

**ALTERACIONES HEMATOLOGICAS E HISTOPATOLOGICAS DEL PACÚ
(*Piaractus mesopotamicus* HOLMBERG,1887) INFESTADO
ARTIFICIALMENTE CON EL ECTOPARASITO *Dolops carvalhoi* Y
CONTROLADO CON 1-(4-chloro-phenyl)-3-(2,6-difluorobenzoyl) urea**

CAMILO LENIN GUERRERO ROMERO

**UNIVERSIDAD DE NARIÑO
FACULTAD DE CIENCIAS PECUARIAS
DEPARTAMENTO DE RECURSOS HIDROBIOLÓGICOS
PROGRAMA DE INGENIERÍA EN PRODUCCIÓN ACUÍCOLA
PASTO, COLOMBIA
2009**

**ALTERACIONES HEMATOLOGICAS E HISTOPATOLOGICAS DEL PACÚ
(*Piaractus mesopotamicus* HOLMBERG,1887) INFESTADO
ARTIFICIALMENTE CON EL ECTOPARASITO *Dolops carvalhoi* Y
CONTROLADO CON 1-(4-chloro-phenyl)-3-(2,6-difluorobenzoyl) urea.**

CAMILO LENIN GUERRERO ROMERO

**Trabajo de grado presentada como requisito parcial para optar al título de
Ingeniero en Producción Acuícola**

Presidente:

**JORGE NELSON LÓPEZ MACÍAS
M.V.Z., Esp., M.Sc., Ph.D (c)
Universidad de Nariño**

Copresidente:

**FLAVIO RUAS DE MORAES
M.V., Esp., M.Sc., Ph.D
Universidad Estatal Paulista**

**UNIVERSIDAD DE NARIÑO
FACULTAD DE CIENCIAS PECUARIAS
DEPARTAMENTO DE RECURSOS HIDROBIOLÓGICOS
PROGRAMA DE INGENIERÍA EN PRODUCCIÓN ACUÍCOLA
PASTO, COLOMBIA
2009**

“Las ideas y conclusiones aportadas en la tesis de grado son responsabilidad exclusiva de los autores”

Artículo 1º del Auerdo N° 324 del 11 de octubre de 1966 emanado del Honorable Consejo Directivo de la Universidad de Nariño.

NOTA DE ACEPTACIÓN

JORGE NELSON LÓPEZ MACÍAS
Presidente

JULBRINER SALAS BENAVIDES
Jurado Delegado

FERNANDO GARZÓN GÓMEZ
Jurado

San Juan de Pasto, Mayo 20 de 2009.

DEDICATORIA

Dedico mis éxitos a Dios, porque en su infinita sabiduría, me dio la fuerza suficiente para culminar todos y cada uno de mis proyectos.

A mi Madre Amparo Romero, debido a que sus esfuerzos y sufrimientos acompañados de su amor incondicional lo es todo para mí.

A mi hijos Sara Isabella e Isaac Steeven Guerrero Rosero; ya que por ellos he podido darle sentido a mi vida.

A mi esposa Ana Milena Rosero, por ser más que una esposa una amiga fiel, siempre al pie del cañón.

A mi hermana Nathalia A. Guerrero por aportar siempre su granito de arena y recordarme que siempre debemos estar preparados para todo.

Camilo Lenin Guerrero Romero

AGRADECIMIENTOS

El autor expresa sinceros agradecimientos a:

JORGE NELSON LÓPEZ MACIAS	M.V.Z., Esp., M.Sc., Ph.D (c)
JULBRINNER SALAS BENAVIDES	Biólogo
FERNANDO GARZÓN GÓMEZ	Médico Veterinario
FLAVIO RUAS DE MORAES	M.V.Z., Esp., M.Sc., Ph.D – CAUNESP. Jaboticabal, Brasil.
MARCO ANTONIO IMUÉZ FIGUEROA	Zootecnista, Esp.
FABIANA PILARSKY	Bióloga., M.Sc., Ph.D – CAUNESP. Jaboticabal, Brasil.
FABIANA GARCIA	Zootecnista., M.Sc (C) – CAUNESP. Jaboticabal, Brasil.
SERGIO CANELLO SCHALCH	M.V., M.Sc., Ph.D – CAUNESP. Jaboticabal, Brasil.
RODRIÇÃO FUJIMOTO Y.	Zootecnista., M.Sc., Ph.D – CAUNESP. Jaboticabal, Brasil.
EDUARDO MAKOTO ONAKA	Zootecnista., M.Sc., Ph.D – CAUNESP. Jaboticabal, Brasil.
CRISTIANE MELDAU DE CAMPOS	Zootecnista., M.Sc., Ph.D – CAUNESP. Jaboticabal, Brasil.
ADRIANA MUÑOZ RAMIREZ	Zootecnista, Esp., M.Sc.,Ph. D – CAUNESP. Jaboticabal, Brasil.
CAMILO ERNESTO GUERRERO	Zootecnista, Esp, M.Sc, Ph.D (C) CAUNESP, Jaboticabal, Brasil.
YEMAL ALEXANDER ENRIQUEZ	Ingeniero en Producción Acuícola UDENAR.
OSCAR MEJÍA SANTACRUZ	Economista, Centro de Documentación Especializada del Dpto. de Recursos Hidrobiológicos UDENAR.
PIEDAD MEJIA SANTACRUZ	Secretaría del Dpto. de Recursos Hidrobiológicos. UDENAR.
JAIRO MUÑOZ HOYOS	Rector Universidad de Nariño.
JAVIER FAJARDO	Representante estudiantil Universidad de Nariño.

Al Programa de Ingeniería en Producción Acuícola de la Universidad de Nariño, Colombia; empleados del Centro de Acuicultura de la Universidad Estatal Paulista, Jaboticabal, San Paulo, Brasil y a todas las personas que de una u otra forma contribuyeron al desarrollo de esta investigación.

CONTENIDO

	Pág.
INTRODUCCION	22
1. DEFINICION Y DELIMITACION DEL PROBLEMA	24
2. FORMULACION DEL PROBLEMA	25
3. OBJETIVOS	26
3.1 GENERAL	26
3.2 ESPECIFICOS	26
4. MARCO TEORICO	27
4.1 GENERALIDADES DE LA ESPECIE PACÚ (<i>Piaractus mesopotamicus</i>)	27
4.2 PARASITOSIS POR CRUSTACEOS	28
4.3 BRANQUIUROS, CICLO VITAL, SINTOMATOLOGÍA E IMPORTANCIA ECONOMICA	28
4.4 DIFLUBENZURON	29
4.5 SITUACION ACTUAL DE LA HEMATOLOGÍA	31
4.6 ORIGEN Y DESARROLLO DE LAS CELULAS SANGUINEAS EN LOS PECES TELEOSTEOS	33
4.7 HEMATOLOGIA DE PECES	35
4.8 PREPARACIÓN, VISUALIZACIÓN Y CARACTERÍSTICAS DE FROTIS SANGUINEOS	35
4.9 TINCIONES HEMATOLOGICAS	36
4.10 CELULAS SANGUINEAS	37
4.10.1 Serie roja o Eritrocitos	37
4.10.2 Serie trombocítica o Trombocitos	37
4.10.3 Serie blanca o Leucocitaria	37
4.10.4 Linfocitos	37
4.10.5 Monocitos	38
4.10.6 Heterófilos	38
4.10.7 Eosinófilos	38
4.10.8 Basófilos	39
4.10.9 Células Granulocíticas Especiales (CGE) o leucocito granular PAS-positivo (LG-PAS)	39
4.11 TECNICAS DE EVALUACION DEL CUADRO HEMATOLOGICO	39
4.11.1 Técnicas cuantitativas	39
4.12 HISTOLOGIA EN PECES	40
4.12.1 Tejido branquial	41
4.12.2 Tejido epitelial	41
4.12.3 Tejido hepático	41
4.12.4 Tejido renal	41

	Pag.
5. DISEÑO METODOLÓGICO	43
5.1 LOCALIZACION	43
5.2 MATERIAL BIOLÓGICO Y UNIDADES EXPERIMENTALES	43
5.3 EQUIPOS, MATERIALES Y REACTIVOS	44
5.3.1 Equipos	44
5.3.2 Materiales	44
5.3.3 Reactivos	45
5.4 PLAN DE MANEJO	45
5.4.1 Alimentación	45
5.4.2 Adecuación de tanques circulares	45
5.4.3 Infestación	45
5.4.4 Control de la calidad del agua	46
5.4.5 Colecta de sangre	46
5.4.6 Extensión sanguínea	47
5.4.7 Conteo diferencial de células blancas	48
5.4.8 Obtención de las muestras histológicas	49
5.4.9 Control de parásitos	49
5.5 TRATAMIENTOS	49
5.6 DISEÑO EXPERIMENTAL	50
5.7 HIPOTESIS	50
5.8 VARIABLES EVALUADAS	51
5.8.1 Conteo total de eritrocitos, porcentaje de hematocrito y contenido de hemoglobina	51
5.8.2 Índices corpusculares hematológicos	51
5.8.3 Conteo de células sanguíneas de la serie blanca (Leucocitos)	51
5.8.4 Conteo relativo de trombocitos	51
5.8.5 Índice hepatosomático IHS	51
5.8.6 Eficacia del medicamento	52
5.8.7 Parámetros morfométricos	52
5.8.8 Calidad del agua	52
5.8.9 Parámetros histopatológicos	52
6. PRESENTACION Y DISCUSION DE RESULTADOS	53
6.1 VARIBLES EVALUADAS	53
6.2 CONTEO TOTAL DE ERITROCITOS	53
6.3 HEMATOCRITO	54
6.4 HEMOGLOBINA	54
6.5 INDICES CORPUSCULARES HEMATOLOGICOS	55
6.5.1 Volumen corpuscular medio (VCM)	55
6.5.2 Hemoglobina Corpuscular Media (HCM)	56
6.5.3 Concentración Corpuscular Media de Hemoglobina (CCMH)	57
6.6 CONTEO DE LEUCOCITOS	57

	Pag.	
6.6.1	Linfocitos (%)	57
6.6.2	Eosinófilos (%)	58
6.6.3	Células Granulocticas Especiales CGE (%)	59
6.6.4	Monocitos (%)	60
6.6.5	Heterófilos (%)	61
6.6.6	Basófilos (%)	62
6.7	CONTEO RELATIVO DE TROMBOCITOS	62
6.8	INDICE HEPATOSOMATICO	63
6.9	EFICACIA DEL TRATAMIENTO (DIFLUBENZURON) EN EL CONTROL DE <i>Dolops carvalhoi</i>	64
6.10	CALIDAD DEL AGUA	65
6.10.1	Temperatura (°C)	65
6.10.2	Oxígeno disuelto (mg/L)	66
6.10.3	Potencial de hidrogenación pH	67
6.11	Peso (g)	68
6.12	PARAMETROS HISTOPATOLOGICOS	69
6.12.1	Tejido branquial	69
6.12.2	Piel	72
6.12.3	Hígado	73
6.12.4	Riñón	75
7.	CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	76
7.1	CONCLUSIONES	76
7.2	RECOMENDACIONES	77
	REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	79
	ANEXOS	87

LISTA DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1. Valores medios del eritrograma en el ciclóstomo pez-bruja <i>Myxine glutinosa</i> (Wintrobe, 1934), en peces cartilagosos (rayas y tiburones) y en teleósteos marinos, de la costa sur del Brasil (Wilhelm Filho et al., 1992).	31
Tabla 2. Hemograma en diferentes especies de la familia Characidae de importancia económica. Erit. = Eritrocitos; Hb = Hemoglobina; Hct = Hematócrito; VCM = Volumen corpuscular medio; CHCM = Concentración de hemoglobina corpuscular medio; - = No hay información.	32
Tabla 3. Comparación de resultados en el conteo del porcentaje de basófilos en especies de la Familia Characidae.	62

LISTA DE FIGURAS

		Pág.
Figura 1.	Juvenil de Pacú (<i>Piaractus mesopotamicus</i>).	27
Figura 2.	Ejemplar <i>Dolops Carvalhoi</i> .	29
Figura 3.	Esquema de las diversas fases de maduración eritrocitaria en peces teleósteos adaptado por (Majan & Dheer 1980) y (Maiti et al., 2000).	34
Figura 4.	Representación esquemática de la eritropoyesis y trombopoyesis en <i>Clarias gariepinus</i> y <i>Oreochromis mossambicus</i> (Boomker, 1980).	34
Figura 5.	Origen de las células que intervienen en la respuesta inmune	35
Figura 6.	Representación de los tipos de anemias.	40
Figura 7.	Ejemplares de pacú (<i>Piaractus mesopotamicus</i>).	43
Figura 8.	Tanques circulares y equipo de aireación (Blower 1,5hp).	44
Figura 9.	Colecta, conteo y siembra del parásito <i>Dolops carvalhoi</i> .	46
Figura 10.	Colecta, conservación y análisis sanguíneo.	47
Figura 11.	Extensión sanguínea.	47
Figura 12.	Campo visual y recorrido a seguir para la realización de recuento de células sanguíneas de la serie blanca al microscopio.	48
Figura 13.	Células sanguíneas de la serie blanca presentes en <i>P. mesopotamicus</i> , objetivo 200X.	48
Figura 14.	Cantidad de eritrocitos ($\times 10^6/\mu\text{L}$) en los tratamientos al finalizar la fase experimental.	53
Figura 15.	Hematocrito presente en la sangre circulante entre los tratamientos al finalizar la fase experimental.	54
Figura 16.	Nivel de hemoglobina en los tratamientos experimentales.	55
Figura 17.	Volumen Corpuscular Medio (VCM) de los hematíes presentes en los diferentes tratamientos al finalizar la fase experimental.	56
Figura 18.	Hemoglobina Corpuscular Media (HCM) promedio de los hematíes presentes en los diferentes tratamientos al finalizar la fase experimental	56
Figura 19.	Concentración Corpuscular Media de Hemoglobina (CCMH) promedio de los hematíes entre los diferentes tratamientos al finalizar la fase experimental.	57
Figura 20.	Porcentaje promedio de Linfocitos presentes en la sangre circulante entre los tratamientos al finalizar la fase experimental.	58
Figura 21.	Porcentaje promedio de Eosinófilos presentes en la sangre circulante en los distintos tratamientos.	59

	Pág
Figura 22. Porcentaje promedio de las Células Granulocíticas Especiales (CGE) presentes entre los distintos tratamientos al finalizar la fase experimental.	60
Figura 23. Porcentaje promedio de Monocitos presentes entre los diferentes tratamientos al finalizar la fase experimental.	61
Figura 24. Porcentaje promedio de Heterófilos en los diferentes tratamientos al finalizar la fase experimental.	61
Figura 25. Cantidad relativa de Trombocitos presentes en la sangre circulante entre los tratamientos al finalizar la fase experimental.	63
Figura 26. Índice hepatosomático de los tratamientos al finalizar la fase experimental.	64
Figura 27. Porcentaje de eficacia del diflubenzuron en el tratamiento del parásito <i>Dolops carvalhoi</i> .	64
Figura 28. Promedio de temperatura (°C) de los tratamientos experimentales.	66
Figura 29. Promedio de oxígeno disuelto (mg/L) en los tratamientos durante la fase experimental.	67
Figura 30. Promedio del potencial de hidrogenación pH en los tratamientos.	68
Figura 31. Peso (g) de los tratamientos durante la fase experimental.	68
Figura 32. Corte sagital tejido branquial <i>P. mesopotamicus</i> H-E	69
Figura 33. Corte sagital tejido branquial <i>P. mesopotamicus</i> H-E	70
Figura 34. Corte sagital tejido branquial <i>P. mesopotamicus</i> H-E	71
Figura 35. Corte sagital tejido epitelial <i>P. mesopotamicus</i> H-E	72
Figura 36. Corte sagital tejido epitelial <i>P. mesopotamicus</i> H-E	73
Figura 37. Corte sagital tejido epitelial <i>P. mesopotamicus</i> H-E	73
Figura 38. Corte sagital tejido hepático <i>P. mesopotamicus</i> H-E	74
Figura 39. Corte sagital tejido hepático <i>P. mesopotamicus</i> H-E	74
Figura 40. Corte sagital tejido hepático <i>P. mesopotamicus</i> H-E	75
Figura 41. Corte sagital tejido renal <i>P. mesopotamicus</i> H-E	75

LISTA DE ANEXOS

	Pág.
Anexo A. Procesamientos histológicos para peces (Laboratorio de histotecnología de la UNESP).	88
Anexo B. Parámetros físico-químicos del agua durante el tiempo de aclimatación y desarrollo del experimento.	89
Anexo C. Datos de campo obtenidos de la biometría.	91
Anexo D. Conteo diferencial de células sanguíneas, provenientes de los ejemplares experimentales mediante contador manual CEL-modelo CC-550 serie 1414 selm con diluidor automático modelo DA 500 P6, serie 4407 selm.	94
Anexo E. Perfil hematológico de los ejemplares de los distintos tratamientos y réplicas.	97
Anexo F. Análisis de varianza para la variable Temperatura.	100
Anexo G. Análisis de varianza para la variable Oxígeno Disuelto.	101
Anexo H. Análisis de varianza para la variable Potencial de Hidrogeniones pH.	102
Anexo I. Análisis de varianza para la variable Peso Total.	103
Anexo J. Análisis de varianza y prueba de Tukey para la variable Longitud.	104
Anexo K. Análisis de varianza y prueba de Tukey para la variable Índice Hepatosomático IHS.	105
Anexo L. Análisis de varianza y prueba de Tukey para la variable cantidad de Eritrocitos.	106
Anexo M. Análisis de varianza la variable porcentaje de Hematócrito.	107
Anexo N. Análisis de varianza para la variable cantidad de Hemoglobina.	108
Anexo O. Análisis de varianza y prueba de Tukey para la variable conteo diferencial de Linfocitos.	109
Anexo P. Análisis de varianza y prueba de Tukey para la variable conteo diferencial de Eosinófilos.	110
Anexo Q. Análisis de varianza y prueba de Tukey para la variable conteo diferencial de Células Granulocíticas Especiales.	111
Anexo R. Análisis de varianza y prueba de Tukey para la variable conteo diferencial de Monocitos.	112
Anexo S. Análisis de varianza y prueba de Tukey para la variable conteo diferencial de Heterofilos.	113
Anexo T. Análisis de varianza y prueba de Tukey para la variable conteo relativo de Trombocitos.	114
Anexo U. Análisis de varianza y prueba de Tukey para la variable	

	Pág.
Volumen Corpuscular Medio VCM.	115
Anexo V. Análisis de varianza y prueba de Tukey para la variable Hemoglobina Corpuscular Media HCM.	116
Anexo W. Análisis de varianza y prueba de Tukey para la variable Concentración de Hemoglobina Corpuscular Media CHCM.	117

GLOSARIO

ANEMIA: Entidad patológica, caracterizada por reducción en el diámetro, tamaño y/o concentración de hemoglobina de los glóbulos rojos especialmente eritrocitos.

ANEMIA MACROCITICA-HIPOCROMICA: Anemia caracterizada por el aumento del Volumen Corpuscular Medio (VCM) y reducción de la Concentración de Hemoglobina Corpuscular Media (CHCM).

ANEMIA MACROCITICA-NORMOCROMICA: Anemia caracterizada por el aumento del Volumen Corpuscular Medio sin alteración significativa de la Concentración de Hemoglobina Corpuscular Media.

ANEMIA MICROCITICA-HIPOCROMICA: Anemia caracterizada por la reducción del Volumen Corpuscular Medio y de la Concentración de Hemoglobina Corpuscular Media.

ANEMIA NORMOCITICA-NORMOCROMICA: Anemia caracterizada por presentar la Concentración de Hemoglobina Corpuscular Media y el Volumen Corpuscular Medio normal.

CELULAS CALICIFORMES: Células en forma de copa, presentes en la mucosa del tracto respiratorio y digestivo de los peces y que ayudan a la segregación de mucus con el fin de proteger al organismo de sustancias nocivas y agentes invasores.

CELULA GRANULOCITICA ESPECIAL: Célula sanguínea, caracterizada por corpúsculos en el citoplasma, con núcleo polimorfonucleado y actividad fisiológica defensiva.

CONCENTRACIÓN DE HEMOGLOBINA CORPUSCULAR MEDIA (CHCM): Es el peso medio de la hemoglobina por eritrocito expresado en picogramos.

DIFLUBENZURON: Insecticida fisiológico clase IV (poco peligroso) que interfiere el crecimiento de artrópodos al impedir la deposición de quitina, principal sustancia constituyente de la cutícula de los insectos.

EOSINA: Colorante que tiñe los organelos celulares con afinidad ácida de color rojo.

EOSINOPOYESIS: Proceso de origen y maduración de eosinófilos de los peces.

ERITROCITO: Célula sanguínea de la serie roja, que se caracteriza por su forma ovalada y presencia de núcleo.

ERITROGRAMA: Examen sanguíneo conformado por la cuantificación del número de eritrocitos por mm^3 , hematócrito, concentración de hemoglobina y los índices hematológicos denominados Volumen Corpuscular Medio (VCM), Hemoglobina Corpuscular Media (HCM) y Concentración de Hemoglobina Corpuscular media (CHCM).

HEMATOCRITO: Porcentaje de glóbulos rojos en un volumen dado de sangre.

HEMATOPOYESIS: Proceso fisiológico de origen, formación y maduración de las células sanguíneas de las series roja y blanca.

HEMATOXILINA: Colorante que con ayuda del oxígeno tiñe los organelos celulares con afinidad básica de color azul violeta.

HEMOGLOBINA: Pigmento con capacidad de transportar oxígeno en los eritrocitos.

HEMOLISIS: Destrucción de los eritrocitos que provoca la liberación de hemoglobina.

HETEROFILIA: Aumento del número de heterófilos circulantes.

HETEROPOYESIS: Proceso de origen y maduración de heterófilos.

HIPERPLASIA: Aumento del tamaño de un tejido u órgano por multiplicación del número de células, sin que estas aumenten su tamaño individual.

HISTOLOGIA: Ciencia que estudia la estructura microscópica de los tejidos, órganos, aparatos y sistemas mediante los procesos de disección preparación de coloración, microtomía, fijación y coloración de las muestras tisulares.

IMUNODEPRESIÓN: Reducción de la capacidad de respuesta del sistema inmunológico.

INSECTICIDA: Sustancias que producen la muerte de insectos mediante la destrucción de la cutícula a través de procesos mecánicos (polvo de silicio), químicos (ácido cianhídrico, dióxido de azufre, sulfuro de carbono) o ingestión (compuestos a base de arsénico, plomo, mercurio) o por contacto (DDT, paratión).

LEUCOGRAMA: Determinación del número de glóbulos blancos totales y su composición diferencial.

LINFOPENÍA O LINFOCITOPENÍA: Reducción del número de linfocitos circulantes en afecciones patológicas de tipo viral, bacteriano o químico.

PATOLOGÍA: Ciencia que estudia las alteraciones macroscópicas y microscópicas y los daños fisiológicos de tejidos, órganos, aparatos y sistemas enfermos.

VOLUMEN CORPUSCULAR MEDIO (VCM): Cuantificación del volumen medio de cada eritrocito, expresado en femtolitros.

RESUMEN

La presente investigación evaluó los efectos producidos por el insecticida diflubenzuron® en el tratamiento de la especie íctica pacú (*Piaractus mesopotamicus*) infestada artificialmente con larvas de *Dolops carvalhoi*, con el fin de determinar los índices hematológicos (VCM, HCM y CCMH), conteo de eritrocitos y leucocitos y evaluar las lesiones histopatológicas en branquias, piel, hígado y riñón. El estudio se llevó a cabo en el Laboratorio de Patología de Organismos Acuáticos del Centro de Acuicultura de la Universidad Estatal Paulista, Jaboticabal, Estado de San Paulo, Brasil, durante un periodo de cuatro meses.

Se analizaron 84 juveniles de pacú, con un peso promedio de $73,68 \pm 16,9$ gr y una longitud total de $15,41 \pm 1,31$ cm; utilizando un Diseño irrestrictamente al azar (DIA) conformado por cinco tratamientos y un control con tres réplicas, distribuidos de la siguiente forma:

T₀ = Control (ejemplares libres de parásitos, sin aplicación del medicamento).

T₁ = Infestación baja, (10 parásitos por pez y sin aplicación del medicamento).

T₂ = Infestación moderada (30 parásitos por pez, sin aplicación del medicamento).

T₃ = Infestación moderada (30 parásitos por pez, tratados con 0,5 mg/L de diflubenzuron).

T₄ = Infestación moderada (30 parásitos por pez, tratados con 1,0 mg/L de diflubenzuron).

T₅ = Infestación moderada (30 parásitos por pez, tratados con 2,0 mg/L de diflubenzuron).

Las variables analizadas fueron: índice hepatosomático (IHS), conteo total de eritrocitos, Hematocrito y contenido de hemoglobina, calculando los índices hematológicos Volumen Corpuscular Medio (VCM), Hemoglobina Corpuscular Media (HCM), Concentración Corpuscular Media de Hemoglobina (CCMH). Igualmente se efectuó el conteo diferencial de células sanguíneas de la serie blanca (Linfocitos, Monocitos, Eosinófilos, Célula Granulocítica Especial (CGE), Heterófilos y Basófilos) mediante extensiones sanguíneas, obteniendo colecta de los vasos sanguíneos caudales. Posteriormente se realizaron placas histopatológicas de piel, branquias, hígado y riñón de 3μ de espesor con tinción Hematoxilina-Eosina. A demás se obtuvieron datos de temperatura, oxígeno disuelto, pH, peso. Las variables se estudiaron mediante análisis de varianza y para aquellas en las que se detectó diferencias estadísticas se aplicó la prueba de Tukey al 0,05 %.

Las variables físico químicas del agua como la temperatura ($29,33 \pm 0,407$ °C), oxígeno disuelto, el pH ($7,82 \pm 0,008$); así como el peso ($73,68 \pm 16$ g), porcentaje de hematocrito ($28,007 \pm 4,44$ %), la cantidad de hemoglobina ($12,4 \pm 2,12$ g/dL), porcentaje de heterofilos ($0,36 \pm 0,87$ %). No presentaron diferencias estadísticas significativas entre tratamientos ($p > 0,005$).

El ensayo estableció la mayor eficacia del insecticida diflubenzuron para el control de infestación por *Dolops carvalhoi* fue de 2,0 mg/L con un 99,5 % en el T₅, en comparación con el T₃ (0,5 mg/L) y T₄ (1,0 mg/L).

El análisis del índice hepatosomático (IH = $0,8 \pm 0,5$), cantidad total de eritrocitos ($2,56 \pm 0,53 \times 10^6$ / μ L) y el conteo diferencial de leucocitos reportó diferencias estadísticas significativas entre los tratamientos ($p \leq 0,05$), con respecto al T₀ de acuerdo a la prueba de Tukey así; estableciendo que la presencia del ectoparásito y el agente químico ejercen cambios fisiológicos en los ejemplares de pacú en el IH, el número de linfocitos ($94,09 \pm 4,11$ %) mostraron un porcentaje de reducción en los tratamientos T₁ y T₂, el porcentaje de eosinofilos ($0,98 \pm 1,15$ %) presentó una disminución en el T₄ y T₅, la cantidad de células granulocíticas especiales ($3,59 \pm 3,73$ %) en T₁ fue mayor en relación a los tratamientos T₂ y T₀, el valor de monocitos ($0,92 \pm 1,08$ %) mostró que el tratamiento T₅ posee más porcentaje de células. No se observaron basófilos en ninguno de los tratamientos.

Los índices corpusculares hematológicos son estadísticamente diferentes en los distintos tratamientos ($p \leq 0,05$); de tal manera que, el Volumen Corpuscular Medio (VCM) ($112,31 \pm 18,44$ fL), presentó un incremento en los distintos tratamientos con respecto al T₀ y la Concentración Corpuscular Media de Hemoglobina (CCMH) ($44,71 \pm 6,36$ g/dL), fue menor en todos los tratamientos respecto al T₀; ubicando estas alteraciones para todos los tratamientos como anemia del tipo macrocítica-hipocrómica.

El estudio histopatológico de los diferentes tratamientos experimentales, demostraron alteraciones microscópicas de la piel, branquias, hígado y riñón con respecto al control; en las branquias se observó hiperplasia de la lamela primaria, pérdida de lamelas secundarias, aumento de células calciformes; en la piel engrosamiento de la epidermis y dermis e incremento de células calciformes; congestión de sinusoides e infiltración eritrocitaria en el tejido hepático. Sin embargo, en el tejido renal no se establecieron alteraciones con relación al testigo.

ABSTRACT

The main objective of this research was to evaluate the experimental infestation of *Dolops carvalhoi* in the fish pacu (*Piaractus mesopotamicus*) and its control with diflubenzuron in order to determine hematology indexes (MCV, MCH, MCHC) eritrocitic and leucocitic count and evaluate the histopathological lesions in gills, skin, kidney and liver. The study was carried out at the Pathology Laboratory of Aquatics Organisms of the Center of Aquaculture at the State Paulista University, Jaboticabal; State of Sao Paulo, Brazil, the study was performed during a period of four months.

Eighty four fry pacú, with an average weight of $73,68 \pm 16,9$ g and total length of $15,41 \pm 1,31$ cm. An Unrestricted Random Design (URD) was used, made up by five treatments and a control with three replications in the following way:

T₀ = Control (fishes without parasites, and they were not treated).

T₁ = Low infestation (10 parasites per fish, and they were not treated).

T₂ = Half infestation (30 parasites per fish, and they were not treated).

T₃ = 30 parasites per fish, and they were treated with 0,5mg/L of diflubenzuron.

T₄ = 30 parasites per fish, and they were treated with 1,0mg/L of diflubenzuron.

T₅ = 30 parasites per fish, and they were treated with 2,0mg/L of diflubenzuron.

The variables analyzed were: temperature, dissolved oxygen, pH, total weight and length, hepatic index, erythrocyte total count, hematocrit, and hemoglobin count, the mean corpuscular volume (MCV), mean corpuscular hemoglobin (MCH), mean corpuscular hemoglobin concentration (MCHC). The differential white cell count of was performed in order to quantify (lymphocytes, monocytes, heterophiles, special granulocytic cells, eosinophiles and basophiles) through blood stains with wright satin. The blood was collected from caudal vesseles and a pathologic study was performed in samples of 3 μ of gills, skin, liver and kidney with hematoxilin- eosin dye, an Analysis of Variance (ANOVA) was run with the in order to dar pose to establish statistics differences of the parameters. If differences statistics existed a Tukey test at 0,05 % of significance was run to detected differences between treatments.

Physical chemistry variables such as temperature ($29,33 \pm 0,407$ °C); dissolved oxygen, pH ($7,82 \pm 0,008$), weight ($73,68 \pm 16$ gr), hematocrit percentage ($28,007 \pm 4,44\%$), hemoglobin quantity ($12,4 \pm 2,12$ gr/dL), heterophiles percentage ($0,36 \pm 0,87$). There was not significant statistics differences among treatments ($p > 0.05$).

The parasitological test showed that the best dose of diflubenzuron insecticide, against experimental infestation with *Dolops carvalhoi*, was 2,0 mg/L (T₅) 99,5%; compared to treatment T₃ (0,05 mg/l) and T₄ (1,0 mg/L).

Hepatosomatic index analysis (0,8±05), Erythrocytes total count (2.56±0,53 x 10⁶/μL) and the differential leucocytes count showed, significant statistic differences among treatments (p≤0,05) in comparison to T₀ treatment according to Tukey test. The lymphocytes percentage (94,09±4,11 %) showed a percentage reduction in T₁ and T₂ treatments in comparison to T₀ treatment. The eosinophiles percentage (0,98±1.15 %) presented a decrease in T₄ and T₅ in relation to T₀ treatment. Special Granulocytic Cells (SGC) percentage was (3,59±3.73 %) in T₁ was higher in relation to treatments T₂ and T₀. Monocytes percentage (0,92±1,08 %) showed that T₅ treatment had more increment percentage than T₀ treatment. There was not basophilic cell in no one treatment.

The hematology corpuscle indexes had some significant statistical differences (p≤0,05), MCV (112,31±18,44 fL), had an increment in all treatments in comparison to T₀ treatment and the MCHC (44,71±6,36 g/dL), all treatment had a diminution in comparison to T₀ treatment.

The histopathology study of different experimental treatments showed microscopic damage skin, gills and liver with respect to control. The gills showed hyperplasia mainly in the primary lamella, loss of secondary lamellae, increased of osmoregulatory cells in the skin of the infected fish showed thickening of the epidermis and dermis, the liver presented congestion of sinusoids and eritrocitic infiltration. However, in the renal tissue were not observed any alteration.

INTRODUCCIÓN

La incidencia de enfermedades de los peces, causadas por diferentes patologías, se intensifica en la medida que se aumentan las densidades de siembra¹. Por esta razón, la expansión de la piscicultura en el Brasil trajo consigo problemas sanitarios relacionados con el manejo inadecuado y el deterioro de las condiciones ambientales. La implementación de técnicas intensivas productivas en el transporte y el deterioro de la calidad del agua, causan depresión de los mecanismos inmunitarios y aumento de la susceptibilidad de los peces a las enfermedades, las cuales tiene gran impacto económico en la rentabilidad acuícola. El perjuicio causado por enfermedades infecciosas en peces de cultivo en los Estados Unidos fue estimado en cerca de U\$23 millones durante 1.989 y más del 50% de las pérdidas correspondieron a infecciones parasitarias². En pescas deportivas de la región del Nordeste del Estado de San Paulo la incidencia del parasitismo durante el 2.000, fue del orden de 46,5%³. Los parásitos se encuentran normalmente en el medio acuático, ocasionando enfermedades en los peces por la pérdida del equilibrio hospedadero-parásito-ambiente^{4, 5, 6, 7}.

Los crustáceos de la familia argulidae, sub-familia branquiuros del género *Dolops*, son ectoparásitos de la piel, aletas, boca y branquias de varias especies de peces silvestres y de cultivo. Según Prieto, et al⁸, este parásito posee ganchos para fijación y, para alimentarse, perforan la piel del hospedadero, inyectan

¹ LÓPEZ, Jorge; IMUEZ, Marco; BURGOS, Álvaro; RODRÍGUEZ, Jaime; MENA, Paolo y TORRERS, Carlos I. Evaluación de inmunoestimulantes en las fases de levante y seba de trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*), cultivada en jaulas flotantes en el Lago Guamuéz. Pasto. Colombia. Universidad de Nariño. Vicerrectoría de Investigaciones, Postgrados y Relaciones Internacionales. Sistema de investigación. 2005. p. 55

² KLESZIUS, P. y ROGER, W. Parasitism of catfish and other farm raised food fish. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, Schawnborg, v. 207, 1995. 1473-1478 p.

³ TAVARES-DIAS, M. Estudos parasitológico e hematológico em peixes oriundos de pesquepagues do município de Franca, SP. Dissertação apresentada ao curso de Pós-graduação em Aqüicultura, para obtenção do título de Mestre em Aqüicultura. Jaboticabal.SP., 2000. 35-37 p.

⁴ MARTINS, M.L.; MORAES, F.R.; FUJIMOTO, R.Y.; ONAKA, E.M.; SCHALCH, S.H.C.; NOGA, E.J. Fish Disease. *Diagnosis and Treatment*. St. Louis, Missouri: Mosby-Year Book, Inc., 1996.

⁵ CECCARELLI, P.S.; FIGUEIRA, L.B.; FERRAZ DE LIMA, C.B.L. & OLIVEIRA, C.A. Observações sobre a ocorrência de parasitas no CEPTA entre 1983 e 1990. *Boletim Técnico do CEPTA – Pirassununga-SP*, v. 3(único), p. 43 – 54, 1990.

⁶ FIGUEIRA, L.B. CECCARELLI, P.S. Observações sobre a presença de ectoparasitas em pisciculturas tropicais do interior (CEPTA- região) entre janeiro e junho de 1991. *Boletim Técnico do CEPTA*, Pirassununga-SP, v.4, n 1, p. 57-65, 1991.

⁷ MARTINS, M.L.; ROMERO, N.G. Efectus del parasitismo sobre el tegido branquial en peces cultivados : Estudio parasitológico e histopatológico. *Revista Brasileira de Zoologia*, v. 13, n.2 , 1996. 489–500 p.

⁸ PRIETO A. et al. Parasites of Freshwater Cultured Fish. Differential Diagnostic Keys. Food and Agriculture Organization of the United Nations-FAO, Mexico, June, 1994.

anticoagulante y secreciones digestivas, succionando sangre y células epiteliales. Causando anemia, inflamación y ruptura del tegumento cutáneo, abriendo paso de continuidad que permiten la instalación de infecciones secundarias⁹. La infesta elevada de este parásito está relacionada con la alta densidad poblacional, baja calidad del agua y de las condiciones sanitarias¹⁰. El tratamiento tradicional de este tipo de parasitismo es mediante organofosforados que poseen alto grado de toxicidad para los peces, el operario y contamina el ambiente acuático, afectando la cadena alimenticia, dejando residuos en el filete que afectan al consumidor final^{11, 12, 13}.

Por lo anteriormente expuesto, se deben implementar nuevas técnicas no polulantes en el control de ectoparásitos de peces como es el caso 1-(4-clorofenil)-3-(2-6-diflurobenzoil) urea (diflubenzuron[®]) que ha demostrado eficacia en el control de estadios inmaduros de insectos, debido a que interfiere en la síntesis de quitina durante la fase de muda y presenta baja toxicidad para vertebrados¹⁴.

En consecuencia, esta investigación tuvo como objetivo evaluar los efectos producidos en los parámetros hematológicos e histopatológicos del pacú (*Piaractus mesopotamicus*) por la infestación artificial del ectoparásito *Dolops carvalhoi* y su control con el insecticida diflubenzuron[®].

⁹ THATCHER, V.E.; BRITES-NETO, J.B. Diagnóstico, Prevenção e Tratamento de Enfermidades de Peixes Neo Tropicais de Água Doce. *Rev. Bras. Med. Vet.*, Rio de Janeiro, v. 16, n. 3, 1994. p. 120

¹⁰ TOMEC, M. *et al.* Kvaliteta vode i ektoparazitarni bolesti ciprinidnih riba. *Ribarstvo*, Ispit, v. 53, n. 4, 1995. 129-139 p.

¹¹ POST, G. *Textbook of fish health*. New Jersey: T.F.H. Public., 1987.

¹² NOGA, E.J. *Fish Disease, Diagnosis and Treatment*. Missouri: Mosby-Year Book, Inc., 1996.

¹³ LOPEZ, J. Comunicación personal 2007.

¹⁴ EISLER R. Diflubenzuron[®] hazards to fish, wildlife and invertebrates: a synoptic review. U.S. *Fish Wildl. Ser Biol. Rep.*, Washington, D.C., v. 4, n. 25, 1992. p. 30

1. DEFINICIÓN Y DELIMITACIÓN DEL PROBLEMA

Las diferentes explotaciones piscícolas a escala extensiva y semi-extensiva, son manejadas generalmente, por personal con un escaso nivel técnico, lo que genera inadecuado desarrollo de protocolos, medidas profilácticas y tratamiento de enfermedades parasitarias de los peces desde el punto de vista de la selección y dosificación del medicamento, lo que se refleja en bajas tasas de crecimiento, alta mortalidad y escasa rentabilidad de la acuicultura.

Igualmente se utilizan de manera indiscriminada en el control de parásitos externos e internos diferentes pesticidas e insecticidas que han creado resistencia en los organismos hidrobiológicos, deteriorando la calidad físico-química y bacteriológica del agua y han causado biomagnificación en los distintos integrantes de la pirámide alimenticia de un cuerpo de agua y acumulación residual en el filete, afectando la salud del consumidor final, el hombre¹⁵. Por esta razón, es necesario realizar ensayos sobre los riesgos y beneficios que trae consigo el uso de estos productos químicos.

De acuerdo con Pavanelli, et al¹⁶, el hecho de no conocer la dosis de la mayoría de insecticidas usados en acuicultura, no se efectúa ningún tratamiento, incrementando la mortalidad de los organismos hidrobiológicos cultivados y por ende aumentando las pérdidas económicas. Brown¹⁷ demostró que la utilización de algunos insecticidas en acuicultura a base de 2,2-tricloro hydroxietil ha intensificado su dosificación de 0,25mg/L a 25mg/L debido a la resistencia desarrollada por los agentes etiológicos con grave riesgo para la estabilidad de los sistemas acuáticos.

Por lo anteriormente expuesto, es importante evaluar nuevos medicamentos desde el punto de vista de su dosificación y los efectos que estas sustancias puedan causar en células, tejidos, órganos, aparatos y sistemas como en la composición celular de la sangre, branquias, piel, hígado y riñones, órganos indicadores de la eficacia o toxicidad de un pesticida¹⁸.

¹⁵ LOPEZ, J., et al, Op. Cit., p. 60.

¹⁶ PAVANELLI, G; EIRAS, J e TAKEMOTO, R. Doenças de peixes: Profilaxia, diagnóstico e tratamento. Paraná, Brasil: Universidade Estadual de Maringá, 1998, p.81.

¹⁷ BROWN, Lydia. Acuicultura para veterinarios. Producción y clínica de peces. Zaragoza, España: Acribia, 1999, p. 144.

¹⁸ LOPEZ, J., Op cit., p.56.

2. FORMULACIÓN DEL PROBLEMA

¿Cuáles son las alteraciones en la composición celular de la sangre y la estructura histológica de branquias, piel, hígado, y riñón del pacú (*Piaractus mesopotamicus*) infestado artificialmente con el ectoparásito *Dolops carvalhoi* y tratados posteriormente con diferentes dosis de un insecticida a base de 4-clorofenil-6diflorobenzoil?

3. OBJETIVOS

3.1 GENERAL

Evaluar los efectos producidos en las células sanguíneas, branquia, piel, hígado y riñón de pacu (*Piaractus mesopotamicus*), infestado artificialmente con el ectoparásito *Dolops carvalhoi* y posteriormente controlado con diferentes dosis de 4-clorofenil-6-diflurobenzoil.

3.2 ESPECÍFICOS

- Determinar el conteo total de eritrocitos, diferencial de leucocitos y relativo de trombocitos del pacú, en todas las réplicas y tratamientos.
- Cuantificar hematocrito y contenido de hemoglobina del pacú, en todas las réplicas y tratamientos.
- Calcular los índices hematológicos: Volumen Corpuscular Medio (VCM), Hemoglobina Corpuscular Media (HCM) y Concentración Corpuscular Media de Hemoglobina del pacú, en los distintos tratamientos.
- Describir las características histológicas de branquia, piel, hígado y riñón de los ejemplares estudiados en cada una de las réplicas de los diferentes tratamientos.
- Recomendar, según los resultados obtenidos, la dosis de 4-chlorophenyl-6-diflurobenzoil con mayor eficacia en el control del ectoparásito *Dolops carvalhoi*.

4. MARCO TEORICO

4.1 GENERALIDADES DE LA ESPECIE PACÚ (*Piaractus mesopotamicus*)

Barbosa¹⁹, Saint-Paul²⁰ y Silva²¹ afirman que las diferentes especies dulceacuícolas aportan importantes ganancias económicas a diferentes regiones que poseen estos tipos de cultivo, según lo anteriormente expuesto, se puede resaltar la importancia de las especies de la familia Characidae, subfamilia Serrasalminae, las cuales presentan gran crecimiento y adaptabilidad al medio en cautiverio, en función de su hábito alimenticio omnívoro, rusticidad, fecundidad elevada, fácil adaptación al alimento artificial y aceptación en el mercado, según lo expresado por Castagnolli y Fontes²². En el Brasil, se cultivan tres especies: el tambaqui, *Colossoma macropomum* (CUVIER 1818): la piratinga *C. brachypomum* (CUVIER 1818), ambas originarias de la Cuenca Amazónica, y el Pacú, *Piaractus mesopotamicus*, encontrado desde la Cuenca del río Orinoco en Venezuela, hasta la Cuenca del río de la plata en el Uruguay. Siendo esta última la más aceptada en el mercado (Figura 1).

Figura 1. Juvenil de Pacu (*Piaractus mesopotamicus*).



¹⁹ BARBOSA, J.M. Síntese dos trabalhos realizados com espécies do gênero *Colossoma*. São Paulo, Brasil: esditorial Pirassununga, 1986, p. 3.

²⁰ SAINT-PAUL, U. Potential for aquaculture of south American freshwater fishes, Jaboticabal, Brasil : Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da Universidade Estadual Paulista, 1986, p. 40.

²¹ SILVA, A. J. 1985. Aspectos da alimentação de pacú adulto, (*Colossoma mitrei* BERG, 1985; PISCES, CHARACIDAE), NO PANTANAL DE MATO GROSSO. Dissertação de mestrado. Universidade Federal do Rio de Janeiro, Brasil, 1999, p. 80.

²² CASTAGNOLLI, N. e FONTES, S. Consolidação do conhecimento adquirido sobre o pacú (*Colossoma mitrei*, BERG, 1985). Jaboticabal, Brasil: Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da Universidade Estadual Paulista, 1985, p. 20.

4.2 PARASITOSIS POR CRUSTÁCEOS

De acuerdo con Ranzani, et al²³, la parasitosis por crustáceos puede causar muerte de alevinos y adultos en pisciculturas, debido a que son vectores de enfermedades de etiología bacteriana y viral. Los peces pueden ser parasitados por crustáceos de las sub-classes Copépoda, Branchyura y Malacostraca.

4.3 BRANQUIUROS, CICLO VITAL, SINTOMATOLOGIA E IMPORTANCIA ECONÓMICA

Phylum	:	Arthropoda
Clase	:	Crustácea
Subclase	:	Branchyura
Géneros	:	Dolops, Argulus
Especie	:	carvalhoi
N. científico	:	<i>Dolops carvalhoi</i>
N. común	:	Piojo de los peces

Según Pavanelli et al²⁴, son ectoparásitos de peces que pueden llegar a medir hasta 13 mm (Figura 2), responsables, en grandes concentraciones, por perjuicios significativos en los animales parasitados. Los branquiuros son encontrados en todas las regiones del planeta, siendo, algunas especies, probablemente diseminadas por el hombre. La localización y ciclo vital descritos por Pavanelli et al²⁵; Kabata,²⁶ y Noga,²⁷ se encuentran en tejidos de la piel, pudiendo también ser encontrados en la boca y cavidad branquial. El ciclo de vida es directo; su reproducción tiene lugar en países extratropicales en primavera y verano. Las hembras, después de ser fecundadas, colocan los huevos que son de color amarillo limón en substratos como plantas o piedras; la eclosión dura treinta días. Los estadios de nauplio, metanauplio y primer copepodito se desarrollan en el interior del huevo. El segundo estadio de copepodito es similar en características al adulto pero busca activamente un pez hospedador, generalmente del género Characidae. Los branquiuros pueden ser transmitidos de un pez a otro a lo largo de sus vidas. De acuerdo con Pavanelli²⁸ los animales afectados tienen alteración en la coloración, debido a que las toxinas de los parásitos actúan sobre los

²³ RANZANI-PAIVA, Maria; MASSATO T., Ricardo e PEREZ, Maria. Sanidade de organismos aquáticos. São Paulo, Brasl : Varela, 2004, p. 190.

²⁴ PAVANELLI, G. et al., Op cit., p. 80.

²⁵ Ibid., p. 81.

²⁶ KABATA, Z. Copepoda and Branchiura. In: Margolis, L., Kabata, Z. editors: Guide to the parasites of fishes of Canadá. Part II. Crustacea, Canadian Special Publication, *Fisheries Aquatic Science*, n. 101, p. 3-27, 1988.

²⁷ NOGA, E.J. Fish Disease. *Diagnosis and Treatment*. St. Louis, Missouri: Mosby-Year Book, Inc., 1996.

²⁸ PAVANELLI, G. et al., Op. cit., p. 91.

cromatóforos de los peces, cambiando el padrón de coloración, dando una apariencia en ocasiones, casi negras. Otros síntomas están ligados a pérdida de peso y cambios comportamentales. Los parásitos, al alimentarse, realizan movimientos con las patas dañando la piel e introducen el estilete en el tegumento de los hospedaderos para succionar la sangre e inocular enzimas digestivas que, además de ser tóxicas, tienen acción citolítica, provocando lesiones ulcerosas. Igualmente Brown²⁹, comprobó, que los peces afectados presentan signos de irritación, letárgica y pérdida de condición corporal. Según Rodríguez³⁰, la importancia de las parasitosis es debida a la disminución de la rentabilidad de la explotación por mortalidad o por menor incremento de peso. Pavanelli³¹, afirma que, la gran mayoría de los problemas sanitarios que poseen los piscicultores provienen de la dificultad en definir las medidas profilácticas y terapéuticas adecuadas, incrementando el uso de medicamentos.

Figura 2. Ejemplar *Dolops Carvalhoi*



4.4 DIFLUBENZURON

Es un insecticida fisiológico del orden de los organofosforados clase IV (poco peligroso) regulador de crecimiento de artrópodos, que interfiere en la deposición de quitina, uno de los principales componentes de la cutícula de los insectos; posterior a la ingestión de diflubenzuron®, las larvas tienen dificultades en la realización de la muda; La cutícula mal formada en el nuevo instar no soporta la presión interna y no consigue dar suficiente soporte a los músculos y finalmente conduce a la muerte de las larvas. El modo de acción de este organofosforado,

²⁹ BROWN, L., Op. cit., p. 123.

³⁰ RODRIGUEZ, Horacio. Prevención y tratamiento de las enfermedades en cultivos de agua dulce. Fundamentos de acuicultura continental. Instituto Nacional de Pesca y Acuicultura INPA, Santafé de Bogotá, Colombia, 1991, p. 141.

³¹ PAVANELLI, G; EIRAS, J e TAKEMOTO, R. Doenças de peixes: Profilaxia, diagnóstico e tratamento. Paraná, Brasil: Universidade Estadual de Maringá, 2002. p. 91.

también puede originar efectos ovicidas por interferir en la deposición de quitina en las larvas en desarrollo dentro de los huevos. Es importante destacar que en los insectos adultos su afección no es de forma letal. Moshen & Mulla³², relataron que varias larvas de dípteros exhibieron muda incompleta después de 15 minutos de exposición a 100µg/L de diflubenzuron®. Según Colwell & Schaefer citados por Onaka³³ realizaron varios estudios sobre los efectos en peces; indicando que, la CL50 96h fue generalmente mayor a 50.0000µg/L; posteriormente investigaron la bioconcentración en *Ictalurus nebulosus* y en *Pomoxis nigromaculatus*. Los residuos de este químico variaron de 291 a 466ng/g de tejido en las dos especies un día después al tratamiento. Siete días después al tratamiento, los niveles residuales del diflubenzuron® fueron indetectables. Hansem & Garton y Ali & Mulla; citados por Onaka³⁴ describieron que poblaciones de especies de oligoquetos y coleópteros no fueron significativamente reducidas después de la exposición de dosis mayores ó iguales a 4 µg/L y menores o iguales a 50 µg/L de DFB, respectivamente. Con todo Ali & Lord citado por Onaka³⁵ reportaron que larvas de coleópteros fueron completamente eliminados 24 días después de la exposición a dosis de DFB mayores o iguales a 6 µg/L. Tres estudios concluyeron que especies de caracoles (Gastropoda) no fueron afectados en concentraciones de hasta 50 µg/L.

La utilización de este producto en el tratamiento de parasitosis provocadas por crustáceos en peces fue revisada por Roth et al³⁶ señalando el cuidado en la aplicación debido a problemas ambientales, sin embargo Tanner & Moffett³⁷ relatan su aprobación por la EPA (Environmental Protection Agency). Ludwig³⁸ evaluó el efecto del triclorfón, fention y diflubenzuron® en el manejo de estanque para bagre rayado y sus híbridos, verificando una menor sobrevivencia de los peces en los estanque tratados con diflubenzuron®, debido a la menor disponibilidad de organismos planctónico; según Schaefer & Dupras^{39,40}, es de

³² MOHSEN, Z.H. y MULLA, M.S. Field evaluation of *Simulium* larvicides: effects on target and nontarget insects. Environ. Entomol., v. 11, n. 390, 1982.

³³ ONAKA, Eduardo. Utilização e efeitos do diflubenzuron® em ecossistemas aquáticos. Disciplina, agrotóxicos e aquacultura. Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, estado do Sao Paulo, Brasil 2.002. p. 5.

³⁴ Ibid., p. 10.

³⁵ Ibid., p. 11.

³⁶ ROTH, M.; RICHARDS, R.H.; SOMMERVILLE, C. Current practices in the chemotherapeutic control of sea lice infestations in aquaculture: a review. Journal of Fish Diseases v.16, n.1, p. 1-26, 1993.

³⁷ TANNER, D.K.; MOFFETT, M.F. Effects of diflubenzuron® on the reproductive success of the bluegill sunfish, *Lepomis macrochirus*. Environmental Toxicology and Chemistry, v. 14, p. 1345-1355, 1995.

³⁸ LUDWIG, G.M. Effects of trichlorfon, fenthion and diflubenzuron® on the zooplankton community and on production of reciprocal-cross hybrid striped bass fry culture ponds. Aquaculture, v. 110, p. 301-319, 1993.

³⁹ SCHAEFER, C.H.; DUPRAS, E.F., Jr. Factors affecting the stability of Dimilin in water and the persistence of Dimilin in field waters. J. Agr. Food. Chem., v. 24, n. 733, 1976a.

considerar que pese a estos inconvenientes el insecticida posee una gran estabilidad sobre las plantas y una curva de degradación favorable en agua dulce y en el suelo debido a la hidrólisis y absorción por la materia orgánica.

4.5 SITUACIÓN ACTUAL DE LA HEMATOLOGÍA

Oria⁴¹ afirma, que los estudios hematológicos de peces de aguas cálidas, tuvieron inicio en el siglo pasado con las observaciones de Gulliver en 1845 y 1846 sobre eritrocitos. Por otra parte Ellis⁴² afirma que, las primeras descripciones sobre leucocitos fueron más tardías con los aportes a inicios del siglo pasado, de Drzewina en 1905, 1909, 1911 y de Jordan en 1926. En el Brasil, el estudio de las variables hematológicas de teleósteos, las desarrollo Oria en 1932, quien describió características morfométricas de eritrocitos en 24 especies de cinco familias de teleósteos brasileiros⁴³. A pesar de la gran importancia de la hematología todavía es escasa la información disponible y corresponde a un bajo porcentaje de especies ícticas. Houston estima que de 50 a 100 nuevos artículos son publicados anualmente. Sin embargo esas contribuciones tienen origen en diferentes países si se considera la diversidad biológica existente en la zona intertropical donde se sitúa Brasil; por ello, las investigaciones realizadas en el Centro de Acuicultura de la Universidad Estatal Paulista (Tabla 2), toman como referencia los reportes de otros autores, y con base en ello inferir comparativamente en los eritrogramas de otros peces (Tabla 1).

Tabla 1. Valores medios del eritrograma en el ciclóstomo pez-bruja *Myxine glutinosa* (Wintrobe, 1934), en peces cartilagosos (rayas y tiburones) y en teleósteos marinos, de la costa sur del Brasil (Wilhelm Filho et al., 1992).

Parámetros	Cyclostoma	Rayas	Tiburones	Teleósteos
Eritrocitos ($\times 10^6/\mu\text{L}$)	0,140 \pm 0,0	0,288 \pm 0,09	0,403 \pm 0,12	2,289 \pm 0,9
Hemoglobina (g/dL)	4,6 \pm 0,0	7,5 \pm 2,3	10,9 \pm 4,5	13,4 \pm 5,8
Hematocrito (%)	22,0 \pm 0,0	17,9 \pm 3,3	24,8 \pm 5,5	41,0 \pm 14,3
VCM (fL)	1530,0 \pm 0,0	676,5 \pm 194,2	686,8 \pm 305,5	200,0 \pm 89,8
CHCM (g/dL)	21,0 \pm 0,0	188,4 \pm 59,3	185,0 \pm 80,4	39,1 \pm 13,0

TAVARES-DIAS, Marcos & MORAIS, Flávio. Hematología de peixes teleósteos. São Paulo : Jaboticabal, Brasil, 2004, p. 19.

⁴⁰ SCHAEFER, C.H.; DUPRAS, E.F., Jr. Residues of difluburon [1-(4-Chlorophenyl)-3-(2,6-difluorobenzoyl)urea] in pasture soil, vegetation, and water falling aerial application. J. Agr. Food. Chem., v. 25, n. 1026, 1977.

⁴¹ ORIA, J. Elementos figurados do sangue de alguns teleósteos fluviais brasileiros (Nematognathas, characidáeos, Gymnotideos, poeciliídeos). I. Eritrócitos: formas normais, formas jovens e formas involuídas. São Paulo : Facu/Med. 1932, p. 30

⁴² ELIS, A. Leucocytes and related cells in the plaice, *Pleuronectes platessa*. J. Fish Vol. 1997p. 10.

⁴³ TAVARES-DIAS, Marcos & MORAIS, Flávio. Hematología de peixes teleósteos. São Paulo : Jaboticabal, Brasil, 2004, p. 7.

Tabla 2. Hemograma en diferentes especies de la familia Characidae de importancia económica. Erit. = Eritrocitos; Hb = Hemoglobina; Hct = Hematocrito; VCM = Volumen corpuscular medio; CHCM = Concentración de hemoglobina corpuscular medio; - = No hay información.

Familia/especies	Ambiente	Erit. (10 ⁶ /μL)	Hb (g/dL)	Hto (%)	VCM (fL)	CHCM (g/dL)	Lin (%)	Het (%)	Mon (%)	CGE (%)	Eosi (%)	Bas (%)	Referencias
<i>Characidae</i>													
<i>Piaractus mesopotamicus</i>	Cautiverio	2,46	7,6	35,9	148,2	21,4	56,2	26,9	12,2	4,7	0,0	0,0	Ranzani-Paiva et al. (1998c)
<i>Piaractus mesopotamicus</i>	Cautiverio	1,63	8,1	36,2	224,7	50,5	92,0	4,0	4,0	0,0	0,0	0,0	Ranzani-Paiva et al. (1998d)
<i>Piaractus mesopotamicus</i>	Cautiverio	3,13	8,3	28,2	-	-	54,1	10,9	10,9	9,9	6,7	0,3	Ranzani-Paiva et al. (1998d)
<i>Colossoma macropomum</i>	Cautiverio	1,31	8,5	32,8	292,9	26,2	36,1	60,3	3,3	0,3	0,0	0,0	Tavares-Dias et al. (1998)
<i>Colossoma macropomum</i>	Cautiverio	2,83	11,3	41,6	150,0	27,7	78,8	2,1	2,6	0,9	13,6	0,0	Tavares-Dias et al. (1998a)
<i>Colossoma macropomum</i>	Cautiverio	1,53	5,6	25,4	166,9	37,2	-	-	-	-	-	-	Ranzani-Paiva et al. (1998/1999)
<i>Brycon cephalus</i>	Cautiverio	2,91	10,9	39,0	134,8	28,8	51,5	34,5	14,0	0,0	0,0	0,0	Tavares-Dias et al. (1999c)
<i>Brycon cephalus</i>	Cautiverio	-	11,4	42,7	-	27,7	-	-	-	-	-	-	Tavares-Dias (2000)
<i>Brycon cephalus</i>	Cautiverio	3,02	10,9	47,0	156,7	23,0	-	-	-	-	-	-	Carneiro (2001)
<i>Brycon sp.</i>	Cautiverio	2,08	10,6	42,4	207,0	25,2	-	-	-	-	-	-	Ranzani-Paiva et al. (1991a)
<i>Brycon sp.</i>	Cautiverio	1,78	8,0	33,5	186,5	24,2	-	-	-	-	-	-	Ranzani-Paiva et al. (199a1)
<i>Híbrido tambacu</i>	Cautiverio	-	12,7	40,2	-	31,5	63,4	19,3	9,3	3,6	4,4	0,0	Tavares-Dias et al. (2000c)
<i>Híbrido tambacu</i>	Cautiverio	-	13,1	38,8	-	35,4	-	-	-	-	-	-	Tavares-Dias (2000)

*TAVARES, Marcos & MORAIS, Flávio. Hematología de peixes teleósteos. São Paulo : Jaboticabal, Brasil, 2004, p. 23 y 49.

4.6 ORIGEN Y DESARROLLO DE LAS CÉLULAS SANGUÍNEAS EN LOS PECES TELEOSTEOS

Según Tavares-Días & Moraes⁴⁴ exponen que, en la literatura son divergentes las opiniones sobre el origen y desarrollo de las células sanguíneas en los órganos hemapoyéticos. Downey (1909) estudiando el tejido renal de *Polyodon spathula* (Polyodontidae, Acipenseriformes) observó pequeños y grandes linfocitos, así como pequeños y grandes Monocitos y concluyó que los linfocitos se desarrollaran formando los pequeños Monocitos. Jordan & Speidle propusieron la idea de que el linfocito sería la célula pluripotente para todos los tipos de células sanguíneas, denominada teoría monofilética. En contraste Duthie propuso que una célula pluripotente denominada hemoblasto linfoide originaría los granulocitos por transformación directa. Después por división mitótica se formarían los pequeños hemoblastos linfoides, los cuales originan a los eritrocitos, trombocitos y linfocitos.

En los peces cartilaginosos *Scyliorhynchus stellaris* (Scyliorhinidae, Carcharhiniformes) e torpedo marmorata (Torpedinidae, Torpediniformes) los trombocitos se originan en el bazo a partir de protrombocitos (Pica et al.). Weinreb (1963) sugiere que, debido a la gran semejanza estructural entre trombocitos e linfocitos, en los teleósteos, posiblemente tengan el mismo precursor directo. Al contrario, Gardner & Yevich proponen que los pequeños linfocitos son antecesores de los trombocitos. Actualmente, Ellis considera que el proeritroblasto es la célula fuente pluripotente que da origen a los eritrocitos. La propuesta de Catón en 1.951 para la formación de estas células a partir de pequeños hemoblastos linfoides, fue confirmada mas tarde. La eritropoyesis en el bazo y el riñón del teleósteo *Channa punctatus* fue estudiada en cada estadio de desarrollo con especial atención a la morfología, morfometría y histoquímica. A partir de un pequeño hemoblasto linfoide (célula fuente potente) se desarrolla el eritoblasto basofílico (3,7 µm), una célula mayor que la anterior (4,2 µm) y posteriormente se transforma en eritoblasto policromatofílico (4,9µm). En el cuarto estadio la célula fue denominada eritoblasto acidofilo (6,0µm) a partir de ese estadio se forman los reticulocitos jóvenes que ya maduros se transforman en eritrocitos. En los reticulocitos la cantidad de hemoglobina es variable, de acuerdo con la maduración (Mahajan & Dheer, 1980). Estudio similar corrobora en elucidación de esos estadios de desarrollo de los eritrocitos en *Oreochromis niloticus* y *Cirrinus mrigala* (Maiti et al., 2000). Se ha demostrado que en los teleósteos, con la maduración los hematíes aumentan de volumen progresivamente, mientras que en los mamíferos ocurre lo inverso.

La nomenclatura adaptada por Mahajan & Dheer en 1980 y Maiti et al. 2000 para las fases de desarrollo de los eritrocitos en peces es similar a la usada para mamíferos, según se observa en el siguiente esquema (Figura 3).

⁴⁴ TAVARES, Marcos & MORAIS, Flávio. Op cit., p 15.

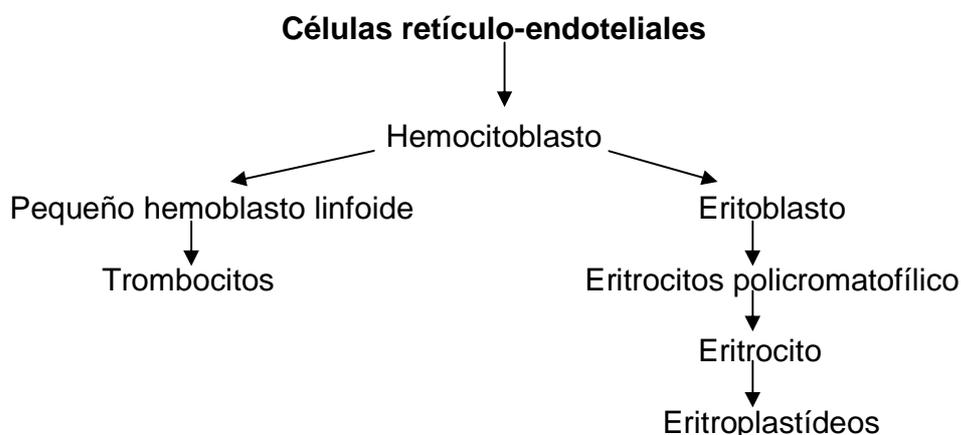
Figura 3. Esquema de las diversas fases de maduración eritrocitaria en peces teleósteos adaptado por (Majan & Dheer 1980) y (Maiti et al., 2000).



*TAVARES, Marcos & MORAIS, Flávio. Hematologia de peixes teleósteos. São Paulo : Jaboticabal, Brasil, 2004, p. 15.

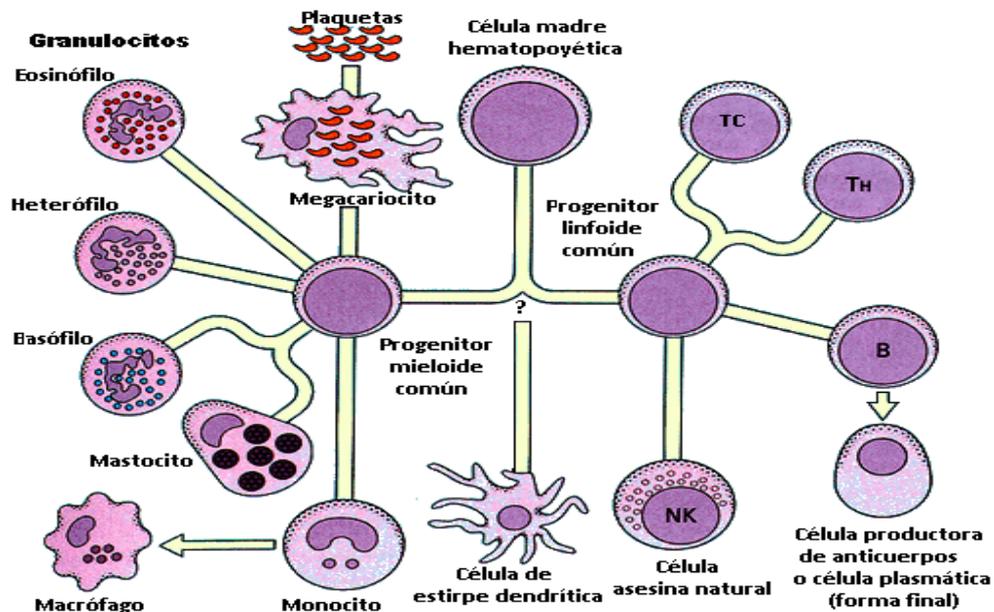
Boomker (1980) sugirió que en los peces teleósteos los hemocitoblastos son las células precursoras del linaje eritrocitario y trombocitario y los hemoblastos, a su vez, se originan de células retículo-endoteliales (Figura 4). De igual manera se puede observar el desarrollo de leucocitos en la Figura 5.

Figura 4. Representación esquemática de la eritropoyesis y trombopoyesis en *Clarias gariepinus* y *Oreochromis mossambicus* (Boomker, 1980).



*TAVARES, Marcos & MORAIS, Flávio. Hematologia de peixes teleósteos. São Paulo : Jaboticabal, Brasil, 2004, p. 16.

Figura 5. Origen de las células que intervienen en la respuesta inmune



*JARAMILLO, Nicolás. Estudio hematológico básico del puye (*Galaxias maculatus*) (Jenyns, 1842) en estado pos larval y adulto. Trabajo de grado Licenciado en Ciencias de la Acuicultura. Universidad Católica de Temuco., Facultad de Recursos Naturales; Escuela de Acuicultura, 2005. p. 12.

4.7 HEMATOLOGÍA DE PECES

De acuerdo con Ranzani et al.⁴⁵, la hematología de los peces es un instrumento necesario en el conocimiento de las modificaciones fisiológicas que ocurren en los peces, causadas principalmente por factores internos como el sexo, estadio de maduración gonadal, edad, modo de vida, y por alteraciones de factores físico-químicos del agua como el oxígeno disuelto, temperatura y pH.

4.8 PREPARACIÓN, VISUALIZACIÓN Y CARACTERÍSTICAS DE FROTIS SANGUÍNEOS

Según Casas, et al.⁴⁶, existen varios protocolos para la realización de frotis sanguíneo; el más usado es el del portaobjetos, el cual se basa en hacer una extensión sobre un portaobjetos con la ayuda de otro. Es la técnica más habitual por ser más fácil, cómoda de realizar y manejable. Estos extendidos presentan

⁴⁵ RANZANI, M. et al., Op cit., p 89.

⁴⁶ CASAS, A. et al. Laboratorio clínico: Hematología. España : McGRAW-HILL-INTERAMERICANA, p. 217-223.

una formación de una fina película de sangre sobre la superficie de la placa, de forma tal que pueda ser observada al microscopio sin que las células se superpongan entre sí. En un frotis correctamente realizado se deben distinguir tres zonas claramente diferenciadas:

- **Cabeza:** zona más gruesa donde estaba colocada la sangre.
- **Cuerpo:** la mayor parte de la extensión de espesor uniforme.
- **Cola:** zona final delgada y deshilachada, formando flecos.
Terminado en forma redondeada.

La extensión no debe llegar a los bordes del portaobjetos porque las células más voluminosas quedarían en ellos, por ello se tendrá en cuenta el tamaño de la gota y el ángulo con que se lo realice; igualmente, evitar la presencia de vacuolas o agujeros sin sangre lo cual indicaría la presencia de grasa. En el mismo sentido los bordes de la placa con la que se realiza la extensión deben estar esmerilados para evitar la presencia de estrías en el cuerpo. Una vez preparada la extensión, debe ser teñida para poder diferenciar los distintos tipos de estructuras. Una tinción puede reportar gran cantidad de información. Sirve tanto para dar un diagnóstico, como para seguir la evolución de un proceso patológico. Se puede estudiar en ellos la morfología de leucocitos, hematíes y plaquetas, fórmula leucocitaria y recuento de reticulocitos.

4.9 TINCIONES HEMATOLOGICAS

Según su composición química se distinguen tres grupos de colorantes: los ácidos, como la eosina, los básicos, como el azul de metileno y los neutros, que son combinaciones de un ácido y un básico que dan tinciones policromas. Las distintas estructuras celulares se teñirán con el colorante de pH antagónico. Así, los colorantes ácidos teñirán las estructuras básicas como la hemoglobina o los gránulos de los leucocitos, eosinófilos, así llamados por su atracción hacia la eosina. Los colorantes básicos teñirán las estructuras ácidas, como el ADN y el ARN citoplasmáticas, denominadas estructuras basófilas; y las estructuras neutrófilas serán aquellas que tienen afinidad por ambos tipos de colorantes.

Existen diversos métodos de tinción basados en el uso de estos colorantes; el más común en estudios hematológicos de peces es el colorante de Wright, compuesto por eosinato de azul de metileno en polvo (0,1g por cada 60ml de alcohol metílico absoluto); también se utiliza el colorante del método de Giemsa (polvo eosinato de azur II, azur II, glicerol puro y metanol a partes iguales); método de May-Grümwald (eosinato de azul de etileno, 0,5g por cada 100ml de alcohol metílico) y Método de May-Grümwald-Giemsa (Panóptico-Pappenheim; combinación de las soluciones de May-Grümwald y de Giemsa) y su modificación según Rosenfeld 1947 en un solo colorante de uso rápido.

4.10 CÉLULAS SANGUÍNEAS

De acuerdo con Ranzani, et al.⁴⁷; Silveira, R. et al.⁴⁸ Valenzuela, A. et al.⁴⁹ Canello, S. y Moraes F.⁵⁰ Canello, S. y Moraes F.⁵¹, las células sanguíneas de los peces se clasifican en:

4.10.1 Serie roja o Eritrocitos. Los eritrocitos de peces son elípticos, poseen núcleo central, con cromatina compactada, constituida por heterocromatina y sin nucléolos de tinción basófila. El citoplasma, relativamente abundante y acidófilo. El tamaño varía entre 10 – 15µm en su eje largo y de 8 – 10µm en su eje corto.

4.10.2 Serie trombocítica o Trombocitos. Los trombocitos de peces poseen formas variadas. Pueden ser elípticos, arredondados, ovals o fusiformes, con núcleo grande que acompaña el formato de la célula; cumpliendo función de coagulación sanguínea, segregan tromboplastina, enzima que polimeriza el fibrinógeno. El citoplasma es escaso y se colorea débilmente por la eosina.

4.10.3 Serie blanca o Leucocitaria. La serie leucocitaria comprende células sanguíneas tales como linfocitos, monocitos, heterófilos, eosinófilos, basófilos y células granulocíticas especiales. La clasificación y nomenclatura de estas células, caracterizadas por la presencia de gránulos en su citoplasma.

4.10.4 Linfocitos. Los linfocitos son células esféricas de tamaños variados, algunas veces presentan proyecciones citoplasmáticas que le confiere un contorno irregular. El citoplasma y puede contener gránulos azurófilos próximos al núcleo. Se dispone como un fino anillo basófilo alrededor del núcleo, el cual posee forma arredondeada, fuertemente basófilico, presenta cromatina compactada, pero no posee nucléolos. Los linfocitos circulan por todo el cuerpo a través de la sangre y

⁴⁷ RANZANI-PAIVA, et al. Op cit., p 91-95

⁴⁸ SILVEIRA, R. et al. Características morfológicas y citoquímicas de las células de la sangre periférica de *Oreochromis aureus* S. Cichlidae. Revista electrónica de veterinaria : España 2005, V. 6, n. p 3-4.

⁴⁹ VALENZUELA, A. et al. Células sanguíneas de *Schroederichthys chilensis* (Elasmobranchii, scyliorhinidae): la serie blanca. Facultad de Ciencias Naturales y Oceanográficas : Concepción, Chile, 2003. v. 67 n. 1 p. 132.

⁵⁰ CANELLO, S. y MORAES F. Contagem diferencial de leucocitos em *Piaractus mesopotamicus* Holmberg, 1887 (Osteichthyes : Characidae) infectados por *Dolops carvalhoi* (Crustacea : Branquiura) e *Anacanthorus penilabiatus* (Monogenea : Dactylogyridae) tratados con praziquantel, levamidazol e diflubenzuron®. Tese de Doutorado em aquicultura. Faculdade de Ciências Agrárias é veterinarias, Universidade Estadual Paulista. Jaboticabal, Brasil, 2006. Capítulo III p.50

⁵¹ CANELLO, Sergio y MORAES Flavio. Variáveis eritrocitárias em *Piaractus mesopotamicus* Holmberg, 1887 (Osteichthyes : Characidae) infectados por *Dolops carvalhoi* (Crustacea : Branquiura) e *Anacanthorus penilabiatus* (Monogenea : Dactylogyridae) tratados con praziquantel, levamidazol e diflubenzuron®. Tese de Doutorado em aquicultura. Faculdade de Ciências Agrárias é veterinarias, Universidade Estadual Paulista. Jaboticabal, Brasil, 2006. Capítulo IV. p. 60.

la linfa, y se congregan en los órganos linfoides⁵². También aparecen en otros tejidos del pez, como la epidermis⁵³ y tejidos afectados por procesos inflamatorios⁵⁴. En salmónidos, los linfocitos son los leucocitos mayoritarios en sangre, suponiendo el 70-90% de los mismos^{55,56}. A nivel funcional, son los responsables de la respuesta inmune específica humoral y celular, que se traduce en la producción de anticuerpos, la capacidad citolítica, el proceso de memoria inmunológica y la liberación de factores reguladores de la función inmune, como las linfocinas^{57,58}.

4.10.5 Monocitos. Los monocitos son células grandes con citoplasma azul-gris o azul brillante con tinción Giemsa, y ocasionalmente vacuolado, posee un núcleo redondo o arriñonado que ocupa entre un medio y un tercio del volumen celular, aproximadamente dos veces el tamaño de los eritrocitos. Normalmente son las células más grandes de la periferia de los peces. Bajo condiciones apropiadas, estas células parecen dejar el sistema vascular y completar su maduración en los tejidos, donde se vuelven macrófagos maduros. Así mismo, su presencia es abundante en tejidos inflamados⁵⁹.

4.10.6 Heterófilos. Son células polimorfonucleadas, de tamaño semejante a los monocitos. La cromatina nuclear es compacta y no se evidencian nucléolos. Son llamados polimorfonucleares, debido a la gran variación de las formas de su núcleo de posición excéntrico, que puede presentarse en bastón o con varias segmentaciones el citoplasma es más abundante con respecto a los linfocitos el cual se tiñe de púrpura oscuro con tinción de Giemsa o Wright, y por la presencia de un gran citoplasma pálido en el que se distinguen gránulos que varían desde el gris, al rosa pálido. Los gránulos son de forma redonda u ovalada, variables de tamaño y electrónicamente densos⁶⁰.

4.10.7 Eosinófilos. Estas células tienen tamaño que por lo general varía entre 4,5 – 15µm de diámetro, correspondiendo de un 2 – 3% del total de leucocitos posee núcleo redondeado, excéntrico y algunos casos segmentado. El

⁵² ROBERTS, R.J. The immunology of Teleost. En: *Fish Pathology*. Baillière Tindall. London. 1989 p. 140.

⁵³ PELETEIRO, M.C. y RICHARDS, R.H. Identification of lymphocytes in the epidermis of the rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson. *J. Fish Dis.*, 8: 1985. p.169.

⁵⁴ HIBIYA, T. *An Atlas of Fish Histology. Normal and Pathological Features*. Gustav Fischer Verlag. Stuttgart. 1994. p. 55

⁵⁵ ELLIS, A. The leucocytes of fish: A review. *J. Fish Biol.*, 11: 1977 p. 461.

⁵⁶ Ibid., p. 60

⁵⁷ CAMPBELL, T. and MURRU, F. An introduction to fish hematology. *The compendium-Small Animal*, 12: 1990. p. 530

⁵⁸ YOSHINAGA, K., OKAMOTO, N., KURATA, O. and IKEDA, Y. Individual variations of Natural Killer activity of rainbow trout leucocytes against IPN virus-infected and uninfected RTG-2 cells. *Fish Pathol.*, 29: 1994. p. 3

⁵⁹ CAMPEL Op cit., p. 521

⁶⁰ Ibid., p. 522.

citoplasma es abundante y rico en gránulos de forma alargada o esférica, con coloración rosa-anaranjados (gránulos eosinofílicos). Esta célula es escasa en la sangre de la periferia de teleósteos, siendo más abundante en el tejido hematopoyético, sub-mucosa intestinal, líquido peritoneal, mesenterio y branquias.

4.10.8 Basófilos. Son células más pequeñas que los heterófilos aproximadamente 8µm de diámetro, que constituyen no más del 0,1% del total de leucocitos, con núcleo arredondeado o segmentado. La forma del núcleo, es similar a la forma de la célula; presenta cromatina compacta y no posee nucléolos. El citoplasma presenta granulaciones basofílicas, que recubren el núcleo en la mayoría de las veces. La función de los basófilos de peces no está bien definida y parece estar ligada a los procesos de detoxificación.

4.10.9 Células Granulocíticas Especiales (CGE) o leucocito granular PAS-positivo (LG-PAS). Se caracteriza por ser una célula grande, similar a los heterófilos; presentan contorno regular bien definido y núcleo pequeño ocupando 1/3 de la célula, de posición excéntrico, redondeado o ligeramente alargado, contiene cromatina densa y no se observa presencia de nucléolo. Posee citoplasma abundante, y rico en granulaciones claras y transparentes ala tinción con May- Grünwald -Giemsa-Wright el cual se extienden homogéneamente por toda la membrana celular.

4.11 TÉCNICAS DE EVALUACIÓN DEL CUADRO HEMATOLÓGICO

De acuerdo con Casas, et al⁶¹ y Jaramillo, N.⁶², existen técnicas básicas que permiten ofrecer datos de laboratorio de gran interés para determinar el estado de salud o enfermedad de los peces.

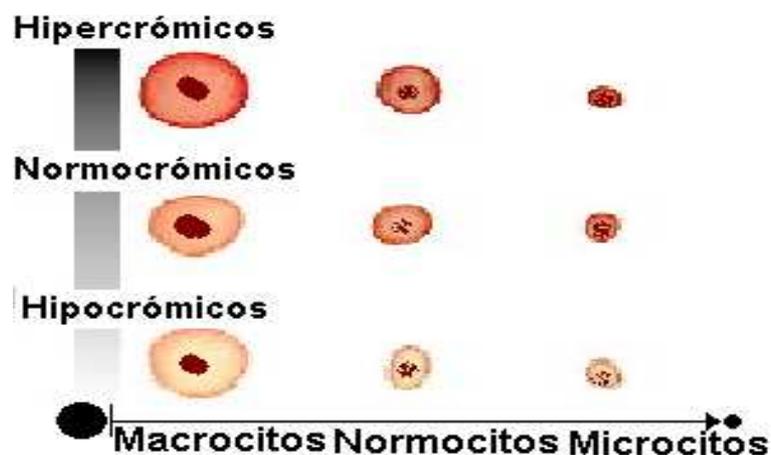
4.11.1 Técnicas cuantitativas. Se refiere principalmente al recuento de eritrocitos, leucocitos, plaquetas, determinación de hematocrito y hemoglobina, con base a los datos anteriores se calcularon los índices hematológicos como el VCM el cual mide el volumen ocupado por un eritrocito medio en la sangre periférica indicando la función respiratoria; los glóbulos rojos que poseen un tamaño o volumen normal (normal VCM) se denominan **normocitos**, si es elevado, se denominan **macroцитos** y se denominan **microцитos** si el volumen es bajo; la HCM la cual determina la masa de la hemoglobina de un eritrocito, permite visualizar la dinámica cardíaca y el estado osmoregulatorio; y el CHCM

⁶¹ CASAS, A. et al. Op cit., p. 212-217.

⁶² JARAMILLO, Nicolas. Estudio hematológico básico del puye (*Galaxias maculatus*) (Jenyns, 1842) en estado poslarval y adulto. Trabajo de grado Licenciado en Ciencias de la Acuicultura. Universidad Católica de Temuco., Facultad de Recursos Naturales; Escuela de Acuicultura, 2005. p. 9 -18

indicador de la cantidad ocupada de hemoglobina de un eritrocito promedio; los hematíes que tienen un contenido normal de hemoglobina (CHCM) se denominan **normocrómicos**. Mientras que se nombran **hipocrómicos** o **hipercrómicos** cuando el contenido de hemoglobina es bajo o alto, respectivamente^{63,64}. Los recuentos se pueden hacer de forma manual o automática. Ambos son métodos cuantitativos que pretenden conocer la cantidad de células en cada milímetro cúbico o microlitro de sangre⁶⁵ (Figura 6). Las técnicas manuales de recuento en cámara son cada vez menos utilizadas por tener una serie de desventajas con respecto a las automáticas como son: mayor lentitud, menor precisión y menor confiabilidad. Debido a ello, se han desarrollado únicamente las técnicas automáticas.

Figura 6. Representación de los tipos de anemias.



*Rodríguez, Jesús. Evaluación fisiológica de deportistas de alto nivel. 2000 Disponible en Internet, URL: <http://www.ugr.es/jhuertas/EvaluacionFisiologica/VCM/mcvmchc.htm>.

4.12 HISTOLOGIA EN PECES

Albelo⁶⁶ y el Departamento de Histología y Biología Celular⁶⁷ Sostienen que la histología es la rama de anatomía que estudia la organización de los tejidos orgánicos considerando su estructura microscópica y ultra-microscópica desde el punto de vista morfológico y funcional. La parte de la histología que se reserva al estudio de los órganos, tejidos o cualquier enfermedad celular toma el nombre de histología, patológica o anatomopatología.

⁶³ Ibid., p. 12.

⁶⁴ RODRÍGUEZ, Jesús. Evaluación fisiológica de deportistas de alto nivel. 2000 Disponible en Internet, URL: <http://www.ugr.es/jhuertas/EvaluacionFisiologica/VCM/mcvmchc.htm>

⁶⁵ CASAS, A. et al. Op cit., p. 218

⁶⁶ ALBELO, A. Ilen Histología. En: Gran Enciclopedia Médica. Madrid: Interamericana, 1980. p. 1207.

⁶⁷ Universidad de Guadalajara: Departamento de histología y biología celular, 2005. Disponible en Internet, URL: <http://www.uag.mx/27/histologia/import.htm>.

4.12.1 Tejido epitelial. Rodríguez⁶⁸ y Crespo⁶⁹ reportan, que la piel de los peces está constituida por una fina epidermis con células mucosas, membrana basal o tejido conjuntivo flexible y dermis superficial fina. La piel contiene una membrana con pigmentos concentrados principalmente en determinadas regiones como la línea lateral, manchas oculares o epiteliales. La parte interna de la dermis está formada por fibras de colágeno y se divide en; una externa con fibras longitudinales finas y empacadas y una interna con fibras longitudinales unidas, largas y rectas. Las fibras de colágeno se presentan en grandes cantidades en la línea lateral y en la parte interna de la dermis entre unas dos capas de fibras de colágeno y una franja espesa de pigmentos de color castaño oscuro.

4.12.2 Tejido branquial. Machado⁷⁰ y Crespo⁷¹ sostienen, que el conocimiento de los aspectos morfológicos de branquias de peces puede ofrecer conocimientos a proyectos de impacto ambiental, teniendo en cuenta que este órgano mediante el cual se realiza la toma de oxígeno y eliminación de desechos está en contacto directo con el agua. La morfología de branquias se investiga usando microscopios ópticos las laminillas branquiales respiratorias son constituidas por una capa de células epiteliales o células pilares que delimitan los espacios sanguíneos como los espacios inter-laminares y en el ápice de los filamentos se encuentra las células productoras de mucus.

4.12.3 Tejido hepático. Iregui⁷² y Crespo⁷³ reportan, describe que el hígado es una glándula reticulotubular cubierta por una membrana serosa. Los hepatocitos son poligonales con núcleos esféricos y usualmente un solo núcleo. Los hepatocitos contienen cantidades considerables de lípidos y glicógeno.

4.12.4 Tejido renal. Según Iregui⁷⁴ y Crespo⁷⁵, el riñón corre de la región dorsal de la cavidad corporal, ventral a la aorta dorsal y por encima de la vejiga natatoria. Este se encuentra fusionado en la parte medial, pero permanece como dos estructuras separadas: craneal y caudal. El riñón craneal se encuentra el tejido hematopoyético y algunos túbulos renales. En el riñón caudal se encuentra la mayor parte de las estructuras excretorias propias del órgano: las nefronas. En las

⁶⁸ RODRÍGUEZ, Byron. Análisis Microscópica de piel en peces. Brasil: Minus,1995. p.105.

⁶⁹ CRESPO, Silvia. Introducción a la histología e histopatología de peces. Acuicultura marina: fundamentos biológicos y tecnología de la producción. Universidad de Barcelona. Facultad de Veterinaria. España: Barcelona, 1993. p. 576.

⁷⁰ MACHADO, Stevan. Descripción Histológica y Estructural de Branquias. Universidad Federal de Panamá. Departamento de Biología Celular. Panamá: Faros, 1992. p. 96.

⁷¹ CRESPO, Silvia. Op cit., p. 577.

⁷² IREGUI, Carlos. Morfología de los peces. En: Memorias del 2º Curso seminario internacional de ictiopatología. Bogotá: Universidad Nacional de Colombia, Grupo de Patología Veterinaria, 2008. p. 19.

⁷³ CRESPO, Silvia. Op cit., p. 580.

⁷⁴ IREGUI, Carlos. Op cit., p. 29.

⁷⁵ CRESPO, Silvia. Op cit., p. 577.

márgenes laterales de este se localizan los corpúsculos de Stannius. Cada nefrona está compuesta por un corpúsculo renal o glomérulo y de un sistema tubular.

5. DISEÑO METODOLÓGICO

5.1 LOCALIZACIÓN

El trabajo de campo fue desarrollado en el Laboratorio de Patología de Organismos Acuáticos del Centro de Acuicultura (**CAUNESP**) de la Universidad Estatal Paulista, Facultad de Ciencias Agrarias y Veterinarias (**FACAV/UNESP**), Campus de Jaboticabal, Estado de San Paulo, Brasil; con clima mesotérmico, verano húmedo e invierno seco, humedad relativa de 70,6 %; altitud de 595 m.s.n.m., posee una pluviosidad anual de 1285 mm y coordenadas 21°15'22" latitud sur y 48°18'58" longitud oeste⁷⁶.

5.2 MATERIAL BIOLÓGICO Y UNIDADES EXPERIMENTALES

Se evaluaron 84 juveniles sanos de Pacú (*Piaractus mesopotamicus*) con un peso aproximado de 73,68±16,9 gr y una longitud total de 15,41±1,31 cm (Figura 7) y 2.730 parásitos juveniles de *Dolops carvalhoi*.

Figura 7. Ejemplares de pacú (*Piaractus mesopotamicus*).



Se utilizaron 18 tanques circulares de plástico con capacidad de 310L y sistema de recambio inferior; entrada de agua constante en tubería de ¾" de pulgada de diámetro (Figura 8). Sistema de aireación constante mediante un blower 1,5 hp y tubería PVC de una pulgada de diámetro (Figura 6). La distribución de oxígeno a

⁷⁶ MAIGUAL, Yemal. Evaluación de la toxicidad aguda del malathion en alevinos de tilapia nilotica *Oreochromis niloticus* (Linnaeus, 1758) en ausencia y presencia de sedimentos y análisis residuo por cromatografía gaseosa. Tesis de grado (Ingeniero en Producción Acuícola). Pasto, Colombia: Universidad de Nariño, Facultad de Ciencias Pecuarias, Programa de Ingeniería en Producción Acuícola, 2007. p. 41

los tanques se realizó con manguera plástica de 3 mm de diámetro y piedras difusoras.

Figura 8. Tanques circulares y equipo de aireación (Blower 1,5 hp.)



5.3 EQUIPOS, MATERIALES Y REACTIVOS

5.3.1 Equipos. Los equipos utilizados durante la fase experimental fueron:

- Balanzas: Modelos MFI-3 0,0 gr; AS2000C 0,0000gr y FILIZOLA-8001; 13 kg \pm 0.0 5g
- Equipo digital para medir conductividad y temperatura: "YSI" modelo 63
- Equipo electrómetro para medir pH: Modelo PM-602 ANALION; \pm 0.01
- Oxímetro: Digital "YSI" modelo 52
- Microscópio óptico acoplado a cámara fotográfica: Coleman[®] modelo XT-CT2
- Contador automático de células hematológicas: CEL- modelo CC-550 serie 1414 selm con diluidor automático modelo DA 500 P6, serie 4407 selm.
- Cámara digital: Canon Power Shot A310

5.3.2 Materiales. Los materiales empleados durante la fase experimental fueron:

- 90 Jeringas de 5ml con émbolo de caucho
- 90 Aguja hipodérmicas
- 90 tubos eppendorf
- 250 Láminas cubre objetos

- 2 Baldes de 10 L
- 2 Nasas con ojo de malla de 1"
- 1 Manguera ½" de 50 cm
- 10ml aceite de inmersión

5.3.3 Reactivos. Los reactivos utilizados durante la fase experimental fueron:

- 2 L de Alcohol 70 %
- 5 L de Formalina 1:400
- 5 L Formol 10 % tamponado (Fosfato de sódio monobásico-6,5 g; fosfato de sódio bi/dibásico-4,0 g).
- 10L de Formol 10 %.
- 3 gr de Benzocaína.
- 3,1 g de 1-(4-chloro-phenyl)-3-(2,6-difluorobenzoyl) urea.
- 0,5 ml de anticoagulante EDTA 10 % para la toma de muestras de sangre.
- 0,5 L de colorante May-Grümwald-Giemsa con modificaciones Rosenfeld 1.947.

5.4 PLAN DE MANEJO

5.4.1 Alimentación. Se suministró alimento comercial con 32 % de proteína a razón del 4 % de la biomasa, distribuida en 4 comidas durante la fase de aclimatación y experimental.

5.4.2 Adecuación de tanques circulares. Se realizó la limpieza y desinfección de los tanques circulares con sal común aplicada directamente sobre las paredes de los tanques y líneas de aireación durante 2 hrs, posteriormente se realizó el llenado, ajuste del caudal y nivel de agua de estos.

5.4.3 Infestación. Se selecciono ejemplares de *Characidos* de diferentes casos clínicos de infestación natural por *Dolops*, presentados en el Laboratorio de Patología de Organismos Acuáticos, y se trasladaron a tanques de 100 L durante 60 días para el desarrollo del ciclo biológico del ectoparásito y su reproducción natural utilizando láminas de icopor de 40x15x2cm como sitio de postura de los

huevos. Posteriormente se capturaron los diferentes ejemplares de pacu realizando la colecta de los parásitos con la ayuda de un pincel, efectuando el conteo de parásitos según el tratamiento y se procedió a la infestación ubicando frascos conteniendo los parásitos en cada tanque (Figura 9).

Figura 9. Colecta, conteo y siembra del parásito *Dolops carvalhoi*.



5.4.4 Control de la calidad del agua. Se realizó cada 72 horas; en la jornada de la mañana, registrando temperatura, oxígeno, pH y conductividad, mediante métodos electrométricos, siguiendo el protocolo de Sipaúba⁷⁷.

5.4.5 Colecta de sangre. En el momento de realizar las medidas morfométricas y colecta de sangre, los peces fueron sedados con 1 gr de benzocaína disuelto en 10 mL de alcohol metanol y agregados a 15 L de agua. Una vez los animales mostraron signos de parasitismo como movimientos bruscos y/o frotos sobre las paredes de los tanques e inapetencia, se efectuó la colecta de sangre de cada uno de los ejemplares 20 días después a la infestación con jeringa hipodérmica impregnada de EDTA al 10 % en la aguja y el espacio muerto de la jeringa, realizando punción de los vasos caudales, inmediatamente debajo del arco hemal, extrayendo 1,5 ml de muestra los cuales se transfirieron a tubos eppendorff de 1 ml con EDTA sobre sus paredes debidamente rotulados, luego se trasladaron al laboratorio en una caja de icopor con hielo, para realizar los análisis correspondientes (Figura 10).

Figura 10. Colecta, conservación y análisis sanguíneo.

⁷⁷ SIPAÚBA TAVARES, Lúcia. Limnología aplicada a acuicultura. São Paulo : editorial afiliada Jaboticabal, Brasil, 1995. 85p.



5.4.6 Extensión sanguínea. Se efectuaron extensiones sanguíneas por cada muestra de sangre según el protocolo de Casas, A⁷⁸ y coloreadas con May-Grünwald-Giemsa según el protocolo de Rosenfeld 1947. (Figura 11).

Figura 11. Extensión sanguínea.



5.4.7 conteo diferencial de células blancas. Mediante observaciones de las extensiones sanguíneas al microscopio con el objetivo de 100X, se efectuó el

⁷⁸ CASAS, A. et al. Op cit., p. 212-217.

conteo diferencial de leucocitos (Linfocitos, Eosinófilos, Célula Granulocítica Especial, Monocitos, Heterófilos y Basófilos. Figura 13), hasta un total de cien células sobre el cuerpo de la extensión, siguiendo el recorrido representado en la figura 12B, registrando el número en el contador manual, determinando así el porcentaje de cada célula. Conjuntamente al conteo de leucocitos se efectuó el conteo total de trombocitos.

Figura 12. Campo visual y recorrido a seguir para la realización de recuento de células sanguíneas de la serie blanca al microscopio.

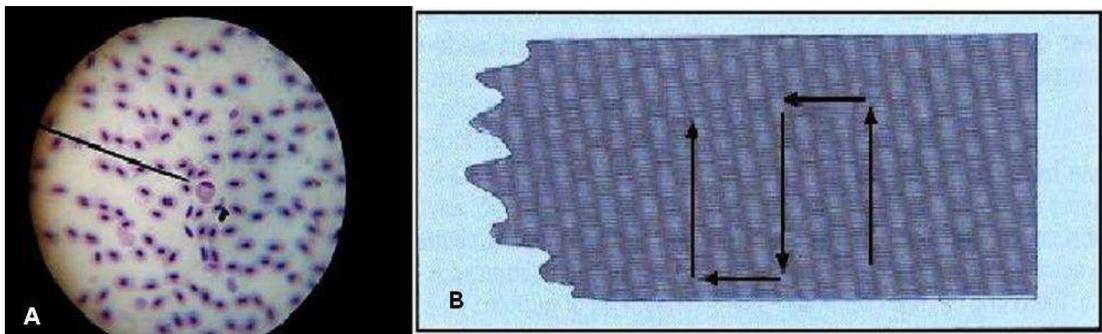
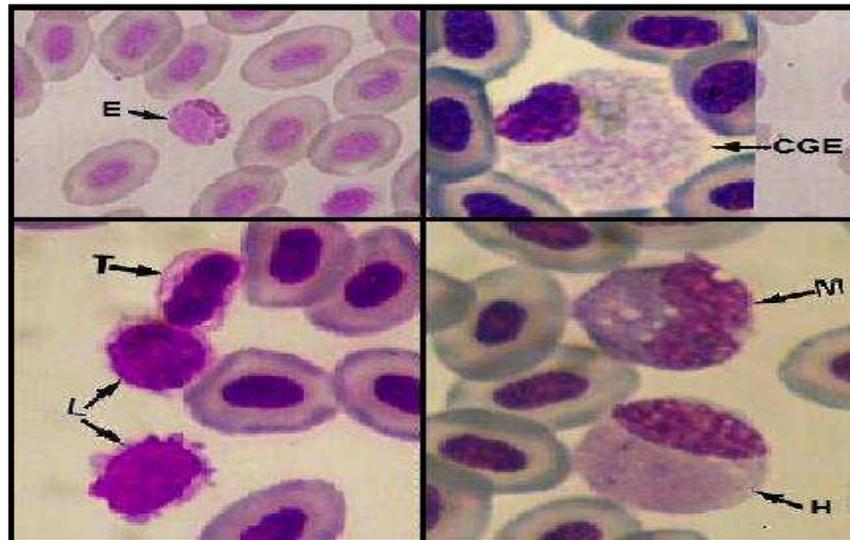


Figura 13. Células sanguíneas de la serie blanca presentes en *P. mesopotamicus*, objetivo 200X.



(E) = Eosinófilo; (CGE) = Célula Granulocítica Especial, célula; (T) = Trombocito; (L) = Linfocito; (M) = Monocito; (H) = Heterófilo.

El conteo total de eritrocitos, porcentaje de hematocrito, cantidad de hemoglobina, se efectuó en el contador automático de células CC-550. Para la calibración del

contador y ajustes de lectura, se efectuó limpieza continua con la ayuda de un pincel y solución salina fisiológica; se introdujeron las mezclas de varias réplicas debidamente centrifugadas también se realizó la lectura manual del hematocrito. Posteriormente con los datos obtenidos se calculó: el volumen corpuscular medio (VCM), la hemoglobina corpuscular media (HCM) y la concentración corpuscular media de hemoglobina (CCMH).

-Volumen Corpuscular Medio: expresado en fentolitros.

$$VCM (fl) = \left(\frac{\text{Hematocrito en porcentaje}}{\text{Número de hematíes/mm}^3 \text{ en millones}} \right) \times 10$$

- Concentración Corpuscular de Hemoglobina media: expresado en picogramos.

$$HCM (pg) = \left(\frac{\text{Hemoglobina en gramos/decilitro}}{\text{Número de hematíes/mm}^3 \text{ en millones}} \right) \times 10$$

- Concentración Corpuscular Media de Hemoglobina: expresado en gramos por decilitro en porcentaje.

$$CCMH (g/dl) = \left(\frac{\text{Hemoglobina en gramos/decilitro}}{\text{Hematocrito en porcentaje}} \right) \times 100$$

5.4.8 Obtención de las muestras histológicas. Se efectuó de manera cuidadosa y por ejemplar disección de cada uno de los órganos, aparatos y sistemas. Se retiraron muestras de branquias, piel, hígado y riñón, en formol al 10 % tamponado (Fosfato de sodio monobásico 6,5 g; fosfato de sodio bi/dibásico 4,0 g por cada Litro de formol), luego se transportaron al laboratorio de histotecnología de la Facultad de Ciencias Agrarias y Veterinarias de la Universidad Estadual Paulista, se implementaron los respectivos cortes histológicos y se procedió a colorear con Hematoxilina-Eosina.

5.4.9 Control de parásitos. El control se realizó mediante el insecticida diflubenzuron[®], el cual fue aplicado en baños de inmersión a diferentes dosis experimentales durante 4 horas y tres días consecutivos, en tanques circulares de plástico de 310 litros, con un flujo de 0,8 litros por minuto y aireación constante.

5.5 TRATAMIENTOS

Los tratamientos evaluados fueron:

T₀: Control (Ejemplares sanos libres de parásitos)

T₁: Ejemplares infestados con 10 parásitos por pez.

T₂: Peces infestados con 30 parásitos por pez.

T₃: Ejemplares infestados con 30 parásitos por pez, controlados con 0,5 ppm de Diflubenzuron[®].

T₄: Peces infestados con 30 parásitos por pez, controlados con 1,0 ppm de Diflubenzuron[®].

T₅: Ejemplares infestados con 30 parásitos por pez, controlados con 2,0 ppm de Diflubenzuron[®].

5.6 DISEÑO EXPERIMENTAL

Se utilizó un Diseño Completamente al Azar constituidos por seis tratamientos y tres replicas por tratamiento según el siguiente modelo matemático:

$$Y_{ij} = \mu + \tau_i + \varepsilon_{ij}, \text{ donde:}$$

Y_{ij} = Respuesta al i-ésimo tratamiento, en la j-ésima unidad experimental

μ = Media poblacional;

τ_i = Efecto del i-ésimo tratamiento ($i = 0, 1, 2, 3, 4, 5$);

ε_{ij} = Error experimental.

Las variables obtenidas del experimento fueron sometidos al análisis de varianza y las medias fueron comparadas por prueba de Tukey, en los casos en los cuales se encontró diferencias significativas.

5.7 HIPÓTESIS

Las hipótesis comprobadas fueron,

H₀: $\mu_i = \mu_j$; $i \neq j$. El efecto medio de los tratamientos es igual en todos los tratamientos.

$H_1: \mu_i \neq \mu_j: i \neq j$. El efecto medio de los tratamientos es diferente en por lo menos uno de los tratamientos.

5.8 VARIABLES EVALUADAS

5.8.1 Conteo total de eritrocitos, porcentaje de hematocrito y contenido de hemoglobina. Se evaluaron con el fin de establecer si se presentaba anemia en ejemplares de diferentes tratamientos.

5.8.2 Índices corpusculares hematológicos. Se interpretaron los índices: Volumen Corpuscular Medio (VCM), Hemoglobina Corpuscular Media, (HCM) y Concentración Corpuscular Media de Hemoglobina (CCMH) con el fin de establecer el tipo de anemia (Macrocítica-hipocrómica, Macrocítica-normocrómica, Microcítica-hipocrómica, Microcítica-normocrómica) que podía afectar a los ejemplares de los distintos tratamientos, Wintrobe 1934, citado por Tavares-Días⁷⁹.

5.8.3 Conteo de células sanguíneas de la serie blanca. Permite visualizar alteraciones en el número de Linfocitos, eosinófilos, CGE, Monocitos, basófilos y heterófilos en cada tratamiento con el fin de establecer el sistema defensivo de los ejemplares con respecto a la infestación.

5.8.4 Conteo relativo de trombocitos. Se evaluación, permitió establecer si existe un aumento de este tipo de células y así inferir sobre el efecto del parasitismo en los procesos de coagulación sanguínea.

5.8.5 Índice hepatosomático IHS. Se calculó mediante la relación del peso del hígado y el peso corporal⁸⁰ realizando la comparación entre los tratamientos. Para esto se sacrificaron ocho ejemplares por réplica en cada tratamiento.

$$IHS = \left(\frac{\text{Peso del hígado (g)}}{\text{Peso corporal (g)}} \right) \times 100$$

5.8.6 Eficacia del medicamento. Al final de la fase experimental se llevó a cabo el conteo final de parásitos vivos en cada uno de los peces con el fin de evaluar la eficacia del producto de acuerdo a la siguiente fórmula⁸¹.

⁷⁹ TAVARES-DIAS, Marcos. Variáveis hematológicas de teleosteos brasileiros de importância zootécnica tese de Doutorado em aquicultura. Jaboticabal, Brasil, 2003, p. 84.

⁸⁰ TAVARES-DIAS, Marcos. Op cit., p. 45.

$$Eficacia = \left(\frac{\mu \text{ de parásitos en el control} - \mu \text{ de parásitos en el tratamiento}}{\mu \text{ de parásitos en el control}} \right) \times 100$$

5.8.7 Parámetros morfométricos. Fueron obtenidos después de la colecta de sangre con el fin de efectuar las posibles correlaciones con las alteraciones sanguíneas (Tavares-Días y Moraes)⁸².

5.8.8 Calidad del agua. Se monitorearon los parámetros físico-químicos del agua como oxígeno, temperatura y potencial de hidrogenación pH.

5.8.9 Parámetros histopatológicos. Se desarrollaron observaciones comparativas de los tejidos de la piel, branquias, hígados y riñones de los ejemplares normales con respecto a animales infectados no tratados e infectados y tratados con 1-(4-chloro-phenyl)-3-(2,6-difluorobenzoyl) urea.

6. PRESENTACIÓN Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS

⁸¹ MARTINS, M. Parasitic infections. In Cultivated brazilian freshwater fishes. A survey of diagnosed cases. Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária, v. 9, n. 1, 2000, p. 23.

⁸² TAVARES-DIAS, Marcos & MORAES, F, op cit., p. 24.

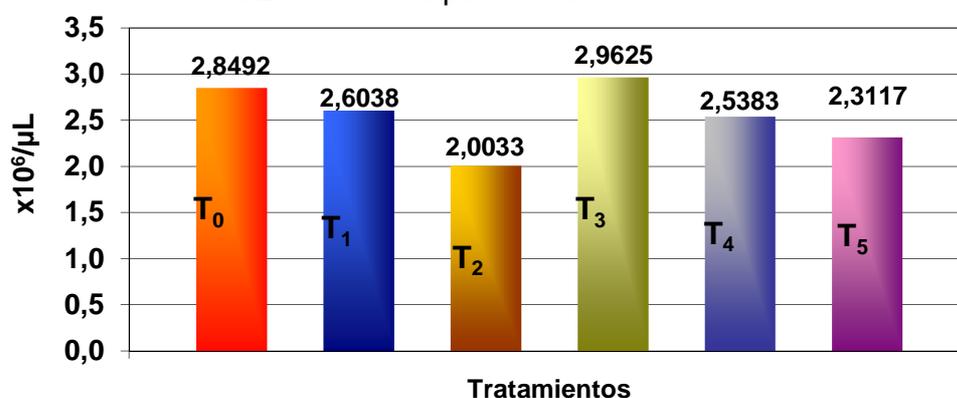
6.1 VARIABLES EVALUADAS

Para el análisis de las variables evaluadas se empleó el paquete estadístico SAS y Microsoft Excel 2000. Según el análisis de varianza se detectó diferencias estadísticas significativas con un 95 % de confianza, en al menos una de las variables estudiadas, lo cual permite aceptar la hipótesis alterna.

6.2 CONTEO TOTAL DE ERITROCITOS

La cantidad de eritrocitos promedio de los tratamientos (Figura 14), presentaron diferencias estadísticas significativas según el análisis de varianza ($p \leq 0,05$), (Anexos L); además la prueba de Tukey ($p \leq 0,05$), (Anexo L) estableció que los tratamientos $T_1 = 2,6 \times 10^6/\mu\text{L}$ y $T_2 = 2,0 \times 10^6/\mu\text{L}$ fueron los más afectados con respecto al $T_0 = 2,8 \times 10^6/\mu\text{L}$; debido a la acción hematófaga y citolítica del parásito *Dolops carvalhoi*, que genera lesiones en el tegumento del hospedadero y disminuye el número de glóbulos rojos circulantes, configurando diferentes tipos de anemias. Según Tavares-Días, M. e Moraes, F.⁸³ cuando el equilibrio entre parásito-hospedadero es alterado, y la carga parasitaria se eleva, como ocurrió en los tratamientos 1 y 2, el pez se debilita y reduce su capacidad defensiva.

Figura 14. Cantidad de eritrocitos ($\times 10^6/\mu\text{L}$) en los tratamientos al finalizar la fase experimental.



En contraste, los tratamientos T_3 , T_4 y T_5 , presentan recuperación de la cantidad de células rojas circulantes con respecto al T_1 y T_2 , debido, al efecto químico en el control positivo de los parásitos. Lo anterior está de acuerdo a lo reportado por Ranzani-Paiva, M. y Silva-Sousa Â.⁸⁴ quienes estudiaron ejemplares de *Cyprinus carpio* infestados por el microcrustáceo *Argulus sp.* con un producto químico a base de Fosfonato de 0,0-dimetil-oxi-2,2,2, tricloretilo, presentando una

⁸³TAVARES-DIAS, M. & MORAES, F., Op cit, p.71.

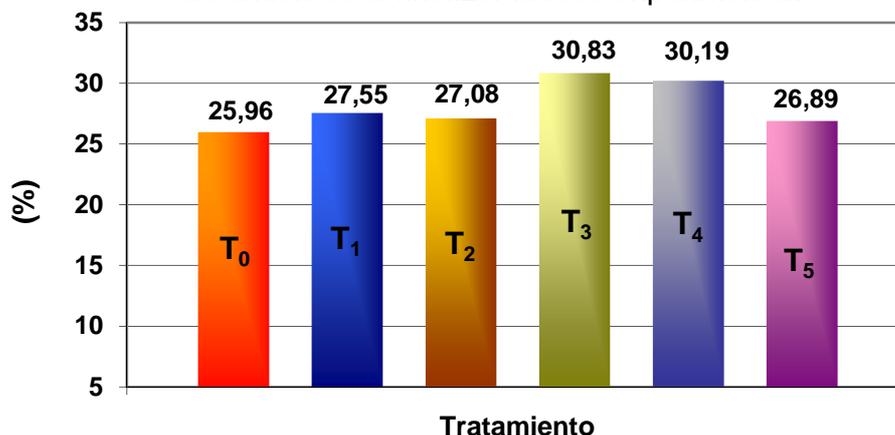
⁸⁴ RANZANI-PAIVA, M. Y SILVA-SOUSA, Â., Op cit. p. 101.

disminución del número de parásitos, lo cual se reflejó en el aumento del número de eritrocitos.

6.3 HEMATÓCRITO

El hematocrito promedio de los tratamientos (Figura 15), no registró diferencias estadísticas significativas según el análisis de varianza ($p > 0,05$), (Anexo M); lo cual está de acuerdo por lo reportado por Tavares-Días, M. et al.⁸⁵; Hiruni, C. & Asoka, P.⁸⁶ y ⁸⁷ no reportan disminución del hematocrito, posterior al estrés del manejo, transporte y a la exposición de químicos como el trichlorofon 7 días después y al tratamiento con sulfato de cobre.

Figura 15. Hematocrito presente en la sangre circulante entre los tratamientos al finalizar la fase experimental.



6.4 HEMOGLOBINA

La cantidad de hemoglobina promedio de los glóbulos rojos de los diferentes tratamientos (Figura 16), no presentó diferencias estadísticas significativas según el análisis de varianza ($p > 0,05$), (Anexos N), sin embargo, gráficamente existe una tendencia a la disminución de este parámetro; lo cual se encuentra dentro de los estudios realizados por Tavares, M. et al.⁸⁸; Tavares, M. et al.⁸⁹; Martins, M. et

⁸⁵ TAVARES-DÍAS, M. et al. Op cit., p. 4.

⁸⁶ HIRUNI, C. & ASOKA, P. Influence of low concentrations of Trichlorfon on haematological parameters and brain acetylcholinesterase activity in common carp, *Cyprinus carpio* L., p. 146.

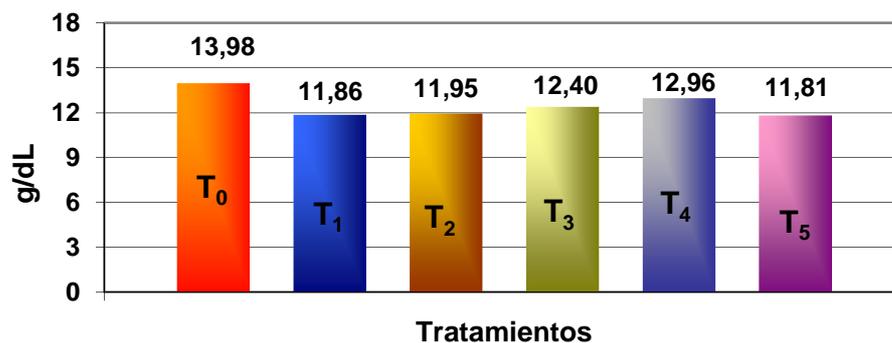
⁸⁷ Ibid., p. 4.

⁸⁸ TAVARES, Marcos. et al. Op cit., p. 5.

⁸⁹ TAVARES, Marcos. et al., Changes in blood parameters of hybrid tambacu fish parasitized by *Dolops carvalhoi* (Crustacea, Branchiura), a fish louse. VETERINARKI ARCHIV 77 (4). 2007., p. 355-363

al⁹⁰, Tavares, M. et. al.⁹¹ y Tavares, M. et. al.⁹² en las especies ícticas *Piaractus mesopotamicus* y *Colossoma macropomum*, infestada con el ectoparásito *D. carvalhoi* y el parásito monogénico *Anacanthorus penilabiatus* y su posterior tratamiento con un antihelmíntico de amplio espectro derivado del benzimidazólico y sulfato de cobre (CuSO₄) respectivamente.

Figura 16. Nivel de hemoglobina en los tratamientos experimentales.



6.5 INDICES CORPUSCULARES HEMATOLÓGICOS

6.5.1 Volumen corpuscular medio (VCM). El volumen corpuscular medio de los tratamientos (Figura 17), presentó según el análisis de varianza ($p \leq 0,05$), (Anexo U), diferencias estadísticas significativas; y la prueba de Tukey ($p \leq 0,05$), (Anexo U) detectó que existe un incremento significativo del VCM en los tratamientos T₁ = 109,61 fL; T₂ = 119,28 fL, T₃ = 111,7 fL, T₄ = 123,28 fL y T₅ = 124,78 fL, con respecto al T₀ = 87,83 fL; reflejando una anemia de tipo macrocítica según la clasificación hematimétrica de Wintrobe 1.934 citada por Tavares-Días, M. & Moraes, F.⁹³; de acuerdo con Tavares-Días; Nikinmaa & Huestis y Railo citados por Tavares-Días, M.⁹⁴ en las especies ícticas tambaqui *Colossoma macropomum* y *Piaractus mesopotamicus*, se presenta una reducción del número de eritrocitos e incremento del VCM bajo estrés agudo y ante el tratamiento con sulfato de cobre (CuSO₄) respectivamente; ese aumento en el volumen eritrocitario, sugiere un aumento del tamaño de la célula, debido al efecto hidratante de la adrenalina durante el estrés.

⁹⁰ MARTINS, Mauricio. et al., Mebendazole treatment against *Anacanthorus penilabiatus* (Monogénea, Dactylogyridae) gill parasite of cultivated *Piaractus mesopotamicus* (Osteichthyes, Characidae) in Brasil. Efficacy and hematology. 2001., p. 334.

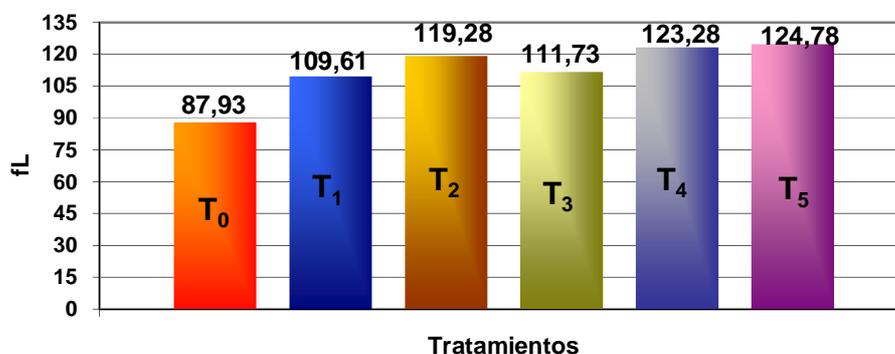
⁹¹ Ibid.

⁹² TAVARES, Marcos. et. al. Op cit., p. 46.

⁹³ TAVARES, Marcos. & MORAES, F. Op cit., p. 71.

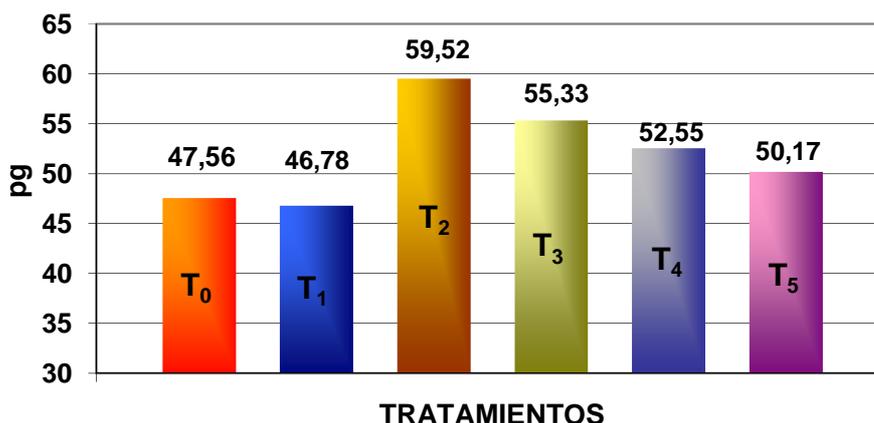
⁹⁴ TAVARES, Marcos. Op cit., p. 4.

Figura 17. Volumen Corpuscular Medio (VCM) promedio de los hematíes presentes en los diferentes tratamientos al finalizar la fase experimental.



6.5.2 Hemoglobina Corpuscular Media (HCM). El contenido de la hemoglobina corpuscular media de los tratamientos (Figura 18), presentó en promedio diferencias estadísticas significativas según el análisis de varianza ($P \leq 0.01$), (Anexo V); la prueba de Tukey ($P \leq 0.05$), (Anexo V) estableció que existe un aumento significativo de la HCM en los tratamientos $T_2 = 59,52\%$ y $T_3 = 55,33\%$; con respecto al $T_0 = 47,56\%$; los tratamientos $T_1 = 46,78\%$, $T_4 = 52,55\%$ y $T_5 = 50,17\%$. Teniéndose en cuenta que los valores de los tratamientos T_3 , T_4 y T_5 , van decreciendo con respecto al T_2 , se estima que existe una normalización de este índice posterior al tratamiento con diflubenzuron.

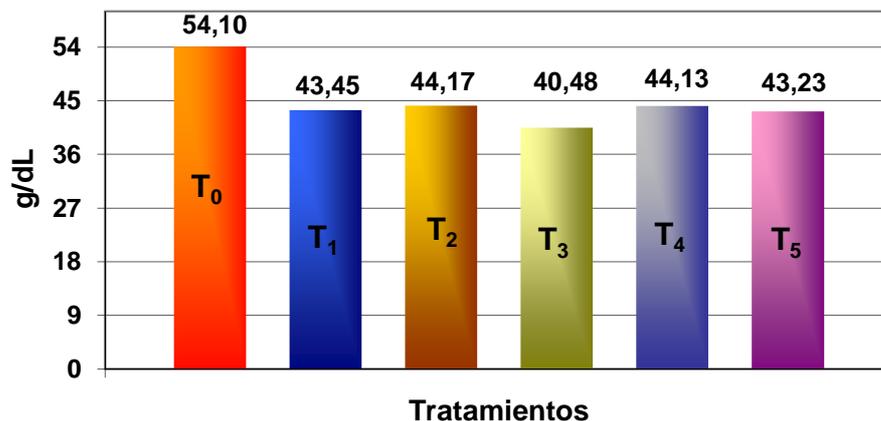
Figura 18. Hemoglobina Corpuscular Media (HCM) promedio de los hematíes presentes en los diferentes tratamientos al finalizar la fase experimental.



6.5.3 Concentración Corpuscular Media de Hemoglobina (CCMH). La concentración corpuscular media de hemoglobina promedio de los tratamientos (Figura 19), presentó diferencias estadísticas significativas según el análisis de varianza ($p \leq 0,05$), (Anexo W); la prueba de Tukey ($p \leq 0,05$), (Anexo W), detectó

que existe una disminución significativa del CCMH; en los tratamientos $T_1 = 43,45$ g/dL; $T_2 = 44,17$ g/dL, $T_3 = 40,48$ g/dL, $T_4 = 44,13$ g/L y $T_5 = 43,23$ g/dL con respecto al $T_0 = 54,1$ g/dL, reflejándose, según la clasificación hematimétrica de Witrobe 1.934 citada por Tavares, M. & Moraes, F.⁹⁵; una anemia de tipo hipocrómica relacionada con la disminución del nivel de hemoglobina; en evaluaciones realizadas por Ramzani-Paiva et al⁹⁶ y Tavares, M. et al.⁹⁷ reportaron comportamientos similares en la determinación de este parámetro a la aplicación del insecticida trichlorfon sobre la sangre de *Prochilodus scrofa*, y a la aplicación del sulfato de cobre en *P. mesopotamicus* respectivamente, comprobando una disminución del valor de la CCMH.

Figura 19. Concentración Corpuscular Media de Hemoglobina (CCMH) promedio de los hematíes entre los diferentes tratamientos al finalizar la fase experimental.



6.6 CONTEO DE LEUCOCITOS

6.6.1 Linfocitos (%). El porcentaje de Linfocitos promedio de los tratamientos (Figura 20), es significativo estadísticamente, según el análisis de varianza ($p \leq 0,05$), (Anexo O); igualmente, la prueba de significancia de Tukey ($p \leq 0,05$), (Anexo O) estableció que los tratamientos $T_1 = 89,75$ % y $T_2 = 89,83$ % registraron menor número que el $T_0 = 97,17$ %. Tavares-Días, M. et al.⁹⁸ comprobaron reducción de estas células al ser desafiadas con el ectoparásito monogénico

⁹⁵ TAVARES, Marcos. & MORAES, F. Op cit., p. 71.

⁹⁶ RAMZANI-PAIVA et al. Hematología de peixes Brasileiros. Sanidade de organismos aquáticos. p. 102

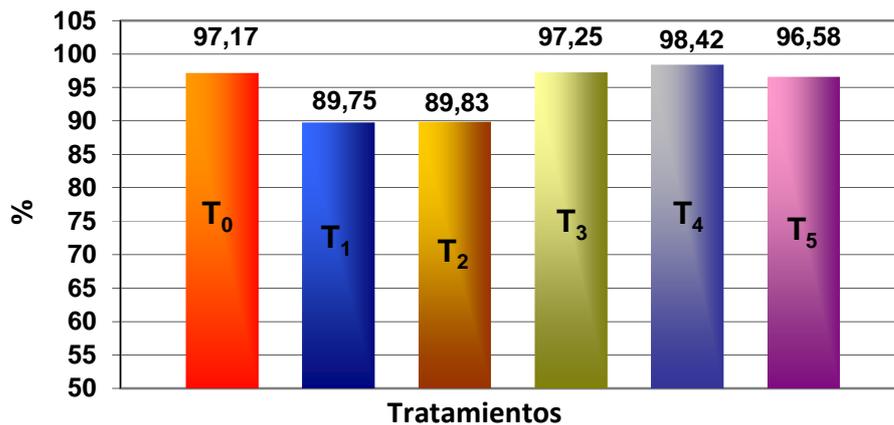
⁹⁷ TAVARES, Marcos. et al. Op cit., p. 5.

⁹⁸ TAVARES-DÍAS, M. et al., Op cit., p. 4.

Anacanthorus penilabiatus. Ranzani-Paiva, M. y Silva-Sousa Â.⁹⁹ establecieron que, la disminución del número de linfocitos se presenta en peces infestados fundamentalmente con parásitos; la razón a esta respuesta fisiológica no se comprende muy bien en peces osteíctios¹⁰⁰.

Al aplicar el tratamiento (Diflubenzuron), contra la parasitosis, en los tratamientos T₃ = 97,25 %, T₄ = 98,42 % y T₅ = 96,58 %, el porcentaje de Linfocitos se eleva; acercándolos a los niveles del T₀; Lo que indicaría que el agente patógeno estresante que genera la respuesta inflamatoria, en este caso el ectoparásito *Dolops*, ha reducido su número debido al control ejercido por el 4 clorofenil – 6 diflurobenzoil del hospedadero, siendo este un indicativo de la funcionalidad del tratamiento.

Figura 20. Porcentaje promedio de Linfocitos presentes en la sangre circulante entre los tratamientos al finalizar la fase experimental.



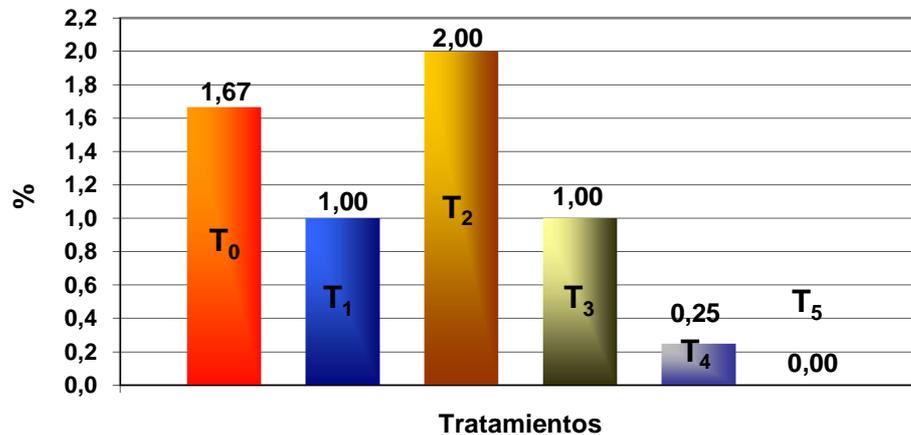
6.6.2 Eosinófilos (%). El porcentaje de Eosinófilos promedio de los tratamientos (figura 21); según el análisis de varianza ($p \leq 0,05$), (Anexo P); presentó diferencias estadísticas significativas; mientras que la prueba de significancia de Tukey ($p \leq 0,05$), (Anexo P), estableció que el T₂ = 2,00 %, ha incrementado el número de células significativamente, indicando una eosinofilia. Lo anterior está de acuerdo a Tavares, M. e Moraes, F.¹⁰¹ quienes determinaron aumento de esta célula granulocítica en peces infestados con el ectoparásito *Megalancistrus aculeatus*.

⁹⁹ RANZANI-PAIVA, M. y SILVA-SOUSA, Â., Op cit. p. 106.

¹⁰⁰ LOPEZ, Jorge y RUBIO, Efraín. Vulnerabilidad de especies ícticas nativas com relación a especies ícticas introducidas em La cuenca alta del río Cauca. Revista científica de la Facultad de Ciencias Pecuarias, Universidad de Nariño, San Juan de Pasto, Colombia, 2001, V. 4, n. 7, p. 18.

¹⁰¹ TAVARES, M. & MORAES, F., Op cit, p.46.

Figura 21. Porcentaje promedio de Eosinófilos presentes en la sangre circulante en los distintos tratamientos.



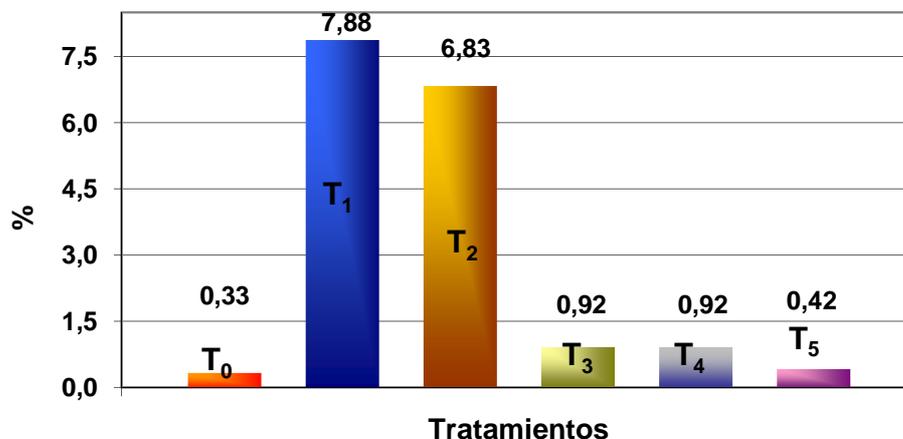
6.6.3 Células Granulosíticas Especiales CGE (%). El porcentaje de las CGE promedio de los tratamientos (figura 22), presentó diferencias estadísticas significativas según el análisis de varianza ($p \leq 0,05$), (Anexo Q); la prueba de significancia de Tukey ($p \leq 0,05$), (Anexo Q) detectó que los tratamientos T₁ = 7,78 % y T₂ = 6,9 %, son estadísticamente iguales; además fueron los más afectados con respecto al T₀ = 0,33 %; el aumento del número de ésta célula puede ser atribuido a la acción del parásito, el cual con su órgano de fijación causa lesión mecánica y estrés al hospedadero y con la muerte de estos crustáceos debido al tratamiento hubo disminución de la agresión al pez y posterior reducción de la CGE; lo anterior, está de acuerdo a lo demostrado por Tavares-Días, M. e Moraes, F.¹⁰²; Canello, et. al.¹⁰³ y Tavares, M. et al.¹⁰⁴ con relación al incremento de esta célula granulocítica en la especie íctica tambaqui *Colossoma macropomum* infestados con *Dolops carvalhoi* y disminución del porcentaje posterior al tratamiento y consecuente reducción del estrés.

Figura 22 Porcentaje promedio de las Células Granulocíticas Especiales (CGE) presentes entre los distintos tratamientos al finalizar la fase experimental.

¹⁰²TAVARES-DIAS, M. & MORAES, F., Op cit, p.44.

¹⁰³CANELLO, S. et. al, Op cit, p. 4.

¹⁰⁴TAVARES, Marcos. et al. Evaluation of the hematological parameters in *Piaractus mesopotamicus* Holmberg. 1887 (Osteichthyes Characidae) with argulus sp. (Crustacea: Branchiura) infestation and treatment with organophosphate : Revista Brasileira. Curitiba, Brasil, 1999. v. 16, n. 2, p. 554



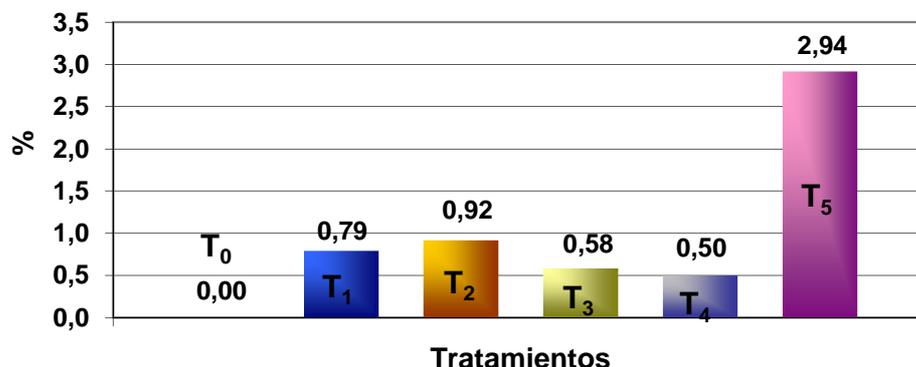
6.6.4 Monocitos (%). El porcentaje de Monocitos promedio de los tratamientos (figura 23), presentó diferencias estadísticas significativas según el análisis de varianza ($p \leq 0,05$), (Anexo R); y la prueba de significancia de Tukey ($p \leq 0,05$), (Anexo R) estableció que los tratamientos $T_1 = 0,77 \%$ y $T_2 = 0,92 \%$, son estadísticamente iguales; la mayor alteración de ésta célula la presenta $T_5 = 2,94 \%$ con respecto a los demás tratamientos; lo anterior, está de acuerdo por Tavares-Días, M. & Moraes, F.¹⁰⁵; Canello, S. et. al.¹⁰⁶ y Tavares-Días, M. et al.¹⁰⁷ verificando un aumento de monocitos (Monocitosis) con reducción del porcentaje de trombocitos (trombocitopenia) en *Piaractus mesopotamicus* infestados por *Argulus sp.*; de igual forma reportan un aumento del porcentaje de esta célula blanca en peces parasitados naturalmente con *Dolops carvalhoi*, y posterior al tratamiento con diflubenzuron. De igual forma, detectan un aumento proporcional del porcentaje, de acuerdo con el incremento en la dosis de sulfato de cobre (CuSO_4), en el tratamiento del ectoparásito monogenésico *A. penilabiatum* en *Piaractus mesopotamicus*. El aumento del número de monócitos, importante célula fagocítica, incrementa sus cantidades en procesos inflamatorios y parasitarias de acuerdo a la actividad de los mecanismos de defensa celular; intensificándose frente a una reacción del pez frente a invasión de un agente etiológico

Figura 23. Porcentaje promedio de Monocitos presentes entre los diferentes tratamientos al finalizar la fase experimental.

¹⁰⁵ TAVARES, Marcos. & MORAES, F. Op cit., p. 75-76.

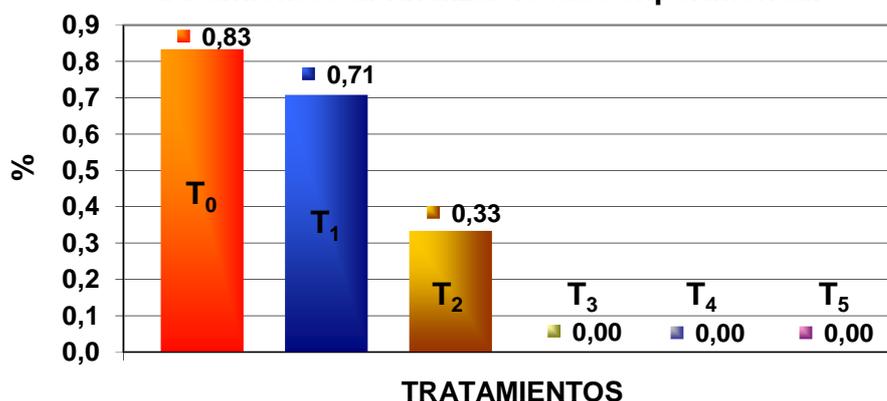
¹⁰⁶ CANELLO, S. et. al. p. 4.

¹⁰⁷ TAVARES, Marcos. et al. Op cit., p. 3.



6.6.5 Heterófilos (%). El porcentaje de Heterófilos promedio de los tratamientos (figura 24), presentó diferencias estadísticas según el análisis de varianza ($p \leq 0,05$), (Anexo S); además la prueba de significancia de Tukey ($p \leq 0,05$), (Anexo S) estableció que la mayor alteración la presentan los tratamientos T₂ = 0,35 % y los tratamientos T₃, T₄ y T₅ con 0,00 %, lo cual indica una disminución progresiva de las células (heteropenia); lo anterior está de acuerdo con Tavares-Días, M. & Moraes, F.¹⁰⁸ y Tavares-Días, M. et al.¹⁰⁹ los Heterófilos son las primeras células en dejar los vasos sanguíneos y llegar al sitio inflamado a semejanza de lo que ocurre en mamíferos; los heterófilos se pueden adherir a células endoteliales y transmigrar hacia el foco inflamatorio, atraídos por quimiotaxinas; igualmente, demuestran disminución de este tipo de células en infestación parasitaria y tratamiento de Monogénea (*A. penilabiatu*s) en *Piaractus mesopotamicus*.

Figura 24. Porcentaje promedio de Heterófilos en los diferentes tratamientos al finalizar la fase experimental.



6.6.6 Basófilos (%). No se observó presencia de este tipo de célula en el conteo diferencial realizado en los diferentes tratamientos experimentales. Según López y

¹⁰⁸ TAVARES-DIAS, M. & MORAES, F. Op cit., p. 38.

¹⁰⁹ TAVARES-DIAS, M. et al. Op cit., p. 4.

Rubio¹¹⁰ el número de basófilos de los peces se incrementa proporcionalmente en condiciones de intoxicación por químicos o metales pesados, lo que demuestra que el medicamento utilizado en esta investigación no afectó negativamente la salud de los ejemplares. Igualmente especies de la familia Characidae no registran basófilos, como lo demuestran diferentes investigaciones realizadas por Tavares-Días, M. et. al.¹¹¹ y los citados por Tavares-Días, M. é Moraes F.¹¹², Martins, et al, Ranzani-Paiva et al.; Arévalo & Castellanos según lo consignado en la Tabla 3.

Tabla 3. Comparación de resultados en el conteo del porcentaje de Basófilos en especies de la familia Characidae.

Familia/especies	Basófilos (%)	Referencias
Characidae		
Piaractus mesopotamicus	0,0	Esta investigación 2006 ¹¹³
<i>Piaractus mesopotamicus</i>	0,0	Tavares-Días et al. (1999b)
<i>Piaractus mesopotamicus</i>	0,0	Tavares-Días & Mataqueiro (2003)
<i>Híbrido tambacu</i>	0,0	Tavares-Días et al. (2000c)
<i>Brycon cephalus</i>	0,0	Tavares-Días et al. (1999c)
<i>Brycon siebenthalae</i>	0,0	Arévalo & Castellanos (2003)

*TAVARES, Marcos & MORAIS, Flávio. Hematología de peixes teleósteos. São Paulo: Jaboticabal, Brasil, 2004, p. 49.

6.7 CONTEO RELATIVO DE TROMBOCITOS

El conteo relativo de trombocitos promedio de los tratamientos (Figura 25), presentó diferencias estadísticas significativas según el análisis de varianza ($p \leq 0,05$), (Anexo T); la prueba de significancia de Tukey ($p \leq 0,05$), (Anexo T) revela que existe disminución significativa del número de trombocitos (trombocitopenia) en los tratamientos $T_1 = 126$; $T_2 = 124$, $T_3 = 96$ y $T_4 = 91$, con respecto al $T_0 = 137$; según Tavares-Días, M. & Moraes, F.¹¹⁴ según Roberts, R.¹¹⁵ los trombocitos son movilizados en los procesos de coagulación, inflamación y control de pérdidas de fluidos tisulares para contribuir con los mecanismos de defensa orgánica, como los fenómenos envueltos en la respuesta inflamatoria que está demostrada en aves, anfibios y peces; debido a que el aumento de la actividad de esas células reduce la predisposición a infecciones. Con relación al incremento del número de

¹¹⁰ LOPEZ, Jorge y RUBIO, Efraín. Vulnerabilidad de especies ícticas nativas con relación a especies icticas introducidas em La cuenca alta del río Cauca. Revista científica de la Facultad de Ciencias Pecuarias, Universidad de Nariño, San Juan de Pasto, Colombia, 2001, V. 4, n. 7, p. 18.

¹¹¹ TAVARES-DÍAS, M. et. al. Op cit., p. 4.

¹¹² TAVARES-DIAS, M. & MORAES, F. Op cit., p. 49.

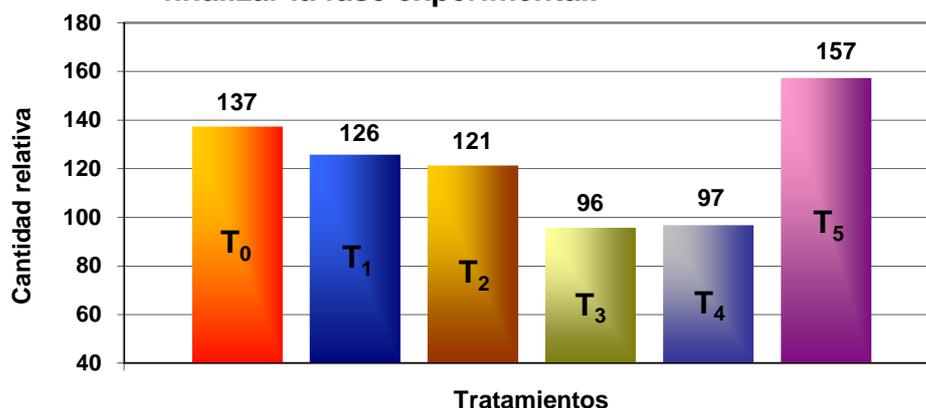
¹¹³ Fuente: adaptado de, esta investigación.

¹¹⁴ TAVARES-DIAS, M. & MORAES, F. Op cit., p. 76.

¹¹⁵ RUBENS, Ronald. Op cit, p. 33.

trombocitos en el T₅ con 158, se explica a la temprana eficacia del tratamiento y por ende recuperación del número de células. Canello, et. al.¹¹⁶ reporta un incremento en el porcentaje de trombocitos después del tratamiento con diflubenzuron en el control de *Dolops carvalhoi*.

Figura 25. Cantidad relativa de Trombocitos presentes en la sangre circulante entre los diferentes tratamientos al finalizar la fase experimental.



6.8 INDICE HEPATOSOMÁTICO

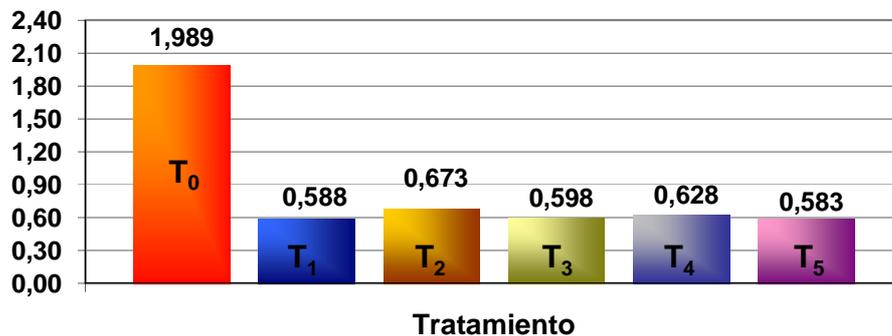
Los valores promedio del índice hepatosomático obtenidos al final de la fase experimental (Figura 26), según el análisis de varianza ($p \leq 0,05$), (Anexo K); demuestra que existen diferencias significativas entre los tratamientos; además la prueba de significancia de Tukey ($p \leq 0,05$), (Anexo K) demostró que el único tratamiento con diferencias altamente significativas es el T₀ = 1,989, con respecto a los tratamientos T₁ = 0,588; T₂ = 0,673; T₃ = 0,598; T₄ = 0,628 y T₅ = 0,583.

Esta variable fue menor en los tratamientos infestados y controlados por el químico, debido a que el parásito en su continuo movimiento por la necesidad de alimento genera una situación de estrés continuo en el organismo, que el pez trata de balancear mediante aumento del número de glóbulos rojos, índices corpusculares hematológicos y el incremento del número de las células blancas defensivas. Igualmente el medicamento se metaboliza por el hígado, lo que produce un estrés adicional en este órgano que es el encargado del metabolismo y detoxificación^{117, 118}.

Figura 26. Índice hepatosomático de los tratamientos experimentales.

¹¹⁶ CANELLO, S. et. al, Op cit, p. 4.

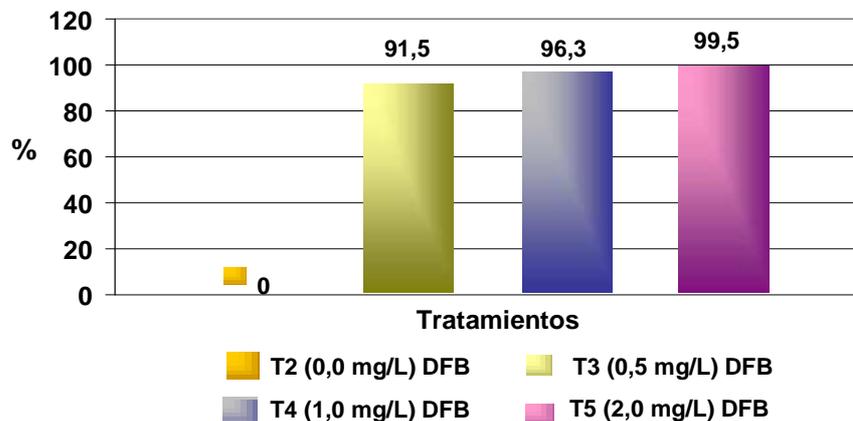
¹¹⁷ LÓPEZ, Jorge. Nutrición Acuícola. Fisiología digestiva de los organismos hidrobiológicos de cultivo. Pasto: Colombia: Universidad Nariño, 1997. p. 36.



6.9 EFICACIA DEL TRATAMIENTO (DIFLUBENZURON) EN EL CONTROL DE *Dolops carvalhoi*

La eficacia del diflubenzuron en el control de *D. carvalhoi* fue del 91,5 %, 96,3 % y 99,5 % para los tratamientos 3, 4 y 5 respectivamente (Figura 27). Estos valores se encuentran de acuerdo a los reportados por Canello, et. al.¹¹⁹ y Fujimoto, et. al.¹²⁰ quienes analizaron efectividad en diferentes concentraciones y tiempos de aplicación, de tal manera que la concentración de 2,0mg/L en tres baños de 30 minutos de duración cada uno y con intervalo de 24 horas registró eficiencia del 97,3 % en el control de *Dolops carvalhoi* en pacú y concentración de 0,5 a 1,0mg/L de DFB en único baño con duración de 24 horas en el control de *Dolops carvalhoi* en piaçu, *Leporinus macrocephalus* fue del 100 %.

Figura 27. Porcentaje de eficacia del diflubenzuron en el tratamiento del parásito *Dolops carvalhoi*.



EI

presente ensayo, demostró que el diflubenzuron controla efectivamente el

¹¹⁹CANELLO, S. et. al, Op cit, p. 3.

¹²⁰FUJIMOTO, R. et. al. Utilização do diflubenzuron no controle de crustáceos de piaçu *Leporinus macrocephalus*. Efeitos parasiticidas e no parâmetros hematológicos. XI Seminarios Brasileiro de Parasitologia Veterinaria. Salvador, Brasil. 1993, p. 133.

ectoparásito *Dolops*, debido a que interfiere en la síntesis de quitina, compuesto básico del exoesqueleto de los micro crustáceos, lo cual indicaría la viabilidad de utilizarlo en cultivos intensivos de pacú, sin causar efectos indeseables a dosis de 0,5 a 2,0 mg/L sobre el ecosistema acuático^{121, 122}.

6.10 CALIDAD DEL AGUA

La calidad fisicoquímica del agua influye directamente en la salud y estado corporal de los peces, debido a que son organismos poiquilotermos con tasa metabólica basal que depende directamente de la temperatura y nivel de oxígeno disuelto en el agua¹²³. Las condiciones ambientales durante el desarrollo de la investigación fueron normales, lo que se reflejó en la estabilidad de los parámetros físico-químicos, los cuales no presentaron diferencias estadísticas significativas según el análisis de varianza ($p > 0,05$), (Anexos F, G y H); por lo tanto las oscilaciones de los parámetros fisicoquímicos del agua no constituyeron una fuente de variación; reflejando homogeneidad de los tratamientos y buen control de los parámetros.

6.10.1 Temperatura (°C). Las temperaturas promedio obtenidas en cada uno de los tratamientos durante la fase experimental (Figura 28), se encuentran dentro de las establecidas para cultivos del género *Piaractus*, como lo reportan Canello, et al¹²⁴ con temperaturas de $30,03 \pm 0,18^\circ \text{C}$ y Tavares-Días M. et al¹²⁵ entre $27,2 \pm 1,7$ y $27,7 \pm 1,6$ para pacu *P. mesopotamicus* en Brasil. Según Díaz, y López¹²⁶ reportan para Colombia el rango óptimo de temperatura para crecimiento de Cachama blanca *Piaractus brachypomus*, de $25 - 29^\circ \text{C}$. De acuerdo con Dheer; Martínez et al; Val & Almeida-Val; Val y Baldisserotto citados por Tavares-Días, M. e Moraes, F.¹²⁷ la elevación de la temperatura del agua genera aumento de las actividades biológicas y metabólicas de peces tropicales, incrementa la frecuencia respiratoria y cardíaca, causando mayor número de eritrocitos, hematocrito y concentración de

¹²¹CANELLO, S. et. al, Op cit, p. 3.

¹²²FUJIMOTO, R. et. al. Utilização do diflubenzuron no controle de crustáceos de piauçu *Leporinus macrocephalus*. Efeitos parasiticidas e no parâmetros hematológicos. XI Seminarios Brasileiro de Parasitología Veterinaria. Salvador, Brasil. 1993, p. 133.

¹²³ LÓPEZ, Jorge. Nutrición Acuícola. Fisiología digestiva de los organismos hidrobiológicos de cultivo. Pasto: Colombia: Universidad Nariño, 1997. p. 36

¹²⁴ CANELLO, Sergio. et al. Eficacia do diflubenzuron no controle de *Dolops carvalhoi* (Crustacea: Branquiura) em jovens pacus *Piaractus mesopotamicus* (Osteichthyes: Caracidae) naturalmente infectados. Sao Paulo, Brasil : Universidade Estadual Paulista, 2005, p. 3.

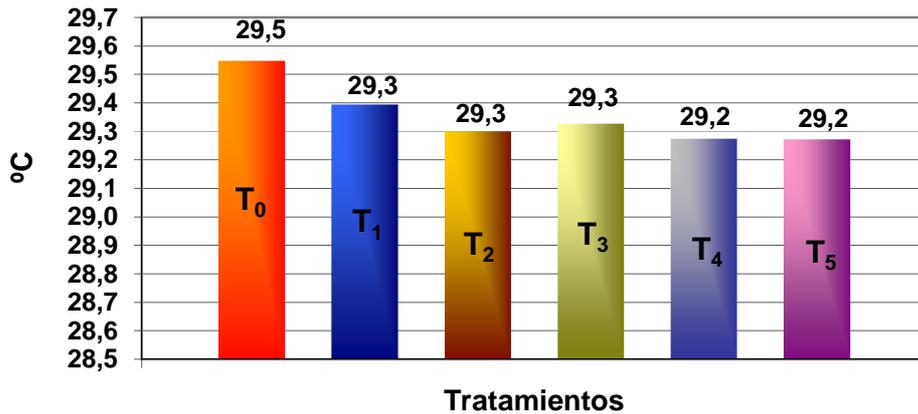
¹²⁵ TAVARES-DÍAS, M. et al. Alterações hematológicas e histopatológicas em pacus *Piaractus mesopotamicus* Holmberg, 1887 (Osteichthyes:Caracidae) tratados com sulfato de cobre (CuSO_4) p. 2.

¹²⁶ DIAZ, Francisco y LÓPEZ, Ricardo. El cultivo de la Cachama blanca (*Piaractus brachypomus*) y de la cachama negra (*Colossoma macropomun*). Fundamentos de acuicultura. Instituto Nacional de Pesca y Acuicultura INPA, Santafé de Bogotá, Colombia, 1993, p. 212.

¹²⁷TAVARES-DIAS, Marcos & MORAES, Flávio. Hematología de peixes teleósteos. São Paulo, Brasil : esditorial afiliada Jaboticabal, 2004, p. 81.

hemoglobina de tal manera que, cualquier cambio térmico alterará el hemograma de las especies acuáticas. Al no existir diferencias estadísticas significativas para este parámetro físico, las modificaciones hematológicas e histopatológicas son causadas por el parásito y su control químico.

Figura 28. Promedio de temperatura (°C) de los tratamientos experimentales.



6.10.2 Oxígeno disuelto (mg/L). Los valores de oxígeno disuelto promedio obtenidos en cada uno de los tratamientos durante la fase experimental (Figura 29), se consideran adecuados, según lo reportado por diferentes investigaciones realizadas en *P. mesopotamicus*: Canello, et al¹²⁸, Tavares-Días M. et al¹²⁹, Tavares-Días y Moraes¹³⁰, Díaz, y López¹³¹ con rangos entre 3 a 6 mg/L.

De acuerdo con Tavares-Días, M. e Moraes, F.¹³² bajos niveles de oxígeno disuelto en el agua, ocasionan disminución en la tasa metabólica basal, menor digestibilidad de los nutrientes e inmunosupresión, las anteriores condiciones son compensadas por los peces produciendo policitemia en las células de la serie roja y por ende afectando los índices hematológicos. En consecuencia, al no existir diferencias estadísticas significativas para este parámetro químico, las posibles variaciones de las diferentes variables hematológicas e histopatológicas, se deben al efecto del ectoparásito y su control farmacológico.

¹²⁸CANELLO, S. et al., Op cit, p 3.

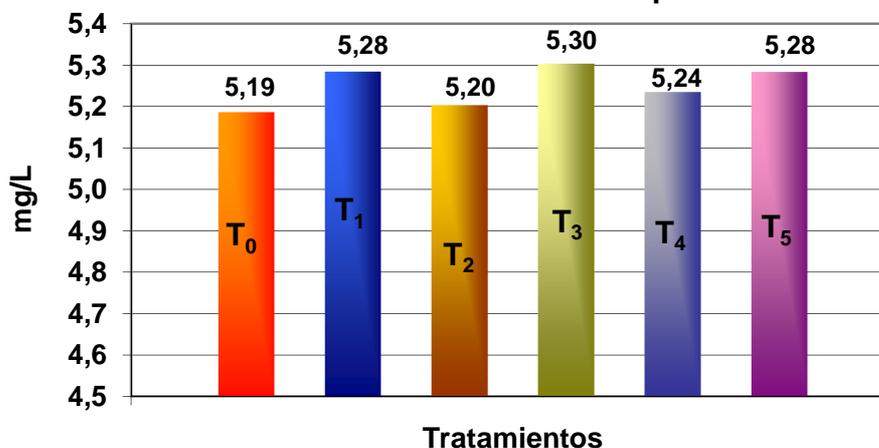
¹²⁹TAVARES-DÍAS, M. et al., Op cit, p 3.

¹³⁰TAVARES-DÍAS, Marcos y MORAES, Flávio. Características hematológicas da Tilapia rendalli Boulenger, 1896 (Osteichthyes: cichlidae) capturada em "pesque-pague" de França, São Paulo, Brasil.

¹³¹DIAZ, F. y LÓPEZ, R., Op cit, p. 212.

¹³²TAVARES-DIAS, M. & MORAES, F., Op cit, p.86.

Figura 29. Promedio de oxígeno disuelto (mg/L) en los tratamientos durante la fase experimental.



6.10.3 Potencial de hidrogenación (pH). Los valores de pH promedio obtenidos en cada uno de los tratamientos durante la fase experimental (Figura 30), son adecuados para el crecimiento del pacu (*Piaractus mesopotamicus*) según lo establecido por: Canello, et al.¹³³, Tavares-Días M. et al.¹³⁴, Tavares-Días y Moraes¹³⁵, Díaz, y López¹³⁶, con rangos entre 6,0 a 8,0.

De acuerdo con Moga & Francis-Floyd; Sipaúba-Tavares; Vaala; Dheer et al. y Houston & Gingras-Bedard citados por Tavares-Días, M. e Moraes, F.¹³⁷ Las alteraciones del pH producen letargia, reducen el apetito, inflaman branquias, disminuyen la capacidad de respuesta del sistema inmunológico y la propensión de los peces a afecciones por bacterias y parásitos. La capacidad de oxigenación de la hemoglobina es afectada por el pH ácido, reduce los niveles arteriales de oxígeno lo que induce una respuesta compensatoria de los eritrocitos circulantes al aumentar su número y capacidad de transporte, elevación del hematocrito, concentración de hemoglobina, glicemia, VCM, CHCM, leucocitos totales y porcentaje de trombocitos. Por lo tanto al no existir diferencias estadísticas significativas para este parámetro químico, las variaciones encontradas en el ensayo, se debieron al efecto hematológico del ectoparásito y del 6-diflurobenzuil.

¹³³CANELLO, S. et al., Op cit, p. 4.

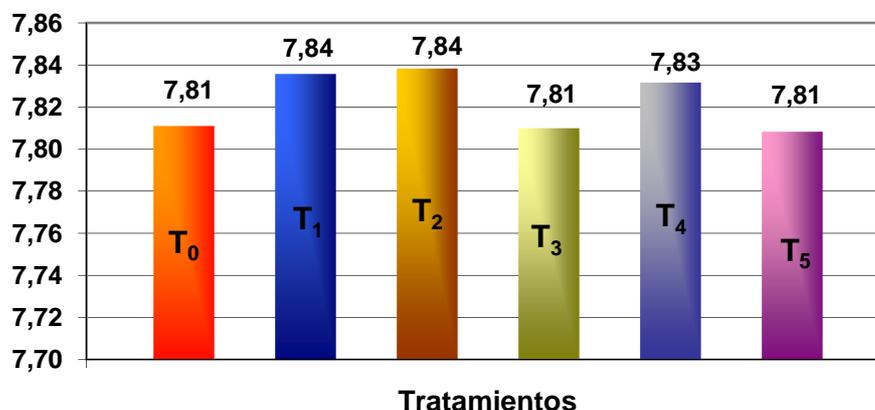
¹³⁴TAVARES-DÍAS, M. et al., Physiological responses of "Tambaqui" *Colossoma macropomum* (Characidae) to acute stress, p 44.

¹³⁵TAVARES-DÍAS, M. y MORAES, F. Op cit. p. 2.

¹³⁶DÍAZ, F. y LÓPEZ, R., Op cit, p. 212.

¹³⁷TAVARES-DÍAS, M. & MORAES, F., Op cit, p.88-89.

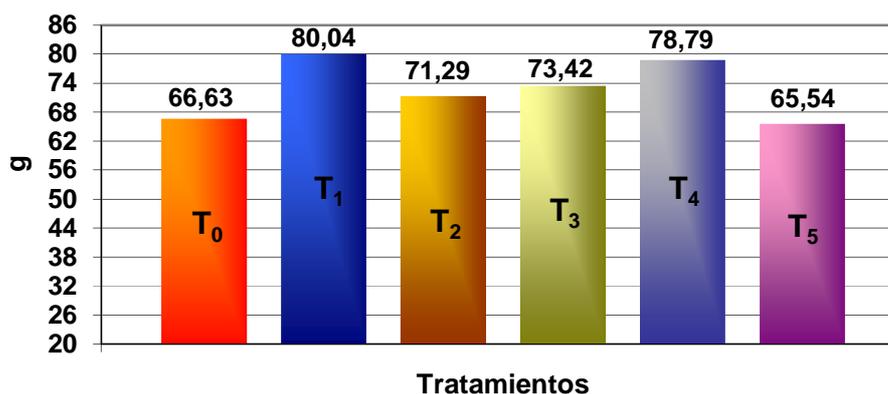
Figura 30. Promedio del potencial de hidrogenación pH en los tratamientos.



6.11 Peso (g). Según Raizada & Singh; Jirásek et al., citados por Tavares-Días e Moraes.¹³⁸ y López¹³⁹ la ganancia de peso de los peces es influenciada por los factores ambientales y nutricionales. La calidad y la cantidad de los alimentos afectan la fisiología de los organismos acuáticos levantados en cautiverio, interfiriendo las variables hematológicas.

El peso promedio en los diferentes tratamientos (Figura 31), según el análisis de varianza ($p > 0,05$), (Anexo I); no detectó diferencias estadísticas significativas; lo que permite asegurar que esta variable no afectó las variables objeto de estudio.

Figura 31. Peso (g) de los tratamientos durante la fase experimental.



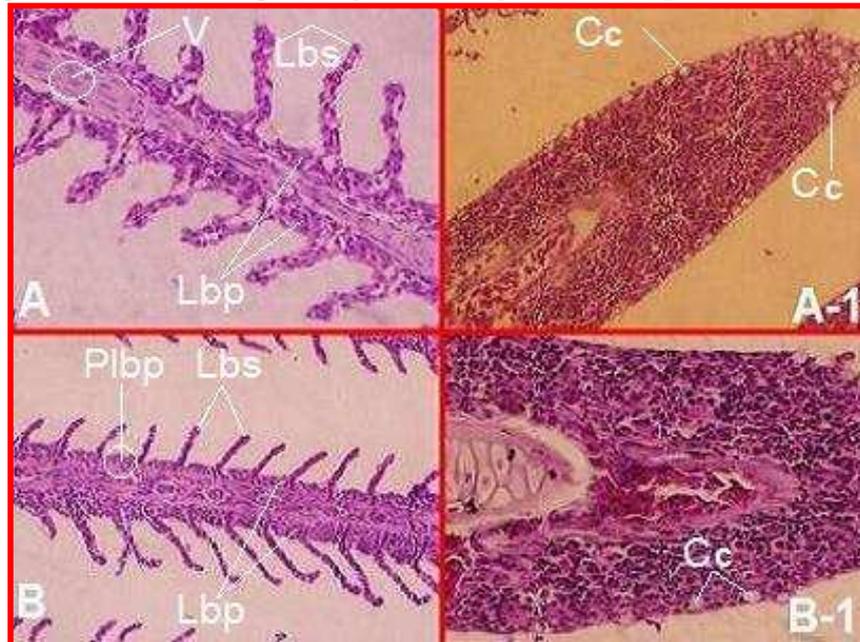
¹³⁸ TAVARES-DIAS, M. & MORAES, F., Op. Cit., p. 88.

¹³⁹ LÓPEZ, Jorge. Nutrición Acuícola. Fisiología digestiva de los organismos hidrobiológicos de cultivo. Pasto: Colombia: Universidad Nariño, 1997. p. 36

6.12 PARÁMETROS HISTOPATOLÓGICOS

6.12.1 Tejido branquial. El estudio histopatológico del tejido branquial en el T₀, indica configuración histológica normal de las lamelas (Figura 32 A y A-1), debido a la adecuada condición sanitaria de los animales en este tratamiento; en contraste el T₁ (infestación baja, 10 parásitos/pez), presenta hiperplasia discreta (figura 32 B y B-1).

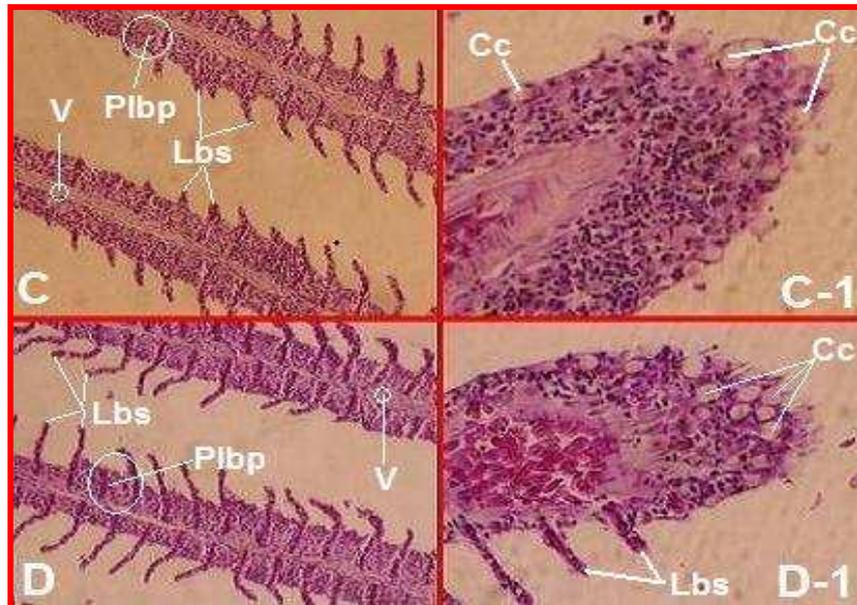
Figura 32. Corte sagital tejido branquial *P. mesopotamicus* H-E



(A 20x) : V = Vena; Lbs = Lamelas branquiales secundarias; Lbp = Lamela branquial primaria. (A-1 20x) : Cc = Células caliciformes. (B 10x) : Plbp = Pared lamela branquial primaria; Lbs = Lamela branquial secundaria; Lbp = Lamina branquial primaria. (B-1 20x) : Cc = Células caliciformes.

En los tratamientos T₂ (Figura 33 C y C-1) y T₃ (Figura 33 D y D-1), se observa deformación y pérdida celular; evidenciándose progresiva hiperplasia en la pared lamelar primaria, así como una disminución en el grosor de los vasos centrales aferentes y eferentes. Igualmente se detecta un aumento en el número de células caliciformes así como de la capa mucosa en la parte final de la lamela. Lo anterior se explica como una respuesta inflamatoria del tejido branquial frente al agente estresor, en este caso infestación del ectoparásito.

Figura 33. Corte sagital tejido branquial *P. mesopotamicus* H-E

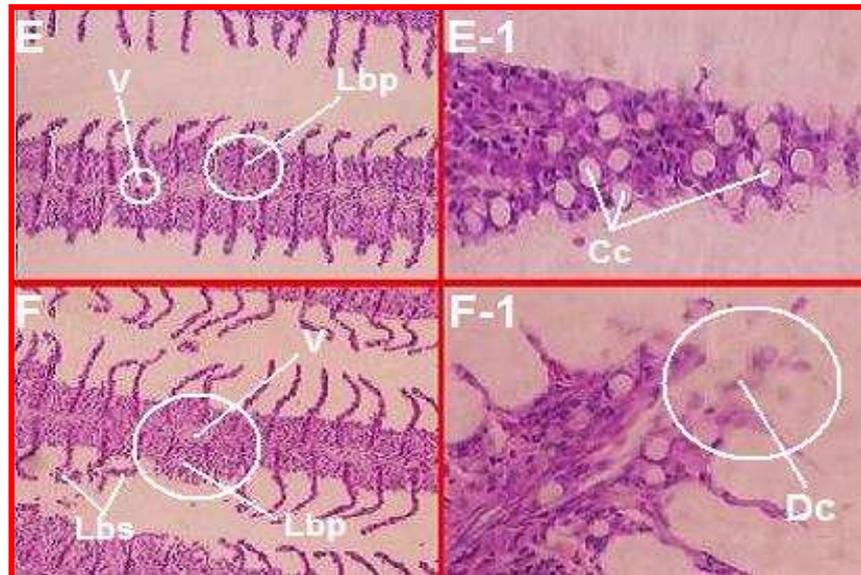


(C 10x) : V = Vena; Lbs = Lamelas branquiales secundarias; Lbp = Lamela branquial primaria. **(C-1 20x)** : Cc = Células calciformes. **(D 10x)** : Plbp = Pared lamela branquial primaria; Lbs = Lamela branquial secundaria; Lbp = Lamina branquial primaria. **(D-1 20x)** : Cc = Células calciformes.

En los tratamientos T₄ (Figura 34 E y E-1) y T₅ (Figura 34 F y F-1), se destaca deformación, acortamiento y pérdida lamelar; evidenciándose hiperplasia en la pared lamelar primaria, así como una disminución del grosor de los vasos aferentes y eferentes, obstruyendo el transporte de celular sanguíneo. Con aumento significativo en el número de células calciformes así como de la capa mucosa en la parte final de la lamela. Las muestras histopatológicas provenientes del T₅ registran un foco de necrosis debido a la presencia del parásito sobre el tejido¹⁴⁰; así como también fusión de las lamelas secundarias lo que interfiere en un eficiente intercambio gaseoso. Así mismo los peces tratados, registran lesiones cuya extensión y gravedad variaron de acuerdo con el aumento en la infestación y la cantidad del insecticida (diflubenzuron).

¹⁴⁰ CANELLO, Sergio; MORAES Flavio. y DE MORAES, Julieta. Efeitos do parasitismo sobre a estrutura branquial de *Leporinus microcephalus* Garavello e Britsk, 1988 (Anastomidae) e *Piaractus mesopotamicus* Holmberg, 1887 (Osteichthyes : Characidae). Revista Brasileira de Parasitologia Veterinaria. Vol. 15, n. 3. 2006. p. 111.

Figura 34. Corte sagital tejido branquial *P. mesopotamicus* H-E



(E 10x) : V = Vena; Lbs = Lamelas branquiales secundarias; Lbp = Lamela branquial primaria. **(E-1 20x)** : Cc = Células caliciformes. **(F 10x)** : Plbp = Pared lamela branquial primaria; Lbs = Lamela branquial secundaria; Lbp = Lamina branquial primaria. **(F-1 20x)** : Cc = Células caliciformes.

Los anteriores hallazgos histopatológicos, concuerdan a lo reportado por Verjan N. et al.¹⁴¹ en branquias infestadas por parásitos, que causaron pérdida de lamelas, hiperplasia del epitelio interlamelar, inflamación del arco y de los filamentos. Igualmente a las investigaciones realizadas por Rubens M. y Fanta E.¹⁴²; Tavares-Dias M. et al.¹⁴³; Velasco, et al.¹⁴⁴ y Ramírez, et al.¹⁴⁵, quienes describen hiperplasia discreta y moderada de células basales y caliciformes y alteraciones en lamelas secundarias en muestras provenientes de branquias de peces infestados con ectoparásitos, tratados con organofosforados (Metil paration 1ppm) y sulfato de cobre CuSO₄ y a la exposición tóxica del herbicida Roundup®.

¹⁴¹ VERJÁN, N; IREGUI, C; REY, A. Y DONADO, P. Sistematización y caracterización de las lesiones branquiales de la cachama blanca (*Piaractus brachypomus*) de cultivo clínicamente sana: algunas interacciones hospedador-patógeno-ambiente. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia : Universidad Nacional de Colombia. Santafé de Bogota, Colombia, 2001, p. 2.

¹⁴² RUBENS Marcelo y FANTA Edith. Effects of the organophosphorous Methyl Parathion on the Branchial epithelium of a freshwater Fish *Metynnis roosevelti*. Brazilian archives of biology and technology : an international journal; Vol.46, n. 3, 2003, p. 370.

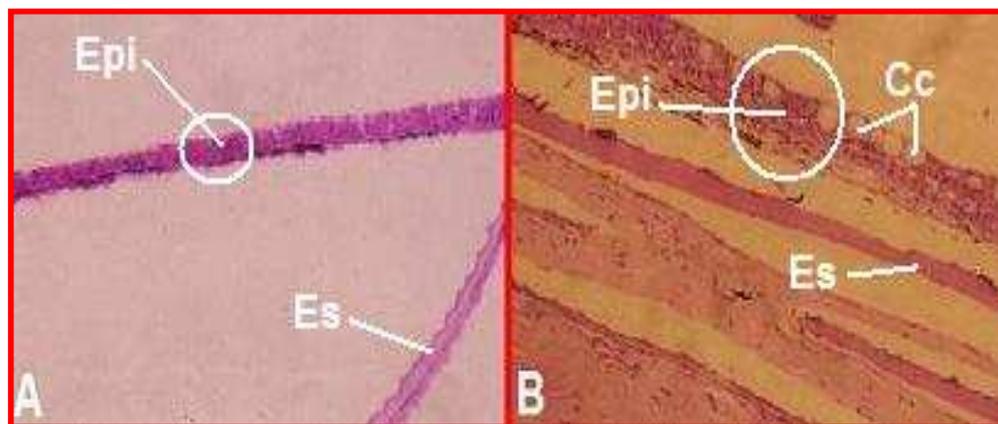
¹⁴³ TAVARES-DIAS M. et al., Op cit., p. 4.

¹⁴⁴ VELASCO, Y; GOMEZ, W. y CALDERON, J. Toxicidad aguada del sulfato de cobre (CuSO₄) en alevinos de cachama blanca (*Piaractus brachypomus*) bajo condiciones de aguas blandas. Revista Orinoquia. Villavicencio Meta. Vol. 10, n. 1, 2006, p. 66.

¹⁴⁵ RAMIREZ, Wilson; RODON, lang y ESLAVA, Pedro. Acute toxicity and histopathological alterations of Roundup® herbicide on "cachama blanca" (*Piaractus brachypomus*). Pesquisas Veterinarias de Brasil. Vol. 28. N 11, 2008, p. 551.

6.12.2 Piel. El estudio histopatológico en el T₀ de varias muestras de piel, presenta histología normal, caracterizada por un epitelio estratificado plano con células mucosas y dermis de fibras conjuntivas, vasos sanguíneos, nervios y cromatóforos, lo que demuestra la condición sanitaria normal de los ejemplares (Figura 35 A). Lo anterior está de acuerdo a lo reportado por Rodríguez, et al.¹⁴⁶ y Souza, et al.¹⁴⁷ quienes observaron una epidermis delgada con capas sobrepuestas de células epiteliales, células mucosas y claviformes, de tamaño, cantidad y textura normal para el pacú (*P. mesopotamicus*). El tratamiento T₁ (infestación baja, 10 parásitos/pez) en comparación al T₀, presentaba ligera hiperplasia de la epidermis, con aumento de las células caliciformes y superposición de escamas. (Figura 35B).

Figura 35. Corte sagital tejido epitelial *P. mesopotamicus* H-E



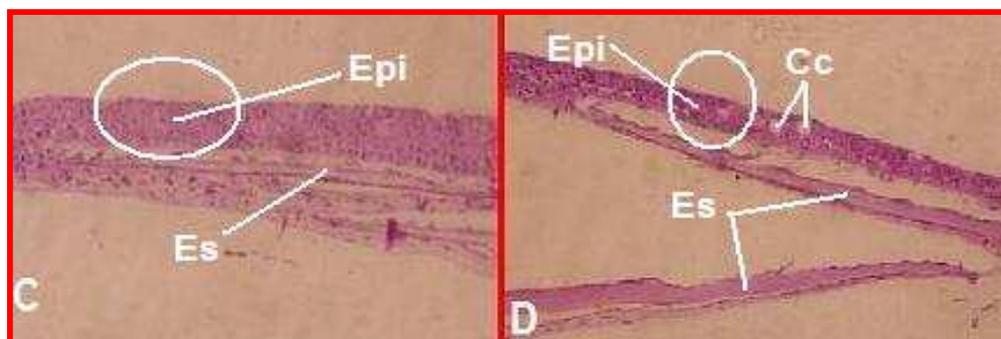
(A 10x) : Epi = Epitelio; Es = Escama. (B 10x) : Epi = Epitelio; Es = Escama; Cc = Células caliciformes.

En las muestras de piel del tratamiento T₂ (Figura 36 C), se registra intensa hiperplasia del tejido epitelial y marcada superposición de escamas; con relación al T₃ (Figura 36 D), se observa menor hiperplasia epitelial, debido a la eliminación del agente agresor externo (parásito) y a la menor dosis del medicamento, lo cual no genera mayor impacto sobre el epitelio.

¹⁴⁶ RODRIGUEZ, Maria; NAKAGHI, Luciana; OKADA, Laura; SANT'ANA, Regina; WAGNER, Petra; APARECIDO, Jayme y FERREIRA, Isabel. Histologia da pele do pacu (*Piaractus mesopotamicus*) e testes de resistência do couro. Acta scientiarum. Animal sciences : Maringá Brasil, 2003, v.25, n.1, 2003, p 39.

¹⁴⁷ SOUZA, Maria; DOURADO, Doroty; MACHADO, Silmara; BUCCINI, Daniele; JARDIM, Maria; MATIAS, Rosemary; CCORREIA, Celso y FERREIRA, Isabel. Análise da Pele de Três Espécies de Peixes: Histologia, Morfometria e Testes de Resistencia. Revista Brasileira de. Zootecnia : Maringa, Brasil 2003, v. 32, n. 6, p. 1555.

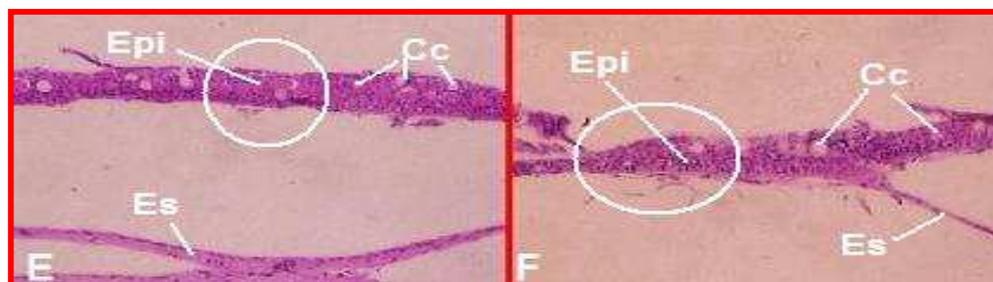
Figura 36. Corte sagital tejido epitelial *P. mesopotamicus* H-E



(C 10x) : Epi = Epitelio; Es = Escama. **(D 10x) :** Epi = Epitelio; Es = Escama; Cc = Células caliciformes.

En los tratamientos T₄ (Figura 37 E) y T₅ (Figura 37 F) se registra necrosis epitelial, aumento del número de células caliciformes y adelgazamiento de las escamas; lo cual indicaría el efecto simultáneo de una mayor dosis del químico e infestación del parásito¹⁴⁸. Según Paz, S.¹⁴⁹ la aplicación del insecticida carbofuran en dosis entre 14 – 22ppm genera hiperplasia epitelial, aumento de células caliciformes, así como la superposición de escamas, debido a la reacción del organismo ante la presencia de un agente químico en el agua.

Figura 37. Corte sagital tejido epitelial *P. mesopotamicus* H-E



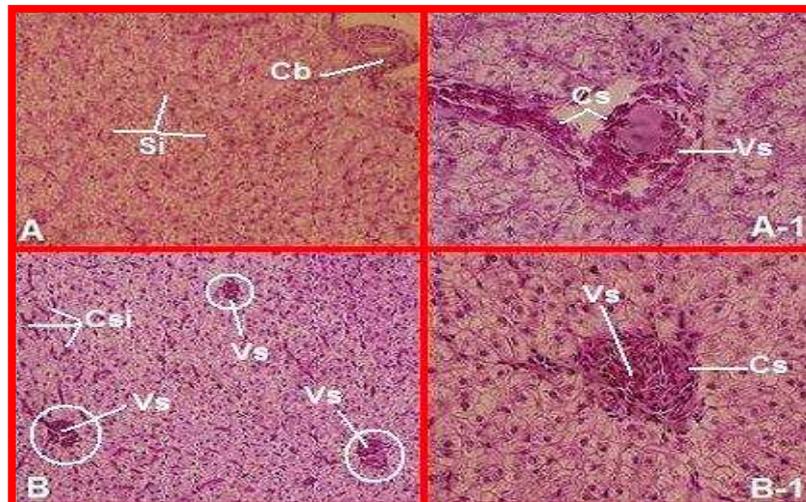
(E y F 10x) : Epi = Epitelio; Es = Escama; Cc = Células caliciformes.

6.12.3 Hígado. El estudio histopatológico de muestras de tejido hepático provenientes de ejemplares correspondientes al tratamiento 0, establece una configuración histológica normal del hígado, lo que demuestra las condiciones sanas de estos ejemplares (Figura 38 A y A-1). Con contraste las muestras histopatológicas del T₁ indican congestión leve Inter e intralobular (Figura 38 B y B-1).

¹⁴⁸ RAMIREZ, et al., Op cit. p. 550.

¹⁴⁹ PAZ, Sonia. Evaluación de toxicidad con carbofuran (Furadan 3GR) LD50 en la trucha arco iris *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum, 1972) observación clínica y patológica. Tesis de grado (Ingeniero en Producción Acuicola). Pasto, Colombia: Universidad de Nariño, Facultad de Ciencias Pecuarias, Programa de Ingeniería en Producción Acuicola, 2006. p. 67-70.

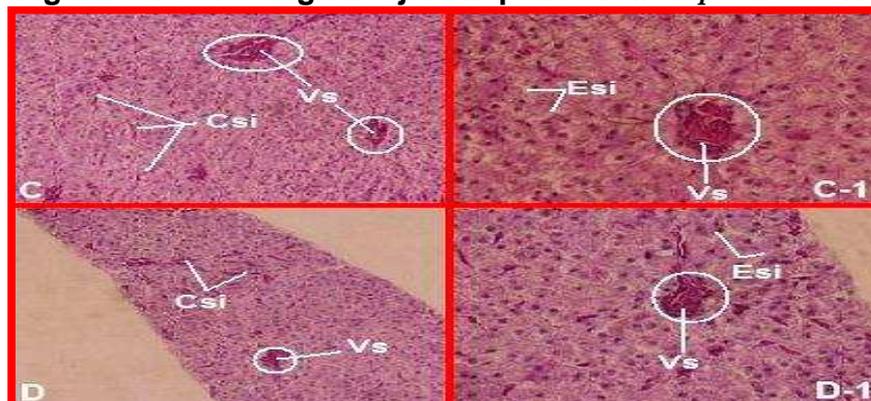
Figura 38. Corte sagital tejido hepático *P. mesopotamicus* H-E



(A 10x) : Cb = Conducto biliar; Si = Sinusoide. **(A-1 20x)** : Cs = Células sanguíneas; Vs = Vaso. **(B 10x)** : Csi = Congestión sinusoidal; Vs = Vaso sanguíneo. **(B-1 20x)** : Cs = Células sanguíneas; Vs = Vaso sanguíneo.

En los tratamientos T₂ (Figura 39 C y C-1) y T₃ (Figura 39 D y D-1), se evidencia congestión generalizada moderada inter e intralobular, así como un ensanchamiento sinusoidal y dilatación venosa, lo anterior se encuentra dentro de lo reportado por Paz S.¹⁵⁰ en estudios con trucha arco iris medicada con el insecticida carbofuran (furadan 3GR).

Figura 39. Corte sagital tejido hepático *P. mesopotamicus* H-E.

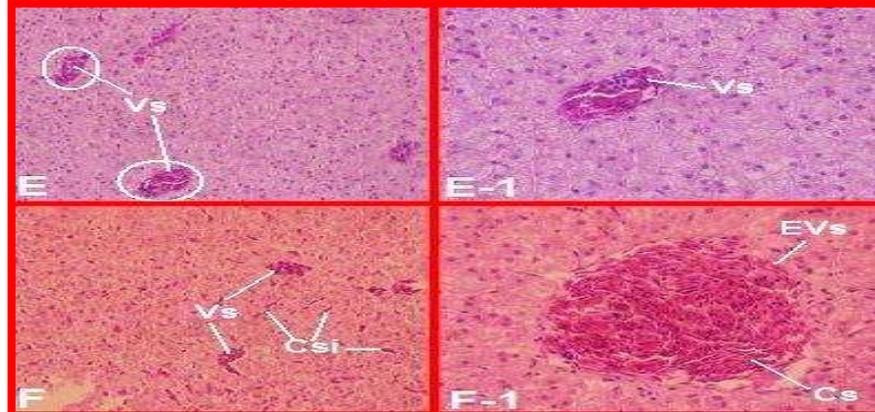


(C 10x) : Csi = Congestión sinusoidal; Vs = Vaso sanguíneo. **(C-1 20x)** : Esi = Ensanchamiento sinusoidal; Vs = Vaso sanguíneo. **(D 10x)** : Csi = Congestión sinusoidal; Vs = Vaso sanguíneo. **(D-1 20x)** : Esi = Ensanchamiento sinusoidal; Vs = Vaso sanguíneo.

¹⁵⁰ PAZ, S. Op cit., p. 78.

En los tratamientos T₄ (Figura 40 E y E-1) y T₅ (Figura 40 F y F-1) se evidencia generalizada intensa inter e intralobular, acompañada simultáneamente por ensanchamiento sinusoidal y dilatación venosa acompañada de hemorragias multifocales. Lo anterior concuerda con lo reportado por Paz S.¹⁵¹ y Ramírez, et al.,¹⁵² en trucha arco iris y cachama blanca respectivamente.

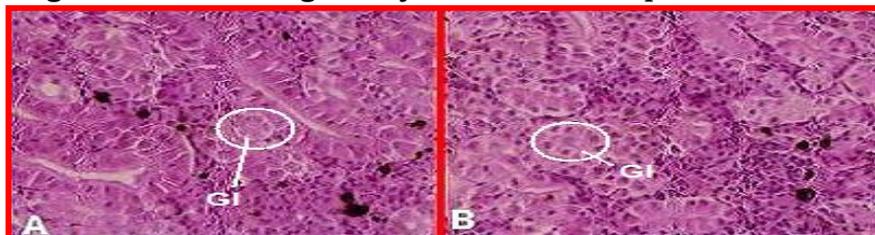
Figura 40. Corte sagital tejido hepático *P. mesopotamicus* H-E.



(E 10x y E-1 20x) : Vs = Vaso sanguíneo. (F 10x) : Csi = Congestión sinusoidal; Vs = Vaso sanguíneo. (F-1 20x) : CS = Células sanguíneas; EVs = Ensanchamiento Vaso sanguíneo.

6.12.4. Riñón. El estudio histológico de muestras provenientes de los diferentes tratamientos no establece alteraciones tisulares en el tejido renal, lo que demuestra que este órgano no es afectado por el ectoparásito o por el químico a base de 4-clorofenil-6-diflubenzoil (Figura 41 A y B). Sin embargo Veiga, M. et al.¹⁵³ han establecido lesiones en el riñón al evaluar bajo concentraciones subletales en la especie íctica *Prochilodus lineatus* el organofosforado triclorfon.

Figura 41. Corte sagital tejido renal *P. mesopotamicus* H-E



(A y B 20X) : Gl = Glomerulo.

¹⁵¹ PAZ, S. Op cit., p. 78.

¹⁵² RAMIREZ, et al., Op cit. p. 551.

¹⁵³ VEIGA, Marcelo; Rodríguez, Edson; PACHECO, Fabio y RANZANI-PAIVA Maria. Histopathologic changes in the kidney tissue of *Prochilodus lineatus* Valenciennes, 1836 (Characiformes, Prochilodontidae) induced by sublethal concentration of trichlorfon exposure. Brazilian archives of biology and technology an international journal : Sao Paulo, sp, Brasil, 2002. v. 45, n. 2, p. 172.

7. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

7.1 CONCLUSIONES

- El número total de eritrocitos por mm^3 , reportó diferencias estadísticas significativas, estableciendo, que los tratamientos T_1 y T_2 fueron los más alterados con respecto al T_0 . Debido a la acción hematófaga del ectoparásito a nivel de piel y branquias.
- Los niveles de hematocrito y hemoglobina, no presentaron diferencias estadísticas significativas entre los tratamientos.
- El Volumen Corpuscular Medio VCM ($112.31 \pm 18.44 \text{fL}$), fue diferente estadísticamente, mayor en los tratamientos $T_1 = 109,61 \text{fL}$; $T_2 = 119,28 \text{fL}$; $T_3 = 111,73 \text{fL}$; $T_4 = 123,28 \text{fL}$ y $T_5 = 124,78 \text{fL}$ con respecto al $T_0 = 87,93 \text{fL}$ y la CHCM ($44.71 \pm 6.36 \text{g/dL}$), en los tratamientos T_1 ; T_2 ; T_3 ; T_4 y T_5 , sufrieron una disminución con respecto al T_0 , reflejando una anemia de tipo macrocítica - hipocrómica.
- El porcentaje de heterófilos, fue similar estadísticamente en los distintos tratamientos.
- El conteo de linfocitos ($94.09 \pm 4.11\%$) presentó una disminución estadística, del porcentaje en los tratamientos T_1 y T_2 con respecto al T_0 . por ser esta una enfermedad parasitaria.
- El porcentaje de CGE ($3.59 \pm 3.73\%$), en los tratamientos T_1 y T_2 , aumentó significativamente este tipo de célula con respecto al T_0 .
- El conteo de monocitos ($0.92 \pm 1.08\%$), reveló que el tratamiento T_5 , presentó el mayor incremento del porcentaje con respecto al T_0 . por el efecto aditivo del parásito y el insecticida.
- El estudio no determinó presencia de basófilos en las extensiones sanguíneas de las muestras provenientes de los distintos tratamientos.
- La mayor eficacia del insecticida diflubenzuron con respecto al control, se la obtuvo en el T_5 ($2,0 \text{mmg/L}$) con el $99,5\%$, seguido respectivamente por el T_4 ($1,0 \text{mg/L}$) = $96,3\%$ y el T_3 ($0,5 \text{mg/L}$) = $91,5\%$.

- El análisis del índice hepatosomático, registró según la prueba de Tukey diferencias estadísticas altamente significativas entre los tratamientos ($p \leq 0,05$), con respecto al T₀, lo cual concuerda con pérdida de apetito, disminución de la ganancia de peso y alteraciones en la configuración histológica hepática, causada por el efecto hematófago del parásito y el metabolismo del pesticida en el hígado.
- Los tejidos con lesiones histopatológicas importantes fueron branquias, piel, al encontrarse directamente expuestos a los agentes externos estresantes como son los parásitos y el insecticida diflubenzuron. En las branquias se observó hiperplasia de lamela primaria, pérdida de las lamelas secundarias y aumento de células caliciformes; y en la piel aumento de las capas epidérmicas y de células caliciformes.
- El análisis histopatológico, del tejido hepático reveló congestión generalizada inter e intralobular, ensanchamiento sinusoidal y dilatación de los vasos.
- El tejido renal no presentó alteraciones evidentes con respecto al control.
- Los parámetros físico-químicos de temperatura, oxígeno disuelto y potencial de hidrogeniones pH, fueron similares y por lo tanto no incidieron sobre los parámetros hematológicos e histopatológicos del pacú *P. mesopotamicus*, infestados con *Dolops carvalhoi*. Reflejando homogeneidad de los tratamientos y buen control de los parámetros.

7.2 RECOMENDACIONES

- Implementar investigaciones que evalúen el posible efecto acumulativo residual en el filete y/o en el sistema acuático por utilización del 4-clorofenil-6-diflurobenzoil.
- Supervisar la utilización del diflubenzuron en ambientes acuáticos debido a los efectos sobre los artrópodos de la cadena trófica.
- Realizar estudios hematológicos en especies ícticas nativas y/o foráneas, estableciendo las características normales de las células sanguíneas e índices hematológicos, para inferir en su alteración en distintas entidades patológicas.
- Promover en el sector piscícola la adopción y desarrollo de tecnologías limpias en los diferentes sistemas de cultivos, con el fin de evitar la polución de los cuerpos de agua.

- Establecer en futuras investigaciones, si las alteraciones histopatológicas, posterior al tratamiento de diferentes etiologías patológicas con agentes químicos, son de tipo permanentes o temporales.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALBELO, Allen. Histología. Gran Enciclopedia Médica. Madrid: Interamericana, 1980. 1207 p.

ANDREY, Tyler. Histología animal, México: Torres, 1996, 49 p.

BARBOSA, J.M. Síntese dos trabalhos realizados com espécies do gênero *Colossoma*. São Paulo, Brasil : editorial Pirassununga, 1986. 8 p.

BROWN, Lydia. ACUACULTURA PARA VETERINARIOS. Producción y clínica de peces. Zaragoza, España : ACRIBIA., 1999. 280 p.

CANELLO, Sergio y MORAES Flavio. Contagem diferencial de leucocitos em *Piaractus mesopotamicus* Holmberg, 1887 (Osteichthyes : Characidae) infectados por *Dolops carvalhoi* (Crustacea : Branquiura) e *Anacanthorus penilabiatus* (Monogenea : Dactylogyridae) tratados com praziquantel, levamidazol e diflubenzuron. Tese de Doutorado em aquicultura. Faculdade de Ciências Agrárias e veterinárias, Universidade Estadual Paulista. Jaboticabal, Brasil, 2006. Capítulo III 37-60 p.

_____. Variáveis eritrocitárias em *Piaractus mesopotamicus* Holmberg, 1887 (Osteichthyes : Characidae) infectados por *Dolops carvalhoi* (Crustacea : Branquiura) e *Anacanthorus penilabiatus* (Monogenea : Dactylogyridae) tratados com praziquantel, levamidazol e diflubenzuron. Tese de Doutorado em aquicultura. Faculdade de Ciências Agrárias e veterinárias, Universidade Estadual Paulista. Jaboticabal, Brasil, 2006. Capítulo IV.61-80 p.

CANELLO, Sergio; BELO, Marco; SOARES, Vando; DE MORAES; Julieta; MORAES. Flávio. Eficácia do diflubenzuron no controle de *Dolops carvalhoi* (Crustacea: Branchiura) em jovens pacus *Piaractus mesopotamicus* (Osteichthyes: Characidae) naturalmente infectados. São Paulo, Brasil : Universidade Estadual Paulista, 2005. 3 p.

CANELLO, Sergio; MORAES Flavio. y DE MORAES, Julieta. Efeitos do parasitismo sobre a estrutura branquial de *Leporinus microcephalus* Garavello e Britsk, 1988 (Anastomidae) e *Piaractus mesopotamicus* Holmberg, 1887 (Osteichthyes : Characidae). Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária. Vol. 15, n. 3. 2006. 110 – 115 p.

CASAS, Antonio; SALVE, María; AMICH, Silvia; PRIETO, Santiago. Laboratorio clínico. Hematología. España : McGRAW-HILL-INTERAMERICANA, 1994. 382 p.

- CASTAGNOLLI, N. e FONTES, S. Consolidação do conhecimento adquirido sobre o pacú (*Colossoma mitrei*, BERG, 1985). Jaboticabal, Brasil : Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, 1985. 120 p.
- CECCARELLI, P.S.; FIGUEIRA, L.B.; FERRAZ DE LIMA, C.B.L. & OLIVEIRA, C.A. Observações sobre a ocorrência de parasitas no CEPTA entre 1983 e 1990. *Boletim Técnico do CEPTA – Pirassununga-SP*, v. 3(único) , 1990. 43–54 p.
- CONROY, Gina y CONROY, David. Patología de tilapias: una reseña general. Sanidad de organismos acuáticos. São Paulo, Brasil : Varela, 2004. 426 p.
- CRESPO, Silvia. Introducción a la histología e histopatología de peces. Acuicultura marina: fundamentos biológicos y tecnología de la producción. Universidad de Barcelona. Facultad de Veterinaria. España: Barcelona, 1993. 739 p.
- DIAZ, Francisco y LÓPEZ, Ricardo. El cultivo de la Cachama blanca (*Piaractus brachypomus*) y de la cachama negra (*Colossoma macropomun*). Fundamentos de acuicultura. Instituto Nacional de Pesca y Acuicultura INPA, Santafé de Bogotá, Colombia, 1993. 212 p.
- EISLER R. Diflubenzuron hazards to fish, wildlife and invertebrates: a synoptic review. U.S. *Fish Wildl. Ser Biol. Rep.* , Washington, D.C., v. 4, n. 25, p. 1-36. 1992.
- ELIS, A.E. Leucocytes and related cells in the plaice, (*Pleuronectes platessa*). *J. Fish farm. Int.*, v. 25, n. 2: 13-18, 1998.
- ERDAL, J.I. New drug treatment hits sea lice when they are most vulnerable. In: *Fish farm. Int.*, v. 24, n. 2: 15-19, 1997.
- FIGUEIRA, L.B. CECCARELLI, P.S. Observações sobre a presença de ectoparasitas em pisciculturas tropicais do interior (CEPTA- região) entre janeiro e junho de 1991. *Boletim Técnico do CEPTA, Pirassununga-SP*, v.4, n 1, 1991. 57-65 p.
- FUJIMOTO, R. et. al. Utilização do diflubenzuron no controle de crustáceos de piauçu *Leporinus macrocephalus*. Efeitos parasiticidas e nos parâmetros hematológicos. XI Seminário Brasileiro de Parasitologia Veterinária. Salvador, Brasil. 1993. 133 p.
- HIRUNI UDARA CHANDRASEKARA & ASOKA PATHIRATNE. Influence of low concentrations of Trichlorfon on haematological parameters and brain acetylcholinesterase activity in common carp, *Cyprinus carpio L.* Department of zoology, University of kelaniya. Blackwrrll publishing Ltd. 2004. 144-149 p.

IREGUI, Carlos. Morfología de los peces. En: Memorias del 2º Curso seminario internacional de ictiopatología. Bogotá: Universidad Nacional de Colombia, Grupo de Patología Veterinaria, 2008. p. 19.

JARAMILLO, Nicolas. Estudio hematológico básico del puye (*Galaxias maculatus*) (Jenyns, 1842) en estado poslarval y adulto. Trabajo de grado Licenciado en Ciencias de la Acuicultura. Universidad Católica de Temuco., Facultad de Recursos Naturales; Escuela de Acuicultura, 2005. 86 p.

KABATA, Z. Copepoda and Branchiura. In: Margolis, L., Kabata, Z. editors: Guide to the parasites of fishes of Canadá. Part II. Crustacea, Canadian Special Publication, *Fisheries Aquatic Science*, n. 101, 1988. 3-27 p.

KLESIOUS, P. y ROGER, W. Parasitism of catfish and other farm raised food fish. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, Schawnborg, v. 207, p. 1473-1478, 1995.

KUBITZA, F. e MEDEIROS, L. Principais parasitoses e doenças dos peixes cultivados. São Paulo, Brasil : Degaspari, 1999. 180 p.

LÓPEZ, Jorge. Nutrición Acuícola. Fisiología digestiva de los organismos hidrobiológicos de cultivo. Pasto: Colombia: Universidad Nariño, 1997. 211 p.

LÓPEZ, Jorge; IMUEZ, Marco; BURGOS, Álvaro; RODRÍGUEZ, Jaime; MENA, Paolo y TORRERS, Carlos. Evaluación de inmunoestimulantes en las fases de levante y seba de trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*), cultivada en jaulas flotantes en el Lago Guamuéz. Pasto. Colombia. Universidad de Nariño. Vicerrectoría de Investigaciones, Postgrados y Relaciones Internacionales. Sistema de investigación. 2005. 55 p.

LÓPEZ, Jorge; PALACIOS, Pedro; CORAL, Iván; ZAMBRANO, Ana. Evaluación comparativa de prebiótico, probiótico e inmunopotenciadores en especies ícticas nativas y foráneas. En: IV Seminario Nacional de Ingeniería en Producción Acuícola. Módulo de Sanidad e inmunoestimulantes. 2007. 65 p.

LOPEZ, Jorge y RUBIO, Efraín. Vulnerabilidad de especies ícticas nativas con relación a especies ícticas introducidas em La cuenca alta del río Cauca. Revista científica de la Facultad de Ciencias Pecuarias, Universidad de Nariño, San Juan de Pasto, Colombia, 2001, V. 4, n. 7, 8-20 p.

LUDWIG, G.M. Effects of trichlorfon, fenthion and diflubenzuron on the zooplankton community and on production of reciprocal-cross hybrid striped bass fry culture ponds. *Aquaculture*, v. 110, p. 301-319, 1993.

MACHADO, Laura. La acuicultura y la calidad de agua. México: Safervo. 1990. 54 p.

MAIGUAL, Yemal. Evaluación de la toxicidad aguada del malathion en alevinos de tilapia nilotica *Oreochromis niloticus* (Linnaeus, 1758) en ausencia y presencia de sedimentos y análisis residuo por cromatografía gaseosa. Tesis de grado (Ingeniero en Producción Acuícola). Pasto, Colombia: Universidad de Nariño, Facultad de Ciencias Pecuarias, Programa de Ingeniería en Producción Acuícola, 2007. 107 p.

MARTINS, M.L.; ROMERO, N.G. Efectos del parasitismo sobre el tejido branquial en peces cultivados : Estudio parasitológico e histopatológico. *Revista Brasileira de Zoología*, v. 13, n.2 , p. 489–500, 1996.

MARTINS, M.L.; MORAES, F.R.; FUJIMOTO, R.Y.; ONAKA, E.M.; SCHALCH, S.H.C.; NOGA, E.J. Fish Disease. *Diagnosis and Treatment*. St. Louis, Missouri: Mosby-Year Book, Inc., 1996.

MARTINS, Maurício; ONAKA, Eduardo; MORAES, Flávio y FUJIMOTO Rodrigo. Mebendazole treatment against *Anacanthorus penilabiatatus* (Monogénea, Dactylogyridae) gill parasite of cultivated *Piaractus mesopotamicus* (Osteichthyes, Characidae) in Brasil. Efficacy and hematology. 2001. 332-336 p.

MARTINS, Maurício; MORAES, Flávio; FUJIMOTO, Rodrigo; ONAKA, Eduardo; SCHALCH, S.H.C.; SILVA, E.D.; NOMURA, Daniela; SILVA, C.A.H. Parasitic infections. In Cultivated Brazilian freshwater fishes. A survey of diagnosed cases. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, v. 9, n. 1: 23-28, 2000.

MOHSEN, Z.H. y MULLA, M.S. Field evaluation of *Simulium* larvicides: effects on target and nontarget insects. *Environ. Entomol.*, v. 11, n. 390, 1982.

NOGA, E.J. *Fish Disease, Diagnosis and Treatment*. Missouri: Mosby-Year Book, Inc., 1996.

ONAKA, Eduardo. Utilização e efeitos do diflubenzuron em ecossistemas aquáticos. Disciplina, agrotóxicos e aquicultura. Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, estado do São Paulo, Brasil 2002. 10 p.

ORIA, J. Elementos figurados do sangue de alguns teleosteos fluviais brasileiros (Nematognathas, characidáeos, Gymnotideos, poeciliideos). I. Eritrócitos: formas normais, formas jovens e formas involuídas. São Paulo : Faculdade de Medicina. 1932. 60 p.

PAVANELLI, G; EIRAS, J e TAKEMOTO, R et al. Doenças de peixes. Profilaxia, diagnóstico e tratamento. Paraná, Brasil : editora da Universidade Estadual de Maringá, 1998.181 p.

_____. Doenças de peixes. Profilaxia, diagnóstico e tratamento. Paraná, Brasil : editora da Universidade Estadual de Maringá, 2002. 205 p.

PAZ, Sonia. Evaluación de toxicidad con carbofuran (Furadan 3GR) LD50 en la trucha arco iris *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum, 1972) observación clínica y patológica. Tesis de grado (Ingeniero en Producción Acuícola). Pasto, Colombia: Universidad de Nariño, Facultad de Ciencias Pecuarias, Programa de Ingeniería en Producción Acuícola, 2006. 130 p.

POST, G. *Textbook of fish health*. New Jersey: T.F.H. Public., 1987.

PRIETO A. *et al. Parasites of Freshwater Cultured Fish*. Differential Diagnostic Keys. Food and Agriculture Organization of the United Nations-FAO, Mexico, June, 1994.

RAMIREZ, Wilson; RODON, Ilang y ESLAVA, Pedro. Acute toxicity and histopathological alterations of Roundup® herbicide on "cachama blanca" (*Piaractus brachypomus*). *Pesquisas Veterinárias de Brasil*. Vol. 28. N 11, 2008, 547 – 554 p.

RANZANI-PAIVA, Maria; MASSATO; Ricardo e PEREZ, Maria. *Sanidade de organismos aquáticos*. São Paulo : Varela, 2004. 426 p.

RANZANI-PAIVA, Maria. y SILVA-SOUZA, Â. *Hematología de peixes Brasileiros*. *Sanidade de organismos aquáticos*. São Paulo : Varela, 2004. 426 p.

ROBERTS, Ronald. *Patología de los peces*. Madrid, España : Mundi-prensa, 1981. 366 p.

RODRÍGUEZ, Byron. *Análisis Microscópica de piel en peces*. Brasil: Minus, 1995. 105 p.

RODRIGUEZ, Horacio. *Prevención y tratamiento de las enfermedades en cultivos de agua dulce*. *Fundamentos de acuicultura continental*. Instituto Nacional de Pesca y Acuicultura INPA, Santafé de Bogotá, Colombia, 1993. 285 p.

RODRÍGUEZ, Jesús. *Evaluación fisiológica de deportistas de alto nivel*. 2000 Disponible en Internet, URL: <http://www.ugr.es/jhuertas/EvaluacionFisiologica/VCM/mcvmchc.htm>.

RODRIGUEZ, María; NAKAGHI, Luciana; OKADA, Laura; SANTANA, Regina; WAGNER, Petra; APARECIDO, Jayme y FERREIRA, Isabel. *Histologia da pele do pacu (*Piaractus mesopotamicus*) e testes de resistência do couro*. *Acta scientiarum. Animal sciences* : Maringá Brazil, 2003, Vol. 25, n. 1, 2003, 37-44 p.

ROTH, M.; RICHARDS, R.H.; SOMMERVILLE, C. Current practices in the chemotherapeutic control of sea lice infestations in aquaculture: a review. *Journal of Fish Diseases* 1993, v.16, n.1, p. 1-26.

RUBENS, Marcelo y FANTA, Edith. Effects of the organophosphorous Methyl Parathion on the Branchial epithelium of a freshwater Fish *Metynnis roosevelti*. *Brazilian archives of biology and technology an international journal: Curimbatá, Brazil*; 2003, Vol.46, n. 3, 2003, 361-372 p.

SAINT-PAUL, U. Potential for aquaculture of south American freshwater fishes, Jaboticabal, Brasil : Faculdade de Ciencias Agriarias é Veterinarias, Universidade Estadual Paulista, 1986. 85 p.

SANTOS. Investigación de estudios histológicos pesqueros y agrícolas. Sao Paulo: Rtes, 1995. 39 p.

SCHAEFER, C.H.; DUPRAS, E.F., Jr. Factors affecting the stability of Dimilin in water and the persistence of Dimilin in field waters. *J. Agr. Food. Chem.*, v. 24, n. 733, 1976a.

_____. Residues of diflubenuron [1-(4-Chlorophenyl)-3-(2,6-difluorobenzoyl) urea] in pasture soil, vegetation, and water falling aerial application. *J. Agr. Food. Chem.*, v. 25, n. 1026, 1977.

SILVA, A. J. 1985. Aspectos da alimentação do pacú adulto, (*Colossoma mitre,i* BERG, 1985) (PISCES, CHARACIDAE), no pantanal de mato grosso. Dissertação de mestrado. Universidade Federal do Rio de Janeiro, Brasil, 1999. 120 p.

SILVEIRA, Raquel; CRUZ, Yanis; MARTINEZ Mercedes y ASCENCIO, Felipe. Características morfológicas y citoquímicas de las células de la sangre periférica de *Oreochromis aureus* S. Cichlidae. *Revista electrónica de veterinaria : España* 2005, V. 6, n. 10, 1-8 p.

SIPAÚBA TAVARES, Lúcia. Limnologia aplicada a aquicultura. São Paulo, Brasil : editorial afiliada Jaboticabal, 1995. 85 p.

SOUZA, Maria; DOURADO, Doroty; MACHADO, Silmara; BUCCINI, Daniele; JARDIM, Maria; MATIAS, Rosemary; CORREIA, Celso y FERREIRA, Isabel. Análise da Pele de Três Espécies de Peixes: Histologia, Morfometria e Testes de Resistencia. *Revista Brasileira de Zootecnia : Maringa, Brasil* 2003, v. 32, n. 6, 1551-1559 p.

TAVARES-DIAS, Marcos. Estudos parasitológico e hematológico em peixes oriundos de pesquepagues do município de Franca, SP. Dissertação apresentada

ao curso de Pós-graduação em Aqüicultura, para obtenção do título de Mestre em Aqüicultura. Jaboticabal.SP., 2000. 140 p.

_____. Variáveis hematológicas de teleósteos brasileiros de importância zootécnica. Tese de Doutorado em aqüicultura. Faculdade de Ciências Agrárias e veterinárias, Universidade Estadual Paulista. Jaboticabal, Brazil, 2003. 150 p.

TAVARES-DIAS, M. et al. Evaluación of the hematological parameters in *Piaractus mesopotamicus* Holmberg. 1887 (Osteichthyes Characidae) with *Argulus sp.* (Crustacea: Branchiura) infestation and treatment with organophosphate : Revista Brasileira. Curitiba, Brasil, 1999. v. 16, n. 2, 553-555 p.

TAVARES-DÍAS, Marcos & MORAES, Flávio. Características hematológicas da *Tilapia rendalli* Boulenger, 1896 (Osteichthyes: cichlidae) capturada em “pesque-pague” de França, São Paulo, Brasil.

_____. Hematología de peixes teleósteos. São Paulo, Brasil : esditorial afiliada Jaboticabal, 2004. 144 p.

TAVARES, Marcos; MORAES, Flávio; MAKOTO, Eduardo and BONADIO Cristina. Changes in blood parameters of hybrid tambacu fish parasitized by *Dolops carvalhoi* (Crustacea, Branchiura), a fish louse. VETERINARKI ARCHIV 77 (4). 2007., 355-363 p.

TAVARES-DÍAS, Marcos; LATERÇA, Mauricio; CANELLO, Sergio; MAKOTO, Eduardo; FLORES, Carolina; ENGRACIA, Julieta y MORAES Flavio. Alterações hematológicas e histopatológicas em pacus *Piaractus mesopotamicus* Holmberg, 1887 (Osteichthyes: Caracidae) tratados com sulfato de cobre (CuSO₄). Acta scientiarum : Jaboticabal, São Paulo, Brasil. 2002, v. 24 n. 2. 1 –7 p.

TAVARES-DÍAS, Marcos; SAMDRIN, Elziane; MORAES, Flávio; CARNEIRO, Paulo. Physiological responses of “Tambaqui” *Colossoma macropomum* (Characidae) to acute stress, 43 – 48 p.

TANNER, D.K.; MOFFETT, M.F. Effects of diflubenzuron on the reproductive success of the bluegill sunfish, *Lepomis macrochirus*. Environmental Toxicology and Chemistry, 1995. v. 14, p. 1345-1355 p.

THATCHER,V.E.; BRITES-NETO, J.B. Diagnóstico, Prevenção e Tratamento de Enfermidades de Peixes Neo Tropicais de Água Doce. Rev. Bras. Med. Vet., Rio de Janeiro, 1994. v. 16, n. 3. 111-128 p.

TOMEĆ, M. et al. Kvaliteta vode i ektoparazitarne bolesti ciprinidnih riba.++++ *Ribarstvo*, Ispit, v. 53, n. 4, 1995. 129-139 p.

Universidad de Guadalajara: Departamento de histología y biología celular, 2005. Disponible en Internet, URL: <http://www.uag.mx/27/histologia/import.htm>.

VALENZUELA, Ariel; OYARZÚN, Ciro y SILVA, Víctor. Células sanguíneas de *Schroederichthys chilensis* (Elasmobranchii, scyliorhinidae): la serie blanca. Facultad de Ciencias Naturales y Oceanográficas : Concepción, Chile, 2003. v. 67 n. 1 130-137 p.

VEIGA, Marcelo; Rodríguez, Edson; PACHECO, Fabio y RANZANI-PAIVA Maria. Histopathologic changes in the kidney tissue of *Prochilodus lineatus* Valenciennes, 1836 (Characiformes, Prochilodontidae) induced by sublethal concentration of /trichlorfon exposure. Brazilian archives of biology and technology an international journal : Sao Paulo, sp, Brazil, 2002. v. 45, n. 2, 171 –175 p.

VELASCO, Y; GOMEZ, W. y CALDERON, J. Toxicidad aguda del sulfato de cobre (CuSO₄) en alevinos de cachama blanca (*Piaractus brachypomus*) bajo condiciones de aguas blandas. Revista Orinoquia. Villavicencio Meta. Vol. 10, n. 1, 2006, 64 – 70 p.

VERJÁN, N; IREGUI, C; REY, A. Y DONADO, P. Sistematización y caracterización de las lesiones branquiales de la cachama blanca (*Piaractus brachypomus*) de cultivo clínicamente sana: algunas interacciones hospedador-patógeno-ambiente. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Nacional de Colombia. Santafé de Bogotá, Colombia, 2001. 24 p.

A N E X O S

Anexo A. Procesamientos histológicos para peces (Laboratorio de histotecnología de la UNESP)

Fijación: es el proceso de interrupción de los fenómenos de putrefacción y fermentación post mortem. Esto se obtiene utilizando sustancias químicas que rápidamente penetren y endurezcan las células, bloqueando los sistemas enzimáticos capaces de destruirlas. El fijador más utilizado es el formol al 10% tamponado.

Solución de formol al 10% tamponado (1 litro)

Formol puro (37 - 40%)	100 ml
Agua destilada	900 ml
Fosfato de sodio monobásico	6,5g
Fosfato de sodio bi/ dibásico	4,0g

Macroscopia del material después de la fijación: se realiza con bisturí nuevo, tijeras, pinzas, etc. El material es reducido en cortes transversales, longitudinales dependiendo de cada órgano. Tomando apenas una porción de la lesión macroscópica, más o menos 5mm de espesor.

Deshidratación: después de la deshidratación, se utiliza la deshidratación cuya es la sustitución del agua contenida en los tejidos por otros fluidos químicos que tornen los tejidos translúcidos. Los agentes más utilizados son: Alcohol etílico y acetona.

Método de deshidratación:

1. Alcohol 80%	2horas
2. Alcohol 90%	2horas
3. Alcohol 95%	1hora y media
4. Alcohol I 100%	1hora
5. Alcohol II 100%	1hora
6. Alcohol III 100%	1hora
7. Alcohol IV 100%	Una noche
8. Alcohol xilol	2horas
9. Xilol I	2horas
10. Xilol II	1hora

Anexo B. Parámetros físico-químicos del agua durante el tiempo de aclimatación y desarrollo del experimento.

Tratamiento/ Réplica		Temperatura °C											
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
T ₀	1	30,3	30,2	29,8	29,8	29,7	29,5	29,3	29,3	29,4	29,0	29,2	29,0
	2	30,4	30,5	29,7	29,8	29,5	29,1	28,9	29,1	28,9	28,8	28,7	28,5
	3	30,5	30,4	29,6	29,7	29,8	28,8	29,0	28,9	29,0	29,0	28,6	28,8
T ₁	1	30,3	30,3	29,6	29,7	29,6	28,8	29,3	29,4	29,0	28,8	28,5	28,7
	2	30,8	30,6	29,9	29,6	29,6b	29,3	29,0	29,6	28,8	28,6	28,7	28,7
	3	30,6	30,5	29,8	29,8	29,5	29,0	28,8	29,3	28,8	28,7	28,8	28,9
T ₂	1	30,5	30,5	30,0	29,5	29,5	29,3	29,0	28,7	28,6	28,7	28,4	28,7
	2	30,8	30,4	29,8	29,7	29,7	29,1	28,7	29,4	29,0	28,9	28,7	28,4
	3	30,6	30,6	29,7	29,8	29,6	28,8	28,9	28,7	28,9	28,7	28,5	28,8
T ₃	1	29,6	30,6	29,8	29,5	29,6	28,9	29,2	28,9	28,7	28,7	28,9	28,9
	2	29,9	30,5	30,1	29,7	29,5	29,3	28,8	28,9	29,0	28,8	28,6	28,7
	3	30,2	30,6	29,7	29,7	29,5	29,1	29,0	28,8	28,9	28,5	28,6	28,5
T ₄	1	30,3	30,5	30,0	29,6	29,6	29,0	28,7	28,9	29,0	28,8	28,6	28,7
	2	30,4	30,4	29,8	29,5	29,5	28,7	29,4	28,9	28,7	28,7	28,9	28,9
	3	30,5	30,6	29,7	29,5	29,5	28,9	28,7	28,7	28,9	28,7	28,5	28,8
T ₅	1	30,5	30,3	29,6	30,0	29,6	28,7	29,0	28,9	28,7	28,7	28,9	28,9
	2	30,4	30,4	29,5	29,8	29,5	29,4	28,7	28,9	29,0	28,8	28,6	28,7
	3	30,6	30,5	29,5	29,7	29,5	28,7	28,9	28,7	28,9	28,7	28,5	28,8

Tratamiento/ Réplica		Oxígeno (mg/L)											
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
T ₀	1	5,52	4,97	5,2	4,85	4,92	5,35	5,61	4,42	5,52	5,2	5,06	4,76
	2	5,41	5,52	5,39	5,39	5,2	5,61	5,39	4,67	5,61	4,7	5,39	5,32
	3	5,58	5,35	5,52	5,21	4,84	5,2	5,21	4,92	4,85	5,2	4,92	4,92
T ₁	1	5,61	5,61	5,2	5,52	4,84	5,61	5,61	5,61	5,47	4,8	5,47	4,76
	2	5,44	5,35	5,61	5,21	5,39	5,61	5,39	5,21	5,61	5,3	5,61	5,39
	3	5,4	5,61	4,85	4,85	4,92	5,52	5,21	5,06	4,76	4,9	5,39	4,84
T ₂	1	5,51	5,35	5,21	5,32	4,92	5,32	5,52	5,47	5,47	5,2	5,47	4,76
	2	5,47	5,61	5,2	5,61	5,39	4,3	5,2	5,52	5,21	5,2	5,61	4,84
	3	5,35	4,97	4,85	4,85	4,84	4,26	5,06	5,47	5,52	5,1	5,39	5,52
T ₃	1	5,52	4,97	5,52	5,39	5,52	4,92	5,52	4,92	5,21	5,5	4,92	5,06
	2	5,52	5,35	5,61	4,85	5,61	5,61	5,2	5,61	5,2	4,8	5,32	5,61
	3	4,97	5,52	5,21	5,52	4,84	5,52	4,84	5,52	4,84	5,5	5,21	5,52
T ₄	1	5,52	5,61	5,21	4,85	5,52	5,52	5,52	4,42	5,47	5,5	5,47	4,76
	2	5,41	5,35	5,2	5,39	5,61	5,61	5,2	4,67	5,21	4,8	5,61	5,32
	3	5,58	5,61	4,85	5,21	4,84	4,84	5,06	4,92	5,52	5,5	5,39	4,92
T ₅	1	5,52	5,35	5,2	4,85	5,52	4,92	4,42	5,52	5,52	5,5	4,92	5,06
	2	5,41	5,61	5,39	5,39	5,61	5,61	4,67	5,2	4,84	5,2	5,32	5,61

3 5,58 4,97 5,52 5,21 4,84 5,52 4,92 5,06 5,52 5,5 5,21 5,52

Anexo B. Parámetros físico-químicos del agua durante el tiempo de aclimatación y desarrollo del experimento. (Continuación).

Tratamiento/ Réplica	pH												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
T ₀	1	7,95	7,76	7,78	7,68	7,70	7,72	7,82	7,80	7,92	7,82	7,97	7,97
	2	7,93	7,78	7,86	7,78	7,78	7,78	7,71	7,89	7,78	7,70	7,78	7,82
	3	7,83	7,86	7,82	7,86	7,72	7,78	7,75	7,91	7,86	7,82	7,97	7,92
T ₁	1	7,74	7,97	7,78	7,70	7,83	7,84	7,83	7,86	7,82	7,84	7,97	7,97
	2	8,16	7,82	7,76	7,82	7,73	7,78	7,73	7,78	7,82	7,74	7,78	7,76
	3	7,94	7,97	7,70	7,92	7,81	7,78	7,78	7,84	7,70	7,76	7,97	7,97
T ₂	1	7,84	7,86	7,97	7,78	7,71	7,81	7,77	7,78	7,97	7,80	7,78	7,97
	2	7,75	7,82	7,70	7,82	7,82	7,75	7,82	7,90	7,82	7,76	7,70	7,82
	3	7,87	7,92	7,97	7,97	7,82	7,83	7,84	7,84	7,97	7,83	7,97	7,97
T ₃	1	7,78	7,76	7,92	7,78	7,76	7,88	7,78	7,85	7,76	7,89	7,97	7,97
	2	7,94	7,82	7,70	7,82	7,77	7,73	7,83	7,87	7,70	7,84	7,70	7,76
	3	7,87	7,92	7,68	7,82	7,85	7,85	7,76	7,82	7,76	7,75	7,78	7,82
T ₄	1	7,95	7,76	7,78	7,68	7,70	7,72	7,82	7,80	7,92	7,82	7,97	7,97
	2	7,74	7,97	7,78	7,70	7,83	7,84	7,83	7,86	7,82	7,84	7,97	7,97
	3	7,94	7,82	7,70	7,82	7,77	7,73	7,83	7,87	7,70	7,84	7,70	7,76
T ₅	1	7,74	7,97	7,78	7,70	7,83	7,84	7,83	7,86	7,82	7,84	7,97	7,97
	2	7,94	7,82	7,70	7,82	7,77	7,73	7,83	7,87	7,70	7,84	7,70	7,76
	3	7,95	7,76	7,78	7,68	7,70	7,72	7,82	7,80	7,92	7,82	7,97	7,97

ANEXO C. Datos de campo obtenidos de la biometría.

Tratamiento/ repetición	Índice Medio parasitismo # Parasitos/ pez	Peso (gr)	Longitud Total (cm)	IHS
T ₀ R ₁	0	67,50	14,50	2,05
T ₀ R ₁	0	78,00	15,50	1,82
T ₀ R ₁	0	83,50	15,30	1,96
T ₀ R ₁	0	77,00	14,70	2,00
T ₀ R ₂	0	51,50	13,10	1,50
T ₀ R ₂	0	79,00	15,40	1,69
T ₀ R ₂	0	58,00	14,00	2,17
T ₀ R ₂	0	59,00	14,40	2,27
T ₀ R ₃	0	53,00	14,00	1,85
T ₀ R ₃	0	60,50	14,60	2, 24
T ₀ R ₃	0	62,50	14,50	2,24
T ₀ R ₃	0	70,00	15,00	2,08
T ₁ R ₁	8	61,00	15,50	0,57
T ₁ R ₁	7	69,50	15,00	1,01
T ₁ R ₁	13	68,00	15,50	0,72
T ₁ R ₁	9	82,00	16,00	0,45
T ₁ R ₁	10	85,50	17,00	0,57
T ₁ R ₁	10	60,50	15,50	0,51
T ₁ R ₁	7	78,50	16,50	0,76
T ₁ R ₁	8	60,50	14,00	1,07
T ₁ R ₂	8	123,00	20,00	0,15
T ₁ R ₂	9	90,00	17,50	0,66
T ₁ R ₂	9	66,00	14,50	0,61
T ₁ R ₂	11	67,50	15,50	0,65
T ₁ R ₂	12	100,00	18,00	0,41
T ₁ R ₂	11	66,00	14,50	0,62
T ₁ R ₂	10	125,50	20,00	0,42
T ₁ R ₂	8	65,00	15,50	0,74
T ₁ R ₃	7	98,50	17,00	0,42
T ₁ R ₃	9	90,00	16,00	0,54
T ₁ R ₃	8	71,00	15,00	0,58
T ₁ R ₃	8	68,50	15,50	0,53
T ₁ R ₃	9	90,50	16,00	0,57
T ₁ R ₃	13	67,00	15,00	0,46

**ANEXO C. Datos de campo obtenidos de la biometría.
(continuación)**

Tratamiento/ repetición	Índice Médio parasitismo # Parasitos/ pez	Peso (g)	Longitud Total (cm)	IHS
T ₁ R ₃	14	90,50	16,50	0,45
T ₁ R ₃	14	76,50	16,00	0,64
T ₂ R ₁	25	83, 5	16,10	0,68
T ₂ R ₁	35	56,50	13,90	0,71
T ₂ R ₁	25	86,00	16,20	0,65
T ₂ R ₁	27	70,50	15,00	0,64
T ₂ R ₂	32	115,00	18,00	0,77
T ₂ R ₂	26	60,00	14,50	0,77
T ₂ R ₂	30	85,00	16,00	0,64
T ₂ R ₂	30	57,50	13,80	0,64
T ₂ R ₃	30	82,00	16,20	0,66
T ₂ R ₃	30	53,50	14,80	0,62
T ₂ R ₃	34	56,00	14,00	0,73
T ₂ R ₃	27	50,00	13,20	0,56
T ₃ R ₁	0	66,50	14,70	0,53
T ₃ R ₁	0	65,50	14,80	0,66
T ₃ R ₁	0	107,50	17,70	0,63
T ₃ R ₁	0	89,50	16,70	0,60
T ₃ R ₂	0	53,50	14,00	0,69
T ₃ R ₂	0	49,50	13,80	0,61
T ₃ R ₂	0	59,00	14,50	0,68
T ₃ R ₂	0	92,00	15,00	0,37
T ₃ R ₃	1	95,50	16,00	0,63
T ₃ R ₃	1	71,50	15,00	0,57
T ₃ R ₃	0	70,00	15,20	0,54
T ₃ R ₃	0	61,00	14,20	0,66
T ₄ R ₁	0	90,00	16,00	0,70
T ₄ R ₁	1	75,50	15,90	0,69
T ₄ R ₁	0	61,00	14,80	0,64
T ₄ R ₁	0	67,50	15,00	0,70
T ₄ R ₂	1	83,00	16,20	0,58
T ₄ R ₂	0	104,00	17,20	0,71
T ₄ R ₂	0	95,00	17,10	0,66
T ₄ R ₂	0	53,50	14,00	0,69
T ₄ R ₃	0	92,00	17,00	0,41

**ANEXO C. Datos de campo obtenidos de la biometría.
(continuación)**

Tratamiento/ repetición	Índice Medio parasitismo # Parasitos/ pez	Peso (gr)	Longitud Total (cm)	IHS
T ₄ R ₃	0	87,50	16,50	0,51
T ₄ R ₃	0	64,50	15,00	0,67
T ₄ R ₃	0	72,00	15,30	0,57
T ₅ R ₁	1	72,00	15,50	0,44
T ₅ R ₁	0	78,00	15,70	0,58
T ₅ R ₁	0	54,00	14,40	0,67
T ₅ R ₁	0	51,00	14,00	0,61
T ₅ R ₂	1	82,50	16,00	0,57
T ₅ R ₂	0	56,00	14,20	0,77
T ₅ R ₂	1	61,50	14,40	0,65
T ₅ R ₂	0	57,00	14,00	0,56
T ₅ R ₃	1	56,50	14,50	0,51
T ₅ R ₃	0	81,50	15,80	0,61
T ₅ R ₃	0	81,00	16,10	0,62
T ₅ R ₃	0	55,50	14,00	0,41

ANEXO D. Conteo diferencial de células sanguíneas, provenientes de los ejemplares experimentales mediante contador manual CEL- modelo CC-550 serie 1414 selm con diluidor automático modelo DA 500 P6, serie 4407 selm.

Tratamiento/ repetición	Linfocito (%)	Heterófilo (%)	CG E (%)	Basófilo (%)	Eosinófilo (%)	Monocito (%)	Trombocito
T ₀ R ₁	99	0	1	0	0	0	129
T ₀ R ₁	97	0	0	0	3	0	131
T ₀ R ₁	97	0	0	0	3	0	137
T ₀ R ₁	95	5	0	0	0	0	130
T ₀ R ₂	98	0	0	0	2	0	164
T ₀ R ₂	97	2	0	0	1	0	138
T ₀ R ₂	97	2	0	0	1	0	139
T ₀ R ₂	97	0	1	0	2	0	137
T ₀ R ₃	95	0	1	0	4	0	140
T ₀ R ₃	99	1	0	0	0	0	138
T ₀ R ₃	96	0	1	0	3	0	135
T ₀ R ₃	88	0	0	0	1	0	125
T ₁ R ₁	88	0	9	0	3	0	120
T ₁ R ₁	92	2	10	0	0	0	130
T ₁ R ₁	93	4	5	0	2	0	114
T ₁ R ₁	94	2	5	0	0	0	160
T ₁ R ₁	89	0	5	0	0	1	107
T ₁ R ₁	87	0	10	0	0	1	130
T ₁ R ₁	90	0	8	0	3	2	135
T ₁ R ₁	90	0	8	0	0	2	110
T ₁ R ₂	89	2	6	0	2	0	133
T ₁ R ₂	89	1	8	0	0	2	120
T ₁ R ₂	88	1	10	0	0	0	120
T ₁ R ₂	94	0	11	0	0	1	149
T ₁ R ₂	89	2	0	0	3	1	105
T ₁ R ₂	89	0	9	0	2	0	115
T ₁ R ₂	91	1	10	0	0	0	115
T ₁ R ₂	88	0	9	0	0	0	121
T ₁ R ₃	94	0	9	0	2	1	120
T ₁ R ₃	89	0	5	0	1	0	140
T ₁ R ₃	86	1	7	0	1	2	120
T ₁ R ₃	88	0	11	0	0	3	120
T ₁ R ₃	87	1	10	0	0	1	140
T ₁ R ₃	91	0	9	0	3	1	140
T ₁ R ₃	91	0	8	0	0	1	130

ANEXO D. Conteo diferencial de células sanguíneas, provenientes de los ejemplares experimentales mediante contador manual CEL-modelo CC-550 serie 1414 selm con diluidor automático modelo DA 500 P6, serie 4407 selm. (continuación)

Tratamiento	Linfocitos	Heterófilos	CGE	Basófilos	Eosinófilos	Monocitos	Trombocitos
o/ repetición	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	
T ₁ R ₃	90	0	7	0	2	0	130
T ₂ R ₁	87	0	8	0	1	1	135
T ₂ R ₁	90	1	7	0	3	2	138
T ₂ R ₁	91	0	7	0	2	1	140
T ₂ R ₁	90	1	7	0	1	0	120
T ₂ R ₂	87	0	7	0	2	1	115
T ₂ R ₂	90	1	7	0	3	2	117
T ₂ R ₂	91	0	8	0	1	1	120
T ₂ R ₂	90	0	6	0	2	1	119
T ₂ R ₃	91	1	8	0	1	0	115
T ₂ R ₃	90	0	5	0	2	1	117
T ₂ R ₃	91	0	6	0	3	1	118
T ₂ R ₃	99	0	6	0	3	0	101
T ₃ R ₁	99	0	1	0	0	0	98
T ₃ R ₁	99	0	0	0	0	1	92
T ₃ R ₁	99	0	0	0	0	1	90
T ₃ R ₁	97	0	0	0	0	1	101
T ₃ R ₂	96	0	2	0	1	0	104
T ₃ R ₂	95	0	1	0	2	1	100
T ₃ R ₂	94	0	2	0	2	1	98
T ₃ R ₂	97	0	1	0	1	1	83
T ₃ R ₃	97	0	1	0	2	0	93
T ₃ R ₃	97	0	1	0	1	1	94
T ₃ R ₃	98	0	1	0	2	0	95
T ₃ R ₃	100	0	1	0	1	0	95
T ₄ R ₁	97	0	0	0	1	0	87
T ₄ R ₁	99	0	0	0	2	1	94
T ₄ R ₁	98	0	1	0	0	0	90
T ₄ R ₁	99	0	1	0	0	1	91
T ₄ R ₂	98	0	1	0	0	0	93
T ₄ R ₂	98	0	1	0	0	1	85
T ₄ R ₂	98	0	1	0	0	1	95
T ₄ R ₂	99	0	1	0	0	1	94

T ₄ R ₃	98	0	1	0	0	0	95
T ₄ R ₃	98	0	1	0	0	1	85
T ₄ R ₃	99	0	2	0	0	0	87

ANEXO D. Conteo diferencial de células sanguíneas, provenientes de los ejemplares experimentales mediante contador manual CEL-modelo CC-550 serie 1414 selm con diluidor automático modelo DA 500 P6, serie 4407 selm. (continuación)

Tratamiento/ repetición	Linfocitos (%)	Heterófilos (%)	CGE (%)	Basófilos (%)	Eosinófilos (%)	Monocitos (%)	Trombocitos
T ₄ R ₃	95	0	1	0	0	0	165
T ₅ R ₁	98	0	1	0	0	4	161
T ₅ R ₁	96	0	0	0	0	2	155
T ₅ R ₁	97	0	1	0	0	3	153
T ₅ R ₁	98	0	0	0	0	3	158
T ₅ R ₂	97	0	0	0	0	2	155
T ₅ R ₂	96	0	1	0	0	3	160
T ₅ R ₂	96	0	0	0	0	4	162
T ₅ R ₂	96	0	1	0	0	3	162
T ₅ R ₃	97	0	0	0	0	3	151
T ₅ R ₃	96	0	0	0	0	4	160
T ₅ R ₃	97	0	1	0	0	2	158
T ₅ R ₃	98	0	0	0	0	2	153

ANEXO E. Perfil hematológico de los ejemplares de los distintos tratamientos y replicas.

Tratamiento/ Réplicas	Eritrocitos (x10 ⁶ /mm ³)	Hematócrito (%)	Hemoglobina (g/dl)	VCM (fL)	HCM (pg)	CHCM (%)
T ₀ R ₁	2,65	25,00	13,60	94,30	51,32	54,40
T ₀ R ₁	3,46	34,10	19,70	98,60	56,94	57,77
T ₀ R ₁	4,42	42,40	20,80	95,90	47,06	49,06
T ₀ R ₁	3,24	27,60	16,20	85,20	50,00	58,70
T ₀ R ₂	3,45	28,30	11,50	82,00	33,33	40,64
T ₀ R ₂	3,32	28,00	17,80	84,30	53,61	63,57
T ₀ R ₂	2,29	17,50	10,00	76,40	43,67	57,14
T ₀ R ₂	2,27	20,70	10,10	91,20	44,49	48,79
T ₀ R ₃	2,59	22,10	11,60	85,30	44,79	52,49
T ₀ R ₃	3,02	27,40	15,00	90,70	49,67	54,74
T ₀ R ₃	2,07	17,60	10,30	85,00	49,76	58,52
T ₀ R ₃	2,41	20,80	11,10	86,30	46,06	53,37
T ₁ R ₁	2,16	31,10	11,90	144,00	55,09	38,26
T ₁ R ₁	2,31	31,10	11,20	134,60	48,48	36,01
T ₁ R ₁	2,48	36,00	11,70	145,20	47,18	32,50
T ₁ R ₁	2,35	34,10	11,50	145,10	48,94	33,72
T ₁ R ₁	3,57	49,60	11,80	138,90	33,05	23,79
T ₁ R ₁	2,41	35,10	12,60	145,60	52,28	35,90
T ₁ R ₁	3,07	45,10	12,50	146,90	40,72	27,72
T ₁ R ₁	2,40	33,80	12,80	140,80	53,33	37,87
T ₁ R ₂	2,31	35,00	11,00	151,50	47,62	31,43
T ₁ R ₂	2,64	39,50	11,90	149,60	45,08	30,13
T ₁ R ₂	2,45	39,30	11,00	160,40	44,90	27,99
T ₁ R ₂	2,63	38,10	12,60	144,90	47,91	33,07
T ₁ R ₂	2,56	35,10	11,00	137,10	42,97	31,34
T ₁ R ₂	3,37	48,00	12,30	142,40	36,50	25,63
T ₁ R ₂	1,97	28,50	11,80	144,70	59,90	41,40
T ₁ R ₂	2,15	30,70	11,90	142,80	55,35	38,76
T ₁ R ₃	2,96	27,80	11,70	123,00	39,53	42,09
T ₁ R ₃	3,69	53,30	10,60	144,40	28,73	19,89
T ₁ R ₃	2,99	43,91	12,20	146,80	40,80	27,78
T ₁ R ₃	2,12	30,20	11,90	142,50	56,13	39,40
T ₁ R ₃	2,13	34,80	11,30	163,40	53,05	32,47
T ₁ R ₃	2,75	42,50	12,50	154,50	45,45	29,41

ANEXO E. Perfil hematológico de los ejemplares de los distintos tratamientos y replicas. (continuación)

Tratamiento/ Réplicas	Eritrocitos (x10⁶/mm³)	Hematócrito (%)	Hemoglobina (g/dl)	VCM (fL)	HCM (pg)	CHCM (%)
T ₁ R ₃	2,35	33,50	12,00	142,60	51,06	35,82
T ₁ R ₃	2,67	38,00	13,00	142,30	48,69	34,21
T ₂ R ₁	1,75	22,50	9,70	122,10	55,43	43,11
T ₂ R ₁	2,07	25,30	11,30	122,20	54,59	44,66
T ₂ R ₁	2,10	24,10	10,90	114,80	51,90	45,23
T ₂ R ₁	1,94	23,20	11,30	119,60	58,25	48,71
T ₂ R ₂	1,86	30,00	11,30	113,70	60,75	37,67
T ₂ R ₂	2,20	29,20	11,90	119,00	54,09	40,75
T ₂ R ₂	2,10	32,60	15,00	119,40	71,43	46,01
T ₂ R ₂	2,23	30,80	16,60	105,50	74,44	53,90
T ₂ R ₃	1,75	30,00	9,40	131,40	53,71	31,33
T ₂ R ₃	2,67	30,70	15,50	115,00	58,05	50,49
T ₂ R ₃	1,68	21,30	9,70	126,80	57,74	45,54
T ₂ R ₃	1,69	25,30	10,80	121,80	63,91	42,69
T ₃ R ₁	2,90	33,40	15,80	123,70	54,48	47,31
T ₃ R ₁	3,51	32,90	20,00	122,00	56,98	60,79
T ₃ R ₁	2,46	31,00	14,90	126,00	60,57	48,06
T ₃ R ₁	2,46	30,00	15,00	122,00	54,88	45,00
T ₃ R ₂	2,32	30,00	19,70	122,30	64,66	50,00
T ₃ R ₂	3,65	31,50	18,50	120,20	53,97	62,54
T ₃ R ₂	3,27	32,10	15,00	125,10	56,57	57,63
T ₃ R ₂	2,84	26,60	14,20	123,70	52,82	56,39
T ₃ R ₃	2,79	33,60	17,60	120,40	50,90	42,26
T ₃ R ₃	3,52	26,50	15,70	121,40	50,00	66,42
T ₃ R ₃	2,88	33,60	15,80	116,70	54,51	46,73
T ₃ R ₃	2,95	28,80	14,60	116,90	53,56	54,86
T ₄ R ₁	2,60	30,70	14,90	118,10	56,15	47,56
T ₄ R ₁	2,57	31,60	14,50	123,00	57,98	47,15
T ₄ R ₁	3,36	38,00	11,30	142,90	43,15	38,16
T ₄ R ₁	2,39	26,10	10,90	119,20	47,28	43,30
T ₄ R ₂	2,09	26,00	16,20	124,40	52,15	41,92
T ₄ R ₂	2,61	32,30	16,00	123,80	62,07	50,15
T ₄ R ₂	2,72	36,90	11,50	125,00	58,82	43,36
T ₄ R ₂	2,03	25,40	10,20	125,70	56,65	45,28
T ₄ R ₃	2,11	26,40	15,50	116,10	48,34	38,64
T ₄ R ₃	3,29	38,90	10,70	118,20	47,11	39,85

ANEXO E. Perfil hematológico de los ejemplares de los distintos tratamientos y replicas. (continuación)

Tratamiento/ Réplicas	Eritrocitos (x10⁶/mm³)	Hematócrito (%)	Hemoglobina (g/dl)	VCM (fL)	HCM (pg)	CHCM (%)
T ₄ R ₃	2,39	24,30	12,90	122,10	44,77	44,03
T ₄ R ₃	2,30	25,70	10,90	120,90	56,09	50,19
T ₅ R ₁	2,24	25,50	11,10	133,50	48,66	42,75
T ₅ R ₁	2,35	23,00	12,40	127,80	47,23	48,26
T ₅ R ₁	2,45	30,70	10,40	125,30	50,61	40,39
T ₅ R ₁	2,08	24,40	11,00	127,30	50,00	42,62
T ₅ R ₂	2,30	26,70	13,50	124,80	47,83	41,20
T ₅ R ₂	2,27	28,40	10,90	125,40	48,02	38,38
T ₅ R ₂	2,43	27,00	13,50	121,00	55,56	50,00
T ₅ R ₂	2,40	26,60	12,50	122,00	52,08	46,99
T ₅ R ₃	2,46	27,80	11,00	123,00	44,72	39,57
T ₅ R ₃	2,46	29,60	12,50	120,30	50,81	42,23
T ₅ R ₃	2,26	27,20	11,90	120,40	52,65	43,75
T ₅ R ₃	2,04	25,80	11,00	126,50	53,92	42,64

Anexo F. Análisis de varianza para la variable Temperatura.

Factor de variación	Grados de Libertad	Suma de Cuadrados	Cuadrado Medio	Fc	Pr>F
Tratamientos	5	0.69870370	0.13974074	0.33	0.8929
Error	210	88.24722222	0.42022487		
Total	215	88.94592593			

$p > 0,05$ no significativo

Anexo G. Análisis de varianza para la variable Oxígeno Disuelto.

Factor de variación	Grados de Libertad	Suma de Cuadrados	Cuadrado Medio	Fc	Pr > F
Tratamientos	5	0.41693194	0.08338639	0.85	0.5174
Error	210	20.65956389	0.09837888		
Total	215	21.07649583			

p > 0,05 no significativo

Anexo H. Análisis de varianza para la variable Potencial de Hidrogeniones pH.

Factor de variación	Grados de Libertad	Suma de Cuadrados	Cuadrado Medio	Fc	Pr > F
Tratamientos	5	0.03596898	0.00719380	0.84	0.5231
Error	210	1.79993056	0.00857110		
Total	215	1.83589954			

p > 0,05 no significativo

Anexo I. Análisis de varianza para la variable Peso Total.

Factor de variación	Grados de Libertad	Suma de Cuadrados	Cuadrado Medio	Fc	Pr > F
Tratamientos	5	2746.19643	549.23929	2.03	0.0835
Error	78	21102.12500	270.54006		
Total	83	23848.32143			

p > 0,05 no significativo

Anexo J. Análisis de varianza y prueba de Tukey para la variable Longitud.

Factor de variación	Grados de Libertad	Suma de Cuadrados	Cuadrado Medio	Fc	Pr > F
Tratamientos	5	28.4569643	5.6913929	3.91	0.0032
Error	78	113.4554167	1.4545566		
Total	83	141.9123810			

$p \leq 0,05$ significativo

Prueba de Tukey.

Comparación	Diferencia entre medias		Límites de confianza
0 - 1	1.5625	0.3167	2.8083 ***
0 - 2	0.5583	-0.8802	1.9969
0 - 3	0.5500	-0.8886	1.9886
0 - 4	1.2500	-0.1886	2.6886
0 - 5	0.3000	-1.1386	1.7386
1 - 2	1.0042	-0.2417	2.2500
1 - 3	1.0125	-0.2333	2.2583
1 - 4	0.3125	-0.9333	1.5583
1 - 5	1.2625	0.0167	2.5083
2 - 3	0.0083	-1.4302	1.4469
2 - 4	0.6917	-0.7469	2.1302
2 - 5	0.2583	-1.1802	1.6969
3 - 4	0.7000	-0.7386	2.1386
3 - 5	0.2500	-1.1886	1.6886
4 - 5	0.9500	-0.4886	2.3886

***Diferencias altamente significativas.

Anexo K. Análisis de varianza y prueba de Tukey para la variable Índice Hepatosomático IHS.

Factor de variación	Grados de Libertad	Suma de Cuadrados	Cuadrado Medio	Fc	Pr > F
Tratamientos	5	19.65286964	3.93057393	170.51	<.0001
Error	78	1.79802917	0.02305166		
Total	83	21.45089881			

p < 0,001 altamente significativo

Prueba de Tukey.

Comparación	Diferencia entre medias	Límites de confianza
0 - 1	1.40125 1.24441	1.55809 ***
0 - 2	1.31667 1.13557	1.49777 ***
0 - 3	1.39167 1.21057	1.57277 ***
0 - 4	1.36167 1.18057	1.54277 ***
0 - 5	1.40583 1.22473	1.58693 ***
1 - 2	0.08458 -0.07225	0.24142
1 - 3	0.00958 -0.14725	0.16642
1 - 4	0.03958 -0.11725	0.19642
1 - 5	0.00458 -0.15225	0.16142
2 - 3	0.07500 -0.10610	0.25610
2 - 4	0.04500 -0.13610	0.22610
2 - 5	0.08917 -0.09193	0.27027
3 - 4	0.03000 -0.15110	0.21110
3 - 5	0.01417 -0.16693	0.19527
4 - 5	0.04417 -0.13693	0.22527

***Diferencias altamente significativas.

Anexo L. Análisis de varianza y prueba de Tukey para la variable cantidad de Eritrocitos.

Factor de variación	Grados de Libertad	Suma de Cuadrados	Cuadrado Medio	Fc	Pr > F
Tratamientos	5	7.45375298	1.49075060	8.78	<.0001
Error	78	13.23947917	0.16973691		
Total	83	20.69323214			

p < 0,0001 altamente significativo

Prueba de Tukey.

Comparación	Diferencia entre medias	Límites de confianza
0 - 1	0.2454 -0.1802	0.6710
0 - 2	0.8458 0.3544	1.3373 ***
0 - 3	0.1133 -0.3781	0.6048
0 - 4	0.3108 -0.1806	0.8023
0 - 5	0.5375 0.0461	1.0289 ***
1 - 2	0.6004 0.1748	1.0260 ***
1 - 3	0.3588 -0.0668	0.7843
1 - 4	0.0654 -0.3602	0.4910
1 - 5	0.2921 -0.1335	0.7177
2 - 3	0.9592 0.4677	1.4506 ***
2 - 4	0.5350 0.0436	1.0264 ***
2 - 5	0.3083 -0.1831	0.7998
3 - 4	0.4242 -0.0673	0.9156
3 - 5	0.6508 0.1594	1.1423 ***
4 - 5	0.2267 -0.2648	0.7181

***Diferencias altamente significativas.

Anexo M. Análisis de varianza para la variable porcentaje de Hematocrito.

Factor de variación	Grados de Libertad	Suma de Cuadrados	Cuadrado Medio	Fc	Pr > F
Tratamientos	5	233.756074	46.751215	2.60	0.0317
Error	78	1403.917596	17.998944		
Total	83	1637.673670			

p > 0,05 no significativo

Anexo N. Análisis de varianza para la variable cantidad de Hemoglobina.

Factor de variación	Grados de Libertad	Suma de Cuadrados	Cuadrado Medio	Fc	Pr > F
Tratamientos	5	47.0724405	9.4144881	2.23	0.059
Error	78	328.6070833	4.2129113		
Total	83	375.6795238			

p > 0,05 no significativo

Anexo O. Análisis de varianza y prueba de Tukey para la variable conteo diferencial de Linfocitos.

Factor de variación	Grados de Libertad	Suma de Cuadrados	Cuadrado Medio	Fc	Pr > F
tratamientos	5	1202.119048	240.423810	88.49	<.0001
Error	78	211.916667	2.716880		
Total	83	1414.035714			

p < 0,0001 altamente significativo

Prueba de Tukey.

Comparación tratamientos	Diferencia entre medias	Límites de confianza
0 - 1	7.4167 5.7140	9.1194 ***
0 - 2	7.3333 5.3672	9.2994 ***
0 - 3	0.0833 -1.8828	2.0494
0 - 4	1.2500 -0.7161	3.2161
0 - 5	0.5833 -1.3828	2.5494
1 - 2	0.0833 -1.6194	1.7860
1 - 3	7.5000 5.7973	9.2027 ***
1 - 4	8.6667 6.9640	10.3694 ***
1 - 5	6.8333 5.1306	8.5360 ***
2 - 3	7.4167 5.4506	9.3828 ***
2 - 4	8.5833 6.6172	10.5494 ***
2 - 5	6.7500 4.7839	8.7161 ***
3 - 4	1.1667 -0.7994	3.1328
3 - 5	0.6667 -1.2994	2.6328
4 - 5	1.8333 -0.1328	3.7994

***Diferencias altamente significativas.

Anexo P. Análisis de varianza y prueba de Tukey para la variable conteo diferencial de Eosinófilos.

Factor de variación	Grados de Libertad	Suma de Cuadrados	Cuadrado Medio	Fc	Pr > F
Tratamientos	5	36.0714286	7.2142857	7.51	<.0001
Error	78	74.9166667	0.9604701		
Total	83	110.9880952			

p < 0,0001 altamente significativo

Prueba de Tukey.

Comparación tratamientos	Diferencia entre medias		Límites de confianza
0 - 1	0.6667	-0.3457	1.6790
0 - 2	-0.3333	-1.5023	0.8357
0 - 3	0.6667	-0.5023	1.8357
0 - 4	1.4167	0.2477	2.5857 ***
0 - 5	1.6667	0.4977	2.8357 ***
1 - 2	-1.0000	-2.0124	0.0124
1 - 3	0.0000	-1.0124	1.0124
1 - 4	0.7500	-0.2624	1.7624
1 - 5	1.0000	-0.0124	2.0124
2 - 3	1.0000	-0.1690	2.1690
2 - 4	1.7500	0.5810	2.9190 ***
2 - 5	2.0000	0.8310	3.1690 ***
3 - 4	0.7500	-0.4190	1.9190
3 - 5	1.0000	-0.1690	2.1690
4 - 5	0.2500	-0.9190	1.4190

***Diferencias altamente significativas.

Anexo Q. Análisis de varianza y prueba de Tukey para la variable conteo diferencial de Células Granulocíticas Especiales CGE.

Factor de variación	Grados de Libertad	Suma de Cuadrados	Cuadrado Medio	Fc	Pr > F
Tratamientos	5	986.529762	197.305952	89.63	<.0001
Error	78	171.708333	2.201389		
Total	83	1158.238095			

p < 0,0001 altamente significativo

Prueba de Tukey.

Comparación	Diferencia entre medias	Límites de confianza
0 - 1	-7.5417 -9.0743	-6.0090 ***
0 - 2	-6.5000 -8.2698	-4.7302 ***
0 - 3	-0.5833 -2.3531	1.1864
0 - 4	-0.5833 -2.3531	1.1864
0 - 5	-0.0833 -1.8531	1.6864
1 - 2	1.0417 -0.4910	2.5743
1 - 3	6.9583 5.4257	8.4910 ***
1 - 4	6.9583 5.4257	8.4910 ***
1 - 5	7.4583 5.9257	8.9910 ***
2 - 3	5.9167 4.1469	7.6864 ***
2 - 4	5.9167 4.1469	7.6864 ***
2 - 5	6.4167 4.6469	8.1864 ***
3 - 4	0.0000 -1.7698	1.7698
3 - 5	0.5000 -1.2698	2.2698
4 - 5	0.5000 -1.2698	2.2698

***Diferencias altamente significativas.

Anexo R. Análisis de varianza y prueba de Tukey para la variable conteo diferencial de Monocitos.

Factor de variación	Grados de Libertad	Suma de Cuadrados	Cuadrado Medio	Fc	Pr > F
Tratamientos	5	61.86309524	12.37261905	27.03	<.0001
Error	78	35.70833333	0.45779915		
Total	83	97.57142857			

p < 0,0001 altamente significativo

Prueba de Tukey.

Comparación	Diferencia entre medias	Límites de confianza
0 - 1	-0.7917 -1.4906	-0.0927 ***
0 - 2	-0.9167 -1.7237	-0.1096 ***
0 - 3	-0.5833 -1.3904	0.2237
0 - 4	-0.5000 -1.3071	0.3071
0 - 5	-2.9167 -3.7237	-2.1096 ***
1 - 2	-0.1250 -0.8239	0.5739
1 - 3	0.2083 -0.4906	0.9073
1 - 4	0.2917 -0.4073	0.9906
1 - 5	-2.1250 -2.8239	-1.4261 ***
2 - 3	0.3333 -0.4737	1.1404
2 - 4	0.4167 -0.3904	1.2237
2 - 5	-2.0000 -2.8071	-1.1929 ***
3 - 4	0.0833 -0.7237	0.8904
3 - 5	-2.3333 -3.1404	-1.5263 ***
4 - 5	-2.4167 -3.2237	-1.6096 ***

***Diferencias altamente significativas.

Anexo S. Análisis de varianza y prueba de Tukey para la variable conteo diferencial de Heterófilos.

Factor de variación	Grados de Libertad	Suma de Cuadrados	Cuadrado Medio	Fc	Pr > F
Tratamientos	5	10.26785714	2.05357143	3.01	0.0156
Error	78	53.29166667	0.68322650		
Total	83	63.55952381			

p > 0,05 no significativo

Anexo T. Análisis de varianza y prueba de Tukey para la variable conteo relativo de Trombocitos.

Factor de variación	Grados de Libertad	Suma de Cuadrados	Cuadrado Medio	Fc	Pr > F
Tratamientos	5	38439.57738	7687.91548	88.44	<.0001
Error	78	6780.45833	86.92895		
Total	83	45220.03571			

p < 0,0001 altamente significativo

Prueba de Tukey.

Comparación	Diferencia entre medias	Límites de confianza
0 - 1	11.542 1.910	21.173 ***
0 - 2	13.667 2.545	24.788 ***
0 - 3	41.583 30.462	52.705 ***
0 - 4	46.583 35.462	57.705 ***
0 - 5	20.333 9.212	31.455 ***
1 - 2	2.125 -7.506	11.756
1 - 3	30.042 20.410	39.673 ***
1 - 4	35.042 25.410	44.673 ***
1 - 5	31.875 22.244	41.506 ***
2 - 3	27.917 16.795	39.038 ***
2 - 4	32.917 21.795	44.038 ***
2 - 5	34.000 22.879	45.121 ***
3 - 4	5.000 -6.121	16.121
3 - 5	61.917 50.795	73.038 ***
4 - 5	66.917 55.795	78.038 ***

***Diferencias altamente significativas.

Anexo U. Análisis de varianza y prueba de Tukey para la variable Volumen Corpuscular Medio VCM.

Factor de variación	Grados de Libertad	Suma de Cuadrados	Cuadrado Medio	Fc	Pr > F
Tratamientos	5	11201.34419	2240.26884	10.25	<.0001
Error	78	17041.56603	218.48162		
Total	83	28242.91022			

p < 0,0001 altamente significativo

Prueba de Tukey.

Comparación	Diferencia entre medias	Límites de confianza
0 - 1	-21.677 -36.946	-6.408 ***
0 - 2	-31.342 -48.973	-13.711 ***
0 - 3	-23.792 -41.423	-6.161 ***
0 - 4	-35.350 -52.981	-17.719 ***
0 - 5	-36.842 -54.473	-19.211 ***
1 - 2	-9.665 -24.934	5.604
1 - 3	-2.115 -17.384	13.154
1 - 4	-13.673 -28.942	1.596
1 - 5	-15.165 -30.434	0.104
2 - 3	7.550 -10.081	25.181
2 - 4	-4.008 -21.639	13.623
2 - 5	-5.500 -23.131	12.131
3 - 4	-11.558 -29.189	6.073
3 - 5	-13.050 -30.681	4.581
4 - 5	-1.492 -19.123	16.139

***Diferencias altamente significativas.

Anexo V. Análisis de varianza y prueba de Tukey para la variable Hemoglobina Corpuscular Media HCM.

Factor de variación	Grados de Libertad	Suma de Cuadrados	Cuadrado Medio	Fc	Pr > F
Tratamientos	5	1761.531845	352.306369	8.15	<.0001
Error	78	3373.611425	43.251429		
Total	83	5135.143270			

p < 0,0001 altamente significativo

Prueba de Tukey.

Comparación	Diferencia entre medias	Límites de confianza
0 - 1	0.779 -6.014	7.573
0 - 2	-11.966 -19.810	-4.121 ***
0 - 3	2.371 -5.474	10.215
0 - 4	-4.988 -12.833	2.856
0 - 5	-2.616 -10.460	5.229
1 - 2	-12.745 -19.539	-5.951 ***
1 - 3	1.592 -5.202	8.385
1 - 4	-5.767 -12.561	1.026
1 - 5	-3.395 -10.189	3.399
2 - 3	14.337 6.492	22.181 ***
2 - 4	6.978 -0.867	14.822
2 - 5	9.350 1.505	17.195 ***
3 - 4	-7.359 -15.204	0.485
3 - 5	-4.987 -12.831	2.858
4 - 5	2.373 -5.472	10.217

***Diferencias altamente significativas.

**Anexo W. Análisis de varianza y prueba de Tukey para la variable
Concentración de Hemoglobina Corpuscular Media CHCM.**

Factor de variación	Grados de Libertad	Suma de Cuadrados	Cuadrado Medio	Fc	Pr > F
Tratamientos	5	1345.126040	269.025208	10.42	<.0001
Error	78	2014.626658	25.828547		
Total	83	3359.752699			

p < 0,0001 altamente significativo

Prueba de Tukey.

Comparación tratamientos	Diferencia entre medias		Límites de confianza
0 - 1	10.653	5.403	15.903 ***
0 - 2	9.925	3.863	15.987 ***
0 - 3	13.624	7.562	19.686 ***
0 - 4	9.967	3.905	16.029 ***
0 - 5	10.868	4.805	16.930 ***
1 - 2	-0.728	-5.978	4.522
1 - 3	2.971	-2.279	8.221
1 - 4	-0.687	-5.937	4.563
1 - 5	0.214	-5.036	5.464
2 - 3	3.699	-2.363	9.761
2 - 4	0.042	-6.020	6.104
2 - 5	0.942	-5.120	7.005
3 - 4	-3.657	-9.720	2.405
3 - 5	-2.757	-8.819	3.305
4 - 5	0.901	-5.161	6.963

***Diferencias altamente significativas.