

RESPUESTAS HEMATOLOGICAS DE TRUCHAS (ONCORHYNCHUS MYKISS WALBAUM 1792) A ESTRÉS HIPOXICO AGUDO: SERIE ROJA

Ariel Valenzuela, Katherine Alveal y Eduardo Tarifeño. 2002. Proceeding of the IV Symposium-Workshop of Chilean Association of Ichthyology. Gayana 66(2): 255-261

1.- Programa Doctorado en Cs. Biológicas. Universidad de Concepción, Chile.

2.- Departamento de Zoología Universidad de Concepción, Chile.

www.produccion-animal.com.ar

Volver a: [Producción acuícola](#)

RESUMEN

En peces, para el control homeostático, se necesita un adecuado suministro de oxígeno desde el medio acuático hasta los sitios de metabolismo aeróbico. Muchos peces están bien adaptados para soportar condiciones hipoxicas en su ambiente por ajustes respiratorios y cardiovasculares. Sin embargo no existe suficiente información sobre la respuesta homeostática de parámetros sanguíneos a hipoxia aguda. En los peces de cultivo es común que ellos sean expuestos a cortos periodos de hipoxia o anoxia a causa de fallas en las rutinas de manejo.

Se determinó hematocrito, hemoglobina, recuento de eritrocitos, tamaño de los eritrocitos y cantidad de hemoglobina por eritrocito en truchas (*Oncorhynchus mykiss*) llevadas a hipoxia progresiva por mantención de los peces en respirómetros estáticos por 5, 10, 20 y 30 minutos; también se determinó el Índice Bazo-Somático (IBS) y la tasa de consumo de oxígeno.

Los resultados mostraron que los peces fueron expuestos a condiciones hipoxicas de 2 mg O₂/L al final de los 30 minutos. En respuesta al estrés hipoxico las truchas reaccionaron con disminución del consumo de oxígeno y del (IBS) e incrementos simultáneos en el número de eritrocitos, hematocrito y policromatófilos (eritrocitos inmaduros). Sin embargo el tamaño celular y la concentración de hemoglobina en los eritrocitos disminuyeron.

Estos resultados sugieren que los peces se adaptan al estrés hipóxico reduciendo el consumo de oxígeno (respuesta oxiconformadora) e incrementando el número de eritrocitos en circulación. Sin embargo muchas de estas células son fisiológicamente poco funcionales debido a la poca hemoglobina que poseen.

INTRODUCCIÓN

La respiración en los peces se dificulta con respecto al mismo proceso en los vertebrados de respiración aérea, ya que la toma de oxígeno desde el agua es más difícil de realizar por factores como la menor disponibilidad del gas en el medio acuoso, la mayor viscosidad del medio y la variabilidad de la tasa de difusión del oxígeno desde la atmósfera por cambios de temperatura y salinidad, por causas de contaminación antropogénica o incluso por procesos naturales tales como corrientes y actividad fotosintética. Dada esta variabilidad en la disponibilidad de oxígeno en el medio acuático, que en algunos casos puede causar situaciones de hipoxia ambiental, hace que los peces dispongan de diferentes estrategias adaptativas que les permita responder con ajustes homeostáticos que van desde el nivel molecular, fisiológico hasta complejas respuestas de comportamiento.

El mantenimiento de la homeostasis respiratoria en peces frente a la reducción del oxígeno ambiental produce tres tipos de respuestas: i) una inmediata que se desarrolla en un lapso de minutos a horas, produciendo ajustes a nivel fisiológico tales como en la frecuencia cardíaca y tasa de ventilación; ii) otra intermedia que se desarrolla dentro de horas a días promoviendo una respuesta más compleja de tipo celular, específicamente ajustes en los parámetros hematológicos relacionados con la captación y distribución del oxígeno y también excreción del CO₂ (Powers 1980). Como parte de esta respuesta ocurre un aumento del hematocrito y del recuento de eritrocitos en conjunto con una disminución de los fosfatos orgánicos, lo que produce una modificación alostérica de la hemoglobina permitiendo un aumento de su afinidad por el oxígeno (Val 2000); iii) Si las condiciones de hipoxia son mantenidas por días o meses, se verifica una respuesta a más largo plazo, ajustándose además de los mecanismos que permiten mantener la homeostasis respiratoria, los procesos que administran el uso de la energía, como son la alimentación, comportamiento y la reproducción.

Todas estas respuestas están mediadas y controladas por la activación del "eje del estrés" (sensu Mazeaud & Mazeaud 1981) el cual, al ser inducido por factores como el aumento de la temperatura, el ejercicio exhaustivo, la hipercapnia, la manipulación excesiva, además de la hipoxia, produce la liberación de catecolaminas desde el tejido interrenal. Las células interrenales, entre otras funciones, facilitan la mantención de la homeostasis respiratoria a través de la aceleración del flujo sanguíneo branquial por vasoconstricción y bradicardia simultánea. El resultado final de todos los mecanismos de respuestas adaptativas a situaciones de hipoxia ambiental en el

medio es mantener el abastecimiento continuo del oxígeno necesario para el metabolismo celular, con su transporte desde el medio externo hasta el medio intracelular.

En el manejo de las pisciculturas, uno de los factores claves en el éxito del proceso productivo es evitar exponer a los peces a situaciones estresantes que afecten sus normales tasas de crecimiento en peso y/o deriven en enfermedades, con el consiguiente mayor costo en alimentación y mantención general de los cultivos. Los niveles de oxígeno disponibles en las pisciculturas deben ser suficientes para no afectar las tasas de respiración individual, existiendo recomendaciones estandarizadas de que no sean nunca inferiores a 8 mg O₂ /L (Leitritz & Lewis 1976). Si bien es cierto que en términos prácticos se conocen las estrategias de manejo que deben ser implementadas en casos de hipoxia en los estanques de cultivos, en gran medida generadas a partir de experiencias empíricas catastróficas, aún se requiere de mayor conocimiento fisiológico sobre las respuestas de los peces a la hipoxia, especialmente de aquellas respuestas que puedan ser consideradas como indicadores de estrés a nivel subletal en los peces y que pueden servir como llamados de alerta para tomar las medidas precautorias que correspondan en el manejo rutinario del cultivo.

Con la finalidad de aportar con información básica a un mejor conocimiento de los mecanismo de respuestas a la hipoxia en peces, en este trabajo se describe y analiza la respuesta de la trucha (*Oncorhynchus mykiss* (Walbaum 1792)) frente a condiciones de hipoxia aguda, tomando en cuenta el perfil hematológico como indicador secundario de estrés.

MATERIALES Y METODOS

Diseño experimental

Se trabajó con un grupo de truchas (*O. mykiss*) obtenidas del Centro de Cultivo de Polcura (Los Angeles, Chile). Los peces fueron aclimatados en estanques de 600 litros a una densidad de 15 Kg/m³ en el Laboratorio de Bioensayos de la Universidad de Concepción. Los peces estuvieron en una cámara de temperatura controlada (12 ± 1°C) bajo fotoperíodo de 12:12, con un sistema de recirculación de agua con un 100% de recambio cada 3 días y aireación permanente. De este grupo se tomó al azar 25 peces (15,9 ± 1,3 cm y 39,4 ± 8,8 g) los que fueron separados en 5 grupos experimentales de 5 individuos cada uno. En cuatro de estos grupos se indujo gradualmente la hipoxia manteniendo cada pez por 5, 10, 20 y 30 minutos en un respirómetro estático cerrado de 1 litro. En la medida que pasaban los minutos, la concentración de oxígeno dentro del respirómetro disminuía por efecto del consumo del pez. Esta situación simulaba una condición aguda de hipoxia ambiental (O₂ < 3 > 1 mg O₂/L) que ocasionalmente se pueden dar en una piscicultura si no hay un control y vigilancia de rutina de los niveles de oxígeno en los estanques o sistemas de cultivos. Ensayos preliminares permitieron determinar los lapsos necesarios (30 minutos) para evitar que se llegara a situaciones de anoxia (O₂ < 1 mg O₂/L) dentro de los respirómetros. Después del tiempo respectivo, cada trucha fue medida y pesada. Como control se analizó 5 peces obtenidos directamente del estanque de aclimatación sin haber sido sometidos a las condiciones de hipoxia gradual que experimentaban los peces en los respirómetros.

Tasa de consumo de oxígeno

Para la estimación de la tasa de consumo de oxígeno de cada pez se procedió a medir con un oxigenómetro el O₂ disuelto en el agua al inicio e inmediatamente después del lapso de mantención de los peces en el respirómetro. La tasa de consumo de oxígeno se expresó como VO₂ = ml O₂ g⁻¹ h⁻¹ a través de la expresión VO₂ = (O_i - O_f)/dt. Donde O_i y O_f son las concentraciones de oxígeno al inicio y final del experimento, respectivamente y dt el tiempo de mantención de los peces en los respirómetros.

Índice bazo-somático (IBS)

Para estimar los cambios producidos en el bazo que pudieran ser atribuibles a la hipoxia se evaluó las variaciones en peso de este órgano hemopoyético estandarizado al peso total de cada pez; para esto se extrajo el órgano y se pesó en una balanza analítica con sensibilidad de 0.001 g. Para obtener los valores de IBS se utilizó la ecuación:

$$IBS = Pb/Pt - Pb \times 100.$$

Donde Pb y Pt son los peso del bazo y total expresados en gramos.

Análisis de sangre

Al término de la exposición a la hipoxia, la muestra de sangre de cada pez se obtuvo por punción caudal usando como anticoagulante EDTA. (4-mg/ml). El tratamiento de las muestras de sangre siguió los métodos estandarizados para peces según Campbell & Murru (1990). El hematocrito se determinó por el micrometodo centrifugando la sangre a 12.000 rpm por 5 minutos. La concentración de hemoglobina se determinó por el método de la cianometahemoglobina y los conteos de eritrocitos fueron realizados en cámaras de Neubauer previa

dilución de la sangre con solución de Ress-Ecker en proporción 1:100. Con estos parámetros se calculó el volumen corpuscular medio (VCM), la concentración de hemoglobina corpuscular media (CHCM) y la hemoglobina corpuscular media (HCM).

Los policromatófilos (eritrocitos inmaduros) fueron determinados en función del recuento de eritrocitos y la policromatofilia relativa obtenida de extensiones sanguíneas teñidas con May Gröndwald y Giemsa. La determinación de la policromatofilia relativa se realizó sobre la base de 1000 eritrocitos contados por individuo.

Para evaluar el efecto de la hipoxia aguda en los parámetros hematológicos se utilizó una ANOVA (previa revisión de los supuestos). Las comparaciones entre los grupos se efectuaron con el test Tuckey y la correlación entre los distintos parámetros por medio de la correlación de Pearson (Zar 1994). En todos los análisis realizados se utilizó un nivel de significancia de 0.05.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la tabla I se muestran las longitudes (cm) y pesos (g) promedio en los grupos de peces mantenidos por distintos períodos de tiempo (0, 5, 10, 20 y 30 minutos) en los respirómetros para inducir gradualmente la hipoxia aguda; no hubo diferencia significativa en longitud y peso ($p > 0.05$) entre los grupos. Como era de esperar, producto de la respiración de los peces se produjo una disminución gradual en la concentración de oxígeno dentro del respirómetro estático, desde valores mayores a 8 mg O₂/L (8.7 al inicio) hasta un promedio de 1.4 mg O₂/L (tabla I). Las tasas de consumo de oxígeno (VO₂) disminuyeron gradualmente hasta un 60% del consumo inicial sin indicios de una presión parcial crítica para el oxígeno ambiental en la cual las tasas de consumo de los peces cambiaran desde una condición de independencia a una de dependencia de la concentración de O₂ en el medio externo. Cabe destacar, que no hubo mortalidad en ninguno de los respirómetros. Una interpretación fisiológica de este resultado podría ser que corresponde a una muestra de la sensibilidad de las truchas a las variaciones de la concentración de oxígeno en el agua, dado que valores aproximados a 8 mg O₂/L han sido sugeridos como el mínimo de seguridad en las pisciculturas (Leitritz & Lewis 1976). Estos antecedentes indicarían que las truchas una vez puestas dentro de los respirómetros, con niveles iniciales de oxígeno disuelto de 8.7 mg O₂/L entraron rápidamente en un estado de estrés fisiológico consumiendo oxígeno con tasas de acuerdo a su disponibilidad en el medio, con una respuesta de tipo oxicon-formadora. Por lo tanto, se debería esperar que los mecanismos de repuestas hematológicas también fueron puestos en funcionamiento tan pronto como empezó la disminución de la concentración de oxígeno dentro de los respirómetros.

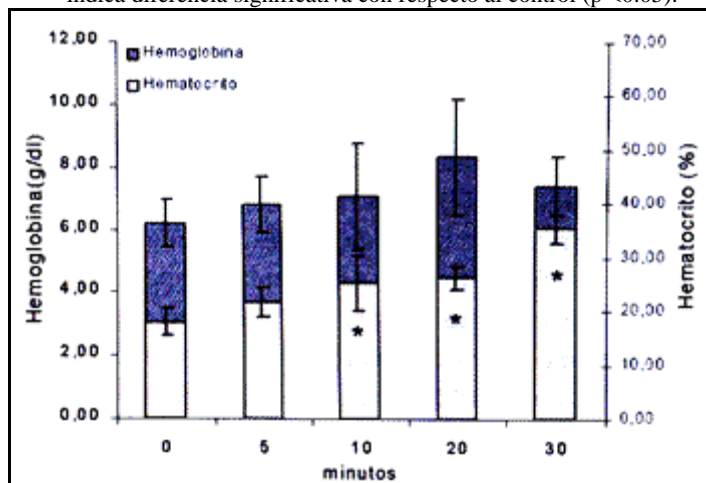
Tabla I. Datos biométricos, IBS (índice bazo somático), de consumo de oxígeno y de oxígeno disuelto promedio por cada grupo de truchas llevadas a hipoxia. Tiempo 0= control, () desviación estándar.

Tiempo (min)	VCM (fl/gr)	HCM (pg/gr)	CHCM (%)
0	366.10 (50.03)	142.23 (12.98)	34.72 (1.40)
5	279.61 (46.91)	89.39 (23.89) *	31.84 (5.44)
10	282.09 (62.84)	78.02 (11.61) *	28.03 (2.52)
20	253.38 (27.22) *	81.03 (19.36) *	32.37 (9.23)
30	318.87 (42.71)	67.41 (15.53) *	21.06 (3.07) *

El índice Bazo/somático (IBS) evidenció una disminución de 0.445 a 0.244 a los 20 minutos de exposición a la hipoxia, lo cual representa una disminución de peso de este órgano hasta un 55% del peso inicial en dicho lapso (Tabla I). La tendencia fue una disminución entre los 20 y 30 minutos ($p = 0.027$). Esta respuesta observada en el bazo, como órgano hematopoyético mostró correlación (negativa) con el número de eritrocitos, de los eritrocitos inmaduros o policromatófilos y del hematocrito ($p < 0.05$), los cuales fueron significativamente diferentes al control a partir de los 5 y 10 minutos respectivamente (Fig. 1 y 2). Sin embargo, la hemoglobina no mostró un aumento significativo, aun después de los 30 minutos de exposición de los peces a la situación de hipoxia (Fig. 1).

Figura 1. Hematocrito y hemoglobina de los grupos de truchas llevadas a hipoxia.

* indica diferencia significativa con respecto al control ($p < 0.05$).

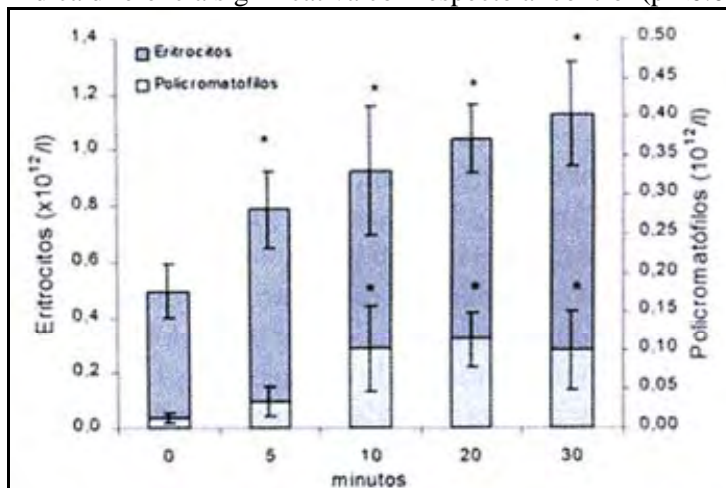


Dado que aumentaba el hematocrito y los eritrocitos con el tiempo de hipoxia, se debía esperar que también aumentara la hemoglobina, ya que este pigmento respiratorio se encuentra sólo dentro de los eritrocitos.

En cuanto a las constantes hematológicas Volumen Corpuscular Medio (VCM), Hemoglobina Corpuscular Media (HCM) y Concentración de Hemoglobina Corpuscular Media (CHCM) (Tabla II) mostraron correlaciones (positivas) con el IBS y la hipoxia ($p < 0.05$) sólo el VCM (con IBS) y la CHCM (con el grado de hipoxia) encontrando disminución de las constantes hematológicas con respecto al control en distintos tiempos (tabla II). Sin embargo, la HCM mostró en los 5 minutos iniciales una disminución significativa ($p < 0.05$), producto del incremento en el número de eritrocitos pero sin un aumento significativo en la concentración de hemoglobina (Figura 1). Las correlaciones de los parámetros concentración de hemoglobina, hematocrito y eritrocitos maduros e inmaduros fue negativa con respecto al IBS ($p < 0.05$).

Figura 2. Cantidad de eritrocitos maduros e inmaduros en los distintos grupos de truchas.

* indica diferencia significativa con respecto al control ($p < 0.05$).



El aumento en el número de eritrocitos sin un incremento significativo de la hemoglobina indica que la gran salida de eritrocitos inmaduros a la circulación no representaría una solución inmediata a la hipoxia aguda, por lo cual deben existir otros mecanismos que expliquen la resistencia a bajos niveles de oxígeno.

Tabla II. Constantes hematológicas de los distintos grupos de truchas, se muestran los promedios y la desviación estándar (). * muestra diferencia significativa con respecto al control ($p < 0.05$)

Tiempo (min)	Longitud (cm)	Peso (g)	IBS	Oxígeno disuelto (mg/l)	VO ₂
0	17.2 (0.57)	44.96 (6.07)	0.445 (0.101)	8.7 (0.0)	
5	15.2 (1.15)	35.60 (9.17)	0.357 (0.076)	6.8 (0.5)	0.360 (0.044)
10	16.2 (0.91)	37.90 (5.70)	0.439 (0.253)	4.8 (0.4)	0.297 (0.038)
20	15.2 (1.35)	36.94 (10.86)	0.244 (0.069)	3.5 (0.9)	0.263 (0.061)
30	16.0 (1.57)	41.58 (10.12)	0.284 (0.138)	1.4 (0.9)	0.218 (0.041)

En los resultados anteriores, se puede observar dos tipos de respuestas de las truchas (*O. mykiss*) frente a la reducción del oxígeno disponible para su respiración. Una primera respuesta rápida, ocurriría a los 5 minutos con optimización de los mecanismos de transporte del oxígeno en la sangre, como el aumento del hematocrito y de los eritrocitos circulantes, esto por aporte rápido desde el bazo, como órgano hematopoyético. Este tipo de respuesta ha sido documentado anteriormente en los peces sometidos a hipoxia aguda, actuando el bazo también como órgano de reserva con capacidad de entrega inmediata de eritrocitos al compartimiento sanguíneo por contracción (Kita & Itazawa 1989, 1990) una vez que la situación de hipoxia ambiental ha puesto en marcha los mecanismos de respuestas fisiológicas compensatorias dentro del individuo.

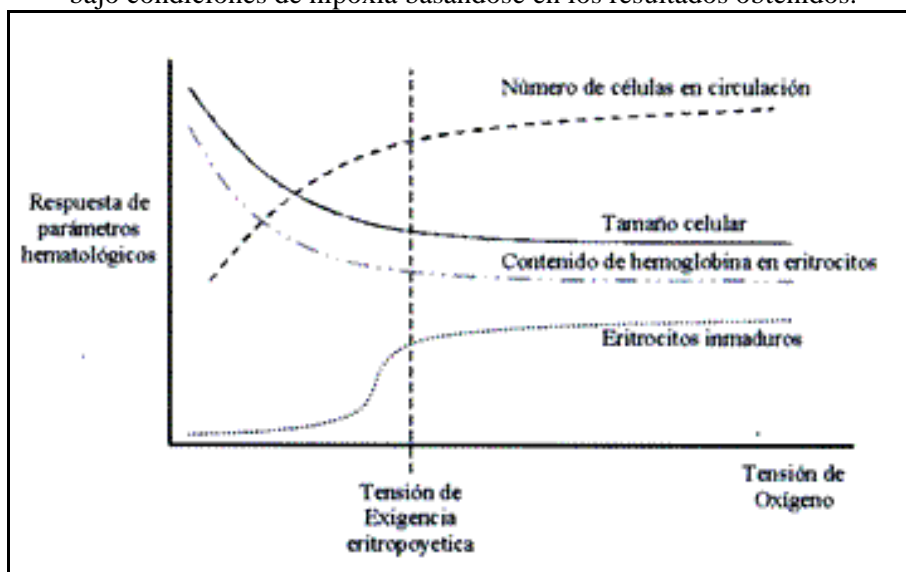
Sin embargo, el aumento del número de eritrocitos en la sangre simultáneamente tiende a producir un aumento en la viscosidad sanguínea, razón por la cual el hematocrito debe ajustarse nuevamente para mantener la entrega de oxígeno y la eliminación de CO₂ en niveles adecuados sin alterar los otros parámetros hematológicos (Brill & Jones 1994). Los mecanismos de regulación pueden ser varios según lo indicado por Birchard (1997). Lo observado en este trabajo fue que junto al aumento de células sanguíneas se produjo una disminución en el tamaño de los eritrocitos, reflejado en la disminución del VCM hasta los 20 minutos (Tabla II); es decir, frente a la hipoxia leve observada en los primeros cinco minutos las truchas liberaron eritrocitos a la circulación por contracción del bazo (Kita & Itazawa 1989) pero estas células fueron de menor tamaño.

El ajuste en el tamaño celular sería una reacción que ocurre in vivo en la sangre dada la capacidad de regulación del tamaño o volumen celular de los eritrocitos, característica ampliamente documentada, especialmente en peces (Soivio & Nikinmaa 1981) y que puede estar asociada a la respuesta al estrés (Lecklin et al. 2000). Sin embargo, aún cuando la respuesta de las truchas a la disminución de oxígeno en los primeros 5 minutos pareció ser la indicada para el nivel de hipoxia inducida, el aumento del número de células y otros ajustes hematológicos (Figura 1 y 2) no fueron acompañados por un aumento significativo en la concentración de hemoglobina (como era de esperar al aumentar el hematocrito), observándose en cambio una disminución en la cantidad de hemoglobina que existe por eritrocitos (HCM) y en la CHCM. Esta situación indica que los eritrocitos liberados a la circulación sanguínea en los primeros momentos del estrés por hipoxia, no estaban suficientemente "maduros" en cuanto a su contenido de hemoglobina, por lo tanto si bien aportaron al aumento de su número circulante (aumento de eritrocitos) no lo fueron en cuanto a la cantidad de hemoglobina como pigmento transportador de oxígeno hacia los tejidos. Esta situación está respaldada por el segundo tipo de respuesta observado a partir de los 10 minutos, la que podría ser calificada como de "exigencia eritropoyética" dado que a partir de ese momento se manifestó claramente el aumento de los policromatófilos en la circulación, lo que se relaciona con los cambios en el bazo y que sería señal de la contracción de este órgano para aumentar los eritrocitos circulantes, pero que incluyó la liberación de células sanguíneas poco funcionales y que aun requieren de un tiempo de maduración para la síntesis de la hemoglobina en su interior.

Estos dos tipos de respuestas (parámetros hematológicos) de las truchas expuestas a condiciones progresivas de hipoxia ambiental indican que las posibilidades de adaptación a disminuciones sorpresivas de oxígeno en el medio acuático, son dependientes no sólo del grado de hipoxia, sino también y tal vez más directamente, de la velocidad de cambio en el parámetro ambiental, en el sentido de que si es muy brusco, no daría tiempo para que los peces pudieran poner en marcha sus mecanismos de respuestas (e.g., liberación de suficientes eritrocitos maduros) para mantener los niveles adecuados de transporte de oxígeno en la sangre circulante, a través de una respuesta de control homeostático.

Por otra parte, cabe destacar la observación que las truchas mostraron tasas de consumo de oxígeno dependientes de la concentración en el medio a partir de los valores cercanos a los 8 mg/l, lo cual coincide con las recomendaciones de Leitritz & Lewis (1976) de mantener niveles mayores a estos niveles de oxígeno disuelto en los sistemas de cultivos de peces. Esta situación es de gran relevancia en el manejo de las pisciculturas, donde el abastecimiento de agua suficientemente oxigenada con valores mayores a 8 mg O₂/L) debiera ser un aspecto prioritario en los sistemas de control y vigilancia, junto con mantener bajos niveles de amonio disuelto.

Figura 3. Representación de los cambios adaptativos mostrados por las truchas bajo condiciones de hipoxia basándose en los resultados obtenidos.



AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen las facilidades otorgadas por los Dres. Alberto Larraín y Enrique Bay-Schmidt en el Laboratorio de Bioensayos de la Universidad de Concepción; la colaboración desinteresada y entusiasta del Sr. Alex Muñoz en el desarrollo de este experimento y especialmente al Dr. Víctor Silva del Departamento de Bioquímica Clínica e Inmunología de la Universidad de Concepción por los comentarios, revisión y apoyo permanente en la realización de los experimentos.

LITERATURA CITADA

- Birchard, G. F. 1997. Optimal hematocrit: Theory, Regulation and Implications. *Amer. Zool.* 27:65-72.
- Brill, R. W. & D. R. Jones. 1994. The influence of hematocrit, temperature and shear rate on the viscosity of blood from a high-energy-demand teleost, the yellowfin tuna *Thunnus albacares*. *J. Exp. Biol.* 189:199-212.
- Campbell, T. W. & F. Murru. 1990. An introduction to fish hematology. *Compendium of Continuing Education in Veterinary Science.* 12, 525-533.
- Kita, J. & Y. Itazawa. 1989. Release of erythrocytes from the spleen during exercise and splenic constriction by adrenaline infusion in the rainbow trout. *Jpn J. Ichthyol.* 36(1): 48-52.
- Kita, J. & Y. Itazawa. 1990. Effects of adrenaline on the blood flow through the spleen of rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *Comp. Biochem. Physiol.* Vol 95A(4):591-595.
- Lecklin, T., A. Tuominen & M. Nikinmaa. 2000. The adrenergic volume changes of immature and mature rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) erythrocytes. *J. Exp. Biol.* 203:3025-3031.
- Leitritz, E., & R. Lewis. 1976. Trout and salmon culture (hatchery methods). *Fish. Bulletin* 164. 197 pp.
- Mazeaud, M. M. & F. Mazeaud. 1981. Adrenergic response to stress in fish. In: Pickering, A. D. (Ed.). *Stress and Fish*. London: Academic Press. pp 49-68.
- Powers, D. A. 1980. Molecular ecology of teleost fish hemoglobins: Strategies for adapting to changing environments. *Amer. Zool.* 20:139-162.
- Soivio, A., & M. Nikinmaa. 1981. The Swelling of erythrocytes in relation to the oxygen affinity of the blood of the rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson. In: Pickering, A.D. (Ed.). *Stress and Fish*. London: Academic Press. pp 103-118.
- Val, A. L. 2000. Organic phosphates in the red blood cells of fish. *Comp. Biochem. Physiol. Part A*, 125: 417-435.
- Zar, J. H. 1994. *Biostatistical Analysis*. Englewood Cliffs, NJ: Prentice-Hall. 662 Pp.

Volver a: [Producción acuícola](#)