

**UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS**

**FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA**

**E. A. P. DE MEDICINA VETERINARIA**

**Evaluación de lesiones histopatológicas y aislamiento  
bacteriológico de algunos de los principales tejidos de  
gamitanas (*Colossoma macropomum*)**

**TESIS**

para optar el Título Profesional de Médico Veterinario

**AUTOR**

**Fernando Carlos Ramos Espinoza**

**Lima-Perú**

**2007**

*A mis padres, Fernando y Gloria, y a mis  
hermanas Silvia y Cecilia.*

*A mi profesora Nieves Sandoval Ch.*

*A mis amigos de la Universidad.*

*Al Sr. Orlando Torres del IVITA-Pucallpa*

## INDICE

<b>LISTA DE CUADROS</b> .....	iii
<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	iv
<b>RESUMEN</b> .....	v
<b>SUMMARY</b> .....	vi
<b>I. INTRODUCCION</b> .....	1
<b>II. REVISIÓN DE LITERATURA</b> .....	3
1. Descripción de la gamitana ( <i>Colossoma macropomum</i> ).....	3
1.1 Aspectos generales.....	3
1.2 Características anatómicas.....	4
1.3 Distribución geográfica.....	5
1.4 Hábito alimenticio.....	5
1.5 Reproducción.....	6
2. Anatomía e histología del hígado, bazo, riñón, estómago, branquias.....	6
y músculo de los teleósteos.....	6
2.1 Hígado.....	6
2.2 Bazo.....	7
2.3 Riñón.....	9
2.4 Branquias.....	10
2.5 Estómago.....	10
2.6 Músculo.....	11
3. Mecanismos de defensa de los peces.....	12
4. Enfermedades en peces amazónicos.....	13
4.1 Generalidades.....	13
4.2 Enfermedades de origen infeccioso.....	14
4.2.1 Enfermedades bacterianas.....	14
4.2.1.1 Enfermedad por <i>Flavobacterium columnare</i> .....	14
4.2.1.2 Enfermedad por <i>Aeromonas hydrophila</i> .....	15
4.2.1.3 Enfermedad por <i>Edwardsiella tarda</i> .....	16
4.2.2 Enfermedades fúngicas.....	17
4.2.2.1 Saprolegniasis.....	17
4.2.3 Enfermedades parasitarias.....	18
4.2.3.1 Mixosporidiasis.....	18

4.2.3.2 Enfermedad por <i>Ichthyophthrius multifiliis</i> .....	19
4.2.3.3 Enfermedad por parásitos monogeneos.....	20
4.3 Enfermedades de origen no infeccioso.....	21
4.3.1 Por la calidad del agua.....	21
4.3.1.1 Amoníaco.....	21
4.3.1.2 Oxígeno Disuelto.....	21
4.3.1.3 pH.....	21
4.3.2 Por Factores Nutricionales.....	22
4.3.3 Neoplasias.....	22
<b>III. MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>	<b>23</b>
1. MATERIALES.....	23
1.1 Relativos a la necropsia.....	23
1.2 Relativos al Proceso Histológico.....	23
1.3 Relativos al Proceso Bacteriológico.....	24
1.4 Equipos.....	24
2. METODOLOGIA.....	25
2.1 Localización.....	25
2.2 Animales.....	25
2.3 Procedimientos.....	25
2.3.1 Necropsia.....	25
2.3.2 Obtención de muestras.....	25
2.3.3 Bacteriología.....	26
2.3.4 Histopatología.....	26
2.4 Análisis de datos.....	26
<b>IV. RESULTADOS.....</b>	<b>28</b>
1. Histología.....	28
2. Microbiología.....	41
<b>V. DISCUSIÓN.....</b>	<b>42</b>
<b>VI. CONCLUSIONES.....</b>	<b>53</b>

<b>VII. RECOMENDACIONES.....</b>	<b>54</b>
<b>VIII. BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>55</b>
<b>IX. ANEXOS.....</b>	<b>67</b>

## **LISTA DE CUADROS**

Cuadro 1. Frecuencia de alteraciones histológicas hepáticas según tipo de trastorno.

Cuadro 2. Frecuencia de alteraciones histológicas renales según tipo de trastorno.

Cuadro 3. Frecuencia de alteraciones histológicas en músculo según tipo de trastorno.

Cuadro 4. Frecuencia de alteraciones histológicas en branquias según tipo de trastorno.

Cuadro 5. Frecuencia de alteraciones histológicas en el estómago según tipo de trastorno.

Cuadro 6. Frecuencia de alteraciones histológicas en bazo según tipo de trastorno.

Cuadro. 7. Frecuencia de lesiones macroscópicas encontradas a la necropsia

Cuadro 8. Frecuencia de peces que presentaron bacterias aisladas en branquias, hígado, bazo, riñón y estomago en 40 gamitanas aparentemente sanas.

## LISTA DE FIGURAS

Fig. 1. Gamitana (*Colossoma macropomum*)

Fig. 2. Hígado de gamitana. Se puede apreciar degeneración hidrópica en los hepatocitos. H&E. x40

Fig. 3. Hígado de gamitana. Pigmentos de coloración marrón negrusca encontrados en el citoplasma de los hepatocitos (Flecha). H&E. x40

Fig. 4. Esporas de mixporidios (Flecha A) e infiltración de centros melanomacrófagos (Flecha B) en células tubulares degeneradas y necrosadas del riñón. H&E. x40

Fig. 5. Formas libres de mixosporidios en células necrosadas del túbulo renal (Flecha A) e infiltración de centros melanomacrófagos en el interior y en la periferia de los túbulos (Flecha B) H&E. x100

Fig. 6. Gotas hialinas en el citoplasma de las células tubulares del riñón (Flecha). H&E. x100

Fig. 7. Zona de necrosis y atrofia en el músculo esquelético (Flecha). H&E. x40

Fig. 8. Quiste de mixosporidio en el músculo esquelético. H&E. x40

Fig. 9. Hiperplasia interlaminar (Flecha A) y congestión en el filamento branquial (Flecha B). H&E. x40

Fig. 10. Quiste de mixosporidio en filamento branquial. Hubo una reacción inflamatoria en su periferia (Flecha). H&E. x10

Fig. 11. Esporas de mixosporidios. Se aprecian las dos cápsulas polares. H&E. x100

Fig. 12. Parásito monogeneo en branquias (Flecha). H&E. x100

Fig. 13. Micro gotas (Fecha A) y macro gotas hialinas (Flecha B) en el epitelio de la mucosa gástrica. H&E. x40

Fig. 14. Leve congestión en el bazo (Flecha) H&E. x100



## RESUMEN

El objetivo del presente estudio fue determinar lesiones histopatológicas y poder aislar agentes infecciosos en algunos tejidos de la gamitana (*Colossoma macropomum*). Se colectaron 40 peces aparentemente normales de estadio juvenil en una piscigranja de la Estación Experimental IVITA-Pucallpa, Ucayali (Perú); tomándose muestras del hígado, bazo, riñón, estómago, branquias y músculo para su estudio Histopatológico y Bacteriológico. Los hallazgos histopatológicos en el hígado fueron degeneración hidrópica (39/40) y congestión (31/40); en el riñón fueron degeneración hidrópica y necrosis tubular (40/40) y regeneración celular en túbulos (6/40), con un incremento de centros melanomacrófagos en la periferia de los túbulos; en el bazo se observó congestión (4/40); en el estómago se observó necrosis del epitelio de la mucosa (3/40) y necrosis de las glándulas gástricas (2/40); en las branquias se observó infiltración de células inflamatorias en filamento branquial (40/40), congestión en filamento (12/40), hiperplasia del epitelio interlamilar (40/40), hiperplasia del filamento branquial (18/40) y pérdida de láminas (2/40); y finalmente en el músculo se pudo observar necrosis (16/40) y atrofia muscular (5/40). Los hepatocitos presentaron unos pigmentos de coloración marrón negrusca en el interior del citoplasma (40/40); también se observó material hialino en el citoplasma de células del riñón (2/40) y estómago (25/40). Se encontraron parásitos mixosporidios en branquias (2/40), riñón (40/40) y músculo (12/40); y parásitos monogeneos en branquias (6/40). Se aislaron bacterias como: *Pseudomona fluorescens/putida*, *Edwardsiella tarda*, *Plesiomona shigelloides*, *Salmonella arizonae*, *Aeromonas hydrophila*, *Bacillus cereus*, *Serratia sp.*, *Escherichia coli*, *Salmonella enterica*. Se concluye, según el estudio, que la histopatología es una técnica diagnóstica que sirve para la determinación de causas infecciosas como no infecciosas en Gamitanas de cultivo. Además, se determinaron lesiones de tipo no infeccioso en el estómago y riñón, que sugieren una asociación con alteraciones en el metabolismo de las proteínas; y las lesiones en branquias sugieren una asociación con una mala calidad del agua. Finalmente se aislaron bacterias potencialmente patógenas en peces tales como *Aeromonas hydrophila* y *Edwardsiella tarda* en branquias y órganos internos, pero no relacionadas a las lesiones histopatológicas encontradas.

**Palabras clave:** Gamitana, *Colossoma macropomum*, centros melanomacrófagos, mixosporidios, monogeneos.

## SUMMARY

The aim of this study was to determine histopathological lesions and bacterial isolates in some tissues of gamitana (*Colossoma macropomum*). Forty clinically healthy juvenile fishes were collected from the Experimental Station IVITA-Pucallpa, Ucayali (Perú), taking samples of the kidney, liver, spleen, stomach, gills and muscle. The histopathological findings in the liver were hydropic degeneration (39/40) and congestion (31/40); the findings in the kidney were hydropic degeneration and tubular necrosis (40/40) and tubule cell regeneration (6/40), with an increase of melano-macrophage centres in the periphery of the tubules; the findings in the spleen were congestion (4/40); the findings in the stomach were epithelial necrosis of the mucosa (3/40) and gastric glands necrosis (2/40); the findings in the gills were infiltration of inflammatory cells in branchial filament (40/40), congestion in filament (12/40), interlamellar epithelium hyperplasia (40/40), (18/40) and loss of lamellas (2/40); and finally in the muscle the findings were necrosis (16/40) and muscle atrophy (5/40). The hepatocytes had dark pigments in the cytoplasm (40/40); and hyaline pigments in the tubular cells of the kidney (2/40) and stomach (25/40). Also, the results showed myxosporean parasites in gills (2/40), kidney (40/40) and muscle (12/40); and monogenean parasites in gills (6/40). The bacteria isolated were: *Pseudomonas fluorescens/putida*, *Edwardsiella tarda*, *Plesiomona shigelloides*, *Salmonella arizonae*, *Aeromonas hydrophila*, *Bacillus cereus*, *Serratia sp.*, *Escherichia coli*, *Salmonella enterica*. It was concluded that the histopathology is a diagnostic technique to determine lesions caused by infectious or non-infectious agents in gamitanas under culture. Also, the study showed non-infectious lesions in the stomach and kidney. These results suggested an association with alterations in protein metabolism; and the branchial lesions, from mild to moderate, suggested an association with low quality of the water; and finally were isolated potentially pathogenic bacteria in fishes such as: *Aeromonas hydrophila* and *Edwardsiella tarda* in gills and organs, but also there was no relation between the isolated bacteria and the histopathological findings in any of the tissues.

**Key words:** Gamitana, *Colossoma macropomum*, melano-macrophage centres, myxosporean, monogenean.

## I. INTRODUCCIÓN

En la amazonía peruana se encuentra una gran variedad de especies de peces para consumo y potenciales para cultivo, entre las cuales destacan: *Colossoma macropomum* “gamitana”, *Piaractus brachypomus* “paco” y *Prochilodus nigricans* “boquichico” (Guerra *et al.*, 2000). Los peces que han alcanzado mayor desarrollo tecnológico son: gamitana, paco, boquichico y zúngaro entre otros. Brasil, Colombia, Perú y Venezuela son los países que mayores avances han logrado en el cultivo de estas especies (FAO, 1989).

La gamitana, cachama o tambaqui es ampliamente conocida en los países de la cuenca amazónica, principalmente Colombia, Brasil, Venezuela, y el Perú (Woynarovich y Woynarovich, 1998).

Con los avances en la técnica del cultivo del género *Colossoma sp.*, se puede detectar la aparición, y con mayor frecuencia, de agentes patógenos que pueden afectar el normal desarrollo de los peces cultivados, disminuyendo la producción y ocasionando pérdidas económicas (Dezon *et al.*, 2004).

El éxito en el cultivo de peces, radica en la prevención, tratamiento y control de cuadros patológicos, afortunadamente en el cultivo de peces amazónicos son poco frecuentes estos cuadros; en todo caso, guardan estrecha relación con aspectos

fundamentales como son la calidad de agua y el estado nutricional del pez (González y Heredia, 1998).

Entre las principales enfermedades que han sido reportadas en gamitana se encuentran: enfermedad por la bacteria *Flexibacter columnaris*, enfermedad del punto blanco por el parásito *Ichthyophthirius multifiliis*, septicemia hemorrágica bacteriana por *Aeromonas hydrophila*, micosis y enfermedades por parásitos monogéneos como el *Dactylogirus spp.* que pueden ocasionar grandes pérdidas en la Acuicultura (Eufasio y Palomino, 2006).

Estudios relacionados a las alteraciones histopatológicas en gamitanas (*Colossoma macropomum*) no han sido descritas hasta el momento en el país. En Colombia predominantemente, se han realizado estudios histopatológicos en la especie (*Piaractus brachipomus*), uno de ellos describiendo la anatomía patológica comparada de las alteraciones branquiales (Eslava, 1999).

En el presente estudio, se identifican y describen las lesiones histopatológicas, así como el aislamiento de agentes bacteriológicos en algunos de los órganos de la gamitana (*Colossoma macropomum*).

## II. REVISION DE LITERATURA

### 1. DESCRIPCIÓN DE LA GAMITANA (*Colossoma macropomum*)

#### 1.1 ASPECTOS GENERALES

Los peces se agrupan en cuatro clases de vertebrados inferiores: Agnatha, Placodermi, Condrichthyes y Osteichthyes (Teleósteos). Los teleósteos son peces con esqueleto óseo, que en la actualidad forman la mayor parte de los animales marinos. En la actualidad, muchos de ellos han migrado a aguas dulces, y representan casi la totalidad de los peces. Hay aproximadamente 20 000 especies de teleósteos. Difieren en sus hábitos, así como en la alimentación, ya que algunos ingieren partículas vegetales microscópicas, y otros son carnívoros que se alimentan de zooplancton y otros peces (Noga, 2000).

El orden Characiforme, la familia Characidae, subfamilia Serrasalminae, comprende una amplitud de peces, de la clase de los Teleósteos, distribuidos en América del Sur, en las cuencas de los ríos Amazonas, Paraná-Paraguay y Orinoco (Woynarovich y Woynarovich, 1998; Pineda *et al.*, 2004). Uno de los carácidos más importantes es *Colossoma macropomun* denominado “gamitana” en el Perú, “cachama negra” en Colombia y Venezuela, “Tambaqui” en Brasil (Woynarovich y Woynarovich, 1998).

## 1.2 CARACTERÍSTICAS ANATÓMICAS

La gamitana es el carácido más grande de la amazonía, es un pez muy fuerte, que puede llegar a pesar hasta 30Kg y crecer hasta 90cm de longitud total (Goulding, 1980), sólo superado por el paiche, *Arapaima gigas* (Guerra et al., 2000).

Son de forma romboidal redondeada los juveniles y pre-adultos, mientras que los adultos frecuentemente se alargan más o menos con la edad (Woynarovich y Woynarovich, 1998).

Presenta una coloración gris oscuro en el dorso y amarillo blanuzco en la parte ventral, el patrón de coloración puede variar en función del tipo de agua donde se desarrolla (Goulding, 1980). Los especímenes jóvenes hasta aproximadamente 40 días de edad presentan una mancha negra, similar a un “ojo” sobre la línea lateral, ubicada en el medio de ambos lados, que va desapareciendo gradualmente con la edad. Esta característica ocasiona que el pequeño pez parezca más grande, lo que le permite evitar el ataque de ciertos enemigos (Woynarovich y Woynarovich, 1998). Los ejemplares adultos tienen manchas oscuras irregulares en la parte ventral y en la cola (Goulding, 1980).

Posee una aleta adiposa ósea con radios. Sus escamas son pequeñas pero se adhieren firmemente a la piel. El borde ventral es afilado, con escamas en forma de “V”, lo que hace posible que la gamitana se adapte bien a la coexistencia con otros peces en las cuencas del Amazonas y el Orinoco, ya que algunas especies de pirañas atacan a los peces con escamas flojas y abdomen blando donde ellas pueden morder (Woynarovich y Woynarovich, 1998).

La gamitana presenta dientes molariformes multicúspides y dientes incisivos con músculos muy fuertes, los primeros han evolucionado para triturar frutos y semillas. Además otra adaptación alimenticia es una branquiespina grande y fina, que le sirve a los peces para retención del zooplancton (Goulding, 1980).

Tiene un esófago corto, un estómago muy desarrollado, alargado y elástico. El número de apéndices pilóricos varía de 43 a 75, lo que le facilita la absorción de los nutrientes digeridos en el estómago; el intestino es de 2 a 2.5 veces más largo que la

longitud estándar del pez (Honda, 1974). La gamitana es un pez que tiene tolerancia a los niveles bajos de oxígeno disuelto, y utiliza una serie de mecanismos morfológicos, bioquímicos, fisiológicos y de comportamiento para contrarrestar esta deficiencia en su hábitat (Florindo *et al.*, 2006), también ha sido señalada como una especie altamente resistente a las enfermedades (Gonzalez y Heredia, 1998).



**Fig. 1. Gamitana (*Colossoma macropomum*)**

### 1.3 DISTRIBUCIÓN GEOGRÁFICA

Se distribuye en las cuencas del Amazonas y del Orinoco. La gamitana es un pez de comportamiento migratorio, que se desplaza aguas arriba en la época de verano en procura de mejores condiciones para su sobrevivencia, a la vez que se prepara para su reproducción que se desarrolla cíclicamente cada año durante el invierno, con la crecida de los ríos la gamitana va dejando sus huevos fertilizados en la margen de éstos y en zonas recién inundadas, donde crecerán los alevines (Useche, 2000).

### 1.4 HÁBITO ALIMENTICIO

Tiene un régimen alimenticio omnívoro. El alimento natural de la gamitana varía con las estaciones de creciente y vaciante. En la estación de creciente, los árboles, arbustos, etc., de los bosques inundados proporcionan gran variedad y cantidad de

frutas, nueces, y granos. Cuando termina la creciente y el agua baja, se tornan escasos las semillas y frutos, convirtiéndose el plancton en el alimento natural más importante, consume también insectos acuáticos y peces pequeños (Woynarovich y Woynarovich, 1998).

## 1.5 REPRODUCCIÓN

Se reproduce al inicio de la creciente de los ríos, que viene a ser en los meses de septiembre a febrero, donde se dan condiciones físicas-químicas apropiadas, así como la subida de temperatura, nivel del río y precipitación fluvial (Woynarovich y Woynarovich, 1998; Penna *et al.*, 2005).

Es una especie muy fecunda llegando a producir, cada hembra, 100.000 óvulos por cada kilogramo de peso corporal. En cautiverio se da la maduración gonadal pero no llega a desovar, habiendo la necesidad de recurrir a la administración de extractos hormonales, técnica que ha sido incorporada al proceso de producción de alevinos en ambiente controlado (Guerra *et al.*, 2000). La gamitana alcanza la madurez sexual y está apta para la reproducción entre los 5 años (machos) y los 6 años (hembras). Bajo condiciones adecuadas en los estanques piscícolas, algunas hembras pueden llegar a la madurez sexual un año antes (Woynarovich y Woynarovich, 1998).

## 2. ANATOMÍA E HISTOLOGÍA DEL HÍGADO, BAZO, RIÑÓN, ESTÓMAGO, BRANQUIAS Y MÚSCULO DE LOS TELEÓSTEOS

### 2.1 HÍGADO

Se encuentra ubicado en la parte anterior de la cavidad peritoneal, presenta un color marrón a rojo vinoso. El hígado esta presente como un órgano simple en varios teleosteos pero en algunas especies se ha observado que el tejido pancreático se ubica alrededor de la vena porta o sus ramificaciones, llamándosele hepatopáncreas (Ellis *et al.*, 1981; Hibiya, 1982). Su superficie esta cubierta por una membrana serosa de tejido conectivo que se extiende hacia el parénquima (Hibiya, 1982; Noga, 2000).



Al igual que en los mamíferos, la arteria hepática y la vena porta ingresan al hígado, ésta última trae sangre venosa proveniente del estómago e intestino para luego ramificarse en capilares llamados sinusoides (Hibiya, 1982; Akiyoshi y Inoue, 2004). Entre los sinusoides se encuentran los hepatocitos, que pueden estar dispuestos a manera de cordones, túbulos o en varias capas, según estudios de la arquitectura hepática realizados en diferentes especies de teleósteos (Akiyoshi y Inoue, 2004). Los hepatocitos son poligonales, prominente núcleo esférico central, un nucleolo, organelas, y alto contenido de glucógeno y lípidos en el citoplasma (Ellis *et al.*, 1981; Hibiya, 1982, Vicentini *et al.*, 2005).

Las venas centrales y tríadas portales encontradas en los mamíferos, no son claramente identificadas en algunas especies de peces (Rocha *et al.*, 1994).

Los conductos biliares se ubican cerca a la vena porta, son canalículos intracelulares e intercelulares que forman el conducto biliar, el cual se une al conducto hepático que desemboca en el duodeno; en varias especies de peces el conducto hepático tiene una ramificación que desemboca en la vesícula biliar, llamada conducto cístico (Hibiya, 1982, Vicentini *et al.*, 2005).

Histológicamente las paredes de los conductos biliares están revestidas por un epitelio cúbico simple, soportado por una capa de tejido conectivo y fibras musculares (Hibiya, 1982; Vicentini *et al.*, 2005), se ha observado la presencia de melanomacrófagos alrededor de canalículos biliares, arterias y venas; así mismo la ausencia de células de Kupffer (Ellis *et al.*, 1981; Rocha *et al.*, 1994).

## 2.2 BAZO

Se encuentra ubicado cerca de la curvatura mayor del estómago o de la flexura intestinal, presenta un color rojo oscuro o negro, en algunas especies puede tener dos o más lóbulos pequeños, o variar individualmente; es posible encontrar tejido pancreático en la zona subcapsular del bazo y su superficie esta cubierta por una membrana serosa compuesta principalmente de tejido conectivo, que se extiende escasamente hacia el interior formando una red de membrana serosa que se extiende al parénquima formando

trabéculas que separan la pulpa roja de la pulpa blanca (Ellis *et al.*, 1981; Hibiya, 1982; Ferguson, 2006).

Al igual que en los mamíferos esta formado por vasos sanguíneos, pulpa roja, pulpa blanca y elipsoides (Ferguson, 2006). En los teleósteos no hay una clara diferencia entre la pulpa roja y la pulpa blanca, como lo es en mamíferos. Ambas partes se encuentran difusas (Hibiya, 1982).

La pulpa roja es un sistema interconectado de cordones esplénicos y de sinusoides, los primeros son células reticulares con varios focos de eritrocitos y los segundos son vasos conteniendo eritrocitos y trombocitos; y la pulpa blanca consiste de células linfoides, centros melanomacrófagos y elipsoides (Ferguson, 2006).

El melanomacrófago es una célula inmune característica de teleósteos, y se ha observado frecuentemente en el bazo. Es un fagocito conteniendo varias cantidades de pigmentos (melanina, hemosiderina, ceroides o lipofucsina) que se localizan en vacuolas (Ferguson, 2006).

En algunos teleósteos se forman focos encapsulados conocidos como centros melanomacrófagos, que a menudo se encuentran próximos a los vasos sanguíneos. A diferencia de los salmónidos, donde estas células son típicamente solitarias, los melanomacrófagos y centros melanomacrófagos además del bazo se pueden encontrar en el riñón, hígado y varios otros órganos (Ferguson, 2006). El número y medida de estos centros melanomacrófagos, como la coloración característica pueden variar con la edad, sexo, infecciones y estresantes. Generalmente aumentan de medida y se tornan más oscuros y más numerosos con la edad y en enfermedad (Ferguson, 2006). Se ha sugerido que pueden ser indicadores de la calidad del agua (Agius y Roberts, 2003)

Los elipsoides son una vaina de macrófagos y células reticulares soportadas por fibras de reticulita que rodean la red de capilares que se originan de la arteria esplénica, son lugares de filtración de partículas y son transportadas por los macrófagos a los centros melanomacrófagos, que se localizan cerca de los vasos (Ellis *et al.*, 1981; Ferguson, 2006).

## 2.3 RIÑÓN

Se encuentra ubicado retroperitonealmente, hacia arriba y adosado en la región ventral de la columna vertebral, presenta un color marrón, rojo oscuro o negro (Ellis *et al.*, 1981; Noga, 2000; Reimshuessel, 2001), su anatomía puede variar según las especies de teleósteos, pudiendo ser lobulado o fusionado, haciéndose esta variación más marcada entre especies de agua dulce y especies marinas (Reimshuessel, 2001).

La porción anterior del riñón denominada cabeza, posee tejido hematopoyético, linfoide y endocrino; y la parte posterior denominada cuerpo posee tejido excretor rodeado de tejido hematopoyético y linfoide (Reimshuessel, 2001; Meyer *et al.*, 2002).

El tejido intersticial ubicado en la parte anterior y entre los túbulos de la parte posterior del riñón está compuesto por tejido hematopoyético, conteniendo glóbulos rojos en diferentes estados de mitosis, sinusoides, capilares, centros melanomacrófagos, pigmentos de hemosiderina y melanina (Hibiya, 1982; Meyer *et al.*, 2002).

En la mayoría de los peces el nefrón se encuentra formado por el corpúsculo renal (Glomérulo y cápsula de Bowman), el túbulo renal (cuello, segmentos proximales, un segmento intermedio, y un segmento distal que está ausente en peces marinos) y los túbulos colectores (Hibiya, 1982).

El corpúsculo renal está formado por el glomérulo y la cápsula de Bowman formada por una capa parietal de tejido epitelial plano simple y una visceral formada por células con prolongaciones llamadas podocitos, las cuales se adhieren a los capilares del glomérulo (Hibiya, 1982). El segmento del cuello está revestido por una capa de epitelio columnar simple ciliado, el segmento proximal se divide en los segmentos I y II; el primero está revestido por epitelio columnar simple ciliado con abundantes microvellosidades, el núcleo es oval o esférico y puede estar ubicado en posición central o basal, el segundo segmento es similar al primero, diferenciándose sólo en un mayor diámetro de los túbulos, lumen estrecho y mayor cantidad de mitocondrias. El segmento distal no presenta casi microvellosidades en su epitelio, el núcleo es oval o esférico y en posición basal, estas características se mantienen en los tubúlos colectores (Ellis, 1981; Hibiya, 1982).

## 2.4 BRANQUIAS

Es un órgano que presenta varias funciones, entre ellas destacan el intercambio gaseoso, osmoregulación, equilibrio ácido-base y excreción de productos nitrogenados (Noga, 2000; Evans *et al.*, 2005). Se encuentra irrigado por la arteria branquial aferente que proviene de la aorta ventral, diseminándose la sangre a través de capilares para oxigenarse en las laminillas secundarias, luego la sangre oxigenada en los capilares confluye en la arteria branquial eferente, la cual se dirige a la arteria aorta dorsal para irrigación sistémica (Evans *et al.*, 2005).

Están formadas en la mayoría de los teleósteos por cuatro a cinco arcos branquiales, ubicados a cada lado de la faringe, en el borde posterior de cada arco branquial se proyectan los filamentos branquiales o laminillas primarias, las cuales para aumentar la superficie respiratoria presentan laminillas secundarias dispuestas en la parte superior e inferior de cada filamento (Amlacher, 1961; Ellis, 1981).

La superficie de las branquias está cubierta con un epitelio simple plano, presentando tres tipos de células: células pavimentosas, un menor número de células del cloro, estas últimas de forma redondeadas o poligonales, acidófilas, con numerosas mitocondrias y ubicándose en el extremo proximal de las laminillas secundarias, y células mucosas dispuestas en las laminillas y en el epitelio basal. También se describen las células pilares, que soportan los múltiples capilares distribuidos en las laminillas secundarias (Hibiya, 1982; Evans *et al.*, 1999; Evans *et al.*, 2005).

## 2.5 ESTÓMAGO

Varía en dimensiones en las diferentes especies de teleósteos. Generalmente, es en forma de saco extensible, sigmoide, recubierto de numerosos pliegues y con paredes musculares desarrolladas. A partir del cardias el tejido muscular estriado del tracto digestivo anterior cambia a tejido muscular liso (Ellis *et al.*, 1981). El estómago tiene la porción cardíaca, el saco ciego y la porción pilórica. El epitelio de la mucosa es simple y con pliegues, siendo un epitelio simple cuboidal en la porción cardíaca y columnar alto con los pliegues más profundos en las dos últimas porciones (Hibiya, 1982).

La lámina propia contiene las glándulas gástricas soportadas por tejido conectivo laxo, que se abren en las criptas de los pliegues de la mucosa (Ellis *et al.*, 1981; Hibiya, 1982). En los salmonídeos se puede distinguir las siguientes zonas: Mucosa, submucosa, muscular y serosa. La mucosa consta de un epitelio, lámina propia y muscular de la mucosa. Se pueden observar los estratos granular y compacto en la lámina propia. La muscular tiene la capa circular interna y la capa longitudinal externa (Hibiya, 1982).

Algunas especies de teleósteos no presentan estómago. Los salmónidos, presentan los ciegos pilóricos, que son divertículos que se originan en el intestino ascendente, cuyo número pueden variar de setenta o más. Sus características histológicas son similares al intestino ascendente (Ellis *et al.*, 1981). En el caso de la gamitana presenta un estómago muy desarrollado, alargado y elástico, cuyo número de apéndices pilóricos varía de 43 a 75 (Honda, 1974).

## 2.6 MÚSCULO

Al igual que el músculo de otros vertebrados, el de los teleósteos está compuesto por fibras musculares. Se reconocen dos clases de músculo: liso y estriado, dividiéndose este último en esquelético y cardíaco (Hibiya, 1982).

La musculatura lateral es un típico ejemplo del músculo estriado en teleósteos, consistiendo en capas de fibras musculares dispuestas a ambos lados del cuerpo desde la cabeza hacia la cola. El tejido conectivo se halla dispuesto entre el tejido muscular formando mioseptos. Los peces poseen dos tipos de fibras locomotoras dispuestas en capas: Fibras rojas o lentas y fibras blancas o rápidas; también existe una capa de fibras intermedias (Altringham y Ellerby, 1999; Ellerby *et al.*, 2000; Rescan *et al.*, 2001; Kiessling *et al.*, 2006). Las fibras están compuestas de sarcoplasma, miofibrillas, núcleo y sarcolema. El núcleo está siempre ubicado al lado del sarcolema, puede haber más de un núcleo en una fibra muscular. Las fibras rojas o de contracción lenta son altamente vascularizadas, alta cantidad de mitocondrias, gotas lipídicas y reservas de glucógeno. También alta concentración de mioglobina y citocromos. A diferencia de éstas, las fibras blancas o de contracción rápida con baja cantidad de mitocondrias, gotas

lipídicas, glucógeno y mioglobina; son de pobre vascularización (Hibiya, 1982; Kiessling *et al.*, 2006).

### 3. MECANISMOS DE DEFENSA DE LOS PECES

Al igual que todos los vertebrados, los peces tienen órganos centrales de respuesta inmune con sus particularidades (Tort *et al.*, 2003). La mayoría de órganos primarios y secundarios presentes en mamíferos se encuentran en los peces, a excepción de los nódulos linfáticos y la médula ósea, por lo cual la hematopoyesis se realiza en el riñón anterior y bazo (Huttenhuis, 2005).

El timo, el riñón y el bazo son los más importantes órganos linfoides en teleosteos (Zapata *et al.*, 2006). El timo es un órgano situado cerca de la cavidad opercular, que produce linfocitos T encargados del rechazo de injertos, estimulación de la fagocitosis y estimulación de la producción de inmunoglobulinas producidas por las células B (Tort *et al.*, 2003). Se ha observado linfocitos en división en el riñón y en el timo, lo que sugiere que estos órganos sean primarios. En el bazo se han observado menos linfocitos, lo que sugiere un rol secundario en la respuesta inmune (Ellis, 1981).

El riñón anterior no tiene función renal, además de la función hematopoyética y de respuesta inmune, esta porción tiene función endocrina; liberando corticosteroides y otras hormonas, la porción media y posterior tienen función renal y de respuesta inmune (Reimschuessel, 2001; Zwollo *et al.*, 2005)

Las células inmunes de los peces muestran las mismas características que otros vertebrados, habiéndose determinado familias de células linfoides y mieloides; no obstante, todavía hay controversia respecto a su clasificación (Hibiya, 1982; Tort *et al.*, 2003). La inmunidad en peces puede ser no específica, o específica adquirida. Siendo de mayor importancia la primera. (Swain *et al.*, 2007).

El mucus es la primera barrera física de los peces, en la mayoría cubriendo las superficies externas, principalmente la piel, aislando al pez de los microorganismos que se encuentran en el agua. Forma parte del mecanismo inmune innato y actúa como una barrera química ya que contiene enzimas, complemento y anticuerpos que eliminan los agentes patógenos (Kinkelin *et al.*, 1991; López-Dóriga y Martínez, 1998). La lisozima

es uno de las principales enzimas estudiadas en peces, es liberada por leucocitos y posee la capacidad de actuar en las paredes celulares de las bacterias provocando la lisis de éstas, y aumentando en situaciones de estrés (Tort *et al.*, 2003). Otros mediadores inmunes son las lectinas, éstas proteínas tienen la habilidad de unirse a carbohidratos presentes en las paredes celulares, y relacionadas a la activación del sistema de complemento (Tort *et al.*, 2003).

El sistema de complemento es importante en la respuesta inmune innata de los peces, ya que a diferencia de los mamíferos los peces poseen varias isoformas activas de la molécula C3 (Tort *et al.*, 2003), relacionado a la capacidad de reconocimiento inmune innato, para así reforzar su grado de respuesta ante patógenos (Sunyer *et al.*, 1997).

La respuesta inmune específica o adaptativa esta representada por la IgM, la principal inmunoglobulina encontrada en peces (Sunyer *et al.*, 1997). Es una IgM tetramérica, siendo diferente a la estructura pentamérica de la IgM de mamíferos, no habiendo evidencia de diversidad de inmunoglobulinas, como en los mamíferos (Ellis, 1981; Hordvik *et al.*, 1999; Tort *et al.*, 2003).

Las citoquinas son importantes para la activación de mecanismos de respuesta inmune innata y adaptativa, se han estudiado poco en peces, habiendo sido caracterizada la interleucina 1 $\beta$  en peces cartilaginosos y óseos al igual que en mamíferos, anfibios y aves (Mulero *et al.*, 2005). Otra citoquina reportada principalmente ha sido el Factor de Necrosis Tumoral alpha (FNT $\alpha$ ) (Tort *et al.*, 2003; Mulero *et al.*, 2005).

## 4. ENFERMEDADES EN PECES AMAZÓNICOS

### 4.1 GENERALIDADES

Los peces de agua dulce en condiciones naturales o de cultivo son susceptibles a agentes virales, bacterianos, micóticos y parasitarios, conocidos como patógenos facultativos, ya que conviven con los peces sin ocasionarles daño, pero si se presentan condiciones desfavorables en el medio donde habitan, los peces disminuyen su

capacidad de defensa, y los microorganismos infectan al hospedero produciéndose trastornos patológicos (Centeno *et al.*, 2004).

En instalaciones de cultivo se pueden presentar algunas condiciones desfavorables que incrementan a los patógenos tales como una disminución en el contenido de oxígeno disuelto en el agua, variaciones de temperatura, hacinamiento por altas densidades o elementos tóxicos en el agua, los que influyen en la respuesta inmunológica del pez y favorecen la invasión, adhesión, colonización y toxicidad de patógenos (Gonzalez y Heredia, 1998).

En los peces del género *Colossoma*, es común encontrarse frente a cuadros clínicos originados por más de un organismo, lo que se denominan infecciones mixtas. La edad o el tamaño del pez pueden determinar una mayor o menor incidencia de infección o infestación por microorganismos o parásitos, reflejándose en el estado clínico que presenta el animal. Se ha reportado una mayor mortalidad en huevos y larvas, debido a infecciones e infestaciones mixtas producidas por bacterias, hongos y protozoarios (Conroy, 1989).

## 4.2 ENFERMEDADES DE ORIGEN INFECCIOSO

### 4.2.1 ENFERMEDADES BACTERIANAS

#### 4.2.1.1 ENFERMEDAD POR *Flavobacterium columnare*

Todos los peces son susceptibles a alguna forma de enfermedad causada por el género *Flavobacterium spp.* Estos microorganismos son considerados ubicuos en el medio ambiente acuático, ocasionando enfermedad en peces sometidos a algún tipo de estrés (Shotts y Starliper, 1999).

Una de las enfermedades más temibles en el cultivo de *Colossoma spp.* es la producida por *Flavobacterium columnare*. Reportes en Venezuela indican altos índices de mortalidad en sistemas de cultivo en jaulas. En la actualidad se están realizando programas de vacunación, usando bacterinas (Conroy, 1989).



Es un bacilo aerobio, gram-negativo, que mide  $0.5\mu$  de ancho X  $12\mu$  o más de largo, es móvil. Las colonias son pigmentadas (amarillo a naranja), variando en forma dependiendo del aislamiento y medio de crecimiento (Richards y Roberts, 1981; Shotts y Starliper, 1999).

La infección por *F. columnare* se inicia en la boca, aletas y branquias, como sitios primarios, pero pueden estar comprometidas otras partes del cuerpo. El periodo de incubación varía con la cepa, estado físico del pez o por la ruta de exposición. La enfermedad se ha reportado usualmente en cultivos con temperaturas entre 10 a 30 °C (Shotts y Starliper, 1999).

Hay un incremento del moco, las branquias presentan placas blanquecinas en la punta de los filamentos, llevando a una necrosis del epitelio, estas lesiones están rodeadas de zonas rojizas, pudiéndose volver necróticas, lo que lleva a una bacteriemia y muerte. En la piel estas lesiones se transforman en úlceras hemorrágicas, presentando un color amarillo o marrón (Richards y Roberts, 1981; Shotts y Starliper, 1999).

#### 4.2.1.2 ENFERMEDAD POR *Aeromonas hydrophila*

Las *Aeromonas spp.* son bacterias ubicuas responsables de un amplio rango de enfermedades en organismos homeotérmicos y poiquilotérmicos, incluyendo a los humanos (Kozinka *et al.*, 2002). Las *Aeromonas* móviles son una de las más importantes, destacando entre ellas la *Aeromonas hydrophila*, la cual es responsable de la septicemia hemorrágica en peces (Paniagua *et al.*, 1990).

Los brotes de la enfermedad son usualmente asociados con un cambio en las condiciones medioambientales, factores estresantes como una sobrepoblación de peces, alta temperatura, repentinos cambios de temperatura, manejo inadecuado, bajo oxígeno disuelto, estado pobre nutricional o infecciones fúngicas o por parásitos, contribuyen a cambios fisiológicos y aumentan la susceptibilidad a infecciones (Aoki, 1999).

La *Aeromonas hydrophila* es un habitante normal de la microflora del tracto intestinal de peces (Cipriano *et al.*, 1984), es anaerobia facultativa, gram-negativa de forma bacilar, es móvil, mide  $0.1-3\mu\text{m}$  de diámetro y  $1-3.5\mu\text{m}$  de longitud, no esporula

ni posee cápsula. La temperatura óptima de crecimiento es de 28°C, pero puede crecer a 37°C. Las colonias en los agaros son de una coloración blanca a rosado pálido, redondas y convexas, con bordes definidos. Son positivas a las reacciones de citocromo oxidasa y catalasa (MacInnes *et al.*, 1979).

Esta bacteria es transmitida vía horizontal, está presente en el agua y sedimentos de los estanques. Puede ser transmitido por descargas intestinales, por lesiones en la piel, y favorecidas por infecciones de la epidermis ocasionadas por parásitos u hongos (Aoki, 1999).

La severidad de la enfermedad depende de diferentes factores, que incluyen la virulencia de microorganismo, el grado de resistencia genética y condición fisiológica del hospedador, así como al estrés (Cipriano *et al.*, 1984; Aoki, 1999).

La enfermedad aguda podría llevar a una septicemia, que lleve a la muerte del animal antes de que presente los signos clínicos. Generalmente no hay signos específicos, los peces afectados presentan lesiones en la piel que incluyen áreas de hemorragias y necrosis, enrojecimiento y ulceraciones en la piel, exoftalmia, abdomen distendido, también otros órganos comúnmente afectados incluyen las branquias, riñones, hígado, bazo, páncreas y corazón (Cipriano *et al.*, 1984; Aoki, 1999; Noga, 2000).

#### 4.2.1.3 ENFERMEDAD POR *Edwardsiella tarda*

Esta enfermedad afecta a un amplio rango de peces, anfibios, reptiles, aves, mamíferos incluyendo a los humanos, en los cuales se ha reportado gastroenteritis. Esta enfermedad puede ser aguda o crónica, y ocasiona alta mortalidad en peces (Sahoo *et al.*, 2000; Najiah *et al.*, 2006). Afecta principalmente a anguilas y al pez gato (Meyer y Bullock, 1973).

*Edwardsiella tarda* es ubicua, pudiendo ser aislada del agua, barro, peces sanos y enfermos; puede volverse patogénica bajo condiciones desfavorables en el ambiente del pez, así como de factores estresantes (Baird *et al.*, 2003; Najiah *et al.*, 2006). *Edwardsiella tarda* pertenece a la familia *Enterobacteriaceae*, es un bacilo gram

negativo flagelado, positivo a catalasa e indol, oxidasa negativo, produce H<sub>2</sub>S e indol y fermenta la glucosa, puede ser aislado de lesiones en riñón de peces enfermos (Meyer y Bullock, 1973; Sechter *et al.*, 1983).

En infecciones leves, solo hay pequeñas lesiones cutáneas ubicadas posterior y lateral al cuerpo, en casos agudos los abscesos aumentan en medida y forman cavidades llenas de gas, que se observan como áreas convexas o hinchadas, también es común la pérdida de pigmentación en las lesiones (Meyer y Bullock, 1973).

## 4.2.2 ENFERMEDADES FÚNGICAS

### 4.2.2.1 SAPROLEGNIASIS

La saprolegniasis causa importantes mortalidades en larvas y juveniles de *Colossoma macropomum* (Conroy, 1989). *Saprolegnia parasitica* ha sido reconocida como la principal especie patógena de organismos relacionados con hongos en peces (Zaror *et al.*, 2004).

La infección micótica del pez depende de factores ambientales y de manejo que conllevan a un estrés que predisponen a la dermatomicosis (Conroy, 1989). Se ha considerado por mucho tiempo a los hongos causantes de la saprolegniasis como invasores secundarios, debido a la aparición de lesiones después del manejo de los peces, daños traumáticos, sobrepoblación y enfermedades víricas o bacterianas (Richards, 1981).

Los saprolegniáceos son de la clase Oomycetos, poseen un micelio aseptado, ramificado. Las hifas varían de diámetro según las especies. Su reproducción asexual se realiza por medio de zoosporas biflageladas, las que se encuentran generalmente en el agua dulce (Richards, 1981). *Saprolegnia* no sobrevive en ambientes con alta concentración de sal, por lo que se le considera una enfermedad de peces de agua dulce (Zaror *et al.*, 2004). Clínicamente se caracteriza por la presencia de masas de hifas, formando un micelio denso y de color blanquecino grisáceo a nivel de la piel, branquias y las aletas, observándose bajo el agua de un aspecto algodonoso (Richards, 1981; Conroy, 1989).

## 4.2.3 ENFERMEDADES PARASITARIAS

### 4.2.3.1 MIXOSPORIDIASIS

Los parásitos responsables de esta enfermedad son los mixosporidios, los cuales son del Phylum Myxozoa, Clase Myxosporea y orden Bivalvulida, son restrictos a invertebrados y vertebrados poiquilotermos, la gran mayoría infecta a los peces (Martins *et al.*, 1999; Noga, 2000; Azevedo y Matos, 2003; Barassa *et al.*, 2003), e incluyen unas cuantas especies que afectan también a anfibios y reptiles (Feist y Longshaw, 2000; Eiras, 2005). Pocas especies de mixosporidios causan síntomas graves, sin embargo algunas son severos patógenos de teleósteos, produciendo importantes impactos económicos y ecológicos en poblaciones de peces en Europa y USA (Kallert, 2006). Los géneros *Henneguya* y *Myxobolus* son unos de los mas importantes patógenos en peces marinos y de agua dulce (Azevedo y Matos, 2003; Eiras *et al.*, 2005). En Sudamérica, *Henneguya* es la especie más común, con 31 especies (Barassa *et al.*, 2003).

Los Myxosporea usualmente miden (10-25 $\mu$ m las mixoesporas, y 300 $\mu$ m las actinoesporas) presentando una gran diversidad en formas y variación morfológica (Kallert, 2006). Una de las más importantes características de los Myxosporea es que, excepto durante la autogamia (reproducción sexual), todos los estadios son formas multinucleadas que tienen células envoltentes (primarias) que contienen células envueltas (secundarias) (Noga, 2000).

El ciclo de vida de los Myxosporea toma lugar en dos hospederos, existiendo dos fases: Mixospora y actinospora. En la primera se realiza la multiplicación del parásito, y se desarrolla en vertebrados menores, siendo los peces los más comunes; en la segunda envuelve un proceso sexual, y se desarrolla en invertebrados, principalmente en anélidos (Wolf y Markiw, 1984).

La actinoesporas liberadas de los anélidos, ingresan en el pez por la piel o por el epitelio branquial, las cápsulas polares descargan sus filamentos polares, fijándola al hospedero. Luego las válvulas se abren, y el esporoplasma ingresa a través de aberturas en células epidermales y del epitelio. Posteriormente, siguen las fases intracelulares o

intercelulares previas a la esporogonia, para migrar luego al lugar de desarrollo de la fase de esporogonia (quiste o plasmodium), el cual contiene núcleos vegetativos, células esporogónicas y pericitos; siendo éstas dos últimas responsables de la esporogonia, dividiéndose y formando las diversas estructuras de la espora madura. El pericito en unión con las células esporogónicas son llamados panesporoblastos. Los estadios plasmodiales pueden ser formas histozoicas (ubicadas en los espacios intercelulares, vasos sanguíneos o intracelularmente) y formas celozoicas (ubicadas en cavidades orgánicas) Las mixoesporas contienen generalmente de una a cuatro cápsulas polares, uno o dos esporoplasmas y un armazón con dos a tres válvulas (Noga, 2000; Lom y Dyková, 2006). Se cree que las mixoesporas son liberadas cuando el pez muere, siendo ingeridas por invertebrados tales como los anélidos. En estos hospederos se realiza la fase sexual, el esporoplasma de la mixospora inicia una merogonia, gametogonia y esporogonia, para finalmente formar las actinoesporas (Kallert, 2006; Lom y Dyková, 2006).

#### 4.2.3.2 ENFERMEDAD POR *Ichthyophthrius multifiliis*

El *Ichthyophthrius multifiliis* es un protozooario ciliado que infecta la piel y branquias de los peces de agua dulce, causando una enfermedad de alta importancia económica conocida como “Ich” o “Enfermedad de la mancha blanca”. Alta morbilidad y mortalidad se dan en acuarios o estanques donde hay una sobrepoblación de peces (Maki *et al.*, 2001).

El ciclo de vida es directo, no requiriendo de un hospedador intermediario. El trofante (forma parasítica) se ubica dentro del hospedero, luego este estadio madura y se libera del pez formando los tomites (forma reproductiva), el cual forma una pared quística fijándose en cualquier superficie en el agua; en el interior del quiste se producen más de 3000 tomites, que son liberados al completar su desarrollo, convirtiéndose en terontes (forma infectiva), los cuales invadirán un nuevo hospedero, penetrando a través del epitelio de la piel, branquias y aletas (Elsayed *et al.*, 2006).

El trofante es de un 1mm de diámetro, éste forma las llamadas manchas blancas, sin embargo en una de estas manchas puede haber agregaciones de trofantes, aumentando el tamaño de ésta. Severos daños en el epitelio de la piel del pez se

producen durante la infección y liberación de los parásitos, lo que conlleva a reducción de los procesos de osmoregulación e intercambio de iones y a infecciones secundarias, los que originan la muerte del pez (Elsayed *et al.*, 2006).

#### 4.2.3.3 ENFERMEDAD POR PARÁSITOS MONOGENEOS

Los monogeneos parasitan gran cantidad de peces marinos y continentales que ocasionan grandes pérdidas económicas en los sistemas de producción piscícolas del mundo (Flores y Flores, 2003), siendo los de mayor riesgo los monogeneos que parasitan las branquias, debido a la fragilidad y contacto directo de este órgano con el medio acuático (Fuentes, 1998).

Son de cuerpo aplanado, boca en forma de ventosa, en el extremo posterior presentan un órgano adhesivo que pueden presentar ganchos que se adhieren al huésped (Soulsby, 1987). Los parásitos son vivíparos u ovíparos y tienen un ciclo biológico directo, los huevos suelen ser operculados, con filamentos en ambos polos que se adhieren a las laminillas branquiales (Flores y Flores, 2003).

Los parásitos adultos se localizan principalmente en branquias, piel, aletas, y cavidad bucal de los peces, donde ovipositan; después de la puesta, los adultos mueren y el desarrollo de los huevos se produce en el hospedero, finalmente los huevos darán origen a las formas larvianas que nadan para buscar un nuevo huésped (Soulsby, 1987; Flores y Flores, 2003).

Los signos de las enfermedades ocasionadas por los monogeneos dependen de la intensidad de la infección. En casos de una carga parasitaria leve no se manifestarán signos clínicos, aunque habrá una disminución de la fertilidad y un retardo en el crecimiento, en severas cargas parasitarias habrá una marcada pérdida de peso y alta mortalidad. También los peces parasitados por monogeneos presentan necrosis y heridas sangrantes en tegumento y branquias (Flores y Flores, 2003).

## 4.3 ENFERMEDADES DE ORIGEN NO INFECCIOSO

### 4.3.1 Por la calidad del agua

#### 4.3.1.1 Amoníaco

El amoníaco es el producto final del catabolismo proteico de los organismos acuáticos y es un contaminante común en los sistemas acuáticos, llegando a ser tóxico para los peces en su forma no ionizada, especialmente en temperaturas altas y pH altos, teniendo consecuencias negativas para el desarrollo y sobrevivencia de los peces, su efecto negativo de la toxicidad en organismos acuáticos es atribuido al amoníaco en su forma no ionizada (NH<sub>3</sub>). (Ismiño y Araujo-Lima, 2002).

#### 4.3.1.2 Oxígeno Disuelto

El contenido del oxígeno disuelto en el agua de los estanques es sin duda alguna el más crítico entre los factores de calidad del agua; ya que si los niveles de concentración de oxígeno son bajos, los peces se ven afectados y no comen y aún recuperando el nivel apropiado este comportamiento se prolonga por algún tiempo más, haciendo a los peces susceptibles a las enfermedades afectadas, dando como resultado la disminución o paralización de la tasa de crecimiento (Francis-Floyd, 2003).

Algunas especies, como la "gamitana" y "paco" pueden tolerar niveles bajos de oxígeno disuelto (Florindo *et al.*, 2006).

#### 4.3.1.3 pH

No hay un rango definitivo de pH para un óptimo cultivo de peces, pero un pH entre 5 y 9 es no tóxico para la mayoría de peces, valores de pH inferiores a 5, podrían ocasionar retardo en el crecimiento, mortalidad y problemas en la reproducción de los peces; valores de pH alcalino han sido menos estudiados (Witters, 1998).

#### 4.3.2 Por Factores Nutricionales

Son de importancia en cultivos piscícolas donde las especies son alimentadas con dietas artificiales, ya que pueden ocasionar un desequilibrio en los nutrientes o poseer factores contaminantes o tóxicos (Corral *et al.*, 2000).

Un exceso de lípidos provoca acumulación de grasa en el hígado, riñón y bazo, tumefacción, degeneración y coloración amarillenta del hígado, anemia, estenosis intestinal y pérdida de peso, mientras que la carencia lipídica causa una detención del crecimiento, necrosis de las aletas, despigmentación y edema cutáneo, degeneración hepática y renal, anemia, alteración en la natación (Corral *et al.*, 2000). Un exceso de proteínas, produce un aumento del gasto energético para la excreción de nitrógeno, lo que conlleva a una merma del crecimiento, mientras que las deficiencias producen una baja en el sistema inmunitario y pérdida del crecimiento (Cowey y Roberts, 1981; Corral *et al.*, 2000). Un exceso de carbohidratos ocasiona un incremento del glucógeno hepático, ocasionando degeneración hepática, degeneración pancreocítica, infiltración grasa en el riñón, retraso del crecimiento, mientras que la carencia ocasiona reducción del crecimiento (Cowey y Roberts, 1981; Corral *et al.*, 2000). La deficiencia en vitamina C ocasiona retardo del crecimiento, falta de apetito, alteraciones en la columna espinal, anemia y letargia, así como la deficiencia de Acido Fólico ocasiona anemia eritrocítica, deficiencia en Vitamina A ocasiona retardo del crecimiento, ceguera, hemorragia en las aletas (Cowey y Roberts, 1981).

#### 4.3.3 Neoplasias

Los procesos neoplásicos son de evolución benigna o maligna, siendo menos frecuentes en las condiciones de cultivo que en las poblaciones silvestres, entre las neoplasias benignas se encuentran fibromas, osteomas y lipomas; ente los malignos son más frecuentes los adenocarcinomas y los tumores tiroideos. Las causas de estas afecciones son difíciles de establecer, pudiendo deberse a orígenes genéticos, respuesta a manifestaciones secundarias de enfermedades, factores dietéticos o por manipulación inadecuada (Corral *et al.*, 2000).



### **III. MATERIALES Y MÉTODOS**

#### **1. MATERIALES**

##### **1.1 Relativos a la necropsia**

- Frascos de plástico
- Tijeras
- Guantes
- Pinzas
- Mechero
- Alcohol 70%
- Formalina Tamponada 10%

##### **1.2 Relativos al Proceso Histológico**

- Láminas portaobjetos y cubreobjetos.
- Alcohol Etilico
- Xilol
- Parafina
- Micrótopo
- Hematoxilina
- Eosina

### 1.3 Relativos al Proceso Bacteriológico

- Láminas portaobjetos
- Placas Petri de vidrio
- Frascos de vidrio
- Probeta
- Anzas
- Mechero
- Medios de Transporte Stuart
- Medios de cultivo (XLD, BHI, TSI, Mac Conkey, Yersinia, TSA+ 8% de sangre de ovino desfibrinado + Ampicilina, TSA+ 8% de sangre de ovino desfibrinado).
- Prueba de Oxidasa
- Sistema API
- Peróxido de Hidrógeno
- Fucsina Básica
- Cristal Violeta
- Solución de Lugol

### 1.4 Equipos

Cámara Digital

Estufa

Autoclave

Horno

Microscopio de luz artificial.

## 2. METODOLOGIA

### 2.1 Localización

El muestreo se realizó en la Estación Experimental del IVITA-Pucallpa, ubicada en el distrito de Campo Verde, provincia de Coronel Portillo, departamento de Ucayali. La evaluación bacteriológica e histopatológica de las muestras se realizó en las instalaciones del Laboratorio de Microbiología y Parasitología Veterinaria (Sección Bacteriología) y en el Laboratorio de Embriología, Histología y Patología Veterinaria, ambos de la Facultad de Medicina Veterinaria de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos respectivamente.

### 2.2 Animales

Se utilizó el teorema del límite central, el cual nos indica que el número de muestra debe ser de 30 animales como mínimo. Se seleccionaron 40 gamitanas (*Colossoma macropomum*) aparentemente sanas (reflejo de fuga, sin alteraciones externas alrededor de la piel, aletas y branquias) en fase juvenil y sin distinción de sexo.

### 2.3 Procedimientos

#### 2.3.1 Necropsia

Los animales fueron sacrificados mediante un corte medular, se hizo el examen externo para identificar lesiones o parásitos externos y luego se desinfectó la superficie del pez con alcohol al 70%. Posteriormente, se realizó la necropsia según las técnicas de rutina (Reimschuessel *et al.*, 1988).

#### 2.3.2 Obtención de muestras

Se hizo la identificación in situ antes de proceder a la toma de muestra. Se tomaron de todos los peces las branquias, hígado, riñón, bazo, y estómago, las cuales fueron colocadas en medios de transporte para Cultivos Bacteriológicos (Stuart Medium). Luego se obtuvieron igualmente muestras de branquias, hígado, riñón, bazo,

estómago y músculo para la evaluación histopatológica, que fueron colocadas en frascos con formalina tamponada al 10%.

### 2.3.3 Bacteriología

Se cultivaron cada una de las muestras provenientes de los medios de transporte en medios de cultivo BHI (Brain Heart infusión), TSA (trypticasa soy agar) + 8% de sangre de ovino desfibrinado, TSA+ 8% de sangre de ovino desfibrinado + Ampicilina, y medios selectivos Mac Conkey, Yersinia, XLD (Xylose Lysine Desoxycholate). Posteriormente, se incubaron a 37° C durante 24-48 horas. Finalmente se observó si había crecimiento bacteriano o no.

Se realizó el reconocimiento de colonias morfológicamente y con el uso de la técnica de coloración Gram. Para la identificación se aplicó a las colonias puras, previamente aisladas, pruebas bioquímicas tales como: SIM para movilidad y presencia de residuos de H<sub>2</sub>S e indol, Caldo Urea para la presencia de ureasa, Agar Simmons Citrato para determinar la capacidad de utilizar el citrato como fuente de carbono, TSI medio para determinar la fermentación de carbohidratos (Glucosa, lactosa, sacarosa), Agar Lisina para medir la capacidad de las bacterias de usar al aminoácido lisina como fuente de carbono y finalmente test de sistema de identificación (API 20E y 10S).

### 2.3.4 Histopatología

Las muestras en los frascos con formalina tamponada al 10% fueron procesadas mediante las técnicas de rutina (inclusión en parafina y tinción con H-E).

## 2.4 Análisis de datos

Las alteraciones histopatológicas observadas fueron clasificadas para cada órgano en trastornos inflamatorios, circulatorios, del crecimiento, degenerativos y parasitarios, propuestos por Reimschuessel *et al.* (1992). Éstas alteraciones fueron clasificadas de acuerdo a su extensión. Esta clasificación fue para los siguientes órganos: Hígado, bazo, riñón, branquias, estómago y músculo.

Escaso	Hasta el 25% de la superficie del corte.
Leve	Por encima del 25% hasta 50% del corte.
Moderado	Por encima del 50% hasta 75% del corte.
Severo	Por encima del 75% hasta 100% del corte.

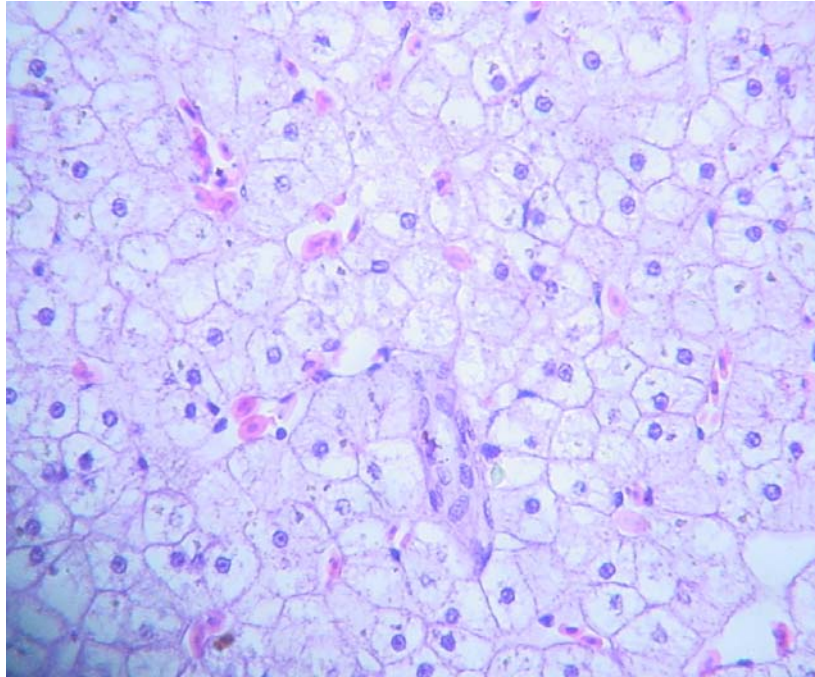
## IV. RESULTADOS

### 1. Histología

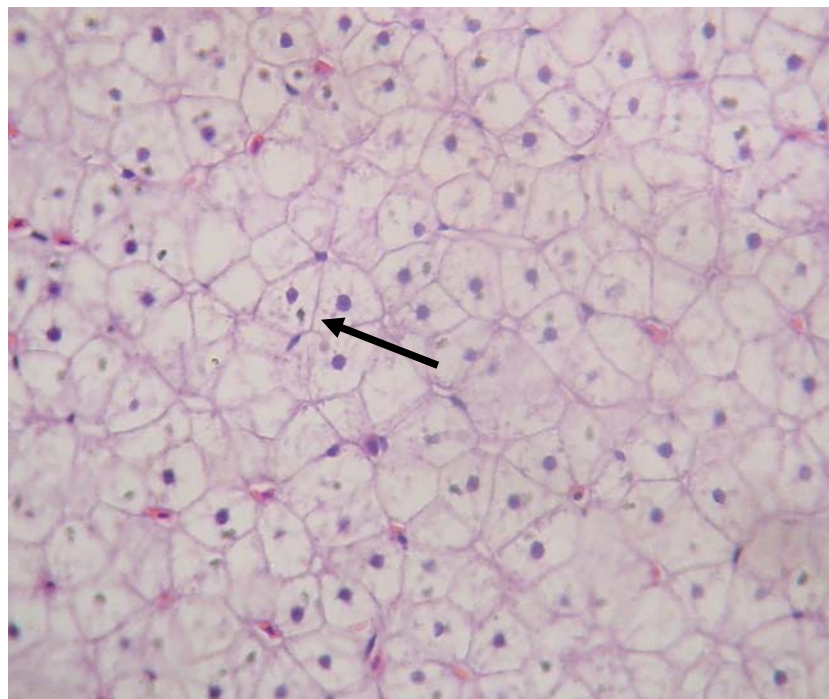
Dentro de las alteraciones histológicas hepáticas (**Cuadro 1**), el trastorno degenerativo más frecuente fue degeneración hidrópica, en un 97.5% (39/40) (**Fig. 2**). La degeneración hidrópica se presentó predominantemente en forma severa (30/40) y moderada (9/40), caracterizándose por la evidencia de microvacuolas de un borde irregular en el citoplasma del hepatocito. También hubo trastornos circulatorios en un 77.5% (31/40). Los hepatocitos mostraron unos pigmentos de coloración marrón negrusca en el interior del citoplasma en el 100% de los animales muestreados (40/40) (**Fig. 3**).

**Cuadro 1. Frecuencia de alteraciones histológicas hepáticas según tipo de trastorno.**

TIPO DE TRASTORNO	LESIONES					ALTERACIÓN	
	Normal	Escaso	Leve	Moderado	Severo	Total	%
<b>CIRCULATORIOS:</b> Congestión	9	18	13	0	0	31/40	77.5
<b>DEGENERATIVOS:</b> Degeneración Hidrópica	1	0	0	9	30	39/40	97.5
<b>OTROS:</b> Pigmentos de coloración marrón negrusca	0	0	40	0	0	40/40	100



**Fig. 2. Hígado de gamitana. Se puede apreciar severa degeneración hidrópica en los hepatocitos. H&E. x40**



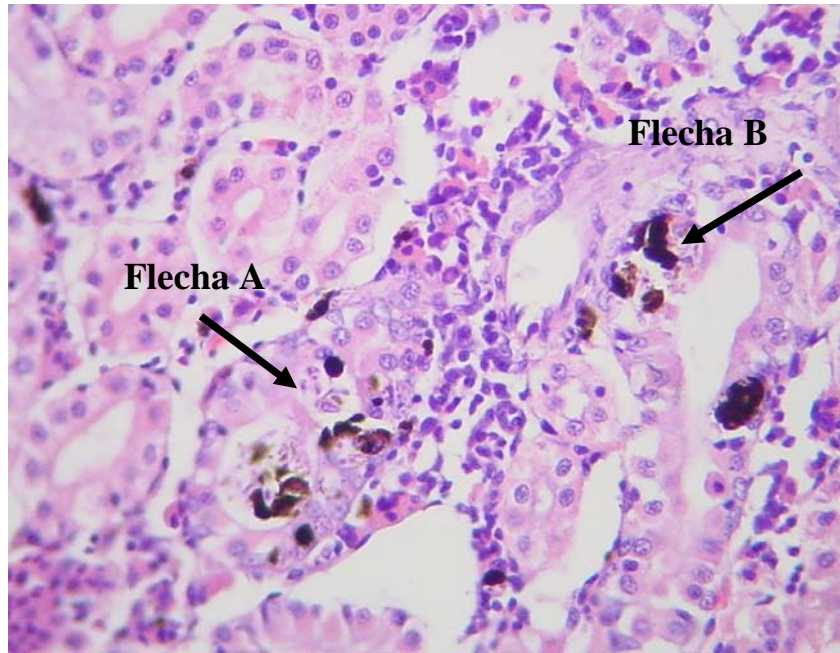
**Fig. 3. Hígado de gamitana. Pigmentos de coloración marrón negrusca encontrados en el citoplasma de los hepatocitos (Flecha). H&E. x40**

Dentro de las alteraciones histológicas renales (**Cuadro 2**), los trastornos degenerativos más frecuentes fueron degeneración hidrópica y necrosis tubular en un 100% (40/40) (**Fig. 4**). El trastorno del crecimiento hallado fue regeneración celular de los túbulos en un 15% (6/40). Por otro lado, como la única alteración parasitaria, en la totalidad de los riñones se observaron formas libres de mixosporidios (esporas) en el citoplasma de las células tubulares en un 100% (40/40), infiltración de centros melanomacrófagos en un 100% (40/40), sobre las células degeneradas y necrosadas de los túbulos que presentaban formas libres de mixosporidios (**Fig. 5**). Finalmente, se observaron micro gotas hialinas en el citoplasma de las células tubulares (2/40) (**Fig. 6**), además de las lesiones de degeneración y necrosis mencionadas anteriormente.

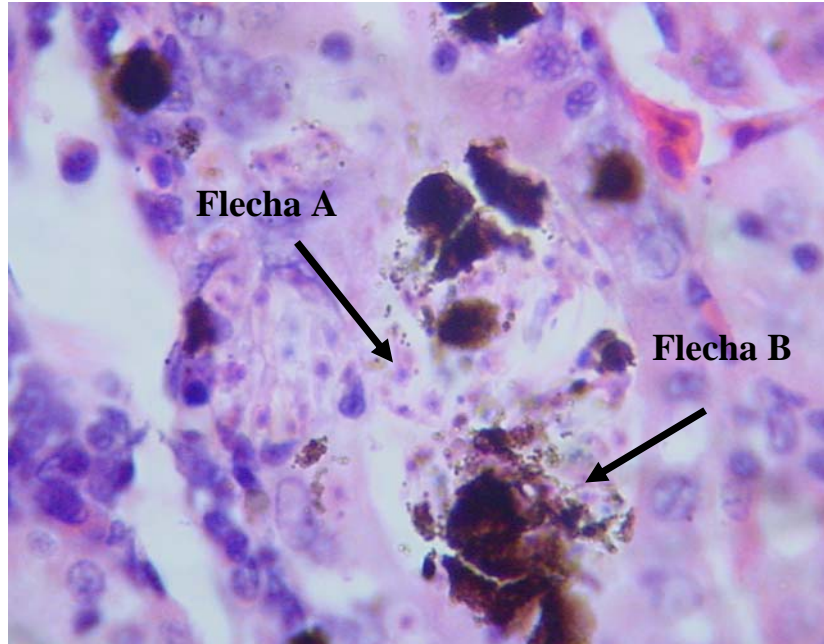
**Cuadro 2. Frecuencia de alteraciones histológicas renales según tipo de trastorno.**

TIPO DE TRASTORNO	LESIONES					ALTERACIÓN	
	Normal	Escaso	Leve	Moderado	Severo	Total	%
<b>DEGENERATIVOS:</b>							
Degeneración hidrópica	0	21	14	4	1	40/40	100
Necrosis tubular	0	21	14	4	1	40/40	100
Degeneración hialina (Micro gotas hialinas) en túbulos	38	2	0	0	0	2/40	5
<b>DEL CRECIMIENTO:</b>							
Regeneración celular en túbulos	34	6	0	0	0	6/40	15
<b>PARASITARIOS:</b>							
Fomas libres (esporas) de mixosporidios	0	21	14	4	1	40/40	100
<b>OTROS:</b>							
Infiltración de centros melanomacrófagos	0	21	14	4	1	40/40	100

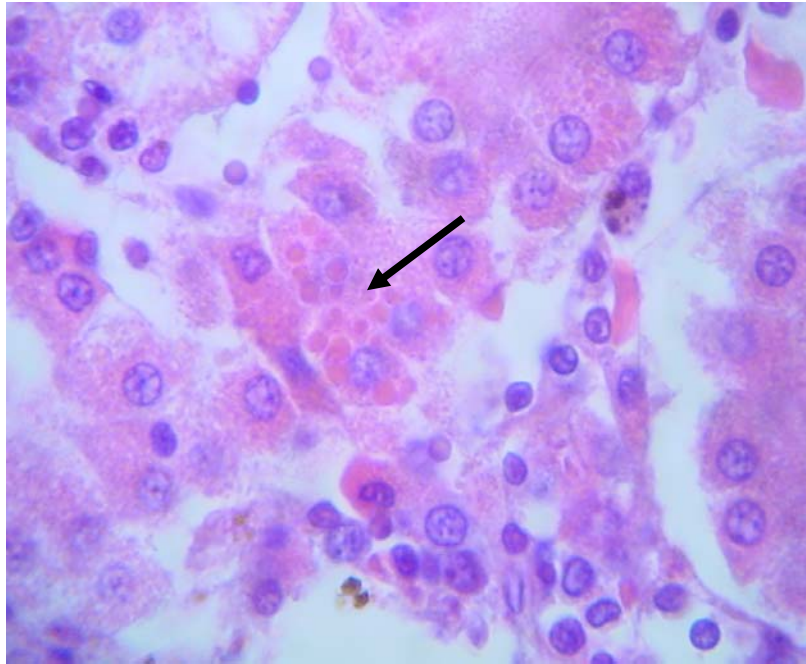




**Fig. 4.** Esporas de mixporidios (Flecha A) e infiltración de centros melanomacrófagos (Flecha B) en células tubulares degeneradas y necrosadas del riñón. H&E. x40



**Fig. 5.** Formas libres de mixosporidios en células necrosadas del túbulo renal (Flecha A) e infiltración de centros melanomacrófagos en el interior y en la periferia de los túbulos (Flecha B) H&E. x100

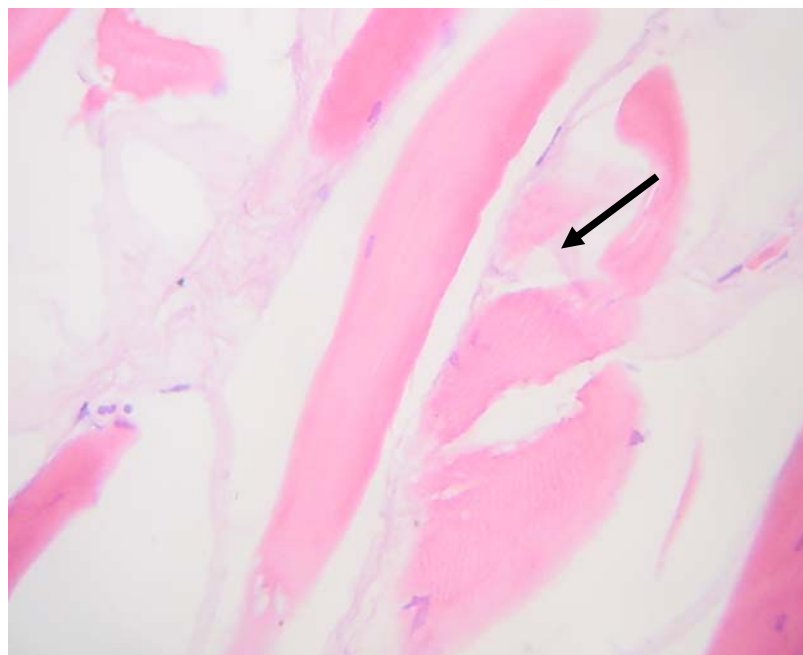


**Fig. 6. Gotas hialinas en el citoplasma de las células tubulares del riñón (Flecha).  
H&E. x100**

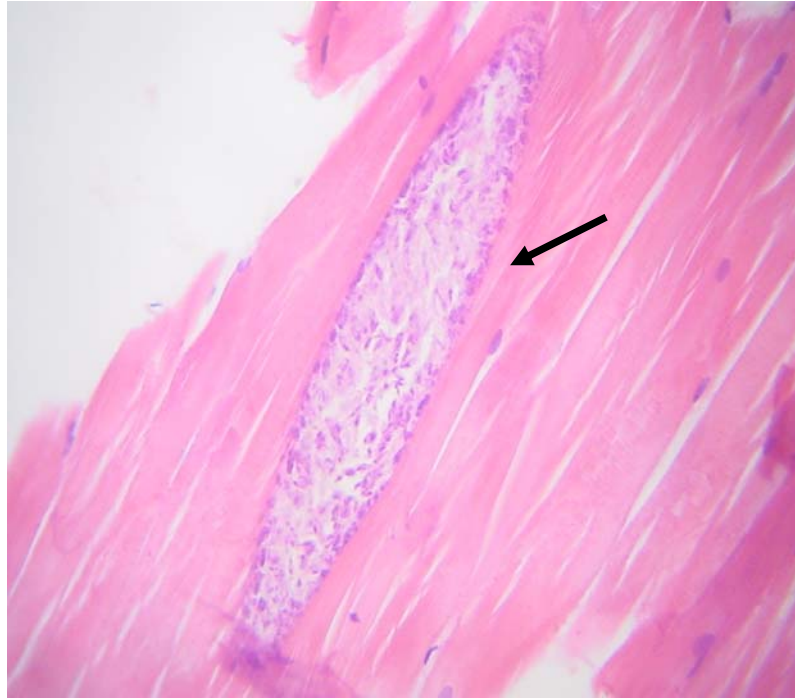
Las alteraciones histológicas en músculo (**Cuadro 3**) fueron de diferente tipo, observándose trastornos degenerativos como la necrosis muscular 40% (16/40) leve; trastornos del crecimiento caracterizados por una moderada atrofia del músculo 12.5% (5/40) (**Fig. 7**). Así mismo, se evidenció alteraciones parasitarias por la presencia de quistes de mixosporidios en un 30% (12/40), se ubicaban entre las fibras musculares, con estadios esporogónicos inmaduros, sin embargo no presentaron reacción inflamatoria en la periferia del quiste ni necrosis muscular en el tejido afectado (**Fig. 8**).

**Cuadro 3. Frecuencia de alteraciones histológicas en músculo según tipo de trastorno.**

TIPO DE TRASTORNO	LESIONES					ALTERACIÓN	
	Normal	Escaso	Leve	Moderado	Severo	Total	%
<b>DEGENERATIVOS:</b> Necrosis muscular	24	0	16	0	0	16/40	40
<b>DEL CRECIMIENTO:</b> Atrofia muscular	35	0	0	5	0	5/40	12.5
<b>PARASITARIO:</b> Quistes de mixosporidios	28	12	0	0	0	12/40	30



**Fig. 7. Zona de necrosis y atrofia en el músculo esquelético (Flecha). H&E. x40**



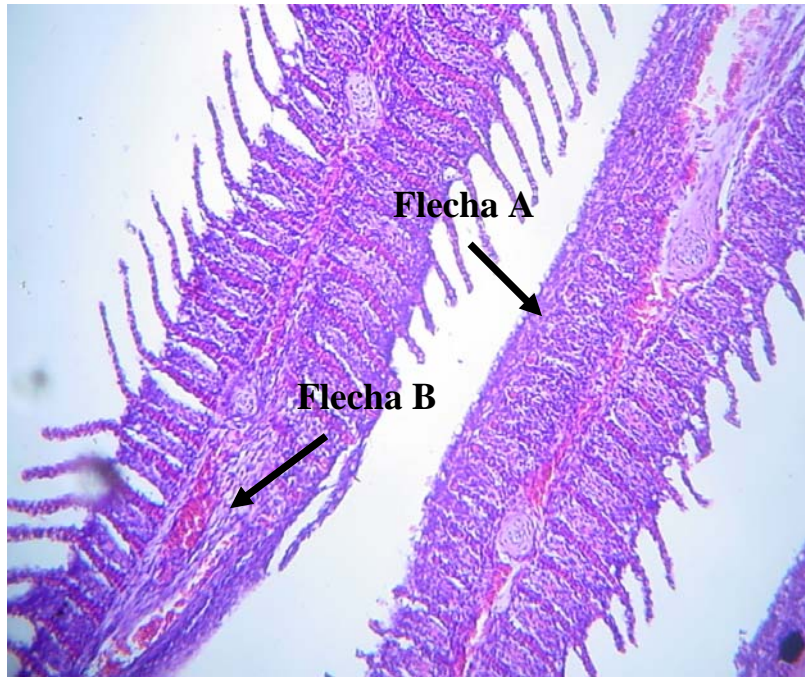
**Fig. 8. Quiste de mixosporidio en el músculo esquelético (Flecha). H&E. x40**

Dentro de las alteraciones histológicas en las branquias (**Cuadro 4**), el trastorno degenerativo más frecuente fue la hiperplasia interlaminar en un 100% (40/40) en forma leve (**Fig. 9**), seguida de la hiperplasia del filamento branquial en un 45% (18/40), predominantemente en forma leve, habiendo también pérdida de laminillas branquiales en forma severa en un 5% (2/40); observándose una moderada infiltración de células inflamatorias, mayormente de tipo mononuclear, en filamento branquial en un 100% (40/40); y cambios circulatorios como congestión en el filamento en un 30% (12/40). Así mismo, al igual que el músculo se observaron alteraciones parasitarias, como quistes de mixosporidios en el arco branquial y filamento branquial en un 5% de la población (2/40). Los quistes (Plasmodium) se observaban como estructuras redondas y ovaladas, presentando interiormente diferentes estructuras esféricas, elongadas o con procesos caudales, que representan estadios esporogónicos maduros e inmaduros. Uno de ellos ubicado en el filamento branquial, estaba rodeado de tejido conectivo y presentaba estadios esporogónicos maduros en su interior, habiendo una reacción inflamatoria en su periferia (**Fig. 10 y 11**); también se presentaron parásitos monogéneos entre las laminillas branquiales en un 15% (6/40) de la población (**Fig. 12**).

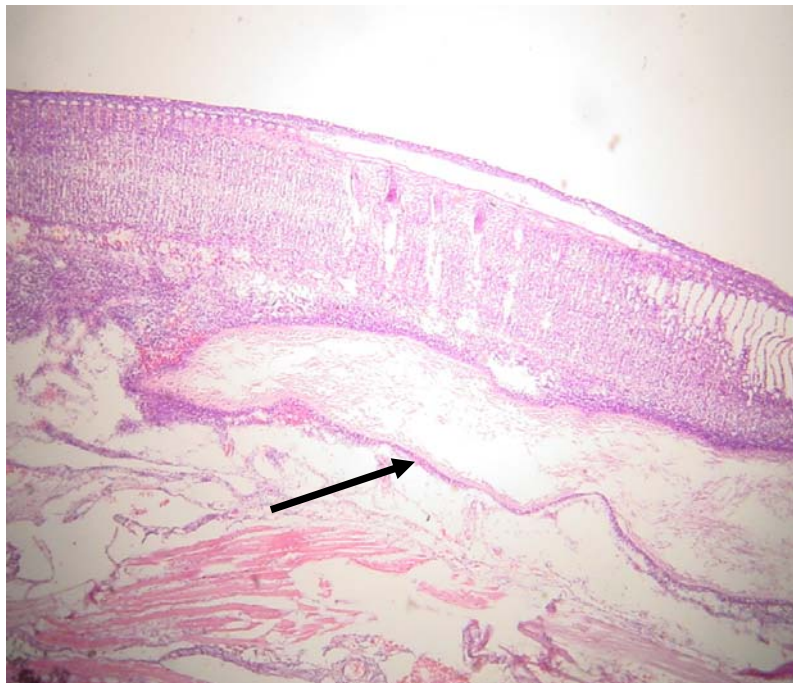
**Cuadro 4. Frecuencia de alteraciones histológicas en branquias según tipo de trastorno.**

TIPO DE TRASTORNO	LESIONES					ALTERACIÓN	
	Normal	Escaso	Leve	Moderado	Severo	Total	%
<b>INFLAMATORIOS:</b>							
Infiltración de células inflamatorias en filamento branquial	0	0	0	40	0	40/40	100
<b>CIRCULATORIOS:</b>							
Congestión en filamento	28	0	12	0	0	12/40	30
<b>DEL CRECIMIENTO:</b>							
Hiperplasia del epitelio interlaminar	0	0	40	0	0	40/40	100
Hiperplasia del filamento branquial	22	0	10	4	4	18/40	45
Pérdida de laminillas	38	0	0	0	2	2/40	5
<b>PARASITARIOS:</b>							
Quistes de mixosporidios	38	2	0	0	0	2/40	5
Parásitos monogéneos	34	6	0	0	0	6/40	15

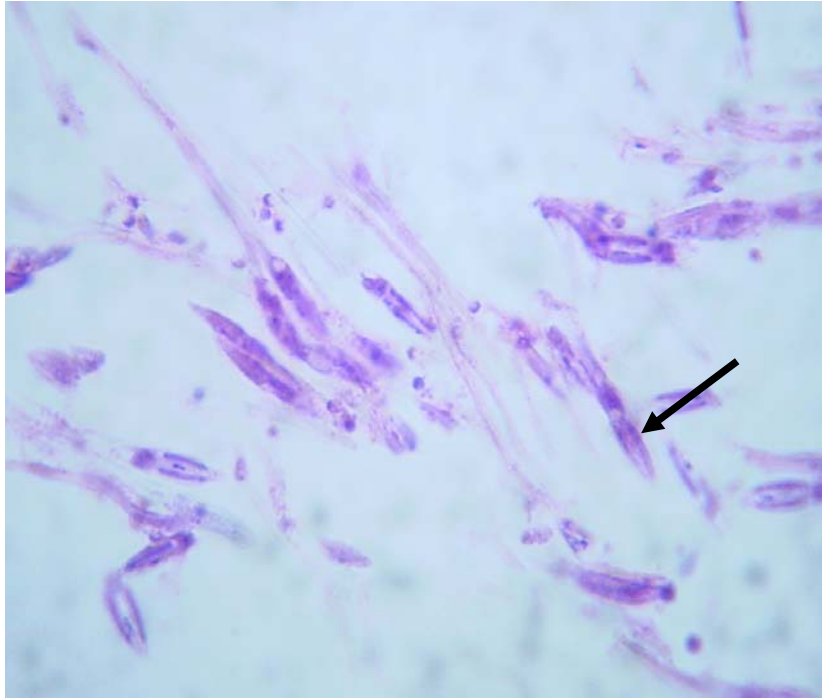




**Fig. 9. Hiperplasia interlaminar (Flecha A) y congestión en el filamento branquial (Flecha B). H&E. x40**



**Fig. 10. Quiste de mixosporidio en filamento branquial. Hubo una reacción inflamatoria en su periferia (Flecha). H&E. x10**



**Fig. 11. Esporas de mixosporidios. Se aprecian las dos cápsulas polares. H&E. x100**



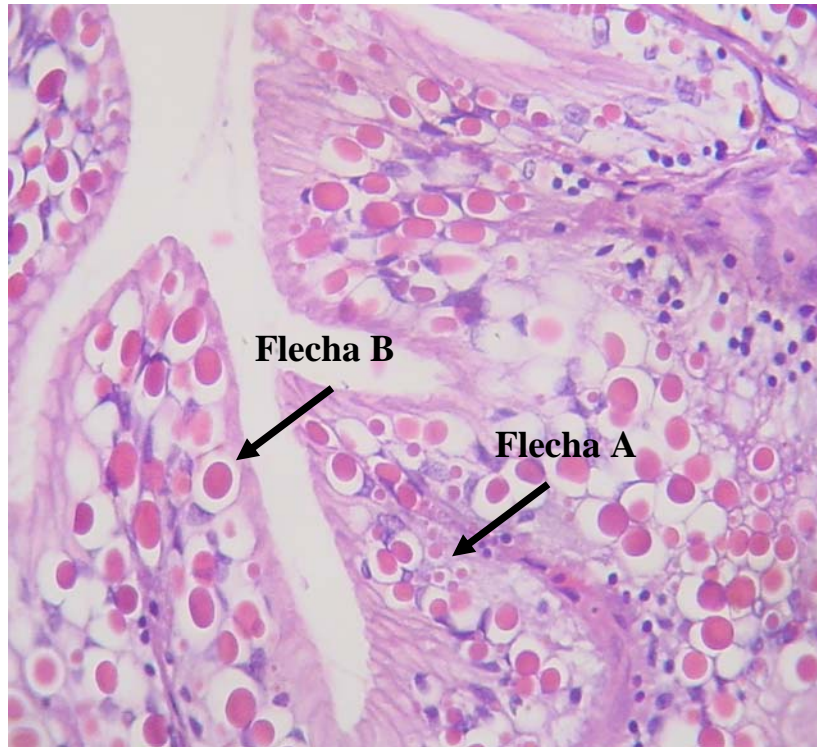
**Fig. 12. Parásito monogeneo en branquias (Flecha). H&E. x100**

Dentro de las alteraciones histológicas en el estómago (**Cuadro 5**), se evidenciaron trastornos degenerativos caracterizados por necrosis del epitelio de la mucosa en un 62.5% (25/40), donde también se observaron micro y macro gotas hialinas en el epitelio de la mucosa gástrica en un 62.5% (25/40), (**Fig. 13**).

**Cuadro 5. Frecuencia de alteraciones histológicas en el estómago según tipo de trastorno.**

TIPO DE TRASTORNO	LESIONES				ALTERACIÓN	
	Normal	Escaso Severo	Leve	Moderado	Total	%
<b>DEGENERATIVOS:</b>						
Necrosis del epitelio de la mucosa	15	0	0	25	0	25/40 62.5
Degeneración hialina (Micro y macro gotas hialinas)	15	0	0	25	0	25/40 62.5



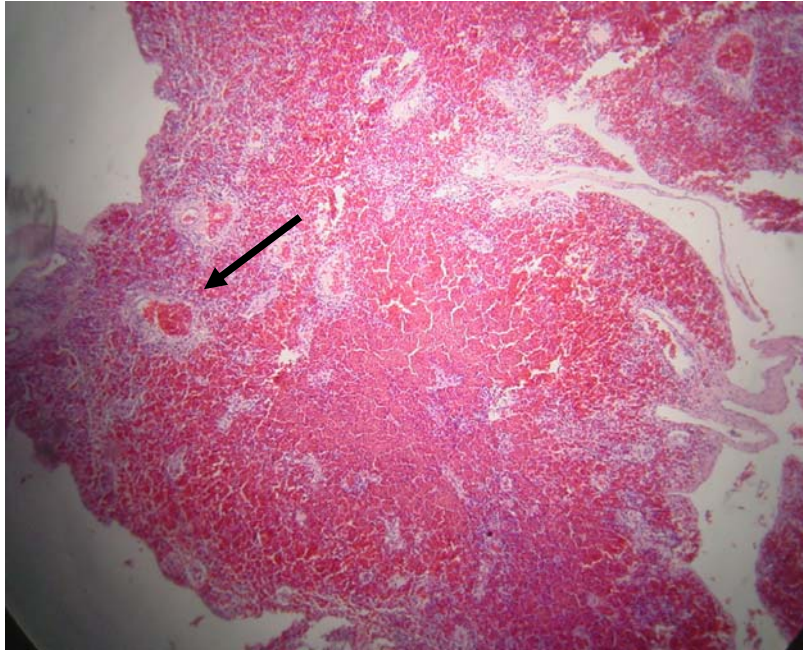


**Fig. 13. Micro gotas (Fecha A) y macro gotas hialinas (Flecha B) en el epitelio de la mucosa gástrica. H&E. x40**

Dentro de las alteraciones histológicas en bazo (**Cuadro 6**), se observaron trastornos de la circulación como congestión en 10% (4/40) (**Fig 14**).

**Cuadro 6. Frecuencia de alteraciones histológicas en bazo según tipo de trastorno.**

TIPO DE TRASTORNO	LESIONES					ALTERACIÓN	
	Normal	Escaso	Leve	Moderado	Severo	Total	%
<b>CIRCULATORIOS:</b> Congestión	36	0	2	1	1	4/40	10



**Fig. 14. Leve congestión en el bazo (Flecha) H&E. x10**

## 2. Microbiología

Se obtuvieron aislamientos microbiológicos en los órganos muestreados del estudio (Cuadros 8).

**Cuadro 8. Frecuencia de peces que presentaron bacterias aisladas en branquias, hígado, bazo, riñón y estómago en 40 gamitanas aparentemente sanas.**

Bacterias aisladas	Branquias		Hígado		Bazo		Riñón		Estómago	
	F	%	F	%	F	%	F	%	F	%
<i>Pseudomona fluorescens/putida</i>	29/40	72.5	8/40	20	8/40	20	5/40	12.5	2/40	5
<i>Edwardsiella tarda</i>	6/40	15	2/40	5	5/40	12.5	2/40	5	5/40	12.5
<i>Plesiomona shigelloides</i>	2/40	5	1/40	2.5	2/40	5			1/40	2.5
<i>Salmonella arizonae</i>	7/40	17.5	1/40	2.5			1/40	2.5	3/40	7.5
<i>Aeromonas hydrophila</i>	1/40	2.5					1/40	2.5		
<i>Bacillus cereus</i>	2/40	5							2/40	5
<i>Serratia sp.</i>	2/40	5							1/40	2.5
<i>Escherichia coli</i>	5/40	12.5								
<i>Salmonella enterica</i>									1/40	2.5

## V. DISCUSIÓN

Estudios relacionados a las alteraciones histopatológicas en gamitanas (*Colossoma macropomum*) no han sido descritas hasta el momento en el país. En Colombia predominantemente, se han realizado estudios histopatológicos en la especie (*Piaractus brachipomus*), uno de ellos describiendo la anatomo patología comparada de las alteraciones branquiales (Eslava, 1999).

Para el desarrollo de este estudio se emplearon técnicas microbiológicas y la Histopatología para evaluar el estado sanitario de gamitanas aparentemente sanas, siendo la Histopatología la que permitió visualizar mayor número de hallazgos relacionados a patologías en peces.

A nivel de los hígados, macroscópicamente se observó una coloración ligeramente pálida (26/40). Del total de las alteraciones histológicas observadas en el hígado de las gamitanas, la degeneración vacuolar fue la de mayor frecuencia de presentación en todo el parénquima, sin manifestar los peces signos clínicos. López *et al.* (2001) reportaron una mayor cantidad de cambios degenerativos en el hígado de salmonídeos (81.8%), siendo la degeneración grasa y vacuolar las más observadas, lo que indica que estos procesos son importantes en peces debido a que pueden ser ocasionados por una amplia variedad de factores etiológicos (fallas circulatorias, dietas mal balanceadas, carencias nutricionales y procesos tóxicos, entre otros).

Tacon (1992) y Ferguson (2006) describen como una de las principales causas de degeneración hidrónica y grasa los altos niveles de ácidos grasos poliinsaturados en las dietas, lo que lleva a cambios oxidativos en los lípidos (rancidez) si están almacenadas en altas temperaturas y expuestas al oxígeno atmosférico, o en ausencia de un adecuado antioxidante como la Vitamina E. Estos ácidos grasos reaccionan con las proteínas, lípidos y vitaminas de la dieta bajando su valor biológico.

Kalogeropoulos *et al.* (1992), señalan que otra causa de cambios degenerativos puede ser por un exceso de lípidos en la dieta, que puede ocurrir cuando la cantidad de lípidos ingerida excede la capacidad de almacenamiento del órgano; así mismo Wolf y Wolfe (2005), sostienen que una acumulación de lípidos en los hepatocitos de peces podría ser resultado de una sobrealimentación y una dieta excesivamente rica en energía. Similarmente, Reyna en 1993, señala problemas nutricionales como dietas ricas en grasa, movilización de grasa en estados de caquexia donde la grasa se acumula en el hepatocito, dietas pobres en proteínas, estados de hipoxia y anoxia, e intoxicaciones entre las causas que originan un cambio de grasa.

La deficiencia de colina puede también ocasionar degeneración grasa ya que es un factor lipotrópico, indispensable en el transporte de grasas, siendo necesaria en la dieta de los peces (Cowey y Roberts, 1981). En algunas especies de peces, el hígado es el órgano principal de almacenamiento de las grasas, evidenciando histológicamente gotas lipídicas en el citoplasma de los hepatocitos, incluso trastornos grasos que comprometen amplias áreas del parénquima no son considerados patológicos (Cowey y Roberts, 1981).

Wolf y Wolfe (2005), sostienen que debido a que varios peces silvestres y en cautiverio sanos tienen la capacidad de almacenar grandes cantidades de lípidos, es difícil distinguir que clase de vacuolas lipídicas son consideradas excesivas, por lo que no hay un adecuado criterio para el diagnóstico de lipidosis hepática.

Se encontraron pigmentos de coloración marrón negruzca en el citoplasma de los hepatocitos, los que podrían ser pigmentos biliares o lipofucsina. Este último pigmento se ve incrementado en células donde hay un aumento en el cambio de organelas o un daño a las membranas; en algunas especies se ve incrementado este pigmento por una

deficiencia de Vitamina E o Selenio o por altos niveles de ácidos grasos poliinsaturados en las dietas, lo que lleva a cambios oxidativos en los lípidos (rancidez) (Slauson y Cooper, 2002). Truchas alimentadas con dietas rancias deficientes en Vitamina E desarrollaron anemia microcítica y degeneración lipóide (ceroidosis; una variante de lipofuscina) (Smith, 1979). En el caso de lipofuscina, al ser un derivado lipídico, se confirmará con la coloración de Sudán negro.

Por otro lado, se encontraron en el riñón de los 40 casos formas libres de mixosporidios, ubicados en el citoplasma de las células tubulares, observándose una degeneración y necrosis del epitelio de los mismos, tal como lo reportó Iregui *et al.* (1999), en un caso de mixosporidiasis clínica en un paco (*Piaractus brachypomus*) en Colombia, donde se hallaron formas extraesporogónicas libres en el citoplasma de las células tubulares cerca de los vasos sanguíneos, ruptura de las células epiteliales con liberación del parásito a la luz vascular y de los túbulos, con degeneración y necrosis del epitelio de los mismos. Martins *et al.* (1999), reportó mediante análisis parasitológicos la presencia de formas libres del mixosporidio *Myxobolus colossomatis* en el riñón, hígado, bazo, músculo y vesícula biliar en caraña (*Piaractus mesopotamicus*) y sólo en el riñón de la gamitana (*Colossoma macropomum*). Verján (2002), reportó en un estudio histopatológico en *Piaractus brachypomus* como una alteración prevalente la degeneración de los túbulos renales (79.9%) en 263 animales muestreados, relacionándolo a la presencia de mixosporidios y estructuras hialinas; señalando además al riñón como el órgano que tuvo la mayor prevalencia de mixosporidios, donde la infección fue generalizada a diferencia de otros órganos internos. Además, este autor sostiene que el riñón es el sitio preferencial de ubicación o posiblemente de salida de los mixosporidios del hospedero.

En casi la totalidad de los riñones se observaron los centros melanomacrófagos, ubicados próximos y dentro de las células degeneradas y necrosadas, de manera similar a lo reportado por Iregui *et al.* (1999), quienes observaron centros melanomacrófagos dentro de las células infectadas del epitelio tubular en un “paco” en un caso de mixosporidiasis clínica. Estas lesiones pueden estar relacionadas a la presencia de formas libres de mixosporidios encontradas en las células de los túbulos, ya que los melanomacrófagos son células de la respuesta inmunológica características de los teleósteos, las cuales aumentan en número y medida y se tornan más oscuras en

procesos de infección (Ferguson, 2006). Sin embargo, es posible también que el aumento de melanomacrófagos este dado por algún otro agente patógeno o debido a la calidad del agua (Agius y Roberts, 2003). Verján (2002), reportó en un estudio histopatológico en un “paco” (*Pyaractus brachypomus*) como una alteración prevalente el incremento de centros melanomacrófagos en el riñón (75.8%) en 263 animales muestreados.

Del trabajo realizado en el presente estudio, se puede deducir que a pesar de haber encontrado mixosporidios en la totalidad de los peces muestreados (40/40), los peces no manifestaron signos clínicos ni hubo mortalidad, posiblemente debido a que la mayoría de las lesiones descritas fueron escasas y leves, a excepción de un caso donde se evidenció mayor presencia de centros melanomacrófagos y severa necrosis con degeneración del epitelio de los túbulos. Sin embargo, esta parasitosis puede ser un potencial factor de riesgo de enfermedad en la gamitana y por ende para la producción, ocasionando morbilidad y mortalidad, así como alteración del filete por la presencia de quistes que se observan como puntos blancos; lo que significa que es de suma importancia que los centros piscícolas cuenten con sistemas de monitoreo que incluyan una evaluación histológica periódica que permita identificar diferentes estadios parasitarios y detectarlos en forma temprana, para así evitar un incremento de la infección por mixosporidios

La presencia de mixosporidios, aún en forma escasa o leve, como de otros patógenos podría deberse a las condiciones del medioambiente, manejo, grado de infestación o inmunidad del hospedero (González y Heredia, 1998).

Entre los trastornos del crecimiento se observó una regeneración tubular en un 15% de los túbulos que evidenciaban formas libres de mixosporidios en el epitelio, había una basofilia en las células del citoplasma de los túbulos, posiblemente como una consecuencia a la presencia del parásito en el epitelio renal. Reimschuessel (2001), sostiene que al igual que los mamíferos, el riñón de los peces tiene la capacidad de regeneración, donde las células dañadas son reemplazadas por un nuevo epitelio, restaurando la integridad del túbulo. Ferguson (2006), también sostiene que cuando hay un daño a los túbulos renales, que puede ser inducido por agentes infecciosos o tóxicos, se produce una regeneración celular. Se puede decir del presente trabajo que

posiblemente la regeneración celular observada en los túbulos se originó como una reacción al daño en éstos ocasionados por los mixosporidios.

Se pudo observar en dos casos, gotas hialinas en las células del citoplasma de los túbulos renales. Verján (2002), encontró también estructuras hialinas en el riñón de paco (*Piaractus brachypomus*), relacionándolas a desarreglos en la formulación de la dieta, sosteniendo que posiblemente eran consecuencia de un exceso de proteína en el alimento. Ferguson (2006), sugirió que estas estructuras pueden estar relacionadas a un daño glomerular, llevando a una salida de proteínas que son reabsorbidas por las células del túbulo contorneado proximal y acumuladas en el citoplasma. Ekman (2003), encontró gotas hialinas en el epitelio tubular del riñón en tres especies de salmónidos después de una infección experimental con *Flavobacterium psychrophilum*. Es necesario realizar más investigaciones que permitan determinar la causa exacta de la presencia del componente hialino.

En este trabajo se presentaron en las branquias trastornos del crecimiento como la hiperplasia del epitelio interlaminar y la hiperplasia del filamento en un 100% (40/40) y 45% (18/40) respectivamente, así como fusión laminar en un 95% (38/40) y pérdida de láminas en un 5% (2/40). Noga (2000), afirma que la hiperplasia e hipertrofia epitelial son las más comunes respuestas ante el daño branquial, los que pueden llevar como consecuencia a fusión de las láminas y filamentos; sostiene que las lesiones en branquias tienen un alto grado de inespecificidad, y pueden ser originadas por diferentes causas tales como bacterias, parásitos o una pobre calidad del agua. Por otro lado, hubo infiltración de células mononucleares en el filamento branquial en un 100% de los casos (40/40), manifestándose moderadamente.

Lesiones como hiperplasia e infiltración de células mononucleares pueden ser ocasionadas por parásitos, pero solamente un 15% (6/40) de la población presentó parásitos monogéneos y un 5% (2/40) quistes de mixosporidios; sin embargo, las lesiones estaban presentes en toda la población. Lo que nos lleva a sostener que las lesiones anteriores podrían evidenciar no tener un origen parasitario, sino una mala calidad del agua, ya que para el cultivo de peces amazónicos las fuentes de agua suelen ser provenientes de ríos, lagunas o quebradas, generalmente con altas cargas de materia orgánica y otros tipos de desechos tóxicos. Esto puede sustentarse con lo observado por Verján (2002), en un estudio histopatológico en pacos (*Piaractus brachypomus*)



clínicamente sanos, quien encontró como alteraciones branquiales más prevalentes la pérdida de láminas, hiperplasia del epitelio interlaminar, infiltración de células inflamatorias en el arco y en el filamento; y sosteniendo que estas lesiones branquiales estarían directamente relacionadas con una baja calidad del agua pero también habría una relación entre los factores químicos del agua y la presencia de algunos parásitos.

En el presente estudio se encontraron en dos casos quistes de mixosporidios ubicados en el arco y filamento branquial. Estas ubicaciones han sido descritas por Molnár (2002), quien describió quistes de las especies de *Myxobolus*, *Henneguya* y *Thelohanellus*, en el arco branquial, filamentos y laminillas, aunque en nuestro estudio no se hallaron quistes ni formas libres de mixosporidios en las laminillas.

Los quistes de mixosporidios se observaban como estructuras redondas y ovaladas, presentando interiormente diferentes estructuras esféricas, elongadas o con procesos caudales, que representan estadios esporogónicos maduros e inmaduros. Hubo un incremento del tejido conectivo alrededor de los quistes; uno de los quistes presentaba estadios esporogónicos maduros y había una reacción severa de células inflamatorias en su periferia, lo que coincide con Noga (2000), quien sostiene que los quistes con estadios maduros, inducen una considerable inflamación a diferencia de los estadios tempranos que producen una leve reacción del hospedero.

Iregui *et al.* (1999), reportó en un estudio histopatológico en branquias y branquiespinas en un paco (*Piaractus brachyomus*), la presencia de formas extraesporogónicas libres y quistes de mixosporidios; y una severa atrofia y pérdida completa de las laminillas, así como una reacción inflamatoria fuerte inducida por las formas libres. En el Perú, Paredes (1984), detecto quistes de *Myxobolus* sp. en branquias de gamitanas procedentes del área de Iquitos mediante técnicas parasitológicas.

En un caso donde se halló un quiste de mixosporidio con estadios maduros en casi la totalidad de un filamento, hubo una severa hiperplasia del filamento branquial, hiperplasia interlaminar y fusión de laminillas, lo que coincide con lesiones señaladas por Martins *et al.* (1999), quienes estudiaron las branquias del paco (*Piaractus brachyomus*) infectadas con *Henneguya piaractus*, y Barassa *et al.* (2003), quienes

estudiaron las branquias de piraña negra (*Serrasalmus spilopleura*) infectadas con *Henneguya curvata*., y sostienen que infecciones por mixosporidios pueden ocasionar lesiones en las estructuras branquiales tales como fusión de laminillas, congestión, proliferación de células epiteliales, infiltrado de células inflamatorias y aumento de tejido conectivo.

Por otra parte, en 6 casos se encontraron parásitos monogéneos, habiendo de 1 a 2 parásitos por corte en cada animal, ubicados en las laminillas branquiales. Sin embargo no se evidenciaron lesiones en las zonas donde se encontraron los parásitos. A pesar de la presencia de parásitos en los peces examinados, éstos no presentaron ningún signo clínico ya que el grado de infestación no fue suficiente para llegar a producir lesiones severas y como consecuencia enfermedad. Este leve grado de infestación difirió de otros estudios como Martins *et al.* (2002), el cual diagnosticó casos de enfermedades en peces de cultivo en agua dulce en Sao Paulo entre Febrero de 1999 a Diciembre del 2000, donde los monogéneos fueron los más importantes patógenos encontrados y la especie más infestada fue *Piaractus mesopotamicus*. Schalch y De Moraes (2005), reportan en un estudio estacional relacionado a la presencia de parásitos branquiales en Guariba-Brasil donde se examinaron 408 peces de diferentes especies, que 4 de 35 gamitanas (11.4%) presentaban parásitos en las branquias, entre los que destacaban los monogéneos.

Según Kinkelin *et al.* (1991) y Noga (2000) infestaciones severas por monogéneos son usualmente indicadores de la pobre sanidad y deterioro de la calidad del agua asociados a sobrepoblación, aumento de amoníaco o nitritos, reducción en el contenido de oxígeno disuelto, acumulación de materia orgánica.

Factores nutricionales como dietas con una deficiencia de Vitamina C o Ácido Pantoténico también pueden originar lesiones branquiales. Oliveira *et al.* (2001) mostró en un estudio experimental lesiones como hiperplasia de filamentos, elevación epitelial, telangiectasia y fusión laminar por infiltrado sanguíneo en larvas de tilapias del Nilo (*Oreochromis niloticus*) alimentadas con dietas con niveles bajos en Vitamina C. La importancia de esta vitamina está también relacionada con la maduración del cartílago y del colágeno, por lo tanto, ante la deficiencia habrá un desarrollo anormal del cartílago, evidenciando distrofia del cartílago y alteración de las branquias (Cowey y Roberts,

1981). Sin embargo, no se observó distrofia del cartílago en los casos estudiados, por lo cual no se puede asegurar que las lesiones como hiperplasia del filamento, hiperplasia interlaminar y fusión de láminas sean consecuencia sólo de la deficiencia de Vitamina C.

Los animales muestreados no presentaron alteraciones externas en las branquias ni previamente presentaban signos clínicos aparentes de hipoxia (boquean en la superficie del estanque), a pesar de las lesiones histológicas anteriormente encontradas tales como hiperplasia interlaminar, hiperplasia del filamento branquial, fusión de laminillas e infiltración de células mononucleares, lo cual se podría explicar a que la mayoría de lesiones se presentaron en forma leve y moderada. Verján (2002), sostiene que el paco (*Piaractus brachipomus*) tolera cierto número de parásitos sin manifestar signos clínicos evidentes e incide en que la infección o infestación, así como patologías no equivalen a enfermedad clínica. Así mismo Florindo *et al.* (2006), sostiene que la gamitana (*Colossoma macropomum*) es un pez que tiene tolerancia a los niveles bajos de oxígeno disuelto, y que utiliza una serie de mecanismos morfológicos, bioquímicos, fisiológicos y de comportamiento para contrarrestar esta deficiencia en su hábitat. Esto podría ser una de las explicaciones relacionadas al hecho de que estos peces no manifiesten signos clínicos a pesar de una mala calidad del agua o alteraciones en las branquias que dificulten su intercambio gaseoso, más aún si la gamitana ha sido catalogada como una especie resistente a las enfermedades (González y Heredia, 1998).

Por otro lado, el 30% (12/40) de los peces presentaban quistes de mixosporidios en el músculo esquelético con estadios esporogónicos inmaduros, no habiendo una reacción inflamatoria en la periferia ni daños en el tejido, coincidiendo con Ferguson (2006), que sostiene que la mayoría de los mixosporidios con estadios inmaduros parecen producir una leve o nula respuesta inflamatoria y generalmente, son encontrados como hallazgos incidentales en el trabajo de rutina diagnóstica. Reportes similares en nuestro país en la especie *Colosoma macropomum* que describan lesiones histológicas parasitarias o de otro origen en el músculo no han sido realizados anteriormente.

Lesiones tales como necrosis muscular 40% (16/40) o atrofas musculares 12.5% (5/40) halladas en el músculo esquelético de los peces que no presentaban quistes parasitarios, se manifestaron en forma leve aunque nos puede sugerir probablemente

una relación de estas lesiones con deficiencias en niveles de Vitamina E en la dieta. Lovell *et al.* (1984), describió lesiones tales como severa atrofia y necrosis de las fibras musculares en el bagre de canal (*Ictalurus punctatus*) alimentadas con dietas con niveles bajos de  $\alpha$ -tocoferol. Murai y Andrews (1974), también describieron cambios histológicos pronunciados en las fibras musculares y distrofia muscular en peces de la misma especie alimentados con bajos niveles de Vitamina E, además con la carencia de esta vitamina, en dietas con altos niveles de ácidos grasos poliinsaturados, llevan a cambios oxidativos en los lípidos (rancidez) si están almacenadas en altas temperaturas y expuestas al oxígeno atmosférico.

El estómago presentó micro y macro gotas hialinas en el epitelio de la mucosa gástrica en un 62.5% (25/40). Son escasos los reportes de inclusiones hialinas en el estómago. Iregui *et al.* (2004) en un estudio de las principales lesiones histológicas y enfermedades de los peces demostró la presencia de material hialino en el citoplasma de las células del hígado, riñón, intestino y estómago, relacionándolas a un exceso, deficiente digestibilidad o inapropiada formulación de la proteína. Verján (2002), encontró estas estructuras hialinas en el riñón de paco (*Piaractus brachypomus*), relacionándolas a desarreglos en la formulación de la dieta, sosteniendo que posiblemente eran consecuencia de un exceso de proteína en el alimento. En el presente estudio más de la mitad de los peces presentaban esta alteración, lo que podría estar relacionado a la proteína en la dieta y nos puede sugerir un problema de manejo en el centro de producción. Éstos son los primeros hallazgos relacionados a este tipo de patología de origen no infeccioso. Se requiere hacer estudios que permitan ver la asociación de estas lesiones con los niveles de proteína en la dieta y su influencia en la salud de los peces de cultivo, así como corroborar la calidad de los insumos que están siendo utilizados en el alimento y la frecuencia de alimentación.

Finalmente, el bazo presentó congestión en un 10% de la población (4/40) mayormente en forma leve.

Con respecto a los aislamientos bacteriológicos, no se observó lesiones histopatológicas que sean compatibles con procesos infecciosos de tipo bacteriano, por lo que no se encontró relación alguna con los hallazgos de histopatología en ninguno de los órganos internos y externos (branquias). Verján (2002), en un estudio

histopatológico de lesiones branquiales en pacos (*Piaractus brachypomus*), donde también se tomaron muestras para bacteriología de hígado, riñón y cavidad abdominal no encontraron lesiones histopatológicas características de agentes bacterianos.

Corral *et al.* (2000), sostienen que el conjunto de la flora bacteriana del medio acuático, tanto marino como continental, está constituida por aerobios y anaerobios facultativos, y dentro de esta flora bacteriana, las especies predominantes son las pertenecientes al género *Pseudomona*, seguidas por *Achromobacter*, *Acinetobacter*, *Flavobacterium*, *Serratia*, y *Vibrio*. La *Edwardsiella tarda* es también una bacteria que puede ser aislada del medio ambiente, peces, y que puede tener una actividad patógena bajo ciertas condiciones (Najiah *et al.*, 2006). El género *Aeromonas* está distribuido generalmente en el agua, por lo que se encuentra asociado a animales acuáticos (Sugita *et al.*, 1995).

Las branquias son un órgano respiratorio que está en contacto permanentemente con el medio acuático, por lo que es posible aislar diferentes agentes bacterianos en ellas. En nuestro estudio las bacterias aisladas en las branquias de gamitanas tales como: *Pseudomona fluorescens/putida*, *Edwardsiella tarda*, *Plesiomona shigelloides*, *Salmonella arizonae*, *Bacillus cereus*, *Serratia sp.*, *Escherichia coli*, *Aeromonas hydrophila* y *Enterobacter aerogenes*, se encuentran en el medio acuático.

En los órganos internos del estudio (hígado, bazo, riñón y estómago) también se aislaron bacterias tales como *Pseudomona fluorescens/putida*, *Edwardsiella tarda*, *Plesiomona shigelloides*, *Salmonella arizonae*, *Aeromonas hydrophila*, *Bacillus cereus*, *Serratia sp.* y *Salmonella enterica*. Es frecuente aislar bacterias tales como *Edwardsiella tarda* y *Aeromonas hydrophila* del tracto digestivo en peces, debido a las aguas ingeridas. Sugita *et al.* (1995) reportaron especies de *Aeromonas* en el intestino de varias especies de carpas. Cipriano *et al.* (1984) también señala a la *Aeromonas hydrophila* como un habitante normal de la microflora del tracto intestinal de peces. En el estudio, estas bacterias encontradas en el estómago, no fueron causantes de un cuadro infeccioso o enfermedad en el pez, puesto que no se observaron lesiones histológicas con presencia de células inflamatorias. La mayoría de estas bacterias son patógenos secundarios y solo ocasionan enfermedad bajo condiciones de estrés tales como una disminución en el contenido de oxígeno disuelto en el agua, variaciones de temperatura,

hacinamiento por altas densidades o elementos tóxicos en el agua, los que influyen en la respuesta inmunológica del pez.

Del Rio Rodríguez y Turnbull (1999), en un estudio de la microflora aeróbica de 120 peces ornamentales importados de Sudamérica y Singapur, aislaron de muestras de órganos internos especies de *Aeromonas*, con prevalencias de 3.3 a 43.3%, y *Pseudomonas* Grupo 1 con una prevalencia de 3.3 a 30% provenientes de los peces de Singapur y especies de *Aeromonas*, *Pseudomonas* Grupo 2, *Flavobacterium* y *Plesiomonas shigelloides* provenientes de peces de Sudamérica. Recientes estudios confirman que animales acuáticos clínicamente sanos pueden contener bacterias dentro de sus órganos internos. Chowdhury *et al.* (1997), aislaron en el riñón un rango de especies de bacterias del pez *Puntius gonionotus*, donde el género que predominó fue *Aeromonas*. Los anteriores estudios indican que podría haber una flora bacteriana en algunos órganos internos de algunas especies de peces; pero en nuestro estudio las bacterias aisladas en hígado, bazo y riñón, tuvieron una baja frecuencia de presentación, además de no tener reportes que indiquen que exista una flora bacteriana en la especie *Colossoma macropomum*.

Paniagua *et al.* (1990) y Kozinka *et al.* (2002), sostienen que el género *Aeromonas* es responsable de varias enfermedades en animales, incluyendo a los humanos. Estos resultados nos pueden indicar que desde un punto de zoonosis, podría ser necesario estudios más detallados con respecto a la relación de ciertos patógenos en peces y su distribución en el medio acuático con la presentación de enfermedades en humanos.

## VI. CONCLUSIONES

La histopatología es una técnica diagnóstica que sirve para la determinación de causas infecciosas como no infecciosas en Gamitanas (*Colosoma macropomum*) de cultivo.

Se determinaron lesiones de tipo no infeccioso tales como: Degeneración hialina en el riñón 5% (2/40) y estómago 62.5% (25/40), así como degeneración hidrópica en hígado 97.5% (39/40), lo que sugieren una asociación con alteraciones en el metabolismo de las proteínas.

Lesiones en branquias como hiperplasia del epitelio interlaminar 100% (40/40), hiperplasia del filamento branquial 45% (18/40), pérdida de láminillas 5% (2/40) e infiltración de células inflamatorias en filamento branquial 100% (40/40), en su mayoría en forma leve a moderada, sugieren una asociación de éstas con una mala calidad del agua.

Se determinaron agentes infecciosos como los mixosporidios con una frecuencia de 5% (2/40) en las branquias, de 100% (40/40) en los riñones y 30% (12/40) en el músculo; además, también se encontraron parásitos Monogeneos en las branquias con una frecuencia de 15% (6/40).

Se aislaron bacterias potencialmente patógenas en peces tales como *Aeromonas hydrophila* y *Edwardsiella tarda* en branquias y órganos internos, pero no relacionadas a las lesiones histopatológicas de los órganos aislados.

## **VII. RECOMENDACIONES**

Se recomienda que los centros piscícolas cuenten con sistemas de monitoreo que incluyan una evaluación histológica periódica que permita identificar diferentes agentes infecciosos y detectarlos en forma temprana, para así evitar un incremento de la infección y posibles pérdidas por mortalidad.

Se recomienda hacer estudios que permitan ver la asociación de las lesiones de tipo no infeccioso con los niveles de proteína en la dieta y su influencia en la salud de los peces de cultivo, así como corroborar la calidad de los insumos que están siendo utilizados en el alimento.



## VIII. BIBLIOGRAFIA

- 1. Agius C. y R.J. Roberts. 2003.** Melano-macrophage centres and their role in fish pathology. *Journal of Fish Diseases*. 26: 499-509.
- 2. Akiyoshi H. y A. Inoue. 2004.** Comparative histological study of teleost livers in relation to Phylogeny. *Zoological Science*. 21: 841-850.
- 3. Altringham J. y D. Ellerby. 1999.** Fish swimming: patterns in muscle function. *The Journal of Experimental Biology*. 202: 3397–3403.
- 4. Amlacher E. 1961.** Manual de enfermedades de los peces. España, Editorial Acribia. p 24-32.
- 5. Aoki T. 1999.** *Motile Aeromonads. (Aeromonas hydrophila)*. En: PTK Woo & DW Bruno (eds.): *Fish diseases and disorders, Volume 3: Viral, bacterial and fungal infections*, p 427-453.
- 6. Azevedo C. y Matos E. 2003.** Fine structure of *Henneguya pilosa sp.n.* (Myxozoa: Myxosporidae), parasite of *Serrasalmus altuvei* (Characidae), in Brazil. *Folia Parasitológica*. 50: 37-42.

- 7. Baird K., H. Chikarmane, R. Smolowitz y K. Uhlinger. 2003.** Detection of *Edwardsiella* infections in *Opsanus tau* by Polymerase Chain Reaction. Biol. Bull. 205: 235–236.
- 8. Barassa B., E. Adriano, S. Arana y N. Cordeiro. 2003.** *Henneguya curvata sp.n.* (Myxosporea: Myxobolidae) Parasiting the gills of *Serrasalmus spilopleura* (Characidae: Serrasalminae), a south american freshwater fish. Folia Parasitológica. 50: 151-153.
- 9. Centeno L., A. Silva-Acuña, R. Silva-Acuña y J. Pérez. 2004.** Fauna ectoparasitaria asociada a *Colossoma macropomum* y al híbrido de *C. macropomum* x *Piaractus brachypomus*, cultivados en el estado delta Amacuro, Venezuela. Biagro. 16(2): 121-126.
- 10. Chowdhury M., S. Karim y M. Islam. 1997.** Bacterial flora in the slime and kidney of rajputi (*Puntius gonionotus*) in two fish farms of Bangladesh. En: TW Flegel & IH MacRae (eds.): Diseases in Asian aquaculture III. Fish health section, Asian Fisheries Society, Manila. p 95–100.
- 11. Cipriano R., G. Bullock y S.W. Pyle. 1984.** *Aeromonas Hydrophila* and motile *aeromonad* septicemias of fish. United States Department of the Interior. Fish and Wildlife Service Division. Fish Disease Leaflet. 68. p 2-12.
- 12. Conroy D. 1989.** Reseña sobre las principales enfermedades infecto-contagiosas y parasitosis de peces del género *Colossoma*. En: A Hernández (ed.): Cultivo de *Colossoma*. Primera Reunión de Trabajo Técnico. Junio 20 al 24 de 1988, Pirassunga, S.P. Brasil. SUDEPE, COLCIENCIAS, CIID/CANADA. Bogotá, Colombia. p 94-112.
- 13. Corral L., H. Grizel, J. Montes y E. Polanco. 2000.** La Acuicultura: Biología, regulación, fomento, nuevas tendencias y estrategia comercial. Tomo I. Análisis del desarrollo de los cultivos: Medio, agua y especies. Fundación Alfonso Martín Escudero. España, Grupo Mundi-Prensa.
- 14. Cowey C.B. y R.J. Roberts. 1981.** Patología de la nutrición de los teleósteos. En: RJ Roberts (ed.): Patología de los peces. Madrid, Editorial Mundi-Prensa. p 249-261.

- 15. Del Rio Rodríguez R.E. y J.F. Turnbull. 1999.** Aerobic microflora of imported tropical ornamental fish from Singapore and South America. Part1: Characterization. Fish Veterinary Journal. 4: 1-16.
- 16. D.E. Dezon, J. Zambrano y I. Gonzalez. 2004.** Parasitosis en *Colossoma macropomum* (Pisces: Characidae) cultivado, ocasionada por los protozoos *Ichthyophthirius multifiliis* (Fouquet) y *Piscinoodinium pillulare* (Schaperclaus). Agrobiología. 16(1): 3-8.
- 17. Eiras J. 2005.** An overview on the myxosporean parasites in amphibians and reptiles. Acta Parasitológica. 50(4): 267-275.
- 18. Eiras J.C., J. Malta, A. Varella y G. Pavanelli. 2005.** *Myxobolus insignis* sp. n. (Myxozoa, Myxosporae, Myxobolidae), a parasite of the Amazonian teleost fish *Semaprochilodus insignis* (Osteichthyes, Prochilodontidae). Mem. Inst. Oswaldo Cruz. Rio de Janeiro. 100(3): 245-247.
- 19. Ekman E. 2003.** Natural and experimental infections with *Flavobacterium psychrophilum* in salmonid fish. Doctoral Degree Thesis. Swedish University of Agricultural Sciences. p 21-34.
- 20. Ellerby D., J. Altringham, T. Willians y B. Block. 2000.** Slow muscle function of pacific bonito (*Sarda Chiliensis*) during steady swimming. The Journal of Experimental Biology. 203: 2001–3403.
- 21. Ellis A. 1981.** Inmunología de los teleósteos. En: RJ Roberts (ed.): Patología de los peces. Madrid, Editorial Mundi-Prensa. p 103-117.
- 22. Ellis A.E., R.J. Roberts, P. Tytler. 1981.** Anatomía y fisiología de los teleósteos. En: RJ Roberts (ed.): Patología de los peces. Madrid, Editorial Mundi-Prensa. p 15-61.
- 23. Elsayed E., N. Ezz El Dien y A. Mahmoud. 2006.** Ichthyophthiriasis: Various fish susceptibility or presence than one strain of the parasite? Nature and Science. 4(3): 5-13.

- 24. Eslava P. 1999.** Anatomopatología comparada de las alteraciones branquiales de la cachama blanca (*Piaractus brachipomus*). Tesis de Maestría en Salud y Producción Animal. Universidad Nacional de Colombia.
- 25. Eufrazio P. y A. Palomino. 2006.** Manual de cultivo de gamitana. Sub-Proyecto: Programa de transferencia de tecnología de acuicultura para pescadores artesanales y comunidades campesinas. 2<sup>da</sup> ed. p 73-75. FONDEPES. Fondo Nacional de Desarrollo Pesquero.
- 26. Evans D., P. Piermarini y W. Potts. 1999.** Ionic transport in the fish gill epithelium. *Journal of experimental zoology*. 283: 641-652.
- 27. Evans D., P. Piermarini y K. Choe. 2005.** The multifunctional fish gill: Dominant site of gas exchange, osmoregulation, acid-base regulation, and excretion of nitrogenous waste. *Physiol. Rev.* 85: 97-177.
- 28. FAO. 1989.** Avances en el cultivo de peces del género *Colossoma*. Documento de Campo No. 5. Programa Cooperativo Gubernamental FAO-Italia. Proyecto AQUILA II. GCP/RLA/102/ITA. 235 p.
- 29. Feist S.W. y M. Longshaw. 2000.** Myxosporidiosis of fish and the bryozoan link with proliferative kidney disease (PKD) of salmonids. *Fish Veterinary Journal*. 5: 37-46.
- 30. Ferguson, H. 2006.** Systemic pathology of fish. A text and atlas of normal tissues in teleosts and their responses in disease. 2<sup>da</sup> ed. Scotian Press.
- 31. Flores J. y R. Flores. 2003.** Monogéneos, parásitos de peces en México: estudio recapitulativo. *Téc. Pecu. Méx.* 41(2): 175-192.
- 32. Florindo L., C. Leite, A. Kalinin, S. Reid, W. Milsom y F. Rantin. 2006.** The role of branchial and orobranchial O<sub>2</sub> chemoreceptors in the control of aquatic surface respiration in the neotropical fish tambaqui (*Colossoma macropomum*): progressive responses to prolonged hypoxia. *Journal of Experimental Biology*. 209: 1709-1715.

- 33. Francis-Floyd. R. 2003.** Dissolved Oxygen for Fish Production. [En línea]. University of Florida. IFAS Extension. [Fecha de consulta: 23 Junio 2007]. Fact Sheet FA-27. Disponible en: <<http://edis.ifas.ufl.edu/pdffiles/FA/FA00200.pdf>>
- 34. Fuentes J. 1998.** Descripción de dos nuevas especies de monogéneos microcotiloideos, parásitos de peces marinos de la costa noreste de Venezuela. *Sci. Mar.* 62(1-2): 65-72.
- 35. González J.A. y B. Heredia. 1998.** Cultivo de la cachama (*Colossoma macropomum*). Fondo Nacional de Investigaciones Agropecuarias, Centro de Investigaciones Agropecuarias del Estado Guárico. Maracay, Venezuela, p 134.
- 36. Goulding M. 1980.** The fishes and the forest. Explorations in Amazonian Natural History. University of California Press, Berkeley. Los Angeles, London, 280p.
- 37. Guerra H., M. Rebaza, F. Alcántara, C. Rebaza, S. Deza, S. Tello, et al. 2000.** Cultivo y Procesamiento de Peces Nativos: Una Propuesta Productiva para la Amazonia Peruana. Instituto de Investigaciones de la Amazonia Peruana. Programa de Ecosistemas Acuáticos. P.E.A. p 9-10.
- 38. Hibiya. 1982.** An atlas of fish histology. Normal and pathological features. Tokyo, Kodansha. p 5-125.
- 39. Honda E. 1974.** Contribuição ao conhecimento da biologia de peixes do Amazonas. II. Alimentação de tambaqui, *Colossoma bidens* (Spix). *Act. Amazônica.* 4(2): 47-53.
- 40. Hordvik I., J. Thevarajan, I. Samdal, N. Bastani y B. Krossoy. 1999.** Molecular cloning and phylogenetic analysis of the atlantic salmon immunoglobulin D gene. *Scand. J. Immunol.* 50: 202-210.
- 41. Huttenhuis H. 2005.** The ontogeny of the common carp (*Cyprinus carpio* L.) immune system. Doctoral Degree Thesis. Wageningen University, Department of Animal Sciences, Cell Biology and Immunology Group.

- 42. Iregui C., P. Eslava, E. Martínez y J. Figueroa. 1999.** Descripción de un caso de mixosporidiasis clínica en cachama blanca, *Piaractus brachypomus*. Dahlia (Rev. Asoc. Colomb. Ictiol.). 3:17-29.
- 43. Iregui A., P. Hernández, A. Jiménez, A. Pulido, A. Rey, J. Comas, et al. 2004.** Primer mapa epidemiológico de las lesiones y enfermedades de los peces de Colombia. Universidad Nacional de Colombia. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural, Bogotá.
- 44. Ismiño R. y C. Araujo-Lima. 2002.** Efecto del Amoníaco sobre el crecimiento de la gamitana *Colossoma Macropomum* (Cuvier, 1818). Folia Amazónica. 13:1-2.
- 45. Kallert D. 2006.** Life cycle studies and transmission mechanisms of myxozoan parasites. Doctoral Degree Thesis. The scientific faculties of the Friedrich-Alexander-Universität Erlangen-Nürnberg.
- 46. Kalogeropoulos N., M. Alexis y R. Henderson. 1992.** Effects of dietary soybean and cod-liver oil levels on growth and body composition of gilthead (*Spaurus aurata*). Aquaculture. 104: 293-308.
- 47. Kinkelin P., C. Michel y P. Ghittino. 1991.** Tratado de las enfermedades de los peces. España, Editorial Acribia. p 15-19.
- 48. Kiessling A., K. Ruohonem y M. Bjornevik. 2006.** Muscle fibre growth and quality in fish. Arch. Tires. 49: 137-146.
- 49. Kozinka A., M.J. Figueras, M.R. Chacon y L. Soler. 2002.** Phenotypic characteristics and pathogenicity of *Aeromonas* genomospecies isolated from common carp (*Cyprinus carpio* L.). Journal of Applied Microbiology. 93: 1034–1041.
- 50. Lom J. y I. Dyková. 2006.** Myxozoan genera: definition and notes on taxonomy, life-cycle terminology and pathogenic species. Folia Parasitológica. 53: 1-36.

- 51. López-Dóriga M.V. y J.L. Martínez. 1998.** Ultrastructure of fish cells involved in cellular defences against *Saprolegnia* infections: evidence of non-leucocytic nature. Dis. Aquatic. Org. 32: 111-117.
- 52. López I., V. Cubillos, S Ernst y C. Rosenfeld. 2001.** Frecuencia y distribución, según edad y estacionalidad, de patologías hepáticas en salmonídeos, provenientes de la Xª a XIIª Región de Chile. Período 1988-1998. Arch. Med. Vet. 33:2.
- 53. Lovell R.T., T. Miyazaki y S. Rabegnator. 1984.** Requirement for a-Tocopherol by channel catfish fed diets low in polyunsaturated triglycerides. J. Nutr. 114: 894-901.
- 54. MacInnes J.I., T.J. Trust y J.H. Crosa. 1979.** Deoxyribonucleic acid relationships among members of the genus *Aeromonas*. Canadian Journal of Microbiology. 25: 579-586.
- 55. Maki J., C. Brown y H. Dickerson. 2001.** Occurrence of *Ichthyophthirius multifiliis* within the peritoneal cavities of infected channel catfish *Ictalurus punctatus*. Dis. Aquat. Org. 44: 41-45.
- 56. Martins M.L., V.N. Souza, J.R. Moraes, F.R. Moraes y A.J. Costa. 1999.** Comparative evaluation of the susceptibility of cultivated fishes to the natural infection with myxosporean parasites and tissue changes in the host. Rev. Brasil. Biol. 59(2): 263-269
- 57. Martins M., E. Onaka, F. Moraes, F. Bozzo, A. Paiva y A. Gonçalves. 2002.** Recent studies on parasitic infections of freshwater cultivated fish in the state of São Paulo, Brazil. Acta Scientiarum. 24(4): 981-985.
- 58. F.P. Meyer y G.L. Bullock. 1973.** *Edwardsiella tarda* a new pathogen of channel catfish (*Ictalurus punctatus*). Applied Microbiology. 25(1): 155-156.
- 59. Meyer C., M. Ganter, W. Korting y D. Steinhagen. 2002.** Effects of a parasite-induced nephritis on osmoregulation in the common carp *Cyprinus carpio*. Dis. Aquat. Org. 50: 127-135.

- 60. Molnár K. 2002.** Site preference of fish myxosporeans in the gill. *Dis. Aquat. Org.* 48: 197-207.
- 61. Mulero V., A. García y J. Meseguer. 2005.** What can we learn from fish? An evolutionary perspective of pro-inflammatory cytokines. *Inmunología.* 24(1):17-22.
- 62. Murai T. y J.W. Andrews. 1974.** Interactions of dietary a-tocopherol, oxidized menhaden oil and ethoxyquin on channel catfish (*Ictalurus punctatus*). *Nutr.* 104:1416-1431.
- 63. Najiah M., S.W. Lee y K.L. Lee. 2006.** Phenotypic characterization and numerical analysis of *Edwardsiella tarda* in wild asian swamp eel, *Monopterus albus* in terengganu. *Journal of Sustain Sci & Mngt.* 1(1): 85-91.
- 64. Noga J. 2000.** Fish Disease. Diagnosis and treatment. First Edition. Iowa State University Press. p 139-158.
- 65. Oliveira J. L., L. Vargas, R. Ribeiro, H. Marques, M. Natali, T. Volski, et al. 2001.** Histologia das brânquias de larvas da tilápia do Nilo, *Oreochromis niloticus* (L.), de origem tailandesa, submetidas a diferentes níveis de vitamina C. *Acta Scientiarum.* 23(4): 863-870.
- 66. Paniagua C., O. Rivero, J. Anguita y Naharro G. 1990.** Pathogenicity factors and virulence for rainbow trout (*Salmo gairdneri*) of motile *Aeromonas spp.* isolated from a river. *Journal of Clinical Microbiology.* 28(2): 350-355.
- 67. Paredes V. 1984.** Enfermedades parasitarias de peces tropicales en la zona de Iquitos y Pucallpa en el Perú. *Mems. Asoc. Latinoam. Acuicult.* 5: 103-111.
- 68. Penna M., Villacorta-Correa, T. Walter y M. Petrere-JR. 2005.** Growth of the tambaqui *Colossoma macropomum* (cuvier) (Characiformes: characidae): which is the best model? *Braz. J. Biol.* 65 (1): 129-139.



- 69. Pineda H., D. Molina, M. Olivera y J. Builes. 2004.** Contribución a la relación taxonómica entre cuatro especies de peces de la familia Characidae mediante el Polimorfismo de ADN Amplificado al Azar (RAPD). *Rev Col Cienc Pec.* 17: 30-37.
- 70. Reimschuessel R., E. May, R. Bennett y M. Lypsky. 1988.** Necropsy examination of fish. *Vet. Clin. North Am.: Small Animal Practice.* 18: 427-433.
- 71. Reimschuessel R., Bennett R.O. y M. Lypsky. 1992.** Communications. A Classification System for Histological Lesions. *Journal of Aquatic Animal Health.* 4:135-143.
- 72. Reimshuessel. R. 2001.** A Fish Model of Renal Regeneration and Development. *ILARL. Journal.* 42(4): 285-291.
- 73. Rescan P., B. Collet, C. Ralliere, C. Cauty, J. Delalande, G. Goldspink, et al. 2001.** Red And white muscle development in the trout (*Oncorhynchus Mykiss*) as shown by In Situ hybridisation of fast and slow myosin heavy chain transcripts. *The Journal of Experimental Biology.* 204: 2097–2101.
- 74. Reyna S.M. 1993.** Patología celular y tisular. En: FJ Trigo & AM Poumián (eds.): *Patología General Veterinaria.* México, Nueva Editorial Interamericana. p 26-30.
- 75. Richards R. 1981.** Micología de los teleósteos. En: RJ Roberts (ed.): *Patología de los peces.* Madrid, Editorial Mundi-Prensa. p 235-247.
- 76. Richards R.H. y R.J. Roberts. 1981.** Bacteriología de los teleósteos. En: RJ Roberts (ed.): *Patología de los peces.* Madrid, Editorial Mundi-Prensa. p 209-233.
- 77. Rocha E., R.A. Monteiro y C.A. Pereira. 1994.** The liver of the brown trout, *Salmo trutta fario*: a light and electron microscope study. *J. Anat.* 185(2): 241–249.
- 78. Sahoo P.K, P. Swain, S.K. Sahoo, S. Mukherjee y A. Sahu. 2000.** Pathology caused by the bacterium *Edwardsiella tarda* in *Anabas testudineus* (Bloch). *Asian Fisheries Science.* 13: 357-362.

- 79. Schalch S. y F. De Moraes. 2005.** Distribuição sazonal de parasitos branquiais em diferentes espécies de peixes em pesque-pague do Município de Guariba-Sp, Brasil. Rev. Bras. Parasitol. Vet. 14(4): 141-146.
- 80. Sechter I., M. Shmilovitz, G. Altmann, R. Seligmann, B. Kretzer, I. Braunstein, et al. 1983.** *Edwardsiella tarda* isolated in Israel between 1961 and 1980. Journal of Clinical Microbiology. 17(4): 669-671.
- 81. Shotts E.B. y C.E. Starliper. 1999.** Flavobacterial diseases: Columnaris disease, Cold-water disease and bacterial gill disease. En: PTK Woo & DW Bruno (eds.): Fish diseases and disorders, Volume 3: Viral, bacterial and fungal infections, p 569-576.
- 82. Slauson D. y B. Cooper. 2002.** Mechanisms of disease. A Textbook of Comparative General Pathology. Chapter 2 Disease at the cellular level. Ed. Mosby, p 34-73.
- 83. Smith C.E. 1979.** The prevention of liver lipoid disease (ceroidosis) and microcytic anaemia in rainbow trout (*Salmo gairdneri*). Richardson fed rancid diets: A preliminary report. Journal of Fis Diseases. 2: 429-437.
- 84. Soulsby E. 1987.** Parasitología y enfermedades parasitarias. 7ma Edición. México, Nueva Editorial Interamericana. p 4-5.
- 85. Sugita H. K. Tanaka, M. Yoshinami y Y. Deguchi. 1995.** Distribution of *Aeromonas* species in the intestinal tracts of river fish. Applied and Environmental Microbiology. 61(11): 4128–4130.
- 86. Sunyer J., L. Tort y J. Lambris. 1997.** Diversity of the third form of complement, C3, in fish: Functional characterization of five forms of C3 in the diploid fish *Sparus aurata*. Biochem. J. 326: 877-881.
- 87. Swain P., S. Dash, P. Sahoo, P. Routray, S. Sahoo, S. Gupta, et al. 2007.** Non-specific immune parameters of brood indian major carp *Labeo rohita* and their seasonal variations. Fish & Shellfish Immunology. 22:38-43.

- 88. Tacon A. 1992.** Nutricional fish pathology morfological signs of nutrient deficiency and toxicity in farmed fish. FAO Fish Technical Paper. p 75.
- 89. Tort L., J.C. Balasch y S. Mackenzie. 2003.** Fish immune system. A crossroads between innate and adaptive responses. *Inmunología*. 22(3):277-286.
- 90. Useche M. 2000.** El cultivo de la cachama, manejo y producción. Primer Taller Piscícola. Universidad Nacional Experimental del Táchira (UNET). Colombia.
- 91. Verján N. 2002.** Sistematización y caracterización de las enfermedades de la cachama blanca (*Piaractus brachypomus*) en algunas regiones de los Llanos Orientales y estudio de la Enfermedad Septicémica. Tesis de Maestría en Salud y Producción Animal. Universidad Nacional de Colombia.
- 92. Vicentini C.A., I.B. Franceschini-Vicentini, M.T. Bertolucci y Santos A.S. 2005.** Morphological study of the liver in the teleost *Oreochromis niloticus*. *Int. J. Morphol.* 23(3): 211-216.
- 93. Witters H. 1998.** Disorders associated with environmental pH. En: JF Leatherland & PTK Woo (eds.): Fish diseases and disorders, Volume 2: Non-infectious disorders, p 187-206.
- 94. Wolf K. y M.E. Markiw. 1984.** Biology contravenes taxonomy in the Myxosoa: new discoveries show alternation of invertebrate and vertebrate hosts. *Science*. 225: 1449-1452.
- 95. Wolf J.C. y M.J. Wolfe. 2005.** A brief overview of nonneoplastic hepatic toxicity in fish. *Toxicologic Pathology*. 33 (1): 75 – 85.
- 96. Woynarovich A y Woynarovich E. 1998.** Reproducción Artificial de las especies *Colossoma* y *Piaractus*. Una guía detallada de la producción de alevinos de gamitana, paco y caraña. FONDEPES. Fondo Nacional de Desarrollo Pesquero. 1ra Edición. p 8-11.

- 97. Zapata A., B. Diez, T. Cejalvo, C. Gutiérrez-de Frias y A. Cortés. 2006.** Ontogeny of the immune system of fish. *Fish & Shellfish Immunology*. 20(02): 126-136.
- 98. Zaror L., L. Collado, H. Bohle, E. Landskron, J. Montaña y F. Avendaño. 2004.** *Saprolegnia parasitica* en salmones y truchas del sur de Chile. *Arch. Med. Vet.* 36(1): 71-78.
- 99. Zwollo P., S. Cole, E. Bromage y Kaattari S. 2005.** B Cell heterogeneity in the teleost kidney: Evidence for a maturation gradient from anterior to posterior kidney. *The Journal of Immunology*. 174: 6608-6616.

## IX. ANEXOS

Anexo 1. Frecuencia de lesiones macroscópicas encontradas a la necropsia

<b>LESIONES MACROSCOPICAS</b>	<b>Total</b>	<b>%</b>
<b>Hígado:</b> Coloración pálida	26/40	65
<b>Bazo:</b> Dilatado	2/40	58
<b>Estómago:</b> Congestión de vasos externos	16/40	40
<b>Ciegos Pilóricos:</b> Congestión	12/40	30

## Anexo 2: Procesamiento de las muestras.

### ➤ *Fijación de muestras*

Inmediatamente de obtenidas las muestras se procedieron a fijar cada una de ellas en Formalina Bufferada al 10% para conservar la estructura morfológica y química de las células y tejidos que permite realizar posteriormente los procedimientos de coloración

### ➤ *Deshidratación*

Se realiza con el objetivo de eliminar el agua intra y extracelular para lo cual debemos deshidratarlos sumergiéndolos en líquidos anhidros, ávidos de agua. Se utilizaron alcoholes de distinta concentración

Alcohol etílico al 70 por 100	1 hora
Alcohol etílico al 80 por 100	1 hora
Alcohol etílico al 95 por 100	1 hora
Alcohol etílico al 100 por 100	1 hora
Alcohol etílico al 100 por 100	1 hora
Alcohol etílico al 100 por 100	1 hora

### ➤ *Aclaración*

Este procedimiento permite que el alcohol de los tejidos sea reemplazado por un líquido que disuelva la parafina con la cual el tejido va a ser impregnado y, tiene la propiedad de volver transparente a las muestras, para ello se utilizo el xileno continuando con el siguiente proceso:

Xileno 1	1 hora
Xileno 2	1 hora
Xileno 3	1 hora

➤ Inclusión

Este proceso comprende la impregnación de las muestras con un medio que llene todas las cavidades naturales, espacios e intersticios tisulares y aun los espacios intracelulares y, que proporcione la consistencia firme, necesaria para hacer los cortes bastantes delgados sin provocar distorsión, otra ventaja más es la maniobra de encerrarlos en un bloque de parafina permitiendo manejar y fijar la muestra al micrótopo sin dañar la muestra, siendo el método de la parafina el más simple y el mas común que se utilizó para lograr el objetivo siguiendo el siguiente proceso:

Parafina líquida I	1 hora
Parafina líquida II	2 horas

Posteriormente cada una de las muestras se colocaron en el centro de un molde con parafina líquida, se dejó reposar en el medio ambiente hasta que se solidifique.

➤ Corte de la muestra

Para el corte de las muestras se utilizó el microtomo de deslizamiento verificando que el microtomo este ajustado para el grosor de 5µm - 6µm, se colocó el bloque de parafina conteniendo la muestra y se comenzó el corte con impulsos regulares.

Luego se tomaron las laminas de parafina cortadas con el micrótopo conteniendo las muestras y se hizo flotar en un recipiente de agua a temperatura ambiente para quitar el excedente de parafina, se introdujo al recipiente una laminilla, se colocó la muestra en ella y se levantó suavemente con un movimiento uniforme y al tocar el borde de la muestra, esa se adhirió a ella y, se dejó escurrir la laminilla con la muestra impregnada a un ángulo de 60 grados aproximadamente durante dos a cinco minutos.

➤ Secado de los cortes

Una vez los cortes de las muestras se colocaron en una estufa a temperaturas de 37 °C a 40 °C durante toda la noche. El secado permite que desaparezca toda huella de agua entre el corte y el portaobjetos.

➤ Tinción de cortes

Se utilizó la tinción más utilizada en histología que es de Hematoxilina - Eosina (H&E) que son colorantes de contraste. La hematoxilina, que permite observar las estructuras físicas del núcleo, y la eosina, que permite distinguir los detalles del citoplasma de las células.

En primer lugar los cortes se sumergieron en el primer baño de xileno durante tres minutos. Se pasaron el segundo baño de xileno por dos minutos, se dejó escurrir el exceso de solución inclinando el soporte y dejándolo en contacto con el borde del recipiente. Luego se llevó al primer baño de alcohol etílico absoluto durante dos minutos. Posteriormente se sumergieron a un baño de alcohol etílico de 95° durante dos minutos.

Sucesivamente se sumergieron en alcohol de 70° por uno a dos minutos. Una vez realizados los baños con alcohol se procedió a hidratar los cortes sumergiéndolos en un frasco con agua destilada por uno a dos minutos. Luego se realizó la tinción durante 5 minutos con hematoxilina. Sucesivamente se aclaró sumergiendo la preparación tres veces en alcohol ácido al 1 por 100. Para finalmente enjuagar en agua.

Se colocaron las muestras en carbonato de litio al 1 por 100 por 30 segundos para azular.

Se enjuagó con agua.

Se procedió a teñir con Eosina durante 30 segundos.

Se enjuago rápidamente con alcohol al 80 por 100

Se lavó con agua por 30 segundos.



Se procedió a deshidratar en tres baños sucesivos de alcohol etílico absoluto de 20 segundos cada uno.

Se pasó por tres baños de xileno de 15 segundos cada uno.

Finalmente se procedió a montar la preparación con bálsamo de Canadá y se colocó una lámina cubreobjetos para conservación de la muestra y una mejor observación.

### Anexo 3: Coloración GRAM

- Preparar un frotis fino, dejar secar y fijar en calor.
- Aplicar Cristal Violeta durante 1 min. Este tinte dejará de color morado las bacterias Gram positivas.
- Lavar con agua.
- Verter y colocar el Lugol durante 30s.
- Lavar con agua.
- Decolorar con alcohol, hasta que no aparesca color violeta de la extensión, durante 30s.
- Lavar con agua.
- Tinción de contraste con Fucsina Básica, durante 1min. Este tinte dejará de color rosado las bacterias Gram negativas.
- Lavar con agua, secar con papel secante y examinar.

Anexo 3: Aporte nutricional del alimento extruido proveniente de la Empresa NUTRIMIX.

E. Digestible (Mcal/Kg)	3.2
Proteína (%mín)	28
Lípidos (%mín)	7
Fibra (%máx)	6.5
Lisina (%)	1.6
Arginina (%)	2.0
Met+Cis (%)	0.9
Fosf. Total (%)	0.8
Calcio (%mín)	1.0
Sodio (%mín)	0.1
Humedad (%máx)	12.0