



Servicio Nacional  
de Pesca y  
Acuicultura

Ministerio de Economía,  
Fomento y Turismo



# MANUAL DE PATOLOGÍA CLÍNICA DE PECES SALMÓNIDOS

**“DETERMINACIÓN DE PARÁMETROS HEMATOLÓGICOS,  
INMUNOLÓGICOS Y MECANISMOS INVOLUCRADOS EN LAS  
RESPUESTAS DEL HOSPEDERO A INFECCIONES PREVALENTES Y  
CO-INFECCIONES”**

## Autores

Laboratorio de Patología Clínica Veterinaria del Hospital Veterinario

Universidad Austral de Chile

Dra. Ananda Müller, Médico veterinario

Dr. Pedro Bittencourt, Médico veterinario

Laboratorio Pathovet

Dr. Marco Rozas, Médico veterinario

MSc. Romina Walker, Médico veterinario

## ÍNDICE

<b>CAP I: GENERALIDADES PATOLOGÍA CLÍNICA EN PECES SALMÓNIDOS .....</b>	<b>3</b>
<b>CAP II: OBTENCIÓN DE MUESTRAS DE SANGRE .....</b>	<b>6</b>
<b>CAP III: TÉCNICAS HEMATOLÓGICAS .....</b>	<b>11</b>
<b>CAP IV: INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS HEMATOLÓGICOS .....</b>	<b>17</b>
<b>CAP V: TÉCNICAS EN BIOQUÍMICA CLÍNICA .....</b>	<b>20</b>
<b>CAP VI: INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS BIQUÍMICOS .....</b>	<b>22</b>
<b>CAP VII: TÉCNICAS EN GASOMETRÍA SANGUÍNEA .....</b>	<b>27</b>
<b>CAP VIII: INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS DE GASOMETRÍA .....</b>	<b>29</b>
<b>CAP IX: DETERMINACIÓN DE HORMONAS .....</b>	<b>32</b>
<b>CAP X: INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS DE HORMONAS .....</b>	<b>38</b>
<b>CAP XI: INTERVALOS DE REFERENCIA .....</b>	<b>41</b>

## **CAPÍTULO I**

### **GENERALIDADES**

La patología clínica veterinaria es una especialidad de la medicina veterinaria que se dedica al apoyo diagnóstico, utilizando pruebas de laboratorio en la sangre y otros fluidos corporales de animales.

La sangre es un tejido constituido por una matriz líquida, el plasma, en dónde se encuentran en suspensión las células (eritrocitos, leucocitos y trombocitos) y proteínas, glucosa, iones minerales, hormonas, dióxido de carbono en solución. El volumen de sangre en los animales varía desde el 6% hasta el 10% del peso corporal. A través de la circulación la sangre entra en contacto con todos los órganos del cuerpo, por lo que su evaluación permite determinar alteraciones en distintos tejidos.

Los glóbulos rojos o eritrocitos son las células sanguíneas predominantes en la gran mayoría de las especies de peces. Una de las funciones más importantes de los eritrocitos es llevando oxígeno a los tejidos y dióxido de carbono a los pulmones para su eliminación. Los glóbulos blancos (o leucocitos) son frecuentemente utilizados como indicadores del estado de salud en los peces porque son los componentes clave de la defensa inmune innata y están implicados en la regulación de la función inmunológica en los organismos. Los trombocitos están involucrados en el proceso de coagulación sanguínea. Los eritrocitos y trombocitos de los peces tienen la particularidad de ser nucleados, a la diferencia aquellos presentes en los mamíferos.

En la ictiopatología, la exploración sanguínea constituye una herramienta adicional como indicador de salud y medio de mejoramiento del diagnóstico y pronóstico de una enfermedad en una población de peces.

La hematología es el estudio de la sangre y sus componentes, rama de la salud que está adquiriendo cada vez mayor importancia en la acuicultura debido a su valor en el monitoreo del estado de salud del pescado. El conocimiento de las características hematológicas es una herramienta importante que puede utilizarse como un índice eficaz y sensible para monitorizar los cambios fisiológicos y patológicos en los peces.

La evaluación de la hematología en peces salmónidos puede ser indicada para establecer el diagnóstico de enfermedades que afectan los componentes celulares de la sangre. La hematología se evalúa a través del hemograma, un examen que incluye la evaluación del número y características morfológicas de eritrocitos, leucocitos y trombocitos. Los análisis incorporados en un hemograma se detallan en la tabla 1.

El hemograma puede ser útil para detectar anemias y estados de estrés o deshidratación en peces. Los trastornos hematológicos más frecuentes en salmónidos están asociados a enfermedades, resultando especialmente en anemia.

La bioquímica sanguínea se basa en la detección de enzimas, substratos, minerales en el suero o plasma. Los principales analitos medidos en la bioquímica sanguínea de salmónidos se destacan en la tabla 2.

A pesar de que la mayoría de los métodos utilizados en bioquímica clínica en mamíferos son adecuados para el análisis de muestras de peces, la interpretación de los resultados puede ser complicada. Un gran número de factores exógenos (especie, etapa productiva, sexo, status nutricional y reproductivo) y externos (condiciones ambientales, densidad poblacional, y método de captura) influyen en los resultados bioquímicos en peces. Esos factores deben ser llevados en cuenta e indican la necesidad de la determinación de intervalos de referencia de acuerdo a la especie, etapa productiva y localidad de los peces a ser evaluados.

En la acuicultura chilena los perfiles bioquímicos han sido utilizados con mayor frecuencia para evaluar salud y presencia de enfermedades infecciosas que pueden generar alteraciones hepáticas, renales, musculares, fácilmente identificadas en los exámenes bioquímicos de la sangre.

**Tabla 1.** Análisis incorporados en la evaluación del hemograma en Salmónidos

Análisis	Parámetro
<b>Eritrograma</b>	Eritrocitos (x10 <sup>6</sup> μL)
	VGA o Hematocrito (%)
	HB (g/L)
	VCM (fL)
	CHCM (g/L)
<b>Leucograma</b>	Leucocitos (cels/μL)
	Basófilos
	Eosinófilos
	Basiliforme Heterófilo
	Heterófilos
	Linfocitos
	Monocitos
	<b>Trombocitos (cels/μL)</b>
	<b>Proteínas Plasmáticas Totales (g/L)</b>

\*VGA= Volumen Globular Aglomerado HB = hemoglobina, VCM =Volumen corpuscular medio,

CHCM = concentración de hemoglobina corpuscular media, céls = células

**Tabla 2.** Principales parámetros incorporados en la evaluación de la bioquímica sanguínea de Salmónidos

Análisis	Parámetro
Sustratos	Urea (mmol/L)
	Creatinina (umol/L)
	Proteínas totales (g/L)
	Albúmina (g/L)
	Globulina (g/L)
	Glucosa (mmol/L)
	Triglicéridos (mmol/L)
	Colesterol (mmol/L)
Minerales	Lactato (mmol/L)
	Fósforo (mmol/L)
	Calcio (mmol/L)
	Sodio (mmol/L)
	Potasio (mmol/L)
Enzimas	Cloro (mmol/L)
	AST (U/L)
	ALT (U/L)
	ALP (U/L)
	CK (U/L)
	GD (U/L)
	LDH (U/L)

AST = Aspartato Amino Transferasa, ALT = Alanino Amino Transferasa, ALP = Fosfatasa Alcalina,

CK = Creatino Quinasa, GD = Glutamato Deshidrogenasa, LDH = Lactato Deshidrogenasa.

## BIBLIOGRAFÍA

Herrera E. 2004. Perfil metabólico de Salmón Atlántico *Salmo salar* y Trucha Arcoiris *Oncorhynchus mykiss* de tres pisciculturas en fase de agua dulce en el sur de Chile. *Memoria de título*, Escuela de Medicina Veterinaria, Universidad Austral de Chile, Valdivia, Chile.

Kaneko JJ, Harvey JW, Bruss ML. 2008. *Clinical Biochemistry of Domestic Animals*. 6ª ed. Academic Press, USA, Pp 928.

Stockham SL, Scott MA. 2008. *Fundamentals of Veterinary Clinical Pathology*. Iowa State University Press, USA, Pp 920.

Thrall MA, Baker DC, Campbell TW, DeNicolla D, Fettman MJ, Lassen ED, Rebar A, Weiser G. 2012. *Veterinary Hematology and Clinical Chemistry*. Lippincott Williams & Wilkins, USA, Pp 776.

Wittwer F. 2012. *Manual de Patología Clínica Veterinaria*. 2ª ed. Imprenta America, Chile, Pp 200.

## CAPÍTULO II

### OBTENCIÓN DE MUESTRAS DE SANGRE

Con respecto al manejo de los peces, estos deberán ser cuidadosamente colectados desde sus respectivas unidades de cultivo evitando una manipulación excesiva. Si el manejo es excesivo, los peces se golpean, o presentan signología clínica, deben ser descartados. Las muestras de sangre deberán ser obtenidas de peces inmediatamente eutanasiados. Los peces deberán ser dispuestos en recipientes con agua fresca y una solución anestésica (benzocaína 20%, u otro) en una concentración suficiente para inducir la eutanasia lo más rápidamente posible. El tiempo requerido para alcanzar el efecto deseado puede variar.

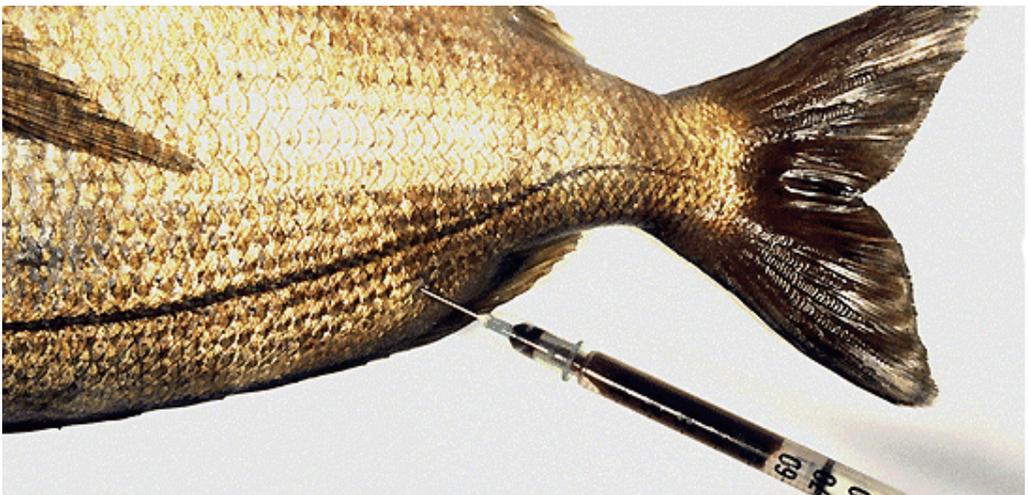
La sangre para el muestreo diagnóstico no letal puede ser recolectada de peces mayores a 8 cm de largo. El procedimiento de recolección en sí debe realizarse en menos de 30 segundos, porque los peces que permanecen fuera del agua durante períodos más prolongados sufren de angustia y desequilibrio electrolítico. La sangre para evaluación hematológica puede recogerse en EDTA o heparina lítica. La muestra para bioquímica sanguínea se puede recoger en frascos estériles sin anticoagulante. Además, frecuentemente se usan las muestras con heparina cuyo plasma es centrifugado después de la evaluación hematológica.

La sangre se puede recoger de los peces a través de la columna vertebral en la vena o arteria caudal. La venopunción de estos vasos puede ser realizada con o sin sedación o anestesia, y la vena o arteria vertebral caudal pueden ser abordadas ya sea de forma ventral o lateral. El abordaje ventral implica la inserción de la aguja debajo de una escala a lo largo de la línea media ventral cerca de la base del pedúnculo caudal (**Figura 1**). Después de alcanzar Los cuerpos vertebrales, la aguja se retira ligeramente, ventral y lateral, mientras que la presión negativa se aplica a la jeringa. Una vez que los vasos hayan sido introducidos, la sangre empieza a entrar en la jeringa.



**Figura 1.** Punción de vena caudal

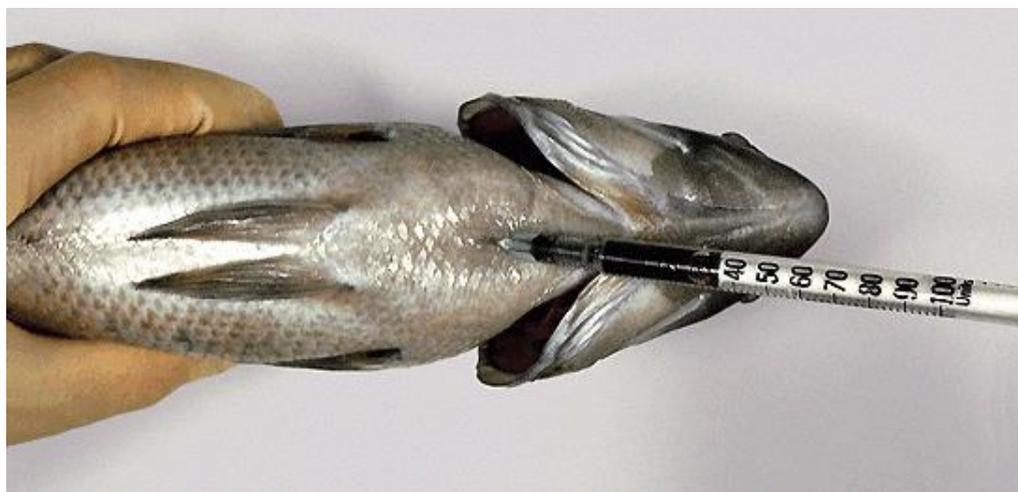
La aproximación lateral se realiza a los vasos vertebrales caudales Insertando la aguja unos pocos milímetros por debajo de la línea lateral cerca de la base del pedúnculo caudal (**Figura 2**). La aguja se dirige entonces hacia la línea media y bajo los cuerpos vertebrales, y la sangre es aspirada dentro de la jeringa como se describe para el enfoque ventral.



**Figura 2.** Punción lateral

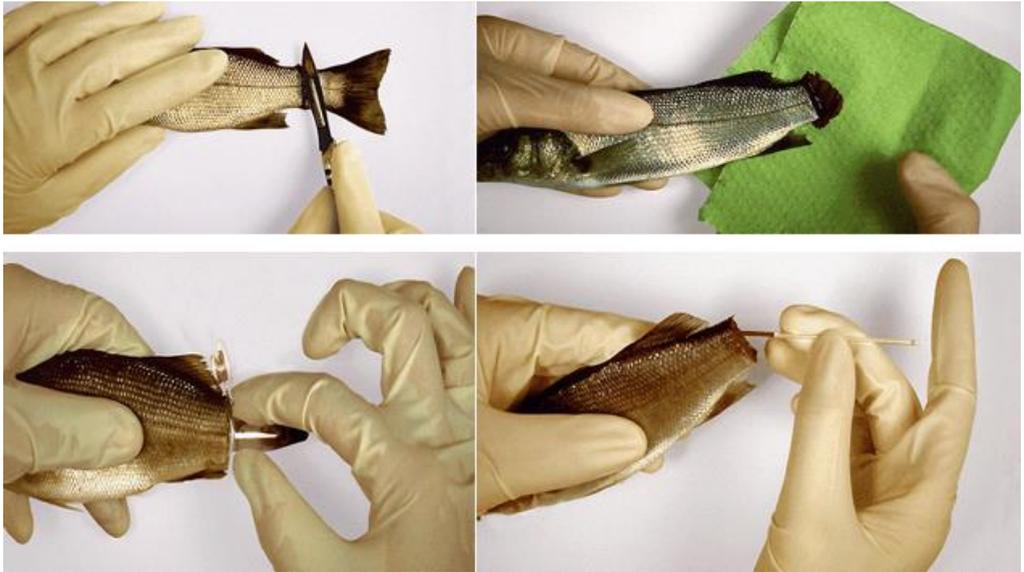
La sangre puede ser recogida aún del corazón utilizando un enfoque ventral. La aguja se inserta ligeramente caudal al vértice de la muesca en forma de V formada por la branquia (opercula) e istmo, y luego se avanza hacia el corazón mientras se aplica un ligero vacío a la jeringa (**Figura**

3). La sangre entrará en la jeringa una vez que el corazón es penetrado. La cardiocentesis puede ser mas riesgosa para el pez que el uso de los vasos vertebrales caudales para la recolección de sangre.



**Figura 3.** Punción cardíaca

Por último, la colecta también se puede realizar seccionando el pedunculo caudal, esta técnica de muestreo es adecuada para peces pequeños (ej. menos de 10 cm) y en muchos casos puede ser la única opción porque los vasos sanguíneos son pequeños y los volúmenes de sangre son muy bajos. Se debe destacar que algunas veces es bastante difícil recoger sangre eficientemente empleando este método. Como la coagulación suele producirse rápidamente la muestra de de sangre debe ser recogida inmediatamente después de seccionar la cola. En este procedimiento se eutanasia al pez para obtener la muestra (**Figura 4**).



**Figura 4.** Sección de pedunculo caudal

Completado el volumen de sangre necesario, se debe retirar la aguja desde el punto de punción, desmontar dicha aguja de la jeringa y disponer su contenido muy lentamente por las paredes del tubo correspondiente, previamente rotulado. Nunca disponer la sangre en el tubo desde la jeringa con la aguja puesta, puesto que podría generar hemólisis y, en consecuencia, alterar el análisis.

Proteja las muestras de la luz directa y el calor del sol, mantenga la cadena de frío almacenándolas en una caja de aislapool refrigerando con la ayuda de gelpacks (4-8°C) durante el muestreo y manejo de las mismas. Mediante el uso de una centrífuga de campo, deberá centrifugar dichas muestras (durante 5 minutos aprox.), para luego con pipetas pasteurs, trasvasijar el suero o plasma a nuevos tubos eppendorf (de 1,5ml). En caso de ser muestras para hematología, estas deberán colectarse SIEMPRE en tubos con anticoagulante (Heparina o EDTA), previa homogeneización para evitar coagulación de la muestra.

Durante el despacho y traslado de las muestras hacia el laboratorio de análisis, deberá refrigerarlas con gelpacks a una temperatura de 4 a 8°C.

#### **MATERIALES NECESARIOS**

- -guantes
- -jeringa apropiada según tamaño de los peces (1 mL, 3 mL o 5 mL)
- -tubos con y sin anticoagulante (dependiendo de análisis requerido)
- -anestésico benzocaína
- -lápiz rotulador

- -aislapool o caja transportadora
- -gelpacks para mantención de cadena de frío

## **BIBLIOGRAFÍA**

Noro M, Wittwer F. 2012. *Hematología de Salmonídeos*. 1ª ed. Imprenta America, Chile. Pp 45.

Thrall MA, Baker DC, Campbell TW, DeNicolla D, Fettman MJ, Lassen ED, Rebar A, Weiser G. 2012. *Veterinary Hematology and Clinical Chemistry*. Lippincott Williams & Wilkins, USA, Pp 776.

Laboratorio Pathovet. 2016. Anestesia y toma de muestras de sangre para diagnóstico de patología clínica, 3ra ed.

## CAPÍTULO III

### TÉCNICAS HEMATOLÓGICAS

En este capítulo se describirán las técnicas para realización del hemograma, que se divide en eritrograma, leucograma, recuento de trombocitos y puede incluir la determinación de proteínas plasmáticas totales. Los análisis se realizan de rutinamente de forma manual por las características celulares de dos eritrocitos y trombocitos de los salmónidos, que son nucleados, bien como los leucocitos.

#### Eritrograma

Los análisis incorporados en el eritrograma incluyen Hematocrito o Volumen Globular Aglomerado (VGA), Recuento de eritrocitos, concentración de hemoglobina, y los índices Volumen Corpuscular Medio (VCM) y Concentración de Hemoglobina Corpuscular Media (CHCM), además de la evaluación morfológica de los eritrocitos.

#### Hematocrito o VGA

La técnica manual estándar para determinación del VGA es el uso de tubos capilares de micro hematocrito y la centrifugación (12.000 g durante 5 minutos). Se mide en una columna de sangre después de la centrifugación que da como resultado un empaquetamiento máximo de los eritrocitos. Las herramientas para realizar el volumen de células empaquetadas incluyen tubos de 75 x 1,5 mm (es decir, tubos de micro hematocrito), sellador de tubo (plastilina o calor), una centrífuga de micro hematocrito y un dispositivo de lectura de tubos (regla de lectura de hematocritos).

El procedimiento se realiza con los siguientes pasos. En primer lugar, el tubo de micro hematocrito es atrapado por acción capilar sosteniéndolo horizontalmente o ligeramente hacia abajo y luego tocando el extremo superior a la sangre del tubo con anticoagulante abierto.

A continuación, permita que el tubo alcance aproximadamente el 70-90% de su longitud. Sostenga el tubo horizontalmente para evitar que la sangre gotee fuera del tubo y cierre un extremo presionando el tubo en el sellador del tubo una o dos veces. Obsérvese que puede haber aire entre el sellador y la sangre. Sin embargo, esto no es un problema, porque el aire atrapado se elimina durante la centrifugación.

El tubo se carga entonces en el centro de micro hematocrito de acuerdo con las instrucciones del fabricante. La centrífuga de micro hematocrito está diseñada para girar el tubo ligero a muy altas velocidades para generar suficiente fuerza centrífuga para empaquetar completamente los glóbulos rojos en 2-3 minutos. Con tal fuerza centrífuga, la mayor parte (o todo) del plasma se retira de las capas de células empaquetadas.

Se pueden observar tres capas distintas en el tubo después de la extracción de la centrífuga: la columna de plasma en la parte superior, los eritrocitos empaquetados en la parte inferior y una pequeña banda blanca media conocida como capa flogística o capa leucocitaria. La capa leucocitaria consiste en células nucleadas (predominantemente leucocitos) y trombocitos.

El VGA se mide en un dispositivo de lectura, tal como un lector de tarjetas de micro hematocrito (regla de lectura). El procedimiento se realiza colocando la interface eritrocito-arcilla en la línea 0 y la parte superior de la columna de plasma en la línea 100. La posición de la parte superior de la columna de eritrocitos se lee entonces en la escala como el VGA, que se expresará en %.

## Hemoglobina

Esta medición de la cantidad de hemoglobina por unidad de volumen, expresada como g/L. Aunque se han utilizado una variedad de métodos para determinar la concentración de hemoglobina en la sangre, el método de cianometahemoglobina proporciona los resultados más consistentes. Se diluye 20  $\mu$ L de sangre con anticoagulante y en 5 mL de reactivo Drabkin, para lisis rápido de las células, liberando así la hemoglobina en la fase líquida. Se debe esperar 3-5 minutos para ocurrir la hemólisis. En seguida, la solución de ser centrifugada por 3.000-5.000rpm por 10 minutos para la sedimentación de los núcleos libres. La absorbancia de la luz a una longitud de onda específica (filtro 540) puede medirse por espectrofotometría en una pequeña célula denominada hemoglobímetro. La absorción de luz es proporcional a la concentración de hemoglobina. El sistema se calibra con material de concentración de hemoglobina conocida utilizando técnicas de referencia.

## Recuento de Eritrocitos

Los eritrocitos de peces son ovales a elipsoidales, tienen abundante citoplasma eosinofílico pálido e incluyen un núcleo centralmente posicionado, ovalado a elipsoidal, en tinciones de Romanowsky. Los núcleos de eritrocitos de peces pueden ser grandes, ocupando hasta un cuarto (o más) del volumen celular. La cromatina nuclear está densamente agrupada y mancha púrpura oscura. El citoplasma es típicamente homogéneo, pero puede contener cantidades variables de áreas raras o manchas pálidas o vacuolas.

La concentración total de eritrocitos en los peces se determina usando métodos manuales. El principal método que se utiliza es el de Natt-Herrick (Tabla 1), que implica la preparación de la solución Natt-Herrick para ser usada como mancha y Diluyente. Se prepara una dilución 1:200 de la sangre usando una pipeta para añadir 20  $\mu$ L de sangre a 4 mL del Natt-Herrick. Después de mezclar, la sangre diluida se descarga en una cámara de recuento (hemocitómetro - Cámara de Neubauer) y las células se dejan sedimentar durante 5 minutos, antes de contar. Los eritrocitos situados en las cuatro esquinas y los cuadrados centrales de la cámara de hemocitómetro se cuentan al utilizar cualquiera de los métodos manuales. El número obtenido se multiplica entonces por 10.000 para calcular el recuento total de glóbulos rojos por microlitro de sangre.

**Tabla 1.** Reactivos necesarios para la preparación de la solución de Natt-Herrick

<b>Substancia</b>	<b>Cantidad</b>
Cloruro de sodio [NaCl]	3,88 g
Sulfato de sodio [Na SO <sub>4</sub> ]	2,50 g
Fosfato de sodio [Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ]	1,74 g
Fosfato de potasio [KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ]	0,25 g
Formalina [37%]	7,50 mL
Violeta de genciana	0,10 g

\*Llevar a 1000mL con agua destilada y filtrar a través de papel filtro # 10.

### **Cálculos de VCM y CHCM**

El VCM y CHCM se calculan para hematología usando fórmulas.

El VCM se calcula a partir del hematocrito (VGA) y del recuento de eritrocitos (RE). Proporcional al tamaño promedio de los eritrocitos (expresado como fL):

$$\text{VCM (fL)} = \text{VGA (\%)} \times 10^{15} / \text{RE} \times 10^{12} (\mu\text{L})$$

El CHCM se calcula a partir de la concentración de hemoglobina y el hematocrito (VGA). Proporciona un índice de la cantidad de hemoglobina (HGB) relativa al volumen de eritrocitos aglomerados (expresado como g/L):

$$\text{CHCM (g/L)} = \text{HGB (g/L)} \times 10 / \text{VGA (\%)}$$

### **Leucograma**

Los análisis incorporados en el Leucograma incluyen recuento total de leucocitos y recuento diferencial de leucocitos, identificando a través de frotis sanguíneo el tipo celular, además de permitir la evaluación de su morfología. Los leucocitos en peces incluyen: basófilos, eosinófilos, basiliiformes de heterófilos, heterófilos (corresponden a los neutrófilos de los mamíferos), linfocitos y monocitos.

### **Recuento Total de Leucocitos**

Debido a que los peces tienen eritrocitos y trombocitos nucleados, se utilizan métodos de recuento manual. Se han utilizado métodos de recuento directo de leucocitos usando un hemocitómetro (cámara de Neubauer) y una variedad de soluciones de tinción y dilución. El método de Natt-Herrick comúnmente se utiliza, y el procedimiento es utilizar la misma dilución preparada para el recuento de eritrocitos (1: 200 con solución de Natt-Herrick). El recuento total de leucocitos (RTL) se obtiene contando todos los leucocitos (células azul oscuro) en los nueve cuadrados grandes en el área de la cámara de hemocitómetro usando la siguiente fórmula:

$$\text{RTL} / \mu\text{L} = (\text{Células totales en nueve cuadrados grandes}) \times 222$$

La ventaja de este método es que también se puede obtener un recuento total de eritrocitos y trombocitos utilizando el mismo hemocitómetro cargado. Una desventaja es que la diferenciación de los trombocitos de los linfocitos pequeños a menudo es difícil, por lo que se recomienda hacer un único recuento en cámara para Leucocitos + Trombocitos. Posteriormente, en el recuento diferencial de leucocitos en frotis se hace el porcentual de trombocitos por leucocitos, permitiendo con la corrección, llegar al recuento total de Leucocitos y Trombocitos.

Los leucocitos aparecen azules y manchan más oscuros que los eritrocitos teñidos con Natt-Herrick. Puede ser difícil distinguir linfocitos pequeños y maduros de trombocitos si los conteos se hacen usando un objetiva  $\times 10$ ; Las células se identifican con mayor precisión en magnificaciones más altas. La tinción durante 60 minutos en la solución Natt-Herrick también puede mejorar la diferenciación entre linfocitos pequeños y trombocitos. Las ventajas del procedimiento de Natt-Herrick incluyen la capacidad de obtener un recuento total de eritrocitos, leucocitos y trombocitos utilizando el mismo hemocitómetro cargado.

## **Recuento Diferencial de Leucocitos**

Se obtiene un diferencial de leucocitos a partir de una sangre teñida con Romanowsky. Secar rápidamente la sangre con un secador de pelo puede ayudar a aliviar los artefactos celulares asociados con la preparación de la sangre. Se deben contar 100 leucocitos en inmersión (1000X), llegándose a un porcentual de cada uno de los leucocitos: basófilos, eosinófilos, heterófilos, linfocitos y monocitos. Mediante la lectura del frotis no solo se realiza el recuento diferencial de leucocitos, bien como se evalúa su morfología, además de la de los eritrocitos y trombocitos, y búsqueda de eventuales parásitos o bacterias que puedan estar circulando.

### **Basófilos**

Son células que tienen afinidad por colorantes básicos y sus gránulos se tiñen de azul en las tinciones de Romanowsky. La existencia de basófilos en peces es controversia. Están en bajo número en la circulación, siendo raramente observados. Están relacionados con fagocitosis de microorganismos y reacciones alérgicas.

### **Eosinófilos**

Son células con afinidad por colorantes ácidos y sus gránulos se tiñen de rojo. Tienen capacidad para destruir parásitos y modular la respuesta alérgica. Se presentan en una proporción <5% en la circulación. Miden de 11 a 19µm, su núcleo es segmentado, excéntrico de color violeta, ocupando aproximadamente 30% de la célula. El citoplasma presenta numerosos gránulos de color naranja a rojo.

### **Heterófilos**

Los heterófilos corresponden alrededor de un 20% de la población de leucocitos circulantes. Son la segunda población de leucocitos más numerosa, quedando detrás de los linfocitos. Los heterófilos tienen función similar a los neutrófilos de los mamíferos. Sin embargo, no tienen capacidad de fagocitosis de microorganismos. Miden entre 6,5 a 8,2 µm, el núcleo tiene color violeta, es lobulado, excéntrico y ocupa 20 a 30% de la célula. El citoplasma posee finos gránulos y vacuolas.

### **Linfocitos**

Los linfocitos miden de 6,5 a 8,0 µm, son esféricos y poseen el núcleo excéntrico de color violeta que ocupa 70% de la célula. Posee un escaso citoplasma discretamente basofílico, rodeado del núcleo, sin gránulos. Son el leucocito predominante en la sangre circulante, correspondiendo a un 70-80% en peces. Funcionalmente se dividen en linfocito B y T, siendo los linfocitos B responsables por la respuesta humoral y los Linfocitos T por la inmunidad mediada por células.

### **Monocitos**

Los monocitos son células grandes que corresponden al 5% de los leucocitos en peces. Su núcleo es reniforme y irregular de cromatina laxa y color violeta, ocupando 50% de la célula. El citoplasma puede contener vacuolas y su color es grisáceo. Los monocitos se transforman en macrófagos en los tejidos y son fagocitos por naturaleza.

## **Recuento Diferencial Relativo**

Determina la distribución porcentual de los diferentes tipos de leucocitos en la sangre circulante. Se hace un recuento porcentual de 100 células (leucocitos), expresándose el resultado en porcentaje. En esa instancia también se hace una proporción de trombocitos/100

leucocitos, con el objetivo de corregir el recuento absoluto de leucocitos y trombocitos que se realizó en el hemocitómetro.

### **Recuento Diferencial Absoluto**

Se obtiene multiplicando el resultado porcentual de cada leucocito (obtenido en el recuento diferencial relativo) por el recuento total de leucocitos. Así, se establece la cantidad absoluta de cada uno de los leucocitos/ $\mu\text{L}$ .

### **Recuento de trombocitos**

Los trombocitos de los peces son más pequeños que los eritrocitos, varían en forma y pueden ser redondos, alargados o en forma de huso. Además, la forma puede variar con la etapa de madurez o el grado de reactividad. Los trombocitos maduros tienden a tener formas ovaladas y alargadas. Los trombocitos inmaduros son redondos, mientras que los trombocitos en forma de huso parecen ser formas reactivas ya menudo se encuentran en grupos. El citoplasma del trombocito es incoloro a azul débil; el núcleo es condensado y sigue la forma de la célula. Los trombocitos de pescado también pueden contener una cantidad variable de gránulos citoplasmáticos eosinófilos. Los trombocitos en peces a menudo se confunden con linfocitos pequeños y maduros. Los linfocitos, sin embargo, tienen un citoplasma levemente más abundante, ligeramente basófilo en comparación con los trombocitos.

El recuento total de trombocitos puede obtenerse a través del mismo hemocitómetro cargado con soluciones diluyentes (es decir, solución de Natt-Herrick) usada para obtener un recuento total de eritrocitos y leucocitos. Los trombocitos se asemejan a eritrocitos en el hemocitómetro, pero son mucho más pequeños y parecen ser redondos a ovals, con una mayor relación núcleo: citoplasma (N: C) en comparación con los eritrocitos. Se recomienda contarse junto con los leucocitos debido a su gran similitud con los linfocitos y el bajo grado de diferenciación que permite los recuentos en hemocitómetro. De acuerdo al descrito anteriormente, el recuento diferencial de leucocitos en frotis sanguíneo teñido permitirá hacer una proporción entre leucocitos y trombocitos y obtener el recuento total de trombocitos. El recuento total se obtiene multiplicando el porcentaje de trombocitos (en frotis sanguíneo) por el recuento total de leucocitos + trombocitos.

### **Proteínas plasmáticas totales por refractometría**

Después de la medición y observación del tubo de micro hematocrito, la columna de plasma se puede utilizar para estimar la concentración de proteínas plasmáticas en el refractómetro. Este instrumento puede utilizarse para estimar la concentración de cualquier soluto de acuerdo con el principio de que el soluto refracta (o dobla) la luz que pasa hasta un grado que es proporcional a la concentración de soluto. El principio o propiedad que se mide es el índice de refracción relativo al agua destilada. La escala para un soluto particular puede desarrollarse a partir de mediciones de índice de refracción calibradas a soluciones con concentraciones conocidas de soluto. En el diagnóstico clínico, la refractometría se utiliza para estimar la concentración de proteínas plasmáticas.

La proteína plasmática se mide usando la columna de plasma en el tubo de micro hematocrito. El tubo se rompe por encima de la capa de la capa flogística, y la parte del tubo que contiene el plasma se utiliza para cargar el refractómetro. El instrumento se mantiene entonces de modo que una fuente de luz ambiente pueda pasar a través del prisma humedecido con plasma y la refracción de la luz se lee en una escala a través de un ocular.

La medida de la proteína se considera como una estimación basada en la calibración, suponiendo que otros solutos en el suero están presentes en concentraciones normales. El resultado de proteínas plasmáticas totales obtenido deberá ser multiplicado por 10, con el fin de expresar el resultado en g/L.

## **BIBLIOGRAFÍA**

Campbell T. 2017. *Exotic animal hematology and cytology*. 4ª ed. Wiley-Blackwell, USA, Pp 424.

Noro M, Wittwer F. 2012. *Hematología de Salmonídeos*. 1ª ed. Imprenta America, Chile. Pp 45.

Thrall MA, Baker DC, Campbell TW, DeNicolla D, Fettman MJ, Lassen ED, Rebar A, Weiser G. 2012. *Veterinary Hematology and Clinical Chemistry*. Lippincott Williams & Wilkins, USA, Pp 776.

Weiss DJ, Wardrop KJ. 2010. *Schalm's Veterinary Hematology*. 6ª ed. Wiley-Blackwell, USA, Pp 1232.

## CAPÍTULO IV

### INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS HEMATOLÓGICOS

#### Introducción

Los resultados hematológicos se interpretan usualmente de forma individual en peces salmónidos, debido a las particularidades de las células de las alteraciones que se pueden observar. Esos resultados deben ser interpretados en comparación con intervalos de referencia para la especie y etapa productiva.

#### Respuestas asociadas los eritrocitos

La manipulación de los peces para la venopunción puede tener un efecto marcado en el eritrograma, aumentando significativamente el hematocrito hasta en un 25%. La magnitud de este efecto se relaciona directamente con el tiempo de manejo. La manipulación de salmónidos durante más de 20 segundos da lugar a la liberación de catecolaminas, que tienden a causar hemoconcentración e aumento del tamaño (VCM) de los eritrocitos. Por lo tanto, el hematocrito aumenta, pero la concentración de hemoglobina sigue siendo la misma, lo que resulta en un CHCM disminuido.

En general, el VGA de peces es menor que el de los mamíferos y las aves. Los hematocritos varían entre y dentro de las especies de salmónidos parecen correlacionarse con la actividad normal del pez, con hematocritos más bajos en peces menos activos. Los hematocritos también varían durante el ciclo de vida del pez. Por ejemplo, durante las condiciones de adelgazamiento, el salmón atlántico (*Salmo salar*) tiene hematocritos altos en comparación con aquellos durante el desove. La edad, el sexo, la temperatura del agua, el fotoperiodo y la variación estacional también pueden influir en el VGA. De hecho, el VGA en algunas especies de peces machos son lo suficientemente alto como para requerir dos intervalos de referencia.

Peces con VGA de más del 45% usualmente se consideran deshidratados, particularmente cuando este aumento está soportado por un aumento de la proteínas séricas o proteína total. Los anémicos tienen VGA bajos (<20%).

Peces presentando una anemia regenerativa (por hemorragia o hemólisis) a menudo presentan policromasia y eritrocitos inmaduros en su sangre. A la diferencia de los mamíferos, los eritrocitos jóvenes de peces son menores, por lo que las anemias regenerativas en el pez se caracterizan por cursar con microcitosis (diminución en el VCM).

Las anemias hemorrágicas de salmónes están asociadas con trauma, parásitos sanguinolentos, deficiencia de vitamina K y septicemia (bacterias o virales). El síndrome del Salmón Coho produce una anemia hipocrómica regenerativa. Asimismo, una anemia microcítica normocrómica puede ser observada en la Anemia Infecciosa del Salmón, producida por el virus ISA genera, como consecuencia de hemorragias en intestino, hígado, ciego pilórico y ocular, producto de daño endotelial.

Las anemias hemolíticas en peces pueden estar asociadas con toxinas (bacterianas o ambientales), infecciones virales, ciertas deficiencias nutricionales y hemoparásitos. El

envenenamiento por nitritos (enfermedad de la sangre parda o síndrome del nuevo tanque) también resulta en anemia hemolítica severa.

Una anemia con eritrocitos que presenten poca o ninguna policromasia se caracterizará como anemia no regenerativa. Anemia microcítica normocrómica se ha asociado con tensiones ambientales, como el aumento de la densidad de población. Las anemias asociadas a núcleos anormales de eritrocitos (mitosis, segmentación y fragmentación), así como la formación de eritroplastos (eritrocitos sin núcleos), pueden estar relacionadas con la deficiencia de ácido fólico o vitamina E y contaminación ambiental. La necrosis pancreática infecciosa (virus IPN) genera una anemia no regenerativa en consecuencia de lesión hepática.

Una variedad de holoparásitos ya fueron observados como cuerpos de inclusión en eritrocito de peces. Inclusiones virales se han descrito en el citoplasma de eritrocitos de salmones. Asimismo, un síndrome denominado síndrome de cuerpos de inclusión en eritrocitos (EIBS) se asocia a la aparición de inclusiones en eritrocitos y anemia leve.

### **Respuestas asociadas los leucocitos**

Los heterófilos de salmónidos participan en las respuestas inflamatorias, sin embargo, no siempre son fagocíticos y poco se sabe sobre su función. Debido a que la función de los granulocitos (heterófilos, eosinófilos, basófilos) en peces no se conoce bien, la interpretación de los cambios en las concentraciones de granulocitos de sangre periférica puede ser difícil. Sin embargo, pueden generalizarse ampliamente hasta que los resultados de otros estudios indiquen las funciones específicas y las respuestas de estas células a la enfermedad. Por ejemplo, una mayor concentración de heterófilos se asocia a menudo en las enfermedades inflamatorias, especialmente en las que afectan a agentes infecciosos. Una heterofilia relativa a menudo se asocia con linfopenias y puede ser interpretada como una respuesta al estrés en peces. Heterofilia es descrita en el síndrome del salmón Coho, así como en la enfermedad producida por el virus ISA, donde la heterofilia va acompañada de desviación a la izquierda (presencia de heterófilos basiformes – inmaduros).

La presencia de toxicidad en heterófilos (basofilia citoplasmática, vacuolización, granulación anormal y degeneración del núcleo celular) ocurren en respuesta a una enfermedad sistémica grave, los neutrófilos de peces. Los heterófilos tóxicos en peces se asocian con enfermedad sistémica grave como septicemia, infecciones micóticas y necrosis tisular severa. El grado de toxicidad suele indicar la gravedad de la afección y una toxicidad marcada indica un pronóstico grave.

La eosinofilia en peces sugiere una respuesta inflamatoria asociada con infecciones parasitarias o estimulación antigénica.

La monocitosis en peces es sugestiva de una respuesta inflamatoria, pudiendo estar asociada con un agente infeccioso.

La linfocitosis es sugestiva de estimulación inmunogénica, mientras que la linfopenia sugiere afecciones inmunosupresoras, como el estrés o el exceso de glucocorticosteroides exógenos. Las septicemias bacterianas pueden resultar en leucopenias y linfopenias marcadas. Las condiciones ambientales, como el fotoperíodo prolongado y la temperatura elevada del agua que causan una respuesta al estrés en peces, generando una leucopenia asociada con una linfopenia.

## **Respuestas asociadas los trombocitos**

La sangre de peces se coagula en respuesta a la lesión así como el descrito en otros vertebrados. Sin embargo, la agregación de trombocitos en peces difiere de la agregación plaquetaria de mamíferos. Por lo tanto, tanto el control como el resultado de la agregación de trombocitos pueden no ser los mismos que los mamíferos.

El exceso de glucocorticoides en peces tiende a disminuir la concentración de trombocitos y aumentar el tiempo de coagulación. Los factores estresantes del medio ambiente, como un fotoperiodo prolongado y una temperatura elevada del agua, darán como resultado una trombocitopenia. También se producen tiempos de coagulación prolongados por deficiencia de la vitamina K en salmónidos.

La trombocitosis y la hipercoagulabilidad de la sangre entera se ha asociado con la exposición a niveles tóxicos de cadmio.

## **BIBLIOGRAFÍA**

Campbell T. 2017. *Exotic animal hematology and cytology*. 4ª ed. Wiley-Blackwell, USA, Pp 424.

Noro M, Wittwer F. 2012. *Hematología de Salmonídeos*. 1ª ed. Imprenta America, Chile. Pp 45.

Thrall MA, Baker DC, Campbell TW, DeNicolla D, Fettman MJ, Lassen ED, Rebar A, Weiser G. 2012. *Veterinary Hematology and Clinical Chemistry*. Lippincott Williams & Wilkins, USA, Pp 776.

Weiss DJ, Wardrop KJ. 2010. *Schalm's Veterinary Hematology*. 6ª ed. Wiley-Blackwell, USA, Pp 1232.

## CAPÍTULO V

### TÉCNICAS EN BIOQUÍMICA CLÍNICA

Al recoger sangre para análisis bioquímico se debe llevar en consideración que la contención el manejo del pescado por tan sólo 30 segundos puede provocar cambios en los analitos bioquímicos plasmáticos.

Los cambios *in vitro* después de la recolección de sangre pueden minimizarse separando el plasma de los eritrocitos tan pronto como sea posible después de obtener el espécimen.

El volumen de muestra obtenido depende del tamaño del pez y puede limitar el número de análisis bioquímicos. Distintos métodos pueden ser utilizados para las determinaciones en bioquímica clínica de peces, desde química seca química seca con la utilización de equipos “*point of care*”, técnica que requiere mínimos volúmenes, sin entrenamiento previo, con gran aplicabilidad en terreno y gran utilidad para investigación; hasta la química húmeda, con uso de la técnica de espectrofotometría que depende de equipamientos y personal entrenado y es ampliamente utilizada en laboratorios de diagnóstico de peces.

#### Metodología para Bioquímica sanguínea

Una amplia variedad de técnicas, que se han incorporado en muchos diseños de instrumentos diferentes, se utilizan en la química clínica veterinaria. La espectrofotometría de absorbancia se usa para medir la mayoría de las sustancias de química clínica, siendo la técnica que se describirá en ese manual. La fluorometría también se utiliza para medir ciertos analitos en algunos analizadores de química clínica. El pH de la sangre, las presiones parciales de dióxido de carbono y oxígeno, y las concentraciones de electrolitos tales como sodio, potasio y cloruro se miden más comúnmente por métodos electroquímicos. Los espectrofotómetros de absorción atómica no se utilizan comúnmente en los laboratorios de química clínica; pero pueden ser utilizados para la determinación de minerales en peces.

#### Espectrofotometría

La espectrofotometría de absorbancia es una técnica analítica en la que las concentraciones de sustancias se determinan dirigiendo un haz de luz a través de una solución que contiene la sustancia que se va a detectar (o un producto de esa sustancia) y luego se mide la cantidad de luz que absorben. La técnica se puede realizar de forma semi automatizada o automatizada, y es necesario tener un analizador (espectrofotómetro) para las lecturas. La automatización, desde el manejo de la adición de muestras y reactivos hasta el cálculo de los resultados de las pruebas hasta la generación de un informe del pez, es posible gracias al control por computadora y al procesamiento de información integral a estos sistemas.

La espectrofotometría de absorbancia funciona basada en los espectros de luz. Típicamente, la luz se clasifica por su longitud de onda, que se mide en nanómetros (nm). La luz en el espectro visible tiene longitudes de onda de 380-750nm. El espectro visible incluye una variedad de longitudes de onda que representan los colores con los que estamos familiarizados. Es importante recordar que el color es el resultado de la transmisión o reflejo de la luz. Una solución verde es azul porque permite que la luz en la zona azul del espectro visible se transmita a través de ella y ha absorbido la luz visible de otras longitudes de onda. Estos mismos principios también se aplican a la luz fuera del espectro visible. Diferentes sustancias absorben y

reaccionan diferentes longitudes de onda en un patrón que es típico para esa sustancia. El patrón en el cual una sustancia absorbe luz a varias longitudes de onda se conoce como su espectro de absorción, y cada sustancia tiene su propio espectro de absorción único.

En la espectrofotometría de absorbancia, se utilizan kits comerciales para la determinación de un analito, enzima o sustrato y se pueden utilizar dos tipos de métodos de ensayo: punto final o cinético. Los ensayos de punto final generalmente se aplican cuando se mide la concentración de alguna sustancia preexistente en suero o plasma. En dicho ensayo, se añade reactivo (s) a una cantidad de suero, y se produce una reacción química. El producto resultante de esta reacción se mide por espectrofotometría. La solución en la que se ha producido la reacción se coloca en una cubeta, un haz luminoso de una longitud de onda absorbida por el producto se proyecta a través de una cubeta y se mide la absorbancia. Mediante el uso de una curva de calibración y / o una constante de calibración, se calcula la concentración de la sustancia que se mide. Un ejemplo de reacción de punto final es la utilizada para determinación de albumina sérica.

Los ensayos cinéticos típicamente se han utilizado para medir actividades enzimáticas, pero también se han adaptado para medir las concentraciones de muchos analitos en la sangre. Típicamente, las concentraciones de enzimas no se miden directamente. Más bien, la cantidad de enzima en el suero generalmente se mide indirectamente, por la actividad de esa enzima. Las enzimas son proteínas que catalizan (es decir, aceleran) las reacciones químicas, con el resultado de que el sustrato se convierte en producto más rápidamente. Para medir la actividad de una enzima, se debe evaluar la velocidad con la que convierte un sustrato en un producto. Cuanto más rápidamente se produce la conversión, mayor es la actividad enzimática se supone que es. Para medir la tasa de conversión de sustrato a producto, se debe evaluar la velocidad a la que se produce el producto y esto requiere múltiples mediciones de la concentración del producto en el tiempo. Debido a que este tipo de ensayo es un proceso dinámico, se denomina ensayo cinético. Un ejemplo de reacción cinética es la utilizada para la determinación de actividad de AST (enzima muscular) en peces.

## **BIBLIOGRAFÍA**

Burtis CA. 2007. *Tietz Fundamentals of Clinical Chemistry*. 6ª ed. Saunders, USA, Pp 110

Kaneko JJ, Harvey JW, Bruss ML. 2008. *Clinical Biochemistry of Domestic Animals*. 6ª ed. Academic Press, USA, Pp 928.

Stockham SL, Scott MA. 2008. *Fundamentals of Veterinary Clinical Pathology*. Iowa State University Press, USA, Pp 920.

Thrall MA, Baker DC, Campbell TW, DeNicolla D, Fettman MJ, Lassen ED, Rebar A, Weiser G. 2012. *Veterinary Hematology and Clinical Chemistry*. Lippincott Williams & Wilkins, USA, Pp 776.

## **CAPÍTULO VI**

### **INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS BIQUÍMICOS**

#### **Introducción**

Los principales analitos que se miden en bioquímica clínica de peces se describen en el Capítulo I y son: urea, creatinina, proteínas totales, albumina, globulinas, calcio, fósforo, sodio y potasio y cloro, ALT, AST, GD, ALP, LDH, CK, ALT, Lactato, glucosa, triglicéridos, colesterol. A continuación, se describirá en cuáles situaciones pueden ser necesaria la medición de esos analitos y cómo interpretar sus variaciones plasmáticas.

#### **Interpretación de perfiles bioquímicos en peces salmónidos**

##### **Evaluación Renal**

Debido a que los riñones de los peces contribuyen poco a la excreción de desechos nitrogenados, la interpretación de las concentraciones plasmáticas de nitrógeno y creatinina puede no ser útil en la evaluación de la enfermedad renal. La urea en peces se deriva principalmente de la degradación de las purinas a través del ácido úrico. La mayoría de los peces producen pequeñas cantidades de urea. Poco se sabe sobre los factores que regulan el metabolismo de la urea en los salmónidos. Las branquias, sin embargo, parecen predominar sobre los riñones como el principal órgano de la excreción de urea en la mayoría de los peces. Por lo tanto, los aumentos en la concentración plasmática de urea pueden ser más indicativos de enfermedad epitelial branquial que de enfermedad renal en teleósteos.

Los peces producen pequeñas cantidades de ácido úrico, creatina y creatinina, pero se sabe poco sobre su función fisiológica. La creatina, un producto final del metabolismo en el músculo blanco, representa más del 50% del residuo nitrogenado que se excreta a través del riñón. Por lo tanto, la concentración plasmática de creatina puede ser valiosa en la evaluación de la enfermedad renal entre peces. Desafortunadamente, no se han realizado estudios para evaluar el uso de creatina como un indicador de dicha enfermedad renal, y la mayoría de los laboratorios veterinarios no ofrecen ensayos de creatina.

La creatinina se forma a partir de creatina y también es secretada por los riñones de la piscina. En un estudio, los aumentos de la concentración plasmática de creatinina se han asociado con enfermedad renal, aunque las concentraciones de urea permanecieron normales.

##### **Evaluación Electrolítica**

##### **Cloruro y Sodio**

Las concentraciones plasmáticas normales de sodio y cloruro de los teleósteos de agua dulce son más bajas que la de los teleósteos marinos. Las concentraciones plasmáticas de sodio y cloruro se ven afectadas por los cambios en la salinidad ambiental, la función branquial y el estrés. A los pocos minutos de la captura y manipulación del trauma, las catecolaminas y el cortisol se liberan junto con la liberación de ácido láctico de los músculos. La liberación de

catecolaminas inducida por el estrés provoca un aumento de la presión sanguínea que da lugar a una mayor permeabilidad electrolítica de las branquias que provoca una rápida disminución de sodio y cloruro en el pez de agua dulce y un aumento de los iones en teleósteos marinos. La hiponatremia y la hipocloremia en peces de agua dulce pueden estar asociadas con la enfermedad de las branquias y las enfermedades renales o con ambientes ácidos.

### **Potasio**

Menos del 2% del potasio corporal total se encuentra en los líquidos extracelulares; por lo tanto, las concentraciones plasmáticas no se ven afectadas por cambios en la permeabilidad electrolítica de las branquias. La hipocalemia puede estar asociada con alcalosis, pérdida de potasio gastrointestinal o cutánea o toxicidad por nitrito. La hipercalemia puede estar asociada con la acidosis, tal como ocurre después de la actividad muscular intensa durante la captura y manejo, y la disminución de la secreción renal de potasio en los teleósteos de agua dulce. La hemólisis también causará un aumento artificial del potasio en plasma.

### **Calcio**

Porque el agua es una fuente de calcio fácilmente disponible, la concentración de calcio plasmático está influenciada por la concentración ambiental de calcio. Los peces tienen acceso a un suministro continuo de calcio, por lo que deben limitar su consumo. Los peces no tienen glándulas paratiroides o una hormona similar a paratormona.

En salmónidos de agua dulce 30-40% del total de calcio plasmático está ligado a la proteína. Aproximadamente el 22% del calcio total está ligado a la proteína en los teleósteos marinos. Por lo tanto, los cambios en las proteínas plasmáticas afectarán la concentración plasmática total de calcio. Sin embargo, la concentración libre de  $\text{Ca}^{++}$  permanece constante, por lo que se recomienda la medición de calcio iónico.

### **Fósforo**

El fósforo (junto con el calcio) es un componente estructural para los huesos, los dientes y las escalas. Además, desempeña un papel en varios procesos metabólicos del pez. Los requerimientos de fósforo dietético varían ampliamente entre para diferentes especies de peces. Cantidad de fósforo que requieren los salmónidos en su dieta es bastante elevada. La disminución en las concentraciones de fósforo está asociada principalmente a la baja ingesta de fósforo en la dieta y generará disminución de la tasa de crecimiento, la reducción de la eficiencia alimenticia y las deformidades óseas.

## **Evaluación del epitelio branquial**

Los cambios en la bioquímica sanguínea pueden indicar alteración del epitelio branquial debido a que las branquias son órganos importantes para la regulación osmótica, iónica y de ácido-básica, así como para la eliminación de desechos nitrogenados. La lesión de tejido branquial puede resultar en un engrosamiento del epitelio branquial y una mayor distancia para la difusión de la sangre al agua. A su vez, esto puede conducir a una concentración plasmática aumentada de analitos normalmente excretada por el epitelio branquial. Por lo tanto, pueden producirse alteraciones ácido-base, desequilibrios electrolíticos y aumentos en las concentraciones de amoníaco y urea en la sangre.

## **Evaluación del hígado y musculatura**

El tejido hepático de los teleósteos parece ser rico en AST y posiblemente ALT. Por lo tanto, la actividad plasmática de estas enzimas puede elevarse con una enfermedad hepatocelular grave en salmónidos.

Existe una falta general de información sobre la incidencia de factores no patogénicos sobre las actividades de estas enzimas en el plasma de peces. Sin embargo, algunos estudios han sugerido que la evaluación de enzimas plasmáticas en peces puede no ser tan directa como lo es en mamíferos. Por ejemplo, los altos niveles de amoníaco de peces pueden conducir a altas actividades de transaminasas. Por lo tanto, el aumento de las actividades puede estar asociado con enfermedad hepática o cambios en la concentración de amoníaco en plasma. Las altas actividades de la AST y la CK también ocurren en el músculo de peces; por lo tanto, las actividades plasmáticas elevadas de estas enzimas aumentarán después de lesión muscular o actividad muscular intensa asociada con la captura y restricción. Lactato también aumentará en las mismas condiciones de actividad muscular intensa y restricción de oxígeno.

Se ha informado que los cambios de temperatura afectan a la actividad de la ALP. El método de recogida de sangre influencia en las actividades de LDH plasmática y CK en peces, conduciendo a la recomendación de que la sangre recogida por cardiocentesis se utilice para estudios enzimáticos. La actividad plasmática de la LDH también se inculca por los niveles de alimentación y de actividad, por lo que inanición e inactividad generan valores bajos de LDH. También se ha demostrado que la actividad de LDH plasmática está positivamente correlacionada con la temperatura del agua y el pH.

Los pigmentos biliares en la mayoría de los peces incluyen bilirrubina y biliverdina; sin embargo, los porcentajes de estos pigmentos varían entre las especies. El suero usualmente es un color amarillo claro debido a la presencia de bilirrubina. La enfermedad hepática en peces puede no generar un aumento en las concentraciones de bilirrubina plasmática.

La concentración plasmática de glucosa en peces es variable. La fuente de glucosa plasmática en peces es el metabolismo hepático de glucógeno; por lo tanto, el agotamiento de las reservas

hepáticas de glucógeno puede dar lugar a hipoglucemia. La concentración plasmática de glucosa en peces depende en gran medida de su nivel de actividad. A mayores actividades se observarán mayores concentraciones de glucosa. La concentración plasmática de glucosa también varía con la edad, el estado nutricional y reproductivo y el estrés. La duración y la magnitud de la hiperglucemia postprandial en peces dependen de la ingesta de carbohidratos en la dieta. El efecto de la inanición sobre la concentración de glucosa plasmática depende de la especie y del tiempo, ya que muchas especies de peces presentan concentraciones normales de glucosa en sangre (hasta 150 días) después de una prolongada inanición. La variación en la concentración de glucosa en la sangre también se produce con el estado reproductivo de pez, pudiendo ser más bajos en machos que en hembras en el período de desove.

La hiperglucemia inducida por el estrés es una ocurrencia frecuente en salmónidos y la extensión y la duración depende de la gravedad del estrés. La hiperglucemia plasmática asociada con una marcada glicogenólisis en el hígado y el músculo es probablemente debido al aumento inducido por el estrés en las catecolaminas.

No se sabe si los cambios en la concentración plasmática de colesterol tienen significación significativa con respecto a la concentración hepática enfermedad. La mayoría de los peces, tienen concentraciones más altas de colesterol en la sangre que los mamíferos. La mayoría del colesterol en la sangre (60-90%) de peces es transportado por lipoproteínas de alta densidad (HDL). Los varones sometidos a espermatogénesis activa tienen valores más altos de colesterol en comparación con los machos inactivos. Las hembras tienen concentraciones más bajas de colesterol en la sangre en comparación con los machos.

Los triglicéridos son lípidos sintetizados en el hígado, formados por glicerol y ácidos grasos, constituyen una de las principales forma de almacenamiento de energía de los peces. Las concentraciones de triglicéridos plasmáticos se elevan después de la alimentación en salmónidos, ya que los lípidos son absorbidos por el intestino y transportados al hígado para su posterior procesamiento. Los triglicéridos son un índice útil de la condición nutricional de los peces, estando su disminución asociada a estados de ayuno prolongado y de carencia nutricional.

Las proteínas totales representan las albúminas y las globulinas. La disminución de las concentraciones de proteínas totales se asocia a bajo aporte de proteína en la dieta por ayuno prolongado. El aumento de las concentraciones de proteínas totales puede darse por estado de deshidratación, con aumento principalmente de las albúminas o por el aumento de las globulinas, en casos de estimulación antigénica con producción de anticuerpos, como es en algunos procesos inflamatorios/infecciosos.

## **BIBLIOGRAFÍA**

Thrall MA, Baker DC, Campbell TW, DeNicolla D, Fettman MJ, Lassen ED, Rebar A, Weiser G. 2012. *Veterinary Hematology and Clinical Chemistry*. Lippincott Williams & Wilkins, USA, Pp 776.

Herrera E. 2004. Perfil metabólico de Salmón Atlántico *Salmo salar* y Trucha Arcoiris *Oncorhynchus mykiss* de tres pisciculturas en fase de agua dulce en el sur de Chile. *Memoria de título*, Escuela de Medicina Veterinaria, Universidad Austral de Chile, Valdivia, Chile.

Kaneko JJ, Harvey JW, Bruss ML. 2008. *Clinical Biochemistry of Domestic Animals*. 6ª ed. Academic Press, USA, Pp 928.

## CAPÍTULO VII

### TÉCNICAS EN GASOMETRÍA SANGUÍNEA

Los parámetros asociados al estatus ácido-base y gases sanguíneos necesitan ser medidos inmediatamente luego de colectada la muestra, o al menos a la brevedad, lo cual genera un inconveniente a la hora de requerir dichos análisis. Sin embargo, dado al avance en instrumentos analíticos, se han desarrollado dispositivos portátiles capaces de evaluar con precisión una variedad de parámetros sanguíneos relevantes; incluyendo gases sanguíneos y el estado ácido-base, permitiendo hacer mediciones en terreno y en un corto tiempo.

pH, presión parcial de O<sub>2</sub> (pO<sub>2</sub>), presión parcial de CO<sub>2</sub> (pCO<sub>2</sub>), saturación de O<sub>2</sub> (O<sub>2</sub>Sat), CO<sub>2</sub> total (TCO<sub>2</sub>), bicarbonato (HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>), iones Na<sup>+</sup>, Cl<sup>-</sup>, K<sup>+</sup>, iCa, y hemoglobina, son los parámetros comúnmente determinados, sin embargo, no todos son aplicables en peces.

El volumen mínimo necesario de muestra deben ser 125 µL sangre (entera fresca arterial o venosa) la cual debe ser tomada en una jeringa heparinizada hasta la capacidad correspondiente ya que llenado incompleto podría menoscabar algunos resultados.

#### Metodología para gasometría sanguínea

Para la medición de los parámetros antes mencionados es necesario el uso de un aparato específico denominado gasómetro. El gasómetro consta de tres electrodos principales: electrodo de pH, electrodo de CO<sub>2</sub> y electrodo de O<sub>2</sub>, mediante los cuales utiliza técnicas de medición potenciométricas, amperométricas y conductimétricas para medir la concentración del analito en sangre entera, como se describe en la siguiente tabla 3

**Tabla 3.** Técnicas de medición en analizadores de gases sanguíneos y pH

Sensor	Técnica de medición
pH, pCO <sub>2</sub>	Medición potenciométrica, basada en los principios del electrodo MacInnes y Dole (para pH) y Severinghaus y Bradley (para pCO <sub>2</sub> )
pO <sub>2</sub>	Medición amperométrica basada en los principios del electrodo Clark
Hematocrito	Medición conductimétrica

Las mediciones potenciométricas generan una tensión relacionada con la concentración de iones según la ecuación de Nernst:

$$E=E^{\circ} + S \log (C1/C2).$$

Los sensores amperométricos generan una corriente relacionada con la concentración del analito según la relación:

$$i = S(C) + B.$$

Además, los equipos pueden calcular otros parámetros tomando como base los valores medidos de una muestra sanguínea, tales como:

- Bicarbonato ( $\text{HCO}_3^-$ )
- Dióxido de Carbono total ( $\text{TCO}_2$ )
- Exceso de base

Todos estos, se calculan basándose en dos fórmulas; de Severinghaus/NCCLS o de Siggaard-Andersen.

La gran limitación con el análisis de estos parámetros sanguíneos en peces son las diferencias con respecto al humano u otro animal homeotermo, tales como un fuerte efecto Bohr / Haldane o incluso un efecto Root (es el caso de *O. mykiss*), que responden a los cambios en los gases en sangre y el estado ácido-base, dificultando su explicación por algoritmos diseñados para la sangre humana. A pesar de estas limitaciones, Stoot et al (2014) identificaron 27 estudios en la última década que han utilizado el sistema i-STAT para medir los parámetros sanguíneos en varias especies de elasmobranchios y teleosteos y en una variedad de condiciones ambientales y fisiológicas

Estas obedecen a 3 condiciones:

- Temperatura de funcionamiento de los equipos en terreno, ya que esta oscila entre 12 a 30°C y muchas veces este puede ser un problema en épocas invernales.
- Temperatura de medición, es decir, considerar la temperatura del agua antes de analizar la muestra para que mida gases sanguíneos corregidos a dicha temperatura.
- Errores pre analíticos

En este sentido, hay que tener en cuenta varias consideraciones: el tipo de jeringa utilizada, la proporción correcta del anticoagulante, la contaminación por introducción de aire, la posible hemólisis de la muestra, la homogeneización y la purga adecuada de la muestra y el procesamiento de esta lo antes posible tras la extracción para evitar alteraciones.

## CAPÍTULO VIII

### INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS DE GASOMETRÍA

La interpretación de los gases sanguíneos es en ocasiones difícil. Los resultados que suministra el laboratorio deben ser siempre estudiados a la luz de los antecedentes, mediante un enfoque sistemático para cada uno de los valores.

La determinación o medición de gases sanguíneos, arteriales o venosos, provee fundamentalmente tres valores de medición directa mediante los respectivos electrodos, como se mencionó anteriormente:

1. Presión parcial (o tensión) del oxígeno disuelto en el plasma, PaO<sub>2</sub>.
2. Presión parcial (o tensión) del bióxido de carbono disuelto en el plasma, PaCO<sub>2</sub>.
3. El grado de acidez o alcalinidad del plasma, lo cual se expresa por el logaritmo inverso de la concentración de iones H<sup>+</sup>, el pH.

De los resultados anteriores se pueden derivar los siguientes valores:

4. CO<sub>2</sub> total.
5. Bicarbonato.
6. Base exceso.

**PaCO<sub>2</sub>:** La PaCO<sub>2</sub> es una medida de la eficacia de la ventilación, un indicador de la efectividad de la eliminación o excreción del dióxido de carbono, el factor de intensidad del CO<sub>2</sub> disuelto en el plasma. También es un indicador de la cantidad de ácido carbónico presente en el plasma, el cual depende directamente de la intensidad de la presión parcial del CO<sub>2</sub>.

Por consiguiente, la PaCO<sub>2</sub> que es un parámetro de ventilación, también es un reflejo del componente respiratorio del equilibrio ácido-base.

- Cuando la PaCO<sub>2</sub> esté anormalmente elevada, habrá un exceso de ácido carbónico en el plasma, o sea que existirá una acidosis respiratoria
- Cuando la PaCO<sub>2</sub> esté anormalmente baja habrá un déficit de ácido carbónico en el plasma, o sea que existirá una alcalosis respiratoria

**PaO<sub>2</sub>:** La PaO<sub>2</sub> es el índice de oxigenación de la sangre, un indicador de la intensidad de la presencia del oxígeno molecular en solución en el plasma; es la expresión de la eficiencia de la ventilación/perfusión branquial y de la difusión para lograr la normal transferencia del oxígeno desde el interior de la laminilla hasta la sangre capilar branquial.

**pH:** El pH se expresa a través de la ecuación de Henderson-Hasselbalch que define el pH en términos de la relación entre la sal y el ácido, o sea que el pH del líquido extracelular depende de la relación entre la cantidad de bicarbonato base y la cantidad de ácido carbónico:

$$\text{pH} = \text{pK} + \log \frac{\text{HCO}_3^-}{\text{H}_2\text{CO}_3}$$

El pH es una manera de expresar intensidad de acidez, aunque es realmente un indicador más importante de la severidad y de la magnitud de una alteración ácido-base que la PCO<sub>2</sub> o el bicarbonato, es menos específico que cualquiera de estas dos determinaciones. En efecto, el pH varía de acuerdo con la relación HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>/ H<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, sin embargo, podemos establecer la siguiente definición:

pH elevado significa SIEMPRE alcalosis

pH bajo significa SIEMPRE acidosis

Pero el pH, que de por sí indica si hay una acidosis o una alcalosis, así como la magnitud de la alteración, no permite diferenciar si se trata de una acidosis respiratoria o metabólica, o de una alcalosis respiratoria o metabólica.

**Bicarbonato:** El bicarbonato es el componente metabólico del equilibrio ácido-base (numerador en la ecuación de H-H, el compuesto químico que contiene casi la totalidad del CO<sub>2</sub> del organismo. En tanto que la PCO<sub>2</sub> es el factor de intensidad (que determina la cantidad de ácido carbónico, la cual es mínima frente a la cantidad de bicarbonato), el bicarbonato es el factor de cantidad de CO<sub>2</sub>. La PCO<sub>2</sub> se refiere a CO<sub>2</sub> en solución, a CO<sub>2</sub> molecular disuelto en el plasma; el bicarbonato se refiere a CO<sub>2</sub> en forma combinada.

El bicarbonato es una base porque liga iones H<sup>+</sup>, y es la base más importante de que dispone el organismo para el sistema de amortiguación (“buffer”) que mantiene el pH en valores normales, o sea para el mantenimiento del equilibrio ácido-base. A pesar de que existen en el organismo diversos sistemas “buffer”, el pH es controlado por sólo uno de ellos, la relación bicarbonato/ácido carbónico.

Evaluando estos datos en conjunto, podremos evaluar el equilibrio ácido-base y definir el tipo de trastornos:

1. Trastornos simples
2. Trastornos mixtos

Las alteraciones ácido base tienen una etiología metabólica o respiratoria. El uso del contenido del CO<sub>2</sub> del suero que, como se ha visto, incluye bicarbonato, ácido carbónico y CO<sub>2</sub> en solución, permitiendo establecer una aproximación al respecto. Sin embargo, el contenido de CO<sub>2</sub> del suero de por sí es, en general, un indicador inadecuado del equilibrio ácido-base, puesto que esta prueba es sólo un reflejo del bicarbonato sérico, siendo que el CO<sub>2</sub> en solución y el ácido carbónico contribuyen no más de unos pocos mili moles. Por consiguiente, en la fase aguda puede existir una franca acidosis o alcalosis respiratoria sin que se observe una alteración en el contenido de CO<sub>2</sub> del plasma: para detectarlas es necesario tomar una muestra fresca de sangre arterial para determinar el pH y la PaCO<sub>2</sub>. En la práctica se pueden presentar complejas situaciones de tipo respiratorio y/o metabólico y los valores de los gases sanguíneos pueden significar fenómenos de compensación ante la alteración primaria, o bien pueden representar dos más alteraciones primarias coexistentes.

- Acidosis respiratoria: PCO<sub>2</sub> elevado, bicarbonato normal o ligeramente aumentado, con pH ácido
- Acidosis metabólica: bicarbonato disminuido, PCO<sub>2</sub> disminuido y pH ácido
- Alcaemia respiratoria: bicarbonato marcadamente disminuido, PCO<sub>2</sub> disminuido y pH alcalino
- Alcaemia metabólica: bicarbonato marcadamente elevado, PCO<sub>2</sub> elevado y pH alcalino

## **BIBLIOGRAFÍA**

Brauner C, D Randall. 1998. The linkage between oxygen and carbón dioxide transport. In SF Perry II, BL Tufts, eds, Fish Physiology, Vol. XVII: Fish Respiration. Academic Press, San diego, pp 283-320.

Cadwell S, J Rummer, C Brauner. 2006. Blood samplig techniques and storage duration: efectos on the presence and magnitude of the red blood cell B-adrenergic response in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Com Biochem Physiol a Mol Inegr Physiol* 162, 94-100.

Gallagher A, L Frick, P Bushnell, R Brill, J Mandelman. 2010. Blood gas, oxygen saturation, pH, and lactate values in elasmobranch blood measured with a commercially available portable clinical analyzer and standard laboratory instruments. *J Aquat Anim Health* 22, 229-234

Harter T, R Shartau, C Brauner, A Farrell. 2014. Validation of the i\_STAT system for the analysis of blood parameters in fish. *C Physiology* 2, 1-12.

Manual del Usuario IRMA TRUpoint®. 2006. International Technidyne Corporation (ITC), versión 6.1, USA.

## CAPÍTULO IX

### DETERMINACIÓN DE HORMONAS

El estudio de la endocrinología en los peces ha tenido un impacto significativo en la comprensión general de los roles funcionales y evolución de una variedad de mensajeros neuroquímicos y sistemas. En los últimos cincuenta años, los neuroendocrinólogos han documentado un número complejo y aparentemente infinito de interacciones entre las hormonas y las estructuras nerviosas. Poco a poco surge de este conocimiento una comprensión de las vías neurohormonales específicas y de los mensajeros responsables de mantener la homeostasis en un medio acuático y de regular los sistemas funcionales, tales como el desarrollo, crecimiento y reproducción.

Con estos conocimientos, la medición de la concentración de distintas hormonas, son una herramienta rápida y útil en procesos claves en la industria acuícola, tales como la esmoltificación, respuesta al estrés, crecimiento, desove, entre otras.

**La** medición de hormonas se puede realizar en plasma o suero, para eso se necesita una muestra colectada en tubos sin anticoagulante (tapa roja) o tubos con heparina lítica (tapa verde). El volumen mínimo de plasma o suero es de 200  $\mu\text{L}$ , el cual debe ser separado antes de 12 hrs de la sangre, idealmente. La muestra puede ser mantenida a  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta su posterior análisis

### Metodología para endocrinología sanguínea

Existen diversas formas para medir hormonas: químicos, espectrofotométricos, cromatográficos, sin embargo, los métodos más utilizados son las técnicas inmunoquímicas o inmunoensayos. Estos consisten en una reacción inmunológica en la que un anticuerpo específico (AC) se une a un antígeno y un antígeno marcado. Para estos efectos, existen diversos métodos con una adecuada precisión y exactitud, dentro de los cuales están:

1. Radioinmunoanálisis (RIA): Se basa en una reacción antígeno – anticuerpo en donde se utilizan isótopos radioactivos como marca y la concentración de radioactividad medida indica la concentración de analito presente. Aunque en la actualidad se sigue utilizando, particularmente para la detección de cantidades muy bajas de analitos, debido a las complicaciones inherentes a manipulación y desecho de los materiales radioactivos en el laboratorio clínico, es una técnica que viene en desuso.
2. Inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA): Es un método que permite determinar la concentración de un Ag o Ac como el RIA y siguiendo un protocolo experimental similar, pero en este caso, el marcaje se hace con una enzima en vez de un isótopo radiactivo.
3. Electroquimioluminiscencia (ECL): El proceso de ECL consta de una inmunorreacción convencional (competitiva o sandwich) donde el Ag o Ac es incubado con la muestra y el marcador (rutenio) unido a Ag o Ac. El inmunocomplejo formado es capturado y luego detectado por partículas magnéticas las cuales permiten separar la fracción unida de la libre mediante un magneto ubicado debajo de un electrodo. El inmunocomplejo queda retenido en la superficie del electrodo. En donde se genera la señal de ECL al aplicar un voltaje al electrodo

en el que se generan especies reactivas a partir de un marcador como el rutenio, que pasa a un estado excitado, inestable y luego decae a su estado basal mediante una reacción quimioluminiscente.

### **Perfiles hormonales en peces salmónidos**

A diferencia de los perfiles bioquímicos, el uso de perfiles hormonales en peces aún está poco estudiado, sin embargo, existe consenso en la importancia del sistema neuroendocrino como regulador de distintos procesos fisiológicos, por ende, estos perfiles debiesen ir orientados a la evaluación de dichos procesos, tales como:

1. Osmorregulación
2. Estrés
3. Reproducción

### **Osmorregulación**

El sistema osmorregulador de peces teleósteos está controlado por el sistema endocrino a través de una amplia diversidad de hormonas, tanto hipofisarias (prolactina, hormona del crecimiento, tiroideas, etc.) como extrahipofisarias (arginina vasotocina, urotensinas, estañocalcina, etc.). De esta forma, la adaptación de los peces frente a cambios en la salinidad ambiental produce la activación de los diversos factores que intervienen en los procesos de secreción y/o absorción de iones y agua, así como su control por parte de diversas hormonas a través de sus receptores específicos, desencadenando las rutas celulares necesarias para integrar la acción fisiológica contenida en ellas.

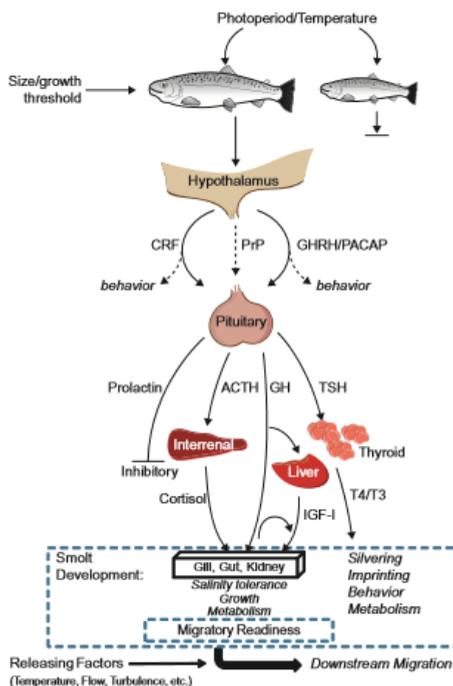
Las hormonas osmorregulatorias envueltas en este proceso adaptativo pueden ser divididas en dos grupos:

- Hormonas de acción rápida y corta que regulan la actividad de las proteínas transportadoras pre-existentes: ANP, angiotensina II, guanylin, etc.
- Hormonas de acción lenta y larga que actúan sobre los genes de las proteínas osmorreguladoras para regular su síntesis. Aquí se incluyen la prolactina y cortisol para la adaptación en agua dulce y GH/IGF-I, hormonas tiroideas y cortisol para la adaptación en agua de mar.

Estas hormonas de acción lenta y larga son las que finalmente representan mayor utilidad clínica, ya que es posible encontrarlas en el plasma de peces y su determinación permite evaluar la adaptación a los cambios osmóticos que ocurren específicamente en la esmoltificación y la respuesta fisiológica asociada a la misma. De este modo, el uso de estos marcadores neuroendocrinos como herramienta de medición para evaluar el progreso de la esmoltificación es válido y se pueden complementar con otros marcadores de uso común, tales como, la medición de electrolitos plasmáticos, la actividad de la bomba Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> ATPasa e inmunohistoquímica.

La esmoltificación ha sido descrita como un estado pan-hiperendocrino donde muchas hormonas que tienen acciones fisiológicas distintas se incrementan durante este proceso y no necesariamente al mismo tiempo o con la misma intensidad, como muestra la **figura 5**. Esta

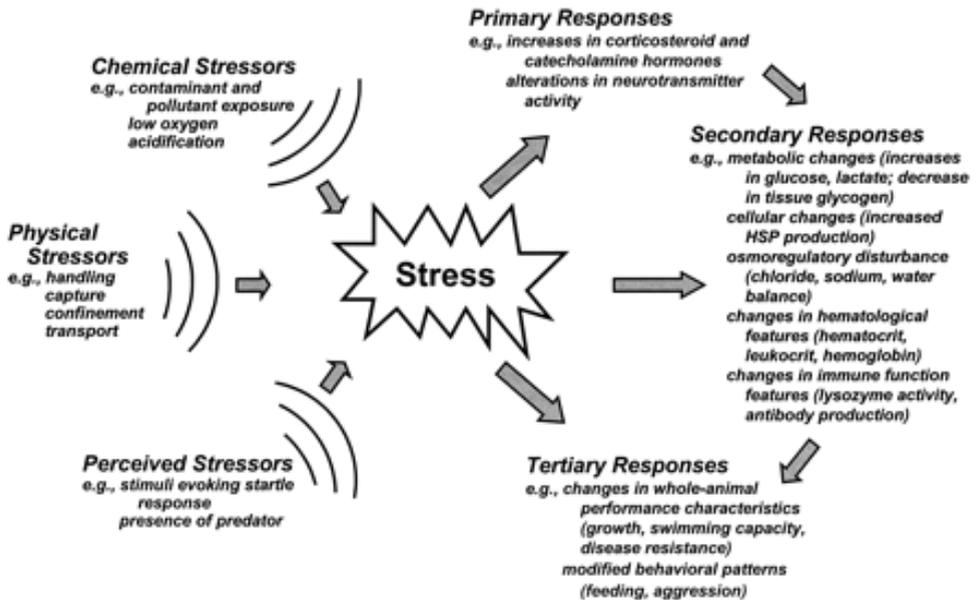
flexibilidad puede ser relevante a la hora de evaluar los cambios en distintos momentos, como es el cambio a agua de mar.



**Figura 5.** Esquema del control neuroendocrino en el desarrollo de smolt.

### Respuesta al estrés

En el último tiempo la industria acuícola ha incorporado el concepto de bienestar animal, tal cual sucede en otras producciones intensivas de animales, esto debido a la relación existente entre situaciones de estrés y el efecto que genera en el sistema inmune en peces de cultivo, aumentando las tasas de infección por patógenos. Fisiológicamente la respuesta al estrés en los peces ha sido agrupada como primaria y secundaria (**Figura 6**). La primaria, asociada a la liberación de catecolaminas y cortisol y la respuesta secundaria incluye cambios metabólicos, hematológicos, balance hidromineral, proteínas de choque térmico o estrés (HSPs) y afecta la función inmune y respuesta celular. Adicionalmente se describe una respuesta terciaria, la cual hace referencia a aquellos aspectos asociados a la performance animales, tales como, tasa de crecimiento, condición corporal, resistencia a enfermedades y finalmente sobrevivencia.



**Figura 6.** Eventos estresantes y respuesta al estrés en peces.

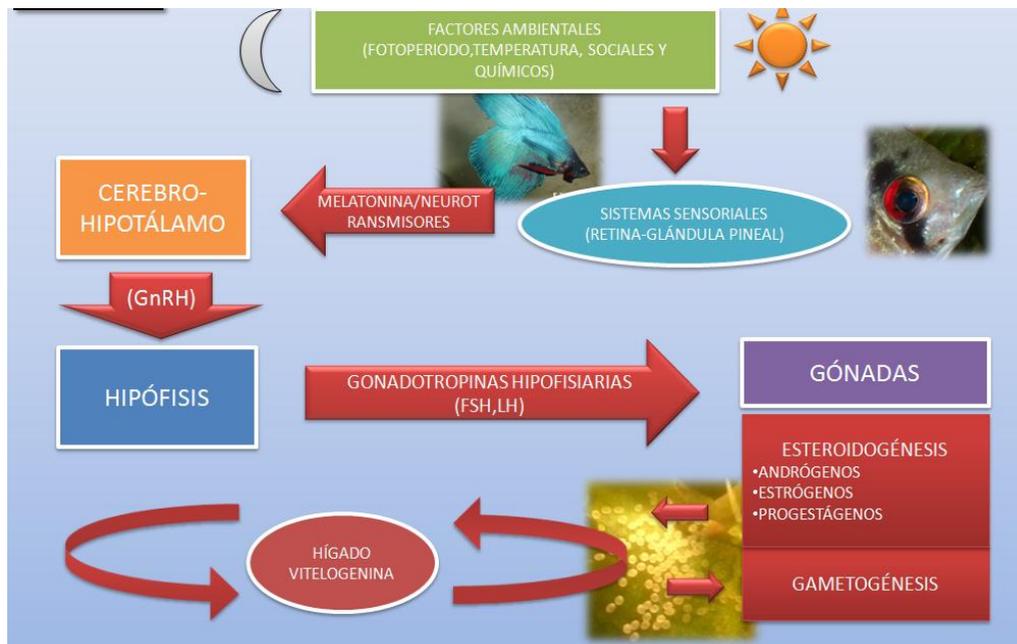
Otra hormona involucrada en los mecanismos que generan respuesta al estrés es la adrenocortitropa. Cuando se percibe un agente estresante, las señales neuronales (visuales, auditivas y sensoriales) activan el hipotálamo e inician una activación descendente de las fibras simpáticas que a su vez estimulan las células cromafines del riñón principal para liberar las catecolaminas adrenalina y noradrenalina en el torrente sanguíneo. Estas catecolaminas preparan al animal para combatir o huir aumentando la gluconeogénesis y la glucogenólisis, la degradación lipídica, etc. En segundo lugar, el eje hipotálamo-glándula pituitaria-glándula interrenal (HPI) (el equivalente del eje hipotálamo-glándula hipófisis-suprarrenal en mamíferos) se activa, liberando factores vinculados a la producción de hormona adrenocorticotrópica (ACTH) que es liberada al torrente sanguíneo induciendo la síntesis y liberación de cortisol.

Con estos antecedentes, la respuesta endocrina al estrés puede ser evaluada principalmente a través de la medición de concentraciones de cortisol y otros parámetros bioquímicos como lactato y glucosa.

## Reproducción

La reproducción en las hembras está controlada por el eje hipotálamo-pituitaria-ovario. Este mecanismo secuencial permite la intervención en varios niveles para promover o interferir en el proceso de maduración, en el cual las hormonas tienen un papel fundamental (**Figura 7**)

En peces, al igual que en otros vertebrados no mamíferos, la gran sensibilidad al medio ambiente ejerce un importante control sobre la reproducción, modulando a través de la integración de los sistemas sensoriales la secreción de hormonas liberadoras hipotalámicas. El mecanismo de secreción de esteroides es un complejo sistema que involucra la percepción de estímulos ambientales, conexiones neuronales y órganos endocrinos, el cual de manera general está compuesto por órganos de los sentidos, glándula pineal, hipotálamo e hipófisis, esta última es la encargada de secretar hormonas estimuladoras de tejidos sintetizadores de esteroides.



**Figura 7.** Eje reproductivo en peces

Ante la llegada del estímulo de GnRH, la hipófisis secreta LH y FSH liberándolas a la circulación plasmática y actuando sobre todo a nivel gonadal, donde se une específicamente a los receptores de membrana de las células foliculares (estrógenos y progestágenos), células de Leydig (productoras de testosterona) y Sertoli (productora de espermatozoides).

No obstante, al igual que ocurre con el resto de organismos superiores, la FSH permanece constante a lo largo de todo el ciclo reproductivo, se asocia al crecimiento de las estructuras germinales junto con la incorporación de la vitelogenina producida en el hígado, incrementándose en la ovogénesis y espermatogénesis y posteriormente a estas fases, a diferencia que la LH, la cual experimenta un pico muy significativo en el momento de la maduración final, ovulación o espermiogénesis y espermiación en machos.

En el caso de estrógenos y progestágenos, están asociados a la maduración e oocitos, aumentando gradualmente en las etapas finales de oocitos y folículos al llegar a la ovulación, teniendo poco efecto después de la maduración.

## **BIBLIOGRAFÍA**

Bruce A. 2002. I Stress in Fishes: A Diversity of Responses with Particular Reference to Changes in Circulating Corticosteroids. *Integrative and Comparative Biology*, Volume 42, Issue 3, 517–525.

Fregeneda-Grandes J, S Hernandez-Navarro, I Fernandez-Coppe, A Correa-Guimaraes, N Ruíz-Potosme, L Navas- Gracia, M Aller-Gancedo, F Martín-Gil, J Martín-Gil. 2013. Seasonal and sex related variations in serum steroid hormone leves in wild and farmed Brown trout *Salmo trutta* L. in the north-west of Spain. *J water and health* 11, 720-728.

Mancera J, S D.Mc Cormick. 2007. Role of Prolactin, Growth Hormone, Insulin-like Growth Factor I and Cortisol in Teleost Osmoregulation In: *Fish Osmoregulation*. Ed. B.G. Kapoor, Science Publishers. Pp 497-515.

McCornick S, M O’Dea, A Moeckel, B Thrandur. 2003. Endocrine and physiological changes in Atlantic salmon smolts following hatchery reléase. *Aquaculture* 222, 45-57.

Subhash M. 2011. The role of thyroid hormones in stress response of fish. *Gen Comp Endocrinol* 172, 198-210.

## CAPÍTULO X

### INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS DE HORMONAS

#### **Hormona del crecimiento/Factor I de crecimiento tipo insulina (GH/IGF-I)**

Ambas son de importancia central en el proceso de esmoltificación. El fotoperíodo es el mayor regulador del incremento de GH, por tanto, esta fuerte asociación permite posicionar el incremento en los niveles de GH como un buen indicador de esmoltificación.

El IGF-I plasmático también se incrementa durante la esmoltificación, permitiendo que los peces aumenten su tolerancia a la salinidad.

Los niveles de GH plasmático de smolts aumentan en FW y posterior a la entrada inicial en SW, pero a largo plazo (después de varias semanas) en SW, estos niveles son relativamente bajos. Los aumentos iniciales en los niveles plasmáticos de GH pueden deberse a las demandas metabólicas de la migración y a la respuesta a la exposición a SW.

Otra interpretación útil es en individuos en crecimiento, debido a que los niveles de GH plasmático son bajos y el IGF-I alto en animales en rápido crecimiento, los niveles muy bajos de GH plasmático y muy altos de IGF-I en SW probablemente reflejan la alta tasa de crecimiento de post-smolts.

#### **Prolactina (PRL)**

La PRL es considerada una hormona promotora a la adaptación a ambientes hipoosmóticos, previniendo tanto la pérdida de iones como la absorción de agua. Esta hormona estimula la secreción de mucus, incrementando el tamaño de esta capa y reduciendo el tránsito de iones y de agua a través de ella, es decir, el mucus actúa como barrera para evitar la pérdida de iones además de ser una barrera inmunológica.

La prolactina también inhibe algunos de los mecanismos asociados con aumentos en la secreción de sal, como es la liberación de GH (hormona de crecimiento), cortisol y niveles de la actividad de la bomba Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPasa (NKA), e incluso la transcripción de la sub-unidad NKA "1b" que está asociada con la aclimatación a agua salada

Los niveles de prolactina plasmática se reducen fuertemente después de la exposición a SW, promoviendo la captación de iones e inhibiendo la secreción de sales.

Entonces, se observa en concentraciones elevadas en plasma de smolt en desarrollo en FW decreciendo a medida que se acerca a la esmoltificación con su peak después de la exposición en SW

#### **Hormonas tiroideas**

La hormona estimulante del tiroides (TSH) es sintetizada por las células tirotropas de la hipófisis y vía torrente sanguíneo, alcanza los folículos tiroideos donde estimula la síntesis y liberación de las dos hormonas tiroideas: la tiroxina (T4) y la 3,5,3-triyodotironina (T3 )

La función de las hormonas tiroideas presentan acciones: i) morfológicas y madurativas (crecimiento y diferenciación), y ii) metabólicas (metabolismo de carbohidratos, lípidos, nitrógeno, etc.).

En salmónidos el sistema tiroideo es importante durante el proceso de esmoltificación, que le permite al animal migrar hacia el agua de mar. Así, se observa un incremento plasmático de T4 en el proceso de esmoltificación, probablemente con el objetivo de incrementar la actividad

Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPásica y el número de células de cloruro. Además, se ha observado una interacción entre T3 y GH o cortisol, esto relacionado a la capacidad de la hormona T3 para aumentar el número de receptores de cortisol en las branquias.

### **Cortisol**

Los niveles plasmáticos de cortisol permanecen bajos y constantes en salmones parr en primavera, pero aumentan 10 veces en los smolts mantenidos en las mismas condiciones. De manera similar, el cortisol plasmático aumenta durante la esmoltificación. Todavía hay una comprensión incompleta de los factores que regulan el eje hipotalámico-hipófisis-interrenal durante la esmoltificación, pero existe una importante interacción entre el eje GH-IGF-I y el cortisol que subyace en el desarrollo de la capacidad hipoosmorreguladora de los smolts. Además el cortisol, considerado como el producto final del eje HHI, puede actuar en teleósteos como mineralcorticoide y glucocorticoide. Su actividad como mineralocorticoide es la responsable de la aclimatación a los cambios de salinidad. En cambio, la actividad como glucocorticoide es la responsable del incremento de los niveles plasmáticos de glucosa, lactato y otros metabolitos que sirven de fuente energética para los diferentes órganos del animal. En la mayoría de los estudios, el cortisol es la hormona que se utiliza para cuantificar los niveles de estrés en situaciones experimentales, aumentando en situaciones de estrés tales como; captura, alta densidad, manipulación, ejercicio intenso, incorporación de tóxicos, cambios en la salinidad, pH, temperatura, e incluso la esmoltificación, ya que este incremento está influenciando de manera directa por la migración de los peces al mar.

### **Hormona Adrenocortitropa (ACTH)**

La ACTH es secretada rápidamente en respuesta al estrés, apareciendo en pocos minutos los niveles más altos en la sangre, siendo probable que las mayores concentraciones de cortisol se encuentren relacionadas con los mayores niveles de ACTH.

### **Estradiol y Progesterona**

La acción fisiológica del 17 $\beta$ -estradiol es inducir la biosíntesis y secreción hepática de vitelogenina, la cual es liberada en la sangre y transportada hasta el ovario, en donde cumple un rol primordial durante la etapa de vitelogénesis. Su aumento en sangre en hembras se asocia al crecimiento e inicio de la maduración oocitaria, la cual declina luego de completarse la vitelogenesis y antes de la maduración final y ovulación. Respuesta al estrés asociada a cortisol, también puede influir en las concentraciones de estradiol, disminuyendo sus niveles plasmáticos en hembras vitelogénicas.

A diferencia del estradiol, la concentración plasmática de la progesterona se incrementa hacia la maduración final y ovulación, coincidiendo con la disminución de la concentración de estrógeno

### **LH y FSH**

El estrés agudo puede aumentar las concentraciones plasmáticas de LH pero no de FSH, lo que ya constituye un bloqueo para GnRH.

Al finalizar la vitelogénesis, incrementan los niveles plasmáticos de LH que produce un marcado aumento de los niveles plasmáticos del esteroide inductor de la maduración (MIS) que actúa a nivel de la membrana del oocito induciendo su maduración final (FOM).

En forma similar a lo ocurrido en hembras, un incremento en los niveles plasmáticos de LH al comienzo de la estación de desoves causa un aumento en la esteroidogénesis a nivel testicular. La LH y el MIS inducen un incremento en los niveles de semen producidos a través de la estimulación de la producción del plasma seminal, y el MIS estimula la capacidad de movimiento del espermatozoide a través de un ascenso del pH en el plasma seminal

## **BIBLIOGRAFÍA**

Mancera J, S D.Mc Cormick. 2007. Role of Prolactin, Growth Hormone, Insulin-like Growth Factor I and Cortisol in Teleost Osmoregulation In: Fish Osmoregulation. Ed. B.G. Kapoor, Science Publishers. Pp 497-515.

McCornick S, M O´Dea, A Moeckel, B Thrandur. 2003. Endocrine and physiological changes in Atlantic salmon smolts following hatchery release. *Aquaculture* 222, 45-57.

Subhash M. 2011. The role of thyroid hormones in stress response of fish. *Gen Comp Endocrinol* 172, 198-210.

Valdevenito I. 2005. Terapias hormonales utilizadas en el control artificial de la madurez sexual en peces de cultivo: una revisión. *Arch. Med. Vet.* 40 (2), 115-123.

McCormick S. 2013. Smolt Physiology and Endocrinology. In: *Fish Physiology, Eurhaline fishes*, 1st ed, Academic Press, Elsevier Inc. Pp199-251.

## CAPÍTULO XI

### INTERVALOS DE REFERENCIA

Intervalos de referencia consolidados entre UACH y Pathovet de hematología y bioquímica clínica, bien como los intervalos para gasometría sanguínea y hormonas en smolt, post-smolt y reproductores de las tres especies de salmónidos cultivadas en Chile.

**Tabla 4.** Intervalos de referencia de gases sanguíneos para las tres especies salmónidas

Parámetro	Unidad	Trucha arcoiris			Salmón del Atlántico			Salmón Coho		
		Pre smolt-smolt	Post smolt	Reproductor	Pre smolt-smolt	Post smolt-Adulto	Reproductor	Smolt	Post smolt	Reproductor
pH		7,03 - 7,45		7,21 - 7,54	7,13 - 7,46	7,02 - 7,56	7,24 - 7,64		7,28 - 7,54	7,17 - 7,47
pCO <sub>2</sub>	mmHg	14,0 - 24,8		12,0 - 29,8	11,6 - 29,5	11,7 - 20,6	11,2 - 21,9		7,8 - 17,1	16,0 - 25,8
HCO <sub>3</sub>	mmol/L	4,9 - 14,2		8,4 - 21,4	8,7 - 14,4	6,7 - 10,5	8,3 - 13,6		5,3 - 9,8	12,6 - 16,7
TCO <sub>2</sub>	mmol/L	5,3 - 14,9		9,1 - 23,2	9,5 - 15,1	7,9 - 11,6	8,8 - 14,3		5,6 - 10,3	14,0 - 18,3
Beb	mmol/L	24,3 - 9,7		18,8 - 6,5	20,4 - 9,8	26 - 15,6	18,4 - 9,4		21,8 - 14,5	11,6 - 18,8
BEef	mmol/L	26,2 - 10,3		20,4 - 6,5	20,3 - 10,2	28,2 - 17,0	18,3 - 8,4		21,0 - 13,8	12,1 - 19,1

**Tabla 5.** Intervalos de referencia de parámetros hormonales para las tres especies salmónidas.

Parámetro	Unidad	Trucha Arcoiris			Salmón del Atlántico			Salmón Coho		
		Pre smolt-smolt	Post smolt-Adulto	Reproductor	Pre smolt-smolt	Post smolt-Adulto	Reproductor	Pre smolt-smolt	Post smolt-Adulto	Reproductor
Cortisol	ng/mL	8,1 - 98,2	7,0 - 116,6	8,4 - 411,4	2,2 - 102,4	0,4 - 212,6	9,2 - 241,5	37,9 - 162,3	0,8 - 232,6	18,0 - 379,7
TSH	μLU/L	<0,4	*	*	*	<0,02	<0,1	<0,2	<0,1	*
T3	nmol/L	0,7 - 28,5	*	1,8 - 47,8	11,5 - 22,2	24,2 - 62,2	3,3 - 88,8	3,7 - 17,3	1,9 - 22,0	4,9 - 76,5
T4 total	nmol/L	5,2 - 11,2	*	5,8 - 72,5	7,0 - 85,4	5,1 - 24,5	3,6 - 38,7	*	-	*
Testosterona	ng/mL	0,01 - 0,3	*	0,04 - 8,4	*	*	*	<2,0	<1,8	*
Progesterona <sup>a</sup>	ng/mL	-	-	0,04 - 0,4	-	-	<0,3	-	-	0,1 - 1,8
Estradiol	ng/mL	<0,13	*	0,1 - 118	*	*	0,03 - 1,3	*	*	0,1 - 24,5
Prolactina <sup>b</sup>	μLU/L	*	-	*	*	-	<4,9	<12,8	-	*
ACTH	μLU/L	<7,8	*	*	*	*	<2,7	<3,5	*	119,7 - 165,8

TSH: Hormona tiroestimulante; T3: triyodotironina; T4: tiroxina total; ACTH: hormona adrenocorticotrópica; \*: Resultados bajo el límite de detección de la técnica en equipo Cobas®e411.

**Tabla 6.** Intervalos de referencia de parámetros bioquímicos en salmónidos.

Parámetro	Unidad	Trucha arcoiris			Salmón del Atlántico			Salmón Coho		
		Pre smolt-smolt	Post smolt-Adulto	Reproductor	Pre smolt-smolt	Post smolt-Adulto	Reproductor	Pre smolt-smolt	Post smolt-Adulto	Reproductor
Proteínas totales	g/L	21,0 - 52,9	29,2 - 55,4	20,4 - 61,7	24,9 - 68,1	24,6 - 50,3	41,9 - 72,0	14,8 - 43,3	26,8 - 59,1	33,9 - 74,8
Albumina	g/L	7,3 - 18,4	11,7 - 21,2	7,6 - 27,2	9,1 - 26,4	11,1 - 21,5	15,8 - 28,2	10,0 - 17,4	10,4 - 22,6	10,7 - 29,0
Globulinas	g/L	13,2 - 37,6	14,7 - 36,1	12,1 - 45,4	9,0 - 34,2	13,5 - 29,7	26,0 - 45,2	9,1 - 28,3	15,4 - 36,3	18,2 - 45,7
Colesterol	mmol/L	2,6 - 19,1	1,7 - 18,0	2,4 - 21,3	6,5 - 16,6	5,8 - 11,0	6,7 - 19,0	1,4 - 9,0	4,4 - 13,5	2,5 - 18,7
HDL	mmol/L	0,3 - 7,1	0,6 - 4,4	0,1 - 7,6	1,1 - 8,9	0,9 - 8,7	0,3 - 13,3	0,5 - 6,7	0,2 - 8,0	0,1 - 0,6
LDL	mmol/L	0,4 - 12,5	0,6 - 7,2	0,1 - 12,2	1,0 - 6,4	0,5 - 2,9	0,9 - 8,7	0,2 - 4,3	0,6 - 5,4	0,1 - 7,0
Triglicéridos	mmol/L	0,1 - 21,9	1,5 - 9,5	2,4 - 19,8	2,6 - 9,2	1,0 - 5,7	1,5 - 7,3	1,1 - 4,8	1,5 - 8,0	0,9 - 4,7
Lactato	mmol/L	6,5 - 16,8	1,7 - 10,3	1,4 - 15,5	3,4 - 13,3	2,0 - 14,1	1,7 - 6,4	4,4 - 14,6	2,8 - 10,6	2,0 - 10,9
Glucosa	mmol/L	0,2 - 4,1	<10,4	0,3 - 19,6	2,4 - 7,1	1,0 - 6,6	1,2 - 12,5	<10,1	0,5 - 6,2	0,2 - 13,8
BILT	μmol/l	<4,4	<4,1	<5,1	<3,8	<4,5	*	<3,3	<5,2	<4,1
BILD	μmol/l	<3,4	<2,2	<3,2	<2,4	<3,5	*	<3,1	<3,3	<3,1
ALT	U/L	<24	<15	<24	<28	<6	<17	<37	<27	<30
AST	U/L	<621	<338	<877	<759	<632	<665	<470	<627	<775
ALP	U/L	<264	<281	<84	<292	<308	<283	<104	<147	<72
LDH	U/L	<2151	<1956	<1884	<4608	<1335	<3171	<2656	<1660	<766
CK	U/L	<10177	<24122	<17221	<28383	<13334	<26352	<9595	<22799	<8300
CK-MB	U/L	<9100	<7807	<11860	<26206	<11537	<23574	<2097	<22177	<7460
Lipasa	U/L	4,4 - 7,2	3,3 - 7,1	5,4 - 7,2	4,7 - 7,1	4,6 - 6,8	5,0 - 7,8	4,0 - 6,7	4,7 - 6,9	6,9 - 11,0
Amilasa	U/L	<27734	<2403	<1799	<1495	<2781	<1668	<1763	<3324	<2090
Amilasa-P	U/L	<2995	<1057	<1674	<1272	<1963	<1501	<1502	<2661	<2044
Creatinina	μmol/l	<96,5	<55,7	<58,9	<54,8	<58,7	<52,8	<89,2	<17,2	*
Urea	mmol/L	0,8 - 1,5	1,0 - 1,8	0,5 - 1,4	0,7 - 1,8	0,6 - 2,7	0,9 - 2,6	1,3 - 2,3	0,5 - 2,1	0,5 - 0,8
Ácido úrico	μmol/l	<83,7	<36,0	<48,3	<43,3	<23,3	<40,5	<26,9	<44	<77
NH3	mmol/L	<2,2	<2,2	< 2,1	< 2,4	<2,4	< 1,4	< 3,7	< 3,0	<1,3
Calcio	mmol/L	2,30 - 4,93	3,17 - 3,88	1,65 - 7, 38	2,38 - 4,58	2,00 - 4,03	1,85 - 3,73	1,38 - 3,05	1,90 - 4,35	3,00 - 9, 00
iCa	mmol/L	0,7- 1,6	1,2-1,9	0,4-1,7	0,2-0,6	0,6-1,6	0,6-1,2	0,4-1,4	0,2-1,4	0,5-1,4
Magnesio	mmol/L	1,03 - 2,01	1,06 - 2,01	0,66 - 2,75	1,19 - 3,21	0,74 - 3,53	1,11 - 2,88	0,8 - 3,2	0,70 - 2,01	0,82 - 2,01
Hierro	μmol/l	2,3 - 22,4	5,9 - 18,6	5,91 - 26,42	11,60 - 34,67	4,51 - 19,49	2,74 - 31,67	4,85 - 50,81	4,94 - 29,82	2,47 - 20,69
Fósforo	mmol/L	4,83 - 10,27	6,12 - 10,37	1,61 - 9,79	4,35 - 12,20	2,83 - 12,24	3,51 - 12,20	7,21 - 11,98	4,12 - 7,82	3,09 - 6,73
Sodio	mmol/L	153,8 - 183,6	136,6 - 186,8	134,2 - 182,3	114,1 - 188,4	143,9 - 192,2	126,5 - 164,0	148,2 - 168,5	156,5 - 179,0	153,9 - 165,7
Potasio	mmol/L	0,6 - 10,1	1,8 - 19,7	0,5 - 11,2	0,4 - 11,0	0,3 - 14,2	0,6 - 9,2	0,7 - 17,3	0,5 - 18,2	1,1 - 7,3
Cloro	mmol/L	126,5 - 166,2	115,6 - 168,9	99,4 - 144,6	89,3 - 153,6	124,3 - 158,8	95,5 - 129,3	124,9 - 140,4	133,3 - 155,3	119,6 - 130,3

\*: Resultados obtenidos menores al límite de detección de la técnica

**Tabla 7.** Intervalos de referencia de parámetros hematológicos para salmónidos

Parámetro	Unidad	Trucha arcoiris			Salmón del Atlántico			Salmón Coho		
		Pre smolt-smolt	Post smolt	Reproductor	Pre smolt-smolt	Post smolt-Adulto	Reproductor	Smolt	Post smolt - Adulto	Reproductor
Eritrocitos	10 <sup>6</sup> cél/μL	0,6 - 1,3	0,8 - 1,3	0,6 - 1,3	0,6 - 1,3	0,6 - 1,1	0,5 - 1,1	0,7 - 1,3	0,6 - 1,2	0,7 - 1,7
VGA	%	37 - 60	39 - 74	40 - 72	30 - 58	33 - 59	36 - 62	38 - 67	35 - 68	42 - 70
HB	g/L	44,7 - 95,0	63,1 - 139,1	44,8 - 99,0	41,3 - 108,6	53,6 - 111,0	52,1 - 135,9	48,0 - 113,8	50,8 - 100,0	78,6 - 138,8
VCM	fL	376,5 - 798,7	347,3 - 735,7	320,0 - 743,6	250,9 - 747,9	392,5 - 773,6	363,6 - 732,0	239,2 - 766,4	399,1 - 775,6	288,6 - 723,1
CHCM	g/L	100,0 - 198,9	110,3 - 259,9	102,9 - 235,0	111,9 - 210,8	112,5 - 201,9	107,2 - 281,0	81,7 - 212,5	91,0 - 209,6	141,4 - 293,6
Leucocitos	cel/μL	6544 - 24149	5486 - 10315	5210 - 24023	4653 - 21290	4547 - 21414	6695 - 23693	5189 - 24278	4689 - 23572	3070 - 20923
Monocito	%	0 - 3	0 - 2	0 - 3	0 - 4	0 - 4	0 - 4	0 - 4	0 - 4	0 - 2
	cel/μL	0 - 680	0 - 206	0 - 660	0 - 0,72	0 - 431	0 - 417	0 - 741	0 - 694	0 - 389
Linfocito	%	68 - 86	69 - 89	68 - 86	54 - 88	60 - 82	68 - 88	69 - 89	66 - 88	72 - 92
	cel/μL	5320 - 17500	3785 - 9180	4340 - 18200	3869 - 17193	2781 - 15499	5068 - 18896	3020 - 19732	2566 - 19027	2579 - 16749
Eosinofilo	%	0 - 1	0	0	0	0 - 1	0 - 1	0	0 - 1	0
	cel/μL	0 - 194	-	-	-	0 - 119	0 - 11	-	0 - 170	-
Heterofilo	%	15 - 30	4 - 19	16 - 33	12 - 33	18 - 38	12 - 31	11 - 31	12 - 32	8 - 28
	cel/μL	722 - 5928	219 - 1960	868 - 6080	749 - 4530	807 - 6051	1213 - 5468	914 - 5730	532 - 6194	391 - 5159
H. baciliforme	%	0 - 1	0	0	0	0 - 2	0 - 3	0	0 - 1	0 - 1
	cel/μL	0 - 211	-	-	-	0 - 178	0 - 128	-	0 - 195	0 - 201
Trombocitos	cel/μL	2120 - 11853	2257 - 5725	3415 - 12985	2183 - 12966	1144 - 15700	5295 - 24113	3512 - 18735	5399 - 24615	4600 - 5686

