

## Cytospin, una alternativa para el estudio y caracterización morfológica de hemocitos de camarones peneidos (Crustacea: Decapoda)

Antonio Joel Ruiz-Urbe \*, Gabriel Aguirre-Guzmán \*, Víctor Alonso Urbina-González \*

### Resumen

**Cytospin, una alternativa para el estudio y caracterización morfológica de hemocitos de camarones penéidos (Crustacea: Decapoda).** *La hemolinfa puede ser usada como una alternativa para determinar el estado de salud de los camarones, pero es uno de los parámetros menos evaluados en la patología de estos organismos. Camarones juveniles (Penaeus sp.), de 2 a 5 cm, procedentes de la laguna de Soto La Marina, Tamaulipas, México, fueron alojados y aclimatados en el laboratorio durante una semana en agua marina con aireación. Estos organismos fueron utilizados para obtener su hemolinfa por medio del corte de la anténula y de la punción cardiaca o del seno ventral, usando una solución Alserver modificada (MAS), ácido etilen-diamino tetracético (EDTA) o citrato de sodio como anticoagulantes. La punción en el seno ventral proporcionó el mayor volumen de hemolinfa y calidad en las células contenida en ella, siendo la solución de MAS refrigerada a 4°C el mejor anticoagulante. La muestra de hemolinfa obtenida a partir del seno ventral fue citocentrifugada en un cytospin por 5 min, teñida con*

### Abstract

**Cytospin, an alternative for the study and morphologic characterization of haemocyte of penaeid shrimps (Crustacea: Decapoda).** *The haemolymph can be used to evaluate the shrimp health status; however, is one of the parameters less evaluated in shrimp pathology. Juvenile (2-5 cm) shrimps (Penaeus sp.) collected in the Soto La Marina lagoon, in Tamaulipas, Mexico, were housed and acclimatized to laboratory conditions, one week on seawater with aeration. Those organisms were used for haemolymph collection from the cut of antennules, heart or ventral sinus puncture, using Alserver modified solution (MAS), ethylene-diamine tetracetic acid (EDTA) or sodium citrate as anticoagulants. The ventral sinus puncture provided the higher haemolymph collection and cell quality, and where MAS at 4°C was the best anticoagulant. The samples from sinus ventral puncture were cytocentrifugated using a cytospin (5 min), stained with haematoxylin and eosin (H&E), and observed in microscope. At 187 G centrifugation shows a best cell integrity, identification, and observation of the characteristics and morphology of*

### Résumé

**Cytospin, une alternative pour l'étude et la caractérisation morphologique des hémocytes de crevettes pénéides (Crustacea: Decapoda).** *L'hémolymph qui peut être utilisée comme alternative pour déterminer l'état de santé des crevettes, est un des paramètres les moins évalués dans la pathologie de ces organismes. Des crevettes juvéniles (Penaeus sp.), de 2 à 5 cm, provenant de la lagune de Soto La Marina, Tamaulipas, Mexique, ont été acclimatées en laboratoire pendant une semaine en eau marine, avec aération. Ces organismes ont été utilisés pour obtenir l'hémolymph par coupe de l'antennule et ponction cardiaque ou du sinus ventral, avec une solution Alserver modifiée (MAS), de l'acide éthylène diamino tétra-acétique (EDTA), ou du citrate de sodium comme anticoagulants. La ponction dans le sinus ventral a proportionné un plus grand volume d'hémolymph et une qualité supérieure de cellules, avec la solution de MAS réfrigérée à 4°C comme meilleur anticoagulant. L'échantillon d'hémolymph obtenu à partir du sinus ventral a été centrifugé dans un cytospin pendant 5 min, teinté avec de l'hématoxyline*

\* Universidad Autónoma de Tamaulipas, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, km 5 carretera Victoria-Mante, Ciudad Victoria, Tamaulipas, 87000, México. Tel. (834) 312-5078, Fax (834) 312-9531. Correos electrónicos: ajruiz@uat.edu.mx, gabaguirre@uat.edu.mx, v\_urbina01@hotmail.com

hematoxilina y eosina (H&E), y observada al microscopio. Una centrifugación a 187 G permitió una mejor conservación, identificación, y observación de las características morfológicas de los hemocitos (granulares, semi-granulares y hialinos). La aplicación de carbonato de litio (0.002 mM por 5 s) durante la tinción con H&E, mejoró y favoreció la observación de las características celulares.

the haemocytes (granular, semi-granular and hyaline cells). The addition of lithium carbonate (0.002 mM by 5 sec) during the H&E staining helped to best observation of cell characteristic.

et éosine (H&E), et observé au microscope. Une centrifugation à 187 G a permis une meilleure conservation, identification, et observation des caractéristiques morphologiques des hémocytes (granulaires, semi granulaires et hyalins). L'application de carbonate de lithium (0.002 mM pendant 5 s) durant la teinte avec H&E, a amélioré et favorisé l'observation des caractéristiques cellulaires.

**Palabras claves:** Anticoagulantes, citocentrifugación, hemolinfa, tinción.

**Key words:** Anticoagulants, cytocentrifugation, haemolymph, stain.

**Mots clefs:** Anticoagulants, cytocentrifugation, hémolymph, teintés.

Los camarones son invertebrados de una gran importancia comercial que están sujetos a numerosos agentes patógenos, que pueden ser controlados por el organismo apoyado en gran medida por las características de su sistema inmune (Bachère 2000). La primera parte del sistema de defensa de los camarones consiste de una cutícula o exoesqueleto, la cual representa una barrera física para los agentes patógenos (Sugumaran 1996). Sin embargo, Destoumieux *et al.* (2000) señalan que la primer línea de defensa del sistema inmune en el camarón, contra agentes bacterianos, son diversos péptidos antimicrobianos tales como Pen-1, Pen-2, Pen-3a, Pen-3b y Pen-3c. Existen además mecanismos de defensa realizados a nivel celular para detectar y atacar moléculas, parásitos o patógenos, esta parte del sistema inmune consiste de elementos de respuesta humoral, la fagocitosis, la encapsulación, la aglutinación y el sistema profenoloxidasas (proPO) (Bachère *et al.* 1995a-b, Roch 1999).

Las células de defensa de los camarones son los hemocitos (hialinos, semigranulares, y granulares) y generan factores de defensa tales como proteínas de coagulación, aglutininas (lectinas), enzimas hidrolíticas, y péptidos antibacterianos (Johansson & Söderhäll 1989, Gargioni & Barracco 1998, Bachère *et al.* 2000, Muñoz *et al.* 2000). Tomando en cuenta que un buen estado de salud es reflejo de un sistema

inmune eficiente, se han realizado estudios en los invertebrados encaminados a utilizar los parámetros de la hemolinfa para determinar sus variaciones fisiológicas (Bachère *et al.* 2000). Parámetros como proteína total, concentración de glucosa, actividad de la fosfatasa alcalina, tiempo de coagulación, número y tipo de células sanguíneas, y actividad antibacteriana han sido considerados como marcadores potenciales de salud o enfermedad y representan una de las principales herramientas para la medicina veterinaria y humana. Sin embargo, resulta contrastante que estos parámetros son difícilmente evaluados en la patología de camarones (Hose *et al.* 1984, Persson *et al.* 1987, Hall & Van Ham 1998, Bachère 2000). Solo el tiempo de coagulación, los cambios en el número de hemocitos totales y las proteínas de choque térmico son esporádicamente empleados (Lightner 1996, Bachère 2000, Muñoz *et al.* 2000, Gross *et al.* 2001).

El presente estudio consistió en establecer un procedimiento para la obtención de la hemolinfa del camarón y observar la eficacia de la citocentrifugación o citospin, además de la tinción con hematoxilina y eosina (H&E) a fin de determinar sus efectos en los componentes celulares y estructurales de los hemocitos.

Fueron recolectados varios camarones juveniles (*Penaeus* sp.), de 2 a 5 cm de longitud, en un vivero camaronícola de La Pesca, Soto La Marina, Tamaulipas, México. Los camarones fueron trasladados en bolsas de polietileno conteniendo agua del vivero y oxígeno hacia la sala de bioensayos de la FMVZ-UAT en donde fueron aclimatados durante una semana y distribuidos en diez peceras con 40 l de agua con salinidad de 20-24‰, pH de 7-8, temperatura 27-29°C, aireación y filtro biológico. Los camarones fueron alimentados con una dieta comercial para camarones con 35% de proteína (Camaronina® de Purina©) a una tasa diaria del 5% de su biomasa (Moullac & Haffner 2000, Van de Braak *et al.* 2000).

La hemolinfa de 10-20 camarones fue obtenida de los organismos por punción cardiaca o a partir del seno ventral, empleando para este fin una jeringa de 1 ml con 0.5 ml de anticoagulante (4°C) a una proporción de 2:1 (Gargioni & Barranco 1998, Muñoz *et al.* 2000). Los anticoagulantes empleados fueron ácido etilén diamino tetracético (EDTA, 27 mM), la solución Alserver modificada (MAS, 30 mM de citrato de sodio, 115 mM de glucosa, 338 mM de cloruro de sodio, 10 mM de EDTA, pH 7), y citrato de sodio (34 mM) (Gargioni & Barranco 1998, Montaña-Pérez *et al.* 1999, Van de Braak *et al.* 2000, Sritunyalucktasana *et al.* 2001, Anónimo 2003). También se obtuvo la hemolinfa realizando un corte en la anténula de los organismos, usando tijeras estériles y limpiando previamente el área con alcohol al 70% (Braak 2002).

Una muestra de la hemolinfa recolectada fue observada en frotis (microscopía óptica) a fin de establecer la eficacia de cada uno de los anticoagulantes para la conservación de los hemocitos (Muñoz *et al.* 2000). La hemolinfa que brindó la mejor calidad de hemocitos fue posteriormente centrifugada en un citospin por 5 min a diferentes gravedades (119, 136, 153, 170, 187, 200, 204 G) para concentrar los hemocitos y observar el efecto de la centrifugación en éstos (Bachère *et al.* 1995a, Ferreira *et al.* 2003). Los hemocitos fueron posteriormente teñidos con H&E, conforme a

lo descrito por Prophet *et al.* (1995) manteniendo las células durante 15 min en alcohol etílico (96%) y 15 min en hematoxilina de Harris. Las laminillas fueron expuestas a carbonato de litio (0.002 mM por 5 s) (Prophet *et al.* 1995), siendo posteriormente observados en un microscopio óptico a fin de determinar la presencia de lisis, degranulación, ruptura y la concentración celular (Roch 1999, Bachère 2000, Muñoz *et al.* 2000, Bacha & Wood 2001, Sritunyalucktasana *et al.* 2001).

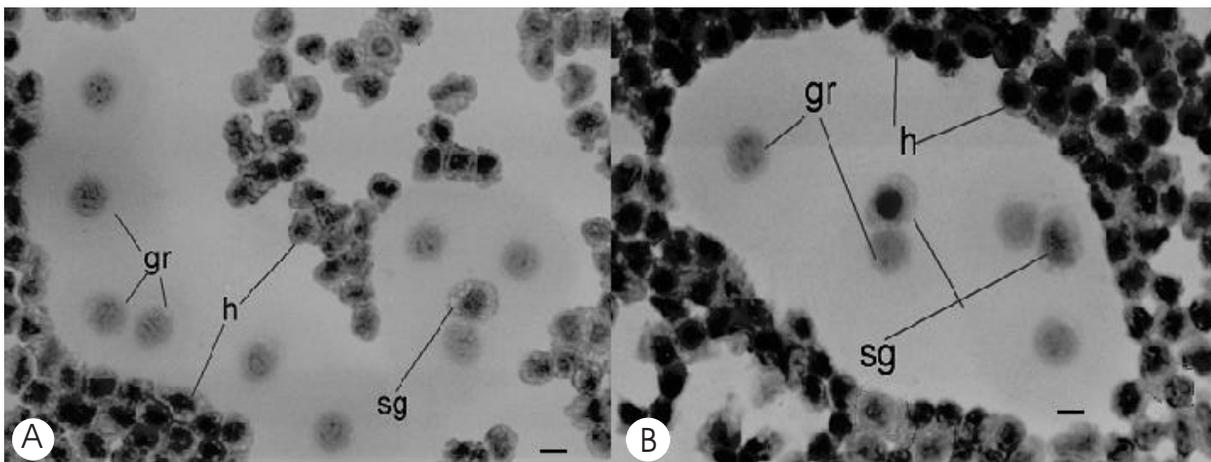
El corte realizado en la anténula de los camarones generó una mortalidad menor del 10% en los organismos, siendo éste el protocolo menos agresivo para los mismos y el que propicio la menor manipulación de los camarones. Sin embargo, al ser un área que no presenta un flujo importante de hemolinfa, solo fue posible recolectar algunas gotas de este tejido, imposibilitando su uso en estudios posteriores. La punción cardiaca realizada en los camarones generó una recolecta de hemolinfa no mayor de 0.1 ml, además de la muerte del 80% de los organismos muestreados. El frotis realizado con esta muestra presentó gran cantidad de células de hepatopáncreas. El proceso de succión generado por la jeringa durante la toma de la muestra, aunado a la cercanía del hepatopáncreas con el corazón, pudieron ser los motivos que propiciaron este fenómeno. Esto sugiere que este método no es adecuado para extraer hemolinfa de organismos menores de 5 cm, tal como sugieren Bachère *et al.* (1995a), Moullac & Haffner (2000) y Braak (2002). La punción del seno ventral permitió la mayor cantidad de recolecta de hemolinfa (>0.4 ml), generando solo un 20% de mortalidad en los organismos muestreados y presentó una buena calidad de hemocitos para ser observados bajo el microscopio.

El uso de EDTA redujo el tiempo de coagulación hasta 30 s, sin embargo, también propició una alta lisis celular y degranulación de los hemocitos. El citrato de sodio permitió una adecuada observación de los hemocitos en el frotis y generó un retardo en la lisis celular de los mismos. Sin embargo, cuando el tiempo

en la toma de muestra fue mayor a 1 min, los hemocitos presentaron degranulación y destrucción inicial. La solución MAS permitió una mejor integridad celular para observar los hemocitos bajo el microscopio, siendo además la que brindó los mejores resultados para los estudios citológicos de la hemolinfa. Este anticoagulante al ser complementado con formalina al 4%, mejoró la conservación de los hemocitos y retardó la destrucción y degranulación de los mismos. Los resultados obtenidos no muestran una eficiencia satisfactoria del EDTA y citrato de sodio a diferencia de lo que señalaron Johansson & Söderhäll (1989) y Bachère *et al.* (1995a). La solución MAS mostró los mejores resultados en la conservación de la hemolinfa, tal como lo registraron Montaña-Pérez *et al.* (1999), Muñoz *et al.* (2000) y Alabi *et al.* (2000). Los resultados sugieren que la elección del anticoagulante es un factor determinante para el éxito o fracaso en los estudios de la hemolinfa como parámetro de salud de los camarones. Sin embargo, la elección del anticoagulante dependerá también del uso que se tenga destinado para la hemolinfa (estudios de biología molecular, bacteriología, citología, etc.) ya que sus componentes pueden llegar a afectar a los resultados. Si la muestra de hemolinfa conserva su integridad celular

puede ser usada para determinar el estado de salud de los camarones al conocer los componentes de la misma. Otras técnicas pueden ser empleadas en conjunto con la cuenta celular, tales como la evaluación con anticuerpos monoclonales (Bachère *et al.* 1995b, Van de Braak *et al.* 2000, Destoumieux *et al.* 2000), pero siendo esta de mayor costo.

La tinción de H&E con 15 min en alcohol etílico (96%) y 15 min en hematoxilina de Harris, produjo una tinción celular muy intensa, además de lisis celular. Fue necesario reducir el tiempo a 4 y 5 min, respectivamente, a fin de obtener una coloración celular, diferenciación y calidad celular adecuada (Fig. 1A-B). La inmersión de las laminillas teñidas en una solución con carbonato de litio, favoreció la observación e identificación de las características celulares de los hemocitos. La Figura 1A-B muestra los hemocitos granulares (gr), las cuales son células grandes con un núcleo pequeño y poseen gran cantidad de gránulos citoplasmáticos. Los hemocitos hialinos (h) son las células más pequeñas, poseen un gran núcleo comparado con el citoplasma, con pocos o ningún granulo citoplasmático. Los hemocitos semi-granulares (sg) son células con características intermedias entre las dos células descritas anteriormente. Al utilizar el citospin a 187 G se



**Figura 1.** Frecuencia en porcentajes de fases sexuales en hembras de a) *Panulirus inflatus* y b) *P. gracilis* en las costas del sur de Sinaloa.

logró obtener células bien definidas con una morfología citoplasmática que permitió una adecuada diferenciación celular. La centrifugación con los niveles inferiores generaron células bien formadas pero con poca definición citoplasmática, además de un gran aglomeramiento celular. Los niveles de citocentrifugación superiores generaron una alta destrucción celular y la presencia de células amorfas.

Cabe mencionar que la extracción de la hemolinfa realizada en el presente trabajo, pretende determinar la factibilidad de usar esta técnica para obtener rasgos distintivos en la morfología de las células presentes en este tejido del camarón. Esto a su vez, puede ser utilizado posteriormente para efectuar modelos experimentales donde se evalúen respuestas celulares a diversos factores fisiológicos en los organismos, exposición a agentes patógenos, entre otros. Esta técnica puede ser usada sin llegar a matar a los organismos evaluados como sucede con otros protocolos tales como histopatología, bacteriología y biología molecular. Sin embargo, no todas las tallas de los camarones pueden ser utilizadas con esta técnica, ya que la extracción de hemolinfa implica que los camarones pequeños pueden morir por el estrés durante la manipulación y obtención de la muestra.

### Agradecimientos

Este trabajo fue realizado con el apoyo de los laboratorios de patología y de inmunología de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Autónoma de Tamaulipas. A dos revisores anónimos que revisaron el manuscrito. Se agradece a Aitor Aizpuru su apoyo para la traducción del resumen al francés.

### Referencias

Alabi, A.O., J.W. Latchford & D.A. Jones. 2000. Demonstration of residual antibacterial activity in plasma of vaccinated *Penaeus vannamei*. *Aquaculture* 187(1-2):15-34.

Anónimo. 2003. Chapter I.3. General Information. *In* Manual of diagnostic tests for aquatic animals. Organization for Animal Health. Consultado el 7 de mayo de 2007 en: [http://www.oie.int/eng/normes/fmanual/A\\_00047.htm](http://www.oie.int/eng/normes/fmanual/A_00047.htm)

Bacha, J. & L. Wood. 2001. Atlas a color de histología veterinaria. Intermedica pp: 27-36.

Bachère, E. 2000. Shrimp immunity and disease control. *Aquaculture* 191(1):3-11.

Bachère, E., E. Mialhe & J. Rodríguez. 1995a. Identification of defense effectors in haemolymph of the shrimp *Penaeus japonicus*: prospects and applications. *Fish & Shellfish Immunol.* 5(8): 597-612.

Bachère, E., J. Rodríguez, V. Boulo & E. Mialhe. 1995b. Characterization of shrimp haemocytes and plasma components by monoclonal antibodies. *J. Cell Sci.* 108:1043-1050.

Bachère, E., D. Destoumieux & P. Bulet. 2000. Penaeidins, antimicrobial peptides of shrimp, a comparison with other effectors of innate immune. *Aquaculture* 191(1):71-88.

Braak, K. 2002. Hemocytic defense in black tiger shrimp (*Penaeus monodon*). Tesis Doctoral, Wageningen Institute of Animal Science, Wageningen University, Países Bajos.

Destoumieux, D., M. Muños, C. Cosseau, J. Rodriguez, P. Bulet, M. Comps & E. Bachère. 2000. Penaeidins, antimicrobial peptides with chitin-binding activity, are produced and stored in shrimp granulocytes and released after microbial challenge. *J. Cell Sci.* 113(3):461-469.

Ferreira, A.G., G.P. Silva, C.E.V. Carvalho, & R.A. DaMatta. 2003. Ultrastructural characterization of blood leukocytes from the tropical fish *Hoplias malabaricus* (Traíra). Proceedings of the XIX Congress of the Brazilian Society for Microscopy and Microanalysis, Caxambu, Brasil, 21-24 de septiembre. *Acta Microscopica* 12(supl. B): 633-634.

Gargioni, R. & M.A. Barracco. 1998. Hemocytes of the palaemonids *Macrobranchium rosenbergii* and *M. acanthurus*, and of the penaeid *Penaeus paulensis*. *Journal of Morphology* 236(3):209-221.

Gross, P.S., T.C. Bartlett, C.L. Browdy, R.W. Chapman & G.W. Warr. 2001. Immune gene discovery by expressed sequence tag analysis of hemocytes and hepatopancreas in the Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, and the Atlantic white shrimp, *L. setiferus*. *Dev. Comp. Immunol.* 25(7): 565-577.

Hall, M.R. & E.H. Van Ham. 1998. The effects of different types of stress on blood glucose in the giant black tiger prawn *Penaeus monodon*. *J. World Aquacult. Soc.* 29: 290-299.

Hose, J.E., D.V. Lightner, R.M. Redman & D.A. Danald. 1984. Observations on the pathogenesis of the imperfect fungus, *Fusarium solani*, in the Californian brown shrimp, *Penaeus californiensis*. *J. Invertebr. Pathol.* 44(3):292-303.