

Rev.MVZ Córdoba 21(2):5345-5354, 2016. ISSN: 0122-0268

ORIGINAL

## Hematological and clinical chemistry changes induced by acute stress during handling and capture of catfish (*Ictalurus punctatus*)

### Cambios hematológicos y bioquímicos provocados por estrés agudo causado por manejo y captura de bagre (*Ictalurus punctatus*)

Gabriel Aguirre-Guzman,<sup>1</sup> Ph.D, Verónica Carvajal-de-la-Fuente,<sup>1\*</sup> M.Sc,  
Miriam Neri-Coronado,<sup>1</sup> MVZ, Jorge Loredo-Osti,<sup>1</sup> MC,  
Jaime Luis Rábago-Castro,<sup>1</sup> Ph.D.

<sup>1</sup>Universidad Autónoma de Tamaulipas, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Km 5 Carr. Victoria - Mante, Cd. Victoria, Tamaulipas, México. \*Correspondencia: [vcarvajal@uat.edu.mx](mailto:vcarvajal@uat.edu.mx)

Received: August 2015; Accepted: November 2015.

#### RESUMEN

**Objetivo.** Evaluar los efectos del estrés agudo debido al manejo y captura sobre los parámetros hematológicos y bioquímicos en bagre de canal (*Ictalurus punctatus*) bajo cultivo. **Materiales y métodos.** Los peces (200 g promedio) fueron mantenidos en tanques de cultivo y divididos en dos tratamientos, por duplicado, (n= 15 x 2 x 2 = 60 peces). Treinta bagres fueron expuestos por 5 min a estrés agudo (TE) por manejo y captura, mientras que otro grupo no (grupo control, TnE). Diez peces de cada tratamiento fueron colectados a las 0, 6, y 24 h post-estrés para la extracción de sangre, los bagres del TnE fueron anestesiados durante su manejo y captura. Se evaluó el hemograma (método manual) y bioquímica sanguínea (espectrofotometría). Los resultados fueron analizados mediante la prueba de *t* student. **Resultados.** El contenido de eritrocitos, hematocrito, hemoglobina y glucosa de los animales TE fue significativamente mayor ( $p < 0.05$ ) a las 6 h post-estrés en comparación de TnE. Las células inmune en peces TE disminuyeron a las 6 y 24 h post-estrés, siendo leucocitos y linfocitos significativamente menores en el TnE ( $p < 0.05$ ) a las 24 h post-estrés. Otros parámetros evaluados no presentaron diferencias significativas en lo largo del estudio. **Conclusiones.** Los resultados sugieren que varios indicadores hematológicos y bioquímica sanguínea en los peces son alterados por el estrés agudo ocasionado por manejo y captura.

**Palabras clave:** Bagre, bioquímica sanguínea, estrés, valores hematológicos (*Fuente:*CAB).

#### ABSTRACT

**Objective.** Evaluation of hematological and biochemical parameters of culture channel catfish (*Ictalurus punctatus*) under acute stress by management and capture practice. **Materials and methods.** Fish (200 g mean) were maintained in culture tanks and divided in two treatments, in duplicate, (n=15x2x2=60 fishes). Thirty catfish were exposed for 5 min to acute stress (TE) by management and capture practice, while other group not (control group, TnE). 10 fish for treatment were collected at 0, 6, and 24 h post-stress for blood collection, where TnE fishes were anesthetized along work. Complete blood count (manual method) and blood biochemical (spectrophotometry) of fish samples were evaluated and their results were analyzed using a *Student's t*-distribution. **Results.** The

erythrocytes, hematocrit, hemoglobin and glucose level of TE animals was significantly higher ( $p < 0.05$ ) at 6 h post-stress, in comparison of TnE. Immune cells in fish TE decreased at 6 and 24 h post-stress, where leukocytes and lymphocytes were significantly lower than TnE ( $p < 0.05$ ) at 24 h post-stress. Other evaluated parameters did not show significant differences along this study. **Conclusions.** Those results suggest that several hematological and blood biochemical parameters in fish changed by acute stress generated by management and capture practice.

**Key words:** Blood parameters, blood biochemical, catfish, stress (*Source: CAB*).

## INTRODUCTION

Aquaculture production has become very important in recent times to ensure food security, which has benefitted from the increasing number of species cultivated. Aquaculture, a constantly growing industry, provides about 50% of the aquatic foods consumed worldwide (1). Additionally, consumption of aquaculture products has increased from 10 kg to 19 kg per capita between 1960 and 2012 (1), representing about 17% of animal protein intake and constituting one of the most important sources of essential vitamins, nutrients and omega-3 acids (1).

Cultured channel catfish (*Ictalurus punctatus*) is a relevant species on a global scale, generally accepted in national and international markets due to its quality and nutritional value as well as its presentation (2). Over the last decade the production of cultured channel catfish (*I. punctatus*) has varied around the world (250.000 - 400.000 tons) and in Mexico (760-1.496 tons). Exploitation, ranging from extensive to intensive, of this as well as other sweet water fish depends on a variety of factors to reach maximum productive levels. However, achieving adequate production levels involves the presence and increase of a variety of stress elements (high densities with a subsequent deterioration in water quality, handling and capture practices, etc.) that could modify the physiological response of fish (3,4).

Studies of aquaculture species show that different levels of stress can lead to a decrease in growth, health, survival, and reproduction (5,6). Furthermore, it has been reported that stress can generate hormone abnormalities, alterations in blood glucose and changes in blood cell composition (7). However, the effect of stress on fish varies from one species to another, and much depends on the duration and magnitude of the stressor (8,9).

Information pertaining to blood and hematologic values in channel catfish is limited (Table 1) (10-13) and demonstrates that variations in these parameters exist, even though the stress

## INTRODUCCIÓN

La producción acuícola ha tomado gran importancia hoy en día al fomentar la seguridad alimentaria, lo cual ha sido favorecido debido al creciente número de especies que se cultivan. Esta actividad provee alrededor del 50% de los alimentos acuáticos consumidos mundialmente, siendo una industria en continuo crecimiento (1). Además, el consumo de productos acuícolas se ha incrementado de 10 a 19 kg per capital entre 1960-2012 (1), representando cerca del 17% de la ingesta de proteína animal y una de las fuentes más importantes de nutrientes esenciales, vitaminas y ácidos grasos omega-3 (1).

El bagre de canal (*Ictalurus punctatus*) producido por acuicultura es una especie relevante a nivel mundial debido a su gran aceptación en el mercado nacional e internacional por la calidad, presentación y valor nutricional de su carne (2). En la última década, la producción de bagre de canal (*I. punctatus*) de cultivo ha presentado variaciones tanto a nivel mundial (250.000 - 400.000 ton) como en México (760 - 1.496 ton). La explotación, desde extensiva a intensiva, de este y otros peces dulce acuícolas depende de diversos factores para alcanzar su máximo potencial productivo; sin embargo, lograr los niveles adecuados de producción conlleva la presencia y potenciamiento de distintos elementos estresantes (altas densidades con deterioro en la calidad del agua, prácticas de manejo, captura, etc.) que pueden modificar la respuesta fisiológica de los peces (3,4).

Estudios en especies acuícolas demuestran que diferentes niveles de estrés puede generar una disminución en el crecimiento, salud, supervivencia, y reproducción de los peces (5, 6). Además, se ha reportado que el estrés puede generar anomalías hormonales, alteraciones en el contenido de la glucosa sanguínea y cambios en la composición celular de la sangre (7). Sin embargo, el efecto del estrés en los peces puede variar entre las diferentes especies, y depende mucho de la duración y magnitud del estímulo estresante (8, 9).

La información asociada a los valores sanguíneos y hematológicos en bagre de canal es limitada (Tabla 1)(10-13) y demuestran la variación que existe en estos parámetros, aun cuando el factor

**Table 1.** Blood and chemistry values in channel catfish (*Ictalurus punctatus*) (10-13).

Parameter	Values	Parameter	Values
VPC (%)	27 - 54	Hematocrit (%)	13 - 29 40 21
NCR (X10 <sup>6</sup> µL)	1.5 - 41	Glucose (gm/dL)	0.9 - 168.1 64.5 26.9
Erythrocytes (x10 <sup>6</sup> )	2.4	Hemoglobin (g/dL)	4.4 - 10.9 8.4-9.9 4-8
Total protein (g/dL)	2.2	CHCM (g/dL)	15.7 - 48.7
Leucocytes (1000/mm <sup>3</sup> )	28		

VPC = volume of cellular packet, CHCM (g/dL) = mean corpuscular hemoglobin, NCR = Number of red cells.

factor was not considered in these studies. However, it is observed that increased stress results in immunosuppression which may favor disease, mortality and decreased production (14,15). Understanding how stress can affect fish physiology is important and is a way to support this industry's development. The purpose of this study was to evaluate the effect of acute stress generated by handling and capture on hematology and chemical blood parameters in channel catfish (*I. punctatus*).

## MATERIALS AND METHODS

**Experimental animals and culture area.** Sixty young channel catfish (200 g mean) from the commercial farm ACUMEX S.A. of C.V., Abasolo, Tamaulipas, Mexico were used. The fish were divided into two treatment groups (stressed or TE and not stressed or TnE) with 30 fish in each group. Each treatment was distributed in two cylindrical fiberglass tanks (192.4L) with fifteen fish in each tank. The fish were acclimated at 25°C for three weeks in culture tanks in sweet water from a deep well at the Dr. Norberto Treviño Zapata Faculty of Veterinary and Zootechnical Medicine (FMVZ). Two aeration stones were placed in each tank (Aquatic eco system, Model 2pS, USA) that were connected to an air blower (Aquatic eco-system, Model HP 4S, USA) to achieve a dissolved oxygen level of 5 ppm. Additionally, the water's level of non-ionized ammonium (NH<sub>3</sub>) was below 0.01 mg/L. The fish were fed *ad libitum* without waste twice daily (0900 and 1700 hr.) with a commercial pellet diet (Agribands Purina México S. A. C. V., Nutripec 3206 AP).

**Applying stress to the fish.** After the acclimation period, all fish were subjected to fasting for a period of 12 hours before the stress test. The

de estrés no era considerado en estos estudios. Sin embargo, al incrementarse el estrés en los organismos se observa una inmunosupresión que puede favorecer las enfermedades, mortalidad, y disminuir la producción (14, 15). Entender cómo el estrés puede afectar la fisiología de los peces es importante y representa una herramienta que apoya para el desarrollo de esta industria. El propósito del presente estudio fue evaluar el efecto del estrés agudo generado por la manipulación y captura sobre los parámetros hematológicos y bioquímicos en el bagre de canal (*I. punctatus*).

## MATERIALES Y MÉTODOS

**Animales experimentales y área de cultivo.** Se utilizaron 60 juveniles de bagre de canal (200 g de peso promedio) provenientes de la granja comercial ACUMEX S.A. de C.V., Abasolo, Tamaulipas, México. Los peces fueron divididos en dos tratamientos (Estresados o TE y No estresados o TnE) con 30 peces cada uno. Cada tratamiento fue distribuido en dos tanques cilíndricos de fibra de vidrio (192.4 L) con quince organismos cada uno. Los peces fueron aclimatados a 25°C durante tres semanas en los tanques de cultivo con agua dulce proveniente del pozo profundo de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia (FMVZ) "Dr. Norberto Treviño Zapata". En cada tanque se colocaron 2 piedras de aireación (Aquatic eco system, Modelo 2pS, EUA) conectadas a un soplador (Aquatic eco-system, Modelo HP 4S, EUA) a fin de tener un nivel de oxígeno disuelto mayor de 5 ppm. Además, el agua mantuvo un nivel de amonio no ionizado (NH<sub>3</sub>) inferior a 0.01 mg/L. Los peces fueron alimentados *ad libitum*, sin desperdicio, dos veces al día (0900 y 1700 hr) con una dieta peletizada comercial (Agribands Purina México S. A. de C. V., Nutripec 3206 AP).

**Aplicación del estrés a los peces.** Después del período de aclimatación, todos los peces fueron sometidos a inanición durante un período de 12 horas antes de comenzar la prueba de estrés. Los bagres TE fueron expuestos a estrés agudo mediante un manejo intencional excesivo que consistió en perseguir y capturar con una red a todos los peces, colocándolos en cubetas de 20 L por 5 min (16). Las cubetas contenían aireación y el mismo tipo de agua de pozo (25°C) empleada en los tanques de cultivo. Al término del período de estrés, los peces fueron reincorporados a sus tanques originales. El grupo control no fue sometido a ninguna clase de manejo con el propósito de no generar estrés y no afectar sus valores fisiológicos basales.

Toma de muestra. Para la extracción de las muestras sanguíneas, 10 peces de cada

TE catfish were exposed to acute stress through excessive intentional handling that consisted of pursuing and capturing the fish with a net and placing them in 20 L buckets for 5 min (16). The buckets were aerated and contained the same well water (25°C) that was in the culture tanks. At the end of the stress period, the fish were returned to their original tanks. To avoid stress and the resulting effects on their physiological base levels, the control group was not subjected to any kind of handling.

**Sampling.** To take the blood tests, ten fish from each treatment group (TE and TnE) were captured at 0, 6, 24 h post-stress. NETs (control) fish were anesthetized in culture tanks using 40 mg/L benzocaine for 3 to 5 min before being captured for sampling (17). Once anaesthetized and captured they were placed in a bucket with fresh well water (25°C) with continuous aeration and the same concentration of anesthetic. TE fish were caught in their culture tanks without anesthesia and treated the same way as the TnE group.

A blood sample (3 mL) of each catfish was collected by heart puncture in a Vacutainer® tube with lithium heparin. Samples were stored on ice and transported to the laboratory for clinical analysis. Each sample was divided into two parts; one of which was used for hematology, and the rest was centrifuged at 3000 rpm for 15 min at room temperature to extract plasma. The product was refrigerated (4°C) to later define blood chemistry (18).

**Hemogram.** This analysis was performed within 4 h post-sampling to avoid any disruption in blood cells (19). The hematocrit (Ht) was determined using a digital microcentrifuge (KHT-410E Kendal Import S.A.C Gemmy Taiwan); hemoglobin (Hb) using cyanmethemoglobin method and read in a spectrophotometer (Spectronic 20 Genesys, Spectronic Instruments, Rochester, NY, USA) at 546 nm (20). Erythrocyte indices: mean corpuscular volume (VCM) and mean corpuscular hemoglobin concentration (CHCM) were estimated using the formulas described by Noga (20). Total erythrocyte and leukocyte count was manually calculated using a Neubauer chamber (Superior 06-100-10 Optic Labor, Wertheim, Germany) using Natt-Herrick as diluent reagent at a dilution of 1:200 (20). The differential count was performed using blood that was labeled and stained with Wright dye. The slides were observed with an optical microscope (Carl Zeiss, Axiostar Plus, Germany) with an immersion objective (100x) following the technique suggested by Fijan (19).

tratamiento (TE y TnE) fueron capturados a las 0, 6, 24 h post-estrés. Los peces TnE (control) fueron anestesiado en sus tanques de cultivo con 40 mg/L de benzocaína durante 3-5 min, antes de ser capturados para su muestreo (17). Una vez anestesiados y capturados, estos fueron colocados en una cubeta con agua dulce de pozo (25°C), aireación continua, y la misma concentración del anestésico. Los peces del grupo TE fueron capturados sin colocar anestesia en sus tanques de cultivo y tratados de igual forma a la descrita para el grupo TnE.

Una muestra sanguínea (3 mL) de cada bagre fue colectada en un tubo Vacutainer® con heparina de litio mediante punción cardiaca. Las muestras fueron transportadas en hielo al laboratorio para su análisis clínico. La sangre de cada muestra fue dividida en dos partes, una de ellas se utilizó para realizar el hemograma, y el resto se centrifugó a 3000 rpm por 15 min a temperatura ambiente para la extracción del plasma. El producto fue almacenado en refrigeración (4°C) para definir su bioquímica sanguínea posteriormente (18).

**Hemograma.** Ese análisis se efectuó dentro de las 4 h post-muestreo para evitar cualquier tipo de alteración en las células sanguíneas (19). Se determinó el hematocrito (Ht) utilizando una microcentrífuga digital (KHT-410E Kendal Import S.A.C Gemmy Taiwan); concentración de hemoglobina (Hb) siguiendo la metodología de la cianometahemoglobina y leyendo en un espectrofotómetro (Spectronic 20 Genesys, Spectronic Instruments, Rochester, NY, USA) a 546 nm (20). Los índices eritrocíticos: volumen corpuscular medio (VCM) y concentración de hemoglobina corpuscular media (CHCM) fueron estimados aplicando las fórmulas descritas por Noga (20). El conteo total de eritrocitos y leucocitos se realizó manualmente con una cámara de Neubauer (Superior 06-100-10 Optic Labor, Wertheim, Alemania) utilizando como diluyente el reactivo de Natt-Herrick a una dilución de 1: 200 (20). El recuento diferencial leucocitario se realizó mediante extendidos sanguíneos que fueron etiquetados y teñidos con el colorante de Wright. Las laminillas fueron observadas con la ayuda de un microscopio óptico (Carl Zeiss, Axiostar Plus, Alemania) utilizando el objetivo de inmersión (100x) siguiendo la técnica sugerida por Fijan (19).

**Química sanguínea.** Para determinar la concentración de albúmina, ALT (Alanina aminotrasferasa), creatinina, glucosa, y FA (Fosfatasa alcalina) en el plasma, se utilizó un analizador de bioquímica seca (Vet Test 8008, IDEXX Laboratories Inc., Maine, USA)(21). La concentración de las proteínas plasmáticas

**Blood chemistry.** To determine the concentrations of albumin, ALT (Alanine aminotransferase), creatinine, glucose, and FA (Alkaline Phosphatase) in plasma, a dry chemistry analyzer (Vet Test 8008, IDEXX Laboratories Inc., Maine, USA) was used (21). The concentration of total plasma proteins was obtained using a refractometer (American Optical TSM, Buffalo, NY, USA) at room temperature (22).

**Statistical analysis.** The results of the hematological parameters were represented by mean and standard deviations, and were compared between treatments (TE vs TNE) and time frames (0, 6, and 24 h). The statistical evaluation of these variables was performed using Student's t-test for independent samples with a significance level of 0.05, and SAS statistical software v. 9.0 was used.

## RESULTS

Table 2 shows the blood count results of channel catfish (*I. punctatus*) under stress (TE) and the no-stress or control group (TNE). It can be noted that the hematological parameters at time 0 post-stress showed no statistically significant differences ( $p > 0.05$ ) between TE and TNE (Table 2), except for the value of monocytes and eosinophils, where group TE shows a significantly higher value ( $p < 0.05$ ). All the immune system cells evaluated have higher assessed values in the TE group than in the TnE group. Only monocytes and eosinophils have significantly higher values ( $p < 0.05$ ), as noted above.

In this study, parameters evaluated at 6 h post-stress for TE were significantly higher when compared with the parameters of TnE ( $p < 0.05$ ). Only erythrocytes, HCM and eosinophils showed higher values in TE compared with TnE, although

totales fue obtenida utilizando un refractómetro (American Optical TSM, Buffalo, N Y, Estados Unidos) a temperatura ambiente (22).

**Análisis Estadístico.** Los resultados de los parámetros hematológicos obtenidos fueron representados mediante medias y desviaciones estándar, y comparados entre tratamientos (TE vs TnE) y tiempos (0, 6, y 24 h). La evaluación estadística de estas variables se realizó mediante la prueba de t student para muestras independientes, con un nivel de significancia de 0.05, utilizando el software estadístico SAS v. 9.0

## RESULTADOS

En la tabla 2 se muestran los resultados del hemograma de los bagres de canal (*I. punctatus*) bajo condiciones de estrés (TE) y no estrés o control (TnE). Se puede observar que los parámetros hematológicos en el tiempo 0 post-estrés no se encontraron diferencias estadísticas significativas ( $p > 0.05$ ) entre TE y TnE (Tabla 2), salvo por el valor de monocitos y eosinófilos en donde los organismos del grupo TE poseen un valor significativamente superior ( $p < 0.05$ ). Todas las células del sistema inmune evaluadas poseen valores mayores en los organismos del grupo TE que en TnE, siendo sólo los monocitos y eosinófilos los que tienen valor significativamente superior ( $p < 0.05$ ), como se señaló anteriormente.

En este estudio, los parámetros evaluados a las 6 h post-estrés en TE fueron significativamente mayores en comparación con los parámetros de TnE ( $p < 0.05$ ), solamente eritrocitos, HCM y eosinófilos mostraron valores superiores en TE comparados con TnE pero sin ser significativos (Tabla 2). Posteriormente, a las 24 h post-estrés se

**Table 2.** Hematology parameters (mean±DE) of treated catfish (*Ictalurus punctatus*) (n=10).

Parameters	Time (h)					
	0 h		6 h		24 h	
	TnE	TE	TnE	TE	TnE	TE
Erythrocytes (x 10 <sup>12</sup> /L)	1.58±0.19	1.52±0.56	1.6±0.65	1.67±0.34	2.03±0.57	2.03±0.57
Hemoglobin (g/dL)	6.30±1.24	5.9±2.29	4.8±2.94	8.3±1.79*	7.7±1.23	7.7±1.23
Hematocrit (%)	19.0±3.65	18.0±6.35	14.43±8.85	25.0±5.32*	23.21±3.86	22.86±5.88
VCM (fL)	119.87±16.65	141.26±10.72	81.92±28.58	155.0±40.4*	120.87±33.91	127.02±66.96
CHCM (g/dL)	33.07±1.57	33.05±2.80	32.81±3.03	33.23±1.33	33.07±4.6	36.18±12.72
Leukocytes (x 10 <sup>9</sup> /L)	18.88±8.40	28.46±8.45	10.71±3.77	25.85±9.57*	11.09±4.36	11.09±4.36 <sub>a</sub>
Lymphocytes (x 10 <sup>9</sup> /L)	11.99±5.20	14.18±5.68	4.61±1.49	12.19±5.06*	5.31±2.66	3.95±2.27 <sub>a</sub>
Heterophils (x 10 <sup>9</sup> /L)	0.40±0.56	2.67±2.98	0.93±0.32	2.82±2.21*	0.51±0.65	0.33±0.17
Monocytes (x 10 <sup>9</sup> /L)	5.85±4.83	10.60±6.28*	4.05±1.70	8.03±4.11*	4.49±1.21	5.88±2.57
Eosinophils (x 10 <sup>9</sup> /L)	0.95±1.03	3.3±2.35*	1.16±0.51	2.94±2.39	0.60±0.47	0.92±0.52

\* = TE that were significantly different compared to TnE ( $p < 0.05$ ), a = significantly different groups ( $p < 0.05$ ) when compared according to time (0, 6, and 24 h post-stress). VCM = Mean corpuscular volume, CHCM = concentration of mean corpuscular volume.

they were insignificant (Table 2). Later, at 24 h post-stress, very similar results were observed between TE and TnE groups, showing no significant differences between them ( $p>0.05$ ).

Comparing hematologic parameters over time (0, 6, and 24 h post-stress), it can be noted that the TnE group shows no significant differences ( $p>0.05$ ) in any of its parameters (Table 2). The same applies to TE in regards to erythrocytes, hemoglobin, hematocrit, VCM and CHCM. However, immune system cells in TE show a tendency to decrease over time and have lower values at 24 h than at 0 h. Only leukocytes and lymphocytes revealed significantly lower values ( $p<0.05$ ) at 24 h compared with 0 and 6 h post-stress (Table 2). Additionally, a clear difference between immune cells values in TnE and TE at different sampling times is observed.

Table 3 shows blood biochemistry values in channel catfish (*I. punctatus*) after being stressed. The detected values show that only glucose has a significantly higher value ( $p<0.05$ ) at 6 h post-stress in TE compared to TnE. This difference is lost at 24 h. However, it can be seen that average glucose is always lower in TnE than TE (Table 3). All other values evaluated in the blood chemistry showed no significant differences between groups. Similarly, no significant differences ( $p>0.05$ ) were detected when comparing these parameters with regard to time (0, 6 and 24 h post-stress).

observaron resultados muy semejantes entre los tratamientos TE y TnE sin diferencias significativas entre ellos ( $p>0.05$ ).

Al comparar los parámetros hematológicos con respecto al tiempo (0, 6, y 24 h post-estrés) se observó que los organismos TnE no poseen diferencias significativas ( $p>0.05$ ) en ninguno de sus parámetros (Tabla 2). Lo mismo sucede para TE en los parámetros de eritrocitos, hemoglobina, hematocrito, VCM y CHCM. Sin embargo, las células del sistema inmune en TE muestran una tendencia a disminuir con respecto al tiempo poseen valores más bajos a las 24 h que a las 0 h. Sólo los leucocitos y linfocitos revelaron valores significativamente inferiores ( $p<0.05$ ) a las 24 h comparado con 0 y 6 h post-estrés (Tabla 2). También se observa una clara diferencia entre los valores de las células inmune entre TnE respecto a TE, en los diferentes tiempos de toma de muestra.

La tabla 3 muestra los valores de bioquímica sanguínea en bagre de canal (*I. punctatus*) después de ser estresados. Los valores detectados definen que solo la glucosa posee un valor significativamente superior ( $p<0.05$ ) a las 6 h post-estrés en TE comparado con TnE, esa diferencia se pierde a las 24 h. Sin embargo, se puede observar que siempre existe un promedio menor de glucosa en TnE que en TE (Tabla 3). Para el resto de los valores evaluados en la química sanguínea no se observaron diferencias significativas entre grupos. De igual forma al compararse estos parámetros con respecto al tiempo (0, 6 y 24 h post-estrés) no se detectaron diferencias significativas ( $p>0.05$ ).

**Table 3.** Blood biochemistry (mean $\pm$ DE) of treated catfish (*Ictalurus punctatus*) (n=10).

Parameters	Time (h)					
	0 h		6 h		24 h	
	TnE	TE	TnE	TE	TnE	TE
Glucose (g/dL)	56.14 $\pm$ 7.56	59.43 $\pm$ 15.85	50.57 $\pm$ 14.22	83.14 $\pm$ 21.26*	76.29 $\pm$ 18.69	76.29 $\pm$ 18.69
Plasma proteins (g/L)	3.96 $\pm$ 0.89	3.0 $\pm$ 1.28	3.17 $\pm$ 1.06	3.43 $\pm$ 1.44	4.34 $\pm$ 0.50	4.34 $\pm$ 0.54
Creatinine (mg/dL)	0.39 $\pm$ 0.32	0.53 $\pm$ 0.21	0.47 $\pm$ 0.32	0.43 $\pm$ 0.35	0.20 $\pm$ 0.17	0.20 $\pm$ 0.15
Alkaline phosphatase (U/L)	20.14 $\pm$ 11.64	16.0 $\pm$ 6.40	17.86 $\pm$ 6.89	22.71 $\pm$ 8.65	24 $\pm$ 10.15	24.12 $\pm$ 6.30
Alanine aminotransferase (U/L)	11.86 $\pm$ 3.18	12.86 $\pm$ 3.63	10.29 $\pm$ 0.76	11.29 $\pm$ 3.40	10.5 $\pm$ 2.50	10.6 $\pm$ 1.40

\*Experimental groups that were significantly different from control groups ( $p<0.05$ ).

## DISCUSSION

The results of the non-stressed group (TNE) are consistent with those previously reported (Table 1). It is interesting to note the lack of information that exists on this subject in channel catfish (*I. punctatus*), since these parameters are crucial to help predict the state of health during production. The values observed in stressed catfish (TE) are consistent with those reported in trout (*Oncorhynchus mykiss*) under acute stress where

## DISCUSIÓN

Los resultados del grupo no estresado (TnE) concuerdan con lo reportado anteriormente (Tabla 1); siendo interesante la poca información que existe sobre este tema en bagre de canal (*I. punctatus*) ya que estos son parámetros cruciales que pueden ayudar a predecir el estado de salud de los organismos durante la producción. Los valores observados en bagres estresados (TE) también concuerda con lo reportado en truchas (*Oncorhynchus mykiss*) sometidas a estrés

the blood count (erythrocytes, hemoglobin, hematocrit and VCM) was significantly higher ( $p < 0.05$ ) in TE than TnE (23-26). Pottinger et al (27) suggest that hematocrit could increase due to the action of catecholamines through smooth muscle contraction and the elastic fibers of the spleen capsule. This could generate a simultaneous increase in cell number and hemoglobin concentration, improving the  $O_2$  transport efficiency required to metabolize tissues exposed to acute stress (7,27).

The significant increase ( $p < 0.05$ ) of VCM observed at 6 h could be an early adaptation response to stress, with subsequent hemodilution caused by electrolyte loss and reduced osmolarity. However, when comparing this parameter with respect to time (0, 6 and 24 h post-stress), no significant differences ( $p > 0.05$ ) in this parameter were observed between TE and TnE. This suggests that increased hematocrit could be caused by an increase in the number of erythrocytes as a necessary response to carry more oxygen to the tissues when under conditions of acute stress, as indicated by Gómez-Manrique et al (28), who reported similar results.

Leukocytes, lymphocytes, heterophiles and monocytes significantly increased ( $p > 0.05$ ) at 6 h post-stress. Tort (29) points out that some immune system cells may increase as a precautionary measure or response to stressful stimuli. The results show that after the initial stimulus, TE fish show a decrease in the number of immune cells that can lead to further immunosuppression, as suggested (3, 4, 15, 29). How this immune system response works is still poorly understood; however, it suggests that it may be related to the release of cells from spleen, thymus and other tissues (29).

Comparing the average values of leukocytes and lymphocytes in the TE group at different time periods (0, 6, and 24 h post-stress) shows significantly lower values ( $p < 0.05$ ) at 24 h post-stress (Table 2). This is consistent with what Adeyemo et al (4) reported, who observed that African catfish (*C. gariepinus*) have lymphocytosis, eosinophilia and monocytosis when they are experimentally exposed to acute handling stress. The control group (TnE) showed no significant differences in any immune system cells at different post-stress times. It has been reported that during periods of stress the combination of cortisol and catecholamine produces an immunosuppressive effect on lymphocytes and monocytes (8). Furthermore, it has been reported that catecholamine increases heart rate and blood pressure, releasing a greater amount of white blood cells into circulation during

agudo donde el hemograma (eritrocitos, hemoglobina, hematocrito, y VCM) se encontró significativamente mayor ( $p < 0.05$ ) en TE con respecto a TnE (23-26). Pottinger et al (27) sugieren que el hematocrito pudo incrementarse por la acción de las catecolaminas a través de la contracción de la musculatura lisa y las fibras elásticas de la cápsula del bazo. Esto efecto pudo generar un aumento simultáneo en el número de células y en la concentración de hemoglobina, mejorando la eficiencia del transporte de  $O_2$  requerido para el metabolismo de los tejidos expuestos a estrés agudo (7, 27).

El aumento significativo ( $p < 0.05$ ) de VCM observado a las 6 h pudo ser una respuesta de adaptación temprana de los bagres al estrés, con hemodilución posterior provocada por la pérdida electrolítica y reducción de la osmolaridad. Sin embargo, al comparar este parámetro con respecto al tiempo (0, 6 y 24 h post-estrés) no se observaron diferencias significativas ( $p > 0.05$ ) en este parámetro al momento de comparar TE o TnE. Esto sugiere que el aumento del hematocrito pudo ser provocado por el incremento en el número de eritrocitos, como una respuesta necesaria para transportar más oxígeno a los tejidos cuando un animal se encuentra bajo condiciones de estrés agudo como lo señalado por Gómez-Manrique et al (28) quienes reportaron resultados similares.

Los leucocitos, linfocitos, heterófilos y monocitos del bagre incrementaron significativamente su nivel ( $p > 0.05$ ) a las 6 h post-estrés. Tort (29) señala que algunas células del sistema inmune pueden verse incrementadas como una medida de precaución o respuesta al estímulo estresante. Los resultados muestran que después del estímulo inicial, los peces TE muestran una disminución en el número de las células del sistema inmune que al continuar puede propiciar una inmunosupresión, como lo sugiere (3, 4, 15, 29). Como funciona esta respuesta del sistema inmune es aún poco comprendida; sin embargo, se sugiere que puede estar relacionada con la liberación de células a partir del bazo, timo y otros tejidos (29).

Los resultados observados en la tabla 2 al comparar los valores promedios de leucocitos y linfocitos del grupo TE en diferentes períodos de tiempo (0, 6, y 24 h post-estrés) muestra valores significativamente inferiores ( $p < 0.05$ ) a las 24 h post-estrés. Esto concuerda con lo reportado por Adeyemo et al (4) que señalaron que los bagres africanos (*C. gariepinus*) presentan una linfocitosis, eosinofilia y monocitosis cuando son sometidos experimentalmente a estrés agudo por manejo. El grupo control (TnE) no presentó diferencias significativas en ninguna de las células del sistema inmune de bagre de canal en los diferentes tiempos post-estrés. Se ha reportado que durante los períodos de estrés, la combinación de cortisol y catecolaminas produce un efecto inmunosupresor de linfocitos y monocitos (8). Además, se ha reportado que las

the first hours (8, 30), as observed in this work.

Blood glucose, like cortisol, is a marker of the stress response metabolic rate (14), which has the advantage of being easy to evaluate with a narrower raising point (2 times) than cortisol (100 times) (7, 16, 24, 31). In this study, TnE glucose levels had a lower average than those observed in TE in the first two evaluations. This indicator is significantly higher ( $p < 0.05$ ) at 6 h post-stress, and holds steady at 24 h post-stress in both groups (Table 2). These detected values are consistent with those reported in channel catfish (*I. punctatus*) in Table 1 and also in trout (*O. mykiss*, 25) and tilapia (*Oreochromis niloticus*, 26). However, Davis et al (14) also report an increase in blood glucose at 6 and 0 h post-stress compared to the control group and the stressed group, respectively. Hyperglycemia observed in TE could be the result of glycogenolysis and gluconeogenesis, since both catecholamines and cortisol are involved in this effect. Since this increase was only observed at 6 h post-stress, it is suggested that the change was due to the effect of catecholamines since it has been proposed that glucose production is mediated in the short term by these hormones and in the long-term by cortisol (27).

The observed results suggest that acute stress alters blood parameters, immune cells, and blood chemistry in fish. These alterations may decrease significantly as time passes and are an important component to consider during production to prevent possible problems that negatively impact the health of cultivated fish.

### Acknowledgements

To the Universidad Autónoma de Tamaulipas for their financial support (Proyecto UAT10-AGRO-0208).

catecolaminas incrementan la frecuencia cardíaca y la presión sanguínea liberando una mayor cantidad de células blancas a la circulación en las primeras horas (8, 30) como se observó en este trabajo.

La glucosa sanguínea, al igual que el cortisol, es un marcador del índice metabólico de la respuesta a estrés (14), el cual tiene la ventaja de ser fácil de evaluar y su punto de elevación es más estrecho (2 veces) que la del cortisol (100 veces) (7, 16, 24, 31). En la presente investigación, la glucosa de TnE revelaron un promedio menor que el observado en TE en las dos primeras evaluaciones; siendo este indicador significativamente mayor ( $p < 0.05$ ) a las 6 h post-estrés, y estabilizándose a las 24 h post-estrés en ambos grupos (Tabla 2). Los valores aquí detectados son consistentes con los reportados en bagre de canal (*I. punctatus*) de la tabla 1, además, de trucha (*O. mykiss*, 25) y Tilapia (*Oreochromis niloticus*, 26). Sin embargo, Davis et al (14) también reportan un aumento en la glucosa sanguínea a las 6 y 0 h post-estrés con respecto al grupo control y al grupo estresado, respectivamente. La hiperglucemia observada en TE podría ser el resultado de la glucogenólisis y gluconeogénesis, estando implicados en este efecto tanto catecolaminas como cortisol. Considerando que este aumento sólo se observó a las 6 h post-estrés, se sugiere que el cambio fue debido al efecto de las catecolaminas ya que se ha propuesto que la producción de glucosa es mediada en corto tiempo por estas hormonas y en largo plazo por el cortisol (27).

Los resultados observados sugieren que el estrés agudo altera los parámetros sanguíneos, células del sistema inmune, y parámetros bioquímicos de los peces. Estas alteraciones pueden disminuir significativamente conforme pasa el tiempo y son un componente relevante a considerar durante la producción a fin de prevenir posible problemas al disminuir el estado de salud de los peces bajo cultivo.

### Agradecimientos

A la Universidad Autónoma de Tamaulipas por el apoyo financiero otorgado (Proyecto UAT10-AGRO-0208).

## REFERENCES

1. Farmer T, Grainger R, Plummer J, editors. The state of world fisheries and aquaculture. Opportunities and challenges. Rome, FAO; 2014.
2. Sanchez-Martinez JG, Aguirre-Guzman G, Cruz-Hernandez NI, Martinez-Burnes J, Perez-Castaneda R, Rabago-Castro JL, Vazquez-Sauceda ML. First detection of channel catfish virus associated with mortality of cultured catfish (*Ictalurus punctatus*, Rafinesque) in Mexico. Aquacult Res 2007; 38(13):1428-1431.



3. Gbore FA, Oginni O, Adewole AM, Aladenton JO. The effect of transportation and handling stress on haematology and plasma biochemistry in fingerlings of *Clarias gariepinus* and *Tilapia zilli*. *World J Agr Sci* 2006; 2(2):208-212.
4. Adeyemo O, Naigaga I, Alli R. Effect of handling and transportation on heamatology of African catfish (*Clarias gariepinus*). *J Fish Sci* 2009; 3(4):333-341.
5. Davis MW. Fish strass and mortality can be predicted using relax impairment. *Fish Fish* 2010; 11:1-11.
6. Eslamloo K, Falahatkar B. Variations of some physiological and immunological parameters in siberian sturgeon (*Acipenser baerii*, Brandt, 1869) subjected to an acute stressor. *J Appl Anim Welf Sci* 2014; 17(1):29-42.
7. Pottinger TG. The stress response in fish mechanisms, effects and measurement. Branson EJ, editor. *Fish welfare*. London: Blackwell Publishing; 2008.
8. Prunet P, Sturm A, Milla S. Multiple corticosteroid receptors in Wsh: from old ideas to new concepts. *Gen Comp Endocrinol* 2006; 147(1):17-23.
9. Schreck CB. Stress and fish reproduction: the roles of allostasis and hormesis. *Gen Comp Endocrinol* 2010; 165(3):549-556.
10. Iwama GK, Pickering AD, Sumpter JP, Schreck CB. editors. *Effect of rearing condition on the health and physiological quality on fish in intensive culture. Fish stress and health in aquaculture*. New York: Cambridge University Press; 2011.
11. Tavares-Dias M, Moraes FR. Haematological and biochemical reference intervals for farmed channel catfish. *J Fish Biol* 2007; 71(2):383-388.
12. Buentello JA, Reyes-Becerril M, Romero-Geraldo MJ, Ascencio-Valle FJ. Effects of dietary arginine on hematological parameters and innate immune function of channel catfish. *J Aquat AniM Health* 2007; 19(3):195-203
13. Taveras-Dias M, Moraes FR. Hematological and biochemical reference intervals for farmed channel catfish. *J Fish Biol* 2007; 71(2):383-388.
14. Davis KB. Management of physiological stress in finfish aquaculture. *N Am J Aquacult* 2006; 68(2):116-121.
15. Bilodeau AL, Small BC, Wise DJ, Wolters WR. Pathogen levels, lysozyme, and cortisol response in channel catfish with susceptibility differences to *Edwardsiella ictaluri*. *Gen Comp Endocrinol* 2005; 142(1-2):256-62.
16. Magnadóttir B. Innate immunity of fish (overview). *Fish Shellfish Immun* 2006; 20(2):137-151.
17. Kiessling A, Johansson D, Zahl IH, Samuelsen OB. Pharmacokinetics, plasma cortisol and effectiveness of benzocaine, MS-222 and isoeugenol measured in individual dorsal aorta-cannulated Atlantic salmon (*Salmo salar*) following bath administration. *Aquaculture*. 2009; 286(3-4):301-308.
18. Minder EI, Schibli A, Mahrer D, Nesic P, Plüer K. Effects of different centrifugation conditions on clinical chemistry and immunology test results. *BMC Clin Pathol* 2011; 11(6):1-15.
19. Fijan N. Composition of main haematopoietic compartments in normal and bled channel catfish. *J Fish Biol* 2002; 60(5):1142-1154.
20. Noga EJ. *Fish diseases and diagnosis and treatment*. Wiley-Blackwell FAO. Iowa, USA. 2010.
21. Velisek J, Svobodova Z, Piackova V, Groch L, Nepejchalova L. Effects of clove oil anaesthesia on common carp (*Cyprinus carpio* L.). *Vet Med*, 2005; 50(6):269-275.
22. Riche M. Analysis of refractometry for determining total plasma protein in hybrid striped bass (*Morone chrysops* × *M. saxatilis*) at various salinities. *Aquaculture* 2007; 264(1-4):279-284.
23. Small BC, Bilodeau AL. Effects of cortisol and stress on channel catfish (*Ictalurus punctatus*) pathogen susceptibility and lysozyme activity following exposure to *Edwardsiella ictaluri*. *Gen Comp Endocrinol* 2008; 70(2):223-235
24. Iwama GK. The welfare of fish. *Dis Aquat Organ* 2007; 75(4):155-158.
25. Merkin GV, Roth B, Gjerstad C, Dahl-Paulsen E, Nortvedt R. Effect of pre-slaughter procedures on stress responses and some quality parameters. *Aquaculture* 2010; 304(1-4):231-235.
26. Welker TL, Lim C, Yildirim-Aksoy M, Klesius PH. Growth, immune function, and disease and stress resistance of juvenile Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) fed graded levels of bovine lactoferrin. *Aquaculture* 2007; 262(1):156-162.

27. Pottinger TG, Henrys PA, Williams RJ, Matthiessen P. The stress response of three-spined sticklebacks is modified in proportion to effluent exposure downstream of wastewater treatment works. *Aquat Toxicol* 2013; 126:382-92.
28. Gómez-Manrique W, Massago H, Abreu, Santos DJ, Criscuolo-Urbinati E. Respuesta del *Piaractus mesopotamicus* a estímulos de persecución e hipoxia. *Orinoquia* 2009; 13(2):93-100.
29. Tort I. Stress and immune modulation in fish. *Dev Comp Immunol* 2011; 35(12):1366-1375.
30. Caruso G, Genovese I, Maricchiolo G, Modica A. Haematological, biochemical and immunological parameters as stress indicators in *Dicentrarchus labrax* and *Sparus aurata* farmed in off-shore cages. *Aquac Int* 2005; 13(1-2):67-73.
31. Pankhurst NW. The endocrinology of stress in fish: an environmental perspective. *Gen Comp Endocr* 2011; 170(2):265-275.