



**UNIVERSIDAD JUÁREZ AUTÓNOMA DE
TABASCO**

DIVISIÓN ACADÉMICA DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
LABORATORIO EN GENÉTICA Y ECOFISIOLOGÍA



**OPTIMIZACIÓN DE UN PROTOCOLO
PARA EL CULTIVO "IN VITRO" DE
SANGRE PÉRFÉRICA EN LA MOJARRA
PALETA *Vieja melanura***

TESIS PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

LICENCIADO EN BIOLOGÍA

PRESENTA:

JOSÉ LUIS JUNCO IGLESIAS

BAJO LA DIRECCIÓN DE:

DR. LENIN ARIAS RODRÍGUEZ

VILLAHERMOSA, TABASCO. OCTUBRE 2025

Declaración de Autoría y Originalidad

En la Ciudad de Villahermosa, Tabasco, el día 30 del mes de septiembre del año 2024, el que suscribe **José Luis Junco Iglesias** alumno del Programa de **Biología** con número de matrícula **171G17047**, adscrito a la **División Académica de Ciencias Biológicas**, de la Universidad Juárez Autónoma de Tabasco, como autor de la Tesis presentada para la obtención del título de **Licenciatura en Biología**, titulada **"OPTIMIZACIÓN DE UN PROTOCOLO PARA EL CULTIVO "IN VITRO" DE SANGRE PERIFÉRICA EN LA MOJARRA PALETA *Vieja melanura*"** dirigida por el Dr. Lenin Arias Rodriguez.

DECLARO QUE:

La Tesis es una obra original que no infringe los derechos de propiedad intelectual ni los derechos de propiedad industrial u otros, de acuerdo con el ordenamiento jurídico vigente, en particular, la LEY FEDERAL DEL DERECHO DE AUTOR (Decreto por el que se reforman y adicionan diversas disposiciones de la Ley Federal del Derecho de Autor del 01 de Julio de 2020 regularizando y aclarando y armonizando las disposiciones legales vigentes sobre la materia), en particular, las disposiciones referidas al derecho de cita.

Del mismo modo, asumo frente a la Universidad cualquier responsabilidad que pudiera derivarse de la autoría o falta de originalidad o contenido de la Tesis presentada de conformidad con el ordenamiento jurídico vigente

Villahermosa, Tabasco a 30 de septiembre 2025.



José Luis Junco Iglesias



**UNIVERSIDAD JUÁREZ
AUTÓNOMA DE TABASCO**

"ESTUDIO EN LA DUDA. ACCIÓN EN LA FE"



**DIVISIÓN ACADÉMICA DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
DIRECCIÓN**

Villahermosa, Tab., a 23 de Septiembre de 2025


ASUNTO: Autorización de Modalidad de Titulación

**C. LIC. MARIBEL VALENCIA THOMPSON
JEFE DEL DEPTO. DE CERTIFICACIÓN Y TITULACION
DIRECCIÓN DE SERVICIOS ESCOLARES
PRESENTE**

Por este conducto y de acuerdo a la solicitud correspondiente por parte del interesado, informo a usted, que en base al reglamento de titulación vigente en esta Universidad, ésta Dirección a mi cargo, autoriza al **C. JOSÉ LUIS JUNCO IGLESIAS** egresado de la Lic. en **BIOLOGIA** de la División Académica de **CIENCIAS BIOLÓGICAS** la opción de titularse bajo la modalidad de Tesis denominado: **"OPTIMIZACIÓN DE UN PROTOCOLO PARA EL CULTIVO "IN VITRO" DE SANGRE PERIFÉRICA EN LA MOJARRA PALETA *Vieja melanura*"**.

Sin otro particular, aprovecho la ocasión para saludarle afectuosamente.

A T E N T A M E N T E


**DR. ARTURO GARRIDO MORA
DIRECTOR DE LA DIVISIÓN ACADÉMICA
DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**

**U.J.A.T.
DIVISIÓN ACADÉMICA
DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**



DIRECCIÓN

C.c.p.- Expediente Alumno de la División Académica
C.c.p.- Interesado



**UNIVERSIDAD JUÁREZ
AUTÓNOMA DE TABASCO**

"ESTUDIO EN LA DUDA. ACCIÓN EN LA FE"



**DIVISIÓN ACADÉMICA DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
DIRECCIÓN**



SEPTIEMBRE 23 DE 2025

**C. JOSÉ LUIS JUNCO IGLESIAS
PAS. DE LA LIC. EN BIOLOGIA
P R E S E N T E**

En virtud de haber cumplido con lo establecido en los Arts. 80 al 85 del Cap. III del Reglamento de titulación de esta Universidad, tengo a bien comunicarle que se le autoriza la impresión de su Trabajo Recepcional, en la Modalidad de Tesis denominado: **"OPTIMIZACIÓN DE UN PROTOCOLO PARA EL CULTIVO "IN VITRO" DE SANGRE PERIFÉRICA EN LA MOJARRA PALETA *Vieja melanura*"**, asesorado por el Dr. Lenin Arias Rodríguez sobre el cual sustentará su Examen Profesional, cuyo jurado está integrado por el Dr. Leonardo Cruz Rosado, Dra. Wendy del Carmen Arévalo Frías, Dr. Lenin Arias Rodríguez, M. en C. Marcela Alejandra Cid Martínez y Dr. Magdiel Torres de la Cruz.

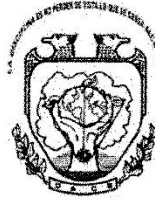
**A T E N T A M E N T E
ESTUDIO EN LA DUDA. ACCIÓN EN LA FE**


**DR. ARTURO GARRIDO MORA
DIRECTOR**

C.c.p.- Expediente del Alumno.
Archivo.

U.J.A.T.
DIVISIÓN ACADÉMICA
DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

DIRECCIÓN



22 de septiembre de 2025

C. JOSÉ LUIS JUNCO IGLESIAS
Egresado de la Lic. en Biología

En cumplimiento de los lineamientos de la Universidad Juárez Autónoma de Tabasco, se implementó la revisión del trabajo recepcional (**Tesis**), a través de la plataforma Turnitin iThenticate para evitar el plagio e incrementar la calidad en los procesos académicos y de investigación en esta División Académica. Esta revisión se realizó en correspondencia con el Código de Ética de la Universidad y el Código Institucional de Ética para la Investigación.

Por este conducto, hago de su conocimiento las observaciones, el índice de similitud y el reporte de originalidad obtenido a través de la revisión en la plataforma iThenticate de su trabajo recepcional **OPTIMIZACIÓN DE UN PROTOCOLO PARA EL CULTIVO "IN VITRO" DE SANGRE PERIFÉRICA EN LA MOJARRA PALETA *Vieja melanura***.

OBSERVACIONES:

Se incluyó citas, se excluyó bibliografía y se estableció el umbral de exclusión de coincidencias pequeñas a 16 palabras.

RESULTADO DE SIMILITUD	9 %
	40 páginas y 9140 palabras

Finalmente, se le solicita al **C. JOSÉ LUIS JUNCO IGLESIAS**, integrar en la versión final del trabajo recepcional, este oficio y el informe de originalidad con el porcentaje de similitud de Turnitin iThenticate.

Sin otro particular al cual referirme, aprovecho la oportunidad para enviarle un cordial saludo.

ATENTAMENTE
"ESTUDIO EN LA DUDA. ACCIÓN EN LA FE"

DR. ARTURO GARRIDO MORA
DIRECTOR

U.J.A.T.
DIVISIÓN ACADÉMICA
DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

C.c.p. Dr. Lenin Arias Rodriguez. Director de trabajo recepcional
C.c.p. Archivo

JOSÉ LUIS JUNCO IGLESIAS

OPTIMIZACIÓN DE UN PROTOCOLO PARA EL CULTIVO “IN VITRO” DE SANGRE PERIFÉRICA EN LA MOJARRA PALETA Vi...

Universidad Juárez Autónoma de Tabasco

Detalles del documento

Identificador de la entrega

trn:oid::3117:501931410

Fecha de entrega

22 sep 2025, 9:02 a.m. GMT-6

Fecha de descarga

22 sep 2025, 9:13 a.m. GMT-6

Nombre del archivo

JOSE LUIS JUNCO_TR tesis.pdf

Tamaño del archivo

2.2 MB

40 páginas

9140 palabras

51.190 caracteres

9% Similitud general

El total combinado de todas las coincidencias, incluidas las fuentes superpuestas, para ca...




Filtrado desde el informe

- ▶ Bibliografía
- ▶ Coincidencias menores (menos de 16 palabras)
- ▶ Abstract
- ▶ Trabajos entregados

Exclusiones


- ▶ N.º de coincidencias excluidas

Fuentes principales

- 9%  Fuentes de Internet
- 0%  Publicaciones
- 0%  Trabajos entregados (trabajos del estudiante)

Marcas de integridad




N.º de alerta de integridad para revisión

-  **Texto oculto**
10 caracteres sospechosos en N.º de páginas
El texto es alterado para mezclarse con el fondo blanco del documento.

Los algoritmos de nuestro sistema analizan un documento en profundidad para buscar inconsistencias que permitirían distinguirlo de una entrega normal. Si advertimos algo extraño, lo marcamos como una alerta para que pueda revisarlo.

Una marca de alerta no es necesariamente un indicador de problemas. Sin embargo, recomendamos que preste atención y la revise.

Fuentes principales

- 9%  Fuentes de Internet
- 0%  Publicaciones
- 0%  Trabajos entregados (trabajos del estudiante)

Fuentes principales

Las fuentes con el mayor número de coincidencias dentro de la entrega. Las fuentes superpuestas no se mostrarán.

1	Internet	
docplayer.es		3%
2	Internet	
core.ac.uk		<1%
3	Internet	
bibliotecavirtual.dgb.umich.mx:8083		<1%
4	Internet	
archivos.ujat.mx		<1%
5	Internet	
tesis.ipn.mx		<1%
6	Internet	
www.lobov.com.ar		<1%
7	Internet	
www.bioline.org.br		<1%
8	Internet	
conogasi.org		<1%
9	Internet	
pt.scribd.com		<1%
10	Internet	
fcm.ens.uabc.mx		<1%
11	Internet	
cicese.repositorioinstitucional.mx		<1%

12 Internet

es.scribd.com

<1%

Universidad Juárez Autónoma de Tabasco.
México

Carta de Cesión de Derechos

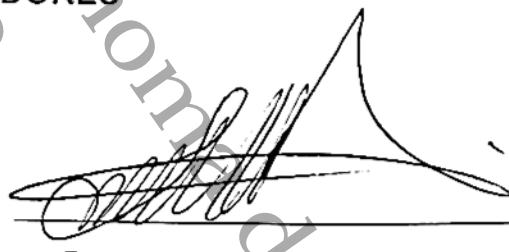
Villahermosa, Tabasco a 30 de septiembre 2025

Por medio de la presente manifestamos haber colaborado como AUTOR(A) y/o AUTORES(RAS) en la producción, creación y/o realización de la obra denominada "OPTIMIZACIÓN DE UN PROTOCOLO PARA EL CULTIVO "IN VITRO" DE SANGRE PERIFÉRICA EN LA MOJARRA PALETA *Vieja melanura*". Con fundamento en el artículo 83 de la Ley Federal del Derecho de Autor y toda vez que, la creación y/o realización de la obra antes mencionada se realizó bajo la comisión de la Universidad Juárez Autónoma de Tabasco; entendemos y aceptamos el alcance del artículo en mención, de que tenemos el derecho al reconocimiento como autores de la obra, y la Universidad Juárez Autónoma de Tabasco mantendrá en un 100% la titularidad de los derechos patrimoniales por un período de 20 años sobre la obra en la que colaboramos, por lo anterior, cedemos el derecho patrimonial exclusivo en favor de la Universidad.

COLABORADORES



José Luis Junco Iglesias

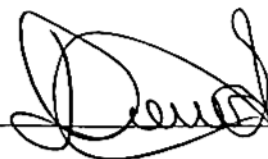


Dr. Lenin Arias Rodriguez
Director

TESTIGOS



Isidro Iván González González



David Álvarez Sarao

DEDICATORIA

Con mucho amor, a mis padres,
hermana y a ti querido hermano,

Sergio †.

Universidad Juárez Autónoma de Tabasco.
México

AGRADECIMIENTOS

A mis **padres**, por el amor y apoyo incondicional, que son el pilar fundamental para continuar mis estudios.

A mi estimado director de tesis, el **Dr. Lenin Arias Rodriguez**, quien ha sido el instructor principal de esta investigación. Agradezco profundamente cada consejo, cada corrección y todo el apoyo que me brindó en las instalaciones del **Laboratorio en Genética y Ecofisiología**.

A mis **amigos** de la carrera, Denisse, Daniel, Johanna, Pedro, Hugo y Sol, que juntos pasamos buenas aventuras, viajes y aprendizajes.

A mis **sinodales**, por cada comentario, sugerencia y corrección. Agradezco su valioso apoyo para la conclusión de esta investigación.

A mis **compañeros** del laboratorio en genética y ecofisiología, a quienes agradezco su apoyo en el cuidado de los organismos, el mantenimiento de las instalaciones de los sistemas de acuicultura y que en ocasiones me apoyaron en la parte experimental.

Y en especial, a mi querida **Biol. Johanna Monserrat**, agradezco su amistad y por todo el apoyo brindado en cada proceso experimental de esta investigación.

Contenido

ÍNDICE

I.- INTRODUCCIÓN	15
II.- ANTECEDENTES	18
2.1.- Clasificación taxonómica de la mojarra paleta.....	18
2.2.- Características Biológicas e Importancia de la Especie	19
2.3.- Cariotipo de la mojarra paleta <i>V. melanura</i>	21
2.4.- Secuenciación Completa del ADN Mitocondrial de <i>V. melanura</i>	21
2.5.- Hematología en Peces.....	22
2.5.1.- El Tejido Hematopoyético	22
2.5.2.- Las Células Mitóticas Eritrocitarias.....	23
2.5.3.- Las Células Mitóticas Leucocitarias	23
2.5.4.- Los Trombocitos	24
2.6.- Cultivo de Sangre Periférica en Peces.....	24
III.- JUSTIFICACIÓN	27
IV. OBJETIVOS	28
4.1 OBJETIVO GENERAL	28
4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	28
V. MATERIALES Y MÉTODOS	29
5.1 Recolecta de Organismos y Mantenimiento en Cautiverio.....	29
5.2 Obtención de Muestras de Sangre, Aislamiento Leucocitario y Cultivo Celular	29
5.3 Cosecha Celular y Elaboración de Preparaciones Citológicas	30
5.4 Análisis Microscópico y Descripción Celular	32
5.5 Base de Datos y Análisis Estadísticos	32
VI. RESULTADOS	33
VII. DISCUSIÓN	43
VIII. CONCLUSIONES	47
IX. REFERENCIAS	48

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Mojarra paleta <i>Vieja melanura</i> (Günther 1862).....	18
Figura 2. Hábitat natural típico de la mojarra paleta <i>Vieja melanura</i> , en la laguna de Mecoacan, Paraíso, Tabasco, México.	20
Figura 3. Descripción esquemática del procedimiento de laboratorio para la toma, separación, cultivo y cosecha de leucocitos de sangre periférica de la mojarra paleta <i>Vieja melanura</i>	31
Figura 4. Microfotografías (A y B) de alta resolución por microscopía óptica de luz transmitida a 10X+1.25X, que muestran el panorama típico de las maravillosas células eritrocitarias y leucocitarias del tejido hematopoyético de la mojarra paleta <i>V. melanura</i> . Las flechas con línea continua muestran las células leucocitarias y aquellas con línea discontinua a los eritrocitos.	34
Figura 5. Microfotografías (A, B, C y D) de alta resolución por microscopía óptica de luz transmitida a 40X+1.25X del optovar, que muestran las células eritrocitarias y leucocitarias de la sangre periférica de la mojarra paleta <i>V. melanura</i> , que fueron obtenidos mediante cultivo “ <i>in vitro</i> ” convencional. Las flechas con línea continua muestran las células leucocitarias y las flechas con línea discontinua a las células eritrocitarias.	35
Figura 6. Microfotografías (A, B, C y D) de alta resolución por microscopía óptica de luz transmitida a 40X+1.25X del optovar, que muestran las células eritrocitarias y leucocitarias de la sangre periférica de la mojarra paleta <i>V. melanura</i> , que fueron obtenidos mediante cultivo “ <i>in vitro</i> ” aislando células leucocitarias por un gradiente de densidad. Las flechas con línea continua muestran las células leucocitarias y las flechas con línea discontinua a las células eritrocitarias.	36
Figura 7. Porcentajes promedio y valores del coeficiente de determinación (R^2) de los leucocitos y eritrocitos, de muestras de sangre de 15 especímenes de <i>V. melanura</i> , cultivadas “ <i>in vitro</i> ” por el método convencional. Literales iguales entre especímenes, indican que no hay diferencias significativas con $P \geq 0.05$ de nivel de probabilidad y en caso contrario las diferencias existen.	40
Figura 8. Porcentajes promedio y valores del coeficiente de determinación (R^2) de los leucocitos y eritrocitos de muestras de sangre de 15 especímenes de <i>V. melanura</i> , tamizados por un gradiente de densidad (control) y el posterior cultivo “ <i>in vitro</i> ”. Literales iguales entre especímenes, indican que no hay diferencias significativas con $P \geq 0.05$ de nivel de probabilidad y en caso contrario las diferencias existen.	41
Figura 9. Crecimiento comparativo promedio de las células leucocitarias y eritrocitarias que fueron o no tamizadas por un gradiente de densidad a partir de muestras sanguíneas de 15 especímenes de la mojarra paleta <i>V. melanura</i> . Las literales en mayúscula o en minúscula, indican un análisis comparativo entre ellas; en el caso de que las literales sean similares no existen diferencias significativas con la comparación múltiple de Tukey y nivel de significancia de $P \geq 0.05$; en caso contrario las diferencias existen.	42

I.- INTRODUCCIÓN

En México, la familia Cichlidae forma el segundo grupo de peces dulceacuícolas más diverso, constituido por 57 especies (Soria-Barreto *et al.* 2011). Las mojarras o cíclidos, representan parte importante de los recursos pesqueros de las riberas del estado de Tabasco. Hay varias especies de mojarras registradas que tienen distribución común en todo el sureste mexicano. Entre ellas destacan la tenguayaca (*Petenia splendida*), las castarricas (*Mayaheros urophthalmus*) y la mojarra paleta (*Vieja melanura* Günther, 1862). La “mojarra paleta” se distribuye a través de la cuenca baja del sistema de los ríos Grijalva-Usumacinta hasta Guatemala, habitando ambientes dulceacuícolas, aunque ha sido reportada en cuerpos de agua salobres (Páramo-Delgadillo, 1984). Actualmente existen pocos estudios básicos en la mojarra paleta (*V. melanura*), a pesar de que es una especie con características especiales que la hacen susceptible para su cultivo comercial (Páramo-Delgadillo, 1994). Los individuos de la paleta, muestran patrones de coloración que son atractivos para ser mantenidos en acuarios, por lo que la especie tiene alternativas comerciales como pez de ornato (Fish-Base, 2008). Sin embargo, los estudios biológicos en la especie son reducidos, lo que ocasiona inconvenientes para su explotación y aprovechamiento sustentable.

El conocimiento de los tipos celulares predominantes en los estadios de desarrollo de los peces, asociado a las evaluaciones hematológicas son de utilidad en organismos de vida silvestre como en acuicultura; porque ayuda a comprender el estado sanitario de los organismos, debido a que estas células forman parte del sistema inmune del pez (Salazar *et al.* 2012). Por ello, los parámetros hematológicos se han aplicado para determinar el estado fisiológico y nutricional de los peces, adquiriendo importancia en la valoración de condiciones ambientales estresantes, para el diagnóstico y pronóstico de enfermedades (Korcock *et al.* 1988).

En dicho contexto, la hematología, es la rama de la biología, que estudia los elementos celulares de la sangre, los precursores de la médula ósea y los componentes bioquímicos en el plasma. También considera el análisis estructural, funcional y las concentraciones bioquímicas relacionadas (Copete, 2013). Pese a que en las últimas décadas se han estandarizado procedimientos para desarrollar pruebas sanguíneas en especies silvestres y no convencionales, aún se presentan algunas limitaciones de aplicación. Entre tales variaciones se encuentra la morfología de las células sanguíneas, que existen en condiciones normales entre especies

(Copete, 2013). Actualmente, los avances tecnológicos en contraste con las pruebas de laboratorio manuales, han hecho posible adaptar analizadores automatizados para la hematología veterinaria, siendo similares a los empleados en humanos que son diseñados para obtener resultados precisos con alto valor cualitativo y cuantitativo (Maya, 2007). En el caso de los anfibios, aves, peces y reptiles, es complejo, debido a que los eritrocitos son nucleados, lo que dificulta el conteo e interpretación con métodos automatizados (Copete, 2013).

En tal sentido, la ictiohematología se define, como la disciplina que estudia la sangre de los peces (Valenzuela *et al.* 2003). Sin embargo, en términos prácticos, esta especialidad estudia también las células sanguíneas, morfológica, bioquímica y funcionalmente. También los órganos hematopoyéticos, enfermedades relacionadas con ellos y cualquier fenómeno o patología que enlace las células y/o sus órganos productores (Valenzuela *et al.* 2003).

El conteo de células sanguíneas en peces ha sido difícil de estandarizar, debido a que se han empleado criterios de la morfología celular humana; tal heterogeneidad en la clasificación de la morfología leucocitaria ictica, ha conducido a confusiones cuando se trata de comparar los resultados de varios estudios (Salazar *et al.* 2012). En general, en los peces se describen seis tipos de leucocitos (linfocitos, monocitos, granulocitos, neutrófilos, basófilos, eosinófilos) los cuales varían dependiendo de la especie y de las condiciones fisiológicas del pez (Stachura y Traver, 2011).

Los elementos formes de la sangre (eritrocitos, leucocitos y plaquetas) tienen duración de vida limitada; por lo cual se requiere constante reposición (Querol, 2002). Ésta queda respaldada en virtud de la hematopoyesis, que constituye el desarrollo de divisiones celulares mitóticas; cuyo resultado son las células sanguíneas morfológicas y funcionalmente maduras (Luz *et al.* 2015).

En la actualidad, pueden cultivarse “*in vitro*” células procedentes de una amplia gama de tejidos y organismos diferentes (Cepeda, 2015). El cultivo celular, es adecuado como modelo para el estudio del desarrollo y la diferenciación celular, en ello, las líneas celulares que conservan la capacidad de diferenciarse “*in vitro*” son objeto de un intenso estudio (Cepeda, 2015).

En las mojarra nativas del sureste mexicano, hay pocos estudios encaminados a comprender la dinámica del tejido sanguíneo. Tales limitaciones no han permitido discernir la importancia que tiene el desarrollo de estudios hematológicos enfocados a comprender su empleo en programas de mejoramiento genético, conservación, monitoreo ambiental, genética molecular y citogenética.

Actualmente, los trabajos realizados en *V. melanura*, se limitan a abordar básicamente aspectos biológicos-pesqueros. En los últimos años, se han considerado aspectos de genética y biología molecular (Álvarez, 2009). En este contexto y frente a la escasa información sobre células sanguíneas en peces, este trabajo tiene como objetivo principal, optimizar un protocolo para el cultivo “*in vitro*” de células sanguíneas de *V. melanura*. Con esto, se pretende aportar una herramienta sustentable de gran utilidad para estudios hematológicos en peces nativos de México.

Universidad Juárez Autónoma de Tabasco.
México

II.- ANTECEDENTES

2.1- Clasificación taxonómica de la mojarra paleta

Phylum: Chordata

Subphylum: Vertebrata

Superclase: Neopterygii

Clase: Actinopterygii

Orden: Cichliformes

Superorden: Acanthopterygii

Familia: Cichlidae

Género: *Vieja*

Especie: *V. melanura*



Figura 1. Mojarra paleta *Vieja melanura* (Günther 1862)

2.2.- Características Biológicas e Importancia de la Especie

Los cíclidos o mojarra dulce acuícolas constituyen un grupo íctico con extensa diversificación regional, geográfica y climática en la república mexicana. Por ello, la cuenca del río Grijalva-Usumacinta, es considerada un centro de endemismos en el país, por la presencia de varias especies de cíclidos como las mojarra paletas, tenguayacas, castarricas, entre otras. Tal es el caso de la mojarra paleta (*Vieja melanura*); un cíclido nativo que se distribuye en los cuerpos de agua dulce acuícolas de la región sureste (Figura 2), la vertiente del Atlántico, en la cuenca del río Grijalva, al este y sur hasta la cuenca del río Usumacinta, Guatemala, de allí hasta Belice y Quintana Roo (Miller *et al.* 2009). Es una especie principalmente herbívora, se encuentra en ríos, arroyos y lagunas. En su cabeza y región torácica presenta coloraciones rojas o rosadas, lo que facilita la determinación de esta especie en vida silvestre. Los estudios de *V. melanura* inician con Páramo-Delgadillo (1984), quien realizó un estudio de la ictiofauna del río González y lagunas adyacentes en Tabasco; donde se menciona la presencia de diferentes especies de peces entre ellos los cíclidos, con una amplia distribución y abundancia. Además, se encontró que la mojarra *V. melanura* es el segundo pez más importante, desde el punto de vista económico, debido a su tolerancia en aguas ligeramente salobres y gran distribución de la especie. Páramo-Delgadillo (1994), continúa con los estudios biológicos de *V. melanura*, con fines de incorporación a la acuicultura en el estado de Tabasco. La mojarra paleta es una especie con características específicas de alimentación que necesita de un alto nivel nutricional, implica la implementación de programas para evaluar hábitos alimenticios y requerimientos nutricionales, para reproducción en cautiverio, cultivo en estanques y jaulas (Mendoza *et al.* 2014).



Figura 2. Hábitat natural típico de la mojarra paleta *Vieja melanura*, en la laguna de Mecoacan, Paraíso, Tabasco, México.

2.3.- Cariotipo de la mojarra paleta *V. melanura*

En los últimos quince años, en Tabasco, se han generado estudios citogenéticos en especies de importancia para la acuicultura. En dicho sentido, Arias-Rodríguez *et al.* (2006) realizaron el estudio citogenético en la “mojarra pinta” (*Parachromis managuensis*), obteniendo de resultado el número cromosómico modal diploide de $2n=48$ cromosomas, que es similar a lo reportado en otros ciclidos nativos. Por otro lado, Arias-Rodríguez *et al.* (2008) presentan el estudio citogenético de la mojarra tenguyaca (*Petenia splendida*), para establecer el cariotipo aplicando una técnica mejorada, con la finalidad de obtener un número mayor de dispersiones cromosómicas. Basándose en estos estudios, Álvarez-Morales (2009) realizó observación microscópica de 200 preparaciones citológicas provenientes de trece hembras y nueve machos de la mojarra *V. melanura*; lo que permitió la cuantificación de 943 dispersiones metafásicas en mitosis y meiosis. De ellas, 542 correspondieron a los especímenes recolectados en la cuenca del río Usumacinta de los que 441 campos cromosómicos fueron de células branquiales en mitosis y 101 de células gonádicas en meiosis. Por otro lado, las 401 dispersiones metafásicas restantes fueron analizadas a partir de los especímenes recolectados en la cuenca del río Grijalva. De esos conteos, 294 fueron metafases mitóticas y 107 dispersiones de origen meiótico. El cariotipo típico de *V. melanura* se caracterizó por mostrarse en condición diploide (mitosis) y haploide (meiosis), dos pares de cromosomas birrámeos de tipo submetacéntrico-subtelocéntricos (smst) y veintidós pares de cromosomas monorrámeos de tipo telocéntrico-acrocéntrico (ta), además de presentar microcromosomas de tipo “B” para la cuenca del río Grijalva. Con base en el resultado anterior se determina que el número fundamental (NF) del cariotipo de *V. melanura* está constituido de 52 brazos cromosómicos.

2.4.- Secuenciación Completa del ADN Mitocondrial de *V. melanura*

La clasificación taxonómica del género *Vieja* ha sido realizada pobremente y con difíciles problemas sistemáticos, debido a variaciones en la morfología de los peces (McMahan *et al.* 2010). Algunos investigadores han propuesto una serie de clasificaciones taxonómicas para las especies del género *Vieja*, lo que resultó en confusión acerca de la clasificación de la especie *V. melanura* (McMahan *et al.* 2010). El genoma mitocondrial, permite clasificaciones

taxonómicas, por lo tanto, Xu *et al.*, (2014) secuenciaron el genoma mitocondrial de *V. melanura*, una especie nativa representante del género *Vieja* dentro de la familia Cichlidae. Las especies utilizadas, fueron obtenidas del acuario de la Universidad Oceánica de Shanghái; la amplificación de PCR y secuenciación de productos fueron realizados de acuerdo al método descrito por He *et al.* (2011) con ligeras modificaciones. El ADN mitocondrial de *V. melanura* fue de 16,543 pb; su secuencia ha sido depositada en GenBank (número de acceso: KF879808). Similar a otros peces cíclidos, el ADN mitocondrial de *V. melanura* consta de 13 genes codificadores de proteínas, dos genes de ARNr, 22 genes de ARNt y una región control.

2.5.- Hematología en Peces

Los estudios hematológicos en peces se han desarrollado desde los años 50 aproximadamente y se desarrolló principalmente en salmónidos, generando información al respecto. Sin embargo, en los últimos años ha adquirido mayor importancia en la acuicultura debido a su valor en el monitoreo de los estados fisiológicos, nutricionales y sanitario de los peces; ya que la sangre es el principal tejido que une las situaciones anómalas por las distintas patologías (Alvis, 2006).

Los órganos encargados de la producción de células sanguíneas en peces varían dependiendo la especie y en ocasiones, cambian el tipo y la distribución de células sanguíneas, especialmente las que tienen función inmune (Anisworth, 1992). En peces, los órganos hematopoyéticos son el riñón (principal órgano productor de anticuerpos) y el bazo (contiene menor número de células hematopoyéticas) compuesto por sangre alojada en cavidades (Olabuenaga, 2000).

2.5.1.- El Tejido Hematopoyético

La sangre de los peces, está compuesta por una parte fluida, el plasma y gran cantidad de células que varían en forma, tamaño y función (Vega, 2013). El plasma de los peces presenta similitudes al de mamíferos. La única diferencia es el contenido proteico, la cual es menor, pero la inmunología y otras funciones son similares. Los componentes celulares, se dividen en tres grupos: los eritrocitos, encargados del transporte de oxígeno; los trombocitos con actividad

coagulante y los leucocitos, encargados de la defensa del organismo. La morfología, presencia y/o ausencia, depende de la especie (Jaramillo-Schadebrodt, 2005).

2.5.2.- Las Células Mitóticas Eritrocitarias

Los eritrocitos o glóbulos rojos son las células mitóticas más abundantes en la sangre, similares en tamaño y estructura a la de los demás vertebrados. Su función, es transportar oxígeno de las branquias a los tejidos con ayuda de la hemoglobina (Hb) y en menor grado el transporte de dióxido de carbono (CO_2) (Satchell, 1991). Morfológicamente, tienen forma elíptica con un núcleo ovoide central de cromatina condensada, además de un citoplasma abundante y levemente eosinófilo. En los peces, el citoplasma de los eritrocitos es granular, sin inclusiones ni mitocondrias. La cantidad de eritrocitos varía según la especie y su concentración está afectada por diversos factores, principalmente por el estrés, la concentración de oxígeno y la temperatura.

2.5.3.- Las Células Mitóticas Leucocitarias

Los leucocitos, son un conjunto de células sanguíneas destinadas a mantener la organización estructural y funcional de los individuos y está genéticamente planificado para la neutralización y eliminación de agentes infecciosos, células, moléculas extrañas (detritus celulares) y células propias envejecidas, dañadas, alteradas y/o transformadas. Estos pueden encontrarse en sangre circulante, o en tejido y pueden formar complejos celulares llamados centros melanomacrofágicos (Vega, 2013). De manera general, los leucocitos se dividen en dos grupos principales: leucocitos granulados (neutrófilos, eosinófilos y basófilos) y leucocitos agranulosos (monocitos o macrófagos y linfocitos) (Jaramillo-Schadebrodt, 2005). Los granulocitos, por lo general, son móviles y fagocíticamente activos. Su citoplasma contiene vacuolas, mitocondrias, lisosomas, entre otros organelos. El núcleo generalmente está abierto y en forma de ovalo, se encuentra dividido en segmentos, que posiblemente indica la maduración de las células antes de migrar a los tejidos. Por otro lado, los monocitos (agranulocitos) son móviles, fagocíticos y normalmente más grande que otros leucocitos, con un citoplasma vacuolado y basofílico. En el caso de los linfocitos, son células que constituyen la base de las reacciones inmunes; en el sentido morfológico, regularmente son pequeños con citoplasma azul oscuro y un núcleo condensado en tinciones de rutina (Vega, 2013).

2.5.4.- Los Trombocitos

Los trombocitos son células sanguíneas de origen mitótico que pueden presentar formas que van de redondas a elipsoides, la cual corresponde a elementos maduros e inmaduros respectivamente. Algunos investigadores se han referido a los trombocitos como “células fusiformes”; estas pueden dividirse en cuatro tipos morfológicos: formas de núcleo puntiagudo, fusiforme, ovalado y solitario (Ellis, 1977). En la mayoría de las células trombocitarias, el citoplasma es carente y no es posible su observación. La ausencia del citoplasma se estima que es debido al estrés que es sometido el pez al momento de su captura, lo que puede confundir morfológicamente en su clasificación debido a la similitud con los linfocitos (Veiga, 2000). La principal función de los trombocitos es la coagulación de la sangre y la formación de coágulos; también se considera una función tipo fagocitosis, pero parcial ya que las partículas no son engullidas en su totalidad por la célula. Su origen aún no ha sido establecido, pero se sugiere al bazo como el órgano generador de trombocitos dado que se han observado en gran cantidad dentro de este tejido (Jaramillo-Schadebrodt, 2005).

2.6.- Cultivo de Sangre Periférica en Peces

El cultivo celular es una de las principales herramientas usadas en biología molecular, que proporciona un modelo de estudio para dar respuesta a cuestiones que van desde la fisiología celular normal, hasta la detección de enfermedades infecciosas y cáncer (Ager et al. 2018).

Los peces tienen características especiales que respaldan su uso en inmunología y toxicología; sin embargo, la mayoría de las pruebas de toxicidad se basan principalmente en pruebas “*in vivo*”, que son de interés ético principalmente y sufren de limitaciones como el consumo de tiempo y altos costos. Por ello, Pierrard *et al.* (2012) aplicaron pruebas “*in vitro*” para aislar, caracterizar y cultivar células mononucleares (PBMC) de la anguila europea (*Anguilla anguilla L.*) y el bagre asiático (*Pangasianodon hypophthalmus S.*), que pueden utilizarse como células diana trascendentales en la evaluación de la toxicidad química ambiental, a través de técnicas proteómicas. Los enfoques proteómicos pueden ser empleados para detectar la exposición a xenobióticos a nivel de expresión de proteínas, lo que ofrece una oportunidad de desarrollar señales de alerta temprana mediante firmas moleculares de toxicidad. Las PBMC se obtuvieron

a partir de muestras de sangre por centrifugación, usando medio de gradiente Ficoll-paque PLUS, posteriormente realizaron el cultivo primario de PBMC con medio RPMI 1640 y se incubaron a una temperatura de 28 °C para el bagre y 20°C para la anguila. Para el análisis subproteómico, se aisló la fracción posnuclear en PBMC lo que permitió la identificación por cromatografía líquida-espectrometría de masas en tándem y búsquedas en la base de datos completa del NCBI nr (National Center for Biotechnology Information no Redundante) de 66 proteínas que representan 36 diferentes proteínas validadas a través del software Peptide and Protein Prophet of Scaffold (Pierrard *et al.* 2012).

En otro estudio, Tillit *et al.* (1988) realizan mitogénesis “*in vitro*” de linfocitos de sangre periférica de la trucha arcoíris (*Salmo Gairdineri*) para valorar la utilidad de este procedimiento en la evaluación de la salud de los peces. Los linfocitos se aislaron por medio de gradiente (Percoll y Ficoll) y se cultivaron en medio RPMI 1640 ajustado a un PH 7,3, donde se proporcionaron abundantes nutrientes para el crecimiento de linfocitos. De los mitógenos probados en el estudio: Concanavalina A (Con A), Fitohemaglutinina (PHA) y lipopolisacárido (LPS), el mayor grado de proliferación de linfocitos se obtuvo con Con A, observándose a los 4-5 días de incubación. Tillit *et al.* (1988) concluye que el uso de su trabajo como herramienta de diagnóstico en la evaluación inmunológica está limitada en las condiciones especificada en la literatura, y considera que el desarrollo de procedimientos de ensayo que utilizan medios químicamente definidos puede ayudar a estandarizar las técnicas de cultivo “*in vitro*” de linfocitos en la trucha arcoíris y mejorar las posibilidades de su uso como herramienta de diagnóstico.

Por otro lado, debido a las propiedades biológicas particulares de los peces, han sido de gran importancia en estudios de filogenia y citogenética. Tal es el caso, Majtánová *et al.* (2017) recolectaron muestras de sangre (0,2-0,5 ml) de dos juveniles de *Amia calva* pertenecientes a la División Académica de Ciencias Biológicas (DACBiol UJAT). El plasma rico en leucocitos se utilizó para preparar cultivos primarios en 5 ml de Medio 199 (sigma, St. Louis, MO, USA) suplementado con suero fetal bovino, antibiótico y Fitohemaglutinina. Después de 120 horas de incubación a 20°C, se añadió colchicina (dos gotas al 0,1%) al medio de cultivo y solución hipotónica de KCL (8 min), posteriormente se colocó fijador (metanol: ácido acético 3:1) tres veces. Los cromosomas se tiñeron con solución Giemsa (5%, 10 min), analizando en total, 20 metafases de cada individuo para analizar la morfología cromosómica y la composición del

cariotipo. El número de cromosomas diploides de *A. calva* fue $2n= 46$, el numero fundamental fue $2n= 58$. El cariotipo se basa en el cultivo de leucocitos que confirmó la presencia de un par de cromosomas metacéntricos, cinco pares de submetacéntricos, cuatro pares de subtelocéntricos y trece pares de cromosomas acrocéntricos. La heterocromatina constitutiva mostró señales en los centrómeros de todos los cromosomas.

México

III.- JUSTIFICACIÓN

En el sureste de México, que abarca los estados de Campeche, Chiapas y Tabasco, se han realizado diversos estudios taxonómicos, ecológicos y en las últimas décadas de genética en la ictiofauna nativa. Entre las especies nativas más importantes en el estado de Tabasco, se encuentran los cíclidos o mojarra dulceacuícolas, que comprende el grupo de peces más numeroso y diversificado. La mojarra paleta *Vieja melanura* es un cíclido nativo, que ha sido empleada como modelo para estudios poblacionales que han enriquecido la información sobre el potencial para la acuicultura; abordando aspectos biológicos, distribución, hábitat y hábitos alimenticios (Hernández *et al.* 2020). En la última década se describió el genoma mitocondrial de *V. melanura* (Xu *et al.* 2016), con el fin de esclarecer la clasificación taxonómica de la especie. Sin embargo, estudios hematológicos en estos cíclidos no existen, siendo la hematología una herramienta útil para el diagnóstico y control rutinario del estado de salud de los peces; debido a que la sangre participa directa e indirectamente en los procesos fisiológicos y nutricionales de los organismos (Gallegos *et al.* 2011). Trabajar con sangre periférica, especialmente con linfocitos y monocitos, es indispensable en diagnósticos en inmunología y su campo en la investigación; su uso en el ámbito científico ayuda a conocer las características de los elementos formes de la sangre y a entender el comportamiento de enfermedades. Frente a la escasa información de la hematología en peces y la carencia de estudios hematológicos de la “mojarra paleta”, este trabajo plantea, desarrollar una técnica para el cultivo “*in vitro*” de sangre periférica de *V. melanura*, con el fin de incrementar su conocimiento biológico y favorecer con ello los estudios de biología celular, citogenética e inmunología. En segundo término, establecer un protocolo para la separación por gradiente de células leucocitarias; asimismo, aportar significativamente información básica que contribuya al conocimiento de la hematología en peces y su potencial uso en ciencia básica y aplicada.

IV. OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GENERAL

Desarrollar un protocolo para el aislamiento y cultivo “*in vitro*” de leucocitos de la sangre periférica de la mojarra *V. melanura*.

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

4.1.1. Comparar el aislamiento leucocitario por gradiente vs el protocolo estándar.

4.1.2. Identificar y comparar la sobrevivencia celular del protocolo por gradiente vs el método estándar.

4.1.3. Identificar indicios de la activación del ciclo celular basados en las condiciones de cultivo “*in vitro*” de las muestras del protocolo por gradiente vs el método estándar.

V. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 Recolección de Organismos y Mantenimiento en Cautiverio

Quince especímenes fueron recolectados en los márgenes del río carrizal, en la ciudad de Villahermosa, Tabasco, por pesca artesanal, utilizando una atarraya. Para el transporte y traslado de los organismos, se utilizó un contenedor térmico con bombas para mantener aireación continua. Posteriormente los especímenes se colocaron en tanques de soporte en las instalaciones del Laboratorio de Acuicultura Tropical perteneciente a la Universidad Juárez Autónoma de Tabasco, de la División Académica de Ciencias Biológicas (UJAT-DACBiol). El permiso de pesca bajo el que se recolectó los especímenes para el desarrollo del estudio es el PRMN/DGOPA-006/2024.

5.2 Obtención de Muestras de Sangre, Aislamiento Leucocitario y Cultivo Celular

La extracción de sangre se realizó en el Laboratorio en Genética y Ecofisiología y para ello las mojarra fueron anestesiadas con benzocaina al 0.2%. A cada pez, se les extrajo dos veces 0.5 ml de sangre periférica por punción en la vena caudal, con una jeringa estéril de 1 ml que rápidamente se colocó en tubos de 1.5 ml que contenían 20 μ L de heparina con el fin de evitar coagulación. Una muestra con 0.5 ml de sangre, se empleó para aislar los leucocitos a través del protocolo ficoll (Ficoll-Paque™ PLUS) que consiste en generar paquetes leucocitarios aislados que se generan por centrifugación a 10,000 rpm basada en un gradiente de densidad celular (eritrocitos/leucocitos) en sangre periférica. Los leucocitos y plaquetas, no son pesados, por lo tanto, no logran penetrar en las capas del medio de Ficoll-Paque. Estas células, se reúnen como una franja concentrada en el inferior de la muestra; esta banda permite aislar las células leucocitarias para ser recuperadas con alto rendimiento en un pequeño volumen.

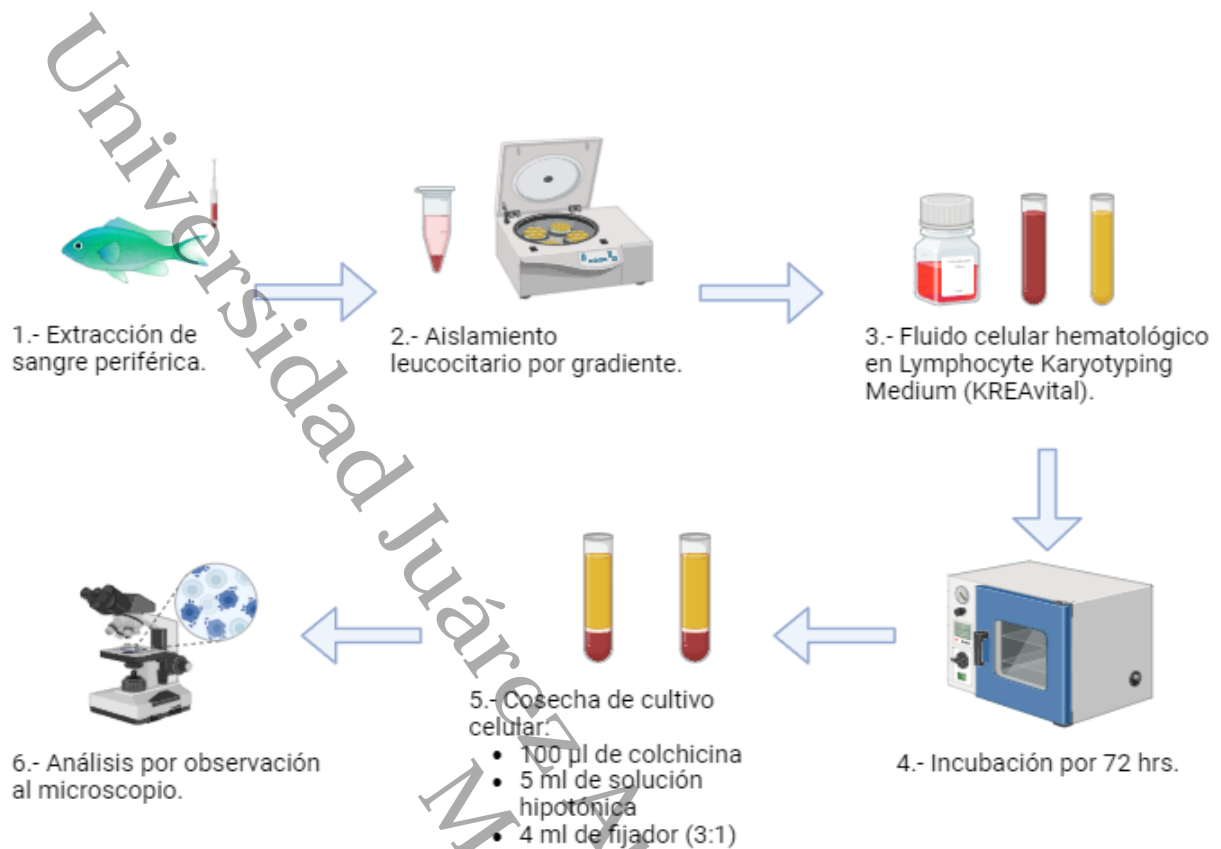
Por otro lado, 0.5 ml de sangre periférica, se empleó para la siembra por el método estándar tradicional que consiste en transferir el fluido celular hematológico en condiciones de esterilidad, a un tubo estéril de 15 ml con cinco mililitros del medio de cultivo KREAvital

Lymphocyte Karyotyping Medium compuesto por L-Glutamina, suero fetal bovino, y Fitohemaglutinina (FHG), suplementado con antibiótico (10 μ L de penicilina).

En el caso del aislado leucocitario, las muestras fueron transferidas al medio de cultivo bajo un procedimiento similar al señalado en el párrafo anterior. En todos los casos, donde fue necesario el cultivo celular, los tubos con las células en el medio de cultivo fueron incubadas por 5 días a $24 \pm 0.1^\circ\text{C}$ y en los cuales diariamente se agitaba suavemente con el fin de homogeneizar los componentes nutricionales y evitar la formación de agregados celulares que propicien pegado en las paredes internas de los tubos de cultivo.

5.3 Cosecha Celular y Elaboración de Preparaciones Citológicas

A las 120 horas de incubación (o cinco días), a cada cultivo celular se le agregó 100 μ L de colchicina al 0.05% diluida en citrato de sodio a 0.1% y se incubaron durante 30 min a $30 \pm 0.1^\circ\text{C}$. Posteriormente, los tubos con las muestras celulares, fueron centrifugados a 3,000 rpm durante 10 min y el sobrenadante se reemplazó por agente hidratante compuesto por 5 ml de citrato de sodio al 1.0% durante 30 min a $30 \pm 0.1^\circ\text{C}$. Luego, el hidratante fue reemplazado por 5 ml de fijador frío (4°C) compuesto por metanol y ácido acético glacial (3:1). La última operación se dejó repartir por tres o más veces hasta que el tejido adoptó coloración blanqueada. Para las preparaciones citológicas fue necesario inducir el aumento del volumen celular a través del tratamiento hipotónico, con el fin de asegurar una dispersión apropiada de los cromosomas dentro de la membrana celular. Finalizando el proceso de fijación, se realizaron goteos de las muestras obtenidas, dejando caer 3 o 4 gotas en portaobjetos sobre una placa fría, a una altura de 1m aproximadamente. Una vez seca las láminas, se cubrieron con colorante giemsa al 70% (14 ml giemsa madre y 56 ml de buffer de fosfato) dejando actuar durante 8 min, que permitió la diferenciación de las células sanguíneas; posteriormente se realizó un lavado con agua destilada y un secado al aire para el análisis microscópico.



Created in [BioRender.com](https://www.biorender.com)

Figura 3. Descripción esquemática del procedimiento de laboratorio para la toma, separación, cultivo y cosecha de leucocitos de sangre periférica de la mojarra paleta *Vieja melanura*.

5.4 Análisis Microscópico y Descripción Celular

Las preparaciones citológicas fueron analizadas bajo un microscopio óptico (Zeiss AxioScope A1) con una cámara digital fotográfica incorporada (AxioCam ERc5s) empleando el programa ZEN/2011 (Carl Zeiss® microscopy GmbH, 2011). Se tomaron fotografías de diferentes campos con los objetivos de 10x y 40x, con la finalidad de realizar el conteo y la identificación de leucocitos y eritrocitos. La descripción de cada tipo celular sanguíneo se realizó con lo establecido por Ainsworth (1992).

5.5 Base de Datos y Análisis Estadísticos

Los datos generados en cada experimento fueron capturados en base de datos con el programa Microsoft Excel 2016© y con las herramientas de cálculo se lograron generar los porcentajes, el promedio y la desviación estándar. Así también, el gráficador del programa Excel fue útil para diseñar las gráficas y los atributos descriptivos de cada una de ellas. Por otro lado, se calculó el coeficiente de determinación (R^2) para determinar la proporción de varianza en base a la mejor parsimonia de distribución espacial de los datos generados. Posteriormente, los datos fueron analizados mediante análisis de varianza (ANVA) de una vía y al haber diferencias significativas con $P \leq 0.05$ se aplicó la comparación múltiple de Tukey. Todos los análisis estadísticos, se realizaron con el empleo de las herramientas de cálculo del programa SigmaStat para Windows®.

VI. RESULTADOS

El cultivo “*in vitro*” de células periféricas del tejido hematopoyético, es una herramienta ampliamente utilizada para estudiar el comportamiento celular en la mitosis de los mamíferos, aves, reptiles, anfibios y peces. Este tipo de estudio permite comprender el desarrollo y diferenciación de las células como modelos en investigación básica y aplicada, para producir vacunas, anticuerpos y proteínas terapéuticas. En dicho contexto, en el presente estudio se realizaron 30 cultivos “*in vitro*” de sangre periférica, empleando como modelo biológico 15 ejemplares adultos de la mojarra paleta (*V. melanura*). Quince cultivos celulares, fueron realizados por el método convencional (**Figura 5**), y otras quince muestras de sangre periférica con la técnica de aislamiento leucocitario por gradiente de densidad (**Figura 6**).

En dicho sentido, para evaluar la eficacia de los tratamientos en estudio, se analizaron cinco preparaciones citológicas por cada cultivo celular, del cual resultaron el total de 150 preparaciones, las cuales fueron el punto de inicio para evaluar la sobrevivencia y proporción celular del tejido hematopoyético. En todos los tratamientos empleados se registró 100% de sobrevivencia celular, en términos de presencia de células rojas y blancas, posterior al cultivo por 120 horas. Las células eritrocitarias fueron el grupo celular predominante en los cultivos de sangre periférica de *V. melanura*. Tales células se caracterizaron por presentar forma elíptica y núcleo compactado en la región central de la célula (**Figura 4**). En contraste, se observó poca variación en la concentración de células leucocitarias en los cultivos de *V. melanura*. Los leucocitos se diversificaron con morfologías que van desde irregulares hasta esféricas, adoptando distintos tamaños, formas del núcleo y citoplasma (**Figura 4, 5 y 6**).

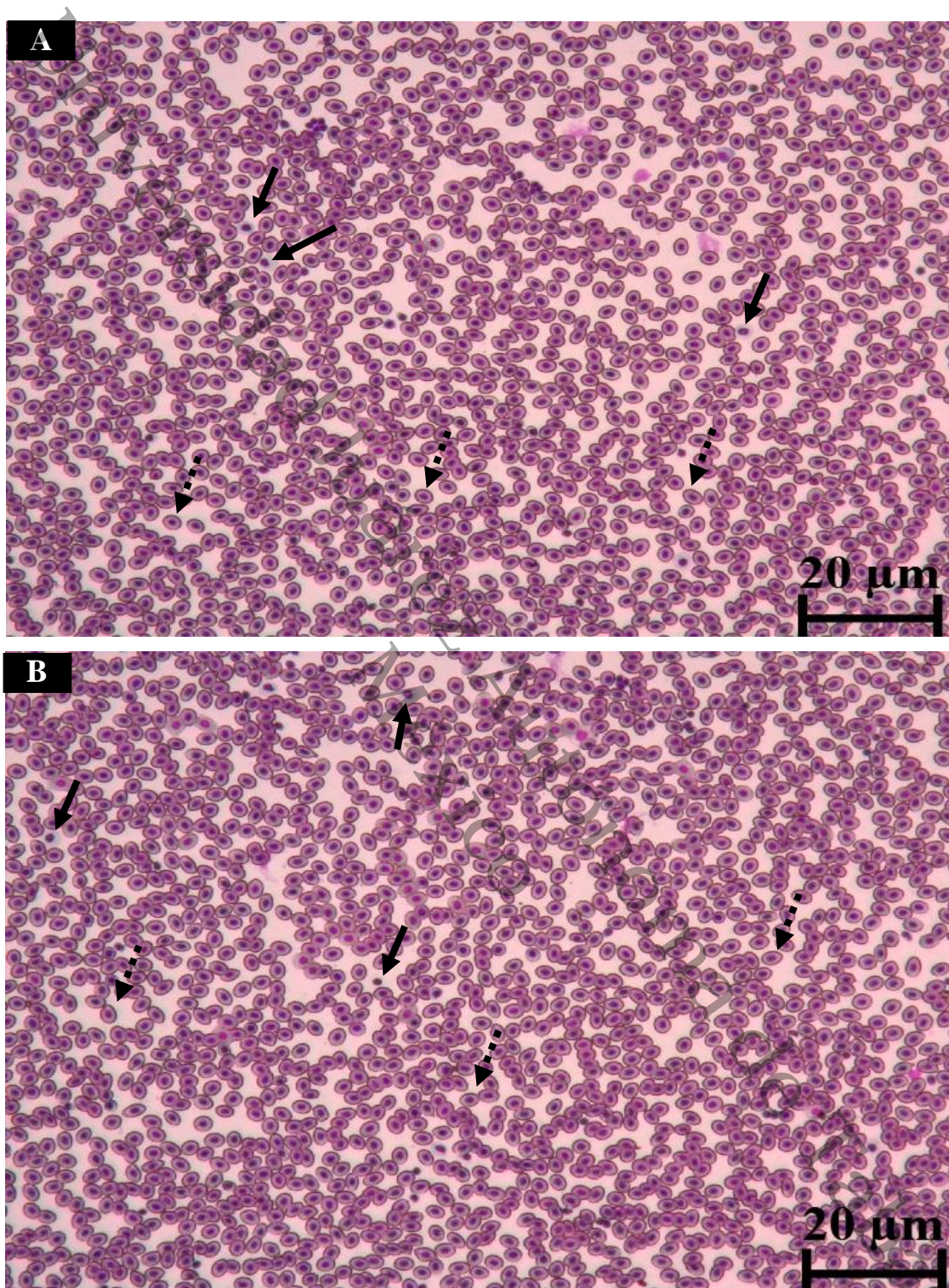


Figura 4. Microfotografías (A y B) de alta resolución por microscopía óptica de luz transmitida a 10X+1.25X, que muestran el panorama típico de las maravillosas células eritrocitarias y leucocitarias del tejido hematopoyético de la mojarra paleta *V. melanura*. Las flechas con línea continua muestran las células leucocitarias y aquellas con línea discontinua a los eritrocitos.

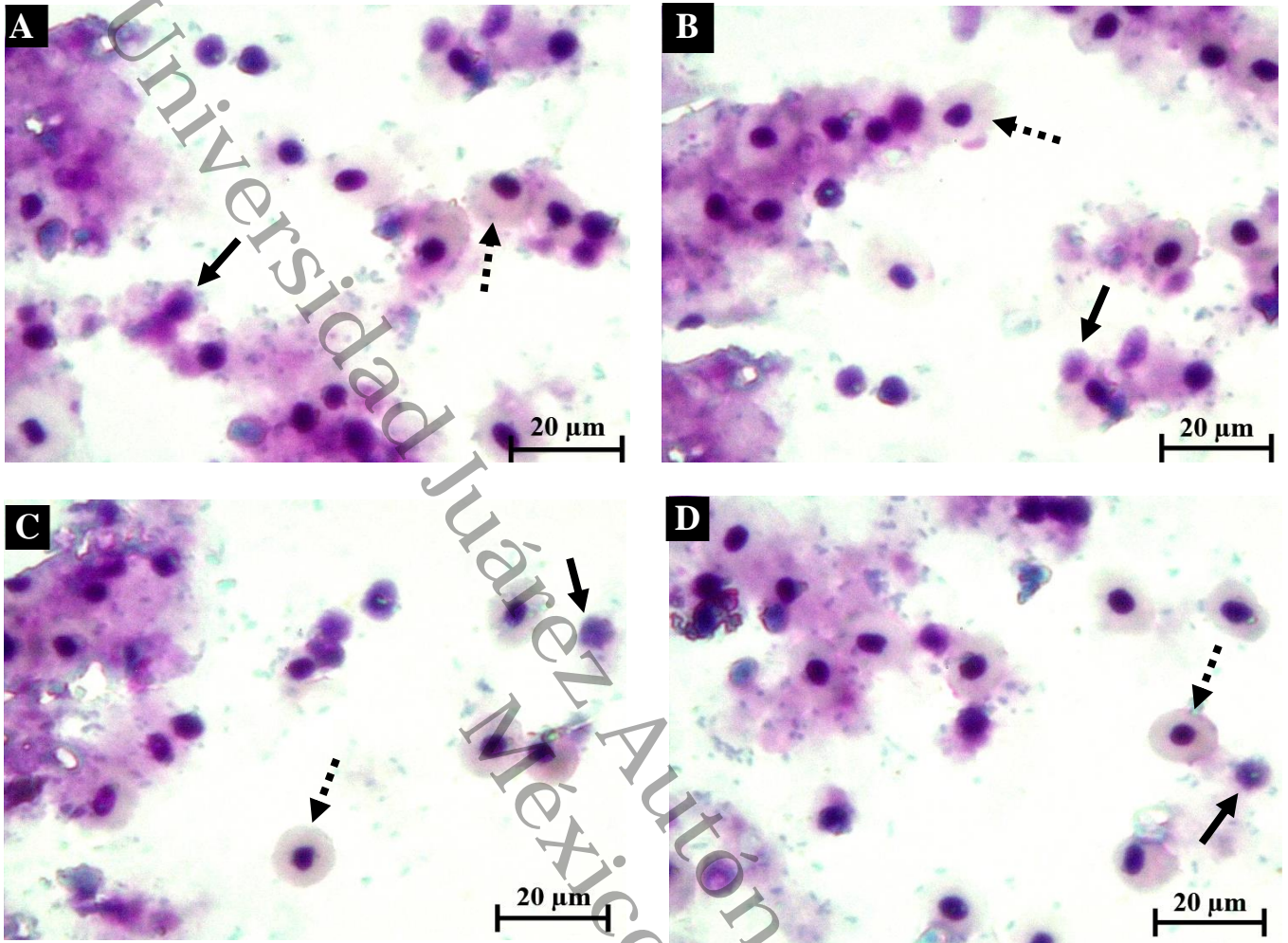


Figura 5. Microfotografías (A, B, C y D) de alta resolución por microscopía óptica de luz transmitida a 40X+1.25X del optovar, que muestran las células eritrocitarias y leucocitarias de la sangre periférica de la mojarra paleta *V. melanura*, que fueron obtenidos mediante cultivo “*in vitro*” convencional. Las flechas con línea continua muestran las células leucocitarias y las flechas con línea discontinua a las células eritrocitarias.

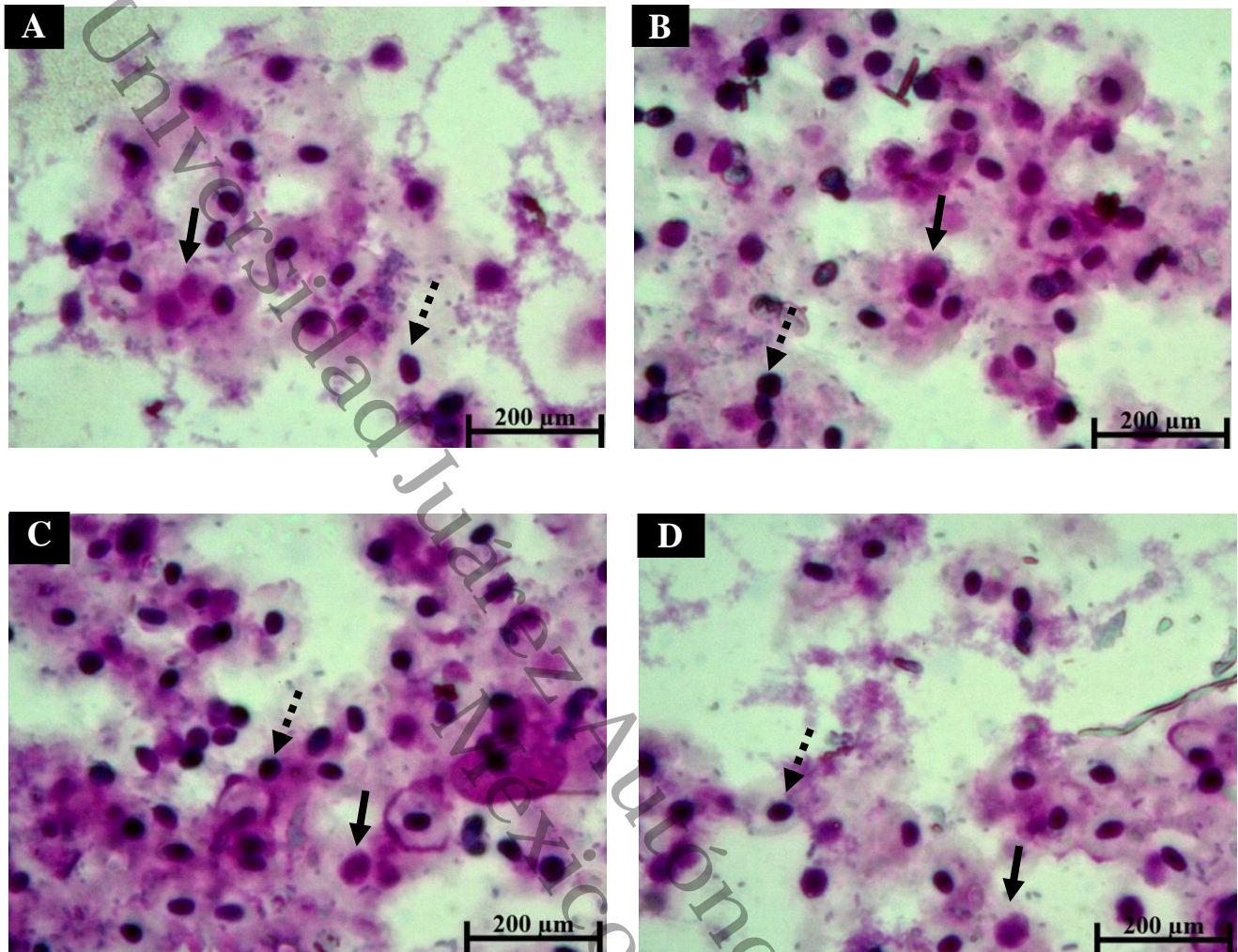


Figura 6. Microfotografías (A, B, C y D) de alta resolución por microscopía óptica de luz transmitida a 40X+1.25X del optovar, que muestran las células eritrocitarias y leucocitarias de la sangre periférica de la mojarra paleta *V. melanura*, que fueron obtenidos mediante cultivo “*in vitro*” aislando células leucocitarias por un gradiente de densidad. Las flechas con línea continua muestran las células leucocitarias y las flechas con línea discontinua a las células eritrocitarias.

Los resultados de los porcentajes de eritrocitos y leucocitos en las muestras control, cultivo estándar y cultivo por aislamiento de células se presentan de forma comparativa en la **Tabla 1** y de modo gráfico en las **Figuras 7, 8 y 9**. Durante la evaluación del recuento celular en las muestras control, se observó que antes del cultivo “*in vitro*”, todos los especímenes (100%) mostraron presencia de leucocitos, con promedio de 3.30%, rango que osciló desde 2.18% y hasta 5.32%; sin diferencias significativas ($P \leq 0.05$) entre las muestras de los especímenes. En la observación de la presencia de eritrocitos, en las muestras de cultivo hematopoyético control, los porcentajes fueron mayores, mostrando promedio de 96.7% con rangos registrados desde 94.7% y hasta 97.8% de eritrocitos observados (**Tabla 1 y Figura 9**); sin diferencias significativas entre los quince especímenes empleados ($P \leq 0.05$).

Hubo diferencias significativas ($P \leq 0.001$) en los porcentajes observados de células leucocitarias y eritrocitarias en las muestras del cultivo estándar. En dicho sentido, en el crecimiento del tejido hematopoyético no tamizado se observó en promedio 16.6% de leucocitos, con valor mínimo registrado desde 7.90% y máximo de hasta 36.0 %. Lo anterior con diferencias significativas entre los valores registrados entre especímenes ($P \leq 0.001$), con presencia de dos grupos estadísticos “a y b”, que representaron valores altos y bajos respectivamente (**Tabla 1**). Las células eritrocitarias (no tamizadas) mostraron el registro promedio de 83.4% con valores mínimos desde 64.0% y hasta 92.1% de eritrocitos observados (**Tabla 1 y Figura 9**). Tales resultados mostraron diferencias significativas ($P \leq 0.001$) entre los valores registrados con presencia de dos grupos estadísticos “a y b”, lo que representó valores bajos y altos entre ellos (**Tabla 1**).

Por otro lado, los resultados del análisis de varianza de una vía (ANVA) y la comparación múltiple de Tukey del cultivo por aislamiento de células, mostraron diferencias estadísticamente significativas ($P \leq 0.001$). En dicho sentido, en las dispersiones de células eritrocitarias tamizadas y cultivadas se registró promedio de 57.1%; presentando valores mínimos desde 29.8% y hasta 69.9% de eritrocitos, con diferencias significativas entre especímenes ($P \leq 0.001$). En el caso del crecimiento de las células leucocitarias tamizadas y cultivadas, variaron significativamente ($P \leq 0.001$) entre especímenes con el valor mínimo de 30.1% y el valor máximo de 70.2%, con promedio global de 42.9% (**Tabla 1 y Figura 9**). Por ello, fueron

observados tres grupos estadísticos, caracterizados por valores altos, medios y bajos, respectivamente (**Tabla 1**).

En las **Figuras 7 y 8**, fue registrada la relación que existe entre los tratamientos y los valores observados en las muestras hematopoyéticas de las células cultivadas de cada espécimen, pues los resultados obtenidos con el análisis de determinación R^2 , que oscilaron entre $R^2= 0.91$ y hasta $R^2= 0.97$.

Finalmente, en la **Figura 9** se describe el crecimiento comparativo promedio de las células leucocitarias y eritrocitarias, procedentes del cultivo celular estándar y de aquellas células que fueron aisladas por un gradiente de densidad. El análisis comparativo, muestra diferencias significativas entre tratamientos ($P \leq 0.001$), con presencia global de mayor número de leucocitos (42.9%), cuando estos fueron tamizados con el gradiente de densidad en comparación con las observaciones del cultivo celular estándar con 16.6 % de leucocitos; siendo ellos el control como el tratamiento con menor conteo leucocitario 3.30 % (**Figura 9**). En el caso de los eritrocitos, el contraste fue similar a las observaciones anteriores (**Figura 9**).

Tabla 1. Resultados comparativos de los porcentajes promedio (\bar{X}) y desviación estándar (D. E.) de leucocitos y eritrocitos registrados en las muestras control, cultivo estándar y cultivo por aislamiento de células.

Especímen	Control		Cultivo estándar		Cultivo por aislamiento de células	
	Porcentajes eritrocitos	Porcentajes leucocitos	Porcentajes eritrocitos	Porcentajes leucocitos	Porcentajes eritrocitos	Porcentajes leucocitos
	$\bar{X} \pm D. E.$	$\bar{X} \pm D. E.$	$\bar{X} \pm D. E.$	$\bar{X} \pm D. E.$	$\bar{X} \pm D. E.$	$\bar{X} \pm D. E.$
1	97.8 \pm 0.86 ^a	2.18 \pm 0.86 ^a	72.7 \pm 5.80 ^a	27.3 \pm 5.80 ^a	30.3 \pm 7.90 ^a	69.7 \pm 7.90 ^a
2	95.1 \pm 2.56 ^a	4.17 \pm 2.56 ^a	64.0 \pm 3.70 ^a	36.0 \pm 3.70 ^a	29.8 \pm 5.10 ^a	70.2 \pm 5.10 ^a
3	95.0 \pm 1.86 ^a	4.96 \pm 1.86 ^a	87.8 \pm 5.22 ^b	12.2 \pm 5.22 ^a	39.2 \pm 3.50 ^a	60.8 \pm 3.50 ^a
4	95.9 \pm 2.07 ^a	4.05 \pm 2.07 ^a	80.5 \pm 6.86 ^b	19.5 \pm 6.86 ^a	69.0 \pm 3.24 ^a	31.0 \pm 3.24 ^a
5	96.6 \pm 1.91 ^a	3.45 \pm 1.91 ^a	84.1 \pm 6.40 ^b	15.9 \pm 6.40 ^a	62.9 \pm 6.83 ^a	37.1 \pm 6.83 ^a
6	96.6 \pm 1.38 ^a	3.44 \pm 1.38 ^a	80.9 \pm 2.41 ^b	19.1 \pm 2.41 ^a	65.0 \pm 3.70 ^b	35.0 \pm 3.70 ^a
7	97.8 \pm 1.01 ^a	2.20 \pm 1.01 ^a	81.2 \pm 4.62 ^b	18.8 \pm 4.62 ^a	62.6 \pm 4.17 ^b	37.4 \pm 4.17 ^a
8	96.7 \pm 0.78 ^a	3.33 \pm 0.78 ^a	85.1 \pm 1.79 ^b	14.9 \pm 1.79 ^a	69.1 \pm 4.15 ^b	30.9 \pm 4.15 ^a
9	97.2 \pm 0.70 ^a	2.78 \pm 0.70 ^a	79.5 \pm 5.12 ^b	20.5 \pm 5.12 ^a	60.8 \pm 3.53 ^b	39.2 \pm 3.53 ^a
10	94.7 \pm 2.24 ^a	5.32 \pm 2.24 ^a	91.3 \pm 3.83 ^b	8.70 \pm 3.83 ^a	69.6 \pm 3.20 ^b	30.4 \pm 3.20 ^a
11	97.7 \pm 0.89 ^a	2.30 \pm 0.89 ^a	89.0 \pm 2.65 ^b	11.0 \pm 2.65 ^a	69.9 \pm 8.20 ^b	30.1 \pm 8.20 ^b
12	97.0 \pm 0.99 ^a	3.00 \pm 0.99 ^a	92.1 \pm 2.70 ^b	7.90 \pm 2.70 ^a	51.7 \pm 5.92 ^b	48.3 \pm 5.92 ^b
13	97.0 \pm 1.17 ^a	3.00 \pm 1.17 ^a	87.7 \pm 5.27 ^b	12.3 \pm 5.27 ^a	67.0 \pm 8.95 ^b	33.0 \pm 8.95 ^b
14	97.6 \pm 0.54 ^a	2.40 \pm 0.54 ^a	87.0 \pm 8.12 ^b	13.0 \pm 8.12 ^b	65.0 \pm 2.67 ^b	35.0 \pm 2.67 ^c
15	97.4 \pm 0.98 ^a	2.60 \pm 0.98 ^a	88.7 \pm 3.71 ^b	11.3 \pm 3.71 ^b	44.3 \pm 11.3 ^b	55.7 \pm 11.3 ^c
$\bar{X} \pm D. E.$	96.7 \pm 1.33	3.30 \pm 1.33	83.4 \pm 4.55	16.6 \pm 4.55	57.1 \pm 5.49	42.9 \pm 5.49

Literales en minúscula, indican un análisis comparativo entre ellas; en el caso de que las literales sean similares no existen diferencias significativas con la comparación múltiple de Tukey y nivel de significancia de $P \geq 0.05$; en caso contrario las diferencias existen. \bar{X} = media y **D. E.**= desviación estándar

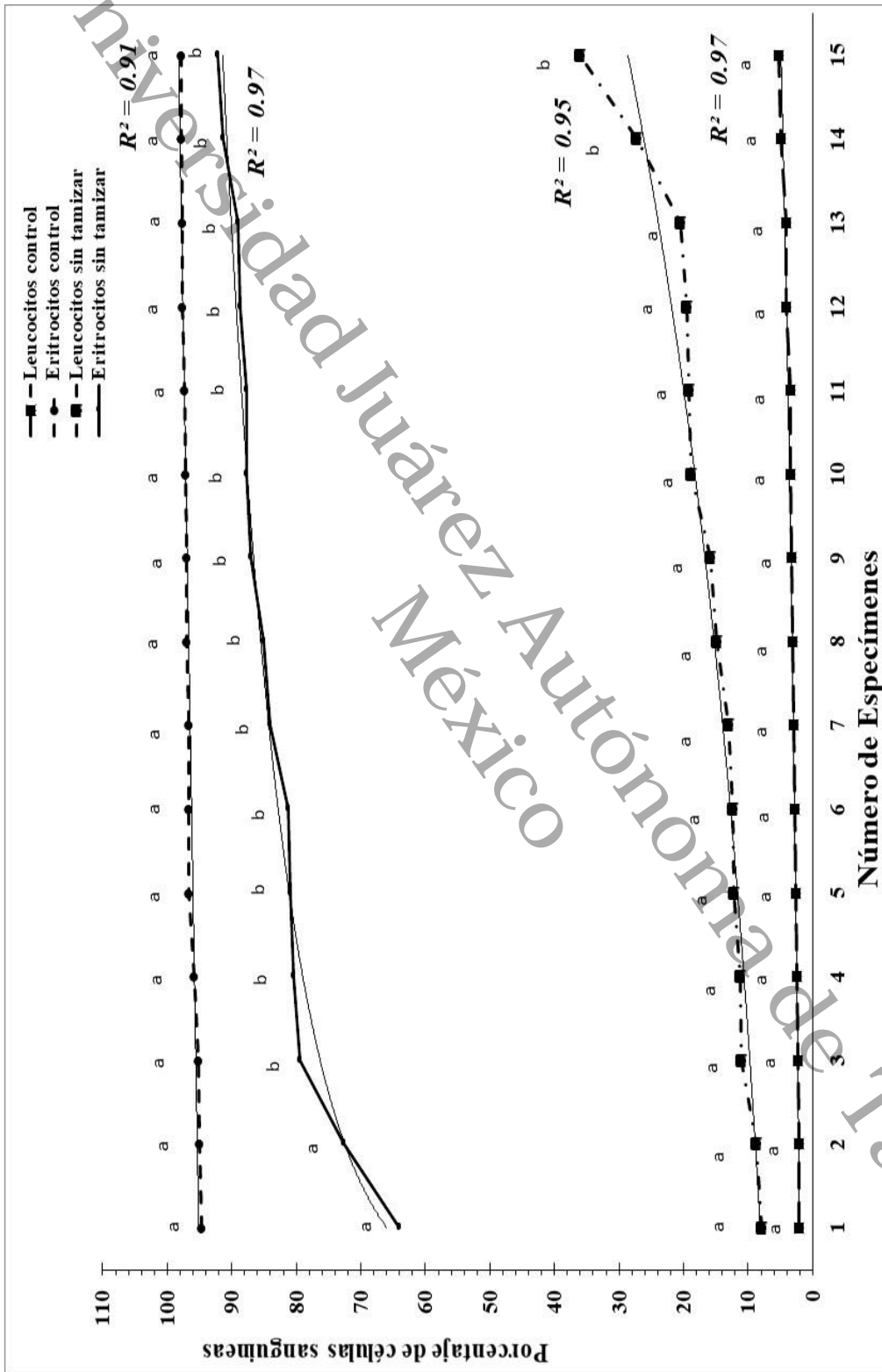


Figura 7. Porcentajes promedio y valores del coeficiente de determinación (R^2) de los leucocitos y eritrocitos, de muestras de sangre de 15 especímenes de *V. melanura*, cultivadas “in vitro” por el método convencional. Literales iguales entre especímenes, indican que no hay diferencias significativas con $P \geq 0.05$ de nivel de probabilidad y en caso contrario las diferencias existen.

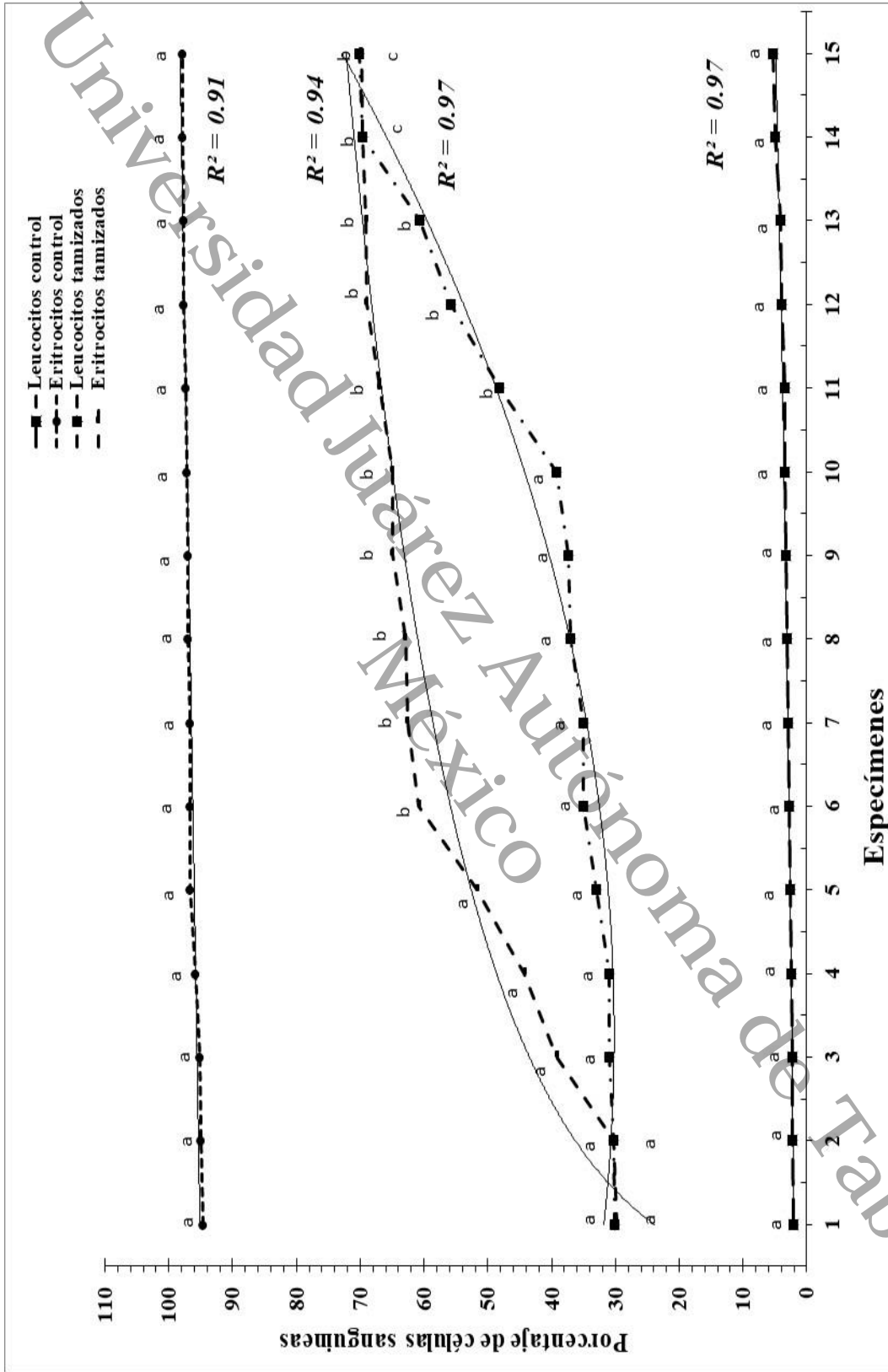


Figura 8. Porcentajes promedio y valores del coeficiente de determinación (R^2) de los leucocitos y eritrocitos de muestras de sangre de 15 especímenes de *V. melanura*, tamizados por un gradiente de densidad (control) y el posterior cultivo "in vitro". Literales iguales entre especímenes, indican que no hay diferencias significativas con $P \geq 0.05$ de nivel de probabilidad y en caso contrario las diferencias existen.

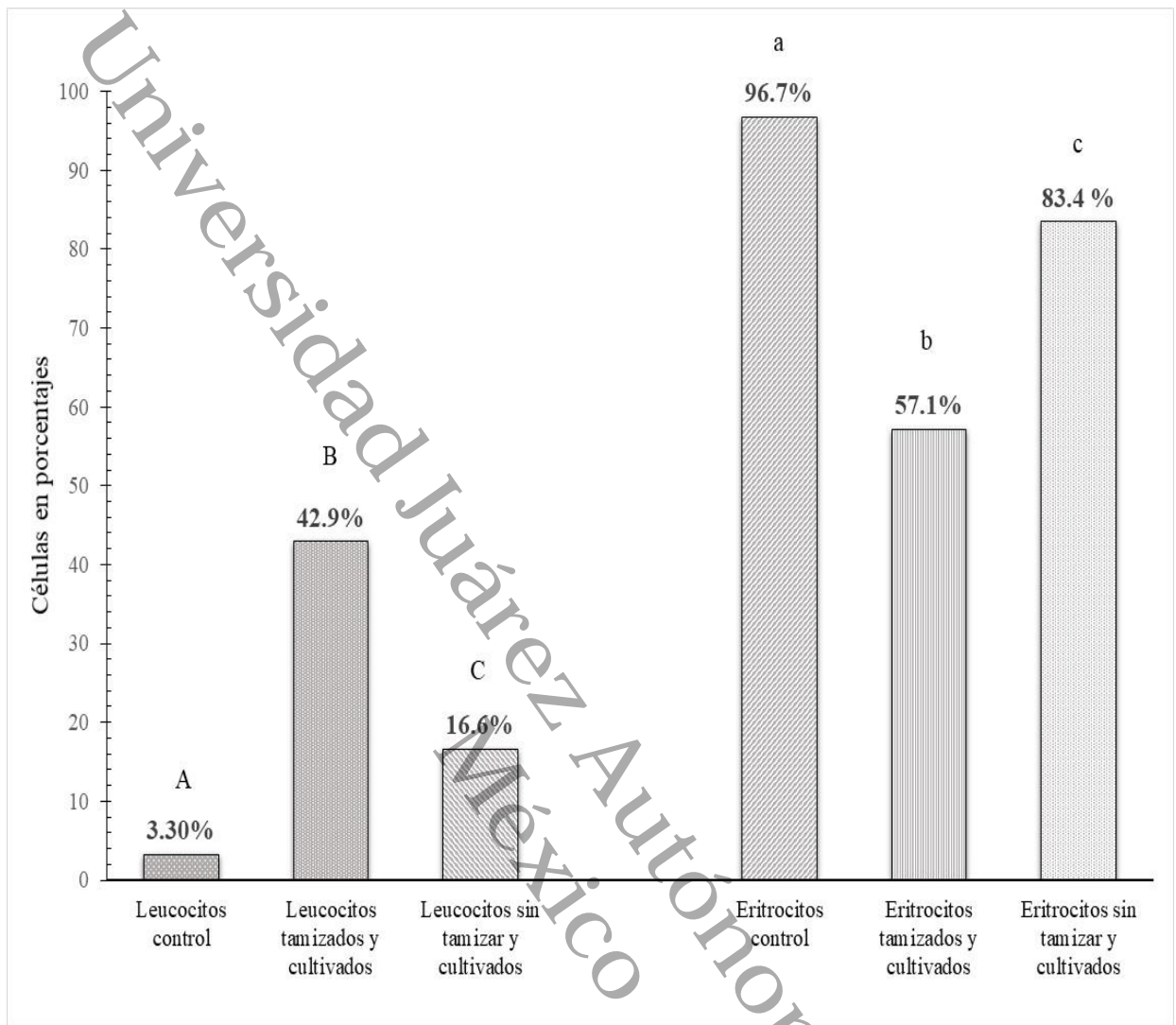


Figura 9. Crecimiento comparativo promedio de las células leucocitarias y eritrocitarias que fueron o no tamizadas por un gradiente de densidad a partir de muestras sanguíneas de 15 especímenes de la mojarra paleta *V. melanura*. Las literales en mayúscula o en minúscula, indican un análisis comparativo entre ellas; en el caso de que las literales sean similares no existen diferencias significativas con la comparación múltiple de Tukey y nivel de significancia de $P \geq 0.05$; en caso contrario las diferencias existen.

VII. DISCUSIÓN

En el sureste mexicano, particularmente en Tabasco, se han utilizado peces nativos y exóticos como modelos biológicos en diversos estudios. Tal es el caso de la mojarra paleta *V. melanura*, un cíclido con estudios en biología, pesquería, ecología (Chávez *et al.* 1989, Castillo *et al.* 2015), genética (Álvarez-Morales 2009), cultivo, desarrollo embrionario (Hernández *et al.* 2020), y recientemente en hematología experimental (Jiménez-Morales, 2024).

En el torrente sanguíneo de los peces, los leucocitos son indispensables en los procesos inmunológicos ante la respuesta a un agente invasor o patógeno mediante la producción de anticuerpos (Rubio-Godoy, 2010; Olabuenaga, 2000). En años recientes, el tejido hematopoyético en peces se ha centrado en el cultivo “*in vitro*” ante el poco conocimiento de las funciones inmunológicas de los leucocitos, siendo este un procedimiento sencillo que evita el sacrificio de los especímenes, dando pauta positiva a las leyes y normas que regulan el uso de animales en experimentación (Molina *et al.* 2018; Martínez-Flores 2023). Por ello, los protocolos para realizar cultivos celulares deben optimizarse para cada tipo de célula o especie de interés, con el propósito de obtener resultados significativos respecto a las características a las que se adapta una célula (Ager *et al.* 2018). Por lo anterior, es necesario el desarrollo de técnicas de cultivos de sangre periférica con el fin de estimular la proliferación celular del tejido hematopoyético (McIntyre *et al.* 1962), para estudios en ciencia básica y aplicada.

En el grupo de los peces, se han reportado diversas metodologías para el cultivo “*in vitro*” de sangre periférica; en los cuales la temperatura, el medio de cultivo y el componente celular son importantes (Denman 1973; Fujiwara *et al.* 2000). Todo ello, con el fin de obtener cultivos viables capaces de sustentar las funciones leucocitarias y eritrocitarias normales de los peces (Denman 1973; Fujiwara *et al.* 2000). Así también, la capacidad de diferenciación de las células leucocitarias es variable, dependiendo de factores como la especie, la condición del pez donador y las condiciones de la toma de las muestras de sangre (Miller *et al.* 1994). En dicho sentido, el protocolo desarrollado en este estudio para el cultivo “*in vitro*” de sangre periférica en la mojarra paleta *V. melanura* es congruente con los estudios realizados en especies como *Salmo gairdneri*, *Carassius auratus* (Sakai, 1981), *Salmo trutta*, *Cyprinus carpio* (Blaxhall, 1983, 1985), entre otras especies; ya que adaptaron el procedimiento estándar para el cultivo leucocitario en peces.

En los treinta cultivos de sangre periférica realizados de la mojarra paleta; se encontró alta sobrevivencia celular (100%); es decir, que las condiciones del medio de cultivo suplementado con Fitohemaglutinina (FHA), el antibiótico y el periodo de incubación fueron adecuados para la vitalidad, proliferación y crecimiento de los eritrocitos y los leucocitos de la especie estudiada. Así también, Fujiwara *et al.* (2001) reportaron alta sobrevivencia celular en cultivos de linfocitos de la trucha arcoíris, mencionando que la propiedad mitogénica de la Fitohemaglutinina se desencadena en la proliferación de las células leucocitarias en 24 a 48 horas. Además, observaron que el tiempo de incubación influyó considerablemente en los cultivos, ya que los valores aumentaron de 4 a 8 veces entre los 3 y 6 días o a las 120 horas de incubación. Por otro lado, Sadique *et al.* (2010; 2013) mostró la existencia de actividad promotora del crecimiento de leucocitos cultivados de *Channa punctatus* con FHA, después de 48 y 72 horas de empleo.

En los resultados promedio del presente estudio, las muestras control (antes del cultivo “*in vitro*”) registraron un 3.30% de leucocitos y un 96.7% de eritrocitos (**Figura 4**). Tales resultados son consistentes con el trabajo realizado por Morales-Jimenez (2024) en *V. melanura*, donde se registró valores promedio de 3.74% de leucocitos y 96.2% de eritrocitos. Por otro lado, en el cíclido africano *Oreochromis niloticus*, ha sido analizado hematológicamente en varios estudios, y en ello se ha reportado que la proporción de células sanguíneas normales tiene presencia de 1.8% de leucocitos y 98.2% de eritrocitos (López-García, 2024), 14.1% de leucocitos y 85.9% de eritrocitos (Von-Hessberg *et al.* 2011). En dicho contexto, la proporción porcentual de eritrocitos y leucocitos en el comparativo de los resultados obtenidos como muestras control en el estudio con la mojarra paleta y el contraste con la literatura citada, nos muestra que los especímenes adultos empleados como donadores de sangre periférica de *V. melanura* se encontraban saludables.

Por otra parte, los resultados de las muestras sanguíneas que se cultivaron por el método estándar (células no tamizadas) se encontraron diferencias significativas ($P=0.001$) en la proporción de células leucocitarias y eritrocitarias (**Tabla 1**). Subsecuentemente, en los cultivos del tejido hematopoyético no tamizado se obtuvo en promedio 16.6% de leucocitos y 83.4% de eritrocitos. Tales resultados, presentan diferencias en el promedio porcentual registrado de la sobrevivencia celular, obteniendo reducción de los porcentajes de células eritrocitarias y el incremento en las células leucocitarias. Lo anterior, fue debido a que la técnica empleada para la siembra celular

del cultivo convencional, que abarca una mezcla de soluciones en distintas concentraciones y tiempo de exposición; además, se comprueba que el empleo de la Fitoheماغلутinina como inmunomodulador en el medio de cultivo (Lymphocyte Karyotyping Medium) genera una alta afinidad por los receptores de los leucocitos y poca por la reactivación de los eritrocitos (Movafagh *et al.* 2011). En dicho sentido, Morales-Jiménez 2024, observó variación significativa de los conteos celulares en la mojarra paleta *Vieja melanura*, después de 24 horas de la aplicación del mitoestimulante Fitoheماغلутinina, obteniendo reducción del conteo celular mitótico eritrocitario de 93.2 ± 3.11 %, pero con incremento significativo en los valores porcentuales leucocitarios del 6.77 ± 3.11 %.

En el caso particular de los resultados en los cultivos de aislamiento de células por gradiente, variaron significativamente en el porcentaje promedio celular; los hallazgos encontrados en las células eritrocitarias (tamizadas y cultivadas) fue de 57.1% y en las células leucocitarias de 42.9%. Estos datos evidencian que el empleo del medio de gradiente (Ficoll), permitió la recuperación y aislamiento de los leucocitos a partir de las muestras totales de sangre periférica de *V. melanura*. Lo anterior, es debido a la densidad elevada que tiene el medio de gradiente Ficoll, lo que causa una migración diferencial de células durante la centrifugación, que da como resultado la formación de capas que contienen diferentes tipos de células; los eritrocitos, los granulocitos y las células muertas al entrar en contacto con el agente hipertónico de Ficoll, tienen sedimentación rápida y se acumulan en el fondo del tubo (capa inferior), mientras que en la interfaz entre el plasma y la capa de Ficoll-Paque se encuentran las células leucocitarias junto con otras partículas de sedimentación lenta con baja densidad. Dicho acontecimiento, ha sido documentado en la literatura científica, donde el uso del medio de gradiente Ficoll ha resultado eficiente en aislar y concentrar células de la sangre periférica en peces. Tal es el caso, como lo reportado en el estudio por Sakai (1981) donde utilizaron Ficoll-Paque como gradiente de densidad estratificado en diferentes concentraciones (12%, 15%, 18%, 20%) para la separación de linfocitos en cultivos de sangre periférica de *Salmo gairdineri* y *Carassius auratus*; los linfocitos se acumularon exclusivamente en la capa de Ficoll al 18%, mientras que los eritrocitos y leucocitos en la capa de Ficoll al 20%, la viabilidad de los linfocitos y leucocitos fue entre el 70%-80% y del 98%, respectivamente. Así mismo, ha sido reportado en especies como *Salmo trutta* y *Ciprinus carpio*, que utilizaron diferentes métodos para la separación de linfocitos, entre ellos, el medio de gradiente ficoll-paque; mismo agente que generó un promedio de 26% en la

recuperación y viabilidad de linfocitos (Blaxhall 1981; 1985), siendo esta técnica una opción para obtener altos rendimientos de células leucocitarias.

Universidad Juárez Autónoma de Tabasco.
México

VIII. CONCLUSIONES

En el presente estudio se establecieron dos técnicas de cultivo “*in vitro*” que favorecieron el crecimiento y desarrollo de células leucocitarias y eritrocitarias en los treinta cultivos realizados; la viabilidad de leucocitos obtenida por la técnica de aislamiento de células por gradiente es mayor con respecto a la técnica de cultivo convencional. Además, se recomienda la utilización del medio de cultivo suplementado con Fitohemaglutinina, ya que promueve en las células la desdiferenciación que da inicio a la división celular en un periodo de 24 a 48 horas. El cultivo “*in vitro*” y la separación de leucocitos por gradiente, ofrece un gran potencial para futuras investigaciones, para indagar sobre las funciones inmunológicas de los leucocitos “*in vivo*” e “*in vitro*”, brindando ventajas éticas, prácticas y económicas. Sin embargo, cualquier método puede ser empleado en dependencia de la disponibilidad de los reactivos y componentes bioquímicos necesarios para uno u otro método.

IX. REFERENCIAS.

- Ager-Wick, E., Hodne, K., Fontaine, R., von Krogh, K., Haug, T. M., & Weltzien, F. A. (2018). Preparation of a high-quality primary cell culture from fish pituitaries. *Journal of Visualized Experiments: Jove*, (138), p. 58159.
- Ainsworth, A. J. (1992). Fish granulocytes: Morphology, distribution, and function. *Annual Review of Fish Diseases*, 2: 123–148.
- Almaguer-Gaona, C. (2003). Interpretación clínica de la biometría hemática. *Medicina Universitaria*. 5(18): p. 35-40.
- Álvarez-Morales, M. (2009). Cariotipo de la mojarra paleta *Vieja synspila* (Hubbs, 1935) en el estado de Tabasco, México. Tesis de Licenciatura. Universidad Juárez Autónoma de Tabasco, México. 45p.
- Alvis, G. (2006). La hematología como herramienta indicadora de la salud en los peces. *Rev Electron Ing En Prod Acuicola*, Vol. 2(2), p. 4.
- Arias-Rodriguez; L. Ibarra-Castro, L. y Páramo-Delgadillo, S. (2008). Los cromosomas mitóticos y meióticos de la mojarra *Petenia splendida* (Pisces:Cichlidae). *Rev. Biol. Trop.* 52:1-1.
- Arias-Rodriguez; L. Páramo-Delgadillo, S. y Durán-González, A. L. (2006). Caracterización citogenética del pez tropical de agua dulce *Parachromis managuensis* (Pisces: Cichlidae). *Revista de Biología Tropical (Int. J. Trop. Biol.)* 54:35-42.
- Biosciences, A. (2001). *Ficoll-Paque PLUS—For In Vitro Isolation of Lymphocytes*.
- Blaxhall, P. C. (1981). A comparison of methods used for the separation of fish lymphocytes. *Journal of Fish Biology*, 18(2): 177-181.

Blaxhall, P. C. (1985). The separation and cultivation of fish lymphocytes. In *Fish immunology* (pp. 245-259). Academic Press.

Burgos-Aceves, M. A. (2011). Estudios hormonales, bioquímicos y hemáticos durante la maduración gonádica en la cabrilla sardinera *Mycteroperca rosácea*. Tesis de Doctorado. Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S. C. 132p.

Canfield, P. J. (1998). Comparative cell morphology in the peripheral blood film from exotic and native animals a. *Australian Veterinary Journal*, 76(12): 793-800.

Castillo-Domínguez, A, Melgar-Valdés, CE, Barba-Macías, E, Rodiles-Hernández, R, Navarrete A de J, Perera García, MA, Cuenca-Soria, CA, Hernández-Gómez, RE. (2015). Composición y diversidad de peces del río San Pedro, Balancán, Tabasco, México. *Hidrobiológica* 25: 285-292.

Cepeda-Cepeda, M. G. (2015). Implementación de una técnica para el desarrollo de los cultivos celulares en muestras de células de cordón umbilical del Banco de cordón del Hospital Universitario. Tesis semestral. Universidad Autónoma de Nuevo León. 53 p.

Chávez, L., M., Mattheeuws, A., E, Pérez, M., H. (1989). Biología de los peces del río San Pedro en vista de determinar su potencial para la piscicultura. 1ra. Edición INIREB, Xalapa, Veracruz, México. 222p

Checa-Rojas A. (2018). Método: aislamiento de células sanguíneas por gradiente de Ficoll-Paque. Conogasi, Conocimiento para la vida.

Copete-Sierra, M. (2013). Aspectos generales de la evaluación hematológica en fauna silvestre y no convencional. Memorias de la Conferencia Interna en Medicina y Aprovechamiento de Fauna Silvestre, Exótica y no Convencional 9, (1): P. 17- 55.

Correa-Negrete, J. C., Garrido-Correa, A. A., Prieto-Guevara, M. J., Atencio-García, Víctor J, y Pardo-Carrasco, S. C. (2009). Caracterización de células sanguíneas y parámetros hematológicos en blanquillo *Sorubim cuspicaudus*. *Zootecnia Tropical*, 27(4): 393-405.

Denman, A. M. (1973). Review: Methods of separating human blood lymphoid cell populations. *Journal of Immunological Methods*, 2(4), 331–351.

Díaz, M. H. (2018). Análisis de las alteraciones en células sanguíneas del pez bagre (*Ariopsis felis*) de Tecolutla, Veracruz para establecer un diagnóstico de salud. Tesis de doctorado. Universidad Autónoma Metropolitana. 61 p.

Fish-Base. (2008). Kullander, Sven O. *Vieja Synspila*, Redhead. Cichlid. Aquarium 2008 disponible, <http://www.fishbase.org/Summary/SpeciesSummary.php?id=12322>.

Freshney, R. I. (2010). *Culture of animal cells: a manual of basic technique and specialized applications*. John Wiley & Sons. P. 725.

Fujiwara, A., Nishida-Umehara, C., Sakamoto, T., Okamoto, N., Nakayama, I., and Abe, S. (2001). Improved fish lymphocyte culture for chromosome preparation. *Genetica*, 111, 77-89.

Gallegos-Morales, I. Iriarte-Rodríguez, F. Angulo-Pineda, R. y Fernández-Pérez M. (2011). Caracterización Hematológica en las diferentes etapas de desarrollo de la Castarrica (*Cichlasoma urophthalmus*) Tenhuayaca (*Petenia splendida*) y Tilapia (*Oreochromis sp*) bajo condiciones de cultivo. Memorias de la Semana de Divulgación y Video Científico. Universidad Juárez Autónoma de Tabasco. 68 p.

Hernández-Hernández, F. A., Hernández-Gómez, R., Valenzuela-Córdova, I., Perera-García, M. A. y Cuenca-Soria, C. A. (2020). Desarrollo embrionario y larval de la mojarra paleta *Vieja melanura* (Günther, 1862) del sureste mexicano. *Ecosistemas y Recursos Agropecuarios*, 7 (3): 26-86.

Jago, C. H. and D. Welter, (1995). Quantitative comparisons of the morphology and ultrastructure of erythrocyte nuclei from seven freshwater species. *Can. J. Zool.*, 73(2): 1951-1959.

Korcock, D. E. Houston, A. H. and Gray, J. D. (1988). Effects of sampling conditions on selected blood variables of rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson. *Journal of Fish Biology*, 33(2): 319-330.

López-García, D. (2024). Estudio comparativo de la extracción de metabolitos de *Ganoderma multipileum* y *Pycnoporus sanguineus* para pruebas de inmunoestimulación en *Oreochromis niloticus*. Tesis de Licenciatura. Universidad Juárez Autónoma de Tabasco, México.

Luz, A., Carlos B. C. y Fernando, L. (2015). Cultivos clonogénicos: historia y su uso actual como control de calidad pre-trasplante. *Revista Médica de la Universidad Veracruzana*, 15(1): 6-12.

Martínez-Flores, E. (2023). Técnicas Citogenéticas Simples para la Obtención de Metafase en Mitosis para Peces. Tesis de licenciatura. Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Xochimilco. 28 p.

Maya, G. C. (2007). Del hemograma manual al hemograma de cuarta generación. *Medicina & Laboratorio*, 13(11-12): 511-550.

Molina, M. J., Obaya, A., Ramos, J., Solís, V., Sparrowe, J., y Muñoz, C. (2018). Por qué los animales importan: Argumentario sobre la experimentación animal. *Grupo de trabajo de la SECAL. Animales de laboratorio*, 79 p.

Morales-Jiménez, J. M. (2024). Mitoestimulación hematopoyética en la mojarra paleta *Vieja melanura* (Günther, 1862). Tesis de licenciatura. Universidad Juárez Autónoma de Tabasco, México. 45 p.

Movafagh, A., Heydary, H., Mortazavi-Tabatabaei, S. & Azargashb, E. (2011). The Significance Application of indigenous phytohemagglutinin (PHA) mitogen on metaphase and cell culture procedure. *Iran J, Pharm.* Fall. 10(4): 895-903.

McMahan, C. D., Geheber, A. D. and Piller, K. R. (2010). Molecular systematics of the enigmatic Middle American genus *Vieja* (Teleostei: Cichlidae). *Mol. Phylogenet Evol.* 57:1293–300.

McMahan, C. D., Matamoros, W., Piller, K. R. and Chakrabarty. (2015). Taxonomy and systematics of the herichthys (Cichlidae Tribe Heroini), with the description of eight new Middle American Genera *Zootaxa* 3999 (2): 211-234.

Mendoza, A., Páramo, S., Oseguera, J. A., Vazquez, C. A., Macías, J., y Bravo, G. (2014). Efecto de la densidad de carga y el nivel de proteína sobre el crecimiento de *Cichlasoma synspilum* (Pisces: Cichlidae) bajo cultivo experimental en un sistema cerrado. *Ecosistemas y Recursos Agropecuarios*, 9(17).

Miller, R. R., Minckley, W.L. y Norris, S.M. (2009). Peces dulceacuícolas de México. CONABIO–simac–Ecosur–dfc, México. Morrone, J. 2005. Hacia una síntesis biogeográfica de México. *Rev. Mex. Biodivers.* 76:207-252.

McIntyre, O. R., Ebaugh Jr, F. G., and Vaules, M. P. (1962). The effect of phytohemagglutinin on leukocyte cultures as measured by P32 incorporation in the DNA, RNA, and acid soluble fractions. *Blood*, 19(4): 443-453.

Olabuenaga, S. E. (2000). Fish immune system. *Gayana (Concepción)*, 64(2), 205-215.

Páramo-Delgadillo, S. (1984). Ictiofauna del río González y lagunas adyacentes, Tabasco, México. Instituto de biología UJAT. *Universidad y Ciencia* 1:5-19.

Páramo-Delgadillo, S. y Mendoza, A.Q.A. (1994). *C. synspilum* estado actual del conocimiento para su incorporación en la acuicultura. P127-128. Memorias del segundo seminario sobre peces nativos con uso potencial en la acuicultura. Colegio de posgraduados en ciencias agrícolas, Cárdenas Tabasco, México. 230 p.

Querol, G. S. (2002). Expansión "ex vivo" de progenitores hematopoyéticos de sangre de cordón umbilical para trasplante. Tesis doctoral. Universidad Autónoma de Bellaterra. 159 p.

Rubio-Godoy, M. (2010). Inmunología de los peces óseos: Revisión. *Revista mexicana de ciencias pecuarias*, 1(1): 47-57.

Sadique, M., Das, B. K., and Maiti, P. K. (2010). In Vitro Culture of Peripheral Blood Leukocytes of *Channa punctatus*. *Journal of Aquaculture*, 37-43.

Sadique, M., Das, B. K., & Maiti, P. K. (2013). Optimization of culture of peripheral blood leukocytes of *channa punctatus*. *Biochem. Cell. Arch.* Vol. 13, No. 1, pp. 111-117

Sakai, D. K. (1981). Separation of lymphocytes from the peripheral blood of rainbow trout and goldfish. *Nippon Suisan Gakkaishi*, 47(10), 1281–1288.

Salazar-Lugo, R., Romero, Z. y Centeno, L. (2012). Caracterización morfológica y citoquímica de leucocitos del pez dulceacuícola *Colossoma macropomum* (Characiformes: Characidae). SABER. *Revista Multidisciplinaria del Consejo de Investigación de la Universidad de Oriente*, 24(1): 49-55.

Satchell, G. (1991). Physiology and form of fish circulation. Ed. Cambridge Univ. Press. Australia. 235 pp

Stachura, D. L. and Traver, D. (2011). Cellular dissection of zebrafish hematopoiesis. *Methods Cell Biol.* 101:75-110.

Tillitt, D. E., Giesy, J. P. and Fromm, P. O. (1988). In vitro mitogenesis of peripheral blood lymphocytes from rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *Comparative Biochemistry and physiology. A, Comparative Physiology*, 89(1): 25-35.

Valenzuela, A., Oyarzún, C. y Silva, V. (2003). Células sanguíneas de *Schroederichthys chilensis* (Guichenot 1848) (Elasmobranchii, Scyliorhinidae): la serie blanca. *Gayana Concepción*, 67(1): 130-137.

Vega, A. R. (2013). Valores hematológicos y bioquímica sanguínea de la población silvestre del huachinango *Lutjanus peru* (Nichols y Murphy, 1922) en el Pacífico Sur de México. Tesis de Maestría. Instituto Politécnico Nacional, México. 75p.

Veiga, M. L., Egami, M. I., Ranzani-Paiva, M. J. T. y Rodrigues, E. L. (2000). Aspectos morfológicos y citoquímicos de las células sanguíneas de *Salminus maxillosus* Valenciennes, 1840 (Characiformes, Characidae). *Revista Chilena de Anatomía*, 18(2): 245-250.

Von Hessberg, C. M. H., Quintero, A. G., y Jaramillo, A. V. G. (2011). Parámetros hematológicos de *Tilapia nilótica* (*Oreochromis niloticus*, Linnaeus 1757) con peso entre 250 gy 350 g, en el Centro Experimental Piscícola de la Universidad de Caldas. *Revista Veterinaria y Zootecnia (On Line)*, 5(1): 47-61.

Xu, B., Gao, J., Wang, X., Chen, Z., & Wang, C. (2016). Complete mitochondrial DNA sequencing of *Vieja synspila*, a cichlid fish. *Mitochondrial DNA Part A*, 27(1): 633-634.

Alojamiento de la Tesis en el Repositorio Institucional	
Título de Tesis:	OPTIMIZACIÓN DE UN PROTOCOLO PARA EL CULTIVO “ <i>IN VITRO</i> ” DE SANGRE PERIFÉRICA EN LA MOJARRA PALETA <i>Vieja melanura</i>
Autor de la Tesis:	José Luis Junco Iglesias
ORCID:	https://orcid.org/0009-0006-7163-7457
Resumen de la Tesis:	<p>Antecedentes: En las mojarra nativas del sureste mexicano, son pocos los estudios encaminados a comprender la dinámica del tejido sanguíneo. La mojarra paleta <i>V. melanurus</i>, es un cíclido, que ha sido utilizada como modelo para estudios de biología-pesquera, enriqueciendo la información sobre su potencial para la acuicultura; abarcando aspectos biológicos, taxonómicos, hábitos alimenticios, genética y en los últimos años en hematología. En años recientes, el tejido hematopoyético en peces, se ha centrado en el cultivo “<i>in vitro</i>” ante el poco conocimiento del movimiento dinámico y las funciones inmunológicas de los leucocitos, siendo este un procedimiento sencillo que evita el sacrificio de los especímenes, dando pauta a las leyes y normas que regulan el uso de animales en experimentación. Por lo anterior, este trabajo plantea, optimizar una técnica para el cultivo “<i>in vitro</i>” de sangre periférica de <i>V. melanurus</i>, favoreciendo estudios de biología celular, citogenética e inmunología. Metodología: Las mojarra fueron obtenidas del sistema de acuicultura perteneciente a la División Académica de Ciencias Biológicas. Se realizaron un total de 15 cultivos de sangre periférica mediante dos métodos: cultivo estándar y cultivo con Ficoll-paque. De cada cultivo se tomó la temperatura de los días de incubación, para el sembrado se utilizó colchicina en citrato de sodio al 0.1%, citrato de sodio al 1% y</p>

	<p>fijador (ácido acético y alcohol metílico) en proporción 3:1. Resultados: La descripción citológica se efectuó mediante un microscopio Axio scope a 40x. Además, se realizó un conteo de células rojas (eritrocitos) y células blancas (leucocitos). Los datos generados se calcularon con las herramientas del programa Microsoft Excel 2016©. Los eritrocitos fueron las células sanguíneas más abundantes, pero con el uso del Ficoll-paque se obtuvieron diferencias significativas con alto porcentaje de células leucocitarias. Conclusiones: El protocolo desarrollado para el cultivo de sangre periférica es eficaz en cultivo estándar y cultivo con Ficoll; siendo una técnica sencilla y económica que no requiere equipos e instalaciones de alta complejidad y que mantiene a los especímenes vivos.</p>
<p>Palabras claves de la Tesis:</p>	<p>Hematología, cultivo “<i>in vitro</i>”, Ficoll-paque, <i>V. melanurus</i>,</p>
<p>Referencias citadas:</p>	<p>Tillitt, D. E., Giesy, J. P., & Fromm, P.O. 1988. In vitro mitogenesis of peripheral blood lymphocytes from rainbow trout (<i>Salmo gairdneri</i>). <i>Comparative Biochemistry and physiology. A, Comparative Physiology</i>, 89(1): 25-35.</p> <p>Ainsworth, A. J. (1992). Fish granulocytes: Morphology, distribution, and function. <i>Annual Review of Fish Diseases</i>, 2: 123–148.</p> <p>Almaguer-Gaona, C. (2003). Interpretación clínica de la biometría hemática. <i>Medicina Universitaria</i>. 5(18): p. 35-40.</p> <p>Chávez, L., M., Mattheeuws, A., E, Pérez, M., H. (1989). Biología de los peces del río San Pedro en vista de determinar su potencial para la piscicultura. 1ra. Edición INIREB, Xalapa, Veracruz, México. 222p.</p>