

CAMBIOS HEMATOLÓGICOS EN EL BAGRE (*ARIOPSIS FELIS*) COMO BIOMARCADORES DE CONTAMINACIÓN

Clave del proyecto: CIN2014A10244

Colegio Anglo Mexicano de Coyoacán

Autores:

Guzmán Paredes José Luis
Matadamas Guzmán Fernando Misael

Asesores:

Edith Maldonado Morales
Xochitl Guzmán García

Área de Conocimiento:
Ciencias Biológicas, Químicas y de la Salud

Disciplina:
Biología.

Tipo de Investigación:
Experimental

Lugar:
México, Distrito Federal

Fecha:
18 de Febrero de 2014

RESUMEN

La ecotoxicología estudia el efecto de los contaminantes en organismos bioindicadores, como los peces. El estudio de la sangre en peces, ha sido utilizado para realizar la evaluación de sus condiciones fisiológicas y/o salud. En estudios de monitoreo ambiental las respuestas biológicas de los organismos son utilizadas como biomarcadores del estrés ambiental. El objetivo de este trabajo fue, identificar los grupos celulares del tejido sanguíneo de peces colectados en 3 sitios de monitoreo ambiental (Celestún Yuc, Guasimas, Son. y Tecolutla, Ver.) con el fin de generar información de su estado de salud en relación a la calidad del ambiente donde se desarrollan. Frotis sanguíneos fueron teñidos con Giemsa, para analizar la morfología y el número de las células. Los tipos celulares y cambios morfológicos fueron fotodocumentados. Se identificaron eritrocitos como el grupo predominante, posteriormente el grupo de polimorfonucleares y monomorfonucleares. La morfología y número de las células sanguíneas fue diferente dependiendo del lugar de colecta. La prevalencia de los cambios morfológicos de las células, indicó que la salud de los peces de Celestún está en mayor riesgo con respecto a los peces colectados en Guasimas, Son. y Tecolutla, Ver.

Los resultados de este trabajo son evidencias del impacto ecológico asociado con la zona de colecta de los peces. A pesar de que existen algunos estudios comparativos de los aspectos hematológicos en peces, aún existe desconocimiento en áreas básicas de la biología de estos organismos.

Palabras clave: Ecotoxicología, biomonitoreo, peces, sangre, Giemsa.

ABSTRACT

Ecotoxicology studies the effect of pollutants in bioindicator organisms such as fish. The study of blood has been used to make the assessment of physiological and health condition of fish. In environmental monitoring studies, the biological responses of organisms are used as environmental stress biomarkers.

The aim of this work was to identify cellular groups of blood tissue in fish that were collected at 3 environmental monitoring zones (Celestún Yuc., Guasimas Son., y Tecolutla Ver.), in order to give information about the status of health and quality in relation to their environment. Blood smears were stained with Giemsa to analyze their morphology and the number of cells in them. Cellular types and morphological changes were photo-documented. Erythrocytes were identified as the predominant group, followed by the polymorphonuclear and the monomorphonuclear groups. The morphology and number of blood cells indicate that health of fish collected in Celestún is in major risk in regard to the fish collected in Guasimas, Son. and Tecolutla, Ver.

The results of this work are evidence of the ecological impact associated with the fish collecting zone. Although there are some comparative studies about the hematological aspect in fishes, there is still a lack of knowledge in basic areas of the biology of these organisms.

Key words: Ecotoxicology, biomonitoring, fishes, blood, Giemsa.

INTRODUCCIÓN PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

¿Los cambios morfológicos, incremento o decrementos de las células sanguíneas, así como la presencia de parásitos y micronúcleos representan un parámetro biomarcador para el diagnóstico de salud de los peces en lugares contaminados?

OBJETIVO GENERAL

Evaluar los cambios morfológicos, incrementos o decrementos de las células sanguíneas así como la presencia de parásitos y micronúcleos como parámetro biomarcador o evidencia para establecer el diagnóstico de salud de los peces.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Elaborar y teñir frotis de sangre de peces colectados en Celestun, Yuc., Guasimas, Son y Tecolutla, Ver. con la técnica de Giemsa.

Revisar al microscopio óptico los frotis elaborados para el reconocimiento y conteo de células.

Observar los cambios morfológicos y su prevalencia en las muestras de sangre.

Asociar un valor de evidencia a los cambios observados.

HIPÓTESIS

Los peces que son expuestos al efecto tóxico en un ecosistema acuático presentan respuestas sanguíneas o biomarcadores que evidencian el estrés ambiental y su estado de salud, por lo tanto el pez bagre (*Ariopsis felis*), expuesto a efecto tóxico presentará cambios nucleares y citoplasmáticos en células sanguíneas así como incremento de monomorfonucleares, dato que indica influencia del ambiente produciendo lesiones a la salud, por la contaminación o degradación de los ecosistemas donde habitan.

El cambio climático que experimenta nuestro planeta se le suma al originado por las actividades humanas y afectan los ecosistemas costeros. El cambio climático se ha evidenciado en el aumento de promedio de las temperaturas del aire y del océano, la fusión de hielos y el aumento del nivel del mar. El planeta tierra ha aumentado de temperatura 0.13 °C por década, los incrementos entre 1 y 2 °C en la temperatura media global pueden ocasionar impactos en la mayoría de los ecosistemas y las especies en su capacidad de adaptación (Piccolo *et al.*, 2013).

Los animales o sus secciones son utilizados para indicar la condición del ambiente estudiado ya sea en términos cualitativos (bioindicación) o cuantitativos (biomonitorio). Este proceso proporciona información sobre la carga ambiental en una región en un momento determinado o de sus cambios a lo largo del tiempo. La bioindicación clásica a menudo se refiere a la observación y a la medición de los efectos de tóxicos químicos sobre organismos bioindicadores. La bioindicación como el biomonitorio proporciona información sobre el alcance de la contaminación o de la degradación en los ecosistemas. La información específica y detallada de los ecosistemas es esencial para el análisis de la bioindicación, además de las clásicas investigaciones florísticas o faunísticas que registran reacciones de exposición a los contaminantes se han desarrollado nuevos instrumentos de bioindicación entre los que se destacan los biomarcadores (Markert *et al.*, 2013).

Un biomarcador es un parámetro biológico medible a nivel organismo o suborganismico (genético, enzimático, fisiológico ó morfológico) en lo que los cambios estructurales o funcionales indican la influencia del ambiente en general y de los contaminantes en particular, en términos cualitativos, y a veces en forma cuantitativo (Markert *et al.*, 2013). Dentro de los biomarcadores, el estudio tisular (la sangre por ejemplo) representa una herramienta de diagnóstico que suma respuestas individuales y permite realizar una evaluación de las condiciones de salud de la población.

El sistema hematopoyético de los peces es altamente sensible a estresores ambientales; por lo que los estudios hematológicos en estos organismos aportan significativa información en el diagnóstico e interpretación de sus enfermedades. Dichos estudios se han incrementado con el desarrollo de la piscicultura y con el empleo de los peces para evaluaciones ecotoxicológicas, en este tipo de estudios algunos peces como el bagre *Ariopsis felis* se han planteado como organismos para estudios de biomonitorio. Por tanto, el entendimiento de la fisiología de estos organismos y en consecuencia de sus relaciones con las variables ambientales es un importante factor a considerar en el uso de esta herramienta de investigación (Salazar-Lugo *et al.*, 2009).

Los patrones hematológicos son útiles como referencia para el diagnóstico de cuadros patológicos en peces (Valenzuela *et al.*, 2003) como malnutrición, edad, tamaño del pez y diferencias estacionales, etc. Aunque la composición sanguínea de los peces está determinada genéticamente, también se encuentra bajo la influencia del ambiente en el que habitan los organismos. Los estudios sobre la hematología de los peces son de suma importancia ya que permiten establecer las variaciones de los patrones hematológicos como indicadores de contaminación (Valenzuela *et al.*, 2003), y pueden ser utilizados como indicadores fisiológicos de disfunción orgánica por estrés (Wedemeyer *et al.*, 1990).

Dentro de los cambios inducidos en el parámetro hematológico se encuentran diferencias morfológicas en las células (eritrocitos, monomorfonucleares y polimorfonucleares), la presencia de parásitos que inducen respuestas de defensa con incrementos o decrementos en la frecuencia de los grupos celulares sanguíneos hasta cambios en la estructura del DNA que genera la presencia de micronucleos. La estimación de estos parámetros genera evidencias para la evaluación de salud de los peces.

Un gran número de contaminantes ambientales son capaces de suprimir la respuesta inmune, y en ciertas circunstancias, hacer mas susceptible al organismo de enfermedades infecciosas o cáncer. Los estresores pueden actuar directamente en los estados de enfermedad de los peces ya que influyen en sus mecanismos de defensa, permitiendo la invasión de patógenos ambientales hasta causar la muerte. Por lo tanto la relación entre contaminación ambiental, enfermedad y organismos acuáticos es todavía incierta, la inmunosupresión es una hipótesis basada en que los contaminantes acuáticos incrementan la prevalencia de enfermedades en los peces expuestos (Di Giulio *et al.*, 2008).

1. Características de los biomarcadores

Existen factores que pueden afectar la morfología y la frecuencia de los eritrocitos generando anemias (disminución) o policitemias (aumento). La morfología de la célula puede ser clasificada por su tamaño, forma, color e inclusiones. Algunos términos usados para describir la morfología de las células o sus síntomas se observan en la tabla numero 1.

La morfología de los leucocitos se describe con las terminaciones *cytosis* (incremento), o *philia* y *penia* que es la reducción de células. Uno de estos ejemplos son hipersegmentación, leucocitosis,

leucopenia o macrófagos. Los xenobióticos pueden ejercer sus efectos en la población de leucocitos por la supresión o destrucción de sus células madre hematopoyéticas, por la proliferación de células precursoras o por cambios inflamatorios o vasculares. La reducción en el número de las células basófilas, eosinófilas y monocitos es difícil de detectar debido al bajo número de este tipo de células en la población en circunstancias normales. Las leucemias son una mezcla de enfermedad maligna que afectan las células precursoras y estas son denominadas algunas veces neoplasia.

2. Parásitos.

Al igual que los seres humanos y otros animales, los peces sufren de enfermedades parasitarias. Si los patógenos infringen los mecanismos de defensa, los peces pueden desarrollar respuestas inflamatorias que aumentan el flujo de sangre a las áreas infectadas y entregar las células blancas de la sangre que tratan de destruir los agentes patógenos. Si el costo es suficientemente alto, a continuación, los impactos pueden ser caracterizados como una enfermedad. Los patógenos que pueden causar enfermedades de los peces comprenden; infecciones virales, infecciones bacterianas, infecciones fúngicas y varios parásitos.

3. Micronúcleos.

El incremento del número de micronúcleo puede ser indicativo del efecto provocado por un agente genotóxico. Los micronucleos son la expresión final de un daño molecular formado por el desplazamiento de la cromatida fuera del núcleo principal de la célula que se está dividiendo después de la telofase, y el micronúcleo permanece en el citoplasma después de la expulsión del núcleo. En adición, los micronucleos han sido empleados frecuentemente como un índice de genotoxicidad, mas que aberraciones en cromosomas e intercambios de cromatidas (hermanas) en estudios citogenéticos realizados en peces. Los micronucleos son formados durante el anafase mitótico.

Tabla 1. Resumen de cambios morfológicos asociados a lesiones o enfermedades en los peces.

Patología	¿Cómo se presenta?	Enfermedad
Eritrocitos	Anormalidad nuclear y alto número de eritrocitos sin núcleo	Toxicidad y deficiencia nutricional
Policromasia	Eritrocitos inmaduros	Anemia regenerativa, hemólisis y hemorragia
Monocitos	Incremento en número	Células de circulación
Linfocitos	Incremento en el número	Pueden indicar heterofilia
Hipersegmentación	Núcleo desplazado a la derecha	Anemia
Enfermedad infecciosa	Aumento de polimorfonucleares	Presencia de virus ó bacterias
Eosinófilos	Mas prevalente que los basófilos	Hipersensibilidad, presencia de parásitos
Respuesta	Incremento de	Infiltración de tejidos

inflamatoria	basófilo	
Basófilo	Incremento en numero	Respuesta antiinflamatoria, reacciones de hipersensibilidad
Fagocitosis	Células incompletas	Alimentación mutua (se comen entre ellos)
Quimiotaxis	Con pequeños flagelos alrededor de la célula	Movimiento por los flagelos
Neoplasia	Proliferación celular	Cáncer

Hay cuatro mecanismos reconocidos por los cuales el micronúcleo puede surgir:

- 1) pérdida de un fragmento de la parte no céntrica del cromosoma
- 2) por una variedad de consecuencias mecánicas del rompimiento e intercambio de los cromosomas
- 3) Pérdida mitótica de todo el cromosoma ó
- 4) por apoptosis o muerte celular. La presencia de diferentes respuestas tisulares conforman evidencias de diagnóstico.

Clasificación de la evidencia.

En la toma de decisiones en materia de salud no todos los datos tienen el mismo impacto o valor, por lo que es necesario evaluar la calidad de la evidencia. Una investigación puede evaluar los tratamientos, la prevención, la etiología, el daño, generar pronósticos, historia natural, realizar un diagnóstico diferencial, evaluar la prevalencia e incluso el análisis de las decisiones. Los resultados o evidencias, dependen de las herramientas, instrumentos y escalas que jerarquizan y valoran la evidencia, ya que en base a su utilización se pueden emitir juicios de recomendación (Manterola et al., 2009).

El diagnóstico de salud en los organismos se relaciona con el bienestar. El término bienestar en animales acuáticos se refiere a las condiciones que deben crearse para los animales para que, según la especie, estos puedan enfrentar los factores ambientales, de gestión y manipulación manteniendo niveles óptimos de salud y productividad. Estas condiciones deben minimizar el efecto de los agentes ambientales y fisiológicos negativos, así como otros agentes estresantes que pueden estar asociadas a prácticas incorrectas. El bienestar considera al animal en un estado de armonía en su ambiente y la forma por la cual reacciona frente a los problemas del medio, tomando en cuenta su confort, alojamiento, trato, cuidado responsable, nutrición, prevención de enfermedades, manejo y eutanasia humanitaria cuando corresponda. Los indicadores del bienestar en especies acuáticas pueden implicar una evaluación de la salud y lesiones; el crecimiento, comportamiento y otros factores de desempeño; la captura, alimentación, manipulación, gestión, transporte, sacrificio humanitario y otras condiciones que no se encuentran normalmente en la naturaleza; y los factores ambientales u otros agentes estresantes que pueden afectar negativamente la producción y el desempeño (Johnston & Jungalwalla, 2008). Tomar en cuenta estos principios e indicadores en las mejoras del bienestar de los animales acuáticos permite con frecuencia mejorar la productividad y la seguridad sanitaria de los alimentos y, por ende los beneficios económicos (Johnston y Jungalwalla, 2008).

METODOLOGÍA

Se realizaron 20 frotis de sangre de pez bagre: *Ariopsis felis* colectados en los siguientes lugares: Tecolutla, Ver., Guásimas, Son., así como en Celestún, Yuc. Posteriormente se realizaron por duplicado frotis sanguíneos los cuales se fijaron en alcohol absoluto por una hora y se tiñeron con solución de Giemsa y se observaron al microscopio óptico para ver si había un cambio morfológico en las células de los eritrocitos, de los polimorfonucleares y de los monomorfonucleares en los peces.

También para establecer el diagnóstico de salud consideraron los siguientes parámetros: 1) la morfología de los eritrocitos 2) conteo de los monomorfonucleares y polimorfonucleares, 3) presencia de micronucleos y 4) presencia de parásitos.

Se determinó la presencia de las siguientes patologías: eritrocitos sin núcleo, policromasia, quimiotaxis, inflamación, hipersegmentación y neoplasia. Cada una de estas respuestas se describe en el anexo 1. Los cambios morfológicos de las células fueron registrados mediante fotografía digital utilizando objetivos de 10, 40, 100 X de un microscopio y una cámara digital. Para la integración de los datos se realizó una tabla de evidencias.

RESULTADOS

Las muestras observadas al microscopio permitieron identificar los eritrocitos, los monomorfonucleares y polimorfonucleares. Las células predominantes corresponden a los eritrocitos nucleados y de forma elíptica. Los monomorfonucleares y polimorfonucleares fueron escasos en las muestras analizadas (Fig 1). Los granulocitos o células polimorfonucleares son más grandes que los eritrocitos y se observaron con varios núcleos teñidos pálidamente en el caso de los neutrófilos de color lila; los basófilos de azul a negro y los eosinófilos de rojo a naranja; los agranulocitos fueron reconocidos por tener poco citoplasma, ser translucidos y presentar un núcleo grande. Gracias a la diferenciación de colorante utilizados se logró obtener diferentes tonalidades, recordando que la diferenciación se logró con el ácido acético.

Moura *et al.* (1994) distinguieron tres tipos de granulocitos (neutrófilos, eosinófilos y células reticulares) y tres agranulocitos (linfocitos, trombocitos y monocitos) en peces, de los cuales en las muestras procesadas en ese trabajo se reconocieron la mayor parte con excepción de monocitos, esto se debe a que tras haberse formado y liberado de la médula ósea van al torrente sanguíneo donde permanecen unas pocas horas, mientras que en mayor abundancia se encontraron eritrocitos, dado que es la masa principal de la sangre (Núñez, 1983). Los demás tipos de células no se pudieron observar debido a que en la sangre representan la menor masa (1-2%) (Von-Hessberg *et al.*, 2011). Las especies marinas y pelágicas son activas, en consecuencia, presentan un alto número de eritrocitos, esto debido a la gran actividad que presentan durante el día y lo cual requiere que el transporte de oxígeno sea muy eficiente (Galeano *et al.*, 2010).

En términos generales se observaron los siguientes cambios morfológicos en los eritrocitos; inclusiones de tipo basófilo y eosinófilo en el citoplasma, cambios nucleares y citoplasmáticos, e incremento en la frecuencia de monomorfonucleares (Fig.2).

Con respecto a los linfocitos se observaron de forma redonda a ovalada. Generalmente en los linfocitos pequeños el núcleo ocupa la mayor parte de la célula teñido de color violeta intenso. Se muestra en la fig. 2 microfotografía (f).

Algunos de los cambios morfológicos se observaron con mayor frecuencia dependiendo del lugar de colecta. En organismos colectados en Celestún, se observó diferenciación nuclear; granulares, amorfo, desplazados y fragmentados, el citoplasma amorfo y con desprendimiento, eritrocito esférico, con agregados nuclear (Tabla 2). Conteo de monomorfonucleares y polimorfonucleares:

Se reconoció la presencia de células monomorfonucleares que se identificaron en las muestras de Guásimas, en Celestún y en Tecolutla, si bien en esta última se presentaron en menor cantidad.

El 20% presento Polimorfonucleares, de estos el 15% corresponde a bagres colectados en Guasimas, Sonora y el restante 5% se observaron en muestras provenientes de Celestún, Yuc.

Presencia de micronucleos:

En las muestras de Guasimas, Son. y Celestún, Yuc., se observaron micronucleos.

Presencia de parásitos: Solo se observo un posible parásito en la sangre de los organismos colectados en Celestún, Yuc.

Otras Patologías:

De las patologías reportadas solo es evidente la presencia de eritrocitos sin núcleo, no se observo: policromasia, quimiotaxis, inflamación, hipersegmentación ó neoplasia.

La tabla 2 sintetiza los cambios morfológicos observados, donde se puede observar que existen lesiones de mayor riesgo en organismos colectados en Celestún, Yuc., seguidos de Guásimas, Son. y con menor riesgo de salud están los organismos colectados en Tecolutla, Ver.

Existen algunos estudios comparativos de los aspectos hematológicos de peces, sin embargo, para otros autores, la hematología en peces no se ha desarrollado debido al desconocimiento en áreas básicas de la biología de estos individuos (Udea et al., 2001). Por ello es importante continuar con estudios que provean elementos de diagnostico para la salud de los recursos naturales así como de los ecosistemas.

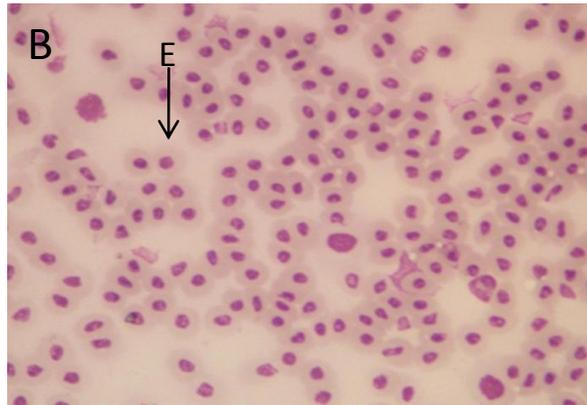
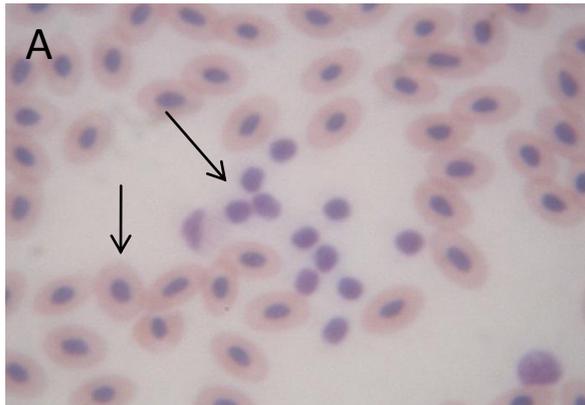
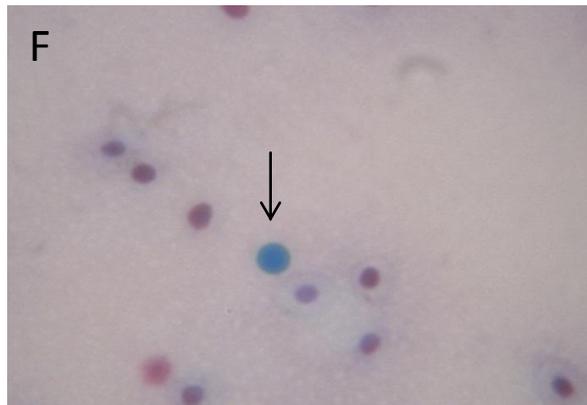
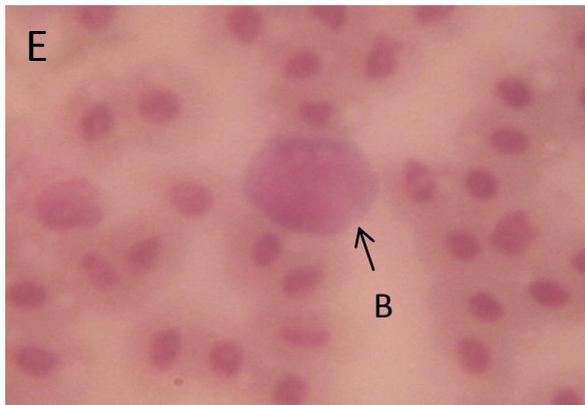
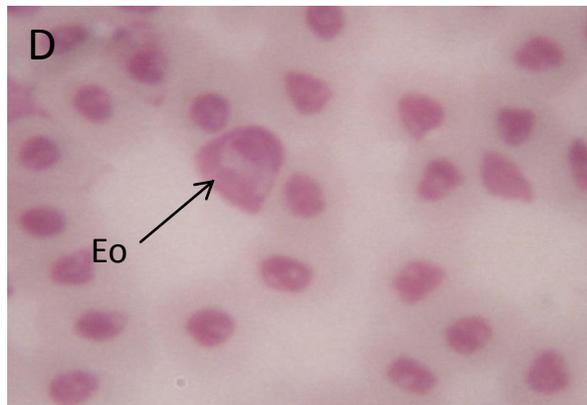


Fig. 1.
Se



observa los eritrocitos (E) y los polimorfonucleares (B=basofilos y EO=eosinofilo)

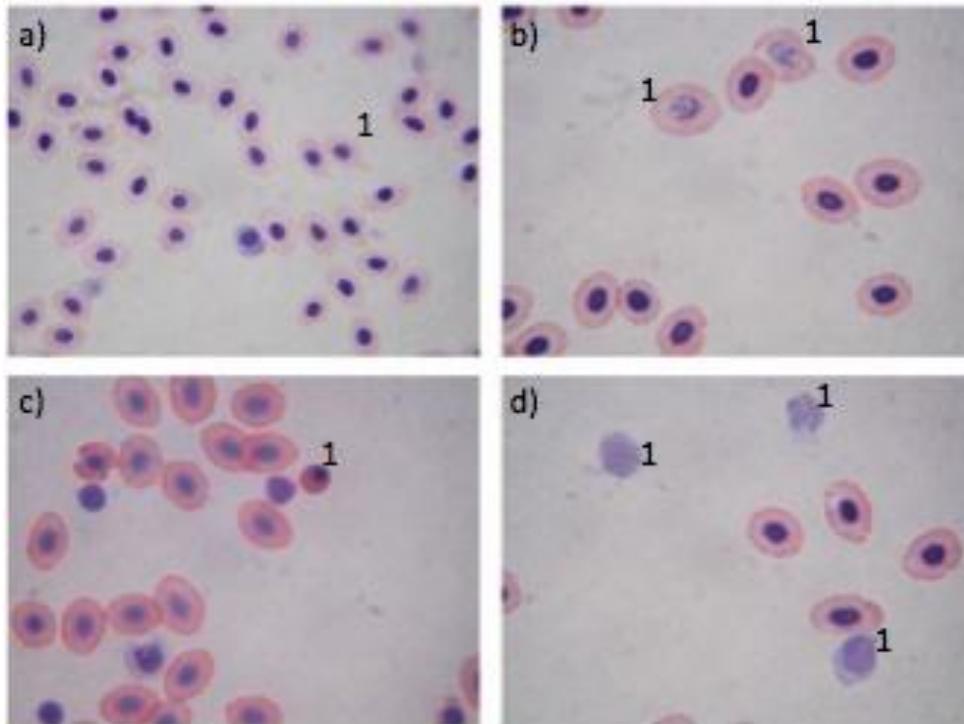


Fig. 2. En los frotis se observan Eritrocitos (a); Núcleos granulares y modificación morfológica del citoplasma (b), Modificaciones en el citoplasma (c) y células monomorfonucleares (d). En b y d se observa de acuerdo a su definición probable quimiotaxis, se requiere de mayor aumento para asegurar que existen estas modificaciones citoplasmicas de los eritrocitos, que se observan en Celestun, Yuc.

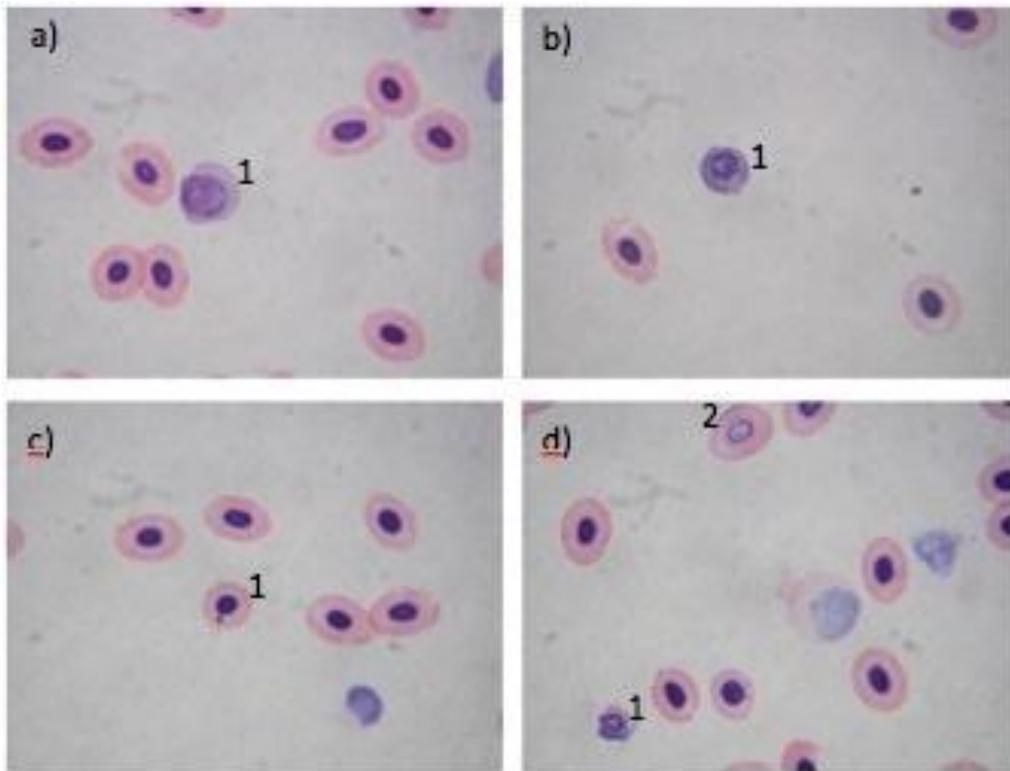


Fig. 3 . Se observan linfocitos (a y b), Micronucleos en menor tamaño que el núcleo (en c; 1), núcleo en la periferia (d; 2) y posibles parásitos (d;1).

Tabla 2. Cambios morfológicos observados en los eritrocitos.

Eritrocitos	Tecolutla, Ver.	Guasima, Son.	Celestún, Yuc
Inclusiones citoplasmáticas	O	O	O
Núcleos granulares	O	NO	NO
Tamaño irregular	O	NO	NO
Núcleos; amorfo, desplazados, fragmentados.	NO	NO	O
Eritrocitos esféricos	NO	NO	O
Polimorfonucleares	NO	O	O
Parásitos	NO	NO	O
Perdida de la relación núcleo-citoplasma	NO	O	O
Micronúcleo	NO	O	O

NO= No observado; O= observado

CONCLUSIONES

La tinción de Giemsa permitió reconocer las células de la sangre de los peces (*A. felis*).

Los parámetros hematológicos en el bagre sugieren que existe respuestas celulares con mayor prevalencia en el siguiente orden: Tecolutla < Guasimas < Celestún, por lo que la salud de los peces de Celestún esta más comprometida.

Se logro diagnosticar el estado de salud de los peces mediante las evidencias presentadas en el trabajo.

Cada lugar tiene diversos factores que alteran el comportamiento de las células, sus cambios morfológicos o la aparición de células monomorfonucleares y polimorfonucleares, por lo que el estudio hematológico es un buen biomarcador de daño por el estrés ambiental.

Se sugiere considerar los parametros hematológicos y analizarlo en estudios similares y en programas de biomonitorio.

Podemos sugerir que al demostrar presencia de eritrocitos morfológicamente cambiados, presencia de monomorfonucleares, polimorfonucleares, parásitos o micronucleos se asocian con la presencia de contaminantes.

Este tipo de prueba es relativamente económica lo que podría permitir que se llevara a cabo en diversos lugares para evidenciar el impacto ambiental.

BIBLIOGRAFÍA

- Beltrán. J., A. Villasol, A. V. Botello y F. Palacios. 2005. Condición actual del ambiente marino-costero de la región del Gran Caribe. P. 1-24. In: A. V. Botello, J. Rendón-von Osten, G. Gold-Bouchot y C. Agraz-Hernández (Eds.). Golfo de México Contaminación e Impacto ambiental: Diagnóstico y Tendencias, 2da Edición. Univ. Autón de Campeche, Univ. Nal. Autón de México, Instituto nacional de Ecología, 696 pág.
- Botello A.V., y S. Villanueva-Fragoso. 2010. Introducción, p. 1-14. En: A.V. Botello, S. Villanueva-Fragoso, J. Gutiérrez, y J.L. Rojas Galaviz (eds.). Vulnerabilidad de las zonas costeras mexicanas ante el cambio climático. Semarnat-INE, UNAM- ICMyl, Universidad Autónoma de Campeche. 514 pág.

- Di Giulio, R., T. y Hinton, D. E. 2008. The Toxicology of fishes. First Edition. Ed. CRC. Press, Taylor & Francis Group. 328-331.
- Galeano, N. A., S. E. Guagliardo, C. B. Schwerdt y R. D. Tanzola. 2010. Características hematológicas de *Porichthys porosissimus* (Pisces: batrachoidiformes) en el estuario de Bahía Blanca, Argentina. *Analecta Vet* 30(1): 5-11p.
- Hernández P., S. 2000. Organismos indicadores de la calidad del agua y de la contaminación (bioindicadores). México: Plaza y Valdés. 220 p.
- Kopit y Elson. 31 de Marzo del 2008. Anatomía cromodinámica. Talleres de imprenta S.A. de C.V. Salvador Velasco 102, Parque Industrial Exportec 1. 50200 Toluca, Edo. México pág. 48.
- Manterola, D., C. y Zavando, M., D. 2009. Cómo interpretar los Niveles de Evidencia en los diferentes estados clínicos. Ed. Grupo Mincir, 582-595.
- Núñez, A. C. 1983. Anatomía, fisiología y patofisiología del hombre. Reverte. Barcelona, España. 124, 152p.
- Quiroga, B. C., Valdez, G. A., Hernandez, T.I., García, G.M. y P. A. Guzmán. 2002. Peces Ribereños. In: La pesca en Veracruz y sus perspectivas de desarrollo. Instituto Nacional de Pesca y la Universidad Veracruzana. 2002. p. 434
- Valenzuela, A., C. Oyarzún y V. Silva. 2003. Células sanguíneas de *Schroederichthys chilensis* (GUICHENOT 1848) (ELASMOBRANCHII, SCYLORHINIDAE): la serie blanca. *Guyana* 67(1) 130-136p.
- Vega-Cendejas, M.E. 2004. Ictiofauna de la reserva de la biosfera Celestún, Yucatán: Una contribución al conocimiento de su biodiversidad. *Serie Zoología* 75(1): 193-206p.
- Von-Hessberg, C.M., A. Grajales-Quintero y A.V. Gutierrez-Jaramillo. 2011. Parámetros hematológicos de Tilapia nilótica (*Oreochromis niloticus*, Linnaeus 1757) con peso entre 250g y 350g, en el Centro Experimental Piscícola de la Universidad de Caldas. *Veterinaria y Zootecnia* 5(1):47-61p.
- Wedemeyer, G.A.; B.A. Barton y D.J. Mcleay. 1990. Stress and acclimation. In: Schreck, C.B., Moyle, P.B. (Eds.), *Methods for Fish Biology*. Fisheries Soc. 50-68p.

https://etd.ohiolink.edu/ap/0?0:APPLICATION_PROCESS%3DDOWNLOAD_ETD_SUB_DOC_ACCNUN:::F1501_ID:osu1187122679%2cattachment

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21835399>

https://etd.ohiolink.edu/ap/10?0::NO:10:P10_ACCESSION_NUM:osu1187122679