



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN
MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

CUANTIFICACIÓN DE BASÓFILOS EN EL DELFÍN
NARIZ DE BOTELLA (*Tursiops truncatus*) MEDIANTE
FROTIS DE CAPA LEUCOPLAQUETARIA.

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
MÉDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

PRESENTA:

PABLO ROJO MENDOZA

ASESOR:

M. EN C. IGNACIO CARLOS RANGEL RODRÍGUEZ

CUAUTITLÁN IZCALLI, ESTADO DE MÉXICO

2016



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN
UNIDAD DE ADMINISTRACIÓN ESCOLAR
DEPARTAMENTO DE EXÁMENES PROFESIONALES**

U. N. A. M.
FACULTAD DE ESTUDIOS

ASUNTO: **VOTO APROBATORIO**

**M. en C. JORGE ALFREDO CUÉLLAR ORDAZ
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLÁN
PRESENTE**

**ATN: M. en A. ISMAEL HERNÁNDEZ MAURICIO
Jefe del Departamento de Exámenes
Profesionales de la FES Cuautitlán.**

Con base en el Reglamento General de Exámenes, y la Dirección de la Facultad, nos permitimos comunicar a usted que revisamos **La Tesis:**

Cuantificación de Basófilos en el Delfín Nariz de Botella (Tursiops truncatus) mediante frotis de Capa Leucoplaquetaria

Que presenta el pasante: **PABLO ROJO MENDOZA**

Con número de cuenta: **30724807-1** para obtener el Título de: **Médico Veterinario Zootecnista**

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el **EXAMEN PROFESIONAL** correspondiente, otorgamos nuestro **VOTO APROBATORIO**.

ATENTAMENTE

“POR MI RAZA HABLARA EL ESPÍRITU”

Cuautitlán Izcalli, Méx. a 24 de junio de 2016.

PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO

	NOMBRE	FIRMA
PRESIDENTE	M.V.Z. Rodolfo Córdova Ponce	
VOCAL	M. en C. Ignacio Carlos Rangel Rodríguez	
SECRETARIO	M.V.Z. María Guadalupe Mondragón Olvera	
1er SUPLENTE	M. en M.V.Z. Gerardo López Islas	
2do SUPLENTE	M. en C. Tiziano Santos Morín	

NOTA: Los sinodales suplentes están obligados a presentarse el día y hora del Examen Profesional (art. 127).

En caso de que algún miembro del jurado no pueda asistir al examen profesional deberá dar aviso por anticipado al departamento.
(Art 127 REP)

HHA/Vc

AGRADECIMIENTOS

La culminación de esta etapa en mi vida conlleva cuestiones remarcables las cuales involucran un espectro social, cultural, económico, intelectual y emocional, consolidando un complejo sistema de crecimiento personal y profesional, desarrollando así un parte aguas para mi actividad futura.

Ofrezco mi total agradecimiento lleno de amor, respeto y compromiso a Gloria Mendoza Fraga y Roberto Rojo Casas, mis padres. Quienes además de ofrecerme indefinidamente la libertad de tomar mis propias decisiones e ideas, me involucraron en múltiples temas relacionados con la medicina, la salud y los principios ético-morales que me acompañarán siempre en conjunto de mi carrera. Ellos apoyaron mis estudios de todas las maneras humanas posibles, siempre creyentes de un futuro con mayor tendencia al éxito y la realización humana en general.

Quiero dar las gracias al Dr. Ignacio Rangel Rodríguez por todo el apoyo que me brindó durante mis estudios, mi estancia en el hospital y mi proyecto de tesis. Por su responsabilidad, carácter, conocimiento y templanza es para mí un ejemplo a seguir sin duda alguna.

A la Dra Concepción López Romahn por permitirme la oportunidad de conocer el mundo de los mamíferos marinos, el ejercicio ético-moral del médico veterinario zootecnista y los hábitos proactivos para el desarrollo personal basados en valores, la eficiencia, la eficacia y el bien común.

Al Dr Roberto Sánchez Okrucky por darme la oportunidad y confianza de desarrollar mi proyecto de tesis bajo la supervisión de la Dra María Reneé Arreola Illescas quien a su vez agradezco todo el apoyo durante mi estancia en Dolphin Discovery.

De igual manera quiero agradecer por ofrecerme sus conocimientos, consejos, paciencia y confianza a todos mis profesores pero marcadamente a los Drs: Jorge Muñoz Muñoz, Juan Raúl Aguilar Tovar (descanse en paz), Salvador Flores Peinado, Norma Villamil González, Rocío Silva Mendoza, Tiziano Santos Morín, Rodolfo Córdova Ponce, Graciela Castañeda Aceves, Guadalupe Mondragón Olvera, Gerardo López Islas, y en especial a mis profesoras, amigas y guías la Dra Ana María Ríos Mena y la Dra Elizabeth Miranda Hernández quienes me impulsaron durante toda la carrera a ser mejor persona mediante múltiples enseñanzas, cuestionamientos, prácticas, discusiones y transducciones. ¡Nunca olvidaré lo aprendido!

DEDICATORIAS

Este proyecto lo dedico a la paciencia, la honestidad, el respeto, la justicia, la solidaridad, la dignidad, la generosidad, la humildad, la lealtad, la responsabilidad y la tolerancia.

Está claro que los principios y valores morales son parte esencial de un ser vivo consciente de la necesidad de vivir plena y colectivamente en conjunto con el resto de los organismos de este cosmos. No puedo evitar mencionar que la sociedad cada vez más presionada por ser feliz y realizarse humanamente, actúa de manera errática, impulsiva y egoísta. Esto no debe ser normal, y debemos esforzarnos por tener un panorama donde esto deje de ser común, y veamos el uno por el otro sin afán de obtener un beneficio que no sea el de la salud en general y el progreso social basado en la familia.

Los animales formamos solo una pequeña porción de los organismos vivientes de este planeta, por lo que evitar hacer uso de la diferencia evolutiva que nos es innato podría considerarse antinatural. Dedico este proyecto que simbólicamente representa el final de mis estudios de licenciatura y el inicio de mi profesión, a cada una de las oportunidades que se presentan para hacer algo a en pro de un futuro lleno de paz y armonía.

“No pueden quebrantar nuestra alma. Si logramos saber y sentir que merece la pena defender nuestra naturaleza humana, aun cuando esto no amerite resultados visibles y positivos, les habremos derrotado”.

George Orwell.

ÍNDICE

Resumen.....	1
Palabras clave.....	1
Introducción	
Hematología	
• Historia	2
• Métodos de Evaluación.....	2
Leucocitos	
• Historia.....	4
• Evaluación.....	4
Basófilos	
• Historia.....	6
• Morfología.....	6
• Producción y Cinética.....	6
• Función.....	7
• Evaluación.....	8
• Métodos de tinción.....	9
Basófilos en Delfines	
• Venopunción.....	11
• Leucocitos.....	11
• Patologías asociadas.....	12
• Intervalos de referencia.....	13
Delfines	
• Generalidades.....	14
• Biología.....	14
• Normatividad.....	15
Objetivos.....	16
Material y métodos.....	17
Resultados.....	19
Discusión.....	20
Anexos	
Figuras.....	21
Cuadros.....	29
Bibliografía.....	30

Resumen

Existen pocos estudios que ofrezcan datos leucocitarios del delfín nariz de botella (*Tursiops truncatus*) y únicamente se reportan parámetros de basófilos en ejemplares de vida silvestre. En el presente estudio se realizaron conteos leucocitarios en sangre de delfín nariz de botella bajo cuidado humano (cautiverio) mediante frotis convencional teñidos con Diff-Quik, frotis de capa leucoplaquetaria teñidos con azul de toluidina y frotis de capa leucoplaquetaria teñidos con azul alcian. Se ofrecen intervalos de referencia leucocitarios y en específico de basófilos, de ejemplares de edades juveniles hasta gerontes, ambos sexos, clínicamente sanos así como con diversos procesos patológicos multifactoriales en tratamientos médicos.

Palabras clave

Delfín Nariz de Botella, Intervalos de Referencia, Leucocitos, Basófilos, Capa Leucoplaquetaria, Diff-Quik, Azul de Toluidina, Azul Alcian.

Introducción

Hematología

Historia

La hematología que viene del griego *áima o áimatos* que significa sangre y *loguía* que significa tratado, estudio o ciencia (RAE, 2008), siendo entonces la especialidad médica que se dedica al tratamiento de los pacientes con enfermedades de la sangre, donde su campo de actuación es el diagnóstico, etiología, tratamiento, pronóstico, prevención, estudio e investigación de la sangre y los órganos hematopoyéticos como lo son la médula ósea, linfonodos y el bazo, tanto sanos como enfermos. Además de los procesos de coagulación, de ahí su gran importancia en el ámbito de la medicina (Miguel, 2009).

Desde la antigüedad la sangre se ha reconocido como un componente esencial de la vida, incluso sin conocimiento de la circulación sanguínea y demás funciones, sin embargo las antiguas religiones y civilizaciones, por ejemplo la egipcia, reconocieron al corazón como “el asiento del alma y la puerta de la póstuma vida dependiendo del pesaje del corazón en la balanza de la justicia de Osiris”. Es a través de creencias, observaciones, herbolaria, procesos físicos, químicos, y múltiples situaciones en las civilizaciones incas, hebreas, romanas y cristianas por nombrar algunas, que se fueron generando conocimientos básicos para la comprensión de la hematología (Hart, 2001).

Métodos de Evaluación

Existen diferentes métodos para determinar un diagnóstico de acuerdo a la historia de la medicina la cual se puede asociar a tres periodos (antiguo Egipto y Mesopotamia, Europa medieval, y siglo XIX). Desde mediados del siglo XVIII, la medicina de cabecera prevaleció hasta los años 1794 y 1848 que la medicina se volvió hospitalaria, y desde ese momento en adelante, la medicina de laboratorio se impuso como una guía médica. Las contribuciones del laboratorio a la medicina moderna, han sido recientemente reconocidas por los historiadores como algo más que la adición de otros recursos a la ciencia médica, si no que las consideran como la base de la medicina, donde los clínicos corroboran lo que observan en sus pacientes (Berger, 1999).

La mayoría de los ensayos actuales son realizados en muestras de sangre completa, como la cuantificación celular sanguínea, dividida en concentración leucocitaria, eritrocitaria y plaquetaria, el cálculo absoluto de la concentración leucocitaria y la estimación plaquetaria sobre frotis, análisis microscópico de neutrófilos tóxicos, linfocitos reactivos, eritrocitos policromatófilos, poiquilocitosis, microcitosis, hipocromía eritrocítica y células leucémicas, además de ensayos de tiempos coagulación sanguínea como de función plaquetaria. (Stockham, 2008)

El análisis de resultados de pruebas de laboratorio tomadas de muestras de pacientes serían muy complicados y difíciles de interpretar sin intervalos de referencia biológicos, los cuales son el resultado que esperamos encontrar en animales sanos. Estos intervalos son usados para ayudar a detectar estados patológicos. Otros términos empleados para referirse a estos intervalos de referencia son: normales, valores normales, rangos normales y rangos de referencia. La definición de la federación internacional de química clínica es: Un intervalo que incluye y separa a los dos límites de referencia, los cuales cuáles son el valor más bajo y el valor más alto derivados de la distribución de los valores en cuestión. Por lo que inicialmente en el proceso es eliminar los valores atípicos y seleccionar el 95% de muestras centrales, después se debe probar en una gráfica de distribución de Gauss para aplicar métodos paramétricos o no paramétricos (Figura 1), sin embargo estos últimos son más apropiados que los paramétricos cuando los números de referencia individuales son bajos, por lo que lo más comúnmente realizado es remover los datos percentiles del 2.5% inferiores y superiores. De esta manera, únicamente obtenemos intervalos de referencia del 95% de confiabilidad en datos de valor individual bajos o nulos (Stockham, 2008; Thrall *et al*, 2012).

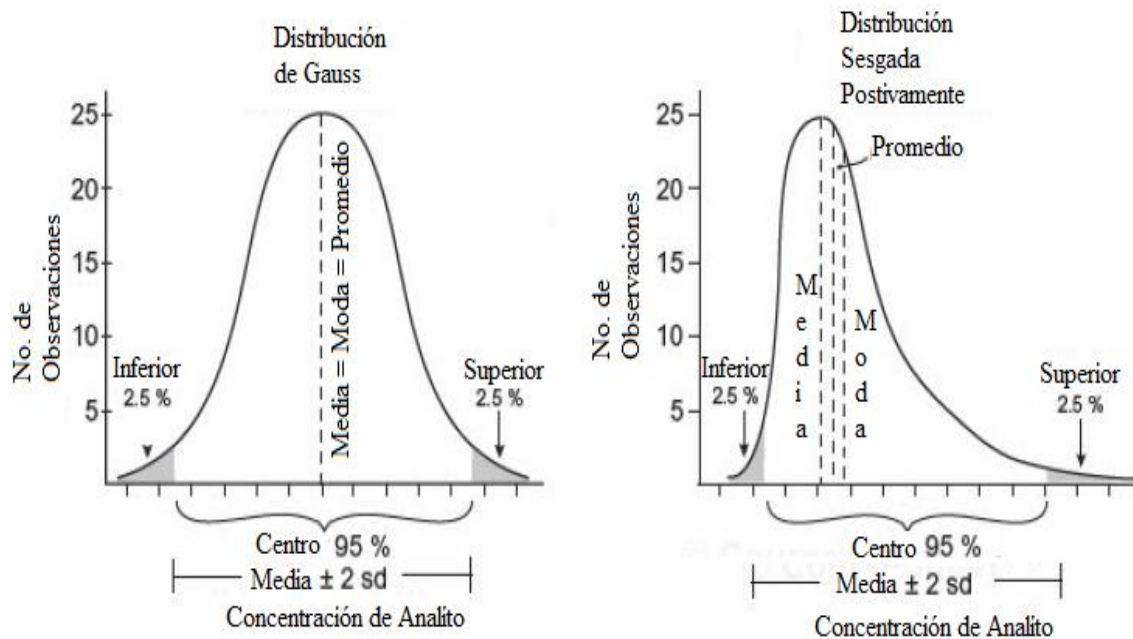


Figura 1. Distribución de Referencia.

Modificada de Stockham SL *et al*. Fundamentals of Veterinary Clinical Pathology 2008

Leucocitos

Historia

La palabra leucocito viene del griego *leukos* que significa blanco y *kytos* que significa bolsa o célula, de ahí que sean llamados glóbulos blancos (RAE, 2008). Su historia se remonta al año de 1843 cuando el profesor de medicina francés Gabriel Andral y el practicante de medicina Inglés, William Addison, reportaron simultáneamente la primera descripción leucocitaria. Ambos concluyeron que los glóbulos rojos como los blancos estaban alterados en la enfermedad. Addison también dedujo que las células del pus eran precisamente los leucocitos sanguíneos que habían logrado atravesar la barrera de vasos capilares (Hajdu, 2013).

Evaluación

La interpretación de las concentraciones leucocitarias en sangre provee una visión respecto a los posibles procesos que podrían ocurrir en el paciente. El conjunto de datos numéricos en el perfil leucocitario junto con alguna anomalía morfológica como hallazgo, es conocido como leucograma, en donde en situaciones anormales suele dirigir hacia un proceso patológico, pero no a establecer un diagnóstico específico. Es sólo con las anomalías leucocitarias en un proceso con hallazgos clínicos que se puede guiar hacia un diagnóstico. Para interpretar patrones leucocitarios en un proceso patológico, se deben primero reconocer las características normales del leucograma como base para identificar patrones anormales. Los leucocitos de mamíferos incluyen neutrófilos, linfocitos, eosinófilos, monocitos y basófilos. Los heterófilos en las aves son los equivalentes a los neutrófilos en los mamíferos. Los linfonodos, el bazo y el timo contienen precursores de linfocitos b y linfocitos t. La médula ósea contiene precursores para neutrófilos, eosinófilos, basófilos, monocitos, linfocitos y mastocitos (Figura 2). Los leucocitos en sangre realizan su tránsito correspondiente desde los sitios de producción hacia los sitios de función o destrucción. Todos los leucocitos participan en la defensa del organismo, aunque cada uno tiene funciones independientes (Duncan 1963; Stockham 2008; Weiss 2010; Thrall 2012).

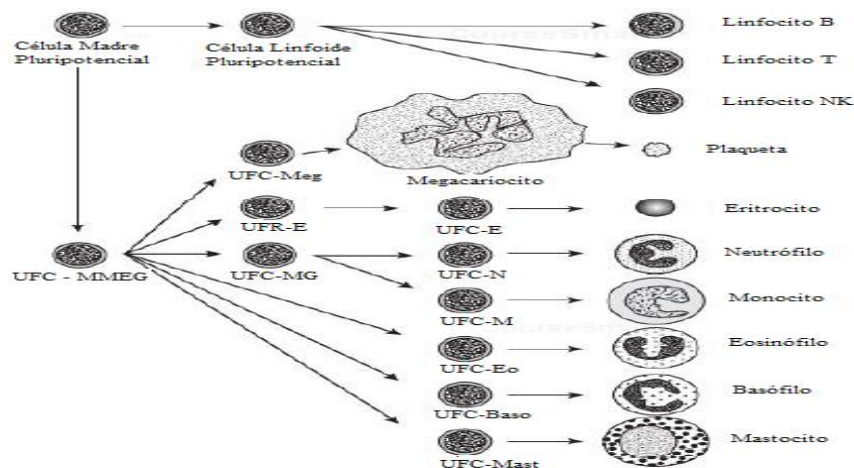


Figura 2. Diferenciación de células madre pluripotenciales de líneas celulares comprometidas con el sistema hematopoyético. Modificada de Stockham SL *et al.* Fundamentals of Veterinary Clinical Pathology 2008

La evaluación leucocitaria se realiza comúnmente de una muestra de sangre colectada en un tubo con EDTA la cual es mezclada con suavidad al momento de su obtención. Para obtener un resultado preciso y completo, la muestra debe estar libre de coágulos y cúmulos plaquetarios. Es importante considerar que la conservación de la muestra puede ser por varias horas a 25°C y por más de 24 horas a 4°C, sin embargo actualmente se prefiere solo el manejo de sangre en refrigeración como máximo por 24hr ya que después de este tiempo carece de valor el estudio. La observación microscópica de un frotis sanguíneo teñido debe ser siempre parte de un Conteo Leucocitario, incluso si existe un instrumento automatizado de conteo diferencial leucocitario. Un frotis sanguíneo es hecho para obtener una mejor distribución de células y una adecuada “ventana de conteo” (la parte del frotis donde se encuentra la monocapa de eritrocitos que ocasionalmente tienen contacto entre ellos, que es donde las características de núcleos y citoplasmas son nítidos). Ese frotis secado con aire es teñido con una tinción tipo Romanowsky como lo es Wright, Wright-Giemsa, Diff-Quik o Quik-Dip, los cuales proveen coloraciones contrastantes y distintas por células. El análisis incluye la exploración con objetivos 4x o 10x, y para una evaluación más crítica con el objetivo seco fuerte (40x) u objetivos de inmersión (40x o 100x). Por lo regular se realizan conteos de cien células para ofrecer de esta manera un porcentaje de cada leucocito observado. Ese porcentaje es dividido con la concentración leucocitaria total ofreciendo la cantidad estimada total de leucocitos por unidad de sangre. Para estimar la cantidad total de leucocitos en sangre se puede realizar mediante un hemocitómetro ((cámara de Neubauer) Figura 3), diluyendo una cantidad de sangre en una solución diluyente de eritrocitos para evitar la interferencia con células nucleadas, y posteriormente colocando la muestra sobre la cámara de Neubauer y cubriendo con un cubreobjetos, para su posterior observación en las áreas correspondientes. El total de células se multiplican por el factor de dilución (Nuñez 2007; Stockham 2008; Weiss 2010).

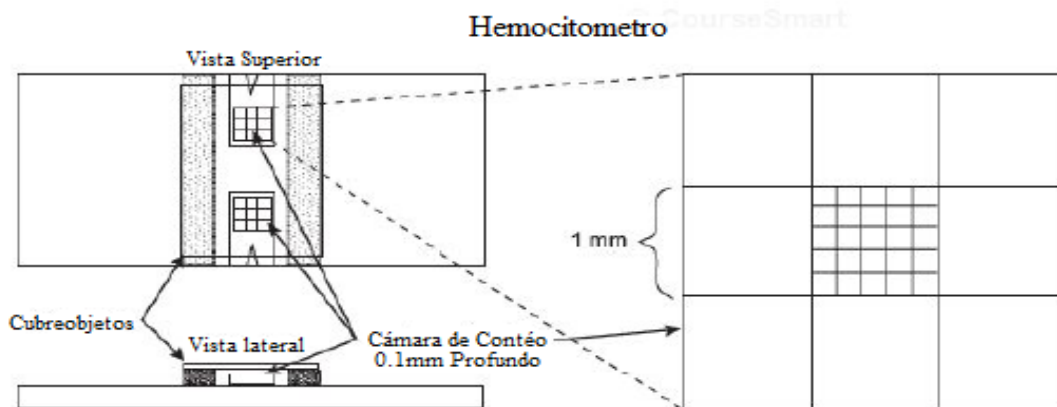


Figura 3. El Hemocitómetro tiene dos componentes: un vidrio grueso con cuadrículas especiales y un vidrio covertor. Cada cuadrícula tiene nueve cuadros de 1mm² y cada uno de estos tiene veinticinco cuadros más pequeños utilizados para contar eritrocitos y plaquetas.

Tomado de Stockham SL *et al.* Fundamentals of Veterinary Clinical Pathology 2008

Basófilos

Historia

Los granulocitos basofílicos (Usualmente llamados basófilos) son una pequeña población de leucocitos sanguíneos periféricos que contienen gránulos citoplasmáticos que se tiñen con colorantes basofílicos. Fueron descritos por primera vez en 1879 por Paul Ehrlich, quien un año antes encontró en los tejidos un tipo celular morfológicamente similar al cual denominó *mastzellen* (mastocito). Basados en su similitud con los mastocitos, los basófilos han sido considerados (también rechazados) como un menor y posiblemente redundante mastocito circulante, pues ambos poseen receptores de gran afinidad por Inmunoglobulinas E (IgE) los cuales están vinculados con los receptores unidos a los antígenos (alérgenos), resultando en la liberación de un número de mediadores en común en ambas células. En los pocos casos reportados de deficiencias basopoyéticas o de función basofílica, los pacientes no han presentado defectos concurrentes en sus mastocitos (Falcone *et al*, 2000; Weiss 2010; Blank *et al*, 2013).

Morfología

Los basófilos de mamíferos contienen de dos a tres lóbulos separados por estrechamiento o presentan un núcleo con forma de cinta. Los basófilos de reptiles y aves tienen un núcleo redondo. Los gránulos se vuelven evidentes en su etapa de desarrollo como mielocitos. Los gránulos son redondos y se tiñen metacromáticamente (morado) en la mayoría de las especies. Los basófilos felinos contienen gránulos color lavanda y forma de varilla. Los gránulos llenan el citoplasma de las células en la mayoría de las especies pero son menos numerosos en el perro. Estructuralmente, los gránulos se encuentran homogéneos y no pueden ser diferenciados de los gránulos de mastocitos en la mayoría de las especies. En algunas especies, los gránulos pueden contener figuras de mielina, áreas electrolúcidas, o cristaloides. La disolución de matriz granular puede estar acompañada de pobre fijación. Los gránulos son particularmente ricos en histamina, heparina y en algunos casos de serotonina. (Latimer, 2011) La característica metacromática de los basófilos y de las células cebadas es atribuida al contenido de sus gránulos de *glicosaminoglicano sulfatado* (*mucopolisacárido*), *heparina*, *ácido condroitín sulfato* y *dermatán sulfato*. (Núñez, 2007).

Producción y cinética

A pesar de que el fenotipo de basófilos maduros ha sido estudiado, las etapas tempranas de maduración y su relación con otras líneas celulares, no han sido bien comprendidas. Se piensa que los basófilos como los mastocitos, monocitos, eosinófilos y neutrófilos se originan de progenitores del cúmulo de diferenciación 34 (CD34) encontrados en cordón umbilical, sangre periférica y médula ósea. Los basófilos no pueden ser identificados antes de su etapa de desarrollo como mielocitos, y su maduración es paralela a de los neutrófilos. Los basófilos son escasos en la mayoría de los mamíferos pero pueden encontrarse frecuentemente en aves. La producción y liberación de basófilos requiere aproximadamente dos días y medio, el almacenamiento de estas células en médula ósea es mínimo. La Interleucina 3 (IL-3) es la citosina que mayormente gobierna el crecimiento y diferenciación de los basófilos. El factor de estimulación de colonias granulocíticas macrófagas (GM-CSF) y la Interleucina 5 (IL-5) juegan un papel menor en el desarrollo de basófilos. No obstante, se ha documentado que los progenitores de los mastocitos

pertencen a una línea distinta a neutrófilos, eosinófilos y monocitos, pues recientemente se describió un nuevo anticuerpo monoclonal (97A6) como específico de mastocitos y basófilos, por lo que el concepto actualmente predominante de líneas de desarrollo separadas entre basófilos y mastocitos debe ser revisada (Falcone 2000; Weiss 2010; Blank 2013).

Los basófilos no han sido investigados tan extensivamente como otras células debido a que son escasos en la sangre periférica y en la médula ósea, consecuentemente, poco se conoce de su producción, función y respuesta en las enfermedades. Su producción es antígeno-específica y está regulada por sustancias producidas por los linfocitos “T” activados, y a pesar de que la IL-3 parece ser el principal factor promotor de diferenciación y maduración de los precursores de los basófilos, no es absolutamente requerida para la producción de basófilos maduros en condiciones estables tras la evidencia de ratones deficientes en IL-3, sin embargo es necesaria para la producción acelerada generando basofilia en la respuesta a parásitos (Lantz, 1998).

Función

La función más importante de los basófilos es iniciar una reacción de hipersensibilidad inmediata. Un incremento de los valores absolutos de los basófilos, con relación a los valores de referencia de las diferentes especies, se califica como una basofilia (Núñez, 2007). Funciones específicas de los basófilos incluyen las siguientes: Participación inmediata y retardada en reacciones de hipersensibilidad a través de la liberación de mediadores como la histamina en reacciones alérgicas, promoción del metabolismo lipídico por activación de la lipoproteína lipasa, promueve la hemostasis mediante la actividad de la calicreína y previene la liberación de heparina, rechazo de parásitos como filarias, y posible citotoxicidad de células tumorales. El número de basófilos puede incrementar en ciertos trastornos mieloproliferativos. Se sabe que los mastocitos y la IgE participan en la reacción anafiláctica y que el aumento de la permeabilidad vascular causada por la histamina, entre otros mediadores, ocasiona el *shock* anafiláctico. Sin embargo, se observó que puede haber anafilaxia sistémica en modelos de ratones deficientes en mastocitos o IgE, lo cual sugiere la existencia de un mecanismo alternativo. La IgG especialmente la subclase IgG1 y los macrófagos podrían estar involucrados en las reacciones anafilácticas. Los basófilos son las células más importantes en la anafilaxia sistémica mediada por la IgG, pero no en la mediada por la IgE. Se observó que los basófilos de la sangre periférica capturan los complejos inmunes formados por los alérgenos y la IgG, los cuales se activan y liberan el factor activador de plaquetario, el cual aumenta la permeabilidad vascular con una eficacia mucho mayor que la de la histamina. (Latimer, 2011).

Los datos de un estudio reciente sugieren que los basófilos incrementan las respuestas de memoria de anticuerpos mediante la producción de IL-4 e IL-6 cuando son estimuladas por un segundo contacto con el alérgeno que ocasionó la producción de la IgE específica en la respuesta inmune primaria (Karasuyama *et al* 2009).

De igual manera se ha observado que las moléculas CD200 y el receptor CD200R juegan un papel importante en la regulación del sistema inmune. Múltiples virus como el herpesvirus humano 6 (HHV-6), HHV-7 y HHV-8, poseen un homólogo de CD200, sugiriendo que estos virus regulan la respuesta inmunitaria vía CD200R, la cual se observó

expresada predominantemente en los basófilos en cantidades mucho mayores que cualquier leucocito de sangre periférica, por lo que los homólogos virales de CD200 sugieren una relación potencial única entre la función de basófilos y una infección viral (Ikuo *et al* 2013).

Evaluación

El basófilo es el granulocito menos numeroso en la sangre de mamíferos domésticos, constituyendo cerca del 0.5% de los leucocitos sanguíneos en la salud, y su proceso de maduración toma cerca de 2-3 días en la médula ósea. Una vez en la sangre periférica, circulan brevemente (su tiempo promedio es de aproximadamente seis horas) pero pueden vivir hasta un máximo de dos semanas en el tejido, manteniendo su peculiar morfología pero no siendo rutinariamente identificados en secciones de tejido con tinciones de hematoxilina y eosina (Weiss, 2010).

En conteos diferenciales leucocitarios, los basófilos están presentes usualmente en pequeñas cantidades. Conteos diferenciales leucocitarios manuales ofrecen resultados válidos sólo si el número de basófilos es sustancialmente elevados (2% o más de la población leucocitaria), conteos diferenciales leucocitarios automatizados pueden producir conteos de basófilos muy precisos (Latimer, 2011).

Existe una relación inversa entre el número de basófilos circulantes y mastocitos en tejido. Los basófilos son raros en sangre de mamíferos que presentan un tejido rico en mastocitos, como existen mayor cantidad de basófilos en sangre de ave cuando existen pocos mastocitos en tejido. La basofilia en frotis de sangre de mamíferos es raramente aparente, sólo observando unas cuantas de estas células es que se atrae la atención. Se presenta cuando estas células exceden los 200 a 300/ μ L. Algunas causas de basofilia son: Parasitarias (*Dirofilaria immitis*, hepatozoonosis, ancylostomiasis, esquistosomas, garrapatas, infestación de ácaros en sacos aéreos), alérgicas (dermatitis, neumonía, granulomas eosinofílicos, gastroenteritis), reacciones farmacológicas (heparina y penicilinas) estrés crónico y enfermedades neoplásicas (mastocitoma), endocrinopatías, además de leucemia basofílica. La basofilia en ausencia de eosinofilia es rara pero puede llegar a ser observada ocasionalmente en frotis sanguíneos de equino.

La basopenia es difícil de apreciar clínicamente, pero se puede lograr mediante tinciones específicas, diluyentes y hemocitómetros para realizar un conteo absoluto de basófilos. (Nuñez 2007; Latimer 2011).

Intervalos de Referencia para conteos absolutos leucocitarios en especies animales domésticas comunes. ($10^9/L$)

Modificado de Thrall Veterinary Hematology and Clinical Chemistry 2012

Parámetro	Perro	Gato	Caballo	Bovino	Ovino	Cerdo
Leucocitos	6.0 – 17.0	5.5 – 19.5	5.5 – 12.5	4.0 – 12.0	4.0 – 12.0	11.0 – 12.0
Neutrófilos	3.0 – 11.5	2.5 – 12.5	2.7 – 6.7	0.6 – 4.0	0.7 – 6.0	3.2 – 10.0
Linfocitos	1.0 – 5.0	1.5 – 7.0	1.5 – 5.5	2.5 – 7.0	2.0 – 9.0	4.5 – 13.0
Monocitos	0 – 1.2	0 – 0.8	0 – 0.8	0 – 0.8	0 – 0.8	0.2 – 2.0
Eosinófilos	0.1 – 1.2	0 – 1.5	0 – 0.9	0 – 2.4	0 – 1.0	0.1 – 2.0
Basófilos	0 – 0.1	0 – 0.1	0 – 0.2	0 – 0.2	0 – 0.3	0 – 0.4

Métodos de Tinción

Los basófilos estimulados antigénicamente sintetizan importantes elementos como el factor de activación plaquetario, sustancias de reacción lenta anafiláctica (leucotrienos C4, D4 y E4) y tromboxano A2, además los basófilos y mastocitos muestran algunas diferencias en las reacciones citoquímicas de sus gránulos, como la tinción metacromática con ácido, pero no con azul de toluidina neutral de los gránulos de los basófilos a diferencia de los gránulos de mastocitos los cuales se tiñen con ácido y azul de toluidina neutro (Jain, 1993, Bressler *et al.* 1990, Williams *et al.* 1990).

De acuerdo con Elbert Gaffney (Prophet *et al.* 1992) los tejidos ricos en carbohidratos son: Glucógeno (hígado, músculo esquelético y cardiaco), sialomucinas (glándulas salivales, células caliciformes intestinales, células de recubrimiento gástrico), mucosubstancia neutral (células de recubrimiento gástrico, glándulas duodenales de Brunner), mucosubstancia ácida (células caliciformes intestinales), ácido hialurónico (cordón umbilical, tejido conectivo de la dermis), condroitín sulfato (cartílago, aorta, válvulas cardiacas, cordón umbilical, dermis) y sulfato de heparina (mastocitos, basófilos, aorta, tejido conectivo cardiaco), y sugiere el uso de la tinción de azul alcian en pH 2.5 para teñir mucosubstancias sulfatadas débilmente ácidas, ácido hialurónico y sialomucinas, azul alcian en pH 1.0 para teñir mucosubstancias sulfatadas, y azul alcian en pH 0.4 para teñir mucosubstancias sulfatadas muy ácidas.

Métodos para conteo directo de basófilos en suspensión usando hemocitómetros y tinciones específicas como el azul de toluidina y el rojo neutro han sido descritos y tienen la ventaja de una incrementada precisión estadística, al ser examinadas en muchos miles de células. De cualquier manera, estos métodos se vuelven tediosos a partir de la gran magnificación microscópica requerida para distinguir los gránulos teñidos de los basófilos (400x), de los nucleares parcialmente teñidos con azul de toluidina y de los eosinófilos teñidos con rojo neutro (Moore 1965; Shelley 1965; Cooper 1966).

Es así como al investigar los valores en los conteos de basófilos en el diagnóstico y el monitoreo de estados patológicos asociados con basofilia o basopenia, es desarrollado un método empleando el tinte azul de alcian en un pH bajo. El surgimiento del contraste entre los basófilos teñidos y los leucocitos sin teñir en este método ha sido aprovechado para el desarrollo y diseño de sistemas automáticos de uso continuo en líneas de muestras y reconocimiento eléctrico-óptico para tinción de basófilos, representando una evaluación del conteo por la cámara azul de toluidina (CAT), cámara azul alcian (CAA) y un conteo automático de basófilos que emplean el procedimiento de la tinción de azul alcian (CIAA) (Gilbert, 1966).

Las dificultades en obtener conteos precisos y reproducibles en basófilos circulantes con las técnicas existentes han obstaculizado la investigación de ésta poco frecuente población celular. Por lo tanto, la tinción de basófilos describe el uso de tinte azul alcian para la coloración de heparina dentro de los basófilos en un pH bajo. El reconocimiento de basófilos está facilitado por la reducción de tintes nucleares no específicos y este objetivo es alcanzado por la reducción del pH después de la coloración aunque se favorece la solubilización de proteínas plasmáticas leucocitarias, proveyendo gran contraste entre las células teñidas y las que no, reduciendo la dispersión lumínica de los leucocitos. La mejorada precisión, reproducibilidad y conveniencia de este método en comparación con los métodos existentes debería facilitar la recolección de mayor información significativa acerca de los niveles circulantes de basófilos en la salud y la enfermedad (Gilbert, 1975).

Es necesario mencionar la existencia de estudios en donde se ha hecho uso de técnicas en microscopía electrónica con el fin de clasificar los componentes basofílicos observados en las estructuras menos definidas dentro del citoplasma celular. Algunos autores han elegido referirse a ello como material o sustancia basofílica más que un componente ya que reconocen su indefinida y variable naturaleza. En algunas células fijadas y teñidas correctamente, aparecen como filamentos o tiras, mientras que en otras como gránulos o esferas y en algunos casos es difícil o imposible identificarlos del todo. La obvia deducción para hacer por medio de la imagen por microscopía de luz es que estas diversas apariencias reflejan diferentes organizaciones u ordenamiento de las extremadamente pequeñas unidades sub-microscópicas. Observando esto se vuelve uno de los componentes celulares más interesantes para ser explorados por la microscopía electrónica especialmente desde que la mayoría de la funcionalidad natural significativa ha sido asociada a ella (Porter, 1954).

Basófilos en Delfines

Veno-punción

Los sitios más comunes de veno-punción en cetáceos son el cúmulo vascular caudal del pedúnculo, las aletas pectorales y la aleta dorsal, además de las venas superficiales de la aleta caudal, la cual es la más empleada (Figura 4). Se utiliza una aguja tipo mariposa de una pulgada de largo calibre 18 o 22 (Dierauf, 2001).

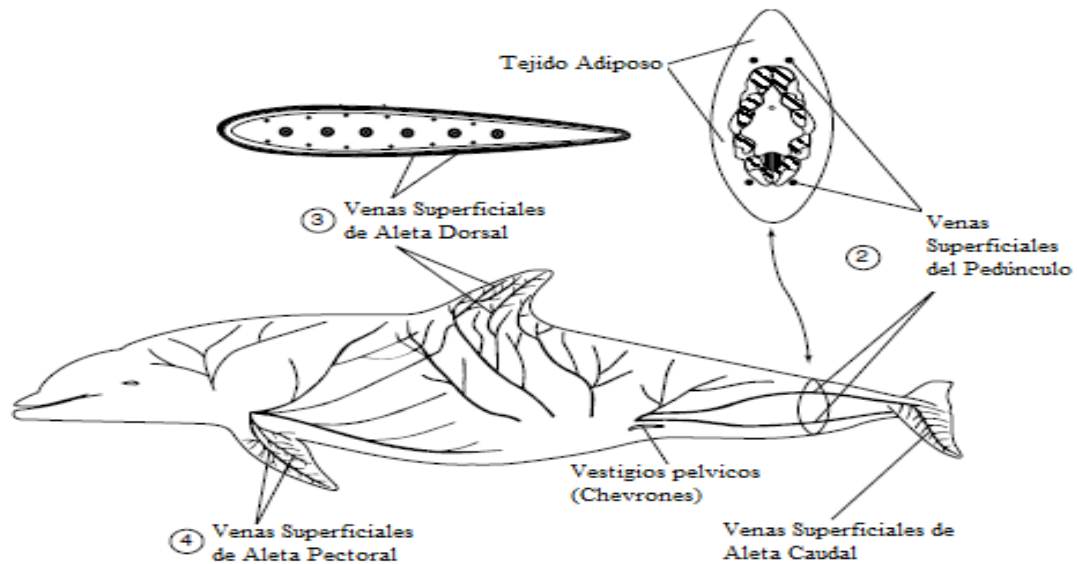


Figura 4. Venas usadas para la colección de sangre en Delfin Nariz de Botella.
Tomado de Dierauf CRC Handbook of Marine Mammal Medicine 2001

Leucocitos

Los leucocitos o células blancas sanguíneas en mamíferos marinos se clasifican de igual manera que el resto de los mamíferos, como leucocitos mononucleares y polimorfos nucleares, siendo estos últimos conocidos como granulocitos, por su marcada presencia de gránulos citoplasmáticos, los cuales representan lisosomas conteniendo enzimas hidrolíticas entre otros compuestos antibacteriales. Los granulocitos en mamíferos marinos incluyen a los neutrófilos, eosinófilos y basófilos, constituyendo el componente celular del sistema de inmunidad innata inespecífica, sin embargo técnicas citoquímicas tradicionales han demostrado que la morfología leucocitaria y las cantidades relativas en células de cetáceos y sirénidos sanos son similares a los mamíferos terrestres con algunas notables excepciones (Bossart, 1995).

En los mamíferos marinos, los granulocitos basófilos son raros. En un estudio con 180 delfines nariz de botella y 56 manatíes, nunca se observaron basófilos (Bossart, 1995). De igual manera en un estudio con 90 cetáceos, se evaluaron parámetros médicos, inmunológicos, biológicos moleculares, fisiológicos, etológicos y clínicos, éstos últimos mostrando resultados con ausencia de basófilos (Barbara, 2001).

En mamíferos marinos, la dinámica leucocitaria en varios estados patológicos siguen con un patrón típico de mamíferos terrestres, con algunas excepciones específicas por especie. En un estudio con delfines nariz de botella (*Tursiops truncatus*) con un mal agudo causado por una infección bacteriana, presentaron leucocitosis de dos a tres veces más alto que el rango de referencia. Esta leucocitosis involucró una neutrofilia madura absoluta con eosinofilia, sin la presencia de neutrófilos banda. Estos delfines demostraron una aparente respuesta inmunológica innata adecuada a infecciones bacterianas.

Patologías asociadas

La Neumonía es una de las más comunes causas de morbilidad en el delfín nariz de botella (*Tursiops truncatus*). Para entender mejor las asociaciones de la neumonía con demografía, microbiología, patología e histopatología, se realizó un estudio con 42 delfines propiedad del programa de mamíferos marinos de la naval de Estados Unidos de América. El 50% de los delfines fueron confirmados histopatológicamente con neumonía, de las cuales el 42.9% fueron de origen bacteriano y el 28.6% de origen micótico. El *Staphylococcus aureus* fue el patógeno con mayor incidencia, aunque también se detectaron como causa de neumonía a *Cryptococcus neoformans*, *Erysipelothrix rhusiopathiae*, *Histoplasma capsulatum*, virus de parainfluenza, especies de *Proteus*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Streptococcus zooepidemicus*. La edad o el sexo no fueron predictores del proceso respiratorio. Áreas que garantizan mayor investigación incluyen la neumonía eosinofílica, infecciones crónicas, y enfermedades metabólicas o de almacenamiento de hierro (Watson *et al* 2012).

Los cetáceos son bien conocidos por ser anfitriones parasitarios de los nematodos del género *Anisakis*, los cuales son de riesgo para humanos, causando potencialmente infecciones gastrointestinales o reacciones alérgicas tras el consumo de pescado infectado. Estos parásitos se asocian a úlceras de la mucosa gástrica del primer estomago del delfín, mientras que en el resto de los órganos no se han aislado estos parásitos. Se presentó el caso de dos cetáceos con una marcada infección gástrica de *Anisakis simplex*, así como dermatitis crónica ulcerativa y granulomatosa con nematodos dentro de las lesiones, rodeados de hiperplasia epitelial, siendo ésta el primer reporte de infección por *Anisakis* spp en la piel de mamíferos marinos (Beurden *et al* 2015).

Intervalos de Referencia

Cuando se utilizan intervalos de referencia o rangos publicados, el clínico debe asumir diversos supuestos sobre la salud de los individuos en las bases de datos. La mayoría de los autores definen a los individuos “clínicamente normales” evaluando la masa corporal, la condición, el comportamiento, si no están gestantes y si llevan fuera de medicación al menos dos semanas. Pero incluso con estos parámetros, algunos resultados, algunos datos caen fuera del rango, en especial los conjuntos de datos pequeños. Utilizando métodos estadísticos estándar la mayoría de estos datos atípicos son removidos, sin embargo, algunos rangos continúan apareciendo más de lo esperado. Por lo tanto es responsabilidad del clínico el determinar la relevancia de un valor cuando cae en un rango alto o bajo (Weiss, 2010).

A continuación se presenta una tabla de intervalos de referencia leucocitarios de diversos autores:

Intervalos de Referencia Leucocitarios del Delfín Nariz de botella (*Tursiops truncatus*).

Parámetro (x10 ⁹ /L)	Leslie 2001 Ca utiverio	Leslie 2001 Silve stres	Schalms 2010 C autiverio	Schalms 2010 Sil vestres	Sánchez 2015 Caut iverio	Peinado 1992 Ca utiverio
Leucocitos	5.0 - 9.0	5.60 - 12.40	4.48 - 9.08	5.90 - 13.70	4.10 - 10.80	3.00 - 8.40
Neutrófilos	3.23 - 4.85	2.54 - 6.14	2.46 - 5.98	2.45 - 6.85	4.90 - 7.70	5.50 - 7.14
Linfocitos	0.84 - 1.66	0.52 - 2.42	0.42 - 2.50	0.31 - 3.81	1.50 - 2.80	1.09 - 2.71
Eosinófilos	0.53 - 1.02	0.74 - 4.53	0.13 - 1.51	1.07 - 5.34	0.70 - 3.70	0.97 - 1.99
Monocitos	0.14 - 0.35	0.08 - 0.61	0.11 - 0.43	0.08 - 0.64	0.0 - 0.80	0.0 - 0.16
Basófilos	0	0 - 0.03	0	0 - 0.05	0	0

Sin embargo en delfines nariz de botella (*Tursiops truncatus*) en cautiverio, los autores no ofrecen un intervalo de referencia de basófilos (Peinado *et al* 1992; Dierauf, 2001; Weiss, 2010; Sánchez, 2015).

Delfines

Generalidades

La palabra delfín viene del griego *delphis* a través del latín *delphinus*, que significa vientre, y de acuerdo a Pierre Chantraine, considerado el mejor etimologista del griego, la palabra *delphis* o *delphys*, no significa exactamente vientre, si no matriz de una hembra y también cría, aplicado especialmente a los cerditos, por lo que según el lingüista francés, significaría en origen cría o pequeño cerdito del mar (Poultney, 1981).

Es importante reconocer que los mamíferos marinos no son un grupo biológico natural. Muchas personas no perciben esto, pero el término “mamífero marino” es algo así como una frase utilizada para esos grupos de mamíferos que regresaron a la vida en el mar. El criterio más importante es que deben obtener la mayor o la totalidad de su alimento del ambiente acuático. No es esencial que en realidad ellos vivan en el mar, de hecho, muchas especies de mamíferos marinos nunca se encuentran en aguas marinas, viviendo en varios estuarios, lagos y ríos, pues se piensa que todos ellos vienen de ancestros marinos.

Los ancestros terrestres de los cetáceos fueron considerados previamente como un grupo de animales ungulados parecidos al lobo llamados *Mesonychia condylarthra*. Sin embargo, evidencia molecular y fósil reciente sugiere que los cetáceos están más emparentados con los artiodáctilos como los rumiantes, los camellos y los hipopótamos, en particular estos últimos han demostrado molecularmente ser los mamíferos modernos más cercanos a las ballenas por lo que se ha generado controversia con el *Mesonychia*, aunque de igual manera se cree que estos pueden ser artiodáctilos primitivos, lo cual haría los hechos un poco más lineales (Jefferson, 1997)

Biología

Los delfines nariz de botella mundialmente conocidos por su nombre científico *Tursiops truncatus* pertenecen al orden de los cetáceos, suborden odontocetos, familia *delfinidae*. Sin embargo, en los últimos años el género ha sido dividido en dos especies, *T. truncatus* y *T. aduncus* (el más pequeño delfín nariz de botella del indo-pacífico) (Figura 5).

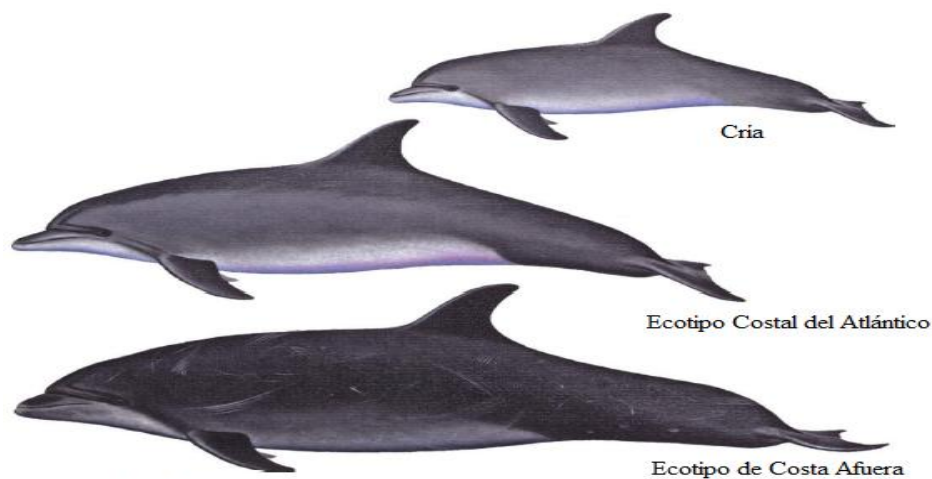


Figura 5. Delfín Nariz de Botella (*Tursiops truncatus*)
Tomada de Marine Mammals Of The World – A Comprehensive Guide To Their
Identification 1997.

Tal vez otras especies de delfines nariz de botella han sido descritas pero la mayoría de ellas son sinónimos de *T. truncatus*. La taxonomía es aún confusa, sin embargo, de acuerdo a la gran extensión de variación geográfica, es muy posible que más especies sean reconocidas en el futuro. Por el momento, más y más evidencias sugieren que los delfines nariz de botella costeros en algunas áreas del Atlántico, pertenezcan a diferentes especies de aquellas fuera de las aguas litorales. Los híbridos con otras especies delfinideas son conocidas en cautiverio o en la naturaleza (Jefferson *et al* 1997; Medina, 1997).

Su distribución es sumamente amplia, puesto que se encuentran en costas y plataformas continentales tropicales y regiones templadas de todo el mundo. De igual manera se pueden encontrar en aguas muy profundas de regiones oceánicas como la tropical sudeste del pacífico. Sus poblaciones parecen ser mayores en áreas cercanas a las costas exceptuando las del Reino Unido, el norte Europeo y el sur de Nueva Zelanda (Jefferson *et al* 1997). En México se han realizado diversos estudios ambientales relacionados directa e indirectamente con los hábitats de los delfines nariz de botella en donde se ha observado que prefieren fondos arenosos sobre otro tipo de fondos y profundidades de 30 metros aproximadamente, entre otros datos como la cantidad de clorofila, pH, estado del mar, conductividad eléctrica, salinidad y temperatura superficial del mar (Vázquez *et al* 2007).

Los grupos sociales de toninas son de aproximadamente 20 individuos aunque se han logrado observar grupos de más de cien individuos en las aguas profundas oceánicas, y se estima que su población mundial sea de 600,000 animales, aparentemente distribuidos en relación con la temperatura lo cual es directa o indirectamente vinculado con la distribución de sus presas (Jefferson *et al* 1997; Perrin *et al* 2007)

Los delfines actualmente son considerados como “centinelas” de acuerdo a la definición de la national research council, en donde los datos obtenidos de un animal expuesto a contaminantes en el ambiente son regular y sistemáticamente colectados y analizados para identificar riesgos de salud potencial para otros animales o humanos (CDC, 1988).

Normatividad

En cuanto a la situación legal actual en México existen normas que regulan las situaciones relacionadas a los mamíferos marinos como la NOM-135-SEMARNAT-2004 que tiene por objeto establecer las especificaciones técnicas para regular la captura para investigación, transporte, exhibición, manejo y manutención de mamíferos marinos en cautiverio, todo esto con una observación general y obligatoria para toda persona física o moral que realice actividades de importación, exportación y reexportación temporal o definitiva. De igual manera la NOM-059-SEMARNAT-2010 tiene como objeto la protección ambiental y de especies nativas de México de flora y fauna silvestres creando las categorías de riesgo y especificaciones para su inclusión, exclusión o cambio en las listas de especies en riesgo, la NOM-126-SEMARNAT-2000 que establece las especificaciones para la realización de actividades de colecta científica de material biológico de especies de flora y fauna silvestres y otros recursos biológicos en el territorio nacional, y la NOM-001-SEMARNAT-1996 que establece los límites máximos permisibles de contaminantes en las descargas de aguas residuales y bienes nacionales.

OBJETIVOS

Objetivo General.

- Cuantificar la presencia de basófilos en el delfín nariz de botella *Tursiops truncatus* bajo cuidado humano mediante frotis de capa leucoplaquetaria.

Objetivos particulares.

- Ofrecer intervalos de referencia leucocitarios en *Tursiops truncatus* bajo cuidado humano.
- Comparar la efectividad de las tinciones de basófilos con azul alcian, azul de toluidina y diff-quick.
- Aportar elementos de investigación sobre la biología de los mamíferos marinos.

MATERIAL Y MÉTODOS.

- Durante una estancia de dos meses en la empresa Dolphin Discovery, se realizó el procesamiento de 45 muestras sanguíneas pertenecientes a 43 delfines nariz de botella (*Tursiops truncatus*) de acuerdo a los programas de evaluación clínica de la empresa, incluyendo ejemplares juveniles a gerontes con edades que fluctúan de 1 año a 32 años de vida, 24 machos y 19 hembras, tanto clínicamente sanos o con diversos procesos patológicos multifactoriales en tratamientos médicos, ubicados de la siguiente manera: 9 en la locación “Puerto Aventuras”, 2 en la locación “Akumal”, 7 en la locación “Maroma”, 4 en la locación “Dreams”, 8 en la locación “Isla Mujeres”, 9 en la locación Cozumel y 4 en la locación “Mahahual”.
- La sangre se colectó mediante punción de la vena superficial de la aleta caudal y se colectó en tubos de 5ml conteniendo 0.05ml de EDTA al 15%. El tiempo desde que se obtuvo la muestra al proceso de la muestra fue variado pero abarcó entre 30 minutos a 18 horas dada la distancia entre el lugar de toma de muestra y el laboratorio de procesamiento.
- Se realizó un conteo leucocitario y eritrocítico total haciendo uso de solución de türk y hayem correspondientemente, pipetas automáticas, cámara de Neubauer y microscopio óptico. También se realizó un conteo diferencial leucocitario de 1000 células en un frotis convencional con tinción rutinaria (diff-quick) cada muestra fijada en metanol previamente, realizando la observación en sentido de greca utilizando objetivos 10x, 40x, y 100x con aceite de inmersión, contando los resultados a través de un contador manual, tomando fotografías de los hallazgos más representativos.
- Se colocó sangre proveniente de los tubos con EDTA en dos capilares para microhematocrito sin anticoagulante y se sometieron a centrifugación por 35 minutos a 3000 rpm. Posteriormente se fraccionaron los capilares en la porción globular próxima inmediata a la capa leucoplaquetaria para así colocar las muestra requeridas, y por técnica de barrido clásico en cada portaobjetos formar los frotis de capa leucoplaquetaria los cuales se fijaron con metanol.
- Se realizó la estandarización del colorante azul de toluidina agregando 1gr del mismo por cada 100ml de agua bidestilada, utilizando a manera de ensayo muestras frotis de capa leucoplaquetaria de sangre equina, canina e improntas de punción por aspiración con aguja fina de mastocitomas caninos fijados con etanol, probando tiempos de coloración y eliminación del colorante excedente mediante alcohol etílico al 96%, alcohol etílico absoluto y xilol, posteriormente se montaron con resina y un cubreobjetos estándar. Los tiempos utilizados para la coloración de las muestras fueron de 10 segundos por la solución de azul de toluidina, enjuague en agua potable por 60 segundos y 15 segundos en alcohol 96°, alcohol absoluto y xilol. Se dejaron secar las muestras por 12hrs previo análisis al microscopio.

- Para la coloración de azul alcian, se sumergieron las muestras previamente fijadas en metanol dentro de un contenedor con ácido acético al 3% durante 2 minutos para posteriormente sumergirlas durante 15 minutos sobre la solución colorante la cual contenía 1gr de polvo azul alcian y 100ml de ácido acético al 3%. Se secaron y se montaron mediante la aplicación de resina y un cubreobjetos estándar para dejarse secar por 12hrs para su observación microscópica.
- La evaluación microscópica se realiza mediante la observación en sentido de greca, utilizando objetivos 10x, 40x, y 100x con aceite de inmersión, contando los resultados a través de un contador manual, tomando fotografías de los hallazgos más representativos.
- Los resultados obtenidos se analizaron mediante estadística descriptiva utilizando el promedio y desviación estándar de cada parámetro cuantificado con el fin de no solamente conocer la medida de tendencia central (media) si no también comprender su comportamiento y poder interpretar datos normales y atípicos. Con el objetivo de obtener intervalos de referencia biológicos aceptables dentro de un nivel de confianza del 95% de cada conjunto de datos (parámetros leucocitarios) ordenados de menor a mayor se aplicó la fórmula estadística no paramétrica (Thrall 2012) siguiente:

Máximo del valor mínimo = $0.025 * N+1$

Mínimo del valor máximo = $0.975 * N+1$

De esta manera se selecciona el dato mínimo aceptable y el dato máximo aceptable de cada parámetro medido.

Resultados

En los cuadros anexos se presentan los intervalos leucocitarios de delfín nariz de botella (*Tursiops truncatus*) bajo cuidado humano. En el cuadro 1 se presentan los intervalos de referencia leucocitarios obtenidos mediante frotis normal teñido con Diff-Quik, y en el cuadro 2 los intervalos de referencia leucocitarios obtenidos mediante frotis de capa leucoplaquetaria teñidos con Azul de Toluidina. En ambos cuadros se presentan de igual manera los promedios y desviaciones estándar correspondientes.

Durante la cuantificación diferencial leucocitaria de frotis convencionales teñidos con DiffQuick, se observaron 15 células con características de basófilos (Fig.1, 2, y 4) y diferentes tipos de leucocitos (Fig. 3, 5, 6 y7). Se obtuvieron como intervalos de referencia de 0 a 0.02 por ciento de basófilos con un promedio de 0.033 con una desviación estándar de 0.073, y de 0 a 0.0124 basófilos totales con un promedio de 0.0019 y una desviación estándar de 0.0037.

El colorante azul de Toluidina permite observar los núcleos leucocitarios de un color azul celeste a un azul marino (Fig.8 y 12) además de una marcada diferencia en la coloración de los granulocitos, ya que a diferencia de neutrófilos y eosinófilos, los cuales mostraron una tenue coloración azul celeste del recubrimiento granular por lo que la observación fue mediante cierta refringencia de sus gránulos transparentes, en cambio los basófilos contenían gránulos nítidos de mayor tamaño de color rojizo a púrpura, logrando observarse un total de 72(Fig. 9, 10 y 11). Como intervalos de referencia se obtuvieron de 0 a 0.05 por ciento de basófilos con un promedio de 0.16 con desviación estándar de 0.15, y de 0 a 0.059 basófilos totales con un promedio de 0.0127 y una desviación estándar de 0.0186.

El colorante Azul Alcian nos permite observar marcadamente a los basófilos de una tonalidad de azul turquesa hasta azul marino en sus gránulos y núcleo, y se logró medir a uno de 5 μ m (Fig. 13,18, 19...29) sólo en 5 muestras no se observó la presencia de células correspondientes a basófilos. No obstante, también se logró apreciar muy tenuemente algunos eosinófilos (Fig. 30) y plaquetas de un color celeste, y muy marcadamente megacariocitos (Fig.14, 15,16 y 17), por lo que el uso de este colorante fue únicamente cualitativo y descriptivo para los leucocitos basófilos en frotis normales o de capa leucoplaquetaria.

Discusión

Los intervalos de referencia leucocitarios en delfines nariz de botella obtenidos en el presente estudio tienen una gran similitud con los estudios realizados en ejemplares de vida silvestre (Dierauf 2001; Weiss 2010), y es importante resaltar que estos intervalos de referencia son contribución por parte de los Servicios de Laboratorio Veterinarios de SeaWorld, los cuales omiten las edades, los sexos o el estatus clínico de los ejemplares estudiados. En cuanto a los parámetros utilizados por Sánchez en el año 2015, menciona que son tomados del estudio ofrecido por Bossart en el año 1990 por ser muy cercanos a los hallados históricamente en delfines sanos del Acuario Nacional de Cuba, aunque no menciona sexo, edad o técnicas de procesamiento (Guevara *et al* 2009). Peinado en el año 1992 menciona únicamente haber utilizado muestras de dos delfines macho y una de hembra, los cuales eran clínicamente sanos.

La cuantificación de basófilos mediante frotis de capa leucoplaquetaria teñidos con Azul de Toluidina es una herramienta diagnóstica útil al teñir los gránulos de los basófilos metacromáticamente a diferencia con el resto de los leucocitos, obteniendo un contraste altamente definido. (Jain 1993; Bressler 1990; Williams 1990). Sin embargo no es factible realizar una comparación con frotis convencionales teñidos con Diff-Quik debido a las diferencias en las concentraciones celulares y leucocitarias en general.

El método sugerido por Elbert Gaffney (Prophet, 1992) para la tinción de tejidos ricos en carbohidratos como sulfato de heparina y mucosubstancias con Azul Alcian, resultó ser preciso en la evaluación microscópica de basófilos, sin embargo al no teñir el resto de los leucocitos en el frotis, no es posible ofrecer un porcentaje que sirva de comparación de efectividad entre tinciones, siendo únicamente útil de manera cualitativa para evidenciar la presencia y las características morfológicas de los basófilos. Se sugiere el uso de la tinción de Azul Alcian en conjunto de Rojo Neutro en próximos estudios con la finalidad de crear contraste leucocitario y de esta manera obtener parámetros que puedan ser utilizados para realizar una comparación estadística con otras técnicas de tinción (Moore 1965; Shelley 1965; Cooper 1966).

Anexos

Figuras

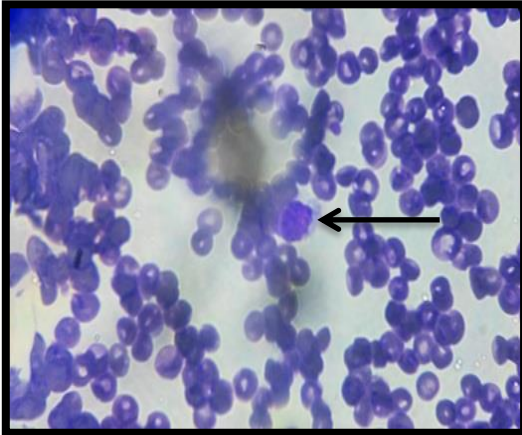


Fig. 1 Basófilo (*Tursiops truncatus*)
Diff-Quick 100x

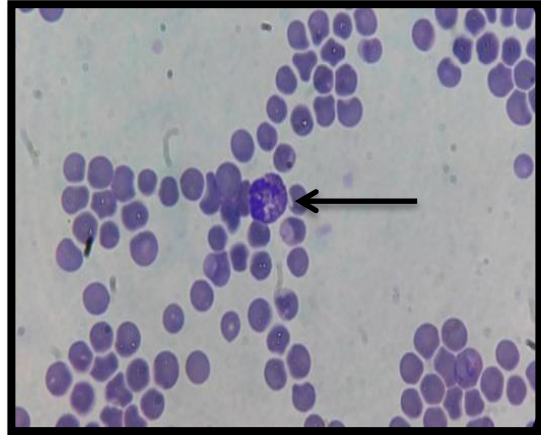


Fig. 2 Basófilo (*Tursiops truncatus*)
Diff-Quick 100x

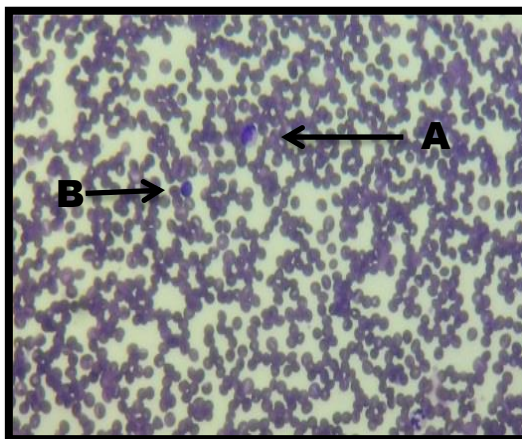


Fig. 3 Monocito (A) y Linfocito (B)
(*Tursiops truncatus*) Diff-Quick 40x

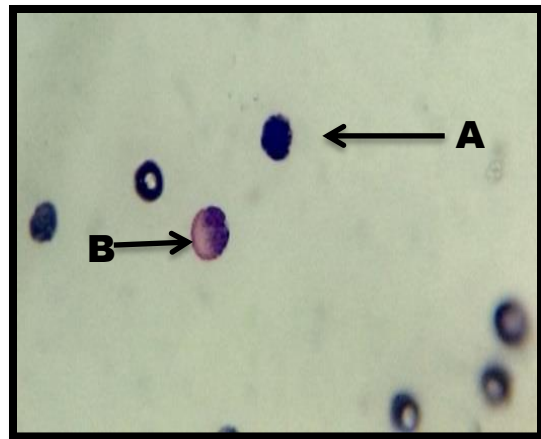


Fig. 4 Basófilo (A) y Eosinófilo (B)
(*Tursiops truncatus*) Diff-Quick 100x

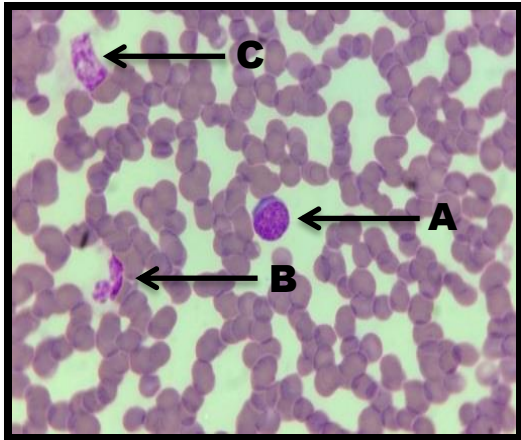


Fig. 5 Linfocito B (A), Neutr3falo Banda (B) y Monoblasto (C) (*Tursiops truncatus*) Diff-Quick 100x

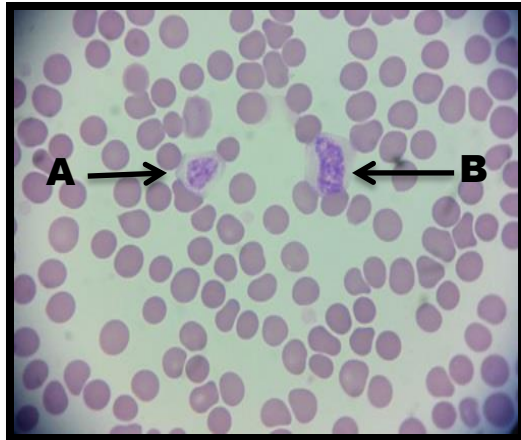


Fig. 6 Linfocito (A) y Monoblasto (B) (*Tursiops truncatus*) Diff-Quick 100x

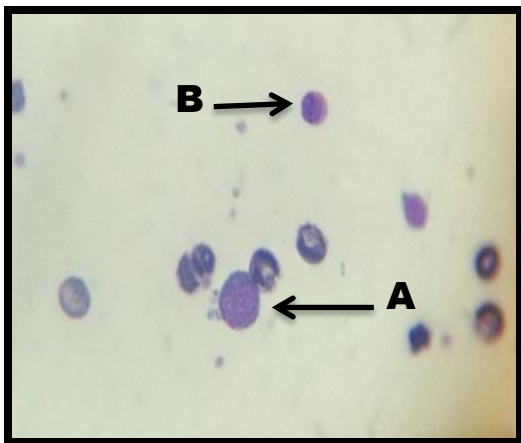


Fig. 7 Linfocito B (A) y Eosin3filo (B) (*Tursiops truncatus*) Diff-Quick 40x

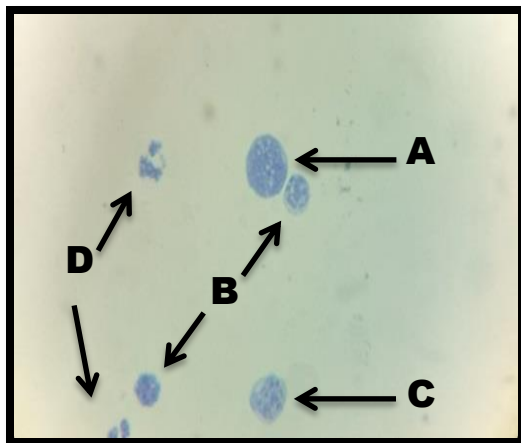


Fig. 8 Megacariocito (A), Linfocitos (B), Monoblasto (C) y Neutr3filos (D) (*Tursiops truncatus*) Azul de Toluidina 100x

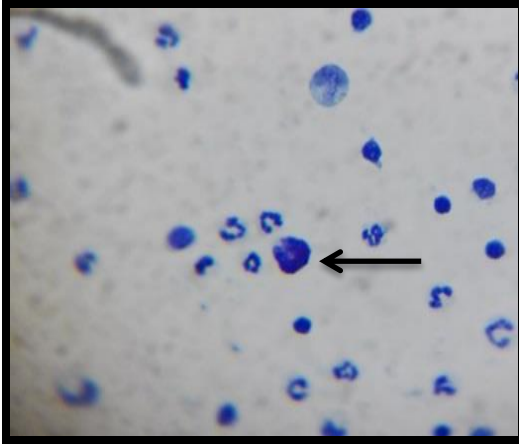


Fig. 9 Basófilo
(*Tursiops truncatus*) Azul de Toluidina 100x

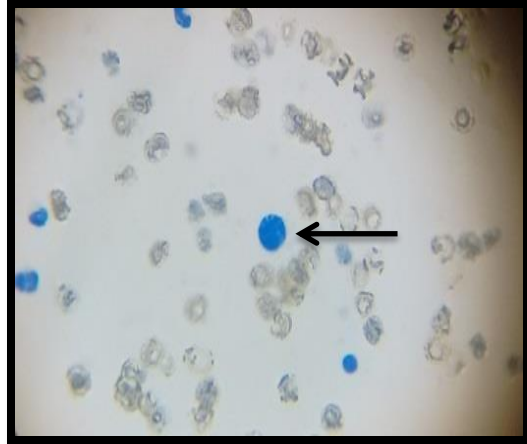


Fig. 10 Basófilo
(*Tursiops truncatus*) Azul de Toluidina 100x

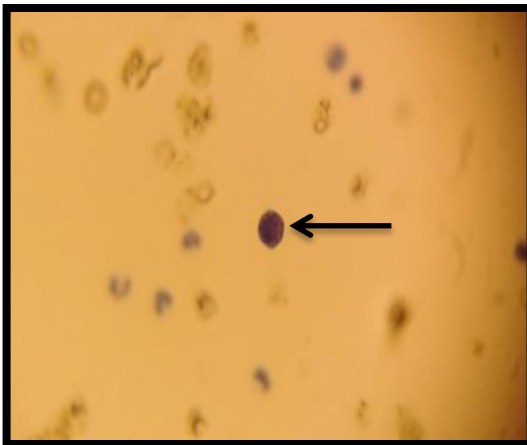


Fig. 11 Basófilo
(*Tursiops truncatus*) Azul de Toluidina 100x

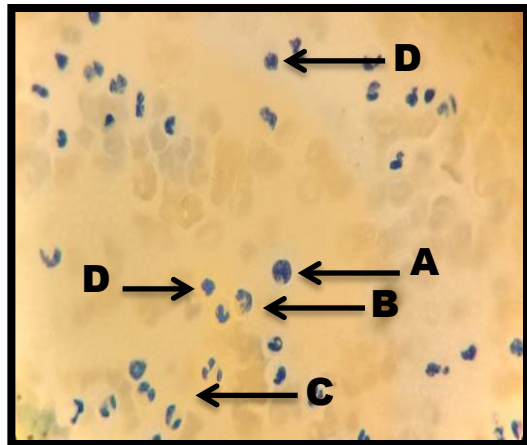


Fig. 12 Basófilo (A), Monocito (B),
Neutrófilos (C) y Linfocitos (D)
(*Tursiops truncatus*) Azul de Toluidina 40x

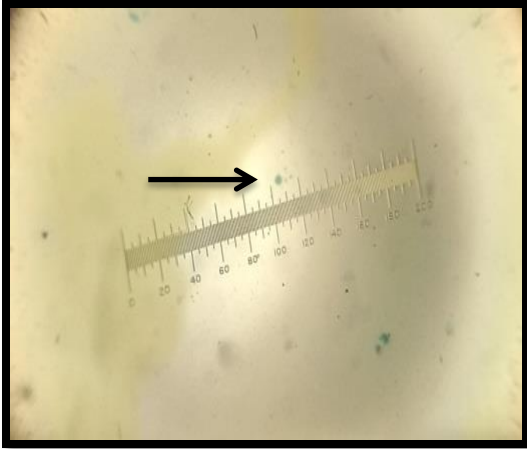


Fig. 13 Basófilo de 5µm
(*Tursiops truncatus*) Azul de Alcian
40x

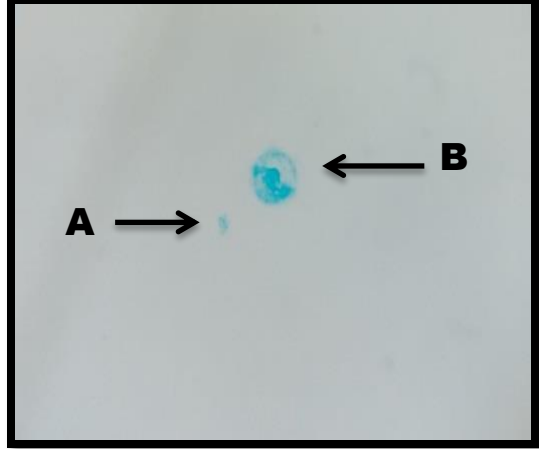


Fig. 14 Plaqueta y megacariocito
(*Tursiops truncatus*) Azul de Alcian
100x

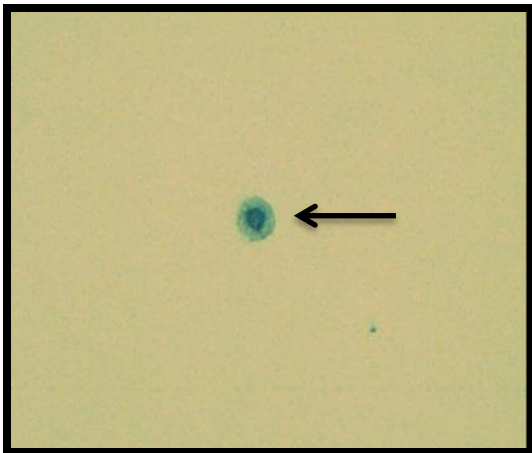


Fig. 15 Megacariocito
(*Tursiops truncatus*)
Azul de Alcian 100x

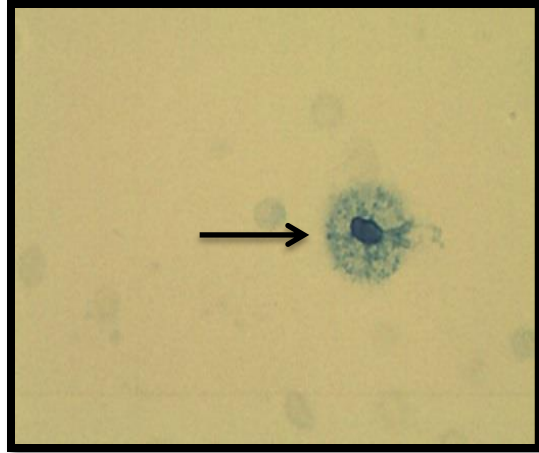


Fig. 16 Megacariocito
(*Tursiops truncatus*)
Azul de Alcian 100x

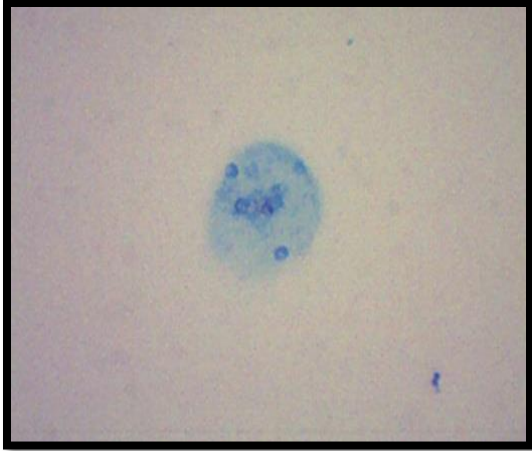


Fig. 17 Megacariocito (*Tursiops truncatus*) Azul Alcian 100x

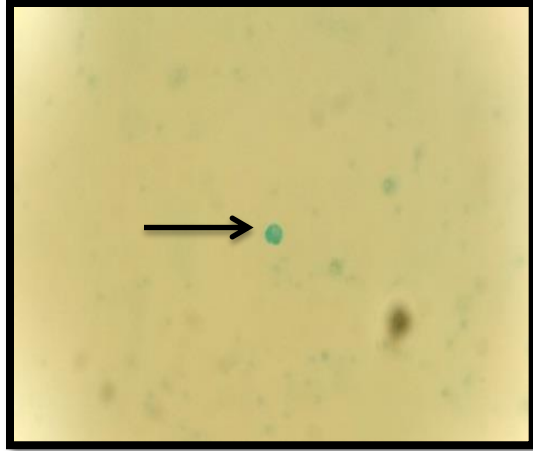


Fig. 18 Basófilo (*Tursiops truncatus*) Azul de Alcian 100x

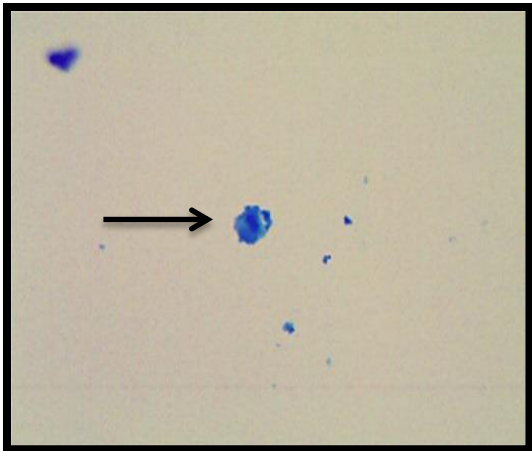


Fig. 19 Basófilo (*Tursiops truncatus*) Azul Alcian 100x

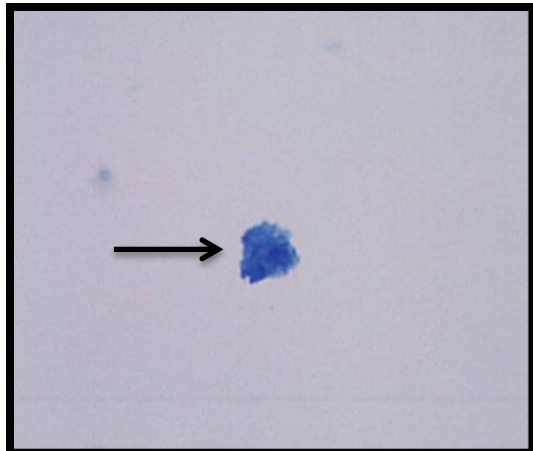


Fig. 20 Basófilo (*Tursiops truncatus*) Azul de Alcian 100x

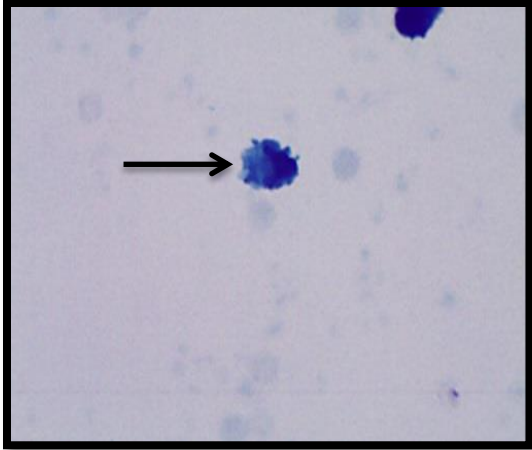


Fig. 21 Basófilo (*Tursiops truncatus*)
Azul Alcian 100x

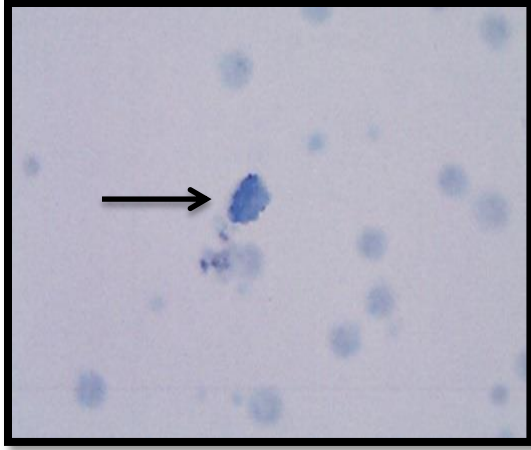


Fig. 22 Basófilo (*Tursiops truncatus*)
Azul Alcian 100x

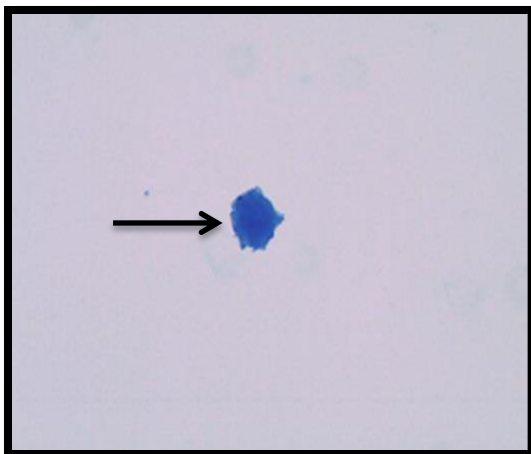


Fig. 23 Basófilo (*Tursiops truncatus*)
Azul Alcian 100x

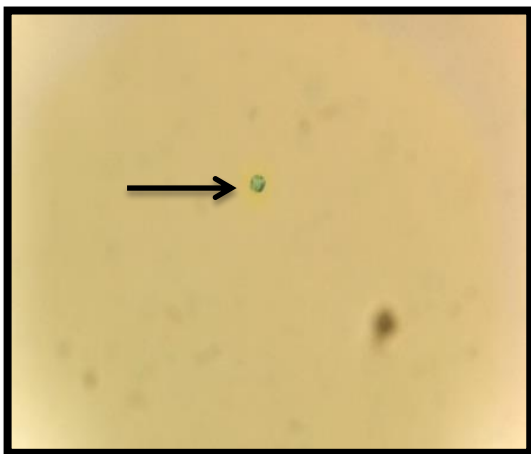


Fig. 24 Basófilo (*Tursiops truncatus*)
Azul Alcian 40x

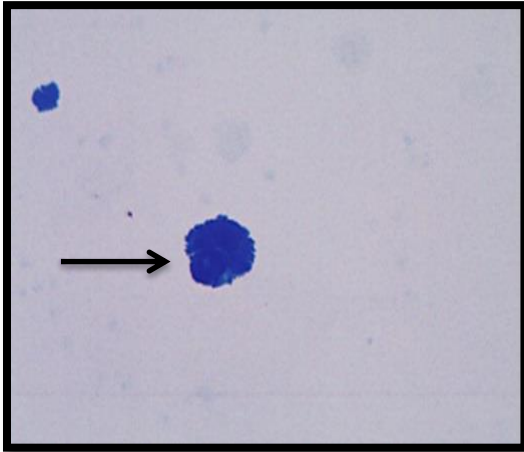


Fig. 25 Basófilo (*Tursiops truncatus*)
Azul Alcian 100x

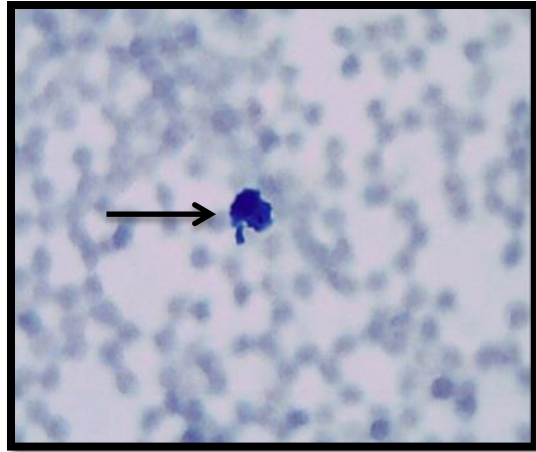


Fig. 26 Basófilo (*Tursiops truncatus*)
Azul de Alcian 100x

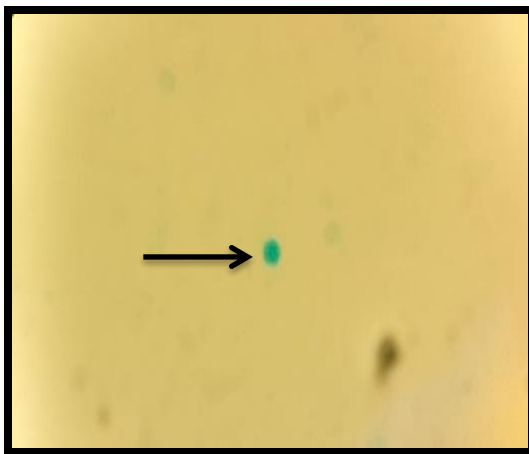


Fig. 27 Basófilo (*Tursiops truncatus*)
Azul Alcian 100x

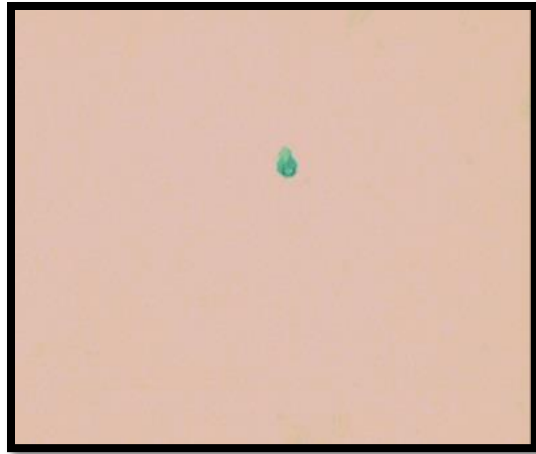


Fig. 28 Basófilo (*Tursiops truncatus*)
Azul Alcian 100x

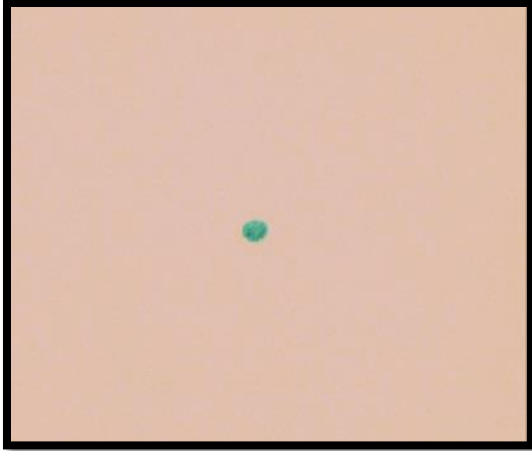


Fig. 29 Basófilo (*Tursiops truncatus*)
Azul Alcian 100x

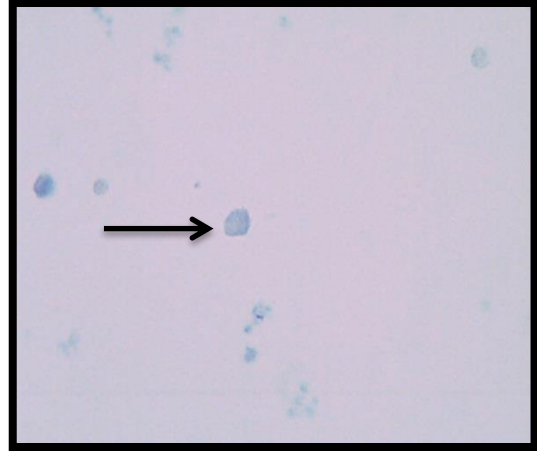


Fig. 30 Eosinófilo (*Tursiops truncatus*) Azul Alcian 100x

Cuadros

Cuadro 1. Intervalos de Referencia Leucocitarios en el delfín Nariz de Botella (*Tursiops truncatus*) teñidos con DiffQuick en frotis tradicional.

Parámetro	Rango ($\times 10^9/L$)	Promedio ($\times 10^9/L$)	Desviación Estándar ($\times 10^9/L$)
Leucocitos	3.4250 - 17.5000	7.0527	3.4585
Neutrófilos	1.9717 - 11.5325	4.6148	2.3552
Linfocitos	0.2755 - 2.6055	1.1505	0.6874
Eosinófilos	0.1050 - 2.6440	0.7278	0.6342
Monocitos	0.0830 - 3.9375	0.5480	0.9428
Basófilos	0.00 - 0.0124	0.0019	0.0037

Cuadro 2. Intervalos de Referencia Leucocitarios en el delfín Nariz de Botella (*Tursiops truncatus*) teñidos con Azul de Toluidina en frotis de capa Leucoplaquetaria.

Parámetro	Rango ($\times 10^9/L$)	Promedio ($\times 10^9/L$)	Desviación Estándar ($\times 10^9/L$)
Leucocitos	3.4250 - 17.5000	7.0527	3.4585
Neutrófilos	2.4885 - 11.7390	4.7902	2.5036
Linfocitos	0.4197 - 2.7800	1.2065	0.6684
Eosinófilos	0.1495 - 1.4570	0.5830	0.3450
Monocitos	0.0780 - 2.8900	0.4603	0.6594
Basófilos	0.0000 - 0.0588	0.0127	0.0186

Bibliografía

1. Barbara E. Curry, Karin A. Forney. 2001. Preliminary Report of the Workshop on Blood Parameters for the Assessment of Stress in Eastern Tropical Pacific Dolphins. Southwest Fisheries Science Center. La Joya California <https://swfsc.noaa.gov/publications/TM/SWFSC/NOAA-TM-NMFS-SWFSC-254.PDF>
2. Berger D. 1999. A Brief History of Medical Diagnosis and The Birth of the Clinical laboratory. Medical Laboratory Observer. 31(7):28-30, 32, 34-40 PMID: 10539661 Sarasota Florida. <http://www.academia.dk/Blog/wp-content/uploads/KlinLab-Hist/LabHistory1.pdf>
3. Beurden SJ, IJsseldijk LL, Cremers H JWM, Gröne A, Verheije M, Héléne. BL. 2015. Anisakis spp. induced granulomatous dermatitis in a harbour porpoise *Phocoena phocoena* and a bottlenose dolphin *Tursiops truncatus*. Pathology Division, Department of Pathobiology, and Dutch Wildlife Health Centre, Faculty of Veterinary Medicine, Utrecht University, The Netherlands. Jan 15; 112(3):257-63. doi: 10.3354/dao02818. <http://www.int-res.com/user-login/?file=%2Farticles%2Fdao2014%2F112%2Fd112p257.pdf>
4. Blank U, Falcone FH, Nilsson G. 2013. The history of mast cell and basophil research – some lessons learnt from the last century. European Journal of Allergy and Clinical Immunology. Volume 68, Issue 9, pages 1093–1101 DOI: 10.1111/all.12197 <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/all.12197/full>
5. Boseila AWA. 1963. Hormonal influence on blood and tissue basophilic granulocytes. Annals of The New York Academy of Sciences Vol. 103 Issue 1 103:394 <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1749-6632.1963.tb53711.x/pdf>
6. Bossart, G.D., 1995, Immunocytes of the Atlantic Bottlenose Dolphin (*Tursiops truncatus*) and West Indian Manatee (*Trichechus manatus latirostris*): Morphologic Characterizations and Correlations between Healthy and Disease States and Under Free-Ranging and Captive conditions, Dissertation, Florida International University, Miami, FL, 183 pp. <http://search.proquest.com/docview/304274829>
7. Bressler, RB. Friedman, MM. Kirshenbaum AS. Et al. 1990. Sequential appearance of basophils and mast cells from human bone marrow in long-term suspension culture. Int. Arch. Allergy Appl. Immunol. 91(4):403-10. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1698724>
8. CDC (Centers for Disease Control), 1988, Guidelines for Evaluating Surveillance Systems, MMWR 37(S-5) 1-18. <http://www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/00001769.htm>
9. Cooper JP, Cruickshank CND 1966. Improved method for direct counting of basophil leukocytes. J Clin Pathol 19:402 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC473294/pdf/jclinpath00363-0098.pdf>
10. Dierauf AL. Gulland FMD. 2001. CRC Handbook of Marine Mammal Medicine. CRC Press.

11. Duncan ER. 1963. Hematología Clínica. Paz Montalvo. Madrid.
12. Falcone FH, Haas H, Gibbs BF. 2000. The human basophil: A new appreciation of its role in immune responses. *Blood Journal of the American Society of hematology*. *Blood*: 96:(13) 4028-4038
<http://www.bloodjournal.org/content/96/13/4028>
13. Fredricks RE, Moloney WD 1959. The Basophilic granulocyte. *The Blood Journal*. 14:571, <http://www.bloodjournal.org/content/bloodjournal/14/5/571.full.pdf?sso-checked=true>
14. Gilbert HS, Warner RRP, Wasserman LR 1966. A study of histamine in myeloproliferative disease. *Blood* 28:795
<http://www.bloodjournal.org/content/bloodjournal/28/6/795.full.pdf>
15. Gilbert H.S. & Ornstein L. 1975. Basophil Counting With A new Staining Method Using Alcian Blue. New York N.Y.
<http://www.bloodjournal.org/content/bloodjournal/46/2/279.full.pdf>
16. Guevara C, López R, Martínez LS, Cruz D, Blanco M, López N, Campos L S. Rangos de valores hematológicos y hemoquímicos del delfín tonina *Tursiops truncatus* para aguas de la costa norte central de Cuba. [CD-ROM]: XIII Congreso Latinoamericano de Ciencias del Mar-COLACMAR. VIII Congreso de Ciencias del Mar-MARCUBA; 2009: ISBN: 978-959-300-005-5.
17. Hajdu SI. 2003. A Note from History: The Discovery of Blood Cell. *Annals of Clinical & Laboratory Science*. vol. 33 no. 2 237-238
<http://www.annclinlabsci.org/content/33/2/237.full.pdf+html>
18. Hart GD. 2001. Description of Blood Disorders Before the Advent of Laboratory Studies. *British Journal of Haematology*. Volume 115, Issue 4, pages 719–728 115, DOI: 10.1046/j.1365-2141.2001.03130.x
<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1046/j.1365-2141.2001.03130.x/full>
19. Ikuo S, Masao Y, Maho S, Kazuhiko Y, Lewis LL, Takashi S, Hisashi A. 2005. Down-Regulation of Basophil Function by Human CD200 and Human Herpesvirus-8 CD200. *The Journal of Immunology*. vol. 175 no. 7 4441-4449 DOI: 10.4049/jimmunol.175.7.4441. <http://www.jimmunol.org/content/175/7/4441>
20. Jain N.C, 1993 *Essentials of Veterinary Hematology*. Lea & Febiger 258-265
21. Jefferson TA, Webber M.A, Pitman R.L. 1997. *Marine Mammals Of The World – A Comprehensive Guide To Their Identification*. First Edition. Elsevier
22. Karasuyama H, Mukai K, Tsujimura Y, Obata K. 2009. Newly Discovered Roles for Basophils: A Neglected Minority Gains New Respect. *Nature Reviews Immunology*. 9, 9-13. doi: 10.1038/nri2458.
<http://www.nature.com/nri/journal/v9/n1/full/nri2458.html>
23. Lantz CS, Boesiger J, Song CH, et al. 1998. Role for interleukin-3 in mast-cells and basophils development and in immunity to parasites. *Nature* 1998;392:90-93 DOI: 10.1038/32190
<http://www.nature.com/nature/journal/v392/n6671/full/392090a0.html>
24. Latimer KS. 2011. *Duncan and Prasse's Veterinary Laboratory Medicine: Clinical Pathology*. 5th Edition. Ames, Iowa, USA. Wiley-Blackwell.
25. Medina MR. 1997. Comportamiento del Tursion (*Tursiops truncatus* Montagu, 1821) en ensenada de La Paz, Baja California Sur, México. [tesis de maestría]. Centro Interdisciplinario de Ciencias Marinas. Instituto Politécnico Nacional.

26. Miguel JFS, Sánchez GFM. 2009. Hematología – Manual Básico Razonado. 3era Edición. Barcelona, España. Elsevier.
27. Moore JE 3rd, James GW 3rd. 1965. A Simple Direct Method for Absolute Basophil Leukocyte Count. *Proc Soc Exp Biol Med* 82:601
28. Nuñez OL. y Bouda J. 2007. Patología Clínica Veterinaria. Segunda edición. Universidad Nacional Autónoma de México-Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. México D.F.
29. Peinado V, Celdrán J, Viscor G, Palomeque J. 1992. Valores Bioquímicos y hematológicos en el delfín mular y la orca en cautividad. *Med. Vet.* Vol. 9 n° 11. Departamento de Bioquímica y Fisiología, Facultad de Biología, Universidad de Barcelona, España.
30. Porter KR. 1954. Electron Microscopy of Basophilic Components of Cytoplasm. *Laboratories Of The Rockefeller Institute For Medical Research.* New York N. Y. 1954 vol. 2 no. 5 346-375 doi: 10.1177/2.5.346
<http://jhc.sagepub.com/content/2/5/346.full.pdf+html>
31. Perrin WF. Würsig B, Thewissen JGM. 2009. *Encyclopedia of Marine Mammals.* Elsevier. Second Edition. USA.
32. Poultney JW. 1981. Reviewed Work: *Dictionnaire Etymologique de la Langue Grecque* by Pierre Chantraine. *The American Journal of Philology* DOI: 10.2307/294316
33. Prophet EB, Wills B, Arrington J.B, Sabin L.H. 1992. *Laboratory Methods In Histotechnology.* Armed Forces Institute Of Pathology. Washington D.C.
34. [RAE] Real Academia Española. *Diccionario de la Lengua Española [en línea].* 2015. 23a ed., edición del tricentenario. Madrid, España. <http://dle.rae.es/>.
35. Sánchez ML, Fernández RG, Guevara MC, Cruz MD, Sánchez CL, López LN, López CR, Campos TR. 2015. Lesiones cutáneas similares observadas en tres delfines *Tursiops truncatus* mantenidos en el acuario nacional de Cuba: Estudio de casos. *Revista Electrónica de Veterinaria* Vol. 16 n°10.
<http://www.veterinaria.org/revistas/redvet/n101015/101501.pdf>
36. Shelley WB. 1963 The circulating basophil as indicator of hypersensitivity in man. *Arch Dermatol* 88:759 doi:10.1001/archderm.1963.01590240083015
37. Shelley WB, Parnes HM 1965. The absolute basophil count, *JAMA* 192:108, doi:10.1001/jama.1965.03080180026005
38. Stockham SL. Scott MA. 2008. *Fundamentals of Veterinary Clinical Pathology.* Second Edition. Ames, Iowa, USA. Blackwell Publishing.
39. Thrall MA, Weiser G, Allison RW, Campbell TW. 2012 *Veterinary Hematology and Clinical Chemistry.* Second Edition. Iowa, USA. Wiley-Blackwell.
40. Vázquez CL, Serrano SA, López OM, Galindo JÁ, Valdés AMP, Naval AC. 2007. Caracterización del hábitat de dos poblaciones de toninas (*Tursiops truncatus*, Montagu 1821) en la costa Norte del Estado de Veracruz, México. *Revista UDO Agrícola* 7 (1): 285-292. 2007
41. Watson SV, Daniels R, Smith C. 2012. Thirty Year Retrospective Evaluation of Pneumonia in a Bottlenose Dolphin *Tursiops truncatus* Population. *National Marine Mammal Foundation.* San Diego, California Jul 25; 99(3):237-42.
doi: 10.3354/dao02471 <http://www.int-res.com/user-login/?file=%2Farticles%2Fdao2012%2F99%2Fd099p237.pdf>

42. Weiss D. J, Wardrop K. J. 2010. Schalm's Veterinary Hematology. Sixth Edition. Blackwell publishing.
43. Williams, WJ., Buetler, E., Erslev, AJ., et al. 1990 Hematology. 4th Ed. New York, McGraw-Hill,
44. [NOM-001] Norma Oficial Mexicana [24 Dic 1996]. NOM-001-SEMARNAT-1996. Que establece los límites máximos permisibles de contaminantes en las descargas de aguas residuales en aguas y bienes nacionales.
45. [NOM-126] Norma Oficial Mexicana [15 Jun 2000]. NOM-126-SEMARNAT-2000. Por la que se establecen las especificaciones para la realización de actividades de colecta científica de material biológico de especies de flora y fauna silvestres y otros recursos biológicos en el territorio nacional.
46. [NOM-135] Norma Oficial Mexicana [25 Feb 2004]. NOM-135-SEMARNAT-2004. Para la regulación de la captura para investigación, transporte, exhibición, manejo y mantenimiento de mamíferos marinos en cautiverio.
47. [NOM-059] Norma Oficial Mexicana [26 Nov 2010]. NOM-059-SEMARNAT-2010. Protección ambiental –especies nativas de México de flora y fauna silvestres– categorías de riesgo y especificaciones para su inclusión, exclusión cambio-lista de especies en riesgo.