinar la concentración de la hemoglobina es necesario preparar un patrón de concentración conocida. Se recomienda emplear patrones comerciales fidedignos para este fin. Sin embargo, si no se cuenta con un patrón comercial, se puede emplear una muestra de sangre, incluyendo humana, de la cual se conozca su concentración de hemoglobina. Se recomienda utilizar un patrón de 5 y 10 g/dl de hemoglobina.

Mientras que, para obtener la concentración de hemoglobina de una muestra desconocida es conveniente realizar el cálculo de un factor. Este factor proviene de las absorbancias de dos patrones de hemoglobina de concentración, previamente determinada o conocida, por ejemplo, un patrón de concentración 5 g/dl, el cual será el patrón 1; y otro patrón de 10 g/dl, el cual será designado como patrón 2. El cálculo del factor (F) se realiza mediante la fórmula siguiente:



$$F = \frac{C1 - C2}{Abs1 - Abs2}$$

Donde:

C1= concentración patrón 1= el de más alta concentración (g/dl)

C2= concentración patrón 2= el de más baja concentración (g/dl)

Abs1= absorbancia patrón 1

Abs2= absorbancia patrón 2

Ejemplo: si se tienen dos patrones, uno de 10 g/dl y el otro de 5 g/dl, cada uno con una absorbancia de 0,250 y 0,120, respectivamente.

Donde:

C1= concentración patrón 1= 10 g/dl

C2= concentración patrón 2= 5 g/dl

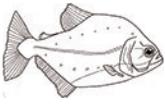
Abs1= absorbancia patrón 1= 0,250

Abs2= absorbancia patrón 2= 0,120

$$F = \frac{10 - 5}{0,250 - 0,120} = 38,40$$

El resultado del factor de 38,40 se multiplica por la absorbancia de las muestras de sangre con concentraciones de hemoglobina desconocida, utilizando la ecuación siguiente:

Concentración desconocida = F × Absorbancia de la muestra



Ejemplo: si se tiene una muestra que se desea saber su concentración de hemoglobina y cuya absorbancia es de 0,157, se tiene:

$$\begin{aligned}\text{Concentración desconocida} &= 38,40 \times 0,157 = \\ &= 6,02 \text{ g/dl de hemoglobina}\end{aligned}$$

Esto quiere decir que el pez tiene una concentración de 6,02 g de hemoglobina por cada decilitro de sangre o, lo que es lo mismo, 60,2 g de hemoglobina por cada litro de sangre.

Es importante señalar que las muestras de sangre hemolizadas o que contengan sustancias que causen turbidez, como lípidos plasmáticos, pueden interferir en la lectura.

Error en la determinación de la concentración de hemoglobina

Causas

- La presencia de hiperlipemia o leucocitosis intensa ($>50 \times 10^9$ células/l).
- Defectos técnicos en la manipulación y análisis del espécimen.
- Errores en la obtención de la sangre.

Error más común

Error en extracción

- Empleo de anticoagulantes no recomendados.
- Coagulación parcial de la sangre.



Error en la dilución

- Empleo de pipetas automáticas no calibradas, pipetas sucias o húmedas.
- No eliminar el exceso de sangre adherida a las paredes externas del capilar antes de introducirlo en el reactivo.
- Dilución incompleta de la sangre en el reactivo.

Error en la transformación de la hemoglobina en cianometahemoglobina (HiCN)

- Empleo de reactivo de Drabkin mal preparado o vencido.
- Lectura antes del tiempo necesario para la completa transformación de la hemoglobina en cianometahemoglobina (HiCN).

Error en la determinación de la concentración de hemoglobina

- Empleo de instrumentos no calibrados.
- Cubetas sucias o deterioradas.
- Soluciones turbias de cianometahemoglobina (HiCN).

Error en la conservación del reactivo

- Congelación del reactivo, lo que produce transformación de Ferricianuro de potasio ($K_3[Fe(CN)_6]$), conocido como Rojo de Prusia, en ferrocianuro potásico ($K_4[Fe(CN)_6]$) y una oxidación parcial de la hemoglobina.
- Conservación del reactivo en botellas de polietileno, ya que se pierden grupos cianuro (CN) con formación exclusiva de metahemoglobina, en vez de cianometahemoglobina (HiCN),



con lo que los valores de concentración de hemoglobina obtenida son inferiores a los reales.

Hematocrito

El hematocrito representa el porcentaje de la masa de eritrocitos en la sangre total, en este análisis se relaciona el volumen plasmático con la masa de eritrocitos, su cifra depende de factores como el tamaño y cantidad de eritrocitos, aparte de las condiciones propias de la especie evaluada.

Se recomienda realizar la determinación de hematocrito con sangre heparinizada, para no aplicar el factor de corrección, como sería el caso de la sangre oxalatada o citratada. La muestra se toma en un tubo de microhematocrito heparinizado o tubos capilares de 75 mm de longitud por 1,2 mm de diámetro (disponibles en el comercio), asegurando la ausencia de burbujas de aire en la columna sanguínea. La altura de la columna debe ser de 3 cm aproximadamente. Luego, se sella un lado del tubo con plastilina y se coloca en una centrifuga especial para microhematocritos, donde se centrifuga durante 5 min., y se procede a leer el microhematocrito de cada muestra.

Las células se compactan en tres capas, donde la capa inferior corresponde a los eritrocitos. Por encima de ellos quedan los leucocitos y los trombocitos, visibles en una capa delgada y de color blanco-grisáceo. Se debe medir solo la altura de la capa de eritrocitos. También se debe observar el color del plasma, para ver cualquier variación o desviación de su color amarillento pálido normal.

El hematocrito se obtiene por el método de microhematocrito (Blaxhall y Daisley, 1973), mediante los pasos siguientes:



- Llenar el capilar heparinizado por capilaridad hasta 75% de su capacidad, con la muestra de sangre extraída de los peces (Figura 3).
- Sellar el capilar heparinizado con plastilina para evitar que se derrame la sangre.
- Centrifugar durante 5 min. a 10.000 rpm para realizar las mediciones de hematocrito (Figura 4).
- Leer en la tabla de lectura para microhematocrito de la manera siguiente: se coloca el capilar heparinizado en la tabla de tal forma que coincida el final (0%) con la línea inferior de la tabla y la parte superior con el tope de llenado (100% del plasma) de la muestra de sangre, leyendo el tope de glóbulos rojos que se hace coincidir con la línea de lectura de la tabla (figuras 5 y 6).
- Anotar el resultado como porcentaje celular del volumen total de sangre en cada tubo.

Error en la determinación del microhematocrito

Causas

- Las fugas de muestra, al no quedar bien sellado los capilares producen una disminución en el valor, al perderse mayor proporción de células que de plasma.
- El uso de anticoagulantes, como el EDTA, provoca un error por dilución de la muestra.
- No se debe colocar el capilar en posición horizontal, una vez que se saca de la microcentrifuga, y sobre todo si no se va



Pruebas hematológicas

a leer inmediatamente, debido a que al colocarlo en posición horizontal el sedimento de los eritrocitos va tomando forma de bisel.

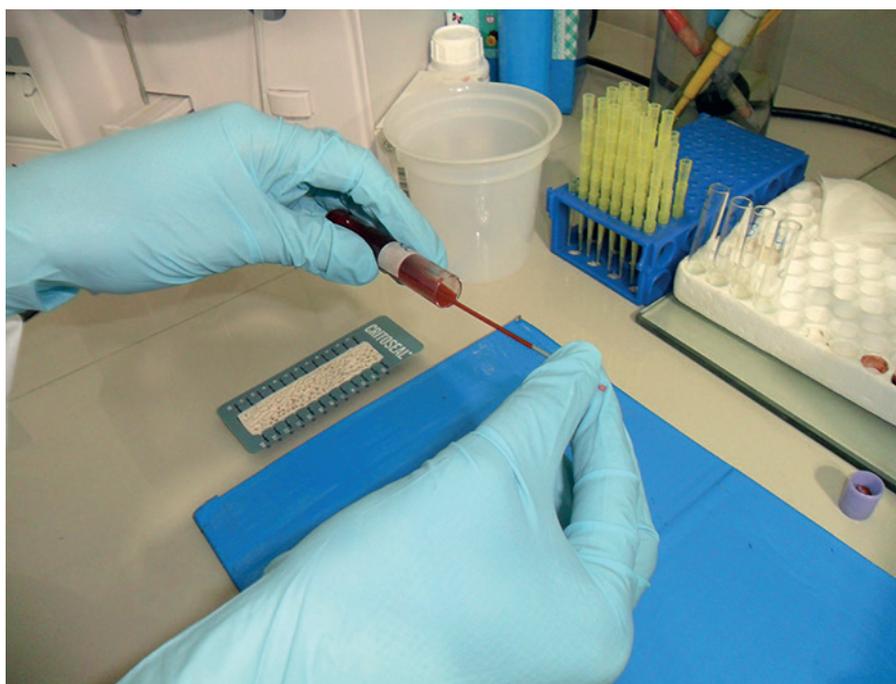


Figura 3. Llenado del capilar con sangre.



Figura 4. Microcentrifuga para hematocrito.

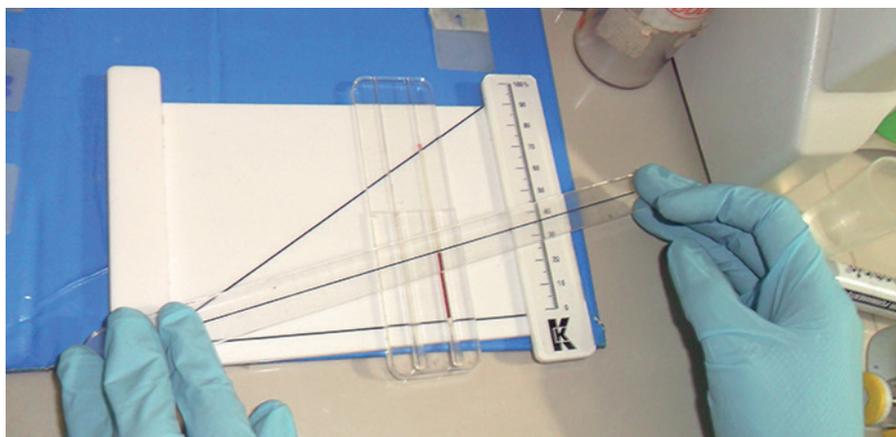


Figura 5. Lectura del hematocrito.

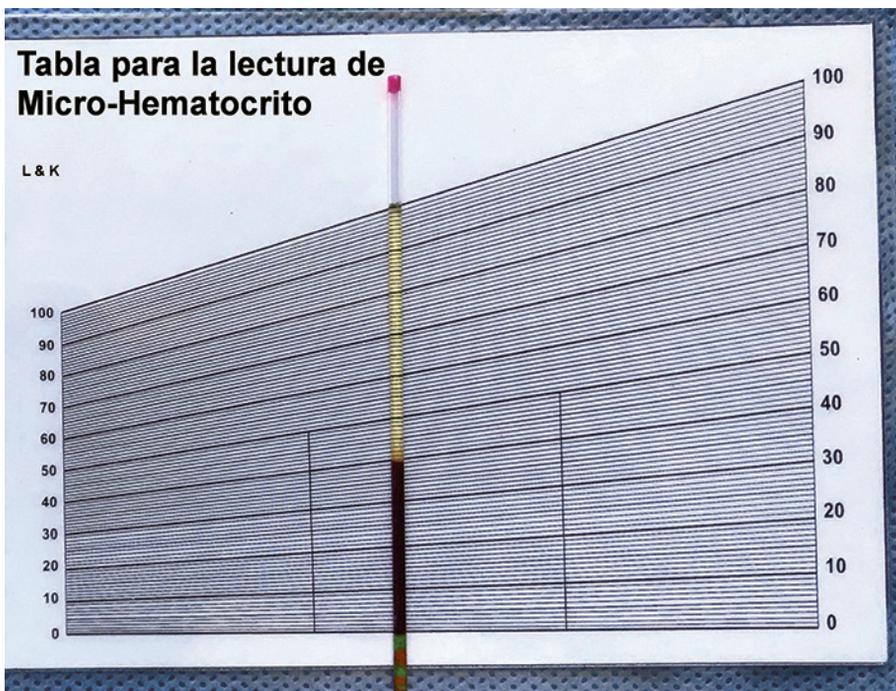


Figura 6. Separación de los componentes de la sangre después de centrifugados.



Contaje de células sanguíneas

El contaje de las células sanguíneas involucra el recuento de los eritrocitos y los leucocitos. La utilidad de hacer este tipo de análisis es para obtener una información que permita dar una indicación clara de algunos desórdenes del tipo nutricional y patológico, lo que sería de gran beneficio en situaciones de estrés de los peces, lo cual suele ser común en ambientes de confinamiento, como en las granjas piscícolas.

Recuento eritrocitario y leucocitario

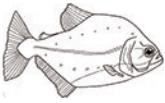
El recuento de eritrocitos consiste en el contaje y observación de los glóbulos rojos presentes en la sangre periférica; mientras que la evaluación de los leucocitos implica la interpretación de los parámetros de los glóbulos blancos de la sangre, incluyendo el recuento total, el contaje diferencial y la morfología de los leucocitos.

El objetivo que se persigue al realizar el recuento eritrocitario y leucocitario es determinar correctamente el número de eritrocitos y leucocitos en la sangre periférica de los peces, por medio del contaje directo en una muestra de sangre colocada en una cámara de Neubauer y con observaciones microscópicas.

Es importante que la cámara Neubauer y el cubreobjetito (cubreobjeto utilizado para cubrir la cámara), deben ser limpiados cuidadosamente con xilol, alcohol o detergente suave para eliminar la grasa presente en ellos.

Procedimiento para realizar el recuento eritrocitario y leucocitario

- Mezclar 20 μ l de sangre con 1,98 ml de la solución de Dacie para peces (Cuadro 5), la dilución de la sangre será 1/100.



Pruebas hematológicas

- Cargar la cámara teniendo en cuenta lo siguiente: el cubre objeto y la cámara deben estar completamente limpios. El cubre-hematímetro se debe adherir perfectamente sobre las bandas longitudinales de la cámara.
- Tomar con la pipeta Pasteur una gota de la dilución de sangre con solución de Dacie, para colocarla en la cámara, apoyando la punta de la pipeta sobre el borde del cubrehematímetro, y llenar cuidadosamente el área reticulada de la cámara de Neubauer (Figura 7).
- Dejar sedimentar la muestra durante 1 min.
- Observar con el lente de menor aumento para verificar si la distribución de los eritrocitos y leucocitos es homogénea.
- Realizar el conteo de los eritrocitos y leucocitos en el microscopio óptico, con el objetivo de 40 X.
- Contar los eritrocitos en el cuadrante central de la cámara y los leucocitos en los cuatros cuadrantes laterales.
- Sumar la cantidad de eritrocitos encontrados y multiplicar por 5 000, lo que dará el número de eritrocitos contados. Luego se determinará el número de eritrocitos por mililitro cúbico de sangre, mediante la fórmula siguiente:

$$\frac{\text{Eritrocitos}}{\text{mm}^3} = \frac{\text{Número de glóbulos rojos contados}}{0,2 \times 0,1 \times 0,01}$$

Donde:

0,2 = superficie del área contada 1/5.

0,1 = altura de la cámara de conteo.

0,01 = dilución de la sangre (1:100).



El resultado obtenido expresa el valor de los eritrocitos por milímetro cúbico de sangre.

Para determinar los leucocitos se suman las células contadas en los cuadrados periféricos de 1 mm² cada uno, los cuales están divididos en 16 cuadrados menores para facilitar el conteo.

- Sumar la cantidad leucocitos y multiplicar por 250, esto dará la cantidad de leucocitos contados. Luego se determinará el número de leucocitos por mililitro cúbico de sangre, mediante la fórmula siguiente:

$$\frac{\text{Leucocitos}}{\text{mm}^3} = \frac{\text{Número de glóbulos blancos contados}}{4 \times 0,1 \times 0,01}$$

Donde:

4 = superficie del área contada (cuatro cuadrados periféricos).

0,1= altura de la cámara (0,1 mm).

0,01 = dilución de la sangre.

Preparación de la solución de Dacie

Para realizar el conteo de los eritrocitos y leucocitos de peces se recomienda usar el líquido de dilución de Dacie, que lleva en su composición azul brillante de cresilo, lo que permite colorear las células para su mejor visualización y conteo.

En el Cuadro 5 se indica la formulación de la dilución de la solución de Dacie para peces, que una vez preparada, se debe filtrar y guardar en un envase de vidrio color ámbar.

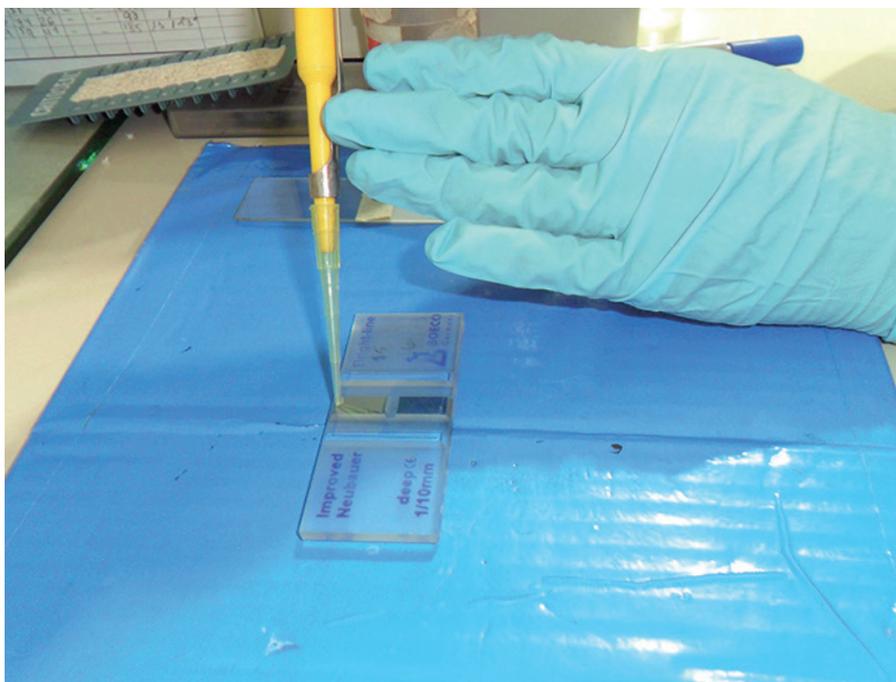


Figura 7. Llenado la cámara de Neubauer.

Cuadro 5. Formulación de la solución de Dacie para peces.

Compuesto	Dosis
Citrato de sodio	3,13 g
Azul brillante de cresilo	0,1 g
Formol	1 ml
Agua destilada	100 ml



Índices hematimétricos

Los índices hematológicos son parámetros que relacionan la hemoglobina, el hematocrito, y el número de eritrocitos, además, cada uno de ellos tiene su finalidad y brindan información importante sobre el estado de salud del pez. En el caso de la hemoglobina corpuscular media (HCM), permite tener idea sobre la dinámica cardiaca y el estado osmoregulatorio. En cambio, el volumen corpuscular medio (VCM) da una orientación de cómo se encuentra la función respiratoria. Mientras que la concentración de hemoglobina corpuscular media (CHCM) permite mostrar el porcentaje ocupado por la hemoglobina en un eritrocito promedio.

Para calcular los índices hematimétricos se requieren tres datos básicos, como son la concentración de hemoglobina, recuento eritrocitario o cantidad de eritrocitos por milímetro cúbico y hematocrito. Para asegurar que los índices hematimétricos sean los más exactos posibles, es necesario que los datos empleados hayan sido determinados con precisión.

Para determinar: el volumen corpuscular medio (VCM), la hemoglobina corpuscular media (HCM) y la concentración de hemoglobina corpuscular media (CHCM) se utilizan las relaciones matemáticas propuestas por Levinson y MacFate (1964).

Volumen corpuscular medio (VCM)

Determina la capacidad funcional de los eritrocitos al relacionar el volumen que ocupa el paquete celular y el número de células contadas en una muestra, obteniéndose una relación del tamaño de estas, que se expresa en micrones cúbicos o fentolitros ($1\text{fl} = 10^{-15} \text{ l}$) y corresponde al volumen ocupado por un eritrocito medio. Se calcula por medio de la formula siguiente:

**Pruebas hematológicas**

$$\text{VCM} = \frac{\text{Hto (\%)} \times 10}{\text{G.R. (10}^6\text{/mm}^3\text{)}} = \text{fentolitros (fl)}$$

Donde:

Hto: valor del hematocrito determinado del pez evaluado, expresado en porcentaje.

G.R.: valor del recuento eritrocitario determinado del pez evaluado, también llamado concentración de eritrocitos.

Ejemplo: si el pez tiene un valor de hematocrito de 40% y un recuento de eritrocitos de $1,1 \times 10^6/\text{mm}^3$, el valor del VCM es de:

$$\text{VCM} = \frac{40 \times 10}{1,1} = \frac{400}{1,1} = \frac{4\,000}{11} = 363,6 \text{ fl}$$

Hemoglobina corpuscular media (HCM)

La hemoglobina corpuscular media (HCM) representa la cantidad de hemoglobina contenida en un solo eritrocito. Expresa la hemoglobina contenida en los glóbulos rojos, los que permiten detectar los cambios fisiológicos que ocurren en estas células. Se expresa en picogramos (pg). Se calcula con la fórmula siguiente:

$$\text{HCM} = \frac{\text{Hb (g/dl)} \times 10}{\text{G.R. (10}^6\text{/mm}^3\text{)}} = \text{picogramos (pg)}$$



Donde:

Hb: valor de la concentración de hemoglobina determinada del pez evaluado.

G.R.: valor del recuento eritrocitario determinado del pez evaluado, también llamado concentración de eritrocitos.

Picogramo: es igual a 10^{-12} g.

Ejemplo: si el pez tiene un valor de hemoglobina de 9,5 g/dl y un recuento de eritrocitos de $1,1 \times 10^6/\text{mm}^3$, el valor del HCM es de:

$$\text{HCM} = \frac{9,5 \times 10}{1,1} = \frac{95}{1,1} = \frac{950}{11} = 86,3 \text{ pg}$$

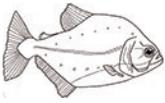
Concentración de hemoglobina corpuscular media (CHCM)

La concentración de hemoglobina corpuscular media (CHCM) es la medida de la concentración de la hemoglobina (peso por volumen) en un volumen determinado de eritrocitos (promedio de los hematíes) de una muestra de sangre. Se refiere a la cantidad efectiva y funcional de hemoglobina dentro de los eritrocitos. Se calcula mediante la fórmula siguiente:

$$\text{CHCM} = \frac{\text{Hb (g/dl)} \times 100}{\text{Hto (\%)}} = \% \text{ o g/dl}$$

Donde:

Hb: valor de la concentración de hemoglobina determinada del pez evaluado.



Hto: valor del hematocrito determinado del pez evaluado, expresado en porcentaje.

Ejemplo: si el pez tiene una concentración de hemoglobina de 9,5 g/dl y un hematocrito de 40%, el valor del CHCM es de:

$$\text{CHCM} = \frac{9,5 \times 100}{40} = \frac{950}{40} = 23,75\%$$

La concentración de hemoglobina corpuscular media (CHCM) es un parámetro poco usado, ya que no aporta una información válida, porque en peces no siempre están relacionados directamente la hemoglobina y el hematocrito.

Morfología celular

Para tener una idea completa del estado de salud de los peces, es necesario realizar el estudio del frotis o extendido de sangre periférica, ya que el mismo permite hacer el conteo relativo de las células, así como observar e interpretar la morfología de las mismas. El estudio del frotis constituye un examen de rutina, que adecuadamente interpretado por el observador, brinda información valiosa para el técnico. La principal importancia del estudio radica en el hecho que se pueda realizar el diagnóstico de algunas patologías en los peces, sobre todo desde el punto de vista morfológico, inmunológico y parasitológico, entre otras.



Preparación y coloración de frotis sanguíneos

Preparación de frotis sanguíneos

La preparación del frotis o extendido se debe realizar con sangre fresca, preferiblemente, sin el uso de anticoagulantes. Sin embargo, también se puede tomar de la muestra recogida para las otras determinaciones. Se coloca una gota de sangre (aproximadamente 10 mm^3) a una distancia de 1,5 cm de la parte terminal de un portaobjeto limpio y libre de grasa. Luego, con un segundo portaobjeto, colocado en un ángulo de 45° , se procede a preparar un frotis delgado mediante un movimiento suave y cuidadoso, que permite la extensión de la gota de sangre sobre la superficie del primer portaobjeto (Figura 8). Una vez preparado el frotis, se seca en el aire, moviendo el portaobjeto cuidadosamente entre el pulgar y el dedo índice. Posteriormente, se fija con metanol absoluto y se guarda en un estuche para portaobjetos hasta su coloración.

Para que un frotis sea válido:

- No debe ser demasiado grueso, ya que los elementos estarán retenidos y no serán identificados.
- No debe ser demasiado delgado, porque sería muy pobre en elementos e impediría una lectura conveniente.
- No debe alcanzar los bordes, ni las extremidades del portaobjeto, ya que se perderían los elementos más voluminosos. La gota se debe agotar sobre el portaobjeto.
- No debe presentar agujeros, por la utilización de portaobjetos mal desengrasados, ni estrías o flecos, que son provocados por un extensor de bordes no esmerilados e irregulares.

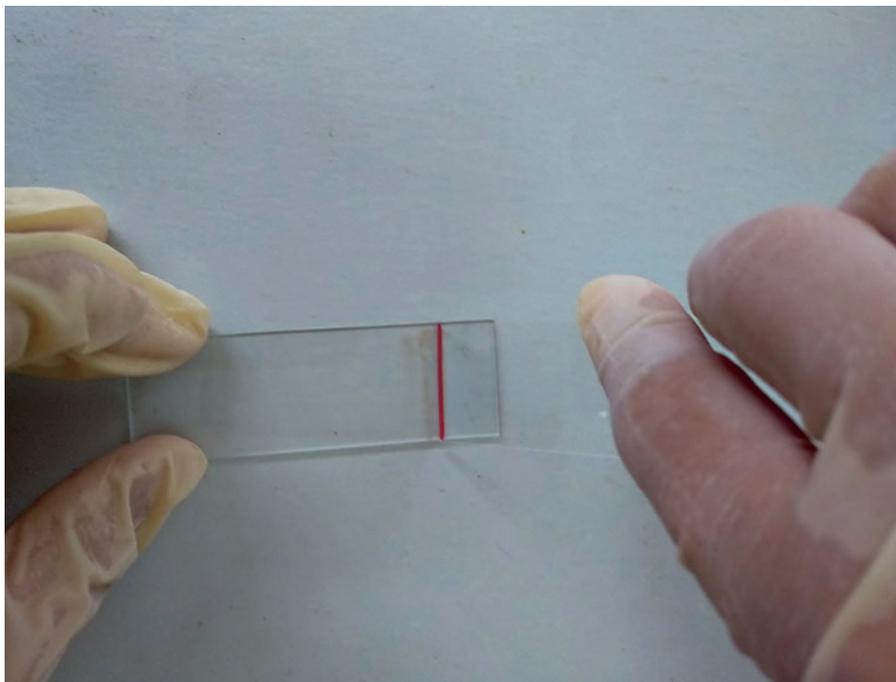


Figura 8. Preparación del frotis sanguíneo.

- Debe ser regular, sino el reparto de elementos es heterogéneo y, por lo tanto, el recuento variará según los campos examinados.
- Se debe secar correctamente, ya que un secado defectuoso produce anomalías en las células que se quieren observar, como hematíes festoneados, leucocitos deformes o con membranas celulares rotas, entre otras.

Recomendaciones para obtener un frotis correcto:

- El tamaño de la gota debe ser el adecuado.



- Si ha caído un exceso de gota, hay que limpiar el portaobjeto con gasa o algodón. Se debe repetir el procedimiento las veces que sea necesario, hasta que la cantidad de sangre sea la adecuada.
- El frotis ideal es aquel que ocupa $\frac{3}{4}$ partes de la lámina.
- Nunca se debe llevar la gota de sangre por delante del extensor, porque puede producir erosión de las células.
- Un buen frotis debe constar de una zona inicial gruesa (cabeza), una zona central mediana (espesor ideal para la lectura), terminar en una cola delgada suavemente en un borde convexo y sin estrías prolongadas, que hablan de un extensor defectuoso. Un buen extendido luce como una pincelada sobre el vidrio (Figura 9).
- Antes de realizar el frotis, se recomienda soplar el portaobjeto limpio y desgrasado con una bocanada de aire caliente sobre el mismo (como se hace para limpiar los lentes) y secar con papel absorbente o tela limpia lentes.

Coloración de frotis sanguíneos

La coloración o tinción de frotis sanguíneos es el conjunto de técnicas requeridas para teñir y diferenciar a través de la observación microscópica los distintos componentes celulares de la sangre de los peces. Esta técnica permite observar la morfología de los distintos grupos de células blancas; además de facilitar la diferenciación de células rojas normales o no.

Es importante señalar, que muchas veces es necesario adaptar la técnica de coloración utilizada de acuerdo con la especie de pez que se esté evaluando, e inclusive, según la etapa de desarrollo del mismo, ya que aplicar cualquier técnica de coloración, tal cual

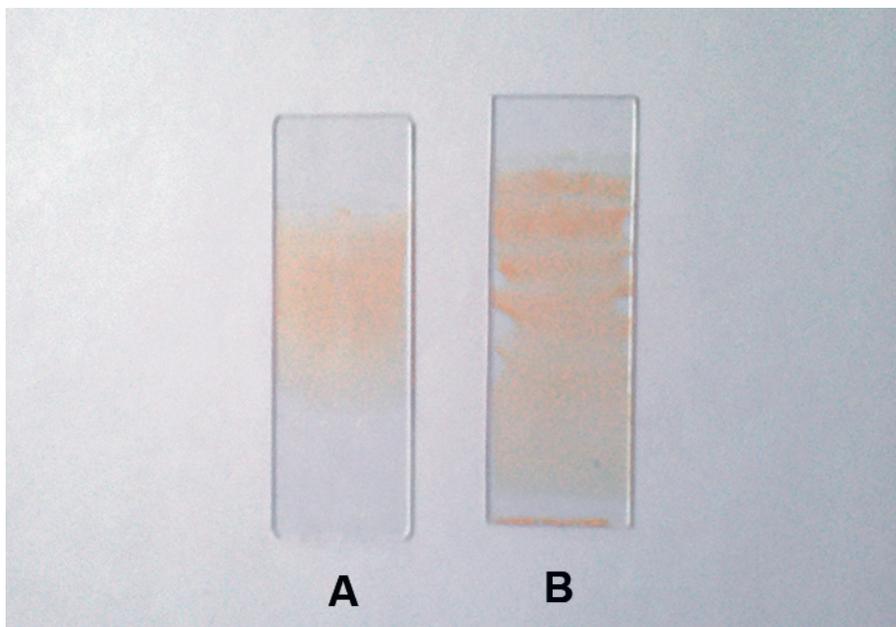


Figura 9. Extendido o frotis. Forma correcta (A) y Forma incorrecta (B).

lo recomienda la casa comercial, en muchos casos no da los resultados esperados, sobre todo, en lo referente a los tiempos de exposición a las diferentes soluciones constituyentes de las coloraciones. Por esta razón, se recomienda realizar una prueba previa, siendo muy cuidadosos con el tiempo de fijación con metanol.

Por otro lado, a pesar de que los leucocitos de los peces tienen algunas características básicas semejantes a la de los humanos, se recomienda que, si aún no se ha realizado la caracterización morfológica de las células leucocitarias del pez de interés o no se conoce bien, el técnico debe realizar previamente esta carac-



terización, para reconocer de forma adecuada la morfología de las células blancas del pez bajo evaluación.

A continuación, se describen las coloraciones más recomendadas para la tinción de células sanguíneas de peces, ligeramente modificadas, tomando en consideración lo anteriormente señalado.

Coloración de Giemsa

El colorante de Giemsa es una solución en metanol de un colorante ácido (eosina) y dos colorantes básicos (azur y azul de metileno), el cual teñirá las estructuras celulares dependiendo de su carácter ácido o básico (Figura 10). Es una coloración de las más importantes y da los mejores resultados, muy adecuada para detectar parásitos en la sangre y tejidos, como los géneros *Myxobolus* y *Haemogregarina*.

Reactivos

Colorante de Giemsa: está formado por una mezcla de azul de metileno, eosina y varios azules derivados de la oxidación del azul de metileno en solución acuosa. Se prepara con 1 g del colorante en polvo, 66 ml de metanol absoluto y 66 ml de glicerol, para ello se disuelve el colorante con el glicerol y se agrega el metanol, mezclar bien y dejar a temperatura ambiente de 7 a 14 días, con el fin de que la mezcla madure. Al momento de usar el colorante, se debe filtrar para eliminar depósitos o residuos que crearían artefactos durante la coloración. La mezcla preparada se debe guardar en un frasco color ámbar para evitar que la luz la dañe. Cuando se trabaje con el colorante preparado, se deben hacer diluciones con la solución amortiguadora en una proporción de 1/10 o 1/20 al momento de realizar las tinciones. Algunas casas comerciales venden el reactivo ya diluido.

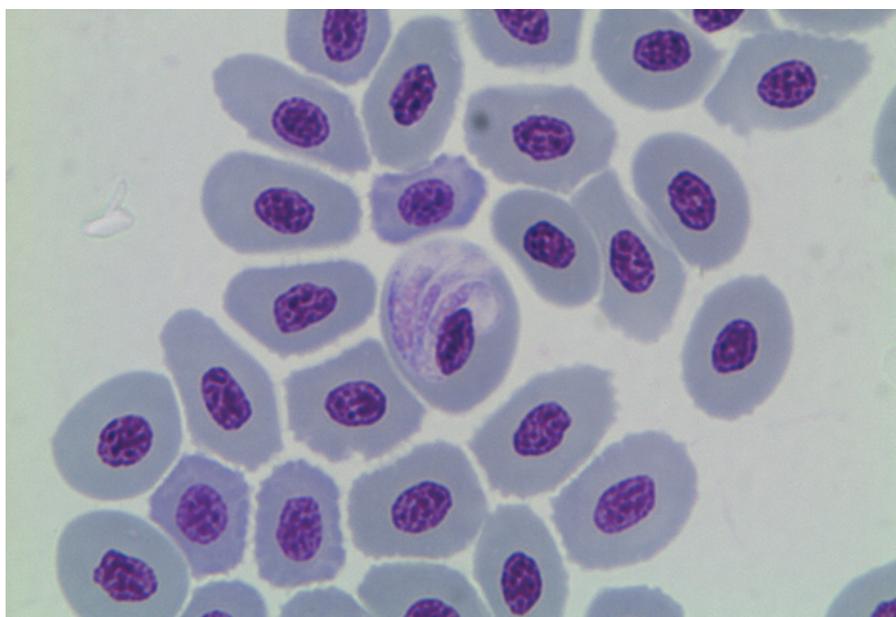
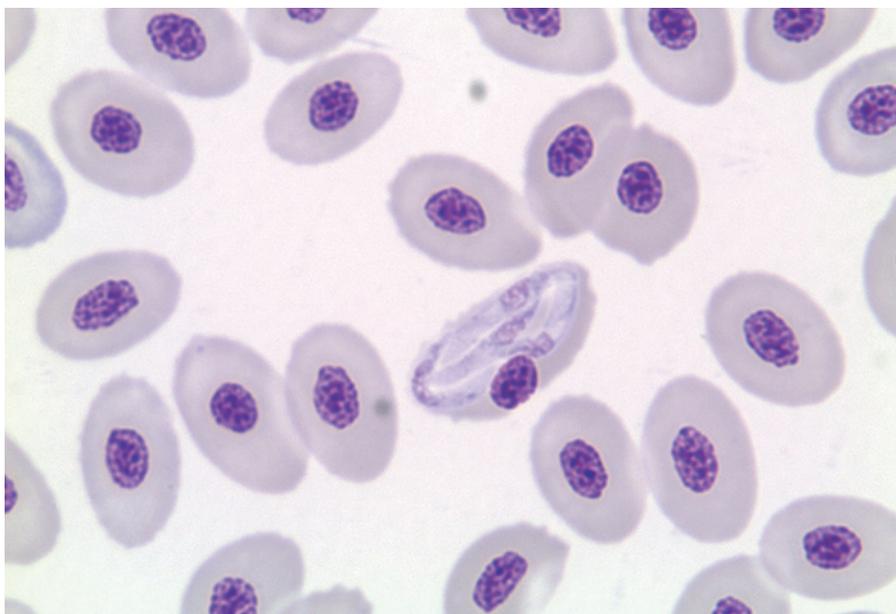


Figura 10. Frotis teñido con la coloración de Giemsa.



Solución amortiguadora: llamada también reguladora, tampón o buffer, con pH 7 comercial o en su efecto agua tamponada o amortiguada, preparada con agua destilada y agua de chorro en partes iguales (V/V).

Es importante señalar que la reacción de la sangre de los peces es muy variable frente a los diferentes componentes de los reactivos de las coloraciones, por lo tanto, esta coloración puede presentar pequeñas modificaciones en sus diferentes pasos y deben ser probados para cada especie de peces a examinar. A continuación, se describe el procedimiento estándar para la tinción con el colorante de Giemsa.

Procedimiento de tinción estándar

- Fijar primero el frotis con metanol absoluto por un tiempo aproximado de 3 min., dejar secar al aire.
- Agregar la solución colorante por un máximo de 4 min. Cuando se trabaja con colorantes previamente diluido (1/10 o 1/20) el tiempo de exposición será de 10 a 20 min. aproximadamente.
- Agregar la solución amortiguadora, mezclar con el colorante soplando suavemente con ayuda de una pipeta de vidrio. Esperar hasta que aparezca en la mezcla una coloración verde metálica, aproximadamente 3 min.
- Botar la mezcla y lavar suavemente con agua de chorro hasta no tener presencia del colorante en el agua escurrida.
- Dejar secar al aire y observar al microscopio.



Coloración de May-Grünwald-Giemsa

Esta coloración es el resultado de la combinación de la tinción de Giemsa con la de May-Grünwald, siendo conocida también como tinción panóptica, la cual hace resaltar en forma especial las granulaciones presentes en los leucocitos, permitiendo diferenciar los diferentes tipos celulares, como los eritrocitos, basófilos, eosinófilos, polimorfonucleares, linfocitos y plaquetas (Figura 11). La solución de May-Grünwald tiñe los elementos acidófilos y las granulaciones neutrófilas de los leucocitos.

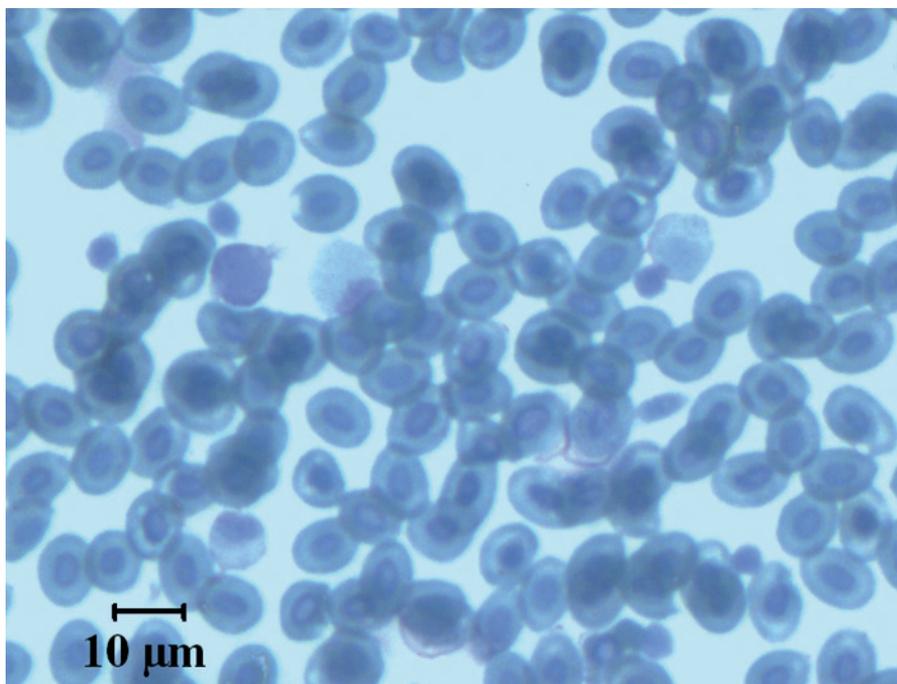


Figura 11. Frotis teñido con la coloración de May-Grünwald-Giemsa.



Reactivos y soluciones

Solución de May-Grünwald: la preparación de la solución se realiza mezclando 0,3 g de colorante de May-Grünwald en 100 ml de alcohol metílico absoluto, luego se calienta la mezcla a 56 °C hasta que se diluya completamente el colorante. Posteriormente, se debe dejar enfriar en la nevera a 4 °C durante 24 h, agitar la solución de vez en cuando. Filtrar antes de su empleo.

Procedimiento de tinción

- Preparar el frotis.
- Cubrir el frotis de sangre seco con la solución May-Grünwald, dejar actuar por 3 min.
- Agregar la solución amortiguadora: buffer fosfato pH 6,8 o una mezcla de agua corriente con agua destilada en partes iguales, en proporción igual a la del colorante.
- Homogeneizar soplando suavemente con una pipeta o moviendo el portaobjetos con un movimiento de vaivén, dejar de 3 a 5 min.
- Botar la mezcla.
- Enjuagar con agua corriente y cubrir el preparado con la solución de Giemsa, preparada, a razón de 2 gotas del colorante/ml de agua (1/10), dejar de 10 a 12 min.
- Lavar con agua destilada, limpiar la cara inferior del portaobjeto con un algodón.
- Secar al aire y observar al microscopio.



Errores a evitar

Los errores más frecuentes son:

- Coloración excesivamente azul (Figura 12). Puede ocurrir por:
 - Frotis muy grueso.
 - Lavado insuficiente.
 - Tinción muy prolongada.
 - Empleo de colorante muy alcalino.
- Coloración muy rosada. En este caso, el colorante, el tampón o el agua de lavado tienen un pH demasiado ácido.
- Presencia de precipitado. Se puede evitar mediante filtración del colorante antes de su empleo.
- Apreciación de artefactos morfológicos debido al anticoagulante. Cuando el frotis se realiza con sangre tratada con ácido etilendiaminotetraacético (EDTA), es muy importante no esperar más de dos horas de la extracción, ya que puede aparecer alteraciones morfológicas imprevisibles en las células sanguíneas.
- Aparición de artefactos debidos a suciedad, deterioro o presencia de grasa en el portaobjetos.

Coloración de glucógeno. Reacción de PAS (Ácido peryódico de Schiff) (Modificado)

En el método de coloración de glucógeno se utiliza la reacción de PAS (Ácido Peryódico de Schiff) (Modificado), que es un colorante incoloro pero que se torna rojo estable al contacto con los grupos aldehídos, tiñendo a los carbohidratos y macromoléculas con abundancia de carbohidratos. Se usa para detectar glucógeno en las células, mucus en varios tipos de células y tejidos.

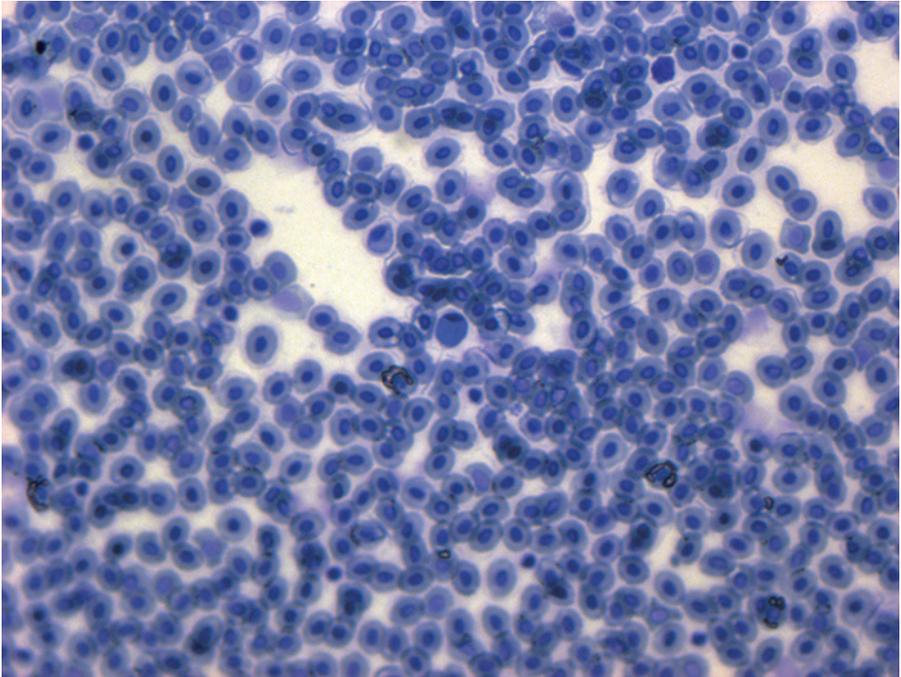


Figura 12. Frotis teñido con la coloración de May-Grünwald-Giemsa (excesivamente azul, incorrecta).

La reacción de PAS colorea de rosado fucsia a rojo púrpura al glucógeno en el citoplasma de la célula. Los neutrófilos reaccionan en todos sus estadios de desarrollo y con mayor intensidad en el estadio maduro (Figura 13), lo mismo ocurre con los eosinófilos, los linfocitos son negativos y en los monocitos puede aparecer una reacción poco acentuada.

Reactivos

Ácido peryódico a 0,5%. Preparación: diluir 0,5 g de ácido peryódico en 100 ml de agua destilada.

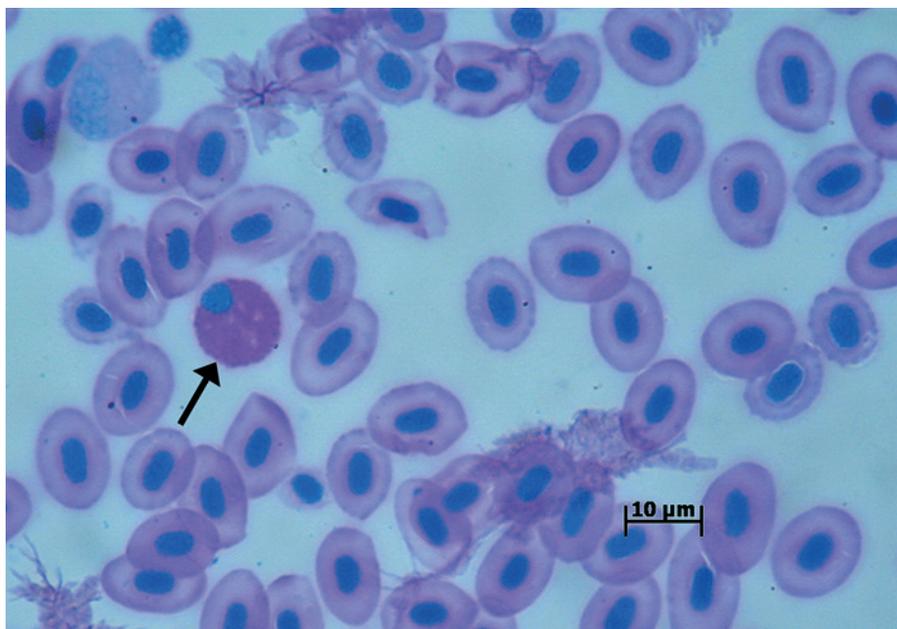


Figura 13. Frotis teñido con la coloración de Ácido Peryódico de Schiff (PAS). La flecha indica un heterófilo del tipo neutrófilo PAS (+).

Reactivo de Schiff. Preparación: tomar 300 ml de agua destilada y llevar a punto de ebullición (80 °C). Luego, tomar 200 ml y disolver 100 mg de Fucsina básica. Dejar enfriar a 50 °C y filtrar. Posteriormente, añadir 100 mg de metabisulfito de sodio, dejar en reposo en un frasco oscuro durante 24 h (en esta fase la solución debe tomar un color rosa pálido). Después de pasar este tiempo, se debe agregar 100 mg de carbón activado, que sirve como filtro y debe decolorarla. Finalmente, envasar y guardar a una temperatura de 4 °C.



Esta técnica fue modificada para ajustarla a los requerimientos de la cachama, *Colossoma macropomum*. A continuación, se describe el protocolo utilizado:

- Fijar el extendido o frotis sanguíneo en el portaobjeto con metanol absoluto durante 10 min., luego lavar con agua destilada brevemente y cubrir con la solución de ácido peryódico a 0,5% por 10 min.
- Lavar nuevamente con agua destilada y secar el portaobjeto, para luego teñir con el reactivo de Schiff, durante 30 min.
- Lavar con agua corriente tres veces.
- Colorear con azul de metileno a 1% durante 5 min.
- Volver a lavar, dejándose secar al aire para luego observar al microscopio.

Coloración con Negro de Sudán B (modificado)

El método de tinción con Negro de Sudán B (modificado) se utiliza en la demostración histoquímica de gránulos neutrófilos en frotis de sangre o médula ósea. Los lípidos, incluyendo las grasas neutras y los esteroides, quedan teñidos de color marrón y, de esa manera, se ponen de manifiesto los neutrófilos y células mieloides (Figura 14).

Procedimiento de tinción

- Colocar los extendidos en la solución fijadora (etanol absoluto-formol en una proporción 3:1) durante 5 s; luego lavar con agua destilada y dejar secar al aire.
- Teñir con la solución colorante Negro de Sudán B (Sigma-Aldrich) durante 30 min.



Pruebas hematológicas

- Seguidamente escurrir y lavar con etanol absoluto.
- Efectuar una coloración de contraste con Giemsa de la forma siguiente:
 - Cubrir la preparación con la solución de Giemsa preparada, a razón de dos gotas del colorante/ml de agua (1/10).
 - Dejar de 10 a 12 min. Lavar con agua, limpiar la cara inferior del portaobjeto con un algodón y secar al aire.
 - Observar al microscopio.

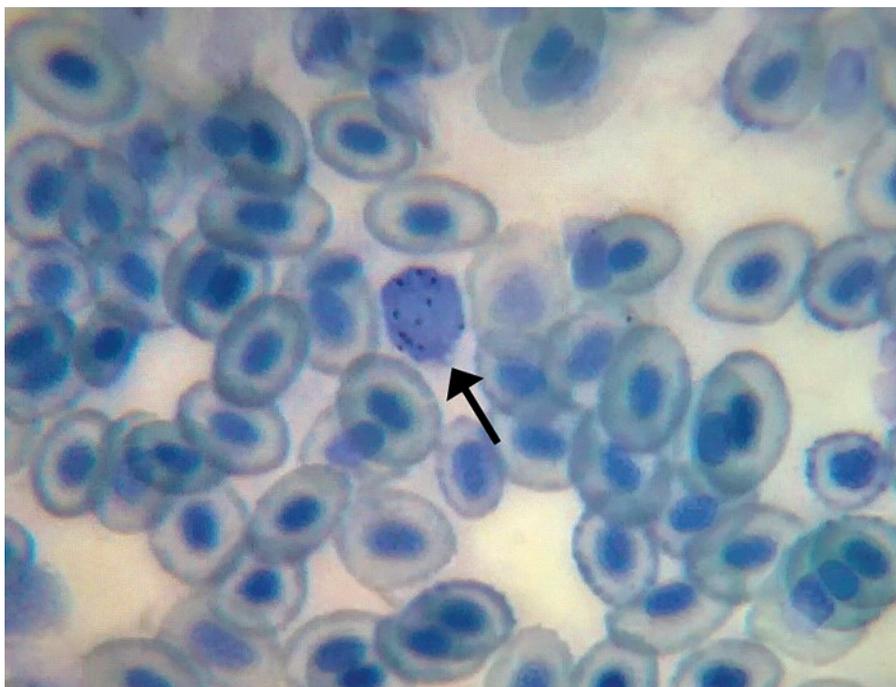


Figura 14. Frotis teñido con la coloración de Negro Sudán B. La flecha indica un heterófilo del tipo basófilo Negro de Sudán B (+).



Coloración de mieloperoxidasa de Sato y Selkiya (modificado)

El método de coloración de mieloperoxidasa se utiliza para diferenciar los granulocitos del resto de las células. Este método se basa en la oxidación de la bencidina por el agua oxigenada (peróxido de hidrógeno) en presencia de peroxidasa por la acción del sulfato de cobre en la bencidina oxidada, que permite visualizar los gránulos de peroxidasa positivo presente en el citoplasma de los granulocitos, que se tiñen de color azul negrozco a diferencia de los linfocitos, trombocitos y eritrocitos (Figura 15), los cuales presentan una reacción negativa a esta tinción.



Figura 15. Frotis teñido mediante la coloración de mieloperoxidasa. La flecha gruesa indica un heterófilo del tipo neutrófilo mieloperoxidasa (+) y la flecha delgada muestra los gránulos peroxidasa (+).



Reactivos y soluciones

Solución de sulfato de cobre pentahidratado a 0,5%. Preparación: diluir 0,5 g de sulfato de cobre pentahidratado en 100 ml de agua destilada.

Benzidina a 0,1%. Preparación: diluir 1 g de bencidina en 100 ml de agua destilada.

Peróxido de hidrógeno a 3% recién filtrado. Preparación: 3 ml de agua oxigenada (peróxido de hidrógeno) en 100 ml de agua destilada.

Safranina a 1%. Preparación: diluir 1 g de safranina en 100 ml de agua destilada.

Procedimiento de tinción

Una vez secos los frotis, recién preparados y fijados en metanol absoluto, se procesan de la manera siguiente:

- Cubrir el frotis con la solución de sulfato de cobre pentahidratado a 0,5% durante 20 s y eliminar el exceso de líquido.
- Agregar la solución a base de bencidina a 0,1% y agua oxigenada (peróxido de hidrógeno) a 3% recién filtrada, se deja actuar por 20 min. y se elimina el exceso de líquido.
- Colorear el frotis con safranina a 1% durante 4 min., eliminando el exceso de líquido.
- Dejar secar al aire y observar al microscopio.



Coloración de proteínas con negro amido (modificado)

Con el método de coloración con negro amido (modificado) las proteínas básicas se colorean de azul intenso. La reacción es positiva en todas las proteínas de la serie mieloide (Figura 16), aumenta paralelamente con la maduración eritroblástica y disminuye en la granulocítica, cuyos elementos maduros, los granulocitos, son casi negativos. En cambio, en la megacariocítica es leve y en la linfocítica prácticamente es negativa.

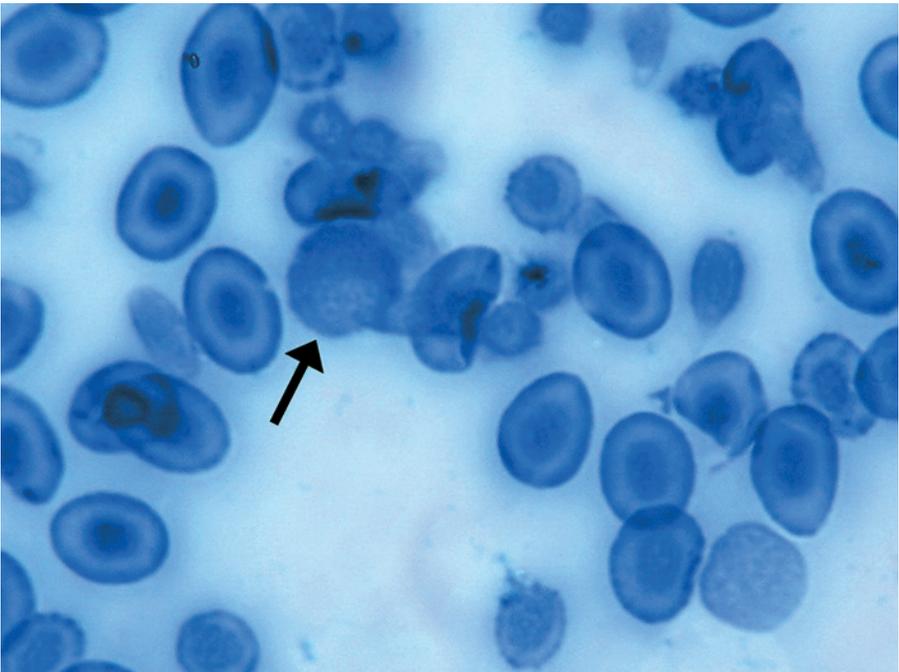


Figura 16. Frotis teñido mediante la coloración de negro amido. La flecha indica una célula monocítica negro amido (+).



Procedimiento de tinción

- Cubrir el extendido por 3 min. con el reactivo puro (SIGMA - Amido black staining solution, 2x concentrado), lapso en el que se produce la fijación.
- Agregar igual cantidad de agua destilada, soplar suavemente con una pipeta durante 5 min.
- Lavar con agua corriente, dejar secar y observar al microscopio.

Coloración con hematoxilina-eosina

El método de tinción con hematoxilina-eosina se utiliza para corroborar la acidofilia de las células evidenciadas en la tinción de Giemsa. Con esta coloración, las estructuras de naturaleza ácida, por lo general, se tiñen de color azul o púrpura, mientras que los componentes celulares de naturaleza básica, se tiñen en tonos rojo-naranja (Figura 17).

Reactivos y soluciones

Hematoxilina. Preparación: diluir 10 g de hematoxilina en 100 ml de etanol absoluto.

Eosina. Preparación: diluir 1 g de eosina en 20 ml de etanol absoluto, completar a 100 ml de agua destilada.

Etanol a 70%, 96% y absoluto.

Xilol.

Bálsamo de Canadá.

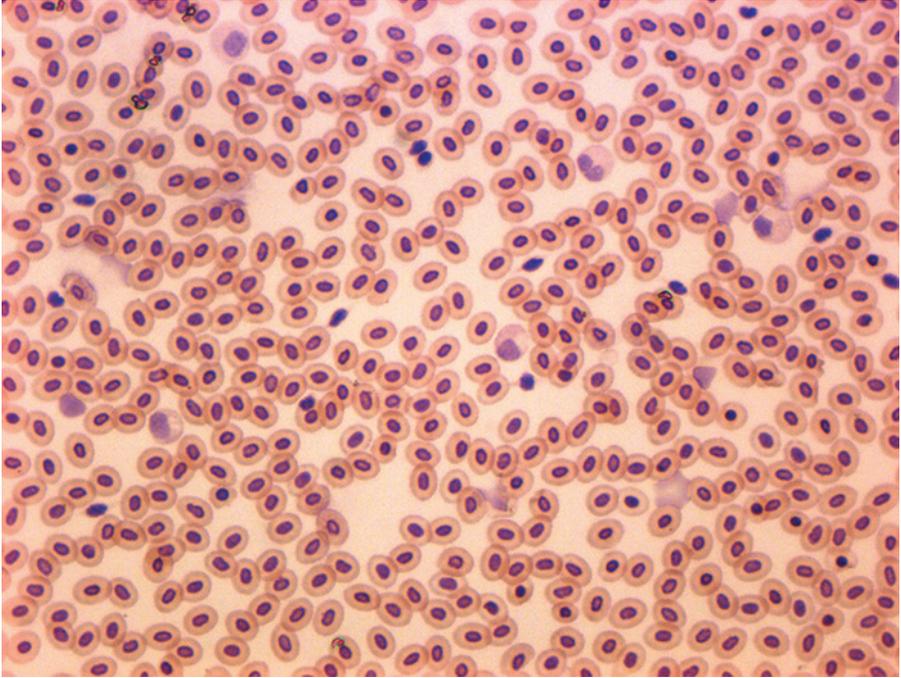
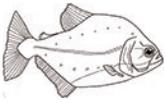


Figura 17. Frotis teñido con la coloración de hematoxilina-eosina.

Procedimiento de tinción

- Cubrir los extendidos secos y fijados con metanol absoluto con hematoxilina durante 5 min.
- Lavar con agua corriente por 10 min. y después con agua destilada.
- Agregar eosina por 5 min.
- Lavar con agua corriente y luego con agua destilada durante 5 min.



Pruebas hematológicas

- Deshidratar cubriendo con etanol a 70%, 96% y absoluto durante 3 min., cada uno.
- Aclarar con xilol por 10 min.
- Cubrir con una gota de bálsamo de Canadá y colocar un cubreobjetos.
- Dejar secar y observar al microscopio.

Bibliografía consultada

Blaxhall, PC; Daisley, KW. 1973. Routine haematological methods for use with fish blood. *Journal of Fish Biology* 5(6):771-781.

Bauer, J. 1986. Análisis clínicos, métodos e investigación. Barcelona, España, Reverté. 1.302 p.

Campbell, T; Murru, F. 1990. An introduction to fish haematology. *Compendium on Continuing Education for the Practicing Veterinarian* 12(4):325-532.

Campos Chagas, E; Val, AL. 2003. Efeito da vitamina C no ganho de peso e em parâmetros hematológicos de tambaqui. *Pesquisa Agropecuária Brasileira* 38(3):397-402.

Centeno, L; Silva-Acuña, R; Barrios, R; Salazar-Lugo, R; Matute, C; Pérez, J. 2007. Características hematológicas de la cachama (*Colossoma macropomum*) en tres etapas de crecimiento cultivadas en el estado Delta Amacuro, Venezuela. *Zootecnia Tropical* 25(4):237-243.

Conroy, DA. 1998. Manual de métodos y técnicas de laboratorio de uso común en la hematología pisciaria. Maracay, Venezuela, Pharmafish. 75 p.



Fernández, J. 1986. Peces más comunes del Territorio Federal Amazonas. Venezuela. Fonaiap Divulga 21:29-35.

Fourniet, JW; Summers, JK; Courtney, LA; Engle, VD; Blazer, VS. 2001. Utility of splenic macrophage aggregates as an indicator of fish exposure to degraded environments. Journal of Aquatic Animal Health 13(2):105-116.

García, N; Salazar, R; Lemus, M; Centeno, L. 2004. Hematological response of freshwater fish *Colossoma macropomum* exposed to sublethal copper concentration (póster). In International Congress on the Biology of Fish. Behavior, Physiology and Toxicology Interactions in Fish (4, 2004, Manaus, Brasil). Sloman, K; Wood, C; MacKinlay, D (eds.). Proceedings. Manaus, Brasil. p. 123-130.

Levinson, SA; MacFate, RP. 1964. Diagnóstico de laboratorio. Barcelona, España, Ateneo 124 p.

Lynch, M; Rápale, S; Mellor, L; Spare, P. 1977. Análisis clínicos. 2 ed. Ciudad de México, México, Interamericana. 1.522 p.

MAC (Ministerio de Agricultura y Cría, Venezuela); SARPA (Servicio Autónomo de los Recursos Pesqueros y Acuícolas, Venezuela). 1995. La acuicultura en Venezuela. Una alternativa de desarrollo. Caracas, Venezuela, MAC. SARPA. 230 p.

Moura, MA; Farias, IP; Val, AL. 1994. Effects of temperature on leucocytes of *Colossoma macropomum* and *Hoplosternum littorale* (Pisces) Brazilian journal of medical and biological research 27(7):1.589-1.598.

Padrós, F; Zarza, C. 2005. Manual de técnicas básicas de diagnóstico patológico en peces. In curso de ictiopatología básica para piscicultores. Situación Sanitaria Actual del Cultivo de la



Dorada y Lubina (5, Barcelona, España, 2005). Barcelona, España, Universidad autónoma de Barcelona. Facultad de Veterinaria. Skretting. Servicio de Patología de Peces. 85 p.

Pádua, SB de; Pilarski, F; Sakabe, R; Dias-Neto, J; Campos, E; Chagas, EC; Ishikawa, MM. 2012. Heparina e EDTA a como anticoagulantes para tambaqui (*Colossoma macropomum* Cuvier, 1816). Acta Amazónica 42(2):293-298.

Parra, L. 2005. Visión general del sector acuícola nacional – Venezuela (en línea). Roma, Italia, FAO. Departamento de Pesca y Acuicultura. Consultado 4 set. 2019. Disponible en http://www.fao.org/fishery/countrysector/naso_venezuela/es

Salazar-Lugo, R; León, A; Lemus, M. 2009. Efecto del cadmio y de la temperatura sobre el conteo de células sanguíneas del pez dulceacuícola *Colossoma macropomum*. Revista Científica 19(1):1-7.

Salazar-Lugo, R; Blanco, Y; Centeno, L; Lemus, M. 2011. Variaciones en los parámetros hematológicos y en la respuesta inmune inespecífica de la cachama negra *Colossoma macropomum* expuesta a cadmio. Saber 23(1):28-35.

Salazar-Lugo, R; Romero, Z Centeno, L. 2012. Caracterización morfológica y citoquímica de leucocitos del pez dulceacuícola *Colossoma macropomum* (Characiformes: Characidae). Saber 24(1):49-55.

Salazar-Lugo, R; Vargas, A; Blanco, Y; Lemus, M; Centeno, L. 2012. Química sanguínea en juveniles de *Colossoma macropomum* en condiciones de cultivo. In Foro Iberoamericano de los Recursos Marinos y la Acuicultura (4, 2011, Viana do Castelo, Portugal). Vaz Velho, M; Fernandes Seixas, P; Lodeiros, C; González, N; Rey-Méndez, M (eds.). Santiago de Compostela, A Coruña,



España, Asociación Cultural Foro dos Recursos Mariños e da Acuicultura das Rías Galegas. p. 445-451.

Stites, D; Stobo, JD; Hugh Fundenberg, H; Wells, J. 1985. Inmunología básica y clínica. 5 ed. Ciudad de México, México, El Manual Moderno. 560 p.

Tavares-Dias, M; Sandrim, E; Sandrim, A. 1998. Característica hematológica de Tambaquí (*Colossoma macropomum*) Cuvier, 1818. (Osteichthyes: Charcidae) en Sistema de Monocultivo Intensivo. I. Serie Eritrocitaria. Revista Brasileira de Biologia 58(2):197-202.

Tavares-Dias, M; Ferreira, JS; Affonso, EG; Ono, EA; Martins, ML. 2011. Toxicity and effects of copper sulfate on parasitic control and hematological response of tambaqui *Colossoma macropomum*. Boletim do Instituto de Pesca 37(4):355-365.

Tocidlowsk, ME; Lewbart, GA; Stoskopf, MK. 1997. Hematologic study of red pacu (*Colossoma brachypomum*). Veterinary Clinical Pathology 26(3):119-125.



ISBN: 978-980-318-356-1

