

Caracterización geométrica de los eritrocitos nucleados de tilapia roja (*Oreochromis spp*)

Geometric characterization of nucleated erythrocytes of red tilapia (*Oreochromis spp*)

Javier Rodríguez^{*}, Víctor Atencio^{**}, Ribká Soracipa^{***},
Diana Madariaga^{****}, Catalina Correa^{****}, Signed Prieto^{*****}

DOI: 10.15446/rev.colomb.biote.v23n1.90704

RESUMEN

Introducción. En hematología, el estudio de las alteraciones de la morfología eritrocitaria contribuye con el diagnóstico de la normalidad o anormalidad de estas estructuras, sin embargo, el carácter cualitativo de los criterios diagnósticos dificulta su interpretación y alcance. **Objetivo.** Caracterizar los eritrocitos nucleados de tilapia roja (*Oreochromis spp*), en el contexto de la geometría fractal y euclidiana. **Metodología.** Se tomaron 50 eritrocitos nucleados de 20 extendidos de sangre de tilapia roja. Posteriormente todos los contornos del núcleo y el citoplasma de los eritrocitos fueron delineados, para superponer dos rejillas, una con el doble tamaño que la otra, para calcular mediante el método de Box Counting la dimensión fractal de cada eritrocito delineado. Adicionalmente fue calculada la superficie de estas dos partes del eritrocito. **Resultados:** Los resultados de este estudio revelaron que los valores de la dimensión fractal no permiten hacer comparaciones entre eritrocitos nucleados. Por su parte, la superposición de rejillas de 5x5 y 10x10 píxeles permitió observar que los valores de ocupación del citoplasma y el núcleo permiten hacer comparaciones entre los eritrocitos nucleados, junto con los valores de la superficie de estas dos partes del eritrocito nucleado. **Conclusión:** Los eritrocitos nucleados de tilapia roja pueden ser caracterizados mediante la medición de los valores espacios ocupados por su citoplasma y el núcleo, junto con los valores de la superficie de cada una de estas dos partes del eritrocito.

Palabras claves: glóbulos rojos, geometría fractal, Box Counting, tilapia roja.

ABSTRACT

Introduction. In hematology, the study of erythrocyte morphology alterations contributes to the diagnosis of normality or abnormality of these structures. However, the qualitative nature of the diagnostic criteria makes their interpretation and scope difficult. **Objective.** Characterize the nucleated erythrocytes of red tilapia (*Oreochromis spp*) in the context of fractal and Euclidean geometry. **Methodology.** Fifty nucleated erythrocytes were taken from twenty red tilapia blood smears. Subsequently, all the contours of the nucleus and the cytoplasm of the erythrocytes were delineated to superimpose two grids, one twice the size of the other, to calculate the fractal dimension of each delineated erythrocyte using the Box Counting method. Additionally, the surface of these two parts of the erythrocyte was calculated. **Results:** This study revealed that the fractal dimension values do not allow comparisons

^{*} MD. Director Grupo Insight. Bogotá, Colombia. Correspondencia: Cra 79 B # 51-16 Sur Interior 5 Apto 102. Bogotá, Cundinamarca- Colombia. Teléfono: (57-1) 4527541 E-mail: grupoinsight2025@yahoo.es

^{**} Líder Grupo CINPIC, FMVZ/DCA/Universidad de Córdoba. Montería, Córdoba, Colombia

^{***} Física. Investigadora Grupo Insight. Bogotá, Colombia.

^{****} Magister en Ciencias Ambientales. Investigadora. Grupo CINPIC. Universidad de Córdoba. Montería, Córdoba, Colombia

^{*****} Psicóloga. Investigadora Grupo Insight. Bogotá, Colombia.

^{*****} Física. Investigadora Grupo Insight. Bogotá, Colombia.

between nucleated erythrocytes. The superposition of 5x5 and 10x10 pixel grids allowed us to observe that the occupancy values of the cytoplasm and the nucleus allow comparisons between the nucleated erythrocytes, together with the values of the surface of these two parts of the nucleated erythrocyte. **Conclusion:** Red tilapia nucleated erythrocytes can be characterized by measuring the values of the spaces occupied by their cytoplasm and nucleus, together with the values of the surface of each of these two parts of the erythrocyte.

Keywords: Red blood cells; fractal geometry; Box Counting; red tilapia.

Recibido: octubre 23 de 2020 **Aprobado:** mayo 14 de 2021

INTRODUCCIÓN

La tilapia roja (*Oreochromis spp*), es una de las especies de mayor interés en la acuicultura mundial, alcanzando una producción estimada en 2016 de 1,17 millones de toneladas métricas (FAO, 2018). En Colombia, esta es la principal especie cultivada y en 2017 representó el 61.2% de la producción piscícola colombiana (Pardo, 2018). Entre las ventajas para cultivar este cíclido se destacan su aspecto atractivo (color rojo), facilidad de cultivo, alta capacidad de adaptación a condiciones ambientales adversas, alta resistencia a enfermedades, comportamiento de alimentación omnívoro, tiempo de generación corto y crecimiento más rápido (Haque *et al.*, 2016); además de su buena adaptación a los sistemas intensivos de cultivos (Avnimelech, 2007; Widanarni *et al.*, 2012).

La intensificación de los sistemas de cultivo de peces aumenta los riesgos de algunas enfermedades por diferentes agentes patógenos (virus, bacterias, hongos y/o alteración de los parámetros ambientales). En este sentido, es importante tener herramientas tecnológicas que permitan vigilancia epidemiológica, seguimiento sanitario y diagnóstico de patologías en el menor tiempo posible.

Los parámetros hematológicos son indicadores rápidos de trastornos fisiológicos en los sistemas de cultivo; por tanto, existe la necesidad de establecer patrones hematológicos en los peces para poder diagnosticar patologías (Davidov *et al.*, 2002). También, se pueden observar alteraciones en el núcleo, como el núcleo con forma ampolada, brotes, condensados, lobulados, entre otros (Barbosa, 2010; Summak *et al.*, 2010; Islam *et al.*, (2019).

El reconocimiento de la morfología eritrocitaria se realiza mediante analogías con objetos visibles a escala macroscópica, por ejemplo, la analogía entre los dacriocitos y la forma que tienen las lágrimas, peras, raquetas de tenis, entre otros (Campuzano, 2008). Las investigaciones realizadas en la fisiología y la morfología eritrocitaria en humanos han apoyado en el diagnóstico de ciertas afecciones (Bogdanova *et al.*, 2020). Investigaciones llevadas a cabo en los vertebrados inferiores, han encontrado la posibilidad de analizar la deformabilidad de los

glóbulos rojos de peces, a partir de la comparación de los resultados arrojados en el estudio con las investigaciones llevadas a cabo con eritrocitos humanos (Hughes *et al.*, 1982). En otra investigación fue analizado los efectos de la temperatura en la deformación de los glóbulos rojos de trucha arco iris *Oncorhynchus mykiss* y raya, encontraron que la deformabilidad de los glóbulos rojos en estas especies, se vería modificada cuando los animales se exponen a cambios ambientales, con efectos considerables en la aclimatación o supervivencia en las diversas condiciones (Hughes *et al.*, 1988). Islam *et al.*, (2019) evaluaron estrés térmico en *Pangasianodon hypophthalmus* y encontraron que a altas temperaturas (36°C) se presentaron anomalías celulares eritrocíticas y las anomalías nucleares eritrocíticas.

La geometría euclidiana, permite caracterizar los objetos regulares y homogéneos mediante el cálculo de su longitud, área y volumen (Mandelbrot, 2000); mientras que, con la geometría fractal es posible medir y caracterizar el grado de irregularidad de un objeto, cuyo resultante es una medida numérica adimensional (Mandelbrot, 1972; Rodríguez *et al.*, 2014). Existen diferentes formas de calcular la dimensión fractal de un objeto irregular, empleadas de acuerdo con el tipo de objeto a medir. Entre ellos se encuentra el fractal salvaje, caracterizado principalmente por la superposición entre sus partes y que se mide mediante el método de Box-Counting (Rodríguez *et al.*, 2014; Peitgen, 1992a, 1992b).

Teniendo en cuenta las diferentes alteraciones en la forma que pueden presentar los glóbulos rojos, se hace necesario plantear nuevas metodologías fundamentadas en el contexto de la geometría fractal considerando la irregularidad morfológica de estas células (Rodríguez *et al.*, 2017a; 2018). La metodología fundamentada en el método de Box Counting permitió caracterizar el grado de irregularidad de los glóbulos rojos normales (Rodríguez *et al.*, 2017a), de los equinocitos (Rodríguez *et al.*, 2017b), células falciformes (Rodríguez *et al.*, 2020), otras posibles alteraciones en la forma de los glóbulos rojos (Correa *et al.*, 2012), incluyendo la comparación entre los valores que caracterizan los glóbulos rojos normales y los esferocitos (Rodríguez *et al.*, 2018).

Por lo anteriormente expuesto, resulta oportuno aplicar la geometría fractal para caracterizar la irregularidad en la forma de los eritrocitos nucleados de tilapia roja (*Oreochromis spp*), como un primer proceso de investigación que permita ser aplicado a todas las posibles alteraciones en los eritrocitos de este y otros grupos de especies. Es por esta razón que el propósito de esta investigación es caracterizar el grado de irregularidad de los eritrocitos nucleados de *Oreochromis spp*, mediante las nociones de irregularidad y superficie desde el contexto de la geometría fractal y euclidiana, respectivamente, aplicando para ello el método de Box Counting, con el fin de obtener parámetros matemáticos que permitan establecer comparaciones y diferencias en otro grupo de eritrocitos que se puedan presentar en esta especie y encontrar posibles deformaciones asociadas a una enfermedad.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material biológico

Se tomaron muestras de sangre de cinco tilapias rojas con longitud total de 11.9±0.5 cm y peso de 27.8±3.6 g. Los animales se observaron aparentemente sanos, nado equilibrado en línea horizontal, sin laceraciones externas, buena coloración de cuerpo y branquias. Las muestras de sangre se obtuvieron puncionando el paquete vascular caudal, entre la línea lateral y el septo medio ventral, extrayendo de 1 a 2 mL de sangre por individuo y recibida en tubos vacutainer (Vacurette®, Greiner Bio-one, USA) con anticoagulante EDTA (Ethylen Diamino Tetra Acético) (Atencio *et al.*, 2007). Posteriormente se realizaron 20 frotis sanguíneos teñidos con colorante Wright y se realizaron microfotografías con un microscopio óptico (Carl Zeiss, Axioestar 4.3, Alemania) con cámara fotográfica digital incorporada (Canon Power Shot G10, Japón). Los eritrocitos nucleados fueron fotografiados con aumento de 40x y posteriormente editadas con el fin de que todas conserven un mismo tamaño para luego delinear el contorno de cada uno de estos eritrocitos que aparecen en las fotografías.

Método de Box Counting

A continuación, el contorno del núcleo y el citoplasma de las fotografías de los eritrocitos nucleados fue delimitado. Posteriormente se utilizó el método de Box Counting incorporado en un software en lenguaje C++ diseñado por el grupo Insight en investigaciones previas, el cual superpone dos rejillas cuyas dimensiones están en píxeles, una con el doble tamaño que la otra, en cada uno de eritrocitos nucleados delimitados.

Rejillas de 5x5 y 10x10 píxeles, es un conjunto de cuadros diseñado en píxeles, en donde la cuadrícula de 5x5

píxeles se denomina rejilla de cuadros pequeños (Kp) y la cuadrícula de 10x10 píxeles recibe el nombre de rejilla de cuadros grandes (Kg).

La superficie del objeto delimitada, es todo lo que toca interior del objeto expresada en órdenes de magnitud en píxeles.

Superpuestas las dos rejillas el software realizó el conteo de los cuadros ocupados por el núcleo y el citoplasma, para evaluar a partir de estos valores la dimensión fractal con la ecuación 1 (Correa *et al.*, 2012).

$$\Rightarrow Df = \frac{\text{Log}N(2^{-(k+1)}) - \text{Log}N(2^{-k})}{\text{Log}2^{k+1} - \text{Log}2^k}$$

$$\Rightarrow Df = \text{Log}_2 \frac{N(2^{-(k+1)})}{N(2^{-k})}$$

Ecuación 1

Donde Df es la dimensión fractal, N el número de espacios que contiene el contorno del objeto y K el grado de partición de la cuadrícula.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Esta es la primera investigación en el cual se aplicó el método de Box Counting, para caracterizar los eritrocitos nucleados de tilapia roja, en el contexto de las nociones de irregularidad de la geometría fractal y superficie de la geometría euclidiana. Para ello fue necesario cuantificar el espacio ocupado por el contorno del núcleo y el citoplasma para evaluar su dimensión fractal y la superficie de cada una de estas dos partes del eritrocito. Estos primeros resultados serán posteriormente comparados con los resultados de un estudio futuro, en el cual se pueda caracterizar la anormalidad eritrocitaria que se pueda presentar durante el proceso de cultivo.

Para caracterizar el grado de irregularidad de los eritrocitos nucleados, se evaluó la ocupación del citoplasma y el núcleo. En la tabla 1, se muestran los resultados establecidos a la hora de utilizar el método de Box Counting en el núcleo y citoplasma en 20 eritrocitos nucleados de los 50 que fueron delimitados, cuyo citoplasma se encuentra entre 53 y 66 al superponer la rejilla Kp; entre 22 y 34 al superponer la rejilla Kg. Los espacios ocupados al superponer la rejilla Kp en el núcleo de los eritrocitos nucleados, varió entre 14 y 21, mientras que al superponer la rejilla Kg varió entre 6 y 11. La dimensión fractal del citoplasma varió entre 0.93 y 1.32 y la dimensión fractal del núcleo varió entre 0.68 y 1.32.

Tabla 1. Valores hallados a partir de la aplicación del método de Box Counting en los eritrocitos nucleados de tilapia roja.

No	Citoplasma				Núcleo			
	Kp	Kg	Df	Superficie	Kp	Kg	Df	Superficie
1	57	28	1,03	1306	15	8	0,91	238
2	65	34	0,93	1716	15	9	0,74	305
3	64	31	1,05	1480	19	10	0,93	284
4	58	25	1,21	779	18	9	1,00	271
5	60	24	1,32	983	16	10	0,68	330
6	57	26	1,13	1101	15	7	1,10	241
7	65	33	0,98	1387	16	9	0,83	345
8	61	30	1,02	1127	18	10	0,85	372
9	55	24	1,20	907	15	8	0,91	241
10	56	24	1,22	910	14	6	1,22	242
11	59	28	1,08	1022	16	10	0,68	307
12	64	30	1,09	1192	19	10	0,93	366
13	55	25	1,14	692	18	10	0,85	337
14	57	26	1,13	1067	15	6	1,32	274
15	58	25	1,21	949	16	10	0,68	301
16	61	28	1,12	1199	16	9	0,83	334
17	61	28	1,12	939	19	10	0,93	313
18	62	29	1,10	1246	16	9	0,83	354
19	66	30	1,14	1211	21	11	0,93	393
20	53	22	1,27	777	17	7	1,28	290

Fuente: Los autores. Dónde: Kp es la rejilla de 5x5 píxeles y Kg la rejilla de 10x10 x píxeles; Df es el valor de la dimensión fractal.

Las superficies del citoplasma se encontraron entre 692 y 1716 píxeles, el núcleo entre 238 y 393 píxeles (ver tabla 1).

Al comparar los valores del citoplasma del eritrocito nucleado No. 4 y 15, se observó que ambos eritrocitos dan como resultado una dimensión fractal de 1.21, debido a que ambos citoplasmas ocuparon los mismos espacios al superponer la rejilla Kp y Kg, sin embargo, los valores de la superficie del citoplasma no son los mismos. Esta misma comparación entre citoplasmas se puede realizar en otro par de eritrocitos como son el eritrocito No. 6 y 14, 16 y 17.

Ahora si la comparación se hace a partir de los valores de la dimensión fractal del citoplasma, se puede observar que los valores de la dimensión fractal de otro par de eritrocitos nucleado como son el eritrocito No. 13 y 19, aunque sean iguales, los cuadros ocupados al super-

poner las dos rejillas y los valores de su superficie ya no son iguales. Lo anterior muestra que los valores de la dimensión fractal no permiten establecer diferencias entre los diferentes grados de irregularidad de los citoplasmas y núcleos delineados para el estudio, mientras que los espacios ocupados por cada una de estas dos partes del eritrocito y su superficie evaluadas con el método de Box Counting si permiten hacer comparaciones y caracterizar los diferentes grados de irregularidad de los eritrocitos nucleados.

La figura 1, ilustra el proceso de selección de un eritrocito nucleado, la forma como se delineó el contorno del citoplasma y el núcleo. Adicionalmente, se puede observar como el software separó las dos partes del eritrocito para luego ser medidas con el método de Box Counting (ver figura 2). La figura 2 muestra los valores de la rejilla Kp y Kg, así como el valor de la dimensión fractal evaluada con la ecuación 1.

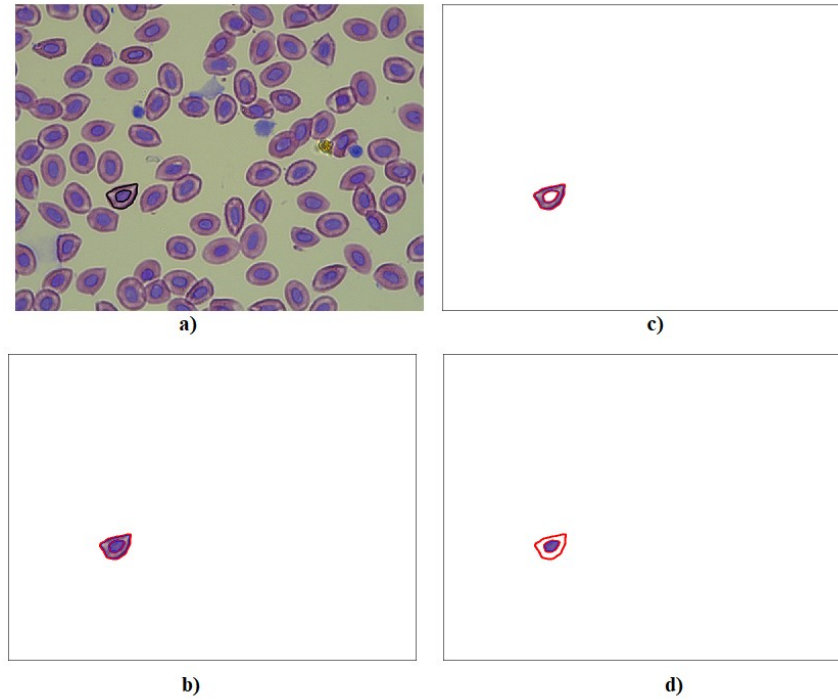


Figura 1. a) Eritrocito nucleado; b) Eritrocito delineado y separado del resto de la muestra; c) y d) Citoplasma y núcleo del eritrocito.

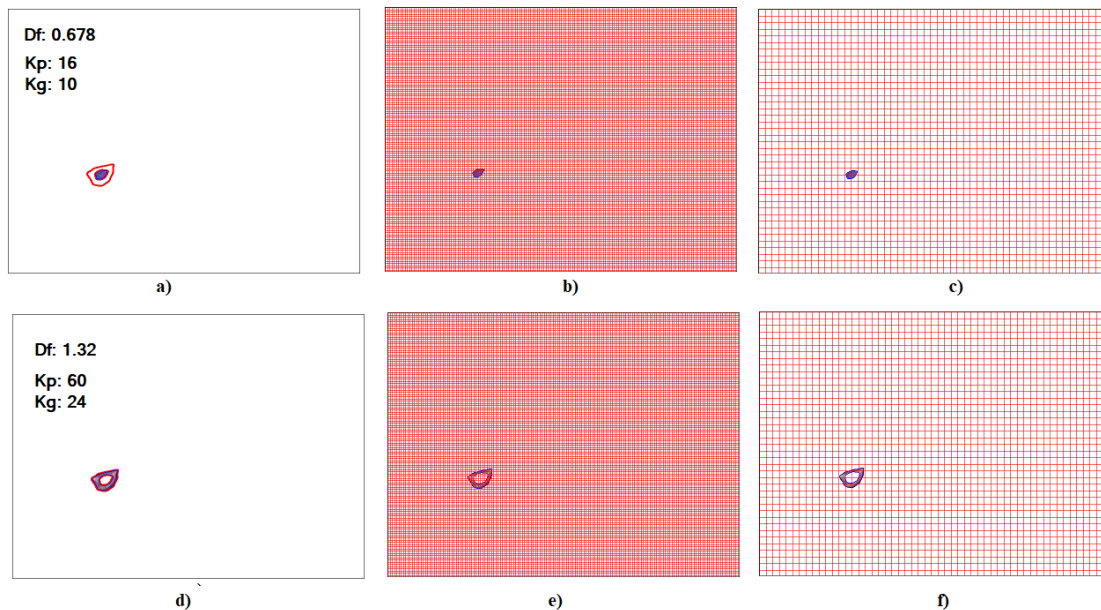


Figura 2. Método de Box Counting aplicado en el eritrocito nucleado, a) núcleo del eritrocito de la figura 1; b) y c) núcleo con rejilla de 5x5 píxeles (Kp) y 10x10 píxeles (Kg); d) citoplasma del eritrocito; e) y f) citoplasma con rejilla de 5x5 píxeles (Kp) y 10x10 píxeles (Kg).

Algunas investigaciones previas en hematología (Rodríguez *et al.*, 2017a, 2018), han revelado que los valores de la dimensión fractal no permiten hacer caracterizaciones morfológicas entre un mismo y diferentes grupos de alteración en la forma del glóbulo rojo. En este estudio

se encontró lo mismo, es por esta razón que se afirma que los valores de la dimensión fractal por sí sola no permite hacer caracterizaciones morfológicas entre grupos de eritrocitos nucleados. Estos resultados serán aplicados en una próxima investigación en un grupo mayor

eritrocitos nucleados para validar los resultados obtenidos, al igual que se analizarán diferentes eritrocitos con alteraciones morfológicas, para caracterizar su anormalidad y así establecer las nociones de un posible método diagnóstico cuantitativo para los eritrocitos de estas especies.

Otras investigaciones llevadas a cabo mediante la aplicación del método de Box Counting, han logrado evaluar de manera exitosa la irregularidad de diferentes estructuras del cuerpo humano y animal (Rodríguez *et al.*, 2010; Velásquez *et al.*, 2015). Entre ellas se encuentra una investigación que logró establecer un orden matemático a partir de la irregularidad de las arterias coronarias normales hasta re-estenosis, en un modelo experimental de porcino y de esta manera diferenciar las arterias normales de las anormales. Los resultados de esta investigación fueron la base para lograr una inducción matemática con la cual se establecieron todos los posibles prototipos arteriales de normalidad hasta anormalidad (Rodríguez *et al.*, 2010). Continuando con esta línea de investigación, se caracterizó el núcleo y el citoplasma en diferentes células de cuello uterino con el fin de establecer diferencias matemáticas y geométricas entre células normales de las anormales (Velásquez *et al.*, 2015). Estos estudios evidencian los alcances que tiene la aplicación de la geometría fractal, para caracterizar de manera más precisa estados normales y anormales en diferentes estructuras del cuerpo humano y animal.

CONCLUSIONES

Los resultados de este estudio revelan que es posible caracterizar la irregularidad de los eritrocitos nucleados de tilapia roja (*Oreochromis spp*), a partir de los espacios ocupados por el citoplasma y núcleo al superponer las dos rejillas, así como por el valor de su superficie. Encontrando en cambio, que los valores de la dimensión fractal no permiten caracterizar y hacer comparaciones entre los eritrocitos de esta especie. De acuerdo con lo anterior, la caracterización de los eritrocitos se hizo posible cuando se aplicó las nociones de irregularidad de la geometría fractal y superficie de la geometría euclidiana.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Atencio-García, V.J., Genes-López, F.L., Madariaga-Mendoza, D.L., & Pardo-Carrasco, S.C. (2007). Hematología y química sanguínea de juveniles de rubio *Salminus affinis* (Pisces: Characidae) del río Sinú. *Acta Bio. Colomb.* 12: 27-40. <https://revistas.unal.edu.co/index.php/actabiol/article/view/27237>.

- Avnimelech, Y. (2007). Feeding with microbial flocs by tilapia in minimal discharge bio-flocs technology ponds. *Aquaculture*, 264:140-147. <http://dx.doi.org/10.1016/j.aquaculture.2006.11.025>.
- Barbosa, J.S., Cabral, T.M., Ferreira, D.N., Agnez-Lima, L.F., Batistuzzo, & De Medeiros, S.R. (2010). Genotoxicity assessment in aquatic environment impacted by the presence of heavy metals. *Ecotox Environ Safe*, 73:320-325. <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0147651309002395>.
- Bogdanova, A., Kaestner, L., Simionato G, Wickrema A, Makhro A. (2020). Heterogeneity of Red Blood Cells: Causes and Consequences. *Front Physiol.* 11:392.
- Campuzano-Maya, G. (2008). Utilidad clínica del extendido de sangre periférica: los eritrocitos. *Medicina & Laboratorio*, 14:311-357. <https://www.medigraphic.com/pdfs/medlab/myl-2008/myl087-8b.pdf>.
- Čepa, M. (2018). Segmentation of Total Cell Area in Brightfield Microscopy Images. *Methods Protoc*, 1(4):43. <https://doi.org/10.3390/mps1040043>.
- Correa, C., Rodríguez, J., Prieto, S., Álvarez, L., Ospino, B., Munévar, A, Bernal, P., Mora, J., & Vitery, S. (2012). Geometric diagnosis of erythrocyte morphophysiology. *J. Med. Med. Sci*, 3(11): 715-720. <http://www.interesjournals.org/full-articles/geometric-diagnosis-of-erythrocyte-morphophysiology.pdf?view=inline>.
- Davidov, O.L., Kurovskaya, I., Balakhnin, P., & Shevchuk. (2002). Physiological express methods in Diagnostic of fish diseases. *J. Hydrobiol*, 38(1):65-76. DOI:10.1615/Hydrobj.v38.i1.50.
- FAO. (2018). The State of World Fisheries and Aquaculture 2018 - Meeting the sustainable development goals. Rome: FAO. <http://www.fao.org/3/i9540en/i9540en.pdf>.
- Jiménez, A., Rey, A.I., Penagos, L.G., Ariza, M.F., Figueroa, J., & Iregui, C. (2007). *Streptococcus agalactiae*: hasta ahora el único *Streptococcus* patógeno de tilapias cultivadas en Colombia. *Rev. Med. Vet. Zoot.* 2007. 54:285-294. <http://bdigital.unal.edu.co/15896/1/10628-38445-1-PB.pdf>.
- Haque, M.R., Islam, M.A., Wahab, M.A., Hoq, M.E., Rahman, M.M., & Azim, M.E. (2016). Evaluation of production performance and profitability of hybrid red tilapia and genetically improved farmed tilapia (GIFT) strains in the carbon/nitrogen controlled periphyton-based (C/N- CP) on-farm prawn culture system in Bangladesh. *Aquaculture Reports*, 4:101-111. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S235251341630076X>.

- Hughes, G.M., Kikuchi Y., Watari H. (1982). A study of the deformability of red blood cells of a teleost fish, the yellowtail (*Seriola quinqueradiata*), and a comparison with human erythrocytes. *J Exp Biol*, 96:209-220.
- Hughes, G.M. & Kikuchi Y. (1988). Effects of Temperature on the Deformability of Red Blood Cells of Rainbow Trout and Ray. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, 68:619-625.
- Islam, MA., Uddin, MH., Uddin, MJ., Shahjahan, M. (2019). Temperature changes influenced the growth performance and physiological functions of Thai pangas *Pangasianodon hypophthalmus*. *Aquac Rep.*,13:100179. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2352513418300905>.
- Mandelbrot, B. (2000) ¿Cuánto mide la costa de Bretaña? En: Mandelbrot B. Los Objetos Fractales. Barcelona. Tusquets Eds. S.A., p.27,50.
- Mandelbrot, B. (1972). The Fractal Geometry of Nature. Freeman Ed. San Francisco, 341-348.
- Pardo, S., Muñoz, A., Atencio, V., & Bonilla, S. (2018). Aquaculture in Colombia. *World Aquaculture Magazine*, 49(2):22-26. <https://www.was.org/magazine/Contents.aspx?ld=1406>.
- Peitgen, J. (1992a). Limits and self similarity. En: Chaos and Fractals: New Frontiers of Science Springer-Verlag. New York. p. 135-182.
- Peitgen, J. (1992b). Length área and dimensión. Measuring complexity and scalling properties. En: Chaos and Fractals: New Frontiers of Science Springer-Verlag. N.Y, p.183-228.
- Pulido, A., Iregui, C., Figueroa, J., & Klesius, P. (2004). Estreptococosis en Tilapias (*Oreochromis spp.*) cultivadas en Colombia. *Revista AquaTIC*, 20:27-106. <http://www.revistaaquatic.com/ojs/index.php/aquatic/article/view/250/238>.
- Rodríguez, J., Prieto, S., Correa, C., Bernal, P., Puerta, G., Vitery, S., Muñoz Diana, Soracipa Y. (2010). Theoretical generalization of normal and sick coronary arteries with fractal dimensions and the arterial intrinsic mathematical harmony. *BMC Medical Physics*, 10:1-6. <http://www.biomedcentral.com/1756-6649/10/1>.
- Rodríguez, J., Prieto, S., Polo, F., Correa, C., Soracipa, Y., Blanco, V., & Rodríguez, A. (2014). Diferenciación geometría fractal y euclidiana de arterias normales y reestenosadas. Armonía matemática arterial. *Rev Repert. Med. Cir*, 23(2):139-44. <https://doi.org/10.31260/RepertMedCir.v23.n2.2014.729>.
- Rodríguez, J., Escobar, S., Abder, L., Rio, J., Quintero, L., & Ocampo, D. (2017a). Nueva metodología geométrica para evaluar la morfología del eritrocito normal. *Rev. Nova*, 15(27): 37-43. <http://www.scielo.org.co/pdf/nova/v15n27/1794-2470-nova-15-27-00037.pdf>.
- Rodríguez J, Moreno N, Alfonso D, Méndez M, Flórez A. (2017b). Caracterización Geométrica de la Morfología del Equinocito. *Arch Med (Esp)*, 13(1:3):1-5. <https://www.archivosdemedicina.com/abstract/caracterizacioacuten-geomeacutetrica-de-la-morfologiacutea-del-equinocito-18740.html>.
- Rodríguez, J., Soracipa, Y., Ovalle, A., Castro, M., Snejoa, N., Quijano, B, Ortiz, A., Guzmán E, & Rozo C. (2018). Geometría fractal aplicada para comparar los espacios ocupados por eritrocitos normales y esferocitos. *Archivos de Medicina*, 1:13-23. <http://revistasum.umanizales.edu.co/ojs/index.php/archivosmedicina/article/view/1835>.
- Rodríguez, J., Castillo, M., Orozco, A., Soracipa, Y., & Prieto, S. (2020). Caracterización geométrica euclidiana y fractal de células falciformes. *Rev Nova*, 18 (33). <https://revistas.unicolmayor.edu.co/index.php/nova/article/view/1087>.
- Rozman, F. (2014). Medicina Interna. España: Elsevier.
- Summak, S., Aydemir, N.C., Vatan, O., Yılmaz, D., Zorlu, T., & Bilaloğlu, R. (2010). Evaluation of genotoxicity from Nilufer Stream (Bursa/Turkey) water using piscine micronucleus test. *Food Chem Toxicol*, 48:2443-47. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0278691510003819>.
- Valenzuela, A., Díaz, S., Cabanillas, J., Uribe, M., Cruz, M., Osuna, I., Báez M. (2018). Microbiological analysis of tilapia and water in aquaculture farms from Sinaloa. *Biotecnia*, 20:20-26. <https://biotecnia.unison.mx/index.php/biotecnia/article/view/525>.
- Velásquez, J., Prieto, S., Catalina, C., Domínguez, D., Cardona, D.M., & Melo, M. (2015). Geometrical nuclear diagnosis, and total paths of cervical cell evolution from normality to cancer. *J Cancer Res Ther*, 11(Issue 1): 98-104. <http://www.cancerjournal.net/article.asp?issn=0973-1482;year=2015;volume=11;issue=1;page=98;epage=104;aulast=Vel%E1squez>.
- Widanarni, W., Ekasari, J., & Maryam, S. (2012). Evaluation of Biofloc Technology Application on Water Quality and Production Performance of Red Tilapia *Oreochromis sp.* Cultured at Different Stocking Densities. *HAYATI Journal of Biosciences*, 19(2):73-80. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S197830191630136X>.