

Short Communication

Método rápido para la cuantificación de leucocitos sanguíneos y su utilidad en la evaluación del estado de salud en trucha arcoíris *Oncorhynchus mykiss*

**Libertad Alzamora-Gonzales¹, Carolina de Amat-Herbozo¹, Erasmo Colona-Vallejos¹
Elizabeth Cervantes-Aguilar², Richard Dyer Velarde-Álvarez²
Ronald Aquino-Ortega¹ & Miguel Ángel Aguilar-Luis¹**

¹Laboratorio de Inmunología, Instituto de Investigación de Ciencias Biológicas
Antonio Raimondi, Universidad Nacional Mayor de San Marcos
Av. Universitaria s/n, Ciudad Universitaria de San Marcos, Lima, Perú

²Cytometric Bioservices S.A.C., Av. José Gálvez Barrenechea N°387, San Isidro, Lima, Perú
Corresponding autor: Libertad Alzamora Gonzales (lalzamora@unmsm.edu.pe)

RESUMEN. El análisis de la proporción y cantidad de células sanguíneas es una forma muy confiable de evaluar el estado de salud en humanos y otras especies. El objetivo fue estandarizar una metodología para la cuantificación rápida de poblaciones de leucocitos sanguíneos de *Oncorhynchus mykiss* (trucha arcoíris). Se procesaron muestras de leucocitos obtenidos de la sangre de un grupo de truchas juveniles saludables mantenidas en el laboratorio. Las muestras fueron analizadas empleando el minicitómetro Scepter™ y los resultados fueron contrastados con los obtenidos por citometría de flujo. Los histogramas generados por ambos métodos mostraron un máximo correspondiente a la población de linfocitos/trombocitos y otro a la de monocitos/neutrófilos. No se encontraron diferencias significativas entre los resultados de ambos métodos ($P > 0,05$). El método con el minicitómetro se utilizó para evaluar muestras de truchas procedentes de una piscigranja, el perfil obtenido mostró la disminución significativa de neutrófilos compatible con los signos clínicos de enfermedad observados en los especímenes evaluados. Estos resultados indican que la metodología aplicada es válida y útil para determinar las concentraciones y proporciones celulares en muestras de sangre en trucha arcoíris y permiten el análisis rápido de su estado de salud.

Palabras clave: *Oncorhynchus mykiss*, trucha arcoíris, hemogramas en peces, leucocitos sanguíneos, acuicultura.

Rapid method for counting of blood leukocytes and its usefulness in health status assessment of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*)

ABSTRACT. The analysis of the ratio and number of blood cells is a very reliable way to assess the health status in humans and other species. The aim was to standardize a methodology for rapid quantification of blood leukocytes in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. Samples of blood leukocytes obtained from a group of healthy juvenile trout maintained in the laboratory were processed. The samples were analyzed using a Scepter™ minicytometer, the results were compared with those obtained by flow cytometry. Histograms generated by both methods showed a peak corresponding to the population of lymphocytes/thrombocytes and one of monocyte/neutrophil. Non-significant differences were found between the results of both methods ($P > 0.05$). The method employing minicytometer was used to evaluate samples of trout from a fish farm, the profile obtained showed a significant decrease in the neutrophils consistent with clinical signs of disease observed in the tested specimens. These results indicate that the methodology is valid and useful in determining the concentrations and cell proportions in blood samples of rainbow trout and allow rapid analysis of its health status.

Keywords: *Oncorhynchus mykiss*, rainbow trout, blood counts in fish, blood leukocytes, aquaculture.

La trucha arcoíris *Oncorhynchus mykiss* es una especie con alto grado de adaptabilidad a condiciones artificiales de cría, lo cual ha favorecido la intensificación de su producción en varios países del mundo, especialmente en los últimos años.

Las condiciones en que los peces se crían los exponen a problemas de contaminación del agua y crean una serie de limitaciones fisiológicas que provocan estrés y brotes epizooticos, causados por diversos microorganismos patógenos perjudicando así la economía de las empresas productoras. La oportuna evaluación y monitoreo del estado de salud de los animales es importante porque ayuda a prevenir y controlar oportunamente estos problemas (Bueñaño, 2010), facilitado por el desarrollo de una serie de herramientas biotecnológicas.

Las alteraciones en los parámetros hematológicos constituyen un buen indicativo del estado de salud en vertebrados (Blaxhall, 1972; Amend & Smith, 1975; Clauss *et al.*, 2008; Bueñaño, 2010). El grado y tipo de alteración varía según la especie y agente causal. Así, en algunas especies incluyendo la trucha arcoíris, se ha observado que la proporción de leucocitos, linfocitos, monocitos, trombocitos y/o neutrófilos aumenta o disminuye según se trate de un proceso infeccioso o una exposición a productos químicos contaminantes (Amend & Smith, 1975; Sjöbeck *et al.*, 1984; Gill & Pant, 1985; Oluah & Mgbenka, 2004; Velisek *et al.*, 2009; Zorriehzahra *et al.*, 2010; Li *et al.*, 2011).

Para este tipo de estudios se puede optar por realizar un hemograma convencional. Sin embargo, este método puede tomar mucho tiempo, sin mencionar la dificultad en diferenciar los diferentes tipos celulares presentes en trucha arcoíris. Además, la citometría de flujo ha resultado ser una técnica rápida y muy confiable para cuantificar y caracterizar algunas poblaciones celulares y estudiar procesos inmunopatológicos en peces (Morgan *et al.*, 1993; Chilmonczyk & Monge, 1999). Para trucha arcoíris, la citometría de flujo permite diferenciar básicamente la población de eritrocitos, linfocitos/trombocitos y granulocitos, facilitando el monitoreo de la dinámica de la población celular de manera rápida y confiable (Morgan *et al.*, 1993). No obstante, esta técnica por su de elevado costo, es poco accesible.

El objetivo del presente trabajo fue estandarizar una metodología para cuantificar poblaciones de leucocitos en sangre de juveniles de trucha arcoíris utilizando el contador celular Scepter™ 2.0 (Merck Millipore), comparando los datos con los obtenidos por citometría de flujo (Gold standard). Además, se evaluó su potencial para diferenciar el estado inmunológico de especímenes sanos y con signos clínicos de enfermedad (oscurecimiento del cuerpo, exoftalmia, etc.).

Para la estandarización del método, se evaluó un grupo de truchas juveniles saludables ($n = 12$), procedentes de Canta (Lima, Perú), que fueron mantenidas durante 2 meses en acuarios del Laboratorio de Inmunología de la Facultad de Ciencias Biológicas (Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima, Perú), para verificar su estado y descartar una posible infección. Los especímenes se anestesiaron empleando MS-222 (Sigma), las muestras de sangre se extrajeron por punción cardíaca o de la vena caudal en tubos con EDTA y se mantuvieron en frío hasta su procesamiento dentro de las 24 h siguientes.

Los eritrocitos de las muestras fueron eliminados por lisis hipotónica siguiendo el método de Crippen *et al.* (2001) con ligeras modificaciones. Se tomaron 200 μL de la sangre obtenida y se agregaron 200 μL de una mezcla de solución Alsever con solución de Hank (1:1). Se adicionaron 3,6 mL de agua destilada a 4°C y se incubó por 30 s invirtiendo el tubo dos veces para mezclar. Para detener la lisis se agregó 400 μL de PBS 10X. Se centrifugó a 700 g por 10 min, se retiró cuidadosamente el sobrenadante, el *pellet* de leucocitos se resuspendió en 800 μL de solución Alsever- Hank (1:1) y se analizaron por citometría de flujo ($n = 6$) y con el minicitómetro Scepter™ 2.0 ($n = 6$).

Para las pruebas de citometría se empleó el citómetro de flujo BD FACS Calibur y las células se identificaron con anticuerpos policlonales contra leucocitos de trucha arcoíris obtenidos en ratón. Los anticuerpos se marcaron con Fab-anti Fc de ratón (IgG1) unido a alofococianina (Zenon® de Invitrogen), se adquirió un total de 20.000 eventos por cada muestra y los datos obtenidos se analizaron con el programa WinList 3D 8.0. Para la cuantificación de leucocitos empleando el Scepter™ 2.0 se siguieron las instrucciones del fabricante, la suspensión de leucocitos se diluyó 1:10 (5×10^5 células mL^{-1} aproximadamente) y se leyó con un sensor de 40 μm . Los histogramas generados fueron analizados con Scepter Software Pro.

Para verificar la utilidad del método rápido descrito, empleando Scepter™ 2.0, se procesaron muestras de sangre de 12 truchas con signos clínicos de enfermedad (exoftalmia, oscurecimiento del cuerpo o hinchazón abdominal), procedentes de la Piscigranja Municipal de Callahuanca, Provincia de Huarochiri-Departamento de Lima, Perú ($11^{\circ}49'35.39''\text{S}$, $76^{\circ}37'7.1''\text{W}$). El peso promedio de las truchas evaluadas criadas en laboratorio fue de 35 g y la talla media de 16 cm, estos son juveniles de edad promedio de 4 meses. En el caso de las truchas procedentes de la Piscigranja, el peso medio fue de 46 g y la talla media de 20 cm, que se extrajeron de las pozas de juveniles. Sin embargo, es probable que el peso y talla de estos especímenes estén

influenciados por el mal estado de salud que mostraban al momento de la evaluación.

Mediante la prueba *t*-Student se compararon los valores porcentuales obtenidos por el método Scepter™ 2.0 y citometría de flujo; y las concentraciones celulares que resultaron con Scepter™ 2.0 para las muestras procedentes de las truchas saludables ($n = 12$) y con signos de enfermedad ($n = 12$).

Los gráficos de puntos Forward scatter vs Side scatter obtenidos por citometría de flujo indican tres poblaciones (Fig. 1a). La población más densa (71.9-74.0%) fue aquella de menor tamaño y granularidad (R1), que correspondería principalmente a la población de linfocitos y en muy baja proporción a la de trombocitos. Las otras dos poblaciones son menos densas (6,7-10,5 y 17,9-19,9%), de mayor tamaño y complejidad, correspondiente a poblaciones de monocitos y polimorfonucleares (R2 y R3 respectivamente). Los histogramas de las muestras presentan dos máximos (Fig. 1b), de los cuales el primero y más alto

corresponde a la población R1 y el segundo a una superposición de las otras dos poblaciones (R2 y R3).

Los histogramas de muestras de truchas saludables obtenidos por Scepter™ presentaron un patrón similar a los de citometría de flujo (Fig. 1c). Los marcadores de los dos máximos se describen en el Scepter software Pro como O1 (primer máximo) y O2 (segundo máximo). No se encontraron diferencias significativas al comparar los porcentajes de los marcadores O1 con el correspondiente al primer máximo de citometría de flujo ($P = 0,48$) ni de los marcadores O2 con el segundo máximo ($P = 0,39$) (Tabla 1). Sin embargo, los valores obtenidos con Scepter™ presentan mayor desviación estándar.

El método Scepter™ tiene la ventaja de proporcionar datos de porcentaje y concentración de células en una muestra considerando el factor de dilución. En el análisis realizado se obtuvo un promedio general de $23,82 \pm 4,39 \times 10^6$ cél mL⁻¹, que coincide con los resultados de otros autores para trucha arcoíris

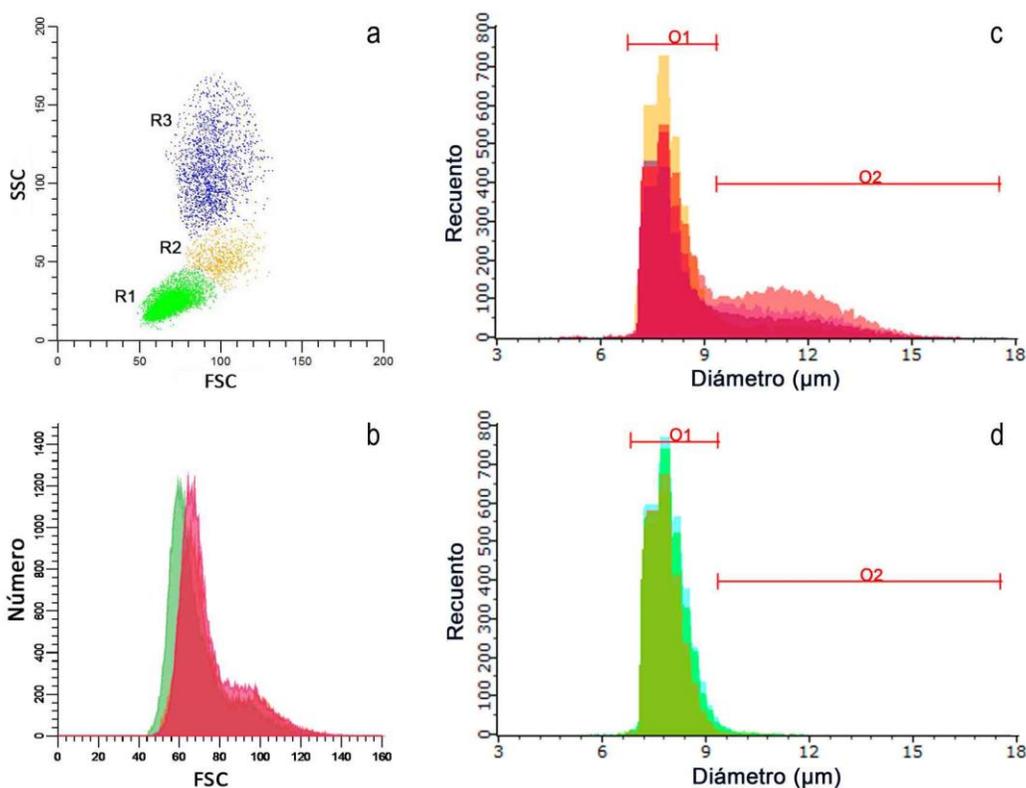


Figura 1. Muestras de leucocitos de sangre de trucha arcoíris. a) Gráfica de puntos obtenida por citometría de flujo donde se definen las poblaciones R1 de linfocitos/trombocitos (verde), R2 de monocitos (anaranjado) y R3 de polimorfonucleares (azul), b) histogramas de ejemplares saludables generados por citometría de flujo. Se observa un primer máximo que representa a R1 unido a un segundo máximo correspondiente a una superposición de R2 con R3, c) histogramas de truchas saludables generados por Scepter, que presentan el mismo perfil del histograma generado por citometría de flujo, se muestran las regiones O1 y O2 delimitadas, d) histogramas de truchas con signos clínicos de enfermedad generados por Scepter™, los cuales presentan menor cantidad de células en la región O2, con respecto a los histogramas de truchas saludables.

Tabla 1. Comparación de porcentajes de leucocitos de sangre de truchas saludables utilizando Scepter™ y citometría de flujo. PROM: promedio; DE: desviación estándar; Región O1: primer máximo del histograma para Scepter™ y citometría de flujo; Región O2: segundo máximo del histograma para Scepter™ y citometría de flujo; N° de muestras evaluadas: 12. Las evaluaciones por ambos métodos (Scepter y citometría de flujo) se realizaron por duplicado.

Método	Región O1		Región O2	
	% PROM	DE	% PROM	DE
Scepter™	73,9	11,14	27,3	11,54
Citometría de flujo	78,9	6,00	20,9	5,85

Tabla 2. Comparación de las concentraciones de leucocitos de sangre de trucha arcoíris saludable y de truchas con signos clínicos de enfermedad, utilizando Scepter™. Región O1: Primer máximo del histograma para Scepter™ y citometría de flujo. Región O2: Segundo máximo del histograma para Scepter™ y citometría de flujo. (*) $P < 0,05$.

Leucocitos	Región O1	Región O2
	N° células x 10 ⁶ mL ⁻¹	N° células x 10 ⁶ mL ⁻¹
Truchas saludables (n = 12)	17,63 ± 3,79	6,19 ± 3,42
Truchas con signos de enfermedad (n = 12)	19,98 ± 3,06	0,25 ± 0,11*

(Yasutake & Wales, 1983; Crippen *et al.*, 2001; Bueñaño, 2010).

Por otro lado, empleando Scepter™ se observaron diferencias significativas ($P < 0,05$) entre las muestras de sangre de truchas saludables adaptadas al laboratorio y truchas con signos de enfermedad procedentes de la piscigranja. En estas últimas muestras se observó mayor porcentaje en el máximo correspondiente a linfocitos, que alcanzó un promedio de $98,83 \pm 0,39\%$; mientras que en la región de los otros leucocitos, el porcentaje bajó a un promedio de $1,37 \pm 0,47\%$.

El empleo del Scepter™ permitió calcular la concentración celular en las muestras de sangre de trucha y se pudo evaluar el aumento o disminución de células de cada región, independientemente de su proporción. De esta manera, se pudo determinar que el máximo correspondiente a linfocitos fue relativamente superior (O1), sin mostrar diferencias significativas respecto a las muestras de truchas mantenidas en laboratorio; mientras que la diferencia entre el número de células de la región O2 (segundo máximo) fue significativamente inferior en las truchas con signos de enfermedad, con disminución en la cantidad de monocitos y neutrófilos (neutropenia) (Fig. 1d) (Tabla 2).

El método de recuento de células sanguíneas de trucha arcoíris empleando el minicitómetro Scepter™ 2.0 (Merck Millipore) permite determinar las concentraciones y proporciones celulares en muestras de sangre, apostando de una imagen rápida del estado de salud de los especímenes evaluados. Sin embargo, para el análisis de mayor precisión es recomendable realizar evaluaciones mediante citometría de flujo

utilizando anticuerpos monoclonales, ya que lo anticuerpos policlonales no permitieron discriminar adecuadamente las poblaciones celulares, por esta razón los resultados se basan en los parámetros de citometría de flujo: Fordware scatter vs Side scatter.

Estos resultados muestran que el método utilizado para la cuantificación de linfocitos y otros leucocitos empleando Scepter™ es válido y útil para el análisis rápido del estado de salud de trucha arcoíris. El método también tiene la cualidad que no es necesario sacrificar a los especímenes, pues no se utiliza el bazo o el riñón anterior para determinar la cantidad de las células que participan en la inmunidad. En cuanto a rapidez tiene ventaja sobre la cuantificación por hemograma convencional, la cual es muy laboriosa y requiere mayor experiencia, emplea mayor tiempo aunque proporciona mayores detalles. Finalmente, los resultados indican que el método Scepter™ es comparable a la citometría de flujo con la ventaja de ser más económico.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen al Consejo Nacional de Ciencia, Tecnología e Innovación Tecnológica (Proyecto FONDECYT 393-2012-CONCYTEC-OAC) por el financiamiento otorgado para la realización del estudio.

REFERENCIAS

Amend, D.F. & L. Smith. 1975. Pathophysiology of infectious hematopoietic necrosis virus disease in

- rainbow trout: hematological and blood chemical changes in moribund fish. *Infect. Immunol.*, 11(1): 171-179.
- Blaxhall, P. 1972. The haematological assesment of the health of freshwater fish. *J. Fish Biol.*, 4: 593-604.
- Bueñaño, M.V. 2010. Hemograma de trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*) en tres etapas de producción en la cuenca alta de la provincia del Napo, Ecuador. *Bol. Téc. 9, Ser. Zool.*, 6: 1-14.
- Chilmonczyk, S. & D. Monge. 1999. Flow cytometry as a tool for assessment of the fish cellular immune response to pathogens. *Fish. Shellfish Immunol.*, 9: 319-333.
- Clauss, T.M., A.D.M. Dove & J.E. Arnold. 2008. Hematologic disorders of fish. *Vet. Clin. Exot. Anim.*, 11: 445-462.
- Crippen, T.L., L.M. Bootland, J.C. Leong, M.S. Fitzpatrick, C.B. Schreck & A.T. Vella. 2001. Analysis of salmonid leukocytes purified by hypotonic lysis of erythrocytes. *J. Aquat. Anim. Health*, 13: 234-245.
- Gill, T.S. & J.C. Pant. 1985. Mercury-induced blood anomalies in the freshwater teleost *Barbus conchoniuis* Ham. *Water Air Soil Pollut.*, 24(2): 165-171.
- Li, Z.H., V. Zlabek, J. Velisek, R. Grabic, J. Machova, J. Kolarova, P. Li & T. Randak. 2011. Acute toxicity of carbamazepine to juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): effects on antioxidant responses, hematological parameters and hepatic EROD. *Ecotox. Environ. Safe.*, 74: 319-327.
- Morgan, J.A.W., T.G. Pottinger & P. Rippon. 1993. Evaluation of flow cytometry as a method for quantification of circulating blood cell populations in salmonid fish. *J. Fish Biol.*, 42(1): 131-141.
- Oluah, N.S. & B.O. Mgbenka. 2004. Effect of actellic 25 EC on the differential leucocyte counts of the catfish *Clarias albopunctatus* (Nichole & Lamonte, 1953). *Anim. Res. Int.*, 1(1): 52-56.
- Sjöbeck, M.L., C. Haux, Å. Larsson & G. Lithner. 1984. Biochemical and hematological studies on perch, *Perca fluviatilis*, from the cadmium-contaminated river Emån. *Ecotox. Environ. Safe.*, 8(3): 303-312.
- Velisek, J., Z. Svobodova & V. Piackova. 2009. Effects of acute exposure to bifenthrin on some haematological, biochemical and histopathological parameters of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Vet. Med-Czech.*, 54(3): 131-137.
- Yasutake, W. & J. Wales. 1983. Microscopic anatomy of salmonids: an atlas. Fish and Wildlife Service, Washington D.C., 207 pp.
- Zorriehzahra, M.J., M.D. Hassan, M. Gholizadeh & A.A. Saidi. 2010. Study of some hematological and biochemical parameters of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fry in western part of Mazandaran province, Iran. *J. Fish. Sci.*, 9(1) 185-198.

Received: 22 August 2014; Accepted: 26 September 2015