

**Características morfológicas y citoquímicas de las células de la sangre periférica de *Oreochromis aureus* S. Cichlidae** (Cytochemical and morphologic aspects of the peripheral blood cells of *Oreochromis aureus* S., Cichlidae)

**Silveira-Coffigny, Raquel:** Centro de Investigaciones Pesqueras. 5ta Ave y 246. Barlovento, Playa Ciudad Habana. Cuba. Nombre de miembro: **rasilve** | **Cruz-Quintana Yanis:** Centro de Investigaciones Pesqueras. 5ta Ave y 246. Barlovento, Playa. Ciudad Habana. Cuba | **Martínez-Pérez, Mercedes:** Centro de Investigaciones Pesqueras. 5ta Ave y 246. Barlovento, Playa Ciudad Habana. Cuba | **Ascencio-Valle, Felipe:** Centro de Investigaciones del Noroeste de Baja California SC. Mar Bermejo 195. Colonia Playa Palo de Santa Rita. La Paz. BCS. México | Contacto: [rsilveira04@cibnor.mx](mailto:rsilveira04@cibnor.mx) y [rasilve@comunidad.veterinaria.org](mailto:rasilve@comunidad.veterinaria.org)

**Resumen**

El análisis de las características morfológicas y citoquímicas de las células sanguíneas indican el tipo celular, la función y el estado de salud de cada especie por lo que se examinaron peces de la especie *Oreochromis aureus*. Para los estudios morfológicos se empleó la técnica de May-Grunwald Giemsa y para los citoquímicos los métodos Sudán Black para la detección de lípidos y reacción ácida periódica de Schiff (PAS) para detección de glucógeno. Se identificaron seis tipos de células: eritrocitos, trombocitos, monocitos, neutrófilos y linfocitos maduros y jóvenes. En los hallazgos citoquímicos se encontró que de los tipos celulares analizados los monocitos y los neutrófilos presentaron glucógeno en el citoplasma y además se observó reacción positiva a la presencia de lípidos en los neutrófilos. Establecer características normales de las células de la sangre periférica de *Oreochromis aureus*, servirá para estudios comparativos posteriores en esta especie, bajo diferentes condiciones ambientales o de estrés

**Abstracts**

The analysis of the morphologic and citochemistry characteristics of the blood cells indicates the cellular type, the function and the health status of the each species. Reason why fish of the *Oreochromis aureus* species were examined. For the morphologic studies the technique of May-Grunwald Giemsa was used and for the citochemistry the methods Sudan Black for lipids detection and PAS Schiff for glycogen detection. Six types of cells were identified: red blood cells, mature and young lymphocytes, thrombocytes, monocytes, neutrophils. In the citochemistry findings we found that of the analyzed cellular types, the neutrophils and monocytes present glycogen in the cytoplasm and neutrophils display lipids positive reactivity for the cytoplasmic granules. To establish characteristics of the cells of the peripheral blood of *Oreochromis aureus* like reference, will be used for later comparative studies under different environmental conditions or stress

**Palabras claves:** *Oreochromis aureus* | histoquímica – cytochemistry | lípidos – lipids | glucógeno – glycogen | células sangre periférica - peripheral blood cells |

## INTRODUCCION

La producción de tilapia sobrepasa el millón de toneladas métricas, por lo que constituye la segunda más importante producción de peces de agua dulce a nivel mundial (FAO, 2004).

Debido a la creciente demanda de este producto alimenticio, muchos productores de tilapia con el fin de incrementar las ganancias han adoptado sistemas intensivos de cultivo donde se desarrollan estresores que pueden comprometer el crecimiento y salud de los animales y predisponerlos a las enfermedades, por lo que el estrés es un problema para las prácticas actuales de la acuicultura

Los parámetros sanguíneos de los peces indican su estado fisiológico y se emplean con frecuencia para valorar la efectividad del control de enfermedades infecciosas, desbalances nutricionales, efectos tóxicos, condiciones anóxicas, cambios ambientales y otros estresores que se presentan durante los cultivos (Hrubec y Smith, 1999; Aydin *et al.*, 2000).

El análisis de los aspectos morfológicos y citoquímicos de las células sanguíneas indican el tipo celular, la función y el estado de salud del animal. Las investigaciones sobre el estudio de la morfología de las células sanguíneas de peces son escasas, aún más lo son los estudios citoquímicos de los constituyentes celulares. Sin embargo, en los últimos años el número de estudios relacionados con el tema ha aumentado. Así, en relación al estudio de los elementos figurados de la sangre de diferentes especies de peces, podemos citar varios trabajos que tratan de la morfología (Imagawa *et al.*, 1989; Nakamoto *et al.*, 1991; Ranzani-Paiva, 1995; Schütt *et al.*, 1997 y Ueda *et al.*, 1997. Veiga *et al.* 2000, Silveira *et al.* 2004)

Otros investigadores han realizado trabajos que involucran aspectos citoquímicos, relativos a la detección de glucógeno (Imagawa *et al.* 1989; Ueda, 1993; Hamers, 1995 y Schütt *et al.* 1997) y de lípidos (Ellis, 1976; Sarasquete y Gutiérrez, 1982 y Doggett *et al.*, 1987, Ueda *et al.* 1993 y Schütt *et al.* 1997)

Antes de que los parámetros sanguíneos de una especie sean empleados para evaluar sus variaciones fisiológicas, tienen que establecerse los índices de referencia y realizar estudios paralelos en poblaciones impactadas y no impactadas de la misma especie ( Leatherland *et al.* 1998).

Debido a lo expuesto anteriormente nos propusimos establecer los indicadores de referencia de algunos aspectos citoquímicos de las células de la sangre periférica de *Oreochromis aureus*, para estudios posteriores bajo diferentes condiciones ambientales o de estrés, en animales cuyas características morfológicas de la sangre periférica estuvieran dentro de los índices de referencia de la especie.

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

Se examinaron 10 peces de la especie *Oreochromis aureus*, que presentaron una longitud total que osciló entre 12.8 – 17.5 cm y entre 32 – 85 g de peso y provenían de sistemas de cultivo semintensivo.

Los peces fueron trasladados al laboratorio donde permanecieron, desde 21 días antes de comenzar los análisis, bajo condiciones óptimas para la especie de oxígeno, pH, temperatura y alimentación. La alimentación fue suspendida 72 horas antes de la extracción de sangre.

En todos los ensayos los peces fueron anestesiados con MS - 222 a 80 mg/L, para evitar estrés por manipulación y la sangre fue extraída de la arteria caudal con jeringuillas plásticas previamente heparinizadas y agujas 22G y vertida en tubos plásticos conteniendo heparina a razón de 0,5 mL por cada 3-4 mL de sangre.

Para los estudios morfológicos, la sangre fue fijada en metanol absoluto por 5 min. y teñidas con May-Grunwald y Giemsa. Las muestras fueron observadas al microscopio biológico con 100x de aumento y 100 células blancas fueron categorizadas basado en su morfología (Dogett et al, 1987, Rowley, 1990) La dimensión de las células fue medida en 20 células blancas de cada tipo identificado en cada uno de los peces examinados, para dar los rangos de diámetro de cada célula.

Para el estudio citoquímico, los frotis sanguíneos fueron sometidos a los siguientes métodos: Acido Periódico Schiff- PAS (Prophet *et al* 1995) para la demostración de glucógeno y Sudán Negro B (Lison, 1960) para la demostración de presencia de lípidos

## **RESULTADOS**

En relación con la morfología de los elementos celulares se identificaron seis tipos de células: eritrocitos, trombocitos, monocitos, neutrófilos, linfocitos maduros y jóvenes. Los eritrocitos son nucleados, elípticos y miden 7.23x 13.02  $\mu\text{m}$ . El núcleo también tiene forma elíptica, esta localizado en el centro de la célula, es de color púrpura con citoplasma acidófilico. (Fig 1)

Los trombocitos presentaron un diámetro de 4.95 x 5.87  $\mu\text{m}$ , son elípticos al igual que el núcleo que se localiza en el centro de la célula, el citoplasma es ligeramente basófilo. Estas células también se presentan con forma esférica. (Fig 1)

Las células blancas predominantes son los linfocitos maduros, estas células son pequeñas (4.7-5.19  $\mu\text{m}$ ), tienen forma irregular, poseen un núcleo redondeado rojo violeta y citoplasma azul ( Fig 1). Las células jóvenes son de mayor tamaño (5.78-6.75  $\mu\text{m}$ ) con núcleo rojo - violeta y el citoplasma azul pálido. Los monocitos (9.45-10,87  $\mu\text{m}$ ) tienen forma redondeada con núcleo rojo - violeta generalmente excéntrico y citoplasma color gris humo (Fig. 1) Los neutrófilos tienen forma redondeada y núcleo denso color rojo violeta, el citoplasma es rosado grisáceo.

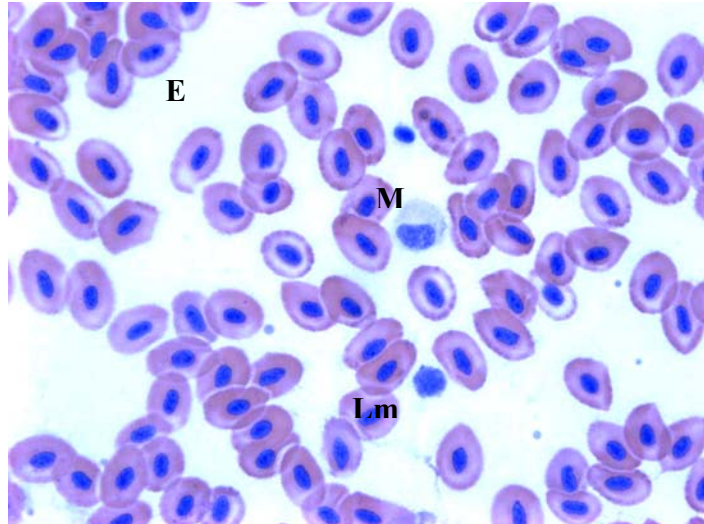


Fig 1. Microfotografía de extensiones de sangre periférica de *Oreochromis aureus*. Tinción May-Grünwald Giemsa. Células presentes: (E. eritrocitos, T. trombocitos, Lm- linfocitos maduros. M- monocitos)1000x

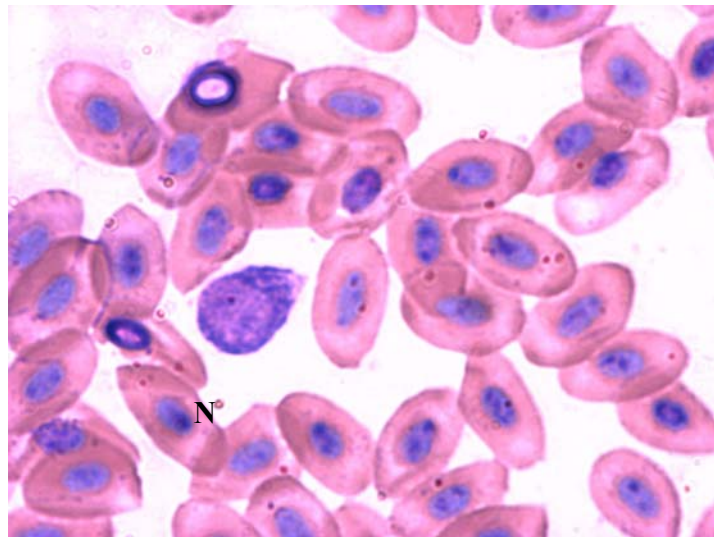


Fig. 2 Microfotografía de extensiones de sangre periférica de *Oreochromis aureus*. Tinción Sudan Black. N- neutrófilo con gránulos sudanofílicos en citoplasma.

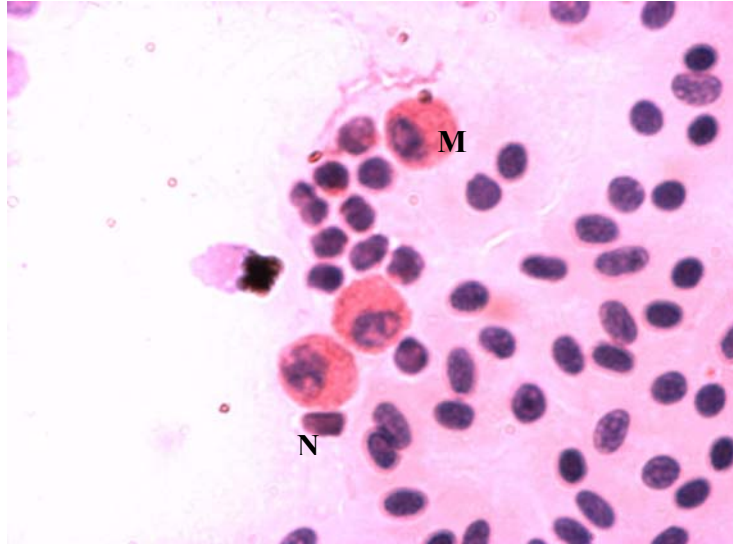


Fig. 3 Microfotografía de extensiones de sangre periférica de *Oreochromis aureus*. N- neutrófilos y M- monocitos, con reacción positiva en citoplasma a la Tinción PAS- Schiff

En los hallazgos citoquímicos encontramos que entre todos los tipos celulares analizados, los neutrófilos y los monocitos presentan glucógeno en el citoplasma( Fig 2), y se observaron gránulos que indican la presencia de lípidos en el citoplasma de los neutrófilos( Fig.3)

## DISCUSIÓN

La citoquímica constituye un complemento indispensable para estudiar la presencia de ciertos componentes bioquímicos (enzimas o sustancias diversas) en el interior de las células sanguíneas circulantes en sangre periférica.

Los 6 tipos de células sanguíneas identificadas en *O. aureus* se corresponden en tipo y dimensiones con los identificados como normales para esta misma especie por Silveira *et al* 2004. Por otra parte Hrubec *et al* 2000, para el híbrido de *Oreochromis* observaron características morfológicas y tintoriales similares. Sin embargo para *O. aureus* no se observan los eosinófilos y basófilos identificados por Ueda *et al* 1997 para *O. niloticus*. Los basofilos y eosinófilos tampoco fueron identificados para la sangre de la trucha arcoiris (Klontz, 1972), y la trucha marrón ( Blaxhall y Daisley, 1973)

En cuanto al método del Sudán Black , para identificación de lípidos, también obtuvieron una reacción positiva solamente en los neutrófilos de *Pleuronectes platessa* (Ellis, 1976), de *Oreochromis mossambicus* (Doggett *et al.*1981) y de *Halobatrachus didactylus* (Sarasquete & Gutiérrez, 1982) en los neutrófilos y eosinófilos de *Oreochromis niloticus* (Ueda *et al*

2001), débil y difusa en linfocitos, monocitos y trombocitos y fuerte en los gránulos de los neutrófilos de *Xiphophorus helleri* (Schütt *et al* 1997). Fernández *et al* 2001, indican que los neutrófilos en peces presentan tinción positiva por reacción al Sudán negro. Las reservas adecuadas de lípidos son necesarias por los organismos para mediar los efectos del estrés (Lee *et al.* 1983) y para servir como almacenadores intermediarios de la energía durante períodos de condiciones ambientales adversas o de falta prolongada de alimentos (Adams y Mclean, 1985)

En relación con el método PAS, en diversas especies, la morfología y la positividad al PAS se asemejan a nuestros resultados. Fernández *et al* 2001 plantea que los monocitos y neutrófilos, se tiñen positivamente por reacción al PAS tal y como en los neutrófilos y algunos monocitos de *Oreochromis niloticus* (Ueda *et al*, 2001); neutrófilos de *Pleuronectes platessa* (Ellis, 1976); *Halobatrachus didactylus* (Sarasquete & Gutiérrez, 1982) y *Oreochromis mossambicus* (Doggett *et al.*1981), La identificación del glucógeno en las células sanguíneas es importante, pues su presencia está íntimamente ligada al abastecimiento de energía para la realización de la fagocitosis (Lee *et al.*1983).

Estos resultados contribuirán sin dudas a las investigaciones que sobre la función de estas células en la respuesta inmune frente a diferentes enfermedades infecciosas en la especie *Oreochromis aureus* en condiciones de cultivo.

## AGRADECIMIENTOS

Le agradecemos al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) de México el apoyo brindado para la realización de esta investigación.

## BIBLIOGRAFIA

- Adams, S. M. and R. B. Mclean, 1985. Estimation of largemouth bass, *Micropterus salmoides* Lacepede, growth using the liver somatic index and physiological variables. *J. Fish Biol.*, 26: 111-126.
- Aydin, S., N. Gutelpeand H. Yildiz. 2000. Natural and experimental infections of *Campylobacter cryaerophila* in rainbow trout, gross pathology, bacteriology, clinical pathology and chemotherapy. *Fish Pathology* 35(3): 117-123.
- Blaxhall P.C., Daisley K.W. 1973. Routine hematological methods for use with fish blood. *J. Fish Biol.* 5, 771-781
- Doggett, T. A.; Wrathmell, A. B. & Harris, J. E. 1987. A cytochemical and light microscopical study of the peripheral blood leucocytes of *Oreochromis mossambicus*, Cichlidae. *J. Fish Biol.*, 31:147-53,
- Ellis, A.E. 1976. Leucocytes and related cells in the plaice *Pleuronectes platessa*. *J. Fish Biol.*, 8:143-56,.
- FAO, 2004. El estado mundial de la pesca y la Acuicultura. Sofía 2004.

- Fernández AB, de Blas I, Ruiz I. El sistema inmune de los teleósteos (I): Células y órganos. *Revista AquaTIC*, nº 16, Abril 2002. [Disponible el 27/06/2005 en URL: <http://www.revistaaquatic.com/aquatic/art.asp?t=h&c=146>]
- Hamers, R. 1995. Granulation staining and cytochemistry of peripheral blood leucocytes in healthy carp (*Cyprinus carpio* L.). I. Granulocytes. *J. Appl. Ichthyol.*, 11:86-93,
- Hrubec TC, Cardinale JL, Smith SA. 2000. Hematology and plasma chemistry reference intervals for cultured tilapia (*Oreochromis hybrid*). *Vet Clin Pathol*;29(1):7-12
- Imagawa, T. et al. 1989. Morphology of blood cells in Carp (*Cyprinus carpio* L.). *Jpn. J. Vet. Sci.*, 51(6):1163-72,
- Klontz G.W. 1972. Haematological techniques and immune response in rainbow trout. In: Mawdesley-Thomas L.E. (Ed.), *Disease of Fish, Symp. Zool. Soc. Lond.* Vol.30 Academic Press, New Cork, pp 89-99.
- Leatherland J.F., J.S: Ballantyne y G. Van der Kraak 1998. Diagnostic assesment of non-infectious disorders of captive and wild fish populations and the use fish as sentinels organisms of environmental studies., In: *Fish Diseases and Disorders* (eds J.F.Leatherland y P.Y. Woo) Cab. International pp 335-366.
- Lee, G. R.; Bithell, T. C.; Foerster, J.; Athens, J. W. & Lukens, J. N. 1998 *Wintrobe \_ Hematología clínica*. São Paulo, Manole.
- Lee, R. N., S. D. Gerking and B. Jezierska, 1983. Electrolyte balance and energy mobilization in acid stressed rainbow trout, *Salmo gairdneri* and their relation to reproductive stress. *Environ. Biol. Fish.*, 8: 115-123.
- Nakamoto, W.; Silva, A. J.; Machado, P. E. A. & Padovani, C. R. 1991. Glóbulos brancos e *Cyrtilia gomesi* (hemoparasita) em *Synbranchus marmoratus* Bloch, 1795 (PISCES, SYNBRANCHIDAE) da região de Birigui, SP. *Rev. Bras. Biol.*, 51(4):755-61,.
- Ranzani-Paiva, M. J. T. 1995. Células do sangue periférico e contagem diferencial de leucócitos de Tainha *Mugil platanus* Günther, 1880 (Osteichthyes, Mugilidae) da região estuarino-lagunar de Cananéia-SP *Bol. Inst. Pesca*, 22(1):23-40,
- Sarasquete, M. C. & Gutiérrez, M. 1982. Citomorfología y citoquímica de la sangre del pez sapo marino, *Halobatrachus didactylus* (Schneider, 1801). *Inv. Pesq.*, 46(2):171-84,
- Schütt, D.A.; Lehmann, J.; Goerlich, R. & Hamers 1997., R. Haematology of swordtail, *Xiphophorus helleri*. I: blood parameters and light microscopy of blood cells. *J. Appl. Ichthyol.*, 13:83-9,
- Silveira-Coffigny R., A. Prieto-Trujillo, F. Ascencio-Valle 2004. Effects of different stressors in haematological variables in cultured *Oreochromis aureus* S. *Comp. Bioch Physiol. C* 139: 245-250.
- Ueda, I. K.; Egami, M. I, Sasso W.S, Matushima, E. 2001 Cytochemical aspects of the peripheral blood cell of *Oreochromis(Tilapia) niloticus*. (Linnaeus, 1758) (CICHLIDAE, Teleostei)- Part II *Braz. J. Vet. Res. An. Sci* 38(6) 273-277

- Ueda, I. K.; Matushima, E. & Egami, M. I. 1997. Estudio hematológico do sangue periférico de *Oreochromis niloticus* (Linneus, 1758) (Cichlidae, Teleostei). *Braz. J. Vet. Res. An. Sci.*, 34(5):270-5,
- Veiga, M. L.; Egami, M. I.; Ranzani-Paiva, M. J. T. & Rodrigues, E. L. 2000. Aspectos morfológicos y citoquímicos de las células sanguíneas de *Salminus maxillosus* Valenciennes, 1840 (Characiformes, Characidae). *Rev. Chil. Anat.*, 18(2):245-250,.
- Prophet E.B., B. Mills, J.B. Arrington, L. H. Sobón, M.D 1995. Métodos Histotecnológicos. Instituto de Patología de las Fuerzas Armadas de los Estados Unidos de America (AFIP). pp153-155.
- Lison, L. 1960. Lipides et lipoproteines. In: LISON, L. *Histochemie et cytochimie animales. Principes et méthodes*. Paris, Gauthier-Villars,. V. 2. pp 449-530.

Trabajo recibido el 25/06/2005, nº de referencia **100501\_REDVET**. Enviado por la Comisión de Arbitraje para REDVET en la Universidad de Santa Clara. Publicado en **REDVET®** el 01/10/05. (Copyright) 1996-2005.

[Revista Electrónica de Veterinaria REDVET®](http://www.veterinaria.org), ISSN 1695-7504 - [Veterinaria.org®](http://www.veterinaria.org) - [Comunidad Virtual Veterinaria.org®](http://www.veterinaria.org) - Veterinaria Organización S.L.®

Se autoriza la difusión y reenvío de esta publicación electrónica en su totalidad o parcialmente, siempre que se cite la fuente, enlace con Veterinaria.org - [www.veterinaria.org](http://www.veterinaria.org) y **REDVET®** [www.veterinaria.org/revistas/redvet](http://www.veterinaria.org/revistas/redvet) y se cumplan los requisitos indicados en [Copyright](http://www.veterinaria.org/revistas/redvet/n101005.html)