

IDENTIFICANDO LEUCÓCITOS NO PEIXE *Poecilia vivipara*: TESTE DE COLORAÇÃO E DESCRIÇÃO DOS TIPOS CELULARES

TAINÁ GUILLANTE¹; MAIDANA DA SILVA IDIARTE²; RICARDO BERTEAUX ROBALDO²; YURI DORNELLES ZEBRAL³.

¹Universidade Federal de Pelotas – tainaguillante@gmail.com

²Universidade Federal de Pelotas – maydanaidiarte@hotmail.com

²Universidade Federal de Pelotas- ricardorobaldo@ufpel@gmail.com

³Universidade Federal de Rio Grande – yurizebral@gmail.com

1. INTRODUÇÃO

A hematologia é um estudo de grande importância em populações de peixes, sendo utilizada como indicador de estado fisiológico, podendo auxiliar na identificação de situações de estresse e no diagnóstico de doenças (TAVARES-DIAS et al., 2004). A contagem de leucócitos tem sido uma técnica bastante empregada no reconhecimento de estresse fisiológico. A liberação de glicocorticoides em resposta ao estresse modifica a razão entre neutrófilos e linfócitos circulares, pois os linfócitos migram da corrente sanguínea para os tecidos e os neutrófilos migram dos tecidos para a corrente sanguínea (DAVIS et al., 2008).

Para realização da contagem diferencial de leucócitos é essencial a verificação do corante que permita a melhor identificação destas células na espécie em estudo. Trabalhos envolvendo características leucocitárias demonstram uma diversidade de resultados quando usada a mesma técnica de coloração em peixes de espécies diferentes (TAVARES-DIAS E MORAES, 2003).

O corante utilizado para análise sanguínea deve evidenciar com clareza os cinco principais tipos de leucócitos de vertebrados: linfócitos, neutrófilos, monócitos, eosinófilos e basófilos. Os linfócitos são células predominantemente arredondadas, com pequena quantidade de citoplasma basofílico. Os neutrófilos apresentam um núcleo esférico ou lobulado e um citoplasma abundante com presença de grânulos. Os monócitos são células grandes de forma irregular, apresentando vacúolos em seu citoplasma. Os eosinófilos, assim como os basófilos, são células mais difíceis de serem encontradas em teleósteos. Os eosinófilos possuem uma característica bem marcante, seu citoplasma é repleto de grânulos avermelhados evidentes. Os basófilos quando encontrados, apresentam grânulos citoplasmáticos bem corados e maiores do que os observados em outros tipos de granulócitos (CLAUSS et al., 2008; TAVARES-DIAS et al., 1999).

Com base no exposto, realizou-se o estudo com a espécie de peixe *Poecilia vivipara* Bloch & Schneider, 1801 com o objetivo de analisar e comparar três metodologias de coloração para identificação de leucócitos.

2. METODOLOGIA

Foram utilizados 5 indivíduos da espécie *P. vivipara* criados sob as mesmas condições. Os animais foram anestesiados e eutanasiados em benzocaína (100ppm) para a coleta de sangue feita através do corte do pedúnculo caudal. Imediatamente após a coleta do sangue, foram confeccionadas extensões sanguíneas que foram fixadas com metanol por 5min e coradas de acordo com três procedimentos.

No primeiro teste foram coradas três extensões sanguíneas de acordo a técnica de Rosenfeld. Utilizou-se 75mL de água destilada, 20mL de solução tampão e 5mL de corante, sendo 2,5mL de Giemsa e 2,5 mL de May-Grunwald. As lâminas foram colocadas em uma cuba de coplin e imersas nessa solução por 40min.

A segunda técnica foi composta por 75mL de água destilada, 20mL de solução tampão e 5mL de corante (2mL de Giemsa, 2mL de May-Grunwald e 1mL de Wright). Nesse método também foram utilizadas três lâminas imersas por 40min.

A solução tampão descrita nos dois procedimentos foi preparada com 4,082g de KH_2PO_4 e 4,258g de Na_2HPO_4 diluídos até 1000mL com água destilada.

Para o terceiro teste, utilizou-se Panótico, um conjunto de coloração rápida em hematologia, composto por um fixador e duas soluções corantes. O reagente 1 com propriedades fixadoras não foi utilizado pois as lâminas já haviam sido fixadas. As lâminas foram mantidas imersas por 25 segundos no reagente 2 e 25 segundos no reagente 3.

Após a coloração, as lâminas foram lavadas com água de torneira e analisadas em microscopia ótica.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Ao avaliar os três tipos de coloração, percebeu-se que apenas um dos corantes foi eficiente na identificação das células leucocitárias. Nas extensões coradas com Panótico foi possível reconhecer com nitidez linfócitos, monócitos e neutrófilos. Os leucócitos por esse método apresentaram características morfológicas semelhantes as descritas por CLAUSS et al. (2008). Observou-se que os linfócitos adquiriram coloração mais intensa no núcleo, sendo este facilmente distinguido de seu citoplasma (Fig. 1a). Os monócitos foram identificados por seu formato irregular e vacuolizações no citoplasma (Fig. 1b). Os neutrófilos também foram corados de maneira esperada, citoplasma pouco corado e proporcionalmente maior em relação ao núcleo (Fig. 1c).

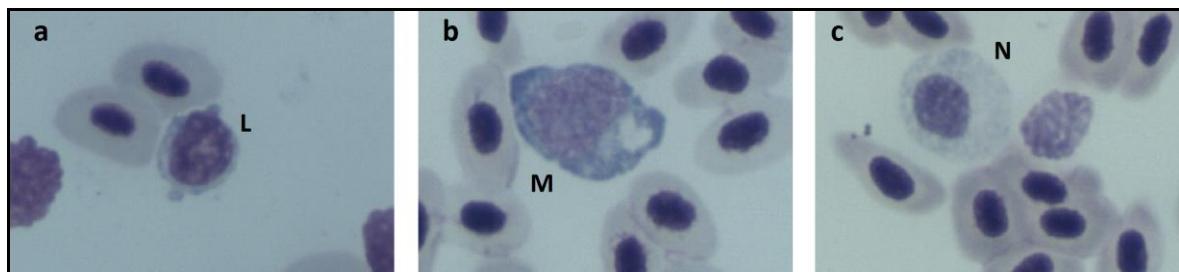


Figura 1- Células sanguíneas do peixe *Poecilia vivipara* coradas com Panótico. a) Linfócito (L); b) Monócito (M); c) Neutrófilo (N).

Diferentemente, o procedimento utilizando os corantes Giemsa, May-Grunwald e Wright demonstrou linfócitos sem coloração no núcleo (Fig 2a). Em geral, linfócitos e neutrófilos são células leucocitárias mais frequentes em extensões sanguíneas de teleósteos (TAVARES-DIAS et al, 2009; CLAUSS et al, 2008; SANTOS et al, 2011), no entanto, ao examinar as lâminas mais detalhadamente, foram identificados poucos neutrófilos. O padrão apresentado por essa técnica possivelmente não permitiu que essas células fossem coradas e visualizadas.

O método de Rosenfeld (Giemsa e May-Grunwald) apresentou coloração irregular para linfócitos, levando à muitas células com núcleo e citoplasma corados de maneira semelhante, e, portanto, de difícil diferenciação (Fig 2c). Com esse procedimento, observou-se também dificuldade para encontrar monócitos. Ao simular uma contagem diferencial de leucócitos, localizou-se apenas dois ou três monócitos por lâmina analisada, estando estes com uma coloração muito sutil. Similarmente a esse estudo, Tavares-Dias e Moraes (2003) também obtiveram dificuldades para identificar granulócitos e monócitos corados por essa combinação.

Ocasionalmente, neutrófilos corados pelo método de Rosenfeld exibiram coloração variável, apresentando células com presença de grânulos avermelhados no citoplasma, confundindo-os com eosinófilos.

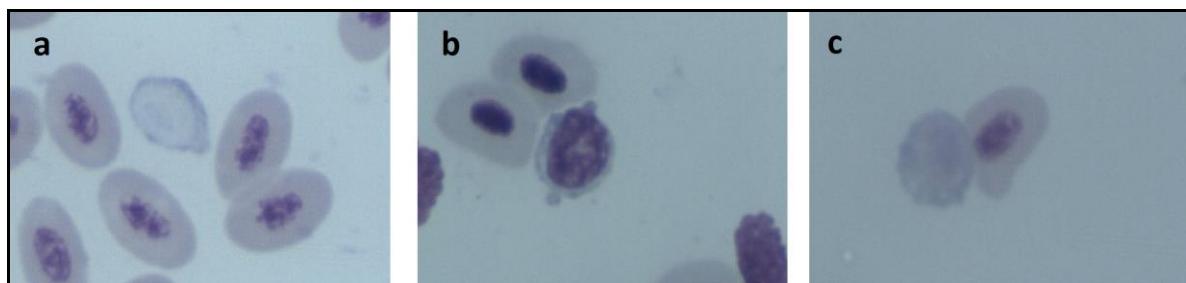


Figura 2- Linfócitos encontrados do peixe *Poecilia vivípara* corados por diferentes métodos. a) Linfócito com coloração Giemsa, May-Grunwald e Writhg; b) Linfócito por Panótico; c) Linfócito pelo procedimento de Rosenfeld (Giemsa, May-Grunwald).

Outras células granulocíticas, como eosinófilos e basófilos são menos comuns de serem encontradas (CLAUSS et al, 2008). Nesse estudo não foram identificadas células de defesa desse tipo.

Em relação aos glóbulos vermelhos, observou-se que nas três metodologias de coloração os eritrócitos foram prontamente reconhecidos.

4. CONCLUSÕES

Através desse estudo pode-se concluir que as células sanguíneas de *P. vivípara* respondem de forma diferente aos métodos de coloração testados. A combinação apresentada pelo Panótico foi a que permitiu maior confiabilidade na visualização e identificação de leucócitos.

Pouco se conhece sobre as características sanguíneas de *Poecilia* e os resultados demonstram a importância de uma coloração adequada nas extensões sanguíneas para posterior realização de exames hematológicos.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- CLAUSS, T.M. Hematologic Disorders of Fish. **Veterinary Clinics: Exotic Animal Practice.** USA, n.11, p. 445-462, 2008.
- DAVIS, A.K.; MANEY, D.L.; MAERZ, J.C. The use of leukocyte profiles to measure stress in vertebrates: a review for ecologists. **Functional Ecology.** Usa, n. 22, p.760-772, 2008.
- SANTOS, R.B.S.; TAVARES-DIAS, M. Células sanguíneas e resposta hematológica de *Oxydoras niger* (pisces, doradidae) oriundos da bacia do médio rio solimões, estado do amazonas (brasil), naturalmente parasitados. **Boletim do Instituto de Pesca.** São Paulo, n. 36(4), p. 283 – 292, 2011.
- TAVARES-DIAS, M.; MATAQUEIRO, M.I. Características hematológicas, bioquímicas e biométricas de *Piaractus mesopotamicus* Holmberg, 1887 (Osteichthyes: Characidae) oriundos de cultivo intensivo. **Acta Scientiarum. Biological Sciences.** São Paulo, v. 26, no. 2, p. 157-162, 2004.
- TAVARES-DIAS, M.; TENANI, R.A.; GIOLI, L.D.; FAUSTINO, C.D.; Características hematológicas de teleósteos brasileiros. II. Parâmetros sanguíneos do *Piaractus mesopotamicus* Holmberg (Osteichthyes, Characidae) em policultivo intensivo. **Revista Brasileira de Zoologia I.** São Paulo, n.16 (2), p. 423 - 431, 1999.
- TAVARES-DIAS, M.; MORAES, F.R. Haematological evaluation of *Tilapia rendalli* Boulenger, 1896 (Osteichthyes: Cichlidae) captured in a fee fishing farm in Franca, São Paulo state, Brazil. **Bioscience Journal.** v. 19, n.1, p. 107-114, 2003.