

## Determinación de algunos aspectos hematológicos de *Oncorhynchus mykiss* (Salmonidae), en Cundinamarca, Colombia

Adriana Rodríguez Forero

Estación Piscícola Neusa. Corporación Autónoma Regional de Cundinamarca. C.A.R. Neusa. Cundinamarca, Colombia.

**Abstract:** Thirty-five normal, adult specimens of the rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* (Richardson, 1836) cultured in the Neusa Fishculture Station (73°38'28" W; 5°8'30"N) were studied to establish normal blood values; the hematopoietic tissues (pronephros, spleen and thymus), and other organs such as the stomach were also structurally studied. The rainbow trout collected in the second half of 1990 and the beginning of the first half of 1991 had 1 415 000 erythrocytes and 22 000 leukocytes per mm<sup>3</sup> of blood. Their hemoglobin concentration was 6.99 g/100ml. They had three types of circulating leukocytes: lymphocytes 65%, polymorphonuclears 24% and monocytes 11%. The pronephros is the major hematopoietic organ in the rainbow trout. It produces mainly the polymorphonuclears; the spleen and the thymus are lymphopoietic. The study of the hemocytometric values in the peripheral blood smears and the structure of the hematopoietic organs of the rainbow trout is very useful, accessible and inexpensive. It produces data which yield information about physiological and pathological conditions.

**Key words:** *Oncorhynchus mykiss*, hematology, seasonal variation, tropical.

En los últimos años se ha venido incrementando el cultivo de peces en Colombia, razón por la cual se hace necesario el estudio de valores normales, estructurales, morfológicos y fisiológicos de este grupo animal, con el fin de interpretar sus variaciones ante condiciones de enfermedad.

El propósito del presente estudio es conocer y normalizar algunos valores normales del cuadro hemático de la trucha arco iris, *Oncorhynchus mykiss* (Richardson 1836), como son el número de eritrocitos y leucocitos por mm<sup>3</sup>, la concentración de hemoglobina, el porcentaje de hematocrito y el volumen corpuscular medio; además, se procura realizar el recuento diferencial leucocitario por medio del extendido sanguíneo con el fin de obtener la frecuencia relativa de cada tipo celular y complementar estos hallazgos con análisis histológicos de los órganos hematopoyéticos y otros ricos en sangre.

## MATERIAL Y METODOS

Se estudiaron 35 truchas arco iris (*Oncorhynchus mykiss* Richardson 1836), aparentemente normales, machos en su mayoría, con promedio de peso y longitud total de 420 g y 325 mm, respectivamente, cultivadas en la Estación Piscícola del Neusa, la cual se encuentra situada dentro del Parque Forestal Represa del Neusa, administrado por la Corporación Autónoma Regional de Cundinamarca (C.A.R.). Se ubica a 3 000 msnm, entre los 73°38'28"W y 5°8'30" N, a 86 km de Santafé de Bogotá, Cundinamarca. Dicha estación presenta una temperatura ambiente de 10°C y del agua de 11°C; durante el año ocurren dos períodos de invierno que comprenden de abril a junio y de octubre a noviembre. El mes más seco es enero. La Estación Piscícola cumple las funciones de producción y fomento a mediana y pequeña escala del cultivo de trucha arco iris

(*Oncorhynchus mykiss*); además de realizar investigaciones biológicas con fines de conservación y aprovechamiento de especies ícticas nativas de la región: Capitán de la Sabana (*Eremophilus mutisii*), Capitanejo (*Pygidium* sp - *Trichomyxterus bogotensis*) y Guapucha (*Grundulus bogotensis*).

Los peces, muestreados entre el segundo semestre de 1990 y el primer semestre de 1991, fueron anestesiados utilizando tricaina metano sulfonato (MS222) durante 3 a 4 min. (Deufel y Pollnitz 1977). La sangre fue recolectada por punción de la vena cardinal común o por punción cardíaca con jeringas plásticas heparinizadas, luego de lo cual se traspasó a tubos de vidrio anticoagulados con 0.1 ml de heparina, (Reichenbach-Klinke 1982). Se hicieron extendidos sanguíneos a partir de la sangre que brotó libremente de cualquiera de las punciones efectuadas (Junqueira 1981).

Los animales a los que se les recolectó la sangre por punción cardíaca fueron sacrificados con el fin de obtener los órganos hematopoyéticos: pronefros, bazo y timo, además de otros órganos ricos en sangre como el tubo digestivo y el hígado, los cuales fueron fijados en formol al 10%, para posterior procesamiento, como se describe más adelante (Drury y Wallington 1980).

Una vez obtenidas las muestras sanguíneas, se trabajó con métodos manuales para el conteo de células sanguíneas por medio de la cámara de Neubauer, empleando solución salina para el recuento de eritrocitos y reactivo de Turck para el recuento de leucocitos (Miales 1985, Lucas y Jamruz 1988, Stoskopf 1988). Se empleó el método de la cianometahemoglobina para hallar el porcentaje de eritrocitos que ocupan 100 ml (Roberts 1981, Heming 1989).

El extendido sanguíneo teñido con colorante de Giemsa se estudió con el fin de analizar la morfología celular y el recuento diferencial leucocitario, contando cada tipo de leucocito hasta completar 100 (Junqueira 1981, Reichenbach-Klinke 1982). Su tamaño se midió usando un ocular graduado para tal efecto.

Los tejidos se procesaron para histología después de 24 hr de haberse fijado en formol; se colocaron en un Autotecnicón donde se deshidrataron en alcoholes de concentraciones ascendentes (50 a 100%); se lavaron en acetona y fueron aclarados con xilol; además, este último reactivo prepara los tejidos para impregnación

en parafina e inclusión en la misma, para luego hacer cortes en el micrótomo y tinción con Hematoxilina-Eosina (Drury y Wallington 1980, Roberts 1981, Fawcet 1986).

## RESULTADOS

La trucha arco iris *Oncorhynchus mykiss* estudiada en la Estación Piscícola del Neusa tiene 1 415 000 eritrocitos y 22 000 leucocitos/mm<sup>3</sup> de sangre. Su concentración de hemoglobina es de 6.99g/dl (Cuadro 1).

CUADRO 1

*Promedio de los resultados obtenidos del cuadro hemático normal de la Trucha Arco Iris (Oncorhynchus mykiss) de la Estación Piscícola del Neusa. C.A.R.*

Parámetro	Media	Desviación estándar
Glóbulos rojos	1415000 / mm <sup>3</sup>	0.25
Glóbulos blancos	22000 / mm <sup>3</sup>	0.99
Hemoglobina	6.99 g / dl	2.99
Hematocrito	40.7 %	8.66
Volumen corpuscular medio	294.2 fl	75.52
Hemoglobina corpuscular media	50.05 pg	21.43
Concentración de hemoglobina corpuscular media	17.23 %	8.69

Posee tres tipos de leucocitos circulantes: linfocitos (65%), polimorfonucleares (24%) y monocitos (11%). No posee eosinófilos, ni basófilos. Los trombocitos sólo se observaron ocasionalmente.

Los eritrocitos, de forma elipsoidal, con tamaño promedio de 20 X 12 µm, son células relativamente grandes, eosinófilas, de núcleo picnótico y amplio citoplasma. En los tejidos procesados para histología resaltan por su intensa eosinofilia (Fig. 1).

Hay criterios morfológicos claros, principalmente nucleares, para diferenciar los tres tipos de leucocitos: los linfocitos tienen núcleo redondeado que ocupa la mayor parte de la célula. En los frotis sanguíneos, teñidos con Giemsa, son basófilos y representan las células que se observan en mayor cantidad. Presentan dos formas: redondeados de membrana citoplasmática uniforme, "lisa" y redondeados con

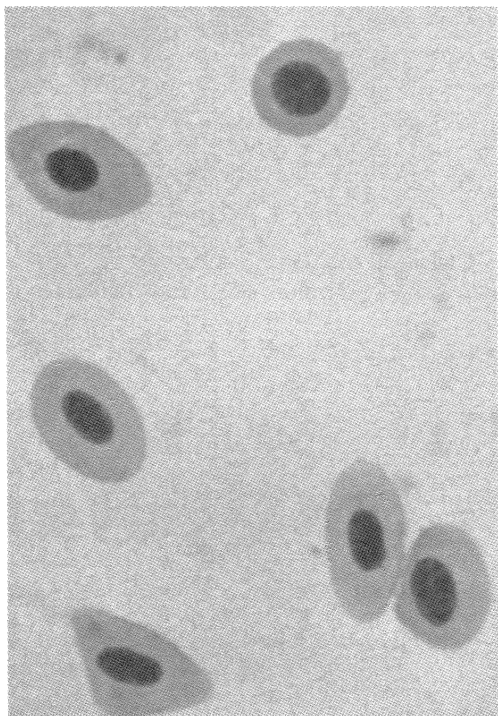


Fig. 1. Frotis de sangre periférica de trucha arco iris adulta, teñido con Giemsa. Abajo se observan dos eritroblastos (e), de citoplasma basófilo, el resto, son eritrocitos caracterizados por su citoplasma eosinófilo.

pseudópodos (Fig.2). Tienen un tamaño promedio de 8  $\mu\text{m}$ . En los extendidos sanguíneos se observan linfocitos pequeños, medianos y grandes; los primeros son los más abundantes.

En los tejidos los linfocitos se identifican por su forma redondeada y su alta basofilia. El bazo, el pronefros y el timo son los órganos donde se forman.

Los polimorfonucleares, más que por su granulación citoplasmática, se caracterizan por la marcada lobulación nuclear (Fig. 3); pueden ser discoides o redondeados y miden entre 6 y 11  $\mu\text{m}$  de diámetro; los gránulos no se demuestran consistente y nítidamente con la coloración de Giemsa, por lo cual se determinó eliminar el término neutrófilo. Su citoplasma es basófilo. Se originan en el pronefros, órgano en el cual se presentan en gran cantidad.

Los monocitos tienen núcleo indentado o en ensenada, con 8  $\mu\text{m}$  de diámetro promedio y forma redondeada; el citoplasma es azul pálido a gris, es vacuolado y más abundante que el de los linfocitos.

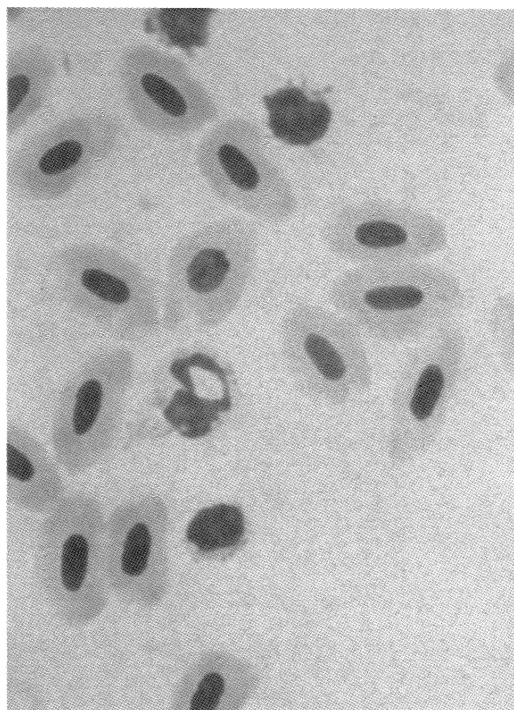


Fig. 2. Frotis de sangre periférica de trucha arco iris adulta, teñido con Giemsa. Se observan numerosos eritrocitos y linfocitos con prolongaciones (l).

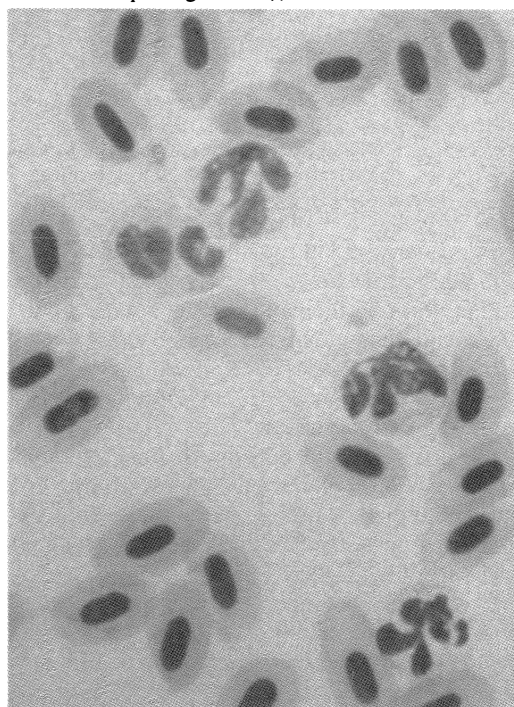


Fig. 3. Frotis de sangre periférica de trucha arco iris adulta, teñido con Giemsa. Se observan múltiples eritrocitos eosinófilos y cuatro polimorfonucleares (PMN) en los que resalta la lobulación marcada del núcleo. No se demuestran gránulos citoplasmáticos y uno de ellos muestra vacuolización citoplasmática.

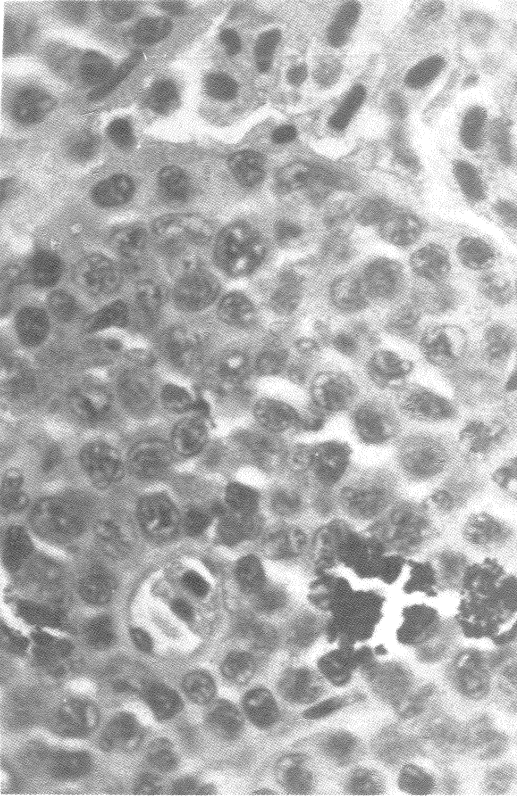


Fig. 4. Corte histológico de pronefros de trucha arco iris teñido con Hematoxilina-Eosina, que muestra tejido hematopoyético en el que se identifican estadios inmaduros en la formación de los polimorfonucleares, además de melanocitos.

El pronefros es el mayor órgano hematopoyético de la trucha arco iris. Es un tejido basófilo que forma principalmente los polimorfonucleares. Además, contiene numerosos melanomacrófagos (Fig. 4). Posee sinusoides revestidos por células grandes de citoplasma marcadamente eosinófilo granular.

El bazo posee una cápsula fina cubierta por mesotelio. La pulpa blanca es rica en linfocitos y plasmocitos y la pulpa roja contiene grandes sinusoides en donde los macrófagos fagocitan eritrocitos desgastados (Fig. 5).

El timo es un órgano pequeño con cápsula colágena tenue, repleto de linfocitos pequeños homogéneos que le dan un efecto global intensamente basófilo.

El tubo digestivo se estudió para observar si contiene el tejido linfoide tan desarrollado en otras especies, (Fawcett 1981, Junqueira 1981). No se demostraron nódulos linfoides. En el es-

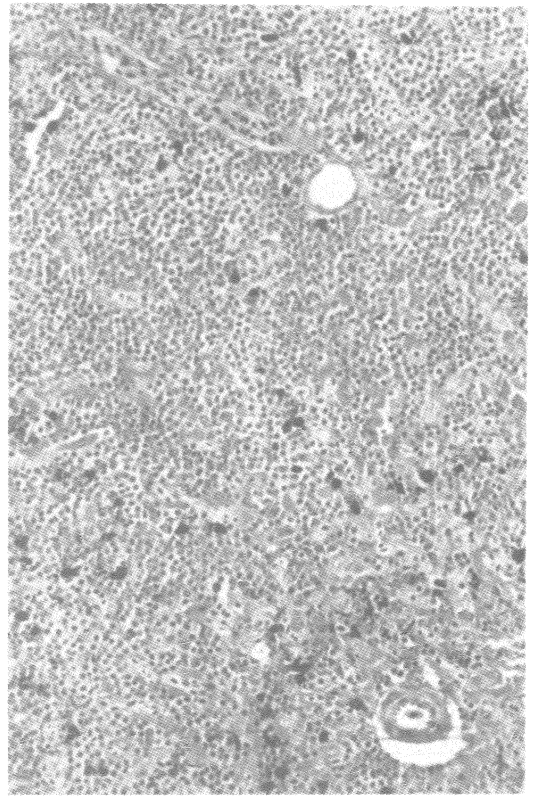


Fig. 5. Corte histológico de bazo de trucha arco iris teñido con Hematoxilina-Eosina en el que se observa tejido linfoyótico en el cual se identifica la pulpa blanca y la pulpa roja. Se reconocen los centros melanomacrófagos.

tómago, en la llamada capa granulosa, se ven numerosas células de citoplasma granular eosinófilo (Fig. 6), que no tienen nada que ver con los eosinófilos sanguíneos de otras especies, pues no se observaron circulando y su núcleo no es lobulado; posiblemente sean macrófagos o células secretorias cuya composición y función vale la pena investigar.

En el hígado no se demostró función hematopoyética.

## DISCUSION

Los resultados observados por los métodos de punción cardíaca o punción venosa son similares. La diferencia radica en que con el primer método se ocasiona la muerte del animal.

Los resultados obtenidos para el recuento diferencial leucocitario, el hematocrito y la

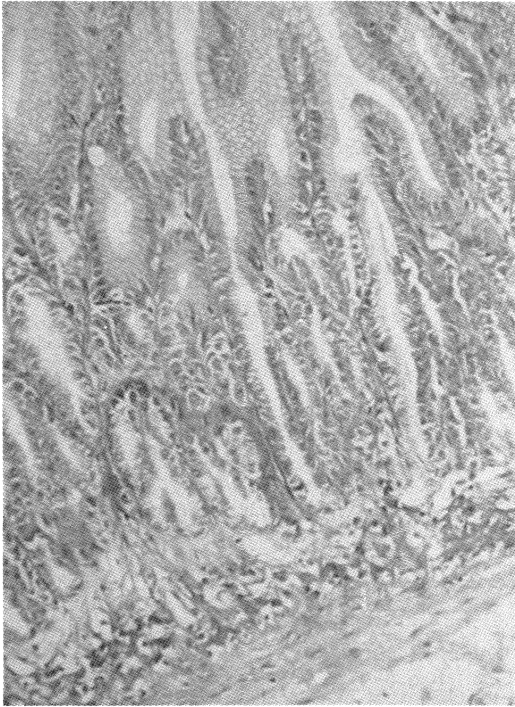


Fig. 6. Corte histológico de estómago de trucha arco iris teñido con Hematoxilina-Eosina. Por debajo de las glándulas gástricas se identifica la capa de células granulosas cuyo citoplasma se tiñe intensamente con la eosina.

hemoglobina fueron similares a los informados por Halley y Weiser (1985). En la trucha arco iris, Reichenbach-Klinke (1982), informa resultados semejantes. El volumen corpuscular medio de 290.2% varía apreciablemente si se compara con los resultados obtenidos por Halley y Weiser (1983) y de Reichenbach-Klinke (1982), de 346% y 420%, los cuales varían entre sí.

El número promedio de eritrocitos de 1 415 000/ $\mu$ l se encuentra dentro de los valores encontrados en trucha arco iris en otros países: 1 670 000/ $\mu$ l en Alemania, Reichenbach-Klinke (1982), 1 020 000 - 1 070 000/ $\mu$ l en Estados Unidos, (Yasutake y Wales 1983) y 1580000/ $\mu$ l en Estados Unidos (Haley y Weiser 1985). Son muchos los factores que intervienen en estas variaciones: pueden deberse al medio ambiente, alteraciones del comportamiento, concentración de oxígeno en el agua, contaminación, época de desove, nutrición y trópico: Heming (1989), Haider (1977), Reichenbach-Klinke (1982).

Los recuentos leucocitarios se acercan a los referidos por Deufel y Pollnitz (1977), y Yasutake y Wales (1983) y difieren ampliamente de los registrados por Reichenbach-Klinke (1982).

Yasutake y Wales (1983), encontraron en juveniles de *O. mykiss*, 89 a 98 % de linfocitos en recuentos diferenciales leucocitarios, resultados no comparables con los obtenidos en este trabajo.

En los polimorfonucleares no se distinguieron los gránulos citoplasmáticos característicos de esta célula con la coloración de Giemsa y estudios al microscopio de luz. El nombre de polimorfonuclear es el indicado, pues refleja su clara maduración nuclear. Con el microscopio electrónico (estudios en preparación) se demuestran claramente los gránulos. Sería interesante ensayar varios métodos tintoriales para demostrar estos gránulos al microscopio de luz así como explicar histoquímicamente por qué no se tiñen con el colorante de Giemsa.

Llama la atención la ausencia de eosinófilos en esta especie, que quizá supla su función a través de los polimorfonucleares. Los eosinófilos aparecen evolutivamente como respuesta de los vertebrados al parasitismo (Gleich y Loegering 1984, Kay 1985).

La estructura de los órganos linfoides (bazo, pronefros y timo) ofrece una serie de preguntas interesantes: ¿Qué significado tiene la presencia tan abundante de melanomacrófagos en el bazo y el pronefros?, ¿Cuál es su función? , ¿Porqué están estas células en las visceras, si en los reptiles y mamíferos son subepidérmicas o epidérmicas y destinadas a la protección de la luz ultravioleta del sol? (Junqueira 1981, Fawcett 1986).

Finalmente, la falta de tejido linfoide en el tubo gastro-intestinal es llamativa y también distinta a lo que ocurre en los mamíferos. En éstos es abundante y representa una modulación o adaptación funcional al estímulo antigénico recibido por la vía oral. Quizás este estímulo antigénico no es tan exigente en la trucha y por eso no desarrolla tejido linfoide intestinal abundante.

#### AGRADECIMIENTOS

La autora agradece a Gerzaín Rodríguez Toro por su valiosa dirección y a Andrés Eraso y Rafael Rosado por permitir utilizar los animales para este estudio.

## RESUMEN

Se estudiaron los cuadros hemáticos y se hicieron análisis histológicos de los órganos hematopoyéticos de 35 truchas arco iris en la Estación Piscícola del Neusa (73° 38' 28" W y 5° 8' 30" N) entre 1990 - 1991, obteniendo 1 415 000 eritrocitos y 22 000 leucocitos/mm<sup>3</sup> cúbico de sangre, 6.99 g/100 ml. de hemoglobina y tres tipos de leucocitos: linfocitos (65%), polimorfonucleares (PMN) (24%) y monocitos (11%). El pronefros es el mayor órgano hematopoyético de la trucha arco iris, formador principal de los PMN; el bazo es linfopoyético al igual que el timo. El estudio hemático, el recuento diferencial leucocitario y el análisis histológico de la trucha arco iris es útil, accesible y económico, produciendo datos que informan sobre condiciones fisiológicas y de enfermedad.

## REFERENCIAS

- Alvarado, E. & J.M. Castro. 1980. Estudio anatomo-histológico del tiburón con especial referencia a los órganos hematopoyéticos. Tesis Facul. Biología Marina, Universidad Jorge Tadeo Lozano, Cartagena. 36 p.
- Bogner, K. & A. Ellis. 1977. Propiedades y funciones de los linfocitos y tejidos linfoides de los peces teleosteos, Acribia, Zaragoza. p. 71-85
- Deufel, J. & C. Pollnitz. 1977. Diagnóstico citohematológico de algunas enfermedades de la trucha arco iris (*Salmo gairdnerii*, Richardson), Acribia, Zaragoza. p. 25-37.
- Drury, R., & E. Wallington. 1980. Carleton's histological technique. Oxford University, Oxford. 530 p.
- Fawcet, D.M. 1981. The cell. Saunders, Filadelfia. 757 p.
- Fawcet, D.M. 1986. A textbook of histology. Saunders, Filadelfia. 879 p.
- Gleich, G.J. & D. Loegering. 1984. Immunobiology of eosinophils. Ann.Rev. Immunol. 2:429-459.
- Haider, G. 1977. Modificaciones hematológicas en peces tratados con diferentes metales pesados. Acribia, Zaragoza. p. 36-48.
- Halley, P.J. & M. Weiser. 1985. Erythrocyte volume distribution in rainbow trout. Am. J. Vet. Res. 2210-2212.
- Heming, T.A. 1989. Clinical studies on fish blood: importance of sample collection and measurement techniques. Am. J. Vet. Res. 50. 93-97.
- Junqueira, L.C. 1981. Histología básica. Salvat, Barcelona. 389 p.
- Kay, A.B. 1985. Eosinophils as effector cells in immunity and hypersensitivity disorders. Clin. Exp. Immunol. 62:1-12.
- Lucas, A., & C. Jamruz. 1988. Atlas of avian hematology. Michigan State University, Ann Arbor 432 p.
- Miales, J. 1985. Hematología: medicina de laboratorio. Reverté, Barcelona. 754 p.
- Reichenbach-Klinke, H. 1982. Enfermedades de los peces. Acribia, Zaragoza. p. 1-47.
- Roberts, R. 1981. Patología de los peces. Mundi Prensa, Madrid. p. 274-313.
- Stoskopf, M. 1988. Fish tropical medicine. Vet. Clin. N.A. 18:1-475.
- Warren, A. 1959. Textbook of comparative histology. Oxford University, Oxford. 273 p.
- Yasutake, W. & J. Wales. 1983. Microscopic anatomy of salmonids: An Atlas. Fish and Wildlife Service. Washington, D.C. 207 p.