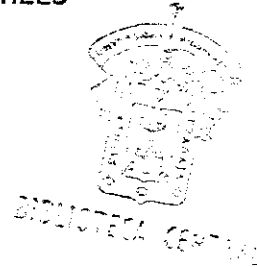


085323466

UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA

CENTRO UNIVERSITARIO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y AGROPECUARIAS

DIVISION DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y AMBIENTALES



APORTACION AL ESTUDIO DE LA INMUNIDAD HUMORAL EN EL
ICTALURUS PUNCTATUS, ASOCIADO A LOS CICLOS ESTACIONA-
LES EN GRANJAS ACUICOLAS DE LA REGION CIENEGA DEL
ESTADO DE JALISCO.

TESIS PROFESIONAL

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
LICENCIADO EN BIOLOGIA

PRESENTA:

MA. DEL SOCORRO IRASU ELIZONDO HERNANDEZ

GUADALAJARA, JAL., JULIO DE 1995

Aportación al estudio de la Inmunidad Humoral
en el Ictalurus punctatus, asociado a los ciclos
estacionales en granjas acuícolas de la región
Ciénega del Estado de Jalisco.

La presente investigación se llevó a cabo en el laboratorio de Inmunobiología del Departamento de Biología Celular y Molecular del Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias de la Universidad de Guadalajara, bajo la dirección de la Dra. Galina Petrovna Zaitseva y la asesoría del Dr. Alfonso E. Islas Rodríguez y en el Laboratorio de Inmunología del Centro Médico de Occidente del I.M.S.S., bajo la asesoría de la Q.F.B. Josefina García A.

PENSAMIENTOS...

AL CREADOR

*Estoy arrivando señor;
siempre aferrada a tus manos.
Ante el acecho de mi soberbia,
simplemente en la vida,
he descubierto tus huellas.*

A MI MADRE

*De tí, no solo recibí la vida.
Con la latitud de tu lucidez,
a diario en mí, te manifiestas.*

A MI PADRE

*Gracias por tu apoyo y
comprensión, sin ellos
no sé que hubiera hecho.*

A MI FAMILIA

*Como un sol que se da,
constantemente
persigo
su fuego abrazador.*

BIOL. SALVADOR VELASCO O.

*En la nave aquella,
en que navegamos,
con sus satisfacciones
y quebrantos.
Siempre
has bogado a mi lado;
sin ataduras,
pero sí,
con tu apego y devoción.
¡ Gracias Chava !*

DRA. GALINA PETROVNA ZAITZEVA
Mi Directora de Tesís

*Maestra:
Con la excelsa virtud
de su generosidad,
abatí mi ignorancia
y enriquecí mi labor.*

DR. ALFONSO E. ISLAS RODRIGUEZ
Mi Asesor

*Su prodigüez,
enalteció mis investigaciones.*

MIS SINODALES

*Amigos:
Lectores todos
de mis modestos homenajes,
debo dar reconocimiento,
a su difícil labor encomendada.*

SRA. MARGARITA ROMERO R.

*En mi crecer,
usted
siempre ha estado atenta
con su amistad y apoyo.*

LIC. ELIGIO GONZALEZ M.

*Su afecto fué único,
su comprensión, siempre fuerte;
continuamente lo recordaré.*

C.P. EDUARDO FLORES M.

*La vida me permitió
disfrutar de la afabilidad,
que usted, siempre me prodigó
en todas sus acciones.*

¡ Gracias !

BIOL. IRMA LETICIA TOTSUKA S.

*A través de la huella
de tu afecto.
Disfruto más del paso
del tiempo.*

BIOL. HECTOR HERNANDEZ

*Al devanar el tiempo
en mis acciones,
labores y tareas
como guardián incansable
siempre en mi auxilio apareces,
recibe mi fraternal cariño.*

Q.F.B. JOSEFINA GARCIA A.

*Usted siempre
prodigó
su trato afable
y amistoso.
¡Gracias a su ayuda crezco!*

**PERSONAL DEL LAB. DE INMUNOLOGIA
DEL HOSPITAL DE OCCIDENTE**

*El allanar
con su apoyo
las dificultades,
me permitió
reconciliarme
con mis metas.*

**PERSONAL DEL LAB. DE INMUNOLOGIA
DE LA UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA**

*Cuantas veces,
llamé a su puerta;
encontrando siempre,
afabilidad en todas sus acciones.*

BIOL. GUSTAVO GOMEZ ORTEGA

*Amigar
sin ningún interés,
prodigarse
con el solo fin de servir
es un hábito en tí;
vaya de mi reconocimiento.*

Q.F.B. ROSA MA. DOMINGUEZ

*En las acciones de: Enseñar y aprender,
de: Dar y Recibir;
Usted es siempre pródiga,
su huella está.
en cada uno de sus alumnos.*

ING. ROBERTO MIRANDA M.

*Con dificultades y esfuerzo,
voy arribando a la meta;
Usted Ingeniero
me tendió su mano.
"Ha facilitado mi lucha"
¡ Gracias Señor!*

SR. JAVIER PARRA

*Resolviendo la suma
de las acciones
en las que he requerido
de tu amistad:
el fallo fué asentido.*

SR. JOSE LUIS MEDINA

*En el estiaje
de mi existencia
tu amistad
ha sido plena.*

INDICE

	Página
A.- RESUMEN	4
1.- INTRODUCCION	5
2. ANTECEDENTES	6
2.1 BIOLOGIA DEL BAGRE DE CANAL	6
2.2 GENERALIDADES SOBRE LA RESPUESTA INMUNE	8
2.3 INMUNOLOGIA DE LOS PECES	10
2.4 INMUNIDAD HUMORAL DEL BAGRE DE CANAL	13
2.5 GENERALIDADES DEL MEDIO AMBIENTE	14
3. JUSTIFICACION	18
4. HIPOTESIS	19
5. Objetivo General	20
6. METODOLOGIA	21
6.1 Características de las Granjas.-	21
6.2 Obtención de las muestras.-	21
6.3 Especímenes.-	21
6.4 Procesamiento de las muestras.-	22
6.5 Análisis Estadístico.-	23
7. RESULTADOS	28
8. DISCUSION	41
10. BIBLIOGRAFIA	45

INDICE DE CUADROS

BIBLIOTECA CENTRAL

	Página
CUADRO 1. Concentracion de IgM en suero de bagre de canal en OTOÑO	29
CUADRO 2. Concentracion de IgM en suero de bagre de canal en INVIERNO	30
CUADRO 3. Concentracion de IgM en suero de bagre de canal en PRIMAVERA	31
CUADRO 4 Concentracion de IgM en suero de bagre de canal en VERANO	32
CUADRO 5. Sumatoria, promedio, desviación estándar y varianza de la concentración de IgM en suero de bagre de canal en los diferentes ciclos estacionales por la técnica de inmunodifusión radial simple y nefelometría estandarizada en dos granjas acuícolas de Jalisco	33
CUADRO 6. Comparación de la concentración de IgM en los diferentes ciclos estacionales con la técnica de Inmunodifusión Radial Simple en la Granja Acuícola de Ocotlán	36
CUADRO 7. Comparación de la concentración de IgM en los diferentes ciclos estacionales con la técnica de Inmunodifusión Radial Simple en la Granja Acuícola de Jamay	37
CUADRO 8. Comparación de la concentración de IgM en los diferentes ciclos estacionales con la técnica de Nefelometría Estandarizada en la Granja Acuícola de Jamay	38
CUADRO 9. Comparación de la concentración de IgM en los diferentes ciclos estacionales con la técnica de Nefelometría Estandarizada en la Granja Acuícola de Ocotlán	39
CUADRO 10. Comparación de la Sensibilidad - tiempo - costo de la técnica de Inmunodifusión Radial Simple y Nefelometría Estandarizada	40

INDICE DE FIGURAS

	Página
FIGURA 1. Localización de las granjas acuícolas en el Estado de Jalisco	24
FIGURA 2. Características de la granja acuícola de Jamay	25
FIGURA 3. Características de la granja acuícola de Ocotlán	26
FIGURA 4. Diagrama de flujo representando el procesamiento de las muestras	27
FIGURA 5. Concentración de IgM en suero de bagre de canal en las diferentes épocas del año con la técnica de Inmunodifusión Radial Simple	34
FIGURA 6. Concentración de IgM en suero de bagre de canal en las diferentes épocas del año con la técnica de Nefelometría Estandarizada	35



UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA
Facultad de Ciencias Biológicas

Expediente.....

Número

Sección

C.MA. DEL SOCORRO IRASU ELIZONDO HERNANDEZ

P R E S E N T E . -

Manifetamos a usted, que con esta fecha ha sido aprobado el tema de tesis "APORTACION AL ESTUDIO DE LA INMUNIDAD HUMORAL EN EL ICTALURUS SPP. ASOCIADA A LOS DIFERENTES CICLOS ESTACIONARIOS EN GRANJAS ACUICOLAS DEL ESTADO DE JALISCO" para obtener la Licenciatura en Biología.

Al mismo tiempo le informamos que ha sido aceptado como Director de dicha Tesis la Dra. Galina Zaitzeva Petrovna.

A T E N T A M E N T E

"PIENSA Y TRABAJA"

Las Agujas Zapopan, Jal. 13 de Enero de 1994

EL DIRECTOR

DR. EULOGIO RIMENTIA BARRIOS



FACULTAD DE
 CIENCIAS BIOLÓGICAS

EL SECRETARIO

M. EN C. MA./GEORGINA GUZMAN GODINEZ

c.c.p.- Dra. Galina Zaitzeva Petrovna, Director de Tesis.-pte.

c.c.p.- El expediente del alumno

EPB/MGGG/cglr.

C. DR. ALFONSO E. ISLAS RODRIGUEZ
DIRECTOR DE LA DIVISION DE
CIENCIAS BIOLÓGICAS Y AMBIENTALES
DE LA UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA
P R E S E N T E

Por medio de la presente, nos permitimos informar a Usted, que habiendo revisado el trabajo de tesis que realizó el (la) pasante:

ELIZONDO HERNANDEZ MARIA DEL SOCORRO TRASHI
código 085323466 con el título: "Aportación al Estudio de la Inmunidad Humoral en el Ictakurus punctatus, asociado a los ciclos estacionales en granjas acuícolas de la región Ciénega del Rió Jalisco".
consideramos que ha quedado debidamente concluído, por lo que ponemos a su consideración el escrito final para autorización de impresión y en su caso programación de fecha de exámenes de tesis y profesional respectivos.

Sin otro particular, agradecemos de antemano la atención que se sirva dar a la presente y aprovechamos la ocasión para enviarle un cordial saludo.

A T E N T A M E N T E
Las Agujas, Nextipac, Zapopan, Jal., de 1995.

EL DIRECTOR DE TESIS

EL ASESOR



NOMBRE Y FIRMA

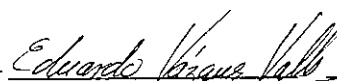
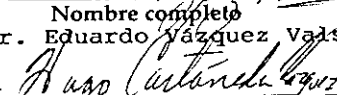
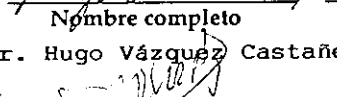


NOMBRE Y FIRMA

DRA, GALINA Zaitseva Petrovna

Dr. Alfonso E. Islas Rodriguez

SINODALES

- 1.- 
Nombre completo
Dr. Eduardo Vázquez Vals
- 2.- 
Nombre completo
Dr. Hugo Vázquez Castañeda
- 3.- 
Nombre completo
M. en C. Ma. Elena Díaz Díaz

RESUMEN

La relación Organismo - Ambiente desempeña un papel importante en los mecanismos de la respuesta inmune, los cuales son determinantes en la salud del ser vivo.

Este trabajo tuvo por objeto determinar la concentración de IgM en el Bagre de canal (*Ictalurus punctatus*) involucrado con el factor ambiental ciclo estacional. Durante doce meses se visitaron dos granjas acuícolas de la región Ciénega de Jalisco (Ocotlán y Jamay), con la finalidad de obtener muestras de suero de bagres de canal juveniles.

La concentración de IgM se valoró por las pruebas de Inmunodifusión Radial Simple y Nefelometría Estandarizada. Los resultados muestran diferencias significativas de la concentración de IgM en los ciclos estacionales. Se encontró elevación significativa de la respuesta humoral en invierno y un descenso marcado en verano y otoño, coincidiendo esto con ambas metodías. Finalmente, en la presente investigación se discuten algunos de los factores ambientales que suponemos influyen en forma determinante sobre la inmunidad humoral del pez.



1.- INTRODUCCION

En los últimos años se ha considerado incrementar el desarrollo de la acuicultura en México para contribuir a la creciente demanda de productos alimenticios de gran valor nutricional. El campo emergente de la Salud Ambiental esta llevando a valorizar las prácticas preventivas para elevar el nivel de vida apoyándose en la producción de especies cuyo cultivo se basa en el manejo de una biotécnica plenamente probada en otros países. Por lo cual, las especies seleccionadas para un desarrollo acuícola con fines de producción actualmente son: el bagre, carpa, tilapia y trucha, ya que la biología de estas especies es más conocida (1). El bagre de canal (*Lctalurus punctatus*) es un pez que se puede mantener con cierta facilidad dada su adaptabilidad, ya que es capaz de desarrollarse a una talla comercial en un tiempo relativamente corto en condiciones controladas y con un mínimo de inversión. Además, tiene un alto índice de fecundidad y buen precio en el mercado tanto nacional como internacional. Todo esto, conjuntado al gran valor nutritivo que tiene esta especie hacen del bagre un pez, que brinda un recurso de alta calidad en la dieta del hombre (2).

En estudios realizados en 1986 (3) y en 1993 (4), demostraron la susceptibilidad que presenta éste pez a las bacterias saprófitas y oportunistas facultativas. Las enfermedades causadas por éstas se acentúan más, cuando las condiciones del medio ambiente no son favorables, lo que nos indica la sensibilidad del pez a los cambios del medio ambiente, que probablemente lo lleva a un estado de inmunodeficiencia relativa. Uno de los aspectos que poco se ha investigado en las poblaciones de peces es el estudio del sistema inmune, que permite al individuo sobrevivir y mantener su homeostasia. Además, casi no hay estudios de la respuesta inmune relacionada con el medio ambiente que podría plantear nuevas perspectivas para las prácticas científicas, con la finalidad de manejar la producción.

El presente estudio se enfoca específicamente a la inmunidad humoral del bagre de canal (*Lctalurus punctatus*), relacionado con la cuantificación de inmunoglobulinas y las repercusiones que éstas sufren en los diferentes ciclos estacionales.



1

2. ANTECEDENTES

2.1 BIOLOGIA DEL BAGRE DE CANAL

Taxonomía del bagre de canal.- Pertenece al Reino Animal; Phylum Chordata; Subphylum Gnatostomata; Clase Osteichthyes; Sub Clase Actinopterygii; Orden Teleostei; Sub Orden Siluroidei; Familia Ictaluridae; Género Ictalurus; Especie punctatus ; Nombre Común Bagre de Canal.

Distribución Geográfica.- El bagre de canal (*Ictalurus punctatus*) es un pez de agua dulce, es nativo de los estados fronterizos entre México y Estados Unidos; la especie fue introducida a través de los Estados Unidos hacia otros países desde el siglo pasado, quedando ampliamente distribuido en Chihuahua, Sinaloa, Sonora, Tamaulipas, Nuevo León y Querétaro. Es de clima tropical y sub tropical, habita en altitudes desde el nivel del mar hasta los 1500 metros.

Descripción Morfológica.- El bagre de canal presenta ojos regresivos, cabeza ancha y aplastada dorsoventralmente que representa del 19% al 24% de la longitud total del cuerpo, hocico largo equivalente a un 42% en relación al tamaño de la cabeza, el cuerpo esta comprimido lateralmente por atrás de las aletas pélvicas; posee branquiespinas largas muy espaciadas en número de 14 a 18, presenta aleta dorsal colocada por delante de la mitad del cuerpo, radios blandos con una espina modificada y fuerte, la aleta anal tiene 8 radios.

Hábitat.- Tiene hábitos nocturnos o crepusculares, se encuentran comúnmente en presas, lagos o ríos de corriente y poca profundidad pero invariablemente con fondo de lodo, grava o arena; evita los cuerpos de agua poco profundos con vegetación densa.

Ciclo de Vida.- La dimensión varía de 20 cm a 90 cm, el peso promedio es variable puede ser de 100 grs. hasta 1000 grs., los cuales están sujetos a las condiciones del medio ambiente, disponibilidad de alimento, sanidad acuícola, etc. La fecundación es externa, la temporada de reproducción es de mediados de primavera hasta Junio o Julio. El macho hace el nido en aguas bajas y en suelos suaves, lodosos o arenosos, los cuales son simples hoyos que se mantienen siempre limpios y cabe solo la pareja. Aquí los huevecillos quedan al cuidado del macho, el que les mantiene oxigenado el ambiente.

La hembra arroja únicamente una vez al año un promedio de 20,000 huevos por kilogramo de peso, dependiendo de la edad y el tamaño, en cambio el macho es



capaz de fecundar a varias hembras. Presenta dimorfismo sexual, el macho tiene la papia genital protuberante y alargada, en la hembra es redondeada con pliegues y surcos de color rojizo; la cabeza es más grande y ancha en el macho y el color de la piel es más claro en las hembras.

Tiene varias etapas de desarrollo: huevo, con un período de incubación de 5 a 7 días dependiendo de la temperatura; alevín, de 5 a 8 días; crías, de 2 a 3 meses; juvenil, de 1 a 1 1/2 años; y adulto de 1 1/2 a 4 años. En las dos primeras etapas se requieren de cuidados esmerados por su elevada mortandad. El desarrollo del huevo está sumamente ligado a la temperatura, en invierno puede ser por debajo de los 17 °C y en primavera-verano entre 25-27 °C. Alcanza su madurez sexual aproximadamente a los 2 años, a una talla de 25 a 30 cm y un peso de 1,500 grs. Presenta un sistema circulatorio cerrado, con un volumen sanguíneo de 1.4 a 3% del peso corporal, el plasma sanguíneo y los elementos figurados son renovados por diversos órganos hematopoyéticos diferenciándose en esto de los mamíferos. Se alimenta de bentos, en tallas mayores se alimenta de otros peces, insectos acuáticos y terrestres, crustáceos y gusanos (2,5).



2.2 GENERALIDADES SOBRE LA RESPUESTA INMUNE

La Inmunología es la ciencia que estudia las reacciones específicas del organismo para reconocer sustancias extrañas (antígenos) (6). La Respuesta Inmune de los seres vivos se caracteriza esencialmente por su habilidad de reconocer lo propio de lo no propio, para ello evolutivamente se ha constituido un sistema biológico de defensa que tiene tres atributos: ser diverso, específico y que genera memoria. La diversidad se manifiesta por la habilidad de responder a un universo de antígenos o sustancias extrañas; la especificidad es la regulación fina del diverso potencial referido, es decir existen elementos altamente restrictivos en el sistema inmune que activan respuestas finas a un antígeno y apagan respuestas a otro. Finalmente la memoria permite un sustancial ahorro de energía ya que no es necesario en cada episodio montar una respuesta inmune primaria, la memoria "recuerda" a la respuesta anterior y solo monta la suficiente respuesta efectiva. La inmunidad humoral se caracteriza por la formación de anticuerpos y la inmunidad celular por la presencia de linfocitos sensibilizados. Las células efectoras de la respuesta inmune humoral son los linfocitos "B", que se originan a partir de la célula madre en la médula ósea. Estos linfocitos sintetizan las inmunoglobulinas (Ig), las cuales son proteínas plasmáticas constituidas como mínimo por 4 cadenas de polipéptidos unidas entre sí por puentes disulfuros. Estas cadenas polipeptídicas pueden ser: pesadas (H) y ligeras (L); en los mamíferos existen en total 5 tipos de las llamadas cadenas pesadas (cadena H: μ , γ , α , ζ , ϵ) y 2 tipos de las denominadas cadenas ligeras (L: κ , λ). El tipo de cadena pesada determina en el hombre la clase de inmunoglobulina. Se distinguen 5 clases IgG, IgA, IgM, IgD e IgE. Los tipos de cadenas ligeras (κ , λ) aparecen en todas las clases de inmunoglobulinas, las cuales se diferencian entre sí por tener características fisicoquímicas y biológicas propias (1,6,7).

Además de ser productos solubles, las inmunoglobulinas pueden ser proteínas constitutivas de la membrana celular y funcionan como receptor del antígeno. Pero la unión del antígeno a una inmunoglobulina receptora de un linfocito B no es suficiente por sí misma para desencadenar una respuesta inmunitaria, se requiere de la participación de las células efectoras de la respuesta inmune celular, que son los linfocitos T supresores/citotóxicos y los linfocitos T cooperadores/inductores. Estos linfocitos T reciben la influencia y capacitación del timo, liberan interleucinas que actúan como mensajeros entre los linfocitos B y T. En esta interacción participan también macrófagos que son los encargados de procesar los antígenos y, además, de presentarlos a los linfocitos T ó B, liberan interleucina 1 (IL-1) que regula la participación de los linfocitos en



la respuesta inmune (1). La IL-1 activa a las células T-colaboradoras (y también en menor grado a los linfocitos B) y a su vez, segrega varias interleucinas que actúan junto con la IL-1 para hacer que los linfocitos B respondan de manera óptima después que se han expuesto a la acción de un antígeno. Una vez que el linfocito B es activado, se divide de manera repetida recibiendo la influencia de otros factores solubles de diferenciación de linfocitos B (BCDF) que son secretados por los linfocitos T. Después la progenie de los linfocitos B que respondieron, se diferencian de manera gradual en dos poblaciones morfológica y funcionalmente diferentes: las células plasmáticas y las células de memoria; las primeras de ellas adquieren la capacidad de fabricar y secretar grandes cantidades de anticuerpos que va a estar regida por dos respuestas: la primaria, que es cuando se lleva a cabo un primer estímulo con un antígeno dado y la secundaria, que son las exposiciones subsiguientes al antígeno. Ambas se diferencian en el tiempo de duración de la respuesta, presentando la secundaria un período más breve de inducción, esto es, que el tiempo transcurrido entre la estimulación con el antígeno y la aparición de anticuerpos detectables es más corto, donde también permanecen constantes los niveles de anticuerpos antes de declinar.

Dentro de la diversidad de anticuerpos vamos a encontrar que están clasificados de acuerdo a la actividad biológica que desarrollan. Así tenemos los que aglutinan, los que precipitan y los que neutralizan virus. Los primeros son capaces de activar el sistema de complemento dando por resultado la lisis de las células extrañas, es necesario mencionar que para obtener una mayor producción de este tipo de anticuerpo, se debe inocular el antígeno con el adyuvante de Freud completo (6). Los precipitantes, por el contrario, son los encargados de contrarrestar los antígenos tóxicos, neutralizándolos para fagocitarlos posteriormente. Estos anticuerpos son muy difíciles de detectar en el plasma por lo que se sugiere que éstos no están bien desarrollados en los vertebrados inferiores. Por último, los anticuerpos neutralizadores de virus se adhieren a la superficie de las partículas víricas incapacitándolas (6).

Por otro lado, las células de memoria permanecen morfológicamente indiferenciada de la célula original, tienen un rango de vida de muchos meses o años después de la primera exposición al antígeno. Por lo tanto, el período latente es más corto en una respuesta secundaria en comparación con la primaria. Aún cuando los niveles circulantes de anticuerpos hayan descendido, puede existir una cantidad suficiente de células de memoria como para dar una respuesta acelerada, llamada anamnésica.



2.3 INMUNOLOGIA DE LOS PECES

Los órganos que constituyen el sistema inmune en los peces teleosteos son: timo, riñón y bazo. El timo es el primer órgano que aparece en el desarrollo ontogénico, es un órgano compacto situado en el ángulo superior del opérculo, esta constituido de una zona cortical y otra medular. Las mallas del tejido cortical están rellenas apretadamente de linfocitos en diversos estadios de desarrollo; la zona medular por el contrario, está formada por reticulocitos; este órgano actúa como centro de maduración tanto de linfocitos B como de los T (6,7,8). El riñón consta de dos partes: el pronefros (riñón anterior) y el mesonefros (riñón excretor). El tejido hematopoyético se encuentra en el riñón anterior; este órgano realiza en los peces la función de médula ósea y de los ganglios linfáticos. En un estudio realizado en el año de 1980, se corroboró que tanto el pronefros como el mesonefros eran los órganos donde había una mayor producción de anticuerpos, siendo de un 53 y 40% respectivamente (6,9). En el bazo observamos linfocitos y centros germinales (6,7).

En los peces, se ha estudiado a fondo una inmunoglobulina que la han denominado IgM la cual posee características fisicoquímicas similares a la IgM de los mamíferos. Esta IgM en los peces tiene un peso molecular de aproximadamente 700,000 daltons y presenta coeficientes de sedimentación de 19S, 16S, 7S, y 6.4S; tienen una estructura tetramérica formada por cuatro unidades, cada una de 2 cadenas de polipéptidos pesadas y dos cadenas de polipéptidos ligeras unidas entre sí por puentes disulfuros (6,7,10,11). En Chondrichthyes y Dipnoi ésta es una molécula pentamérica como en la de otros vertebrados. En los Actinopterygii es tetramérica. La IgM de los peces, también puede presentar formas monoméricas o diméricas. Numerosos estudios revelaron que se trata de una molécula con estructura heterogénea (12,13).

Estudios realizados en 1985 (14) en peces cartilaginosos (*Baja kenojei*) y en 1992 (15) en el tiburón primitivo, demostraron la presencia de una segunda clase de inmunoglobulina formada de dímeros asociados por enlaces no covalentes, la cual esta formada de dos moléculas, una de alto peso molecular (Ig HMW) y otra de bajo peso molecular (Ig LMW); la primera mostró un coeficiente de sedimentación de 18S y un peso molecular de 840,000 daltons presentó una estructura pentamérica; la segunda tuvo un coeficiente de sedimentación de 9S y un peso molecular de 320,000 daltons; ambas fueron observadas en el bazo, mucosa intestinal, órgano linfóide, órgano epigonal y en la conexión interlobular del hígado (16,17,18).



Anteriormente se creía que la IgM se encontraba solamente en el suero del pez, pero estudios realizados en el año de 1992 (19) en los huevos del salmón (*Oncorhynchus keta*), demostraron que en las proteínas de las yemas se encuentra una inmunoglobulina con un peso molecular de 495,000 daltons inferior al peso molecular registrado en la IgM del suero. Este mecanismo local está ayudado por las células plasmáticas, tratándose, por lo tanto, de un proceso metabólicamente activo, ya que la concentración de anticuerpos en el moco del tracto digestivo, segmento posterior del intestino, piel y branquias puede ser más elevada que la encontrada en el plasma. Esta distribución de los anticuerpos plantea serias implicaciones a la hora de idear métodos de inmunización (20).

Formación de anticuerpo.- Los teleósteos presentan un período de inducción más largo y el aumento en el título de anticuerpos es más lento a diferencia de mamíferos y aves. Esto está mediado por la temperatura, ya que los peces que habitan en zonas templadas tienen sus períodos de inducción más largos que los que habitan en zonas cálidas; en promedio, el período es entre 2 y 3 semanas. Se ha planteado, que esta fase de inducción es muy larga para que los anticuerpos ocupen una posición de importancia entre los mecanismos de defensa. Cabe aclarar, que aunque el proceso es muy lento, este se inicia con la misma velocidad que en los mamíferos, es decir, de 2 a 3 días (21). Es importante tomar en cuenta varios factores que afectan la producción de anticuerpos, porque de estos depende la optimización de la respuesta inmune.

Es bien sabido, que en los animales poiquilotermos la capacidad de reacción inmunológica depende en un alto grado de la temperatura y cuando éstas son bajas (son variables dependiendo la especie), retrasa o llega a abolir por completo la producción de anticuerpos. De aquí se deduce la existencia de una zona de temperatura óptima para la formación de inmunoglobulinas, la cual varía según la especie y está en relación con la gama natural de temperaturas de su medio ambiente (8,9,21). Se ha observado, que bajo condiciones climáticas ideales, el pez producirá anticuerpos detectables en el plasma a los 9 días. Pero en temperaturas críticas, el pez no producirá anticuerpos, incluso después de meses. Sin embargo, cuando el pez es inoculado a temperaturas óptimas y después se pasa a una temperatura crítica no antes de haber transcurrido al menos 8 días, se presentaba una respuesta normal de anticuerpos.

Esto sugiere, que el mantenimiento de los peces en aguas templadas durante un plazo de 14 días puede considerarse como una medida profiláctica, y también sugiere que es la fase de inducción la que es termodependiente. Posiblemente la temperatura afecte los mecanismos por los cuales los linfocitos inmunocompetentes se transforman en linfoblastos para llegar a los clones de



células plasmáticas (6,7,8). Sin embargo, estudios hechos en carpa (*Cyprinus carpio*) en el año de 1980 (9), demostraron que la primera fase de la respuesta inmune es relativamente independiente de la temperatura, así como también la etapa de multiplicación y diferenciación de células B; en tanto que la subsecuente interacción entre células T y B si son sensibles a la temperatura. Una posible explicación puede ser el incremento de la actividad de las células T-Helper.

El segundo evento sensible a la temperatura es en la síntesis y liberación de anticuerpos por las células plasmáticas, por lo que se concluyó que en los peces óseos la inmunidad humoral y celular son afectados en igual medida por la temperatura (9).

En la respuesta inmune también interviene la conducta. Así en la organización de peces por jerarquías de dominancia, los miembros dominantes son los que producirán más cantidad de anticuerpos. Se incluye también en este apartado la relación de sexos y la presencia de feromonas liberadas como respuesta a múltiples condiciones, como densidad de población, manejo, condiciones de iluminación, etc. Con seguridad todos los mecanismos de conducta se acompañan de la supresión de anticuerpos y entran dentro del sistema endocrino y más específicamente en los denominados fenómenos de estrés (6,17).

2.4 INMUNIDAD HUMORAL DEL BAGRE DE CANAL

Son muy pocos los estudios que se han hecho de la respuesta inmune humoral del bagre de canal (*Lctalurus punctatus*). Los primeros, se hicieron en el año de 1971, donde se aisló una IgM del suero, en la que se determinó la estructura tetramérica y la composición de carbohidratos y aminoácidos (11).

En el año de 1980, se demostró una IgM secretora en el moco de la piel con un coeficiente de sedimentación de 14S y un peso molecular de 600,000 a 630,000 daltons (18). Se ha encontrado la misma inmunoglobulina en el segmento posterior del intestino, después de la administración oral de un antígeno (22). En 1986 se determinó la respuesta humoral en este pez, con dosis variadas de antígeno (*Yersenia ruckeri*) administrada por tres vías: intramuscular, intraperitoneal e intraesofágica; encontrándose una respuesta sustancial cuando fueron inoculados por vía intramuscular, lo que sugiere que el pez pudiera dar una segunda respuesta al antígeno (23). Estudios hechos en el mismo año, informaron que la inmunoglobulina está formada por diferentes moléculas que varían en su estructura covalente y también en los componentes de las cadenas ligeras (24,25,26), por lo que esta considerada como una molécula perteneciente a otra clase o subclase denominada "IgN" por tener variaciones estructurales y antigenicas (27).

Recientemente se han hecho investigaciones en las proteínas de las yemas de los huevos fertilizados (28) en donde se encontró una inmunoglobulina que tenía una movilidad idéntica a la que fue previamente descrita para la inmunoglobulina del suero (tanto de cadenas pesadas como ligeras).

En lo que respecta a trabajos realizados sobre la interacción de los factores del medio ambiente con la inmunidad humoral del bagre, no se encontró nada, de ahí el interés de la presente investigación.



2.5 GENERALIDADES DEL MEDIO AMBIENTE

El término ecosistema se refiere a la unidad dinámica fundamental que incluye tanto a los organismos insertos en las respectivas comunidades como al ambiente físico; las propiedades de los componentes físicos y biológicos de un ecosistema se influyen recíprocamente y esas interacciones son frecuentemente complejas. El medio ambiente es el conjunto de factores físicos externos que actúan sobre los seres vivos. Los factores del medio ambiente son muchos, complejos e interrelacionados en sus efectos, entre estos tenemos: Temperatura, luz, humedad y suelo (29,30).

La temperatura es, en todos los ambientes un importante factor limitante. La vida solo puede existir dentro de una gama determinada de temperaturas, desde -200°C hasta más de 100°C , pero para la inmensa mayoría de seres vivos los límites térmicos son de -18°C hasta 45°C . En los vegetales y en la mayor parte de los animales, la temperatura del cuerpo está determinada por condiciones del ambiente externo (poiquilotermita); en cambio en otros existen mecanismos fisiológicos que permiten el mantenimiento de una temperatura constante (homeotermia). La temperatura sobre la tierra experimenta variaciones en el espacio (relacionadas con la latitud y altitud) y el tiempo. Las oscilaciones térmicas de mayor importancia se observan en las áreas continentales de las zonas templadas; la amplitud de las oscilaciones térmicas se reduce en los trópicos y en la proximidad de las costas. Con fines climáticos, los valores de la temperatura utilizados son los que expresan las medias mensuales y anuales. También son importantes las oscilaciones diurnas y nocturnas. Las primeras se obtienen calculando la diferencia entre las temperaturas extremas del día (tomadas antes de la salida del sol y en las primeras horas de la tarde). La oscilación anual puede saberse, conociendo las diferencias de las medias de los dos meses extremos (normalmente Julio y Enero) (31).

Las radiaciones que más interesan a los seres vivos son las comprendidas en los intervalos de longitud de onda más o menos coincidentes con la luz visible. Los componentes de la radiación luminosa más importantes desde el punto de vista ecológico son la cualidad (longitud de onda o color), la intensidad y la duración. La acción limitante del factor luminoso está en relación sobre todo con la actividad fotosintética de las plantas (32).

Las lluvias y su distribución en el curso del año, constituyen para los

organismos un factor limitante. Una misma cantidad de agua llega al suelo en forma de precipitación distribuida en varios meses del año, o concentrada en un período restringido. La relación entre la precipitación y la evaporación suele ser un factor determinante en la distribución de las áreas de vegetación. Además el grado de humedad produce un efecto crítico cuando la temperatura alcanza valores extremos. La influencia es recíproca, puesto que también la temperatura ejerce una severa acción limitante en condiciones extremas de humedad (32). El oxígeno y el dióxido de carbono, principales constituyentes de interés biológico de la atmósfera. El oxígeno, actúa como factor limitante y esta acción está acentuada por las sustancias orgánicas contenidas en el agua (32). Algunas sales inorgánicas entran en la composición de los organismos y por eso deben hallarse siempre en el ambiente en cantidades suficientes. Además de las sales de nitrógeno y fósforo, el calcio, el potasio y el magnesio deben estar disponibles en cantidades relativamente grandes (31,32).

La estructura y composición del sustrato puede ser rocoso, arenoso o fangoso. Su estructura y el grado de porosidad condicionan la disponibilidad de sustancias nutritivas para las plantas y para la fauna del suelo. El suelo está organizado en estratos llamados también horizontes y su formación depende de factores geológicos, climáticos, topográficos y biológicos (31,32).

Los factores del medio ambiente que inciden en la vida de los peces son: temperatura, pH, luz, corrientes, oxígeno disuelto, alimento y factores sociales (33,34,35). La temperatura es un factor muy amplio y variado, tiene influencia directa sobre la alimentación, el crecimiento, la reproducción y la salud del pez. Dentro del margen de temperaturas que pueden ser toleradas por el pez, se presentan la aceleración de los procesos vitales por las temperaturas calientes y la desaceleración por las frías. Las temperaturas extremas o los cambios súbitos son a menudo letales.

Por otro lado, las temperaturas elevadas pero subletales inducen a la estivación, mientras que las bajas, a la hibernación. Dentro del ciclo hidrológico, la precipitación y la evaporación son fenómenos térmicos (33,34,36). En este ambiente, la más importante fuente de calor es la radiación solar, que al ser reabsorbida rápidamente por los estratos superiores de la masa de agua, no llega a producir efecto más allá de una cierta profundidad. El proceso de enfriamiento (pérdida de calor por evaporación) también se produce en los estratos superiores. En general se puede decir, que los niveles más profundos acusan escasamente los efectos de la irradiación externa. Sin embargo, los movimientos del agua particularmente los de circulación vertical, pueden transmitir una cierta



cantidad de calor hacia los estratos más profundos. La circulación está condicionada por fenómenos de estratificación que impide la mezcla de las aguas superficiales con las del fondo. Durante los períodos de estratificación se distingue una zona superficial, epilimnion, una zona profunda, hipolimnion, y una zona intermedia de salto térmico, termoclina.

La luz es otro factor ecológico que reviste importancia ya que participa en forma directa en la coloración del integumento, determina las clases y cantidades de alimentos disponibles para los peces; es la fuente de energía para las actividades fotosintéticas que se llevan a cabo en la zona trofogénica o enfótica que se extiende hacia abajo algunos 200 mts. También impulsa y dirige las migraciones y movimientos; desempeña el papel de cronómetro en la reproducción, influyendo en la velocidad y características del crecimiento. Las corrientes tienden a equilibrar en la superficie las temperaturas del agua y del aire, así como los factores químicos del agua. Las corrientes internas formadas por los movimientos del aire por sobre la superficie del agua, producen remolinos turbulentos que conducen al intercambio vertical de las partículas del agua. La acción erosiva de las corrientes, altera continuamente el hábitat local, por lo que puede afectar a las adaptaciones de los peces, reduce notablemente las oportunidades que tienen para su sobrevivencia o pueden tener un efecto letal. Las corrientes también aceleran la velocidad con la que el agua absorbe calor a partir del sol. Por otro lado, los peces responden a la magnitud de la corriente, modificando sus órganos para nadar.

El oxígeno disuelto en el agua es necesario para la respiración. La solubilidad del agua esta fuertemente influenciada por la temperatura y por la cantidad de sales en disolución. Normalmente, las aguas limpias no contaminadas están saturadas de oxígeno para una temperatura dada. Sin embargo, puede descender por debajo del requerimiento mínimo de unas cuantas partes por millón en el nacimiento de las corrientes y en la aguas estancadas de los cuerpos de agua quietos, así como también, en los depósitos con mucha materia orgánica o en aguas contaminadas con productos orgánicos de desperdicio. El oxígeno aumenta con las bajas temperaturas y disminuye con la salinidad elevada. También depende de la eficacia fotosintética de las plantas acuáticas presentes. El oxígeno se difunde lentamente desde la superficie hasta el fondo. Tal disminución será tanto más acentuada cuanto más intensos sean los procesos respiratorios animales y los fenómenos de oxidación de los materiales orgánicos en descomposición (31,33,36).

El alimento es un factor biológico importante; la abundancia y

variedad esta determinada en la composición de las especies así como en la magnitud de las poblaciones de peces. Entre éstos tenemos: plancton de flotación libre, el bentos compuesto de organismos que se mueven o cavan en el fondo y el perifiton y el perizoon formados por los organismos que crecen en las superficies libres de los objetos sumergidos. Los factores químicos clave para el primer eslabón de la cadena alimenticia, incluyen el dióxido de carbono para la fotosíntesis y elementos comunes como el hidrógeno, el nitrógeno, el fósforo, el potasio y el calcio, así como trazas de elementos como el manganeso, boro, azufre, zinc y molibdeno. Los procesos por los que se hacen presentes, son básicamente tres: la difusión lenta, la mezcla rápida y la transformación interna (34,36,37).

Los factores sociales, son las interacciones que se dan entre los individuos de la misma o de diferente especie. Generalmente se dan factores de competencia y de depredación, este último es muy común entre los peces, en donde generalmente estos no eliminan a la presa. La depredación también favorece la supervivencia de los mejor dotados, tanto en los depredadores como entre la presa. La competencia entre los peces puede producirse entre organismos de una misma especie o entre dos o más especies. Las reacciones competitivas más comunes se producen cuando andan en busca de un lugar para desovar, de alimento, de espacio y de protección.

Además de estos dos factores, los peces exhiben una variedad de relaciones simbióticas, o sea los casos en que por lo menos una de las especies es afectada por la presencia de la otra; relaciones de comensalismo, en el que el pez se beneficia pero su huésped no es esencialmente afectado y el parasitismo, condición en la que una especie o individuo vive sobre el otro y depende de él para su subsistencia. Cualquiera de los anteriores factores sociales en la vida de los peces, pueden variar e interactuar de acuerdo a determinada etapa de su desarrollo, estación del año y ubicación (36).

En el presente trabajo sobre Inmunología Ambiental, nos ocuparemos solamente del estudio de un factor determinante del medio ambiente: Ciclo estacional, con el fin de continuar posteriormente la investigación al respecto.



BIBLIOTECA CENTRAL

3. JUSTIFICACION

El desarrollo sostenible ha puesto al hombre en el centro de sus objetivos, planteando entre sus metas la elevación de su calidad de vida y el desarrollo de todos sus potenciales. Ello implica la necesidad de asegurar las condiciones mínimas de nutrición y de salud que proporcione una vida sana, productiva y placentera para todos.

Uno de los productos que puede cubrir la demanda de proteína animal de bajo costo, dado que proporciona un alto valor nutritivo y es de precio accesible es el bagre de canal (*Ictalurus punctatus*). Esta especie actualmente es una de las más importantes en la producción acuícola en México. Pero debido a que en el año de 1993, se registró un alto índice de mortalidad del bagre de canal en granjas acuícolas que se dedican a su reproducción y comercialización, en la región de la Ciénega de Jalisco, nos vimos en la necesidad de reconceptualizar el campo de la salud-enfermedad, así como reorientar los servicios de salud pública en el contexto de nuevos estilos de desarrollo. Investigaciones hechas anteriormente en estas granjas, determinaron como una de las causas principales de pérdidas en la producción piscícola a las enfermedades infecciosas, provocadas principalmente por bacterias oportunistas, lo que nos sugiere un estado inmunodeficiente en el pez. Por lo anterior es necesario enfocar el estudio a los mecanismos de defensa del macroorganismo y su relación con las condiciones ambientales. En realidad, es muy escasa la información que se tiene acerca de la inmunidad humoral en el bagre de canal y, además, se requiere una investigación sobre los impactos del ambiente en la salud del mismo. Por esta razón, se implementó un estudio piloto que aportara un conocimiento de frontera que pueda responder a los cuestionamientos hechos por los productores del bagre.

La investigación se realizó a través de dos metodologías con la finalidad de elegir la técnica más sensible, ya que el nivel de inmunoglobulina en los peces es bajo. Además, es conveniente encontrar la técnica que nos proporcione el coeficiente de costo/beneficio apropiado para nuestro presupuesto.

Este trabajo se inicio con el efecto estacional por ser un parámetro ambiental global que incluye varios factores: temperatura, oxígeno disuelto, radiación solar, y pH del agua. En estudios posteriores se pretenden desglosar cada uno de ellos para determinar la influencia directa que tienen.

Conociendo la influencia del medio ambiente sobre el sistema inmune del bagre de canal, podemos mejorar los métodos y esquemas de inmunización para que las poblaciones de peces sean capaces de defenderse eficazmente de los agentes patógenos por medio de sus mecanismos naturales de defensa.

4. HIPOTESIS

Los procesos metabólicos vitales y en particular, el sistema inmune humoral en un organismo poiquilotermo como es el bagre de canal (*Lctalurus punctatus*), se ven afectados por las variaciones ambientales que generan los ciclos estacionales.

5. Objetivo General

_ Estudiar la inmunidad humoral del bagre de canal (*Ictalurus punctatus*) en diferentes épocas del año.

Objetivos Particulares

_ Determinar el nivel de IgM en el suero del bagre de canal mensualmente durante un año, por los métodos de Inmunodifusión Radial Simple y Nefelometría Estandarizada.

_ Comparar la sensibilidad y costo de ambos métodos mencionados, en la determinación de la Inmunoglobulina M.

_ Establecer que papel juegan los ciclos estacionales sobre la Inmunidad Humoral del Bagre de canal.

6. METODOLOGIA

6.1 Características de las Granjas.-

Se trabajo en dos granjas piscícolas, ubicadas cada una en las poblaciones de Ocotlán y Jamay en el Estado de Jalisco. La ubicación de cada una de ellas se muestra en la Fig. 1. A continuación se enlistan algunas características principales de cada una de las granjas (Fig. 2 y 3). En la Fig. 4, se representa en un diagrama de flujo el procesamiento de las muestras de suero de los peces.

6.2 Obtención de las muestras.-

Se llevaron a cabo un total de 26 muestreos durante 12 meses, uno por mes en las dos granjas acuícolas de la zona Ciénega de Chapala, una en Ocotlán y otra en Jamay, Jal. Los peces fueron capturados al azar de estanques de contención siempre a la misma hora (09:00 Hrs.). Al principio de la investigación fueron transportados en bolsas de plástico con agua y gran cantidad de oxígeno. El pez quedaba totalmente cubierto de agua con la finalidad de favorecer la mezcla de gases con el líquido. Pero las espinas branquiales de los bagres perforaban la bolsa, por lo que se recurrió a la utilización de hieleras de poliestireno con agua. El tiempo de traslado de las muestras desde las granjas acuícolas hasta el laboratorio generalmente se hacía en 2 horas aproximadamente.

6.3 Especímenes.-

Para este estudio inmunológico fueron usados peces juveniles aparentemente sanos pesando 250 a 350 grs. y con una talla de 20 a 25 cm., pertenecientes al género *Ictalurus punctatus*. Con la finalidad de evitar la coagulación de la sangre, en cada uno de los experimentos los individuos fueron inyectados previamente con 0.2 ml. de E.D.T.A. diluida en agua bidestilada, administrada a través de la pared abdominal; 2.5 ml. de sangre fue extraída de la arteria caudal y colocada en tubos estériles que contenían 0.1 ml de E.D.T.A. tomando en cuenta la coagulación excesiva. Inmediatamente después las muestras fueron centrifugadas a 2,500 rev/min. por espacio de 10 min. a una temperatura ambiente. El plasma de cada muestra fué almacenado a -20 °C para analizarlo posteriormente.

La cantidad de especímenes por muestreo fué variado de 3 a 5. Pero dado el hecho de que no todos los peces llegaban vivos al laboratorio por las condiciones del traslado y aunado a esto, la suma de los sueros hemolizados y/o contaminados, la cantidad fue reducida hasta 27 y 21 muestras en Ocotlán y

Jamay respectivamente.

6.4 Procesamiento de las muestras.-

Para determinar la concentración de Inmunoglobulina, fué dado por dos métodos diferentes. En todos los casos, se utilizó una anti IgM humana por el antecedente de la similitud que tiene la IgM humana con la inmunoglobulina del pez y además, porque no existe aún en el mercado una anti inmunoglobulina de pez.

La técnica de Inmunodifusión Radial tiene como finalidad identificar la reacción de precipitación. Aunque la formación de los complejos depende de electrolitos amortiguadores, pH y la temperatura, los determinantes más importantes son las concentraciones relativas del antígeno-anticuerpo, el primero de ellos tiene que ser soluble, el cual por ser polivalente, formará agregados visibles cuando se combinan con el anticuerpo. Este método es útil para cuantificar las cantidades de inmunoglobulinas (38,39).

Procedimiento.- Teniendo el antecedente de que no se obtuvo ninguna reacción de precipitación con placas que detectan niveles normales de IgM, fué necesario utilizar placas para determinaciones de IgM de concentraciones inferiores con anticuerpos Anti IgM de humano, de los Laboratorios The Binding Site, Birmingham Research Park, Birmingham, UK. Cada pozo fué cubierto con 20 microlitros del suero problema neto; se dejó incubar durante 96 hrs. a una temperatura entre 4 y 8 °C, para completar el tiempo de difusión; finalmente se midió el diámetro del anillo de precipitación con un visor de precisión de la marca Trancydine General Corporation, las cifras obtenidas se cotejan con la Tabla de Referencia para las Clases de Inmunoglobulinas Humanas de Concentraciones Inferiores en Mg/L, determinándose así la cantidad de IgM.

El principio básico de la Nefelometría es la medición de la luz dispersa del rayo principal de una fuente de luz transmitida. En las soluciones diluidas, la reacción entre antígeno-anticuerpo puede medirse por la dispersión de una fuente de luz incidente. La determinación se ejecuta por la adición de cantidades constantes de antisueros específicos altamente purificados y ópticamente claros a cantidades variables de antígeno (38,39).

Procedimiento.- Se utilizó un Nefelómetro marca Behring, Modelo BN 100. Una vez indicado el análisis a que serán sometidas las pruebas, se establece una curva de calibración con un estándar conocido para delimitar el rango a medir; el estándar se diluye 1:2 con un buffer de dilución en las celdillas correspondientes en donde se lleva a cabo una incubación de 18 minutos, tiempo en que se

finiquita la curva. Posteriormente se ingresan las muestras identificándolas por fecha y lugar de obtención, al término del registro el aparato nos indica el número de los contenedores en donde se deberán colocar las muestras. Se agregaron 400 microlitros de los sueros problemas y se hizo la indicación de procesarlos como si se tratara de líquido cefalorraquídeo con la finalidad de que las muestras no fueran diluidas (1:1). En las celdillas de reacción se llevo a cabo la reacción antígeno-anticuerpo que es determinada por el paso de un rayo laser que incide sobre la celdilla midiendo la turbidez de la mezcla; en este proceso hay un período de incubación de 16 min. a partir de entonces empiezan a registrarse los primeros resultados.

Cabe aclarar que para llegar a estas determinaciones fué necesario hacer varias pruebas.

1er Intento: Las muestras se procesaron igual que la de los sueros humanos (dilución 1:5) con lo que el nefelómetro no alcanzó a dar valores precisos, ya que el rango normal que mide es de 50 a 320 mg/dl.

2do Intento: Se procedió a formar una curva de referencia con el estándar diluido 1:2 con el buffer de dilución o sea, 200 microlitros del primero con 200 microlitros del segundo, detectando rangos de 0.18 a 11.4 mg/dl. No se alcanzó a formar el último punto de la curva, que se invalidó y no dió ningún resultado.

3er Intento: Se elaboró otra curva de referencia con 400 microlitros del estándar contra 200 microlitros del buffer (2:1) con un rango a medir de 0.24 a 15.0 mg/dL. Tampoco se completó. Nuevamente fue invalidada la curva.

En los dos últimos intentos, las muestras ya se manejaban como si se trataran de líquido cefalorraquídeo, lo único que se pretendía, era ampliar los rangos. Esto tampoco fué posible por las razones arriba expuestas.

6.5 Análisis Estadístico.-

Las pruebas de comparación pueden realizarse por medio de una estadística Paramétrica o por una estadística No Paramétrica (libre distribución). Para poder utilizar estadística Paramétrica, los datos a analizar deben cumplir los siguientes puntos: a) Que las muestras sean aleatorias. b) Que los datos sean normales. c) Que la muestra sea cuantitativa y d) Que los datos sean homocedásticos (varianzas iguales). Si al menos uno de estos puntos no se cumplen, entonces no es posible utilizar estadística Paramétrica por lo que se puede hacer uso de la estadística No Paramétrica. La ventaja de utilizar ésta última, es que se puede trabajar con pocos datos y libre distribución de los mismos; pero siempre y cuando la muestra sea cuantitativa y aleatoria (40).

Los datos analizados en esta investigación no fueron homocedásticos. Por lo tanto se determino realizar el análisis comparativo por medio de una estadística No Paramétrica.

ZONAS DE MUESTREO

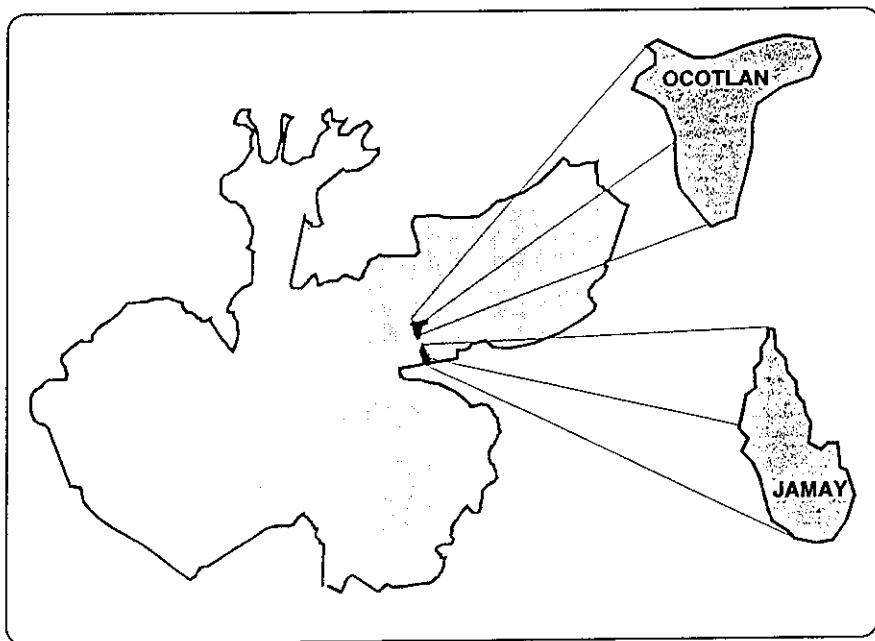
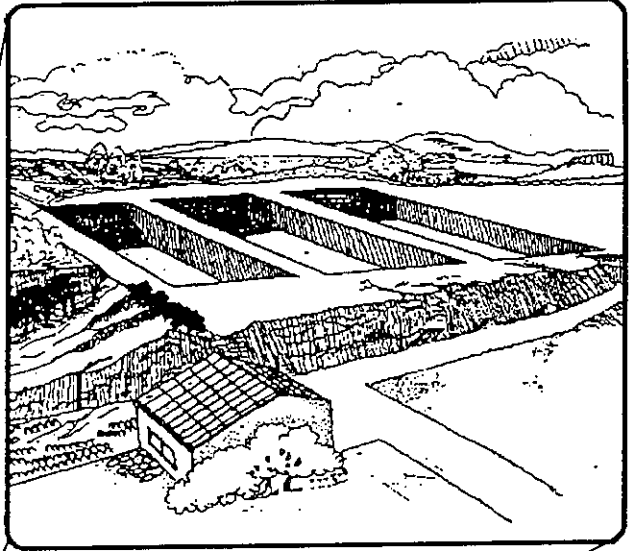


Fig. 1 Ubicación de las Granjas Acuícolas en el Estado de Jalisco.



GRANJA ACUICOLA DE JAMAY

Nombre o razón social: Acuícola de Jamay

Domicilio: Carretera a Capulines Km. 1 Jamay, Jal.

Instalaciones: Tipo rústico

Superficie: 90,000 mts.² (3 estanques)

Profundidad media: 1.5 mts.

Origen del agua: pozo profundo

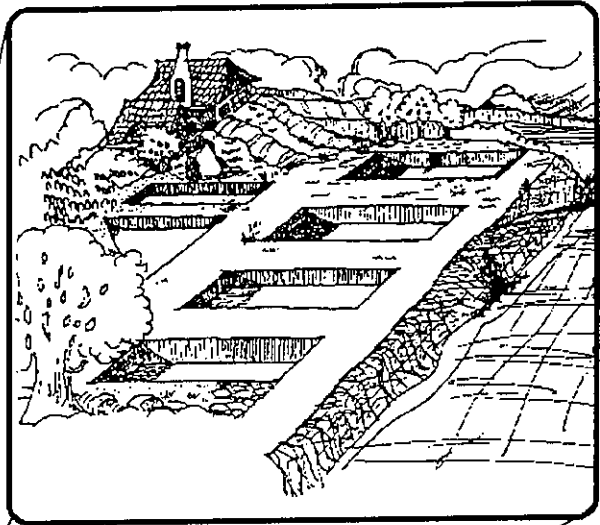
Densidad: 120,000 bagres de canal con una talla promedio de 15 cms. y un peso de 350 gramos.

Producción anual: 2.5 toneladas

Tipo de suelo: Vp/3 fase arcilloso, textura fina pedregoso sin fase química.

Región hidrológica: cuenca "C"

Fig. 2.- Características de la granja acuícola de Jamay.



GRANJA ACUICOLA SAN ANDRES

Nombre o razón social: Acuícola San Andrés

Domicilio: Potrero el Casco a 4 km. por terracería partiendo de la Ciudad de Ocotlán, Jalisco.

Macrolocalización: Zona oriental del Estado de Jalisco, al oriente de la Ciudad de Ocotlán y en la micro región de la Ciénega de Chapala.

Microlocalización: 500 mts. al poniente del poblado de San Andrés, sobre el margen izquierdo del río Zula.

Tipo de suelo: Hh+Vp+Tm/2 S.F.F y sin fase química Vp+Hh/3 S.F.F. y S.F.Q.

Clima: Cálido - seco a seco

Rango de lluvia invernal: Menor a los 5.5 mililitros

Región hidrológica: Cuenca A

Instalaciones: Tipo rústico, 5 estanques de 11/2 Ha., 2 estanques de 2 Ha., 8 estanques de 1,200 mts. de superficie promedio y un estanque de 1/2 Ha.

Profundidad media: 1.6 mts.

Origen del agua: Río Zula

Densidad: 75,000 bagres de canal con una talla promedio de 25 cms. y un peso de 400 gramos.

Producción anual: 1.5 toneladas

Calidad del agua: Temperatura promedio del agua 24 °C, oxígeno disuelto promedio 5 p.p.m., pH promedio 8.0

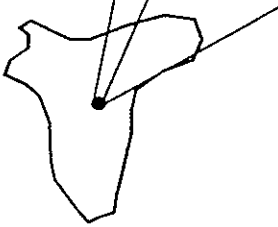


Fig. 3.- Características de la granja acuícola de San Andrés.

METODOLOGIA

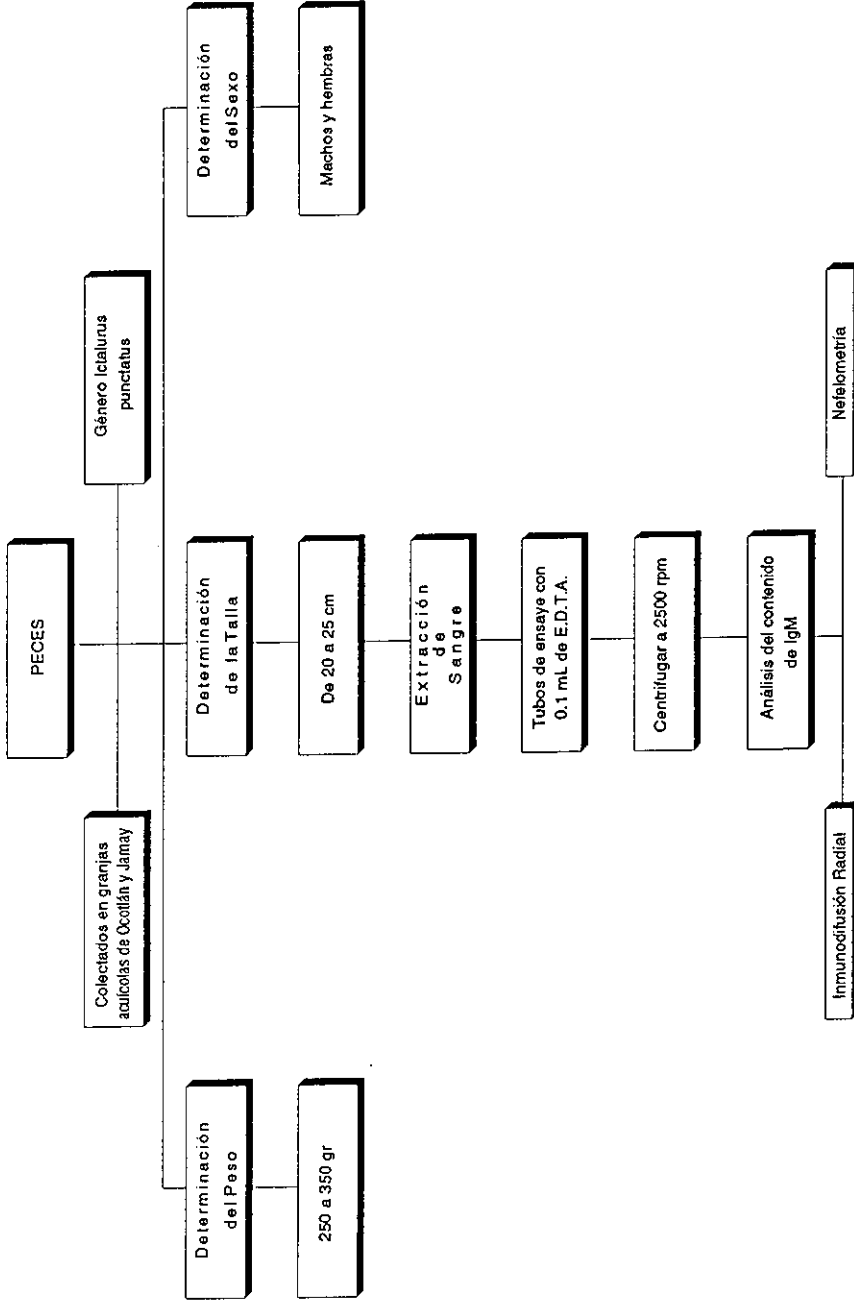


Fig. 4 Diagrama de flujo representando el procesamiento de las muestras.



7. RESULTADOS

La concentración de IgM en las muestras de suero de cada pez, colectadas mensualmente durante un año en dos granjas acuícolas (Ocotlán y Jamay) se pueden ver en los cuadros 1, 2, 3, 4. En el cuadro 5 se detalla la sumatoria, promedio, desviación estandar y varianza de las muestras de suero de bagres de canal por cada ciclo estacional tanto en Ocotlán como en Jamay, por los métodos de Inmunodifusión Radial Simple y Nefelometría Estandarizada.

El nivel de IgM promedio en el suero del bagre de canal (*Ictalurus punctatus*) de la granja de Ocotlán por el método de Inmunodifusión Radial Simple para las temporadas de primavera, verano-otoño e invierno son: 13.55 ± 3.08 mg/dl; 3.3 ± 0 mg/dl; 7.32 ± 0.99 mg/dl y 16.11 ± 4.08 mg/dl respectivamente (Fig. 5).

Para la granja de Jamay por el mismo método los resultados fueron: 15.67 ± 2.59 mg/dl; 5 ± 1.4 mg/dl; 8.9 ± 0.56 mg/dl y 25.6 ± 12.95 mg/dl, respectivamente para primavera, verano, otoño e invierno (Fig. 5).

Por el método de Nefelometría Estandarizada en la granja de Ocotlán, se obtuvo una concentración promedio de IgM de: 7.4 ± 0.64 mg/dl; 6.8 ± 0 mg/dl, 6.8 ± 0 mg/dl y 8.82 ± 1.92 mg/dl, para las temporadas de primavera, verano-otoño e invierno respectivamente (Fig. 6).

En la granja de Jamay con la misma técnica las concentraciones de IgM promedio fueron para primavera 8.95 ± 1.71 mg/dl; verano 6.8 ± 0 mg/dl; 6.8 ± 0 mg/dl e invierno 18.45 ± 12.93 mg/dl (Fig. 6).

El análisis estadístico (No Paramétrico) mediante la prueba de "Kruskall-Wallis" demuestra que la concentración de IgM registrada en cada ciclo estacional, por el método de Inmunodifusión Radial Simple tanto para la granja de Ocotlán como la de Jamay no son iguales entre sí (estadísticamente significativos $P < 0.05$) (cuadro 6 y 7), también se presentaron variaciones significativas por el método de Nefelometría Estandarizada en ambas granjas acuícolas (cuadro 8 y 9).

Las diferencias respecto a la sensibilidad, tiempo y costo de cada una de las técnicas se pueden ver en el cuadro 10.

Concentración de IgM en suero del bagre de canal (*Ictalurus punctatus*) en OTOÑO.

Técnica Granja	Método de Inmunodifusión Radial Simple	Método de Nefelometría Estandarizada
Ocotlán	Sep '93 - 6,2 mg/dL	Sep '93 - <6,8 mg/dL
	Oct '93 - 6,9 mg/dL	Oct '93 - <6,8 mg/dL
	Nov '93 - 8,5 mg/dL 7,7 mg/dL	Nov '93 - <6,8 mg/dL <6,8 mg/dL
Jamay	Sep '93 - 8,5 mg/dL	Sep '93 - <6,8 mg/dL
	Oct '93 -	Oct '93 -
	Nov '93 - 9,3 mg/dL	Nov '93 - <6,8 mg/dL

Cuadro No.1

Concentración de IgM en suero del bagre de canal (*Ictalurus punctatus*) en INVIERNO.

Técnica Granja	Método de Inmunodifusión Radial Simple	Método de Nefelometría Estandarizada
Ocotlán	Dic.'93 - 12,7 mg/dL	Dic.'93 - <6,8 mg/dL
	14,5 mg/dL	8,0 mg/dL
	9,3 mg/dL	<6,8 mg/dL
	Ene.'94 - 17,3 mg/dL	Ene.'94 - 8,0 mg/dL
	20,2 mg/dL	10,5 mg/dL
	21,2 mg/dL	12,5 mg/dL
Jamay	Feb.'94 - 19,2 mg/dL	Feb.'94 - 10,5 mg/dL
	14,5 mg/dL	8,5 mg/dL
	Dic.'93 - 15,4 mg/dL	Dic.'93 - 8,0 mg/dL
	Ene.'94 - 44,6 mg/dL	Ene.'94 - 37,1 mg/dL
	21,2 mg/dL	16,7 mg/dL
	Feb.'94 - 21,2 mg/dL	Feb.'94 - 12,0 mg/dL

Cuadro No.2

Concentración de IgM en suero del bague de canal (*Ictalurus punctatus*) en PRIMAVERA.

Técnica Granja	Método de Inmunodifusión Radial Simple	Método de Nefelometría Estandarizada
Ocotlán	Mar.'94 - 17,3 mg/dL	Mar.'94 - 8,0 mg/dL
	16,3 mg/dL	8,0 mg/dL
	16,3 mg/dL	8,0 mg/dL
	Abr.'94 - 14,5 mg/dL	Abr.'94 - 8,0 mg/dL
	13,6 mg/dL	<6,8 mg/dL
	May.'94 - 9,3 mg/dL	May.'94 - <6,8 mg/dL
	10,1 mg/dL	<6,8 mg/dL
	11,0 mg/dL	<6,8 mg/dL
Jamay	Mar.'94 - 19,2 mg/dL	Mar.'94 - 10,5 mg/dL
	18,2 mg/dL	10,5 mg/dL
	17,3 mg/dL	10,5 mg/dL
	Abr.'94 - 16,3 mg/dL	Abr.'94 - 8,0 mg/dL
	14,5 mg/dL	10,5 mg/dL
	15,4 mg/dL	8,0 mg/dL
	May.'94 - 11,8 mg/dL	May.'94 - <6,8 mg/dL
	12,7 mg/dL	<6,8 mg/dL



Concentración de IgM en suero del bagre de canal (*Ictalurus punctatus*) en VERANO.

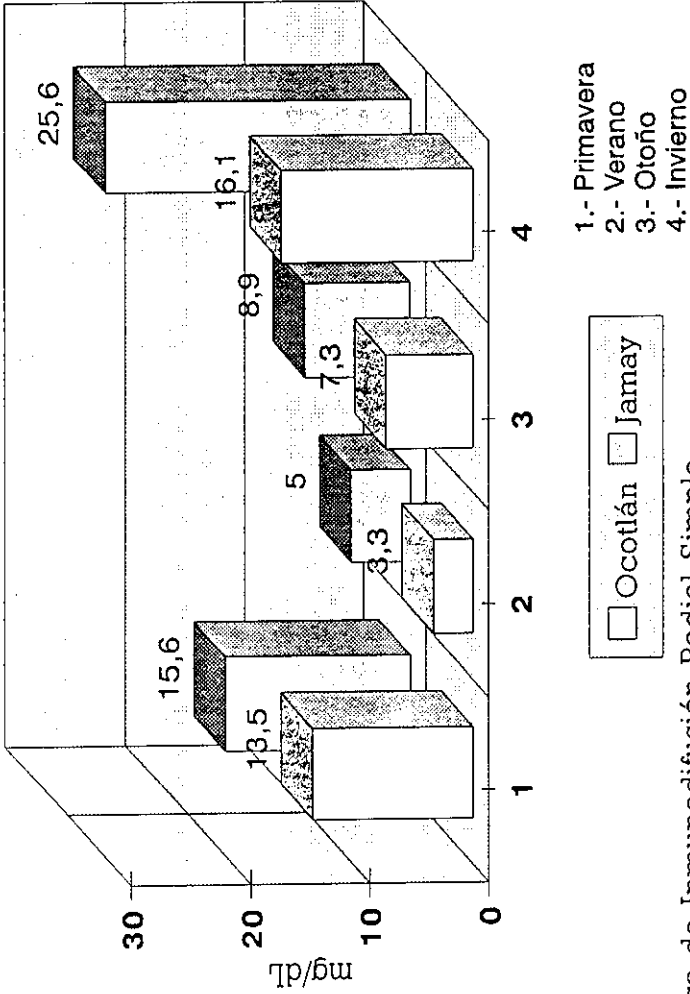
Técnica Granja	Método de Inmunodifusión Radial Simple	Método de Nefelometría Estandarizada
Ocotlán	Jun.'94 - 3,3 mg/dL	Jun.'94 - <6,8 mg/dL
	3,3 mg/dL	<6,8 mg/dL
	Jul.'94 - 3,3 mg/dL	Jul.'94 - <6,8 mg/dL
	3,3 mg/dL	<6,8 mg/dL
	3,3 mg/dL	<6,8 mg/dL
	Ago.'94 - 3,3 mg/dL	Ago.'94 - <6,8 mg/dL
Jamay	Jun.'94 - 5,4 mg/dL	Jun.'94 - <6,8 mg/dL
	4,3 mg/dL	<6,8 mg/dL
	Jul.'94 - 4,3 mg/dL	Jul.'94 - <6,8 mg/dL
	4,0 mg/dL	<6,8 mg/dL
	Ago.'94 - 4,3 mg/dL	<6,8 mg/dL
	7,7 mg/dL	Ago.'94 - <6,8 mg/dL
		<6,8 mg/dL

SUMATORIA, PROMEDIO, DESVIACION ESTANDAR Y VARIANZA, DE LA CONCENTRACION DE IGM EN SUERO DEL BAGRE DE CANAL EN LOS DIFERENTES CICLOS ESTACIONALES POR LA TECNICA DE INMUNODIFUSION RADIAL Y NEFELOMETRIA ESTANDARIZADA EN GRANJAS ACUICOLAS DE JAL.

SAN ANDRES		PRIMAVERA	VERANO	OTOÑO	INVIERNO
INMUNODIFUSION RADIAL SIMPLE	X	13.55	3.30	7.32	16.11
	Σ	108.40	23.10	29.30	128.90
	S	3.08	0	0.99	4.08
	S ²	9.50	0	0.98	16.68
NEFELOMETRIA ESTANDARIZADA	X	7.40	6.80	6.80	8.82
	Σ	59.20	54.40	27.20	70.60
	S	0.64	0	0	1.92
	S ²	0.41	0	0	3.70
JAMAY		PRIMAVERA	VERANO	OTOÑO	INVIERNO
INMUNODIFUSION RADIAL SIMPLE	X	15.67	5	8.90	25.60
	Σ	125.40	30	17.80	102.40
	S	2.59	1.40	0.56	12.95
	S ²	6.73	1.98	0.32	167.90
NEFELOMETRIA ESTANDARIZADA	X	8.95	6.80	6.80	18.45
	Σ	71.60	47.60	13.60	73.80
	S	1.71	0	0	12.93
	S ²	2.95	0	0	167.23

Cuadro No. 5

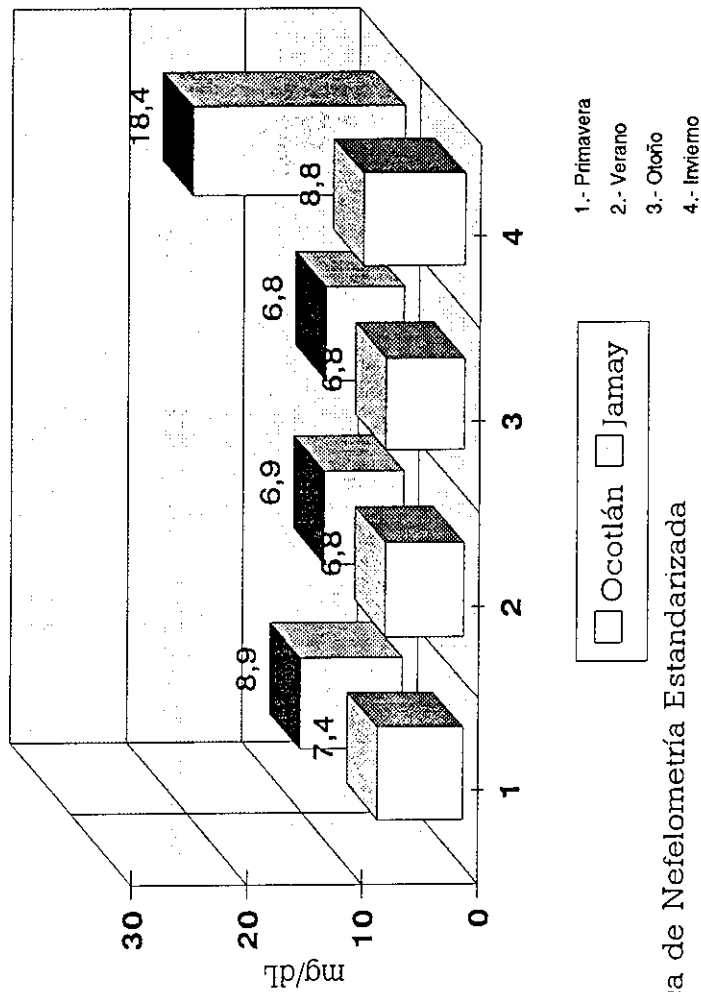
Concentración de IgM del Bagre de canal en las diferentes épocas del año.



Técnica de Inmunodifusión Radial Simple

Figura No. 5

Concentración de IgM del Bagre de canal en las diferentes épocas del año.



Técnica de Nefelometría Estandarizada

Figura No. 6

Significancia de las diferencias en la Concentración de IgM en los diferentes Ciclos Estacionales con la Técnica de inmunodifusión Radial Simple en la Granja Acuícola de Ocotlán.

Experim.	Primavera	Verano	Otoño	Invierno
Primavera	-	*	*	NS
Verano		-	*	*
Otoño			-	*
Invierno				-

Análisis Estadístico: Kruskal-Wallis.

NS = No existe dif. sig.

* $P < 0.05$

Cuadro No.6

Significancia de las diferencias en la Concentración de IgM en los diferentes Ciclos Estacionales con la Técnica de Inmunodifusión Radial Simple en la Granja Acuicola de Jamay.

Experim.	Primavera	Verano	Otoño	Invierno
Primavera	-	*	*	*
Verano		-	*	*
Otoño			-	*
Invierno				-

NS = No existe dif. sig.
 * P < 0.05

Análisis estadístico: Kruskal-Wallis.

Cuadro No. 7

Significancia de las diferencias en la Concentración de IgM en los diferentes Ciclos Estacionales con la Técnica de Nefelometría Estandarizada en la Granja Acuicola de Ocotlán.

Experim.	Primavera	Verano	Otoño	Invierno
Primavera	-	NS	NS	NS
Verano		-	NS	*
Otoño			-	*
Invierno				-

NS = No existe dif. sig.

* P < 0.05

Análisis estadístico: Kruskal-Wallis.

Cuadro No. 8

Significancia de las diferencias en la Concentración de IgM en los diferentes Ciclos Estacionales con la Técnica de Nefelometría Estandarizada en la Granja Acuícola de Jamay.

Experim.	Primavera	Verano	Otoño	Invierno
Primavera	-	*	*	*
Verano		-	NS	*
Otoño			-	*
Invierno				-

NS = No existe dif. sig.
 * P < 0.05

Análisis estadístico: Kruskal-Wallis.

Cuadro No. 9

Comparación de la Sensibilidad-Tiempo-Costo de la Técnica de Inmunodifusión Radial y Nefelometría Estandarizada

	Inmunodifusión Radial Simple		Nefelometría Estandarizada	
	Periodo Sensibilidad	Tiempo	Periodo Sensibilidad	Tiempo
Ocollán	Primav	96 hrs.	Primav	34 min.
	Verano	84 hrs.	Verano	34 min.
	Otoño	84 Hrs.	Otoño	34 min.
	Invier	84 hrs.	Invier	34 min.
Jamay	Primav	84 Hrs.	Primav	34 min.
	Verano	84 hrs.	Verano	34 min.
	Otoño	84 hrs.	Otoño	34 min.
	Invier	84 hrs.	Invier	34 min.

* Cabe aclarar que la inversión más fuerte es la compra del equipo, dado que para Inmunodifusión es 1,900 dils. y para Nefelometría es de 9,500 dils.

8. DISCUSION

En esta investigación se confirmó que la eficiencia del sistema inmune humoral en el bagre de canal presenta relación significativa con los ciclos estacionales.

Las condiciones en las que los peces viven, pueden ser muy diferentes tanto en el medio natural como en lo controlado. Por ser el bagre de canal un organismo poiquilotermo, su homeostasis puede variar al estar expuesto a factores ambientales externos como la temperatura y el fotoperíodo. Además, un pez sujeto a cultivo podría estar siempre sometido a un grado determinado de estrés, debido principalmente al mal manejo. Suponemos que estos factores influyen directamente en el funcionamiento del sistema inmune.

La menor concentración de IgM se determinó en los meses de Junio a Noviembre, cuando se presentan las temperaturas más altas, y se registró una mayor concentración de IgM, en los meses de Diciembre a Marzo en que oscilan temperaturas bajas; en Abril y Mayo se inicia el descenso de la IgM por la reanudación del ciclo estacional.

La parte experimental se realizó con dos métodos, los cuales nos ofrecieron un grado de sensibilidad y costo/beneficio diferente.

Con la técnica de nefelometría, la sensibilidad es mayor, los resultados se obtienen en 30 min., pero durante el procedimiento se utilizan reactivos de alto costo (N\$50.00 por muestra). En esta técnica la reacción antígeno-anticuerpo es altamente específica, por lo que al utilizar un antiIgM humano con una IgM de pez, no se obtuvo un reconocimiento total de los sitios antigénicos, dando únicamente valores aproximados de la concentración de IgM presente en el suero del pez, por lo que no es conveniente utilizarla en las reacciones cruzadas con antígenos heterogénicos.

Si nos referimos a la técnica de inmunodifusión radial, actualmente en el laboratorio clínico no proporciona resultados satisfactorios ya que tiene un tiempo de determinación prolongado - 72 hrs. - por lo que ha sido substituida por métodos más eficaces. En inmunodifusión radial, el Anti IgM humano tal vez reconoce la cadena m del pez llevando a cabo una reacción de precipitación visible, en donde los resultados fueron cifras más concisas que por nefelometría. Cabe hacer la aclaración que ésta técnica tiene un precio accesible (N\$22.00) y es fácil de realizar.

Sin embargo, si analizamos detenidamente los resultados obtenidos con ambos métodos vemos como coinciden en formar un ciclo en donde

invierno registra los valores más altos, siguiendo un descenso en primavera hasta llegar al punto más bajo en verano, reanudándose en otoño.

Teniendo en cuenta que debido a los cambios de temperatura, actividad solar y fotoperíodo, el pez empieza a estresarse liberando hormonas que lo preparan para una acción de emergencia movilizándolo las reservas energéticas, podemos deliberar el porqué de la mayor concentración de IgM en los meses de Diciembre a Marzo. Ahora bien, si hacemos referencia al clima que impera en nuestro Estado, y particularmente, en la zona de la Ciénega de Chapala, podemos darnos cuenta, que aún en Invierno (16.4 °C promedio) la temperatura no rebasa los límites de tolerancia térmica, sin embargo el pez sí detecta un descenso de la misma, razón por la cual manifiesta una reacción inicial. Por otro lado, si la temperatura rebasara los límites de tolerancia se va a presentar un deterioro en la inmunidad, que se reflejaría en la susceptibilidad del organismo a contraer enfermedades infecciosas o inclusive podría llegar hasta la muerte.

En Verano y Otoño se presentaron índices de baja concentración de IgM, ante esto nos surgen más preguntas que respuestas. Los antecedentes bibliográficos señalan que "A mayor temperatura las funciones vitales se aceleran" (5), esto está probado *in vitro* donde la temperatura se toma como un factor aislado (9). Sin embargo, los resultados obtenidos *in vivo* demostraron lo contrario, de aquí surgen algunas interrogantes ¿A que se debe que la concentración de IgM sea más baja en temporadas de calor?

Pudiera ser que la radiación solar actúe como un inmunodepresor.

También en el estío en que los vientos son escasos, el oxígeno disuelto en el agua que está íntimamente ligados a éstos disminuye; el pez al sentir el descenso se estresa llevándolo a un estado inmunodeficiente (41).

En los dos párrafos anteriores, hablamos de una probable disminución del oxígeno en el agua, que lleva a la hipoxemia en el pez, que puede ser un factor importante que influya en forma negativa en la inmunidad humoral. Por lo que se sugiere que en las investigaciones posteriores se mida el nivel de oxígeno libre, durante los ciclos estacionales.

La temperatura del agua que depende de la actividad solar, también influye sobre ciertas propiedades del medio acuático; así tenemos que las fluctuaciones de temperatura que se presentan en la superficie del agua van a ser causadas por la latitud, estación del año, altitud, hora del día y profundidad; lo que va a repercutir en la solubilidad de los gases en disolución, ya que estos disminuyen con el aumento de la temperatura, mientras que los compuestos tóxicos (aceites naturales y pesticidas) aumentan con el incremento de la temperatura.

Por otro lado, entre la granja de Ocotlán y de Jamay encontramos notables diferencias en los niveles de IgM séricos. La razón de ello puede estar en el manejo técnico y en la conservación de las instalaciones.

En la granja de Jamay, las instalaciones son apropiadas, la higiene es adecuada y el mantenimiento es constante; con respecto al manejo técnico se cuenta con el apoyo de un técnico acuícola, que mantiene en condiciones óptimas las poblaciones de peces.

En la granja acuícola de Ocotlán, las instalaciones son propias, pero las condiciones de higiene y mantenimiento son insuficientes; el manejo técnico se lleva a cabo en forma empírica.

Así, la condición física de los organismos está directamente relacionada a las condiciones ambientales. En este sentido, sería necesario instaurar sistemas preventivos para atender el problema de salud de la población antes de la necesidad de corregir y tratar las enfermedades. Durante el solsticio de verano se debe intensificar el cuidado de los organismos acuáticos y de su hábitat.

Este trabajo abre perspectivas para un programa de investigaciones interdisciplinarias para analizar los efectos conjuntos de la exposición a diferentes riesgos ambientales, ya que los vínculos existentes entre la salud y el medio ambiente en el contexto del desarrollo sostenible, no sólo abarca las consecuencias de la salud del pez y su interacción, sino toda una serie de factores del entorno físico y social.

9. CONCLUSIONES

1.- La inmunidad humoral del bagre de canal esta relacionada con los ciclos estacionales. El nivel de IgM en los sueros de los peces de las dos granjas acuícolas estudiadas, fué más elevado en invierno (17.24 mg/dL en promedio) y más bajo en verano (5.51 mg/dL en promedio). En los meses de Junio a Septiembre en que el nivel de IgM desciende, se deben aplicar medidas preventivas (mayores cuidados en el manejo de los peces y/o inmunoprofiláxis).

2.- En la granja acuícola de Jamay, aparentemente, el nivel de IgM fué más alto que en la granja de Ocotlán en todas las estaciones, porque las condiciones en el manejo técnico y en el mantenimiento de las instalaciones son mejores.

3.- El mayor grado de sensibilidad se obtuvo con la técnica de Inmunodifusión Radial Simple, que además de tener un bajo costo (N\$ 22.00), es muy fácil de realizar.

4.- Aunque las cifras obtenidas de IgM tanto por el método de inmunodifusión radial simple como por el método de nefelometría estandarizada muestran cantidades diferentes, estos resultados no son absolutos en virtud de que el sustrato de referencia fué una anti IgM humana.

comparison with immunoglobulins of mammals. In comparative Immunology, Marchalonis J.J. Blackwell scientific Publications, Oxford.

13.- Warr, G.W. and Marchalonis, J.J. Molecular Basis of self/non-self discrimination in the ectothermic vertebrates. In the Reticuloendothelial system. Vol. 3: Phylogeny and Ontogeny, Cohen, N. and Sigel M.M. Ceds. Plenum Press, New York. 1982.

14.- S. Tomonaya, K. Kobayashi. A second class of Immunoglobulin in the cartilaginous fishes. Developmental and comparative immunology vol. 9 pp. 797-802. University School of Medicine, Ube 7SS, Japan 1985.

15.-K. Kobayashi, S. Tomonaya and S. Tanakas. Identification of a second Immunoglobulin in the most primitive shark, the frill shark *Chlamydoselachus anguineus*. Developmental and Comparative Immunology. Vol. 16 pp. 295-299, 1992.

16.- S. Tomonaya, K. Kobayashi, K. Hagimara, K. Sasaki and K. Sezaki. Studies on Immunoglobulin and Immunoglobulin-forming cells in *Heterodontus japonicus*, a cartilaginous fish. Developmental and Comparative Immunology, Vol. 9, pp. 617-626. 1985.

17.- J. J. Marchalonis, V. S. Hohman, Camarena Th., S. F. Schluter. Antibody Production in Sharks and Humans: A role for natural antibodies. Developmental and Comparative Immunology, vol. 17 pp. 41-53. University of Arizona, Tucson. 1993.

18.- D. D. Ourth. Secretory IgM, lysozyme and lymphocytes in the skin mucus of the channel catfish, *Ictalurus punctatus*. Developmental and Comparative Immunology, vol. 4, pp. 65-74. Memphis, Tenn 1980.

19.- H. Fuda, A. Harat, F. Yamazaki, K. Kobayashi; A peculiar Immunoglobulin M (IgM) identified in eggs of chum Salmon (*Oncorhynchus keta*). Developmental and Comparative Immunology, Vol. 16, pp. 415-423. University, Sapporo Hokkaido Japan 1992.

20.- U. Georgopoulou, J. M. Vernier; Local Immunological response in the posterior intestinal segment of the rainbow trout after oral administration of macromolecules. Developmental and Comparative Immunology. Vol. 10, pp. 529-537. Université de Paris-Sud, 1986.

21.- F. X. Desvaux, I.J. Charlemagne; The goldfish immune-response. Immunology 1981. Vol. 43, pp. 755. Université Pierre et Marie Curie, Laboratoire d'Immunologie Comparée, Paris, France.

22.- J. J. di Conza, W. J. Halliday. Relationship of catfish serum antibodies to immunoglobulin in mucus secretions. University of Queensland, Brisbane 1971.

23.- D. A. Neuman and M. R. Tripp. Influence of route of administration on the humoral response of channel cat fish (*Ictalurus punctatus*) to *Yersenia ruckeri*. Veterinary Immunology and Immunopathology. 1986. pp. 163-174. USA.

24.- Lobb, C.J. Structural diversity of channel cat fish Immunoglobulins. Vet. Immunol. Immunopathol. 1986.

25.- John Wiley and Sons. Immunology: A comparative approach. University of Wales, Aberystwyth. U.K. Edited by R.J. Turner. 1994.

26.-Michael R. Johnson. Culture Methods and diseases of channel catfish *Ictalurus punctatus*. College of Veterinary Medicine. Mississippi State University. 1989.

27.- Rombout, J.H.W.M., Bot. H.E. and Taveine Thiele, J.J. Immunological Importance of the second gut segment of carp. II Characteristic of mucosal leucocytes. J. Fish Biol. 1989.

28.-J. R. Hayman, C. J. Lobb; Immunoglobulin in the Eggs of the Channel Catfish (*Ictalurus punctatus*). Developmental and Comparative Immunology. Vol. 17, pp. 241-248. University of Mississippi Medical Center Jackson 1993.

29.- Enrique Leff. La formación de recursos humanos en salud ambiental en America Latina. Materiales de la Red de Formación Ambiental para America Latina y el Caribe. Programa de las Naciones Unidas para el Medio Ambiente. 1995.

30.-Chapman, R.N. Animal ecology. McGraw.Hill. Book Company. Nueva York.

31.-Hutchinson, G.E. A treatise on limnology, Vol. 1. Geography, physical and chemistry. John Wiley and Sons, Nueva York.

32.-Arrendo, F.J.C. Breve descripción de los criterios y técnicas para el manejo de la calidad de agua en estanques de piscicultura intensiva. Secretaría de Pesca, México. 1986.



- 33.- Juárez, P. R. y Palomo, M.G.G. Acuicultura bases biológicas del cultivo de organismos acuáticos. Consejo Nacional para la enseñanza de la Biología. Ed. CECSA. México. 1985.
- 34.- Sria. de Pesca. Programa Nacional de acuicultura. Subsecretaría. Dirección General de Acuicultura. Pachuca, Hidalgo. 1986.
- 35.- Contreras Flores Luis Ernesto. Manual de Prevención de Enfermedades que afectan a los organismos en cultivo. Secretaría de Pesca. México, D.F. 1988.
- 36.- Karl Lagler, F. Karl y Col. Ictiología. Ed. A.G.T. Editor, S.A., México. 1984.
- 37.- Zeiss, C.E. La enfermedad en el cultivo de peces: Un enfoque ecofisiológico y su prevención a través del manejo. Investigación acuícola. 1er. Informe de Trabajo. México. U.A.E.M. Pesca. CNPA. 1982.
- 38.- R. Rose Noel y Col. Manual of Clinical Laboratory Immunology. Third Edition. American Society. Microbiology Washington D.C. 1986.
- 39.- T. Stites Daniel. Inmunología Básica y Clínica. Editorial Manual Moderno. 1988.
- 40.- Márquez de Cantú, M.S. 1990. Probabilidad y Estadística para Ciencias Químicas-Biológicas. McGraw-Hill. 657 pp.
- 41.- Further. Stress and Fish. Ed. A. D. Pickering, 1981.