



UNIVERSIDAD DE ORIENTE
NÚCLEO DE SUCRE
ESCUELA DE CIENCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOANÁLISIS

CARACTERIZACIÓN DE LAS CÉLULAS LEUCOCITARIAS EN JUVENILES DE
CACHAMOTO (*Colossoma macropomum* x *Piaractus brachypomus*) EN
CONDICIONES DE CULTIVO
(Modalidad: Tesis de Grado)

CLAUDYSBEL DEL VALLE HERNÁNDEZ AMUNDARAIN

TRABAJO DE GRADO PRESENTADO COMO REQUISITO PARCIAL PARA
OPTAR AL TÍTULO DE LICENCIADA EN BIOANÁLISIS

CUMANÁ, 2018

CARACTERIZACIÓN DE LAS CÉLULAS LEUCOCITARIAS EN JUVENILES DE
CACHAMOTO (*Colossoma macropomum* x *Piaractus brachypomus*) EN
CONDICIONES DE CULTIVO

APROBADO POR:



Profa. Yanet Antón
Asesora



Profa. Raquel Saizar
Jurado



Profa. América Vargas
Jurado

INDICE GENERAL

DEDICATORIA	i
AGRADECIMIENTOS	ii
LISTA DE FIGURAS.....	iv
RESUMEN	vi
INTRODUCCIÓN	1
METODOLOGÍA	7
Organismos	7
Aclimatación, manejo y mantenimiento	7
Toma de muestras sanguíneas	8
Coloración de frotis sanguíneos	8
Método de coloración de Giemsa (modificado por Antón-Marín, 2014)	8
Coloraciones citoquímicas	9
Ácido peryódico de Schiff (PAS).....	9
Método de tinción con Negro de Sudán B.....	9
Método de coloración de mieloperoxidasa modificada (Salazar-Lugo <i>et al</i> , 2014).	10
Método de coloración con negro amido	11
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	12
Heterófilos del tipo neutrófilos.....	12
Heterófilos del tipo eosinófilos	13
Heterófilos del tipo basófilos.....	14
Células semejantes a los linfocitos del subtipo grande	16
Células monocíticas.....	16
Trombocitos redondos	17
Trombocitos ovalados	18
Características citoquímicas.....	21

Ácido peryódico de Schiff (PAS).....	21
Negro de Sudan B.....	23
Negro amido	26
CONCLUSIONES	30
RECOMENDACIONES.....	32
BIBLIOGRAFÍA	33
APÉNDICES	38
HOJAS DE METADATOS.....	39

DEDICATORIA

A

Mi madre Glorys Milena Amundarain por amarme, y por darme su apoyo incondicional en todo momento, por su paciencia, y sus palabras de aliento en las situaciones más complicadas. GRACIAS MAMI, TE AMO.

Mi papa Omar Hernández por su apoyo, sus oraciones y amor. GRACIAS PAPI, TE AMO.

La memoria de mis abuelos Francisca Isabel Amundarain y Cleto Marcelino González.

Dios, la virgen del valle y a todos mis ángeles en el cielo, Claudia Hernández, Luis Hernández, Luis Amundarain.

Carlos González por sus palabras de apoyo, por estar siempre a mi lado y por el sentimiento que nos une.

Mis amigas Roxibel Lisboa y Concepción Acevedo por su apoyo y compañía durante este camino. Eternamente agradecida.

Sr. Carlos González y Sra. Cruz Urdaneta por recibirme como parte de su familia, y darme apoyo durante todo momento.

Jesús Velásquez “Chuo”, por su amistad y apoyo durante toda mi carrera.

A mis compañeros y amigos que durante este camino estuvieron a mi lado. GRACIAS.

AGRADECIMIENTOS

A

Mi asesora la Dra. Yanet Antón Marín por colaboración, paciencia, orientación, y por siempre brindarme su apoyo y conocimientos, lo cual me sirvió de mucha ayuda para culminar satisfactoriamente este trabajo de investigación.

La Prof. Yaricruz Pineda, por su gran ayuda, disponibilidad y orientación.

La Dra. Raquel Salazar, por sus orientaciones y colaboración.

La Dra. Luz Marina Rojas por su colaboración.

El Laboratorio de Proteínas e Inmunotoxicidad del Postgrado de Biología Aplicada, y al laboratorio de retinas (IIBCA) del Núcleo de Sucre de la Universidad de Oriente.

El Laboratorio de retinas (IBCA) y a la Dra. Luz Marina Rojas por su colaboración.

El Instituto Nacional de Investigación Agrícolas (INIA), sede Cumaná, por la colaboración prestada para la realización de este trabajo de investigación, especialmente a la Dra. Luisa Centeno y al Sr. Osmica Vallenilla.

Mi compañera Olinda Gómez por su ayuda durante la realización de esta investigación.

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Resumen de las características morfológicas halladas en las células leucocitarias del pez híbrido <i>Colossoma macropomum</i> x <i>Piaractus brachypomus</i>	20
Tabla 2. Resumen de las características citoquímicas de las células leucocitarias de <i>Colossoma macropomum</i> x <i>Piaractus brachypomus</i>	29

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. Frotis de *Colossoma macropomum* x *Piaractus brachypomus* (cachamote) mediante la coloración de Giemsa. La flecha señala la célula que indica la forma en la cual se realizaron las mediciones. 11
- Figura 2. Frotis de *Colossoma macropomum* x *Piaractus brachypomus* (cachamote) mediante la coloración de Giemsa. La flecha sólida señala un heterófilo del tipo neutrófilo, la flecha punteada señala un eritrocito. Aumento 100X. 13
- Figura 3. Frotis de *Colossoma macropomum* x *Piaractus brachypomus* (cachamote) mediante la coloración de Giemsa. La flecha señala un ejemplo de heterófilos del tipo eosinófilos. En la imagen se observa los dos tipos de gránulos que se determinaron según las características de coloración. Aumento 100X. 14
- Figura 4. Frotis de *Colossoma macropomum* x *Piaractus brachypomus* (cachamote) mediante la coloración de Giemsa. En la imagen se observa un heterófilo del tipo basófilo con los gránulos característicos de color violeta intenso. Aumento 100X. 15
- Figura 5. Frotis de *Colossoma macropomum* x *Piaractus brachypomus* (cachamote) mediante la coloración de Giemsa. 5A: la flecha señala una célula semejante a los linfocitos del subtipo pequeño. 5B: la flecha señala una célula semejante los linfocitos del subtipo grande. Aumento 100X. 16
- Figura 6. Frotis de *Colossoma macropomum* x *Piaractus brachypomus* (cachamote) mediante la coloración de Giemsa. La flecha señala una célula monocítica. Aumento 100X. 17
- Figura 7. Frotis de *Colossoma macropomum* x *Piaractus brachypomus* (cachamote) mediante la coloración de Giemsa. 7A: la flecha señala un trombocito redondo. 7B: la flecha señala un trombocito ovalado. Aumento 100X. 18
- Figura 8. Frotis de *Colossoma macropomum* x *Piaractus brachypomus* (cachamote) mediante la coloración de Ácido peryódico de Schiff (PAS). 8A: la flecha señala un heterófilo del tipo neutrófilo PAS (+). 8B: la flecha señala un heterófilo del tipo eosinófilo PAS (+). Aumento 100X. 21
- Figura 9. Frotis de *Colossoma macropomum* x *Piaractus brachypomus* (cachamote) mediante la coloración de Ácido peryódico de Schiff (PAS). 9A: la flecha sólida señala una célula monocítica PAS (-), la flecha punteada señala una célula semejante a los linfocitos PAS (-). 9B: la flecha señala un trombocito PAS (-). Aumento 100X. 22
- Figura 10. Frotis de *Colossoma macropomum* x *Piaractus brachypomus* (cachamote) mediante la coloración de Negro de Sudan B. 10A: la flecha señala un heterófilo del tipo neutrófilo Negro de Sudan B (+). 10B: la flecha señala un heterófilo del tipo eosinófilo Negro de Sudan B (+). . 23

- Figura 11. Frotis de *Colossoma macropomum* x *Piaractus brachypomus* (cachamoto) mediante la coloración de Negro de Sudan B. 11A: la flecha señala un heterófilo del tipo basófilo Negro de Sudan B (+). En la figura 11B: la flecha señala una célula monocítica Negro de Sudan B (+) reacción débil. Aumento 100X. 24
- Figura 12. Frotis de *Colossoma macropomum* x *Piaractus brachypomus* (cachamoto) mediante la coloración de Negro de Sudan B. 12A: la flecha señala una célula semejante a los linfocitos Negro de Sudan B (-). 12B: la flecha señala un trombocito alargado Negro de Sudan B (-). Aumento 100X..... 25
- Figura 13. Frotis de *Colossoma macropomum* x *Piaractus brachypomus* (cachamoto) mediante la coloración de mieloperoxidasa. 13A: la flecha sólida señala un heterófilo del tipo neutrófilo mieloperoxidasa (+), la flecha delgada señala los gránulos peroxidasa (+).13B: la flecha sólida señala un heterófilo del tipo eosinófilo mieloperoxidasa (+) reacción débil, la flecha delgada señala los gránulos peroxidasa (+). Aumento 100X. 25
- Figura 14. Frotis de *Colossoma macropomum* x *Piaractus brachypomus* (cachamoto) mediante la coloración de mieloperoxidasa. La flecha señala un trombocito alargado mieloperoxidasa (-). Aumento 100X..... 26
- Figura 15. Frotis de *Colossoma macropomum* x *Piaractus brachypomus* (cachamoto) mediante la coloración de negro amido. 15A: la flecha señala una heterófilo del tipo neutrófilo negro amido (+). 15B: la flecha señala una heterófilo del tipo eosinófilo negro amido (+). Aumento 100X..... 27
- Figura 16. Frotis de *Colossoma macropomum* x *Piaractus brachypomus* (cachamoto) mediante la coloración de negro amido. 16A: la flecha señala una célula monocítica negro amido (+) En la figura 16B: la flecha señala una célula semejante a los linfocitos del subtipo pequeño negro amido (+). Aumento 100X..... 27

RESUMEN

En este trabajo de investigación se presenta el primer estudio sobre caracterización morfológica y citoquímica de los leucocitos en sangre periférica de juveniles del híbrido *Colossoma macropomum* x *Piaractus brachypomus* (cachamote). Se tomaron 30 ejemplares juveniles del híbrido a los cuales se les realizó la extracción de sangre mediante la punción de la vena caudal, la muestra sanguínea extraída se utilizó para realizar la caracterización tanto morfológica como citoquímica de las células leucocitarias del pez. Para establecer las características morfológicas de las células leucocitarias se usó la tinción de Giemsa. Se identificaron seis (6) tipos de células morfológicamente diferentes, las cuales se clasificaron como células heterófilas, adicionalmente, se identificaron células semejantes a los linfocitos, células monocíticas, y trombocitos. El grupo de las células heterófilas se dividió a su vez en tres (3): tipos celulares: células heterófilas del tipo neutrófilos, del tipo eosinófilos, y del tipo basófilos. En términos generales, todas las células descritas concuerdan con las halladas en otros peces teleósteos, sin embargo, se encontraron diferencias morfológicas marcadas con respecto a los heterófilos del tipo eosinófilos, donde se evidenciaron dos tipos de gránulos con características tintoriales diferentes: unos de color naranja intenso (lo cual demuestra su naturaleza ácida), y otros de color púrpura intenso (lo que quiere decir que son de naturaleza básica). Para la caracterización citoquímica se aplicó la técnica de coloración del Ácido peryódico de Schiff, la cual permite la identificación de glucógeno en las células, así mismo, para establecer la presencia de lípidos en las células de interés, se empleó la tinción de Negro de Sudán B, mientras que se aplicó la técnica de coloración de negro amido para comprobar la presencia de proteínas y para determinar la presencia de enzimas se contó con la tinción de la mieloperoxidasa. Con respecto a la presencia de glucógeno, se hallaron positivos los heterófilos del tipo neutrófilos y los del tipo eosinófilos; para la presencia de lípidos, dieron reacción positiva todas las células heterófilas, en la cuanto a la coloración para determinar la presencia de proteínas básicas, todas las células resultaron positivas; así mismo, para la reacción de la mieloperoxidasa, los heterófilos del tipo neutrófilos evidenciaron una reacción claramente positiva, mientras que los del tipo eosinófilo mostraron una reacción débil. Todos estos hallazgos dan evidencia de la naturaleza de las células estudiadas, mostrando que las mismas intervienen en procesos de defensa del pez estudiado, así mismo, la heterogenicidad de las células blancas del pez híbrido, sugiere la necesidad de profundizar en estudios histoquímicos más específicos para poder identificar con más precisión la función de cada una de ellas. El estudio de estas células proporciona nuevos conocimientos que importantes para monitoreos de tipo ambiental en este organismo, lo cual ayudaría a establecer controles sanitarios y asegurar la salud de estos peces en los cultivos, así mismo los hallazgos obtenidos permiten deducir de forma indirecta cuales son los constituyentes celulares del sistema inmune innato del híbrido, sirviendo como estudio base para futuras investigaciones, tanto ambientales como de tipo inmunológicas.

INTRODUCCIÓN

En los peces, tanto en las poblaciones naturales, como en aquellas que están en cautiverio, la hematología reviste suma importancia ya que permite evaluar el estado de salud general de estos organismos. El poder determinar los factores que inciden sobre el bienestar de los peces es prioritario; encontrándose dentro de esos factores la interacción que existe entre los nutrientes y la posible presencia de tóxicos; así como las potenciales alteraciones ocasionadas por dichos tóxicos además de la presencia de agentes patógenos, los cuales están reflejados muchas veces, por algún grado de inmunosupresión y/o alteración de los elementos constituyentes de la sangre (Witeska, 2005; Salazar-Lugo *et al.*, 2012; Alaye-Rahy y Morales-Palacios, 2013).

Dentro de los componentes formes de la sangre de los peces (al igual que en todos los vertebrados), se encuentran los glóbulos rojos, también llamados eritrocitos o hematíes, los cuales son las células sanguíneas más abundantes; luego, y en menor cantidad, se hallan los glóbulos blancos o leucocitos y los trombocitos, considerándose, estos últimos, equivalentes a las plaquetas de los mamíferos. Los glóbulos blancos, son elementos fundamentales del sistema inmune, de allí la importancia de conocer de manera precisa la morfología de estos, así como de los tipos celulares leucocitarios predominantes en los diferentes estadios de desarrollo de los peces, estos factores son de gran utilidad en acuicultura ya que contribuyen a valorar y monitorear el estado de salud de estos organismos, asociados, por supuesto, a las diferentes evaluaciones hematológicas (Valenzuela *et al.*, 2003; Davis *et al.*, 2008; Salazar-Lugo *et al.*, 2012).

En los peces, la clasificación de los leucocitos (al igual que en todos los vertebrados), se ha realizado por criterios morfológicos, utilizando como modelo, los leucocitos de los mamíferos. Es entonces, que se ha tratado de adaptar la clasificación de las células de estos organismos a la clasificación ya establecida de las células blancas de los mamíferos. Esta situación hace, que en general, se distingan cinco tipos: tres de ellos contienen abundantes gránulos citoplasmáticos específicos y son llamados granulocitos neutrófilos, eosinófilos y basófilos, mientras que los otros dos tipos de leucocitos no

presentan (según los criterios que generalmente se utilizan), gránulos citoplasmáticos y son llamados agranulocitos, y comprenden a los linfocitos y monocitos (Sardar *et al.*, 2000; Haugland *et al.*, 2012).

En los peces también se puede encontrar trombocitos, los cuales se han reportado, en algunas especies, que poseen actividad fagocítica e intervienen en los mecanismos hemostáticos, por lo que se consideran equivalentes a las plaquetas (Uribe *et al.*, 2002; Beelen *et al.*, 2003).

Las células llamadas granulocitos o polimorfonucleares (PMN) se caracterizan, como se señaló anteriormente, por presentar gránulos citoplasmáticos, su clasificación y nomenclatura han sido controversiales por la variación que existe entre las diferentes especies y por los intentos de compararlos a los de mamíferos, se distinguen de forma general, tres clases: neutrófilos, eosinófilos y basófilos; los dos primeros son más comunes, mientras que los basófilos son escasos y no se hallan presentes en la mayoría de las especies (Olabuenaga, 2000; Mulero *et al.*, 2008).

Los neutrófilos exhiben una respuesta quimiotáctica con actividad fosfatasa ácida ante patógenos (Katzenback y Belosevic, 2009). Entre sus funciones están la fagocitosis y la actividad microbicida, además de intervenir en la mediación de la respuesta inflamatoria actuando como células presentadoras de antígenos (Cuesta *et al.*, 2006; Litman y Cannon, 2009; Overland *et al.*, 2010), aunque pareciera que ésta es más lenta que en mamíferos (Hine, 1992; Leknes, 2007). Así mismo, se cree que juegan un papel clave en la iniciación y el mantenimiento de la respuesta adaptativa (Hanington *et al.*, 2009).

Los eosinófilos, por su parte, se han descrito como células redondas, con un núcleo a veces bilobulado, el citoplasma presenta gránulos que se tiñen de color rojo-naranja (Correa-Negrete *et al.*, 2009). No hay dudas de su presencia en ciprínidos; sin embargo, en salmónidos, son de aparición rara o ausentes (Ellis, 1977). No obstante, se hallan células eosinófilas en el tejido conectivo, sobre todo en el tracto gastrointestinal, branquias, corazón y piel; posiblemente intervienen en la inflamación y en la defensa

celular mediante desgranulación, En algunas especies de elasmobranquios son abundantes en el intestino, lo cual explicaría su posible función en la inmunidad contra bacterias, así mismo, su elevada (eosinofilia) está asociada a la presencia parasitaria, según las observaciones de Martins *et al.* (2004) en *Leporinus macrocephalus* y Ranzani-Paiva (1998; 1999) en *Colossoma macropomun* y *Piaractus mesopotamicus*.

Los basófilos de peces semejan a los basófilos y mastocitos de los mamíferos, poseen citoplasma basófilo y presentan grandes gránulos, que generalmente, no dejan ver el núcleo, son escasos y raros en sangre periférica en la mayoría de las especies estudiadas (Olabuenaga, 2000).

Entre los agranulocitos se encuentran los linfocitos y los monocitos; los linfocitos son las células implicadas en la inmunidad específica, y en peces son células sensibles a la presencia de contaminantes y a cambios físicos en el ambiente (Salazar-Lugo *et al.*, 2012), son células de tamaño y forma variable, ligeramente redondo, con citoplasma escaso y núcleo grande (Correa-Negrete *et al.*, 2009). Los monocitos son variables tanto en tamaño como en forma, móviles, fagocíticos y más grande que otros leucocitos, presentan tamaño variable entre redondo, ovalado y con una ligera invaginación en forma de riñón, cromatina dispersa, y en algunos casos el citoplasma presenta vacuolas en su interior (Correa-Negrete *et al.*, 2009).

Los trombocitos en algunos casos son equivalentes a las plaquetas de los mamíferos, intervienen en la coagulación, y en algunos estudios se ha descrito que participan en la fagocitosis, presentan diferentes morfologías tal y como han sido descritos en otras especies de peces de agua dulce, las formas predominantes son fusiformes y redondeadas, y por lo general son negativos para todas las tinciones citoquímicas (Salazar-Lugo *et al.*, 2012).

Por otro lado, una de las herramientas más usadas en la caracterización morfológica de las células, es la utilización de la coloración de Giemsa (Garrido *et al.*, 2003). De igual forma, las coloraciones histoquímicas, junto a la utilización de la microscopia óptica,

permiten conocer las características citoquímicas de las células, constituyéndose en elementos indispensables para establecer la presencia de ciertos componentes bioquímicos como lo son el glucógeno, los lípidos, las proteínas y las enzimas; estas moléculas se encuentran en el interior de los leucocitos, y pueden ser reconocidas gracias a la utilización de técnicas histoquímicas adecuadas junto con ensayos funcionales, lo que permite una evaluación más precisa de la distribución espacial y temporal de las células blancas (Petrie-Hanson, 1999).

Dentro de los métodos histoquímicos están la coloración de glucógeno o reacción de PAS (también llamada reacción del ácido peryódico-reactivo de Schiff), con la cual se pueden identificar los neutrófilos y los eosinófilos, ya que colorea de rojo púrpura al glucógeno en el citoplasma de estas células, mientras que en los linfocitos se evidencia una reacción negativa y en los monocitos puede aparecer una reacción poco acentuada, 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 (Prophet *et al.*, 1995).

El método de tinción Negro de Sudán B se utiliza en la demostración histoquímica de gránulos neutrófilos y células mieloides, expresando la presencia de lípidos, incluyendo las grasas neutras y los esteroides, los que quedan teñidos de color marrón (Garrido *et al.*, 2003). Las reservas adecuadas de lípidos son necesarias por los organismos para mediar los efectos del estrés y para servir como almacenadores intermediarios de la energía durante períodos de condiciones ambientales adversas o de falta prolongada de alimentos (Silveira-Coffigny *et al.*, 2005).

Otro método histoquímico es la coloración de la mieloperoxidasa (Kaplow, 1965). Con ésta se logra la diferenciación de los granulocitos del resto de las células frente a un agregado de peróxido de hidrógeno; aquellos organelos que poseen la enzima mieloperoxidasa desprenden oxígeno proveniente del peróxido de hidrógeno y éste oxida la bencidina a un óxido intermedio de color azul oscuro, lo que permite la

visualización de gránulos peroxidasa positivo presentes en el citoplasma celular. Los linfocitos, trombocitos y eritrocitos, presenta una reacción negativa a esta tinción (Conroy, 1998).

Finalmente, el método de coloración de proteínas con negro amido, el cual colorea de azul intenso los lugares donde se encuentran las proteínas básicas (Túnez-Fiñana, 2014).

En Venezuela las especies de peces de mayor relevancia para la piscicultura continental son la “cachama” (*Colossoma macropomum*) y el morocoto (*Piaractus brachypomus*) y más recientemente su híbrido (*Colossoma macropomum* x *Piaractus brachypomus*) conocido como cachamoto (Romero, 2012). El morocoto (*P. brachypomus*) y la cachama (*C. macropomum*) pueden distinguirse a simple vista por el colorido de su cuerpo, el morocoto presenta un color grisáceo a pardo sobre el dorso y los costados, con el abdomen blanquecino salpicado de pequeñas manchas anaranjadas, mientras que la cachama puede presentar dos patrones de coloración: amarillo y negro, con toda la gama de variantes (Poleo *et al.*, 2011).

El híbrido *Colossoma macropomum* x *Piaractus brachypomus*, es un cruce genético entre la especie cachama negra (*C. macropomum*) y el morocoto o cachama blanca (*P. brachypomus*), la cual presenta características fenotípicas muy marcadas de esta última. Cuenta con una alta tasa de crecimiento y con una adecuada alimentación se logra mejorar el rendimiento y la apariencia de la carne, obteniendo una buena presentación del espécimen para la venta, es engordado bajo diferentes densidades de siembra en lagunas de tierras, estanques de concreto y en jaulas flotantes, siendo esta especie cultivada de manera intensiva en los ríos Orinoco y Caroní. Se encuentra en aguas con rangos de temperaturas de 23-30°C; tiene una alimentación omnívora; crecimiento acelerado y sabor agradable, lo que lo hace una alternativa ventajosa tanto para los consumidores como para los cultivadores, se ha desarrollado notablemente mediante la reproducción artificial o inducida, multiplicándose así su comercialización, la cual a

gran escala genera empleos y divisas para el país, además de abastecer de alimento al mercado (López y Anzoátegui, 2013).

Hasta la fecha en Venezuela solo se ha realizado un trabajo donde se efectuó la caracterización morfológica y citoquímica de las células leucocitarias en peces, siendo realizado el mismo en la especie *Colossoma macropomum* (Salazar-Lugo *et al.*, 2012), quienes realizaron la caracterización morfológica y citoquímica de leucocitos en juveniles de cachama negra, al realizar la caracterización morfológica y citoquímica de las células de *Colossoma macropomum* hallaron células blancas tales como: granulocitos tipo I y tipo II, eosinófilos, basófilos, monocitos y linfocitos En el país no se ha realizado estudios donde se caractericen las células blancas de la especie híbrida *Colossoma macropomum* x *Piaractus brachypomus* (cachamoto) ni morfológica ni citoquímicamente.

En base a lo anteriormente expuesto, el objetivo de esta investigación fue evaluar la morfología y realizar la caracterización citoquímica de la especie híbrida *Colossoma macropomum* x *Piaractus brachypomus* (cachamoto) en condiciones de cultivo, con lo que se pretende aportar conocimientos e información básica de la especie, que contribuirá al establecimiento de controles sanitarios adecuados, constituyéndose esto en una herramienta de gran utilidad para evaluar el estado de salud de esta especie, al mismo tiempo que puede establecerse como un medio de vigilancia epidemiológica para monitoreos de tipo ambiental en este organismo, lo cual ayudara a asegurar la salud de estos peces cuando estén en confinamiento, lo que a su vez permitirá asegurar cultivos sanos; así mismo, se constituirá en un estudio línea base para futuras investigaciones sobre el tema.

METODOLOGÍA

Organismos

Se utilizaron para este estudio 30 ejemplares juveniles del híbrido *Colossoma macropomum* x *Piaractus brachypomus*, los cuales fueron facilitados por el Instituto Nacional de Investigación Agrícolas (INIA), procedentes de cultivadores de la localidad de Cariaco y Casanay, estado Sucre. Con medidas promedios de $23,60 \pm 6,36$ cm y con pesos de $281,60 \pm 64,62$ g.

Los organismos fueron capturados en tanques de cautiverio utilizando la técnica de pesca conocida como chinchorrazo, para la cual se empleó una malla de 0,5 cm de diámetro aproximadamente. Una vez colectados, los peces fueron transportados hasta el Laboratorio de Proteínas e Inmunotoxicidad del Postgrado en Biología Aplicada de la Universidad de Oriente, Núcleo de Sucre.

Aclimatación, manejo y mantenimiento

Los peces fueron ubicados en bolsas de polietileno con oxígeno, debidamente selladas y transportadas al laboratorio anteriormente citado. Las bolsas plásticas con los organismos en su interior se colocaron en 3 acuarios de vidrio, de medidas 60 x 30 cm y con capacidad para 60 L de agua, por un tiempo aproximado de 30 minutos para lograr su aclimatación; estos acuarios fueron preparados 24 horas antes con agua aireada y libre de cloro. Luego de transcurrido ese tiempo, los peces fueron liberados poco a poco de las bolsas y colocados en el agua de los acuarios, los cuales se cubrieron con bolsas negras con la finalidad de minimizar el estrés de los organismos (Blanco, 2004). Se les realizó la limpieza diariamente, eliminando los desechos por succión con mangueras, así como el recambio del 60-80 % del agua, manteniéndose ésta oxigenada mediante un sistema de aireación, el cual estaba compuesto por aireadores y piedras difusoras de oxígeno, de igual manera, el agua de los acuarios se mantuvo a una temperatura entre 24-25°C. El periodo de aclimatación de los peces fue 48 horas.

Toma de muestras sanguíneas

Las muestras se tomaron mediante punción de la vena caudal a nivel del arco hemal, siguiendo la técnica descrita por Blanco (2004) y García (2004), utilizando jeringas desechables de 3 ml con agujas de 21 G (0,80 mm) x 38 mm (1 1/2"); previamente impregnadas con heparina sódica comercial (1000 UI/ml).

Coloración de frotis sanguíneos

Los extendidos (3 frotis para cada técnica de coloración), se realizaron utilizando el método del extendido según Lynch *et al.* (1977), las láminas se observaron al microscopio óptico con objetivo de 100X. Los elementos celulares se identificaron utilizando criterios morfológicos definidos por Correa-Negrete *et al.* (2009) para el blanquillo *Sorubim cuspidus*, por Salazar-Lugo *et al.* (2012) y por Antón-Marín (2014) para *C. macropomum*.

Método de coloración de Giemsa (modificado por Antón-Marín, 2014)

Se utilizó la coloración de Giemsa para realizar la descripción, reconocimiento y determinación parcial de las características morfológicas de las células blancas.

Se fijó el extendido en metanol absoluto durante 2 segundos y se dejó secar rápidamente al aire. Posteriormente se cubrió el extendido con colorante de Giemsa puro y se dejó actuar durante 3 minutos. A continuación, se le agregó igual cantidad de agua destilada tamponada (pH 6,4), luego se procedió a soplar suavemente con una pipeta para mezclar el colorante y el agua hasta que apareciera una película verde metálica sobre la superficie de la muestra; enseguida se lavó bien con agua corriente y se secó al aire en posición vertical, posteriormente se observó microscópicamente con objetivo de 100X.

Las coloraciones de tipo Romanowsky actúan mediante la oxidación rápida de azul de metileno, el cual es básico y por ende es atraído por los ácidos nucleicos de la célula; en cambio, la eosina es un colorante ácido y es atraído por la alcalinidad del citoplasma celular (Perera-Sasiaín, 2003).

Coloraciones citoquímicas

Estas coloraciones se usaron para detectar la presencia de glucógeno (Ácido peryódico de Schiff o PAS), lípidos (Método de tinción con negro de Sudán B), mieloperoxidasa (Método de coloración de mieloperoxidasa modificada) y proteínas en las células (Método de coloración con negro amido), lo cual permitió la caracterización citoquímica de las células blancas.

Ácido peryódico de Schiff (PAS)

Esta reacción se fundamenta en la tinción del glucógeno en el citoplasma de la célula, oxidando los tejidos mediante el ácido peryódico para incrementar el número de grupos carbonilos (aldehídos o cetonas), posteriormente el reactivo de Schiff reacciona con dos grupos aldehídos continuos dando lugar a un color rojo púrpura. Los neutrófilos y eosinófilos reaccionan en todas sus etapas de desarrollo y con mayor intensidad en su madurez, mientras que los linfocitos son negativos y en los monocitos se puede evidenciar una reacción poco acentuada (Prophet *et al.*, 1995).

Durante el procedimiento, el extendido se fijó con metanol por 10 minutos, luego se lavó brevemente con agua destilada, se cubrió con una solución de ácido peryódico al 0.5 % por 10 minutos. Nuevamente se lavó con agua destilada de forma rápida, se dejó secar y se le añadió el reactivo de Schiff, dejándolo actuar por 30 minutos; después de este tiempo, se pasó por agua corriente tres veces, y se coloreo con una solución de azul de metileno al 1 % por 5 minutos, subsecuentemente se lavó hasta que saliera todo el colorante, se dejó secar al aire para luego observar al microscopio con objetivo de inmersión (100X).

Método de tinción con Negro de Sudán B

Esta coloración se utilizó en la demostración histoquímica de la presencia de lípidos en los gránulos presentes en las células estudiadas, tiene preferencia por los lípidos,

incluyendo las grasas neutras y los esteroides, como por ejemplo las vainas mielínicas de las fibras nerviosas que están compuestas por lípidos, los cuales quedan teñidos de color marrón, quedando en evidencia las células que tengan en su interior gránulos cargados de lípidos (Garrido *et al.*, 2003).

El extendido se colocó durante 5 segundos en la solución fijadora (etanol absoluto-formol a una proporción 3:1); luego se lavó rápidamente con agua destilada y se dejó secar al aire. Se tiñó durante 30 minutos con la solución colorante Negro de Sudán B (Sigma-Aldrich), escurriéndose y lavándose seguidamente con etanol puro. Finalmente se efectuó una coloración de contraste con el colorante de Giemsa de la forma anteriormente descrita, se esperó que seicara al aire y se procedió a observar al microscopio con objetivo de inmersión (100X).

Método de coloración de mieloperoxidasa modificada (Salazar-Lugo *et al.*, 2014)

A través de esta coloración se logró la diferenciación de las células que presentan gránulos de las que no lo presentan. Frente al agregado de peróxido de hidrógeno, aquellos organelos que poseen la enzima desprenden oxígeno del peróxido de hidrógeno y éste oxida la bencidina a un óxido intermedio de color azul oscuro, lo que permite la visualización de gránulos peroxidasa positivo presentes en el citoplasma celular. Diferencia a las células que poseen gránulos con la enzima en su interior, de las células que no poseen gránulos (Kaplou, 1965; Conroy, 1998).

Los extendidos de sangre recién preparados, fueron procesados de la siguiente manera: se cubrió el frotis con una solución de sulfato de cobre pentahidratado al 0,5 % durante 20 segundos, al cabo del cual, se eliminó el exceso de solución mediante escurrido. Paso seguido, se agregó una solución con base de bencidina al 0,1 % y peróxido de hidrógeno al 3 % (recién filtrado) y se dejó actuar por 20 minutos, cumplido este periodo de tiempo se eliminó de la misma forma en la cual se descartó la solución anterior, para finalmente colorear el extendido con safranina al 1 % durante 4 minutos, seguidamente se lavó hasta que en el agua no se observara más colorante, posteriormente se dejó secar para luego observar al microscopio con objetivo de inmersión (100X) (Conroy, 1998).

Método de coloración con negro amido

Es una coloración acida que se fija en aquellas estructuras donde se encuentran las proteínas básicas, coloreándose de azul intenso (Túnez-Fiñana, 2014).

Se cubrió el extendido por 3 minutos con el reactivo puro (Sigma-Amido black staining solution, 2X concentrado), lapso en el que se produce la fijación. Se agregó igual cantidad de agua destilada, soplando suavemente con una pipeta durante 5 minutos para luego lavar con agua corriente hasta eliminar totalmente el colorante, se dejó secar para su posterior observación al microscopio con objetivo de inmersión (100X).

Finalmente, los análisis microscópicos de las muestras de sangre coloreadas se hicieron a partir de micrografías tomadas con un fotomicroscopio marca Zeiss, modelo FL 40. El análisis de las micrografías tomadas de las láminas fue realizado con el programa Adobe Photo Deluxe. Al momento de tomarse las fotos, se les realizaron mediciones a las células (figura1).

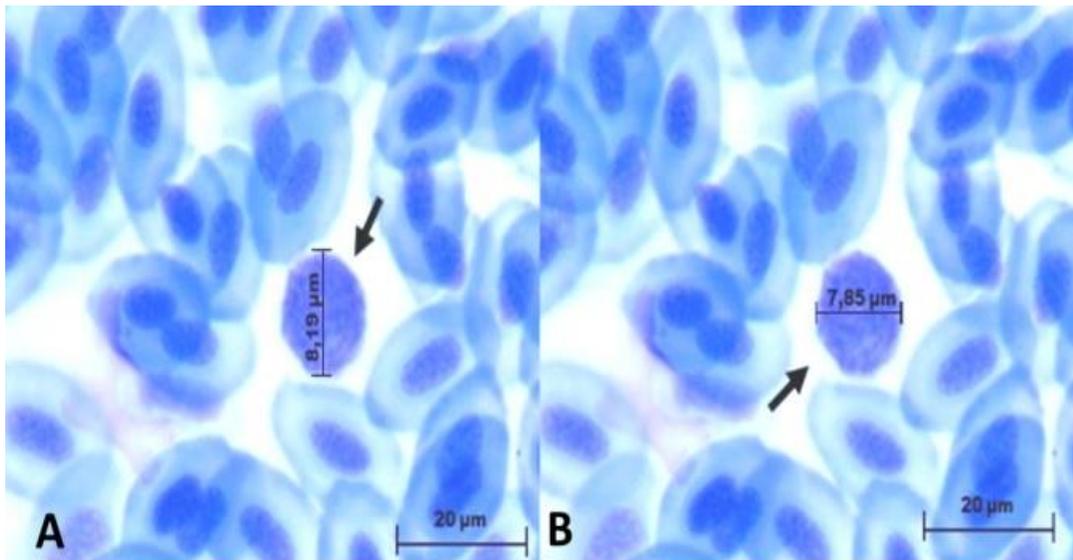


Figura 1. Micrografías de células sanguíneas coloreadas con negro amido. La flecha señala la célula que indica la forma en la cual se realizaron las mediciones.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En este estudio, la descripción de la morfología de los leucocitos permitió identificar seis (6) tipos de células, las cuales se clasificaron como células heterófilas: en este grupo se ubicaron los del tipo neutrófilos, del tipo eosinófilos y del tipo basófilos; adicionalmente, se identificaron células semejantes a los linfocitos, células monocíticas y trombocitos.

Células heterófilas

Este grupo de células se clasificaron como: heterófilos del tipo neutrófilos, heterófilos del tipo eosinófilos y del tipo basófilos.

Heterófilos del tipo neutrófilos

Estas células se observaron redondas, de 6-12 μm de diámetro. Poseen un núcleo de color azul intenso, generalmente excéntrico de forma redondeada, y en ocasiones arriñonado. La cromatina por lo general se observa compacta y a veces se presenta en grumos. Mientras que el citoplasma se advirtió de color rosa pálido, presentando granulaciones finas, algunas de color azul claro (figura 2).

La morfología de este tipo de células es similar a la descrita para *Salminus maxillosus* por Veiga et al. (2000) y para *C. macropomum* por Romero (2012). Por otra parte, estos resultados en cuanto a forma y tamaño del núcleo difieren a los presentados en *S. affinis* por Atencio-García et al. (2007), *Porichthys porosissimus* por Galeano et al. (2010) y en *Rhamdia quelem* por Gianceselli et al. (2005), en dichos trabajos, los autores reportaron núcleos bilobulados, tamaños más grandes y en algunas ocasiones presencias de vacuolas en el citoplasma.

Heterófilos del tipo eosinófilos

Los heterófilos del tipo eosinófilos se observaron cómo células redondas, de entre 5-12 μm de diámetro. Con núcleo excéntrico, ovalado, en ocasiones redondo, de color azul claro, el cual presenta cromatina compacta y en algunas ocasiones laxa. Con respecto al citoplasma, este se observó de color rosa pálido, evidenciándose tintorialmente dos tipos de granulaciones: un tipo que se observó más abundante, de forma y tamaños variados, refringentes y de naturaleza acidófila, ya que se colorearon de naranja intenso y otro tipo de gránulo que se observó en menor cantidad, de forma y tamaños variados y de naturaleza basófilica, debido a que tomaron color púrpura intenso (figura 3).

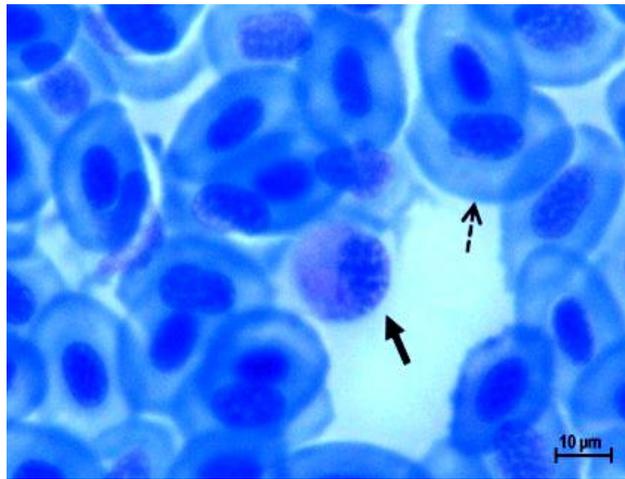


Figura 2. Frotis de *Colossoma macropomum* x *Piaractus brachypomus* (cachamote) mediante la coloración de Giemsa. La flecha sólida señala un heterófilo del tipo neutrófilo, la flecha punteada señala un eritrocito. Aumento 100X.

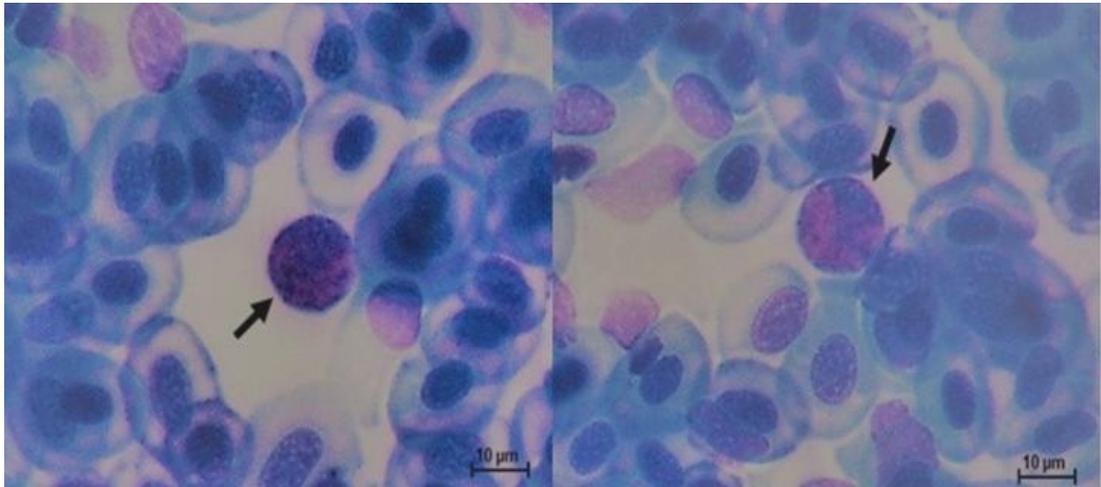


Figura mediante la coloración de Giemsa. La flecha señala un ejemplo de heterófilos del tipo eosinófilos. En la imagen se observa los dos tipos de gránulos que se determinaron según las características de coloración. Aumento 100X.

Estos resultados se diferencian de los hallados para *C. macropomum* por Salazar-Lugo *et al.* (2012), para *S. cuspidus* por Correa-Negrete *et al.* (2009), *S. maxillosus* por Veiga *et al.* (2000) y para *Schroederichthys chilensis* por Valenzuela *et al.* (2003), quienes solo reportaron, tintorialmente, un tipo de gránulo.

Heterófilos del tipo basófilos

Este tipo de células se observaron de forma redonda, de tamaño entre 6-8 µm de diámetro. El núcleo presenta forma redondeada de color azul intenso. El citoplasma, por su parte se observó de color azul claro, apenas visible, con abundantes gránulos de color violeta intenso, de tamaño irregular, distribuidos de forma variable, tanto en el citoplasma como en el núcleo (figura 4).

Resultados similares se encontraron para *Oreochromis niloticus* por Hahn-Von-Hessberg *et al.* (2011), *S. cuspidus*, por Correa-Negrete *et al.* (2009), y *Ginglymostoma cirratum*, por Vergara y Mantilla, (1996); mientras que, por otro lado, otros autores, no reportaron la presencia de células basófilicas, tal como en *Dicentrarchus labrax* (Esteban *et al.*, 2000) y en *Acipenser sinensis* (Zexia *et al.*, 2006).

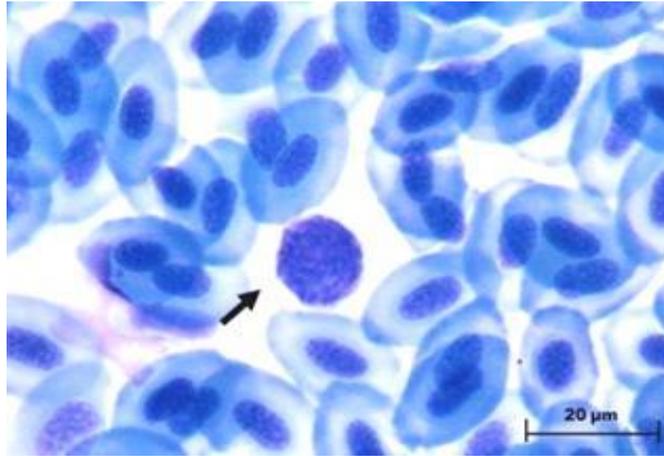


Figura 4. Frotis de *Colossoma macropomum* x *Piaractus brachypomus* (cachamoto) mediante la coloración de Giemsa. En la imagen se observa un heterófilo del tipo basófilo con los gránulos característicos de color violeta intenso. Aumento 100X. Células semejantes a los linfocitos (*lymphocyte-like* por su denominación en inglés).

Se observaron, de acuerdo a su forma, dos subtipos: los pequeños y los grandes (figura 6).

Células semejantes a los linfocitos del subtipo pequeño

Estas células tienen un tamaño entre 3-5 μm de diámetro. El núcleo se observa grande, con cromatina compacta, de color azul intenso, redondo y de borde irregular, ocupando casi toda la superficie de la célula. Presentan citoplasma escaso, poco visible, de color azul claro, sin ningún tipo de granulaciones (figura 5A).

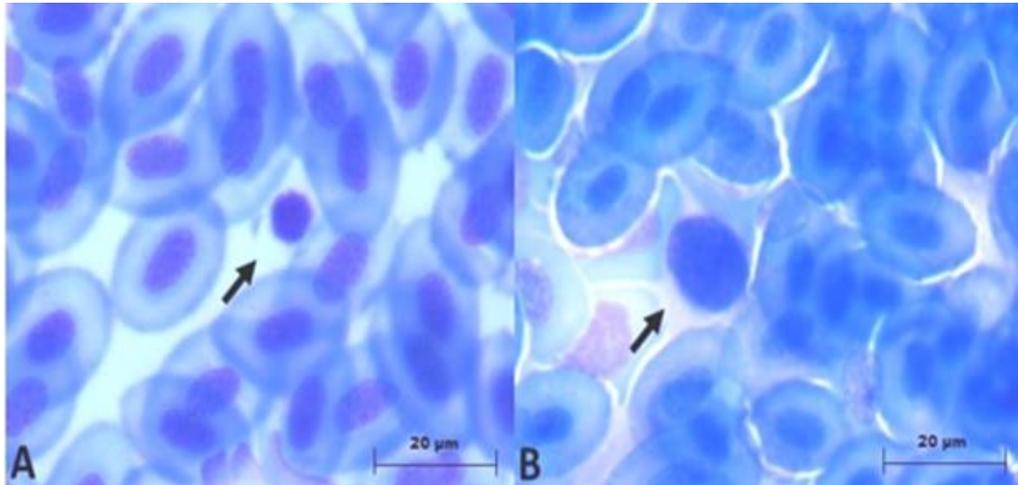


Figura 5. Frotis de *Colossoma macropomum* x *Piaractus brachypomus* (cacnamoto) mediante la coloración de Giemsa. 5A: la flecha señala una célula semejante a los linfocitos del subtipo pequeño. 5B: la flecha señala una célula semejante los linfocitos del subtipo grande. Aumento 100X.

Células semejantes a los linfocitos del subtipo grande

Las células semejantes a los linfocitos del subtipo grande por se observaron de forma redonda, y presentan un tamaño entre 6-8 μm de diámetro. El núcleo, de cromatina compacta, abarca casi toda la célula, es generalmente redondo, de color azul, coloreándose más intensamente que el de los linfocitos pequeños. El citoplasma, se presenta escaso, de bordes irregulares, de color azul ligeramente más intenso que el de los linfocitos pequeños, no se observaron granulaciones (figura 5B).

Estos resultados concuerdan con los reportados para *Astronotus ocellatus* por Iannacone *et al.* (2006), para *S. cuspidus* por Correa-Negrete *et al.* (2009), así como para la tortuga *Phrynops hilarii* por Pitol *et al.* (2007).

Células monocíticas

Estas células se observaron de forma redondeada, grandes, de tamaño entre 8-10 μm de diámetro. El núcleo se observó de forma variable, redonda u ovalada y en algunas

ocasiones con ligera forma arriñonada; de color azul claro, con la cromatina dispersa. El citoplasma se observó azul grisáceo, con la presencia de vacuolas en su interior, se observaron granulaciones escasas muy finas (figura 6).

Resultados semejantes a estos fueron reportados en el pez cebra (Crowhurst *et al.*, 2002), en *S. chilensis* (Valenzuela *et al.*, 2003), en *P. porosissimus* (Galeano *et al.*, 2010) y en *Hoplosternum littorale* (Tavares-Díaz y Marques, 2005).

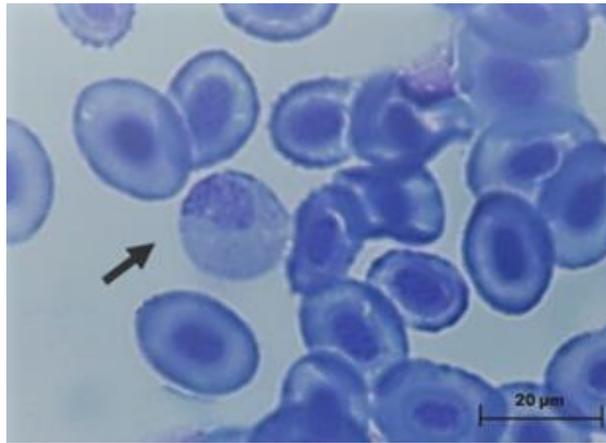


Figura 6. Frotis de *Colossoma macropomum* x *Piaractus brachypomus* (cachamoto) mediante la coloración de Giemsa. La flecha señala una célula monocítica. Aumento 100X.

Trombocitos

Se observaron de acuerdo a su forma, dos subtipos: los de forma redondeada y los de forma ovalada (figura 7).

Trombocitos redondos

Los Trombocitos redondos tienen un tamaño que oscila entre 3-5 μm de diámetro. El núcleo es ligeramente redondo y en algunas ocasiones ovalado, de color azul intenso. Con respecto al citoplasma, este es escaso, de color azul-grisáceo, poco visible y no presenta granulaciones y con vacuolas escasas (figura 7A).

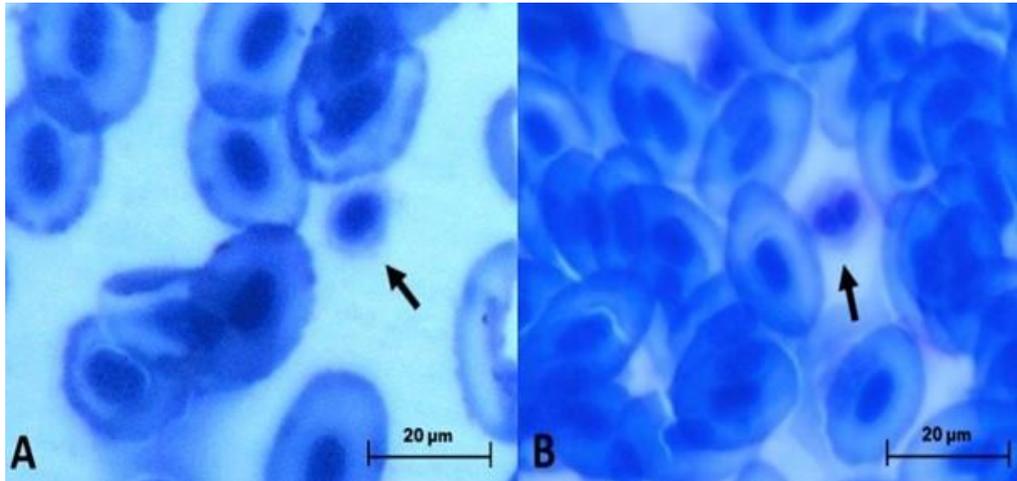


Figura 7. Frotis de *Colossoma macropomum* x *Piaractus brachypomus* (cachamote) mediante la coloración de Giemsa. 7A: la flecha señala un trombocito redondo. 7B: la flecha señala un trombocito ovalado. Aumento 100X.

Trombocitos ovalados

Los trombocitos ovalados presentan un tamaño más grande que los de forma redondeada, con un diámetro que oscila entre 4-6 μm . El núcleo de color azul intenso, presenta formas variadas, que van desde arriñonado, ovalado sin muesca, ovalado, presentando en su zona media una especie de muesca, lo que lo hace más delgado en esa región. Con respecto al citoplasma, este se presentó escaso, de tonalidad azul grisácea, sin ningún tipo de granulaciones y con vacuolas escasas (figura 7B).

Los trombocitos, morfológicamente coinciden con los descritos por Valenzuela *et al.* (2003) para *S. chilensis*, por Salazar-Lugo *et al.* (2012) para *C. macropomum* y por Alaye-Rahy y Morales-Palacios, (2013) para *Chirostoma estor*, igualmente estos resultados difieren con los reportados por Iannacone *et al.* (2006) para *A. ocellatus*, quienes no observaron la presencia de trombocitos.

Estos seis (6) tipos de células concuerdan con las descritas en otros estudios para peces teleósteos, sin embargo, presentaron algunas variaciones importantes con respecto a la

morfología, como es el caso de los heterófilos del tipo eosinófilos, donde se observaron distintos tipos de gránulos, con formas variables y distintas coloraciones.

En los heterófilos del tipo eosinófilos, se pudo observar un tipo de gránulo el cual se coloreo de naranja intenso y otro tipo de gránulo que adquirió coloración purpura intenso.

Este hallazgo es significativo ya que en otros estudios de peces teleósteos solo se reportaron granulaciones que también tenían formas variadas, pero que solo se teñían de naranja intenso (Veiga *et al.*, 2000; Valenzuela *et al.*, 2003; Correa-Negrete *et al.*, 2009; Salazar-Lugo *et al.*, 2012), lo cual hace presumir, que muy posiblemente estos gránulos sean lisosomas ricos en peroxidasas y otras enzimas hidrolíticas que contribuyen a que la célula cumpla con su función celular (Vergara y Mantilla, 1996).

La identificación de estos gránulos de naturaleza básica, en este tipo de células, permite deducir que los mismos están constituidos por moléculas de naturaleza básica, muy probablemente entre ellas, estén la proteína básica mayor de los eosinófilos (MBP por sus siglas en inglés), la colagenasa, la lisozima, entre otras (Veiga *et al.*, 2000; Kotomi *et al.*, 2001).

Con relación a la variedad de formas y tamaño de estos gránulos, tanto en lo heterófilos del tipo neutrófilos, como los del tipo eosinófilos, está sustentado por el hecho, que a través de microscopia electrónica realizadas en células de *C. macropomun* (Antón-Marín, 2014) se evidencio que ambos tipos de células tienen una variedad de formas y tamaños en los gránulos tal y como se describen en este trabajo.

Son células cuya función en peces no es completamente clara, sin embargo, se relacionan con la estimulación antigénica, la inmunidad contra bacterias e infecciones parasitarias (Valenzuela *et al.*, 2003). Debido a la presencia de este tipo de gránulos, los cuales, a su vez contienen enzimas y proteínas de diversa naturaleza, pudiera pensarse

que estas células, además de tener las funciones anteriormente señaladas, muy probablemente intervienen de forma activa en el proceso de fagocitosis (Rojas y Arce, 2004).

La tabla 1 contiene un resumen de las características morfológicas, determinadas mediante la coloración de Giemsa, en las células leucocitarias del pez híbrido *Colossoma macropomum* x *Piaractus brachypomus*.

Tabla 1. Resumen de las características morfológicas halladas en las células leucocitarias del pez híbrido *Colossoma macropomum* x *Piaractus brachypomus*.

CÉLULA	FORMA	CITOPLASMA	NÚCLEO
Heterófilos del tipo neutrófilos	Redonda	Abundante, rosa pálido, con granulaciones de color azul claro	Redondo, arriñonado, excéntrico, de color azul intenso
Heterófilos del tipo eosinófilos	Redonda	Rosa pálido, con granulaciones acidófilas y basófilas	Ovalado y Redondo, excéntrico, de color azul claro
Heterófilos del tipo basófilos	Redonda	Azul claro, con gránulos basófilos que ocupan todo el citoplasma	Redondeada, excéntrico, de color azul claro
Trombocitos	Ovalada Redonda	Escaso, sin granulaciones, de color azul-grisáceo	Redondo, ovalado sin muesca, redondo, ovalado con muesca, de color azul intenso
Células semejantes a los linfocitos	Redondo	Escaso, sin granulaciones, azul claro	Redondo, borde irregular, de color azul intenso
Células monocíticas	Redonda	Azul grisáceo, presencia de vacuolas y de granulaciones finas escasas	Ovalado, redondo, arriñonado, de color azul claro

Características citoquímicas

Ácido peryódico de Schiff (PAS)

Este método resulto positivo para los heterófilos del tipo neutrófilos (figura 8A) y los del tipo eosinófilos (figura 8B). En los mismos, se puede observar en el citoplasma de la célula, la presencia de una coloración naranja-rojizo intenso, siendo más intensa, en las células del tipo eosinófilos; mientras que resulto negativa para los heterófilos del tipo basófilos, células semejantes a los linfocitos, células monocíticas (figura 9A) y trombocitos (figura 9B), evidenciándose mediante la observación de una coloración rosa pálido en el citoplasma de las células.

Estos resultados concuerdan con los hallados en *C. macropomum* (Romero, 2012), donde se encontró reacción positiva para PAS en los heterófilos del tipo neutrófilos y del tipo eosinófilos, así como para *O. niloticus* (Kotomi *et al.*, 2001) donde solo resultaron positivos los heterófilos del tipo neutrófilos, al igual que en *H. littorale* (Tavares-Días y Marques, 2005); sin embargo difieren de los resultados obtenidos en *O. aureus* (Silveira-Coffigny *et al.*, 2005) donde resultaron positivas las células monocíticas.

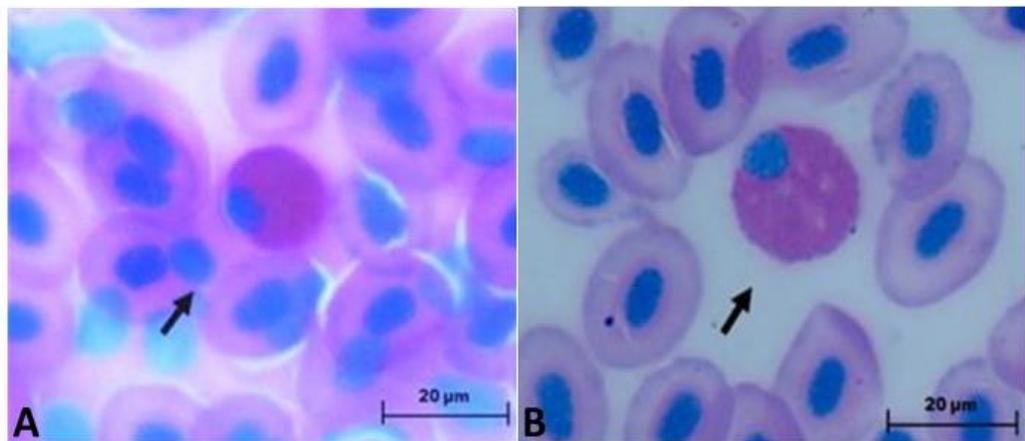


Figura
mediante la coloración de Acido peryódico de Schiff (PAS). 8A: la flecha señala un heterófilo del tipo neutrófilo PAS (+). 8B: la flecha señala un heterófilo del tipo eosinófilo PAS (+). Aumento 100X.

En otros vertebrados también se han hallado semejanzas en los resultados obtenidos resultando positivo los heterófilos del tipo neutrófilos y del tipo eosinófilos en el anfibio *Rhinella fernandezae* (Zenklusen *et al.*, 2011) y en el reptil *Caiman crocodilus* (Velásquez-Bolívar *et al.*, 2017).

La coloración de reacción de Schiff, se utiliza para evidenciar la presencia de glucógeno en los gránulos de las células. El hecho que exista glucógeno en estas células está íntimamente ligado al abastecimiento de energía para la realización de actividades que utilicen energía de rápido acceso, como por ejemplo la fagocitosis (Kotomi *et al.*, 2001). Según la lógica de este razonamiento, este hallazgo implicaría que los heterófilos del tipo neutrófilos y los del tipo eosinófilos son células con una reserva de glucógeno elevada (lo cual se refleja por la intensidad del color que adquieren), lo que hace suponer que son células que tienen una alta demanda energética, en consecuencia, ambas células muy posiblemente, están implicadas en los procesos de fagocitosis (Rubio-Godoy, 2011), observaciones que permiten sustentar la afirmación realizada anteriormente con respecto a la función que cumplen los heterófilos del tipo eosinófilos, donde se plantea la posibilidad de que estas células realicen el proceso de fagocitosis de forma activa (Rojas y Arce, 2004).

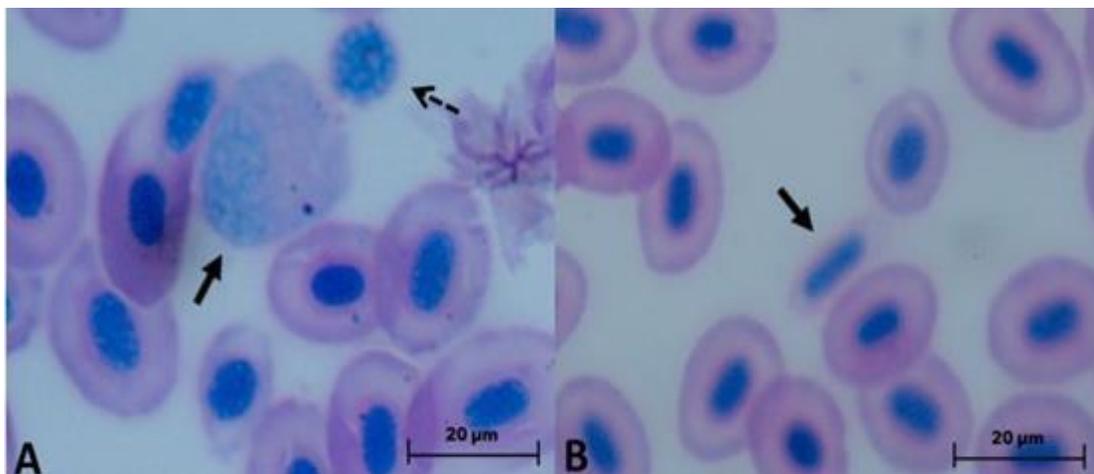


Figura 9. Coloración de Acido peryodico de Schiff (PAS). 9A: la flecha solida senala una célula monocítica PAS (-), la flecha punteada señala una célula semejante a los linfocitos PAS (-). 9B: la flecha señala un trombocito PAS (-). Aumento 100X.

Negro de Sudan B

La positividad de esta reacción se demuestra por la presencia de gránulos de color marrón en el citoplasma. Para esta tinción se observó una reacción positiva en los heterófilos del tipo neutrófilos (figura 10A), del tipo eosinófilos (figura 10B) y del tipo basófilos (figura 11A) y una reacción débil en las células monocíticas (figura 11B), mientras que se consideró una reacción negativa en las células semejantes a los linfocitos (figura 12A) y trombocitos (figura 12B).

Estos resultados coinciden con los obtenidos para *C macropomum* por Romero (2012), *O. aureus* por Silveira-Coffigny *et al.* (2005) y para *O. niloticus* (Kotomi *et al.*, 2001) quienes también reportaron positivos a los heterófilos del tipo neutrófilos, sin embargo, difieren con Romero (2012) y Silveira-Coffigny *et al.* (2005), con respecto a que ellos no reportaron como positivos, a los heterófilos del tipo basófilos y en este trabajo si fue evidente este hallazgo.

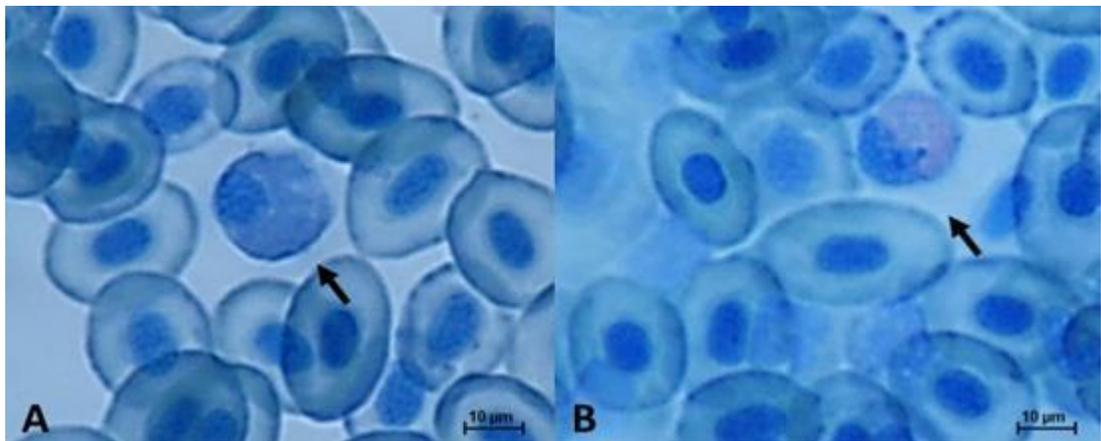


Figura 10. Trofos de *Crassostrea macropomum* y *Paraceras brachypomus* (caenozoos), mediante la coloración de Negro de Sudan B. 10A: la flecha señala un heterófilo del tipo neutrófilo Negro de Sudan B (+). 10B: la flecha señala un heterófilo del tipo eosinófilo Negro de Sudan B (+).

La coloración de Negro Sudan B se usa para evidenciar la presencia de lípidos en las células, muy posiblemente las células que mostraron reacción positiva, utilizan reservas

de lípidos, grasas neutras y esteroides para periodos de falta de alimento o condiciones ambientales adversas.

Las reservas adecuadas de lípidos son necesarias por los organismos para mediar los efectos del estrés, ya que los lípidos sirven como almacenadores intermediarios de energía durante períodos prolongados de falta de alimentos, probablemente las células que presentaron reacción positiva contengan mayores reservas de lípidos, quizás debido, a entre otras cosas, a los diferentes constituyentes de los gránulos y de las membranas celulares de estas (Kotomi *et al.*, 2001; Silveira-Coffigny *et al.*, 2005).

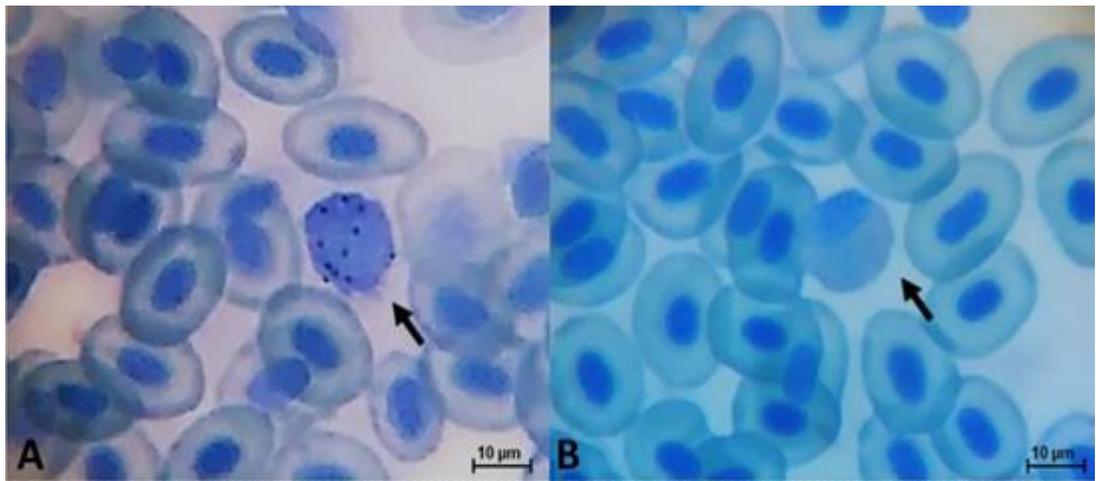


Figura 11. Fiebas de *Colossoma macropomum* A *Parachanna braichipomus* (caeránote), mediante la coloración de Negro de Sudan B. 11A: la flecha señala un heterófilo del tipo basófilo Negro de Sudan B (+). En la figura 11B: la flecha señala una célula monocítica Negro de Sudan B (+) reacción débil. Aumento 100X.

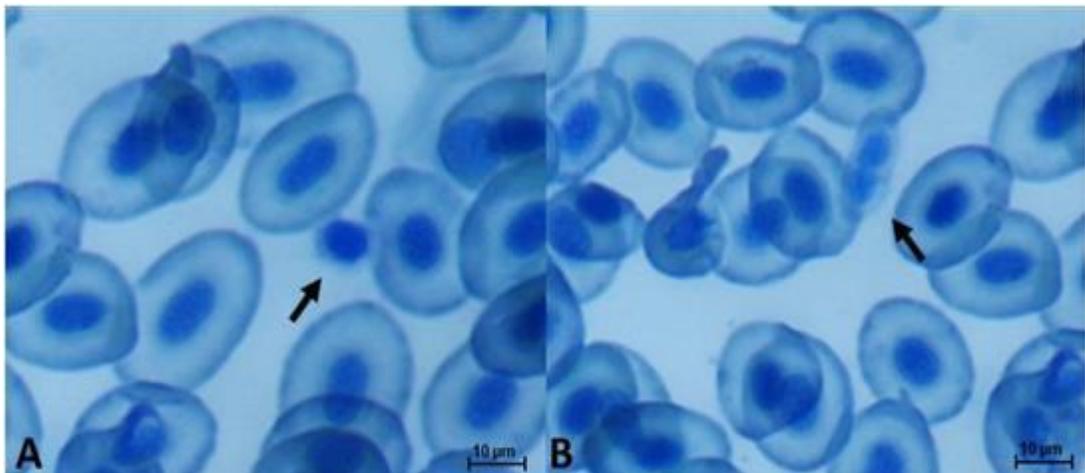


Figura 12. Frotis de *Colossoma macropomum* x *Piaractus brachypomus* (cachamote) mediante la coloración de Negro de Sudan B. 12A: la flecha señala una célula semejante a los linfocitos Negro de Sudan B (-). 12B: la flecha señala un trombocito alargado Negro de Sudan B (-). Aumento 100X.

Mieloperoxidasa

La presencia de mieloperoxidasa en los gránulos de las células se evidencia por la manifestación de un color azul oscuro en el citoplasma. En esta investigación se observaron resultados positivos para los granulocitos heterófilos del tipo neutrófilos (figura 13A) y débil para los del tipo eosinófilos (figura 13B), mientras que la reacción fue negativa para las células semejantes a los linfocitos, las células monocíticas y trombocitos (figura 14), con respecto a las células del tipo basófilos, no se puede afirmar si son negativas o positivas ya que no pudieron ser observadas con esta coloración.

Estos resultados son semejantes a los reportados en *O. niloticus* (Kotomi *et al.*, 2001) y para *C. macropomum* (Salazar-Lugo *et al.*, 2012), en cuanto a que reportaron positivos los heterófilos del tipo neutrófilos; sin embargo, no concuerdan con respecto a la positividad de los del tipo eosinófilos, ya que, para ellos, esta coloración resulto negativa.

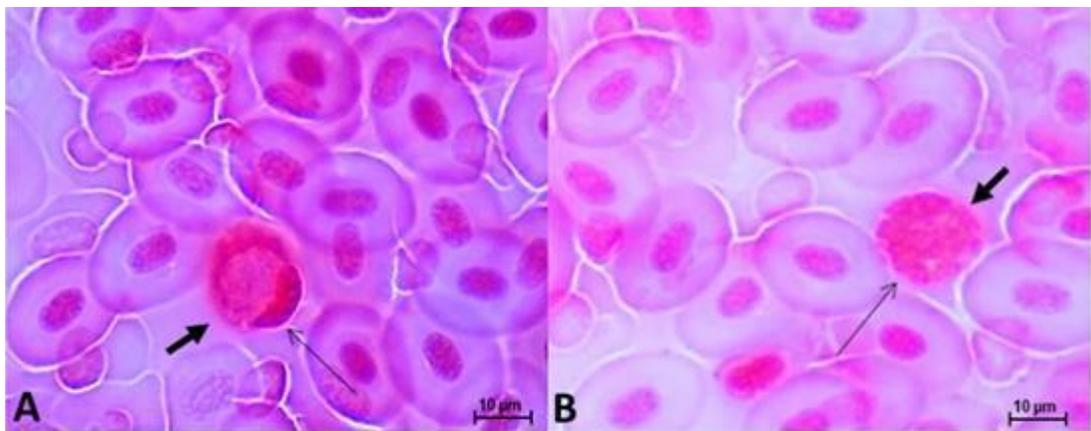


Figura 13. Frotis de *Colossoma macropomum* x *Piaractus brachypomus* (cachamote) mediante la coloración de mieloperoxidasa. 13A: la flecha sólida señala un heterófilo del tipo neutrófilo mieloperoxidasa (+), la flecha delgada señala los gránulos peroxidasa (+). 13B: la flecha sólida señala un heterófilo del tipo eosinófilo mieloperoxidasa (+) reacción débil, la flecha delgada señala los gránulos peroxidasa (+). Aumento 100X.

Los resultados obtenidos indican que estas células tienen funciones bactericidas y esto se explica por el hecho de que la enzima peroxidasa es producida en aquellas células que muestren función fagocítica (Kotomi *et al.*, 2001). El que ambas células presenten reacción positiva a la mieloperoxidasa, indica indudablemente que participan en el proceso de fagocitosis (Veiga *et al.*, 2000).

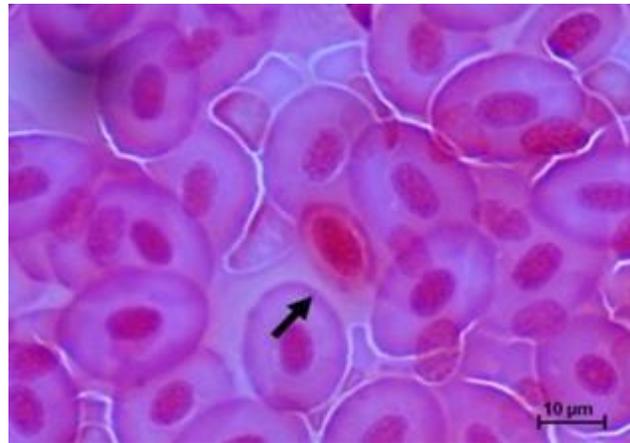


Figura 14. Frotis de *Collossoma macropomum* x *Piaractus brachypomus* (cachamote) mediante la coloración de mieloperoxidasa. La flecha señala un trombocito alargado mieloperoxidasa (-). Aumento 100X.

Negro amido

La reacción positiva para esta coloración viene dada por la presencia de un color azul oscuro intenso en el interior de la célula. Se observó positividad para los seis (6) tipos de células reportados en este trabajo (figura 15 y 16).

Los resultados obtenidos concuerdan con Veiga *et al.* (2000) en *S. maxillosus* quien reporto positividad para los heterófilos del tipo neutrófilos y del tipo eosinófilos, mientras que Romero (2012) en *C. macropomum* solo reporto positividad para los heterófilos del tipo neutrófilos. Sin embargo, con respecto a los mismos autores presento diferencias ya que en esta investigación todas las células resultaron positivas.

Estos resultados vienen a demostrar la naturaleza química de este tipo de células, ya que la presencia de proteínas de naturaleza básica en las mismas es un indicativo indirecto de su carácter citotóxico y por consiguiente, su posible papel como participantes en la resistencia contra la invasión hacia microorganismos (Salazar-Lugo *et al.*, 2012).

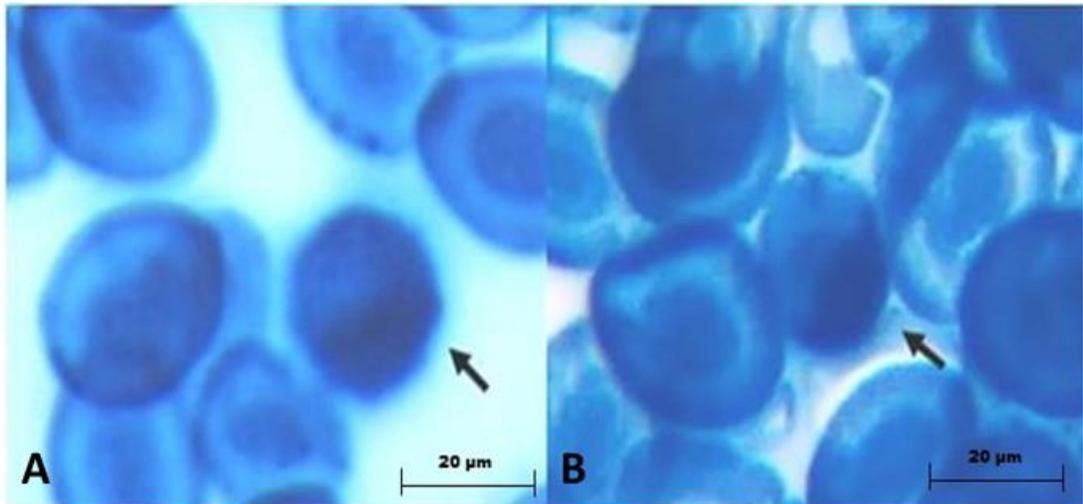


Figura mediante la coloración de negro amido. 15A: la flecha señala una heterófilo del tipo neutrófilo negro amido (+). 15B: la flecha señala una heterófilo del tipo eosinófilo negro amido (+). Aumento 100X.

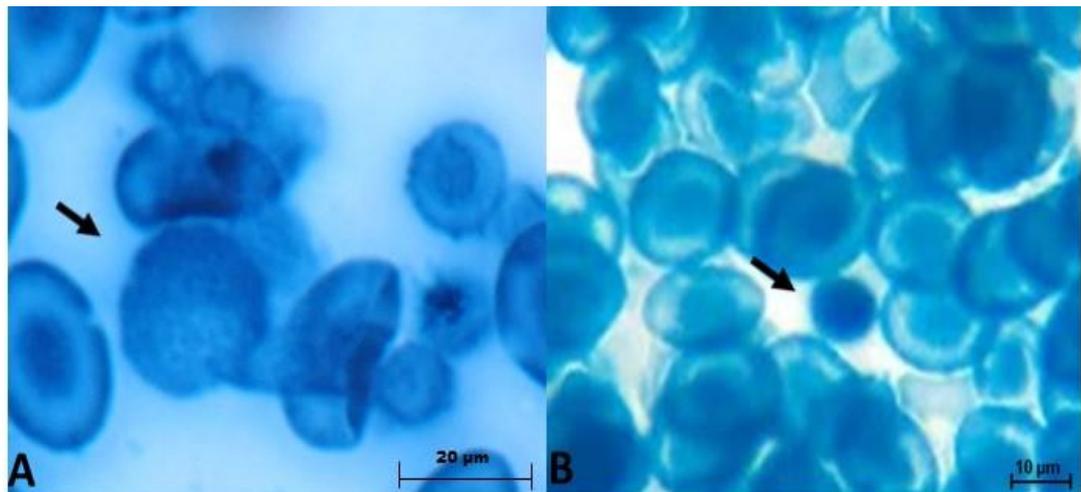


Figura mediante la coloración de negro amido. 16A: la flecha señala una célula monocítica negro amido (+) En la figura 16B: la flecha señala una célula semejante a los linfocitos del subtipo pequeño negro amido (+). Aumento 100X.

La citotoxicidad celular, a su vez, está mediada por las proteínas catiónicas las cuales están incluidas en los gránulos citoplasmáticos. Ejemplo de esto lo constituyen, muy probablemente, los heterófilos del tipo eosinófilos. En mamíferos, cuando estas células son reclutadas hacia los sitios donde ocurren procesos inflamatorios, con frecuencia, sufren desgranulación, liberando una gama de moléculas citotóxicas catiónicas, que incluyen a la proteína básica principal (MBP) y la peroxidasa de eosinófilos (EPX), así mismo existe producción de numerosas citoquinas, quimiocinas y factores de crecimiento (Davoine y Lacy, 2014).

Los eosinófilos contienen gránulos secretores únicos, conocidos como gránulos cristaloides. Estos son llamados así, debido a que están conformados por núcleos cristalinos (los cuales son característicos de este tipo de células); que son electrón denso cuando son observados en imágenes tomadas mediante microscopía electrónica de transmisión. El núcleo cristalino consiste en MBP altamente concentrada y cristalizada, una proteína catiónica que tiene efectos citotóxicos en los tejidos cuando se libera. Además del núcleo cristalino rico en MBP, los gránulos cristaloides contienen una matriz que está enriquecida, con al menos, otras tres proteínas catiónicas, que son EPX, proteína catiónica de eosinófilos (ECP) y neurotoxina derivada de eosinófilos (EDN). La fase líquida de la matriz también contiene muchas otras enzimas y proteínas, incluidas citoquinas, quimiocinas y factores de crecimiento (Saffari *et al.*, 2014).

Citoquímicamente, en las células blancas del híbrido *Collossoma macropomum* x *Piaractus brachypomus* se evidenció la presencia de glucógeno en los heterófilos del tipo neutrófilos, y en los del tipo eosinófilos; mientras que se determinó la presencia de mieloperoxidasa en heterófilos del tipo neutrófilos y en los del tipo eosinófilos se observó una reacción débil; con respecto a los lípidos, resultaron positivos los heterófilos del tipo neutrófilos, los del tipo eosinófilos, los del tipo basófilos, y una reacción débil en las células monocíticas; finalmente para la coloración de negro amido resultaron positivas todas las células, hallándose la presencia de proteínas básicas.

Las características morfológicas y citoquímicas observadas en esta investigación resultaron similares en algunos aspectos, a las encontradas en otros estudios sobre peces óseos, sin embargo, existen diferencias bien marcadas (que hasta ahora no han sido reportadas en otras investigaciones) con respecto a los hallazgos encontrados en este estudio sobre las células blancas; como por ejemplo, las determinadas para los heterófilos del tipo eosinófilos, en el cual se pudo determinar la presencia de gránulos que se tiñen de dos colores diferentes, lo cual marca una distinción con respecto a los reportados con otros peces teleósteos, donde solo se han descrito gránulos del tipo acidófilos.

La tabla 2 muestra un resumen de las características citoquímicas realizadas a las células leucocitarias del pez híbrido *Colossoma macropomum* x *Piaractus brachypomus*.

Tabla 2. Resumen de las características citoquímicas de las células leucocitarias de *Colossoma macropomum* x *Piaractus brachypomus*

Célula/Tinción	PAS	Negro de Sudan B	Mieloperoxidasa	Negro amido
Heterófilos del tipo neutrófilos	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo
Heterófilos del tipo eosinófilos	Positivo	Positivo	Reacción Débil	Positivo
Heterófilos del tipo basófilos	Negativo	Positivo	Negativo	Positivo
Trombocitos	Negativo	Negativo	Negativo	Positivo
Células semejantes a los linfocitos	Negativo	Negativo	Negativo	Positivo
Células monocíticas	Negativo	Reacción débil	Negativo	Positivo

Las características morfológicas de las células blancas presentes en la sangre del híbrido *Colossoma macropomum* x *Piaractus brachypomus*, concuerdan, en algunos aspectos, con las características celulares descritas para otros peces teleósteos, aunque con algunas diferencias determinantes en algunas células, tal como el caso de los heterófilos del tipo eosinófilo. Por otra parte, la capacidad de estudiar estas células proporciona nuevos conocimientos, los cuales son importantes para monitoreos de tipo ambiental en este tipo de organismos, lo cual ayudaría a establecer un control sanitario para asegurar la salud de estos peces en los cultivos, así mismo los hallazgos obtenidos permiten deducir de forma indirecta cuales son los constituyentes celulares del sistema inmune innato, sirviendo como un importante estudio base para futuras investigaciones

CONCLUSIONES

Se describen seis (6) tipos celulares, las cuales muestran algunas semejanzas tintoriales a las halladas en otros peces, aunque con ciertas particularidades con relación a la forma, tamaño y tipos de gránulos, así como en la forma del núcleo.

Todas las formas celulares leucocitarias halladas en sangre periférica en la especie híbrida estudiada, son claramente diferenciables con la coloración de Giemsa.

Los heterófilos del tipo eosinófilos, presentaron particularidades tintoriales diferentes a las reportadas en una de las especies parentales (*Colossoma macropomum*), lo que a su vez permite su fácil diferenciación morfológica.

Los heterófilos del tipo neutrófilos y los del tipo eosinófilos contienen glucógeno, lo cual refleja que tienen una alta demanda energética por lo que muy probablemente participen en procesos como la fagocitosis.

El hecho que las células heterófilas del tipo neutrófilos, del tipo eosinófilos y del tipo basófilos tengan una reacción Negro Sudan B positiva es indicativo que contienen una cantidad de lípidos apreciables, los cuales son muy posiblemente utilizados como reserva energética para enfrentar periodos ambientales o situaciones adversas.

La reacción positiva de los heterófilos del tipo neutrófilos y los del tipo eosinófilos a la coloración de la mieloperoxidasa, indica que estas células contienen peroxidasas, siendo factible que intervengan en procesos de defensa de la inmunidad innata.

Los seis (6) tipos de células reportados en este trabajo contienen proteínas de naturaleza básica, lo que pudiera significar que estas células participan en la resistencia contra la invasión de los microorganismos.

La heterogenicidad de las células blancas del pez híbrido estudiado, sugiere la necesidad de profundizar en estudios histoquímicos más específicos para poder identificar con más precisión la función de cada leucocito.

RECOMENDACIONES

Realizar estudios complementarios para una mejor caracterización celular de las células leucocitarias en *Colossoma macropomum* x *Piaractus brachypomus* a través de microscopía electrónica.

Efectuar comparaciones y estudios de las células blancas entre la especie *Colossoma macropomum* x *Piaractus brachypomus* “cachamoto” y la especie *Piaractus brachypomus* “morocoto”, ya que hasta ahora no se han realizado estudios de este tipo en *P. brachypomus*.

Implementar otras pruebas de naturaleza histoquímicas tales como: azul de bromofenol, tinción de fosfatasa alcalina granulocitaria, tinción de fosfatasa ácida, entre otras, para una caracterización más completa de las células blancas del híbrido estudiado.

BIBLIOGRAFÍA

Alaye-Rahy, N. y Morales-Palacios, J. 2013. Parámetros hematológicos y células sanguíneas de organismos juveniles del pescado blanco (*Chirostoma estor*) cultivados en Pátzcuaro, Michoacán, México. *Hidrobiológica*, 23(3):340-347.

Antón-Marín, Y. 2014. El Sistema inmune innato del pez dulceacuícola *Colossoma macropomum* (Cuvier, 1818) como modelo para estudios de inmunotoxicidad. Tesis de doctorado. Universidad de Oriente. Cumaná.

Atencio-Garcia, V.; Genes, F.; Madariaga, D. y Pardo, S. 2007. Hematology and Blood Chemistry of Juveniles Rubio (*Salminus affinis* Pisces: Characidae) Captured in the River Sinú. *Acta Biol. Colomb.*, 12:27-40.

Beelen, R.; Boyd, B.; Garavello, J.; Pavanelli, G. y Ainsworth, A. 2003. A citomethical, light and electron microscopic study of the peripheral blood leucocytes of hibrid

surubim catfish (*Pseudoplatystoma corruscans* x *Pseudoplatystoma fasciatum*). *Comp Clin Panth.*, 12:61-68.

Blanco, J. 2004. Parámetros hematológicos e inmunológicos de la cachama *Colossoma macropomum* (Curvier, 1818) expuesto a cloruro de cadmio. Trabajo de grado. Departamento de Bioanálisis. Universidad de Oriente. Cumaná.

Conroy, D. 1988. Manual de métodos y técnicas de laboratorio de uso común en la hematología pisciaria. Maracay (Venezuela). Pharma. Fish., pp. 25.

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

Crowhurst, M.; Layton, J. y Lieschke, G. 2002. Caracterización morfológica y citoquímica de leucocitos. *Developmental biology of zebrafish myeloid cells. Int. J. Dev. Biol.*, 46:483-492.

Cuesta, A.; Esteban, M. y Meseguer, J. 2006. Cloning, distribution and up-regulation of the teleost fish MHC class II alpha suggests a role for granulocytes as antigen-presenting cells. *Mol. Immunol.*, 43:1275-1285.

Davis, A.; Maney, D. y Maerz, J. 2008. The use of leukocyte profiles to measure stress in vertebrates: a review for ecologists. *Functional Ecology.*, 22:760-772.

Davoine, F. y Lacy, P. 2014. Eosinophil cytokines, chemokines, and growth factors: emerging roles in immunity. *Front. Immunol.*, 10: 389-570.

Ellis, A. 1977. The leucocytes of fish: A review. *J. Fish. Biol.*, 11:435-491.

Esteban, M.; Muñoz, J. y Meseguer, J. 2000. Blood cells of sea bass (*Dicentrarchus labrax*). Flow cytometric and microscopic studies. *The Anatomical Record*, 258:80-89.

Galeano, N.; Prat, M.; Guagliardo, S.; Schwerdt, C. y Tanzola, R. 2010. Características hematológicas de *porichthys porosissimus* (pisces: batrachoidiformes) en el estuario de bahía blanca, argentina. *Analecta Vet.*, 30(1):5-11.

García, N. 2004. Efecto de concentraciones subletales de cloruro de cobre sobre las respuestas hematológicas, inmunológicas y perfil de proteínas séricas en *Colossoma macropomum* (Curvier, 1818). Trabajo de grado. Departamento de Bioanálisis. Universidad de Oriente. Cumaná.

Garrido, G.; Correjo, M. y Salinas, E. 2003. Manual de colorantes para laboratorios de ciencias biológicas. Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM). México.

Gianeselli, M.; Vanotti, M.; Hernández, D. y Domitrovic, H. 2005. Caracterización morfológica de Leucocitos de *Rhamdia Quelen*. Facultad de Ciencias Veterinarias. Universidad Nacional del Nordeste (UNNE). Argentina.

- Hahn-Von-Hessberg, C.; Grajales-Quintero, A.; Gutiérrez-Jaramillo, A. 2011. Parámetros hematológicos de Tilapia nilótica (*Oreochromis niloticus*, Linnaeus 1757) con peso entre 250 g y 350 g, en el Centro Experimental Piscícola de la Universidad de Caldas. *Vet. Zootec.*, 5(1): 47-61.
- Hanington, P.; Hitchen, S.; Beamish, L. y Belosevic, M. 2009. Macrophage colony stimulating factor (CSF-1) is a central growth factor of goldfish macrophages. *Fish. Shellfish. Immunol.*, 26:1-9.
- Haugland, G.; Jordal, A. y Wergeland, H. 2012. Characterization of small, mononuclear blood cells from salmon having high phagocytic capacity and ability to differentiate into dendritic like cells. *PLOS ONE* 7(11): e49260. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0049260>.
- Hine, P. 1992. The granulocytes of fish. *Fish. Shellfish. Immunol.*, 2:79-88.
- Iannacone, J.; Falcon, W. y Vargas, R. 2006. Paramentros hematológicos del Acauraguazú *astronotus ocellatus* (Agassiz,1831) (cichlidae: perciformes). Laboratorio de Ecofisiología Animal. Universidad Nacional Federico Villareal. Lima.
- Kaplow, L. 1965. Simplified myeloperoxidase stain using benzidine dihydricchloride. *Blood.*, 25:215-219.
- Katzenback, B.A y Belosevic. M. 2009. Isolation and functional characterization of neutrophil-like cells, from goldfish (*carassius auratus l*) kidney. *Dev Comp Immunol.*, 33(4):601-11.
- Kotomi, I.; Imoto, M.; Da silva, W. y Reiko, E. 2001. Cytochemical aspects of the peripheral blood cells of *Oreochromis (tilapia) niloticus*. (Linnaeus, 1758) (cichlidae, Teleostei) - Parte II. *Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.* 38(6):273-277.
- Leknes, I. 2007. [Eosinophilic granule cells and endocytic cells in intestinal wall of pearl gouramy \(Anabantidae: Teleostei\)](#). *Fish. Shellfish. Immunol.*, 23(4):897-900.
- Litman, G. y Cannon, J. 2009. Immunology: Immunity's ancient arms. *Nature.*, 459: 784-786.
- López, P. y Anzoátegui, D. 2013. Engorde de la cachama (*Colossoma macropomum*, Cuvier, 1816) cultivada en un sistema de recirculación de agua. *Zootecnia Trop.*, 31(4):271-277.
- Lynch, M.; Rápale, S.; Mellor, L. y Spare, P. 1977. Análisis clínicos. Segunda edición. Nueva editorial Interamericana, S.A. de C.V. México, D.F.
- Martins, M.; Tavares-Días, R.; Fujimoto, E., Onaka, E. y Nomura, D. 2004. Haematological alterations of *Leporinus macrocephalus* (Osteichthyes: Anostomidae) naturally infected by *Goezia leporini* (Nematoda: Anisakidae) in fishpond. *Rev. SciELO Br.*, 56(5):640-646.

- Mulero, I.; Sepulcre, P.; Roca, F.; Meseguer, J.; García-Ayala, A. y Mulero, V. 2008. Characterization of macrophages from the bony fish gilthead seabream using an antibody against the macrophage colony-stimulating factor receptor. *Dev. Comp. Immunol.*, 32(10):1151-1159.
- Olabuenaga, S. 2000. Fish immune system. *Gayana Concepción*, 64(2):205-215.
- Overland, H.; Pettersen, E.; Ronneseth, A. y Wergeland, H. 2010. Phagocytosis by B-cells and neutrophils in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) and Atlantic cod (*Gadus morhua* L.). *Fish. Shellfish. Immunol.*, 28:193-204.
- Perea-Sasiaín, J. 2003. Cien años del colorante de Giemsa. *Biomédica*, 23:5-18.
- Petrie-Hanson., L. 1999. Differential cytochemical staining characteristics of channel catfish leukocytes identify cell populations in lymphoid organs. College of Veterinary Medicine, Mississippi State University, *Vet. Immunol. Immunopathol.*, 73:129-144.
- Pitol, D.; Mardegan, J.; Caetano, F. y Orive, L. 2007. Caracterización morfológica de leucocitos circulantes en la sangre de la tortuga (*Phrynops hilarii*). *Int. J. Morphol.*, 25(4):677-682.
- Poleo, G.; Aranbarrio, J.; Mendoza, L. y Romero, O. 2011. Cultivo de cachama blanca en altas densidades y en dos sistemas cerrados. *Pescq. Agropec. Bras.*, 46:429-437.
- Prophet, E.; Millis, J.; Arrington, L. y Sobón, M. 1995. *Métodos Histotecnológicos*. Instituto de Patología de las Fuerzas Armadas de los Estados Unidos de América (AFIP).
- Ranzani-Paiva, M.; Salles, F.; Eiras, J.; Eiras, A.; Ishikawa, C. y Alexandrino, A. 1998/1999. Análisis hematológico de curimatá (*Prochilodus scrofa*), pacú (*Piaractus mesopotamicus*) y tambaqui (*Colossoma macropomum*) das estações de piscicultura do Instituto de Pesca, estado de São Paulo. *Bol. Inst. Pesca*, 25:77-83.
- Rojas, O y Arce, P. 2004. Fagocitosis: mecanismo y consecuencias segunda parte. Departamento de Inmunología. Instituto Politécnico Nacional. México.
- Rubio-Godoy, M. 2010. Inmunología de los peces óseos. *Rev. Mex. Cienc. Pecu.*, 1(1): 47-57.
- Romero, Z. 2012. Caracterización morfológica y citoquímica de las células inmunocompetentes de hígado, riñón y sangre del pez *Colossoma macropomum* (Cuvier, 1818). Tesis de pregrado. Departamento de Bioanálisis. Universidad de Oriente. Cumaná.
- Saffari, H, Hoffman, L, Peterson, K., Fang, J., Leiferman, K. y Pease, L. 2014. Electron microscopy elucidates eosinophil degranulation patterns in patients with eosinophilic esophagitis. [J. Allergy Clin Immunol.](#), 133(6):1728-1734.

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

Salazar-Lugo, R.; Centeno, L. y Antón-Marín. 2014. Manual de técnicas para evaluación del estado de salud de peces en cultivo. En prensa.

Sardar, M.; Khan, M.; Alam, M. y Rashid, M. 2000. Cell types in the peripheral blood of waking catfish *Clarias batrachus* (Lin.). *Bangladesh. Fish. Res.*, 4(2):157-164.

Silveira-Coffigny, R.; Cruz, Y.; Martinez, M. y Ascencio, F. 2005. Características morfológicas y citoquímicas de las células de la sangre periférica de *Oreochromis aureus* S. cichlidae. *Revista Electrónica de Veterinaria REDVET*. <<http://www.veterinaria.org/revistas/redvet/n101005.html>>.

Tavares-Diaz, M y Marques, J. 2005. Peripheral blood cells of the armored catfish *hoplosternum littorale hancock*, 1828: a morphological and cytochemical study. *Braz. J. Morphol. Sci.*, 22(4):215-220.

Túnez-Fiñana, I. 2014. Electroforesis en papel de proteínas séricas. Departamento de Bioquímica y Biología molecular. Universidad de Córdoba. Colombia.

Uribe, M.; Pérez, R.; Estrada, E.; Romero, V. y Torres, M. 2002. Atlas de histología de vertebrados. Universidad Nacional Autónoma de México. México.

Valenzuela, A.; Oyarsun, C. y Silva, V. 2003. Células sanguíneas de *Schroederichthys chilensis* (Guichenot, 1848) (Elasmobranchii, Scyliorhinidae) la serie blanca. *Gayana Concepción*, 67(1):130-136.

Veiga, M.; Egami, M.; Ranzani-Paiva, M. y Rodrigues, E. 2000. Aspectos morfológicos y citoquímicos de las células sanguíneas de *Salminus maxillosus* (Valenciennes, 1840) (Characiformes, Characidae). *Rev. Chil. Anat.*, 18(2):245-250.

Velásquez-Bolívar, E.; Rossini, M. y Barrios, E. 2017. Caracterización histológica e histoquímica de la médula ósea de la baba (*Caiman Crocodilus*) en hábitat silvestre. *Saber*, 29:139-151.

Vergara, E y Mantilla, A. 1996. Morfología comparativa de las células sanguíneas del tiburón nodriza *Gynglimostoma cirratum* (Bonnaterre, 1788) con diversos peces. *Biología marina*. Universidad Jorge Tadeo Lozano. Colombia.

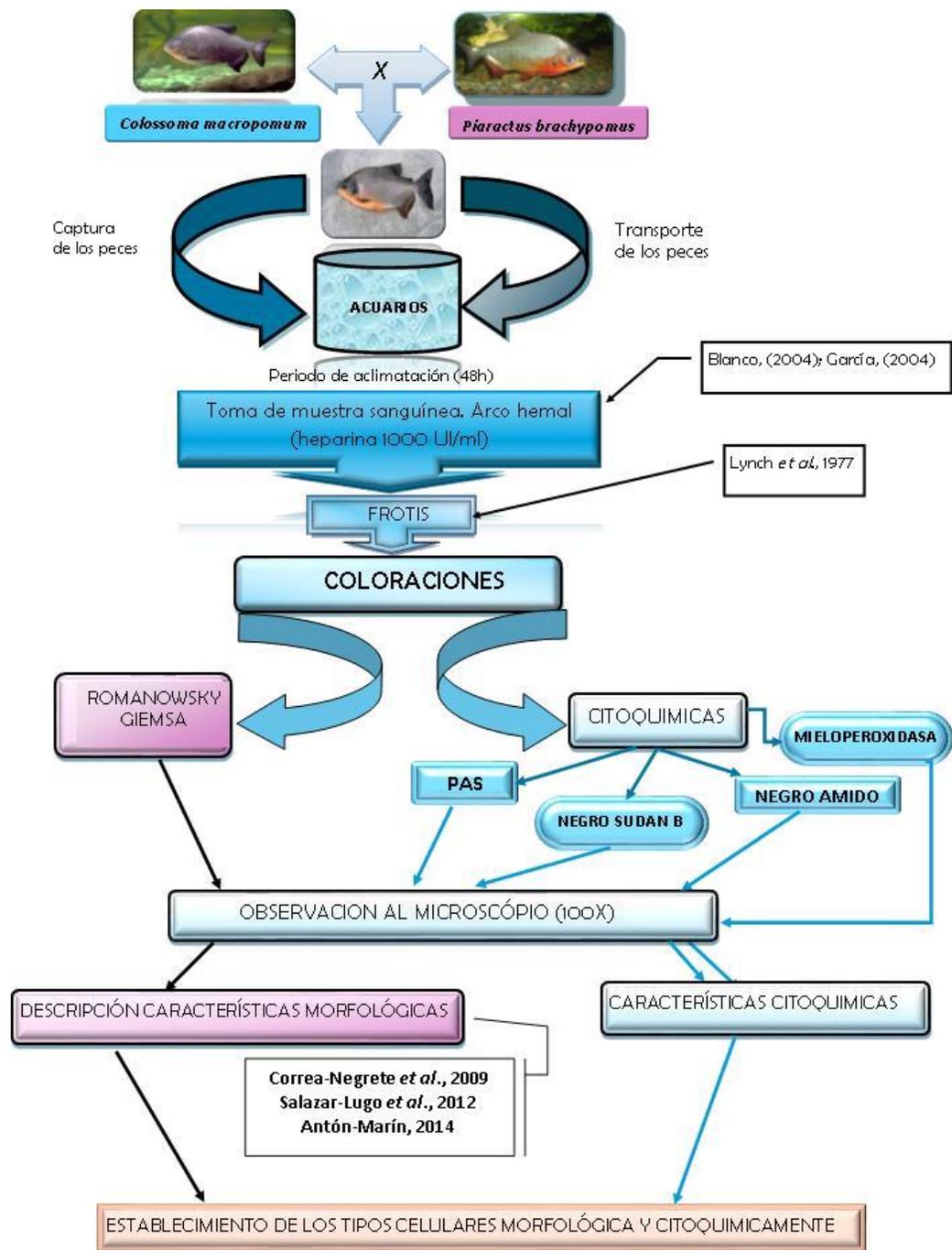
Witeska, M. 2005. Stress in fish: hematological and immunological effects of heavy metals. *Eletron. J. Ichthyol.*, 1:35-41.

Zenklusen, M.; Lajmanovich, R.; Attademo, A.; Peltzer, P.; Junges, S.; Fiorenza-Biancucci, G. y Bassó, A. 2011. Hematología y citoquímica de las células sanguíneas de *Rhinella fernandezae* (Anura: Bufonidae) en Espinal y Delta-Islands del río Paraná, Argentina. *Rev. Biol. Trop.*, 59(1):17-28.

Zexia, G.; Weimin, W.; Yi, Y.; Abas, K.; Dapeng, L.; Guiwei, Z. y Diana, J. 2007. Morphological studies of peripheral blood cells of the chinese sturgeon, *Acipenser sinensis*. *Fish. Physiol. Biochem.*, 33:213-222.

APÉNDICES

APÉNDICE 1. Resumen esquematizado de la metodología utilizada en el estudio.



Título	CARACTERIZACIÓN DE LAS CÉLULAS LEUCOCITARIAS EN JUVENILES DE CACHAMOTO (<i>Colossoma macropomum</i> x <i>Piaractus brachypomus</i>) EN CONDICIONES DE CULTIVO
---------------	---

Subtítulo	
------------------	--

Autor(es)

Apellidos y Nombres	Código CVLAC / e-mail	
Hernández Amundarain, Claudysbel Del Valle	CVLAC	19.897.106
	e-mail	Claudydelvalle@gmail.com
	e-mail	

Palabras o frases claves:

Células leucocitarias, Morfología, citoquímica, cachamoto
--

Hoja de Metadatos para Tesis y Trabajos de Ascenso – 2/6

Líneas y sublíneas de investigación:

Área	Subárea
Ciencias de la salud	Bioanálisis

Resumen (abstract):

En este trabajo de investigación se presenta el primer estudio sobre caracterización morfológica y citoquímica de los leucocitos en sangre periférica de juveniles del híbrido *Colossoma macropomum* x *Piaractus brachypomus* (cachamoto). Se tomaron 30 ejemplares juveniles del híbrido a los cuales se les realizó la extracción de sangre mediante la punción de la vena caudal, la muestra sanguínea extraída se utilizó para realizar la caracterización tanto morfológica como citoquímica de las células

leucocitarias del pez. Para establecer las características morfológicas de las células leucocitarias se usó la tinción de Giemsa. Se identificaron seis (6) tipos de células morfológicamente diferentes, las cuales se clasificaron como células heterófilas, adicionalmente, se identificaron células semejantes a los linfocitos, células monocíticas, y trombocitos. El grupo de las células heterófilas se dividió a su vez en tres (3): tipos celulares: células heterófilas del tipo neutrófilos, del tipo eosinófilos, y del tipo basófilos. En términos generales, todas las células descritas concuerdan con las halladas en otros peces teleósteos, sin embargo, se encontraron diferencias morfológicas marcadas con respecto a los heterófilos del tipo eosinófilos, donde se evidenciaron dos tipos de gránulos con características tintoriales diferentes: unos de color naranja intenso (lo cual demuestra su naturaleza ácida), y otros de color púrpura intenso (lo que quiere decir que son de naturaleza básica). Para la caracterización citoquímica se aplicó la técnica de coloración del Ácido peryódico de Schiff, la cual permite la identificación de glucógeno en las células, así mismo, para establecer la presencia de lípidos en las células de interés, se empleó la tinción de Negro de Sudán B, mientras que se aplicó la técnica de coloración de negro amido para comprobar la presencia de proteínas y para determinar la presencia de enzimas se contó con la tinción de la mieloperoxidasa. Con respecto a la presencia de glucógeno, se hallaron positivos los heterófilos del tipo neutrófilos y los del tipo eosinófilos; para la presencia de lípidos, dieron reacción positiva todas las células heterófilas, en la cuanto a la coloración para determinar la presencia de proteínas básicas, todas las células resultaron positivas; así mismo, para la reacción de la mieloperoxidasa, los heterófilos del tipo neutrófilos evidenciaron una reacción claramente positiva, mientras que los del tipo eosinófilo mostraron una reacción débil. Todos estos hallazgos dan evidencia de la naturaleza de las células estudiadas, mostrando que las mismas intervienen en procesos de defensa del pez estudiado, así mismo, la heterogenicidad de las células blancas del pez híbrido, sugiere la necesidad de profundizar en estudios histoquímicos más específicos para poder identificar con más precisión la función de cada una de ellas. El estudio de estas células proporciona nuevos conocimientos que importantes para monitoreos de tipo ambiental en este organismo, lo cual ayudaría a establecer controles sanitarios y asegurar la salud de estos peces en los cultivos, así mismo los hallazgos obtenidos permiten deducir de forma indirecta cuales son los constituyentes celulares del sistema inmune innato del híbrido, sirviendo como estudio base para futuras investigaciones, tanto ambientales como de tipo inmunológicas.

Hoja de Metadatos para Tesis y Trabajos de Ascenso – 3/6

Contribuidores:

Apellidos y Nombres	ROL / Código CVLAC / e-mail
Yanet Antón	ROL

		CA <input type="checkbox"/> AS <input checked="" type="checkbox"/> TU <input type="checkbox"/> JU <input type="checkbox"/>
	CVLAC	8.439.227
	e-mail	yanton@udo.edu.ve
	e-mail	
Raquel Salazar	ROL	CA <input type="checkbox"/> AS <input type="checkbox"/> TU <input type="checkbox"/> JU <input checked="" type="checkbox"/>
	CVLAC	5 855 836
	e-mail	rsalazarlugo50@gmail.com
	e-mail	
América Vargas	ROL	CA <input type="checkbox"/> AS <input type="checkbox"/> TU <input type="checkbox"/> JU <input checked="" type="checkbox"/>
	CVLAC	9.978.150
	e-mail	americabelen2@yahoo.es

Fecha de discusión y aprobación:

Año Mes Día

2018	06	22
-------------	-----------	-----------

Lenguaje: SPA

Hoja de Metadatos para Tesis y Trabajos de Ascenso – 4/6

Archivo(s):

Nombre de archivo	Tipo MIME
--------------------------	------------------

Tesis-Hernández doc	Application/word
----------------------------	-------------------------

Alcance:

Espacial: _____ (Opcional)

Temporal: _____ (Opcional)

Título o Grado asociado con el trabajo: Licenciada en Bioanálisis

Nivel Asociado con el Trabajo: Licenciada

Área de Estudio: Bioanálisis

Institución(es) que garantiza(n) el Título o grado: Universidad de Oriente

Hoja de Metadatos para Tesis y Trabajos de Ascenso – 5/6



UNIVERSIDAD DE ORIENTE
CONSEJO UNIVERSITARIO
RECTORADO

CUN°0975

Cumaná, 04 AGO 2009

Ciudadano
Prof. JESÚS MARTÍNEZ YÉPEZ
Vicerrector Académico
Universidad de Oriente
Su Despacho

Estimado Profesor Martínez:

Cumplo en notificarle que el Consejo Universitario, en Reunión Ordinaria celebrada en Centro de Convenciones de Cantaura, los días 28 y 29 de julio de 2009, conoció el punto de agenda **"SOLICITUD DE AUTORIZACIÓN PARA PUBLICAR TODA LA PRODUCCIÓN INTELECTUAL DE LA UNIVERSIDAD DE ORIENTE EN EL REPOSITORIO INSTITUCIONAL DE LA UDO, SEGÚN VRAC N° 696/2009"**.

Leído el oficio SIBI – 139/2009 de fecha 09-07-2009, suscrita por el Dr. Abul K. Bashirullah, Director de Bibliotecas, este Cuerpo Colegiado decidió, por unanimidad, autorizar la publicación de toda la producción intelectual de la Universidad de Oriente en el Repositorio en cuestión.



Comunicación que hago a usted a los fines consiguientes.

Cordialmente,

JUAN A. BOLANOS CUNPEL
Secretario



C.C: Rectora, Vicerrectora Administrativa, Decanos de los Núcleos, Coordinador General de Administración, Director de Personal, Dirección de Finanzas, Dirección de Presupuesto, Contraloría Interna, Consultoría Jurídica, Director de Bibliotecas, Dirección de Publicaciones, Dirección de Computación, Coordinación de Teleinformática, Coordinación General de Postgrado.

JABC/YGC/manuja

Hoja de Metadatos para Tesis y Trabajos de Ascenso- 6/6

Artículo 41 del REGLAMENTO DE TRABAJO DE PREGRADO (vigente a partir del II Semestre 2009, según comunicación CU-034-2009): “los Trabajos de Grado son de la exclusiva propiedad de la Universidad de Oriente, y sólo podrán ser utilizados para otros fines con el consentimiento del Consejo de Núcleo respectivo, quien deberá participarlo previamente al Consejo Universitario para su autorización”.

Claudysbel H

Claudysbel Hernández

Autor

Yanet Antón

Profa. Yanet Antón

Asesor