

TESTE DE CORANTES PARA ANÁLISE E IDENTIFICAÇÃO DE CÉLULAS SANGUÍNEAS EM *Odontesthes bonariensis*

ZEBRAL, Yuri¹; ZAFALON-SILVA, Bruna¹; ROBALDO, Ricardo¹.

¹Departamento de Fisiologia e Farmacologia, Instituto de Biologia da Universidade Federal de Pelotas (UFPEL). yurizebral@hotmail.com.

1 INTRODUÇÃO

O estudo das variáveis hematológicas em peixes proporciona informações relevantes sobre o estado fisiológico em que estes animais se encontram, fornecendo dados importantes para o diagnóstico e prognóstico de doenças (TAVARES-DIAS et al, 2007). Este tipo de análise pode servir também como um indicador do nível de estresse nesses animais, levando-se em consideração as alterações causadas pela ação de catecolâminas e do cortisol sobre as variáveis hematológicas, mais precisamente sobre a série leucocitária (OBA et al, 2009).

As variáveis hematológicas podem ser estudadas por meio de extensões sanguíneas que proporcionam a análise das séries branca e vermelha de forma relativamente prática e barata (ISHIKAWA, 2010), mas para que esta análise seja eficiente, é imprescindível a utilização de uma técnica de coloração que permita a diferenciação entre estas células (THRALL, 2006).

As técnicas tintoriais em hematologia vêm evoluindo desde o final do século XIX, quando Romanowsky idealizou uma mistura de corantes que poderia identificar células distintas com cores diferentes. Os corantes baseiam-se em misturas de diferentes concentrações de azul de metileno e eosina, dissolvidos em alcoóis, normalmente o metanol. As formulações, disponíveis hoje no mercado, são constituídas por diferentes proporções entre essas duas tinturas-mãe e são conhecidas pelo nome de seus criadores: Leishman, May-Grunwald, Giemsa e Wright (TAVARES-DIAS, 2006). A utilização de misturas entre esses corantes é bem comum, sendo mais utilizada a combinação de May-Grunwald com Giemsa, chamada de Rosenfeld e uma segunda mistura que consiste na combinação de May-Grunwald, Giemsa e Wright (TAVARES-DIAS et al, 2004).

Outra técnica bastante empregada na rotina laboratorial é a coloração por panótico rápido, na qual as lâminas são submetidas à ação de três compostos: um fixador e duas soluções corantes (OLICHESKI, 2003).

Todas essas tinturas funcionam da mesma forma, demarcando estruturas de acordo com seu pH. Estruturas ácidas tem a tendência de se corar em tons de vermelho (acidófilas) e estruturas básicas em tons de azul (basófilas), estruturas que apresentam um pH neutro irão apresentar coloração intermediária entre essas duas cores (TAVARES-DIAS et al, 2004).

Diante destas informações, o referente trabalho teve como objetivo testar diferentes formulações para a coloração de extensões sanguíneas de peixes em busca de metodologia adequada ao acompanhamento hematológico da condição sanitária durante a criação do peixe-rei *Odontesthes bonariensis* em cativeiro.

2 METODOLOGIA

Para a coleta de sangue, indivíduos juvenis de *O. bonariensis* (n=5) foram capturados com anzol e linha na Estação de Piscicultura da Barragem do Chasqueiro (UFPel/ALM) e prontamente anestesiados com benzocaína a 50ppm. Após a anestesia, foram retiradas amostras de sangue periférico através de punção da artéria caudal mediante o uso de seringa e agulha hipodérmica (13X4,5) heparinizada (GRASSI, 2002). As extensões sangüíneas foram confeccionadas imediatamente após a coleta de sangue e encaminhadas para o laboratório de fisiologia aplica a aqüicultura (UFPel), onde foram expostas para secagem por 24h em temperatura ambiente (aproximadamente 24 °C), com posterior fixação em metanol P.A. por 15 min.

Os testes tintoriais foram realizados com os seguintes corantes: Panótico rápido; Giemsa; mistura de Rosenfeld e mistura entre May-Grunwald, Giemsa e Wright. Estes corantes foram diluídos a uma concentração de 5% em solução de tampão fosfato com pH a 6,8 e água destilada, com exceção do corante panótico que já vem pronto para o uso.

Para a realização da mistura de Rosenfeld, foi utilizada a proporção de 2,5% de Wright e 2,5% de Giemsa, já para a segunda mistura, foi utilizada a proporção de 2% de May-Grunwald, 2% de Giemsa e 1% de Wright, seguindo a metodologia apresentada por Tavares-Dias (2004).

Para a coloração com o panótico rápido, as lâminas ficaram imersas em cada solução durante 5 segundos e aquelas coradas com as soluções diluídas permaneceram imersas durante 20 minutos. Após a coloração, as lâminas foram secas a temperatura ambiente (aproximadamente 24 °C) e posteriormente analisadas em microscópio óptico binocular, com objetiva de 100X e oculares de 10X.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os corantes testados proporcionaram vários padrões de coloração, possibilitando em diferentes graus, a distinção entre os tipos celulares encontrados no sangue periférico de *Odontesthes bonariensis*. A técnica de coloração com Giemsa 5% (Fig. 1.1) resultou em eritrócitos bem diferenciáveis com núcleo corado em roxo claro e o citoplasma em vermelho. O mesmo ocorreu com os trombócitos, mas nestes, o núcleo ocupa quase toda a célula, corando-se praticamente toda em roxo escuro. Tavares-Dias (2004) corrobora que os trombócitos podem possuir citoplasma com pouca afinidade por corantes ácido-básico, talvez as técnicas utilizadas não possibilitem a observação do citoplasma neste tipo celular. A coloração por panótico rápido (Fig. 1.2) resultou em células coradas em diferentes tons de azul, os eritrócitos apresentaram citoplasma azul claro e núcleo azul escuro, já os trombócitos foram corados totalmente em azul. Na metodologia de Rosenfeld 5% (Fig. 1.3), os eritrócitos apresentaram citoplasma levemente acinzentado e núcleo roxo já os trombócitos tiveram seu núcleo corado em roxo claro e não foi possível a observação de citoplasma. Na solução em que houve a combinação das três formulações, as hemácias apresentaram núcleo corado em tons de roxo e citoplasma levemente avermelhado, já os trombócitos apresentaram núcleo roxo claro sem distinção com o citoplasma.

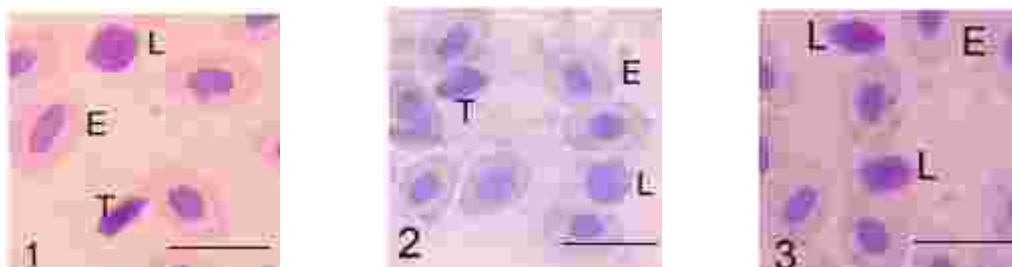


Figura 1 - Teste de corantes em sangue periférico de *Odontesthes bonariensis*. 1 - Células coradas com Giemsa 5%; 2 - Células coradas com panótico rápido; 3 - Células coradas com Rosenfeld 5%. L= Linfócito, T= Trombócito e E= Eritrócito. Barra= 10 μ m. Observação em microscopia óptica com aumento de 100X.

A forma como os leucócitos foram corados foi semelhante nas diferentes metodologias testadas e todas proporcionaram a distinção entre estas células e a serie vermelha. Os leucócitos apresentaram núcleo bem azulado ocupando a maioria da célula e seu citoplasma foi corado em tons de azul mais claro. Essa diferença de tons na coloração entre o núcleo e o citoplasma é importante na caracterização dos leucócitos, o kit panótico não proporcionou a identificação entre os diferentes tipos destas células exatamente por corá-las demais, dificultando a distinção entre núcleo e citoplasma.

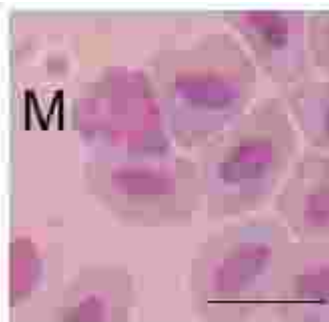


Figura 2 – M= Monócito em sangue periférico de *Odontesthes bonariensis*. Lâminas coradas com Giemsa 5%. Barra= 10 μ m. Observação em microscopia óptica com aumento de 100X.

Os corantes diluídos proporcionaram claramente a identificação de linfócitos e raramente monócitos (Fig. 2), apesar de classicamente se identificar também a presença de outros leucócitos na circulação periférica de peixes como neutrófilos, basófilos, célula granulocítica especial e eosinófilos, considerando a variedade de nomenclatura de acordo com o autor. (TAVARES-DIAS et al, 2004)

A falta de uma classificação geral de leucócitos, dentro do grupo dos teleósteos, relaciona-se com a grande variedade leucocitária encontrada nas diferentes espécies de peixes analisados (ISHIKAWA et al, 2008). Esta variação pode estar vinculada à presença de células em diferentes graus de ontogenia, aumentando dessa forma a variedade morfológica e até mesmo a variedade nos padrões de coloração das células encontradas na circulação periférica de peixes (Thrall, 2006).

Outro fator que também pode influenciar a classificação e identificação entre os diferentes tipos de leucócitos, é a utilização de anticoagulantes na coleta do sangue. Anticoagulantes podem alterar tanto a morfologia celular como a afinidade dos corantes pelas células, dificultando desta forma, a comparação com a bibliografia já existente. Mais especificamente, o uso de EDTA pode estar vinculado à hemólise

em algumas células de peixes dulceaquícolas assim como o uso de heparina pode estimular a agregação dos leucócitos, dificultado sua análise (THRALL, 2006).

4 CONCLUSÃO

De todas as metodologias testadas, o corante panótico proporcionou a distinção satisfatória entre eritrócitos, trombócitos e leucócitos de forma rápida e prática, portanto, recomenda-se a utilização desta técnica em trabalhos que não envolvam a contagem diferencial entre leucócitos. Para tal, as técnicas que utilizam os corantes diluídos apresentaram os melhores resultados, apesar da impossibilidade em se diferenciar satisfatoriamente estas células em *Odontesthes bonariensis* devido a ausência de trabalhos publicados na área para esta espécie.

5 REFERÊNCIAS

MARTINEZ, C. B. R.; CÓLUS, I. M. S. **Biomarcadores em peixes neotropicais para o monitoramento da poluição aquática na bacia do rio Tibagi**. In: MEDRI, M. E. *et al.* Editores. Londrina, PR : M. E. Medri, 2002, p. 551-577.

ISHIKAWA, N.M. *et al.* Metodologia para quantificação de leucócitos totais em peixe, *oreochromis niloticus*. **Archives of Veterinary Science** , v.13, n.1, p. 54-63, 2008.

ISHIKAWA, N.M.; *et al.*, **Procedimentos Básicos para Colheita de Sangue em Peixes**; Manual Embrapa, 2010.

OBA, Eliane, *et al.* Estresse em peixes cultivados: Agravantes e atenuantes para um manejo rentável. In: TAVARES-DIAS, Marcos (Organizador) **Manejo e sanidade em peixes de cultivo**. Embrapa Amapá, Macapá: Embrapa, 2009. Capítulo 8, p. 226 – 247.

OLICHESKI, Adriana. **Comparação entre os métodos de coloração panótico rápido e giemsa para o diagnóstico de protozoários do gênero Babesia (Starcovici, 1893) e de riquetsias do gênero Ehrlichia (Ehrlich, 1888) em cães (Canis familiaris) no município de Porto Alegre, RS, Brasil..** 2003. Dissertação de mestrado em Ciências Veterinárias - Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Faculdade de Veterinária. Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias.

TAVARES-DIAS, M.; MORAES, F.R. **Hematologia de peixes teleósteos**. Ribeirão Preto: M. Tavares-Dias, 2004.

TAVARES-DIAS, M. *et al.* Leukocyte and thrombocyte reference values for channel catfish (*Ictalurus punctatus* Raf), with an assessment of morphologic, cytochemical, and ultrastructural features. **Veterinary clinical pathology**, v. 36, n. 1, p. 49-54, 2007.

TAVARES-DIAS, M. A morphological and cytochemical study of erythrocytes, thrombocytes and leukocytes in four freshwater teleosts. **Journal of Fish Biology**, 68, 1822–1833, 2006.

THRALL, M. *et al.*, **Hematologia e bioquímica veterinária**, São Paulo: Roca, 2006.