

Aspectos citoquímicos das células sanguíneas de matrinxã (*Brycon amazonicus* Spix & Agassiz, 1829) (Characidae: Bryconinae)

Marcio Quara de Carvalho Santos¹, Adriano Teixeira de Oliveira², Elenice Martins Brasil³, Iracimar Batista do Carmo⁴, Marcos Tavares-Dias⁵, Elizabeth Gusmão Affonso⁶, Jaydione Luiz Marcon⁷

¹Mestrando do Programa de Pós-Graduação em Diversidade Biológica – UFAM. Bolsista FAPEAM. e-mail: marcioquara@hotmail.com

²Doutorando do Programa de Pós-Graduação em Diversidade Biológica - UFAM. Bolsista CAPES.

³Mestrando do Programa de Pós-Graduação em Agricultura do Trópico Úmido – INPA. Bolsista FAPEAM.

⁴Bolsita do Programa de Capacitação Institucional – PCI/MCT/INPA.

⁵Pesquisador da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – EMBRAPA – Macapá, AP. Bolsista de Produtividade do CNPq.

⁶Pesquisadora do Laboratório de Fisiologia Aplicado à Piscicultura – INPA.

⁷Professor Adjunto do Laboratório de Fisiologia - UFAM. Bolsista de Produtividade do CNPq.

Resumo: A citoquímica é uma ferramenta usada para a diferenciação e identificação precisa dos tipos celulares bem como a determinação das contribuições de cada célula para o sistema imunológico dos animais. Nesse sentido, este trabalho objetivou traçar o perfil citoquímico das células sanguíneas de juvenis de matrinxã provenientes de uma piscicultura. Nas extensões sanguíneas de matrinxã foram identificados seis tipos celulares: eritrócitos, trombócitos, linfócitos, monócitos, heterófilos e neutrófilos. A reação de metacromasia confirmou a inexistência de basófilo nesta espécie. A análise de reticulócitos revelou a presença de ribonucleoproteína no interior de alguns eritrócitos. Os heterófilos, neutrófilos e monócitos apresentaram reação positiva para lipídeos, proteínas básicas e mieloperoxidase. Os linfócitos e trombócitos apresentaram reação fraco-positiva para proteínas básicas e negativa para as demais colorações citoquímicas. A composição citoquímica dos heterófilos, neutrófilos e monócitos indicam que estas células são as células mais importantes do sistema imunológico do matrinxã, estando diretamente relacionadas com a atividade fagocítica.

Palavras-chave: citoquímica, eritrócitos, hematologia, leucócitos, sangue

Cytochemical aspects of blood cells of matrinxã (*Brycon amazonicus* Spix & Agassiz, 1829) (Characidae: Bryconinae)

Abstract: Cytochemistry is a tool used to differentiate and identify specific cell types and determining the contributions of each cell to the immune system of animals. Thus, this study aimed to determine the cytochemical profile of the blood cells of juvenile matrinxã from a pisciculture. Of blood smears matrinxã were identified six cell types: erythrocytes, thrombocytes, lymphocytes, monocytes, heterophils and neutrophils. The metachromasia reaction confirmed the absence of basophils in this species. The reticulocyte analysis revealed the presence of ribonucleoprotein in the interior of some erythrocytes. Heterophils, neutrophils and monocytes showed a positive reaction for lipids, basic proteins and myeloperoxidase. Lymphocytes and thrombocytes showed weak-positive reaction for basic proteins and negative for the other cytochemical stains. The cytochemical composition of heterophils, neutrophils and monocytes indicate that these cells are the most important of the immune system of matrinxã, being directly related to the phagocytic activity.

Keywords: blood, cytochemistry, erythrocytes, hematology, leukocytes

Introdução

Uma vertente que merece destaque dentro hematologia clínica é o sistema imunológico e mais especificamente o estudo das células de defesa. Alterações nos tipos leucocitários geralmente fornecem indicativos da atuação do sistema imunológico (Tavares-Dias & Moraes, 2007), portanto, o acompanhamento de modificações quantitativas e qualitativas nos leucócitos constitui uma das maneiras mais elementares para avaliar o estado de saúde dos animais. Em peixes, a identificação leucocitária é inconsistente e problemática, principalmente em função da grande variação inter e intra-específica dos tipos celulares existentes. Nesse sentido, a demonstração dos constituintes químico-enzimáticos, por meio das reações citoquímicas, pode auxiliar na identificação dessas células.

As técnicas citoquímicas consistem basicamente na utilização de reagentes colorimétricos que, em contato com os componentes químico-enzimáticos presentes no interior das células, formam precipitados

com colorações específicas para cada reação. Atualmente, essa ferramenta tem sido amplamente utilizada em estudos hematológicos, pois possibilita a diferenciação e identificação mais precisa dos tipos celulares bem como a determinação das contribuições de cada célula para o sistema imunológico dos animais (Shigdar et al., 2009).

Entre as espécies comerciais de maior destaque na piscicultura amazônica destaca-se o matrinxã, *Brycon amazonicus*. Esta espécie apresenta ótimas qualidades zootécnicas, tais como: crescimento rápido, boa aceitação ao ambiente de confinamento e ao arraçoamento, excelente composição de carcaça bem como grande demanda por sua carne (Arbelaez-Rojas et al., 2002). Diversos estudos sobre a hematologia desta espécie têm sido descritos na literatura, entretanto, de acordo com Tavares-Dias et al. (2008), as informações sobre as linhagens celulares do matrinxã ainda são contraditórias, gerando equívocos durante a identificação e nomenclatura das células. Nesse sentido, este trabalho objetivou traçar o perfil citoquímico das células sanguíneas de *Brycon amazonicus*, fornecendo informações sobre o sistema imunológico desses animais para futuros estudos hematológicos com a espécie.

Material e Métodos

Os exemplares de matrinxã foram adquiridos no estágio de pós-larvas de pisciculturas locais e transferidos para a Coordenação de Pesquisas em Aquicultura (CPAQ) do INPA, onde foram mantidos em viveiros escavados de 150 m², sendo alimentados com ração com 36% de proteína bruta. Ao atingirem um peso médio de 100 g, foram coletadas amostras de sangue de 15 animais por punção da veia caudal utilizando seringas contendo EDTA (10%). O sangue foi destinado à confecção de extensões sanguíneas as quais foram submetidas a processos de coloração específicos para cada reação citoquímica. Para a identificação dos tipos celulares, as extensões foram coradas com May Grunwald-Giemsa-Wright (MGGW). A identificação das proteínas básicas, lipídeos e mieloperoxidase foi realizada pelo método do azul de bromofenol, sudan black B e orto-toluidina-peróxido de hidrogênio, respectivamente. A metacromasia foi determinada pelo método do azul de toluidina e os reticulócitos foram identificados com azul brilhante de cresil e posteriormente corados com MGGW.

Todas as extensões sanguíneas foram analisadas em microscópio óptico Olympus modelo BX51 com câmera acoplada Olympus modelo DP72, em aumento de 1.000x. As reações citoquímicas foram classificadas de acordo com a intensidade em negativa (-), fraco-positiva (+/-) e positiva (+).

Resultados e Discussão

Nas extensões sanguíneas de matrinxã coradas com MGGW foram identificados seis tipos celulares: eritrócitos, trombócitos, linfócitos, monócitos, heterófilos e neutrófilos. Estas células também foram encontradas por Tavares-Dias et al. (2008) em exemplares juvenis da mesma espécie.

Os resultados das reações citoquímicas estão presentes na Tabela 1. A reação de metacromasia é usada para comprovação da presença de basófilos nos organismos. Todas as células encontradas no sangue dos animais analisados apresentaram reação negativa para esta coloração citoquímica, confirmando a inexistência deste tipo leucocitário no matrinxã. A análise de reticulócitos revelou a presença de ribonucleoproteína no interior de alguns eritrócitos. De acordo com Tavares-Dias (2006), quantidades elevadas de ribonucleoproteínas indicam liberação prematura dos eritrócitos na corrente sanguínea, nesse sentido, o acompanhamento do número de reticulócitos circulantes pode fornecer informações sobre a atividade eritropoiética e consequentemente sobre o estado de saúde dos animais.

A coloração com sudan black B indicou reação positiva em heterófilos, neutrófilos e monócitos. Este reagente tem alta afinidade por lipídeos, corando os fosfolipídeos presentes nas membranas dos grânulos citoplasmáticos (Shigdar et al., 2009). Os leucócitos granulócitos possuem a capacidade de utilizar enzimas citoplasmáticas para degradar os lipídios e utilizar como fonte energética para as atividades fagocíticas. Com a aplicação do método do azul de bromofenol, foi observada reação positiva para proteínas nos heterófilos, neutrófilos e monócitos e fraco-positiva linfócitos e trombócitos. De acordo com Moura et al. (1999), as proteínas que estão presentes nos grânulos dos leucócitos têm função enzimática de defesa contra microorganismos, enquanto que as proteínas das demais células são possivelmente estruturais. Os heterófilos, neutrófilos e monócitos apresentaram reação positiva para mieloperoxidase. De acordo com Shigdar et al. (2009), a peroxidase participa da digestão intracelular, portanto, a presença desta enzima lisossomal é um forte indicativo de atividade celular anti-bacteriana e de função fagocítica.

Tabela 1 Reações citoquímicas das células sanguíneas de *Brycon amazonicus*.

Reações citoquímica	Leucócitos				Trombócitos	Eritrócitos
	Linfócitos	Heterófilos	Neutrófilos	Monócitos		
Proteínas básicas	+/-	+	+	+	+/-	-
Lipídeos	-	+	+	+	-	-
Mieloperoxidase	-	+	+	+	-	-
Metacromasia	-	-	-	-	-	-
Reticulócitos	-	-	-	-	-	+

- : reação negativa; +/- : reação fraco-positiva; + : reação positiva.

Conclusões

Este trabalho reforça a existência de eritrócitos, trombócitos, linfócitos, monócitos, heterófilos e neutrófilos no sangue de *Brycon amazonicus*. A composição citoquímica revelou que os heterófilos, neutrófilos e monócitos são as células mais importantes do sistema imunológico do matrinxã, uma vez que apresentaram grânulos de proteínas básicas, lipídeos e mieloperoxidase, estando diretamente relacionadas à atividade fagocítica.

Os resultados deste trabalho possuem grande aplicabilidade em estudos zootécnicos, visto que, em ambiente de cultivo, os peixes podem entrar em contato com diversos organismos patogênicos, seja através de uma infecção induzida ou acidental. Desse modo, uma avaliação mais refinada do estado imunológico é fundamental para a manutenção do estado de saúde animal e, conseqüentemente, para o sucesso de uma produção piscícola.

Agradecimentos

À Universidade Federal do Amazonas (UFAM), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq, processo 408795/2006-9) e Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Amazonas (FAPEAM, processo 126/08).

Literatura citada

ARBELAEZ-ROJAS, G.A.; FRACALOSSO, D.M.; FIM, J.D.I. Composição corporal de tambaqui, *Colossoma macropomum*, e matrinxã, *Brycon cephalus*, em sistemas de cultivo intensivo, em igarapé, e semi-intensivo, em viveiros. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.31, n.3, p.1059 – 1069, 2002.

MOURA, W.L.; MATUSHIMA, E.R.; OLIVEIRA, L.W.; EGAMI, M.I. Aspectos morfológicos e citoquímicos dos glóbulos sanguíneos de *Caiman crocodilus yacare* (Daudin, 1802) (Reptilia, Crocodylia). **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v.36, n.1, p.45 – 50, 1999.

SHIGDAR, S.; HARFORD, A.; WARD, A.C. Cytochemical characterisation of the leucocytes and thrombocytes from Murray cod (*Maccullochella peelii peelii*, Mitchell). **Fish & Shellfish Immunology**, v.26, n.5, p.731–736, 2009.

TAVARES-DIAS, M. Cytochemical method for staining fish basophils. **Journal of Fish Biology**, v.69, n.1, p.312 – 317, 2006.

TAVARES-DIAS, M.; AFFONSO, E.G.; OLIVEIRA, S.R.; MARCON, J.L.; EGAMI, M.I. Comparative study on hematological parameters of farmed matrinxã, *Brycon amazonicus* Spix and Agassiz, 1829 (Characidae: Bryconinae) with others Bryconinae species. **Acta Amazonica**, v.38, n.4, p.799 – 806, 2008.

TAVARES-DIAS, M.; MORAES, F.R. 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.