

Parâmetros hematológicos dos peixes: procedimentos para análise ambiental.

CICERO, Laís Henrique¹; BARRELLA, Walter¹; ROTUNDO Matheus Marcos²

¹Programa de Pós-Graduação em Sustentabilidade de Ecossistemas Costeiros e Marinheiros (ECOMAR) lais_cicero@hotmail.com

²Acervo Zoológico Universidade Santa Cecília

Resumo

O sangue é constituído por um líquido, o plasma, que conduz três células distintas quanto suas funções. Os eritrócitos, são as células em maior quantidade na circulação sanguínea, são nucleados nos peixes e transportam oxigênio e gás carbônico. Os leucócitos são as células de defesa e podem ser utilizados para avaliar o sistema imunológico, já os trombócitos estão relacionados com a coagulação sanguínea, com a defesa orgânica e possuem função fagocitária. Os parâmetros hematológicos vêm sendo utilizado Brasil e no exterior como fator de indicação ambiental e saúde confiável de organismos. O objetivo desse trabalho é apresentar para os alunos do curso de biologia sobre as análises sanguíneas e qual sua utilização nos dias atuais. Os peixes serão capturados com picaré na praia do Boqueirão em Santos, serão anestesiados com óleo de cravo e o sangue será coletado no pedúnculo caudal com seringa heparinizada e acondicionado em tubos de EDTA, esses peixes serão transportados para o acervo para serem identificados. Com o sangue serão feitos esfregaços sanguíneos, hematócrito e VCM. Espera-se que os alunos aprendam a utilizar a rede picaré, a coletar o sangue dos peixes e identifica-los utilizando chave dicotômica. Assim como, aprender a confeccionar esfregaços sanguíneos e observá-los em microscópio óptico, diferenciar as células sanguíneas em eritrócitos, os diferentes tipos de leucócitos e trombócitos. E perceberam a importância dessas análises hematológicas para análise e monitoramento ambiental.

Palavras-Chaves: peixes, análise sanguínea, eritrócitos, leucócitos e trombócitos.

Hematological parameters of fish: procedures for environmental analysis.

Abstract

Blood consists of a liquid, the plasma, which leads to three different cells and their functions. Red cells are the cells in greater amounts in the blood stream, are nucleated in fish and carry oxygen and Carbonic gas. The leukocytes are the defense cells and can be used to assess the immune system, as thrombocytes are related to blood clotting with the organic defense and have phagocytic function. Hematologic parameters have been used Brazil and abroad as an environmental statement and reliable health Factor bodies . The aim of this work is to present to students of biology on blood tests and what their use today. The fish will be caught with seine on the beach of the Big hole in Santos , will be anesthetized with clove oil and the blood will be collected on the caudal peduncle with heparinized syringe and placed in EDTA tubes, these fish will be transported to the acquits to be identified . With blood, a blood hematocrit and MCV smears will be made. It is expected that students learn to use a seine net to collect the blood of fish and identify them using a dichotomous key. Like , learn to sew blood smears and observe

them under a light microscope , the blood cells differentiate into erythrocytes , the different types of leukocytes and thrombocytes . And realized the importance of these hematologic analyzes for environmental analysis and monitoring.

Key-words: Fish , blood analysis , erythrocytes , leukocytes and thrombocytes.

Introdução

O sangue é constituído por um líquido, o plasma, que conduz diversas células que possuem diferentes atividades. Origina-se principalmente no timo, no fígado, no baço e no intestino e é o responsável por levar aos tecidos, nutrientes que são importantes nas atividades metabólicas e hormônios, também retiram dos tecidos o que não é útil (SATAKE *et al.*,2009) . O plasma conduz três células distintas quanto suas funções: os leucócitos, os trombócitos e os eritrócitos (DRUMOND *et al.*, 2010; SATAKE *et al.*, 2009; ZAVALA – CAMIN, 2004)..

Os eritrócitos, são as células em maior quantidade na circulação sanguínea, são nucleados nos peixes e transportam oxigênio e gás carbônico. Pode-se notar variações morfológicas nestas células em diferentes espécies de peixes, geralmente os eritrócitos são elípticos com núcleo central, exibem cromatina compacta nas células maduras e nos eritroblastos a cromatina é frouxa (RANZANI-PAIVA *et al.*,1998; RANZANI-PAIVA *et al.*,2013).

Os leucócitos são as células de defesa e podem ser utilizados para avaliar o sistema imunológico, são classificados como monócitos (principais fagócitos dos peixes), linfócitos (os mais abundantes e são responsáveis pelo reconhecimento dos antígenos e resposta imune), neutrófilo (defesa contra bactérias), eosinófilos (defesa contra parasitas), basófilos (participa do processo fagocitário). Já os trombócitos estão relacionados com a coagulação sanguínea, com a defesa orgânica e possuem função fagocitária (RANZANI-PAIVA *et al.*,2013).

Os parâmetros hematológicos vêm sendo utilizado Brasil e no exterior como fator de indicação ambiental e saúde confiável de organismos (SERIANI *et al.*, 2013). Nos peixes de clima temperados, os estudos tiveram início no século passado e no Brasil, a partir da década de 80, quando teve início uma pesquisa mais intensa (TAVARES-DIAS & MORAES, 2004;). A literatura afirma que os peixes que estão expostos a pesticidas, metais e efluentes contaminados apresentam alterações hematológicas tanto em campo quanto em laboratório, (SERIANI *et al.*, 2013). Dessa forma, análises hematológicas de peixes expostos a contaminantes podem ser importantes no sentido de avaliar e monitorar a qualidade ambiental (RANZANI-PAIVA *et al.*, 2013).

O objetivo desse trabalho é apresentar para os alunos do curso de biologia sobre as análises sanguíneas e qual sua utilização nos dias atuais.

Materiais e métodos

Parte teórica

Os alunos irão ter uma aula teórica sobre o assunto e após a aula prática irão entregar um relatório em formato de artigo sobre o que foi observado em aula.

Parte prática

A coleta será realizada na praia do Boqueirão, localizada em Santos, (Figura 01). Os exemplares serão coletados através de dois arrastos de picaré (30 m de comprimento, 2 m de altura, 2 m de ensacador e malha de 2,4 cm entre nós opostos)

realizados em paralelo a praia, com duração de 5 minutos cada, sendo inicializado as 09h30.

Os exemplares coletados serão anestesiados segundo Delbon (2009) e RANZANI-PAIVA *et al.* (2013) utilizando 1,5 mL de solução de óleo de cravo (5mL de óleo de cravo + 95 mL de álcool 96 – 99° GL) para cada 1L de água. Posteriormente o sangue será coletado por punção da artéria caudal utilizando seringa heparinizada e será transferido e armazenado em tubos de EDTA (ácido etilenodiamino tetra-acético) e guardados em isopor para facilitar o transporte para posterior análise laboratorial. Os peixes serão acondicionados individualmente e transportados para o laboratório do Acervo Zoológico da Universidade Santa Cecília (AZUSC-UNISANTA).

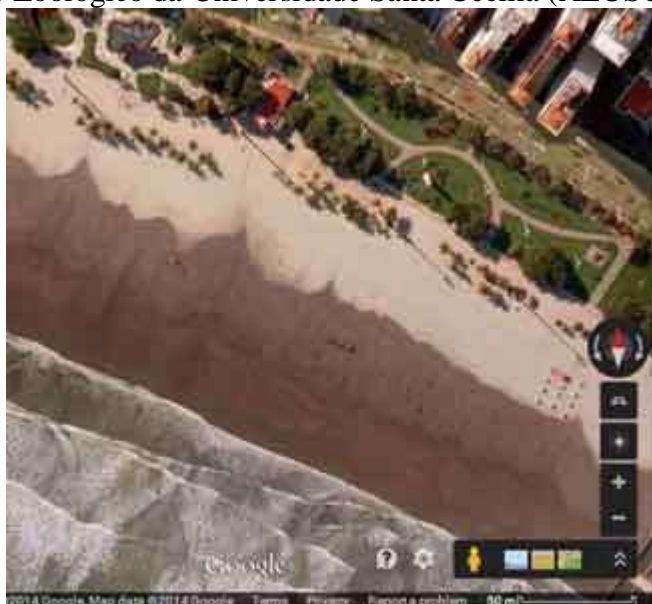


Figura 1: Praia do Boqueirão em Santos, SP.
Fonte: Google

Análise laboratorial

Para a realização dessa etapa os alunos deverão trazer impresso para o laboratório os procedimentos em anexo dos testes e as imagens dos exemplos de células que eles irão observar em microscópio óptico.

Será realizada a identificação dos peixes através de chaves dicotômicas. A análise sanguínea de cada exemplar será realizada utilizando lâminas de esfregaço, coradas segundo Rosenfeld (1947) e câmara de Neubauer para a quantificação e morfologia dos eritrócitos, assim como a presença ou ausência de parasitas e micronúcleos. Será realizado o microhematócrito, que mostra a proporção de eritrócitos no sangue em relação à quantidade de plasma, trombócitos e leucócitos (GOLDERFARD *et al.*, 1971). Com base nos resultados, será calculado o volume corpuscular médio (VCM) segundo Wintrobe (1934), que avalia o volume dos eritrócitos, através da expressão:

Hematócrito x 10

$$\text{VCM: } \frac{\text{Hematócrito} \times 10}{\text{Número de Eritrócitos (x } 10^6 \mu\text{L}^{-1})} = \text{fL}$$

Em anexo

Resultados esperados e discussão

Com bases na aula teórica e prática, espera-se que os alunos aprendam a utilizar a rede picaré, a coletar o sangue dos peixes e identifica-los utilizando chave dicotômica. Assim como, aprender a confeccionar esfregaços sanguíneos e observá-los em microscópio óptico, diferenciar as células sanguíneas em eritrócitos, os diferentes tipos de leucócitos e trombócitos. E perceberam a importância dessas análises hematológicas para análise e monitoramento ambiental através do relatório que entregarão e para isso irão precisar buscar artigos científicos para tal.

Como o de Seriani *et al.* (2013) que em seu trabalho comparou o hematócrito, contagem de leucócitos, contagem de eritrócitos, trombócitos e VCM em peixes da espécie *Centropomus parallelus*, coletados no verão e no inverno nos estuários de Cananéia (menos contaminado) e São Vicente (mais contaminado) e os resultados mostraram que os peixes coletados em São Vicente apresentaram tanto no inverno quanto no verão parâmetros hematológicos mais elevados que os de Cananéia.

Referências

DELBON, M. C. **Ação da Benzocaína e do Óleo de Cravo sobre parâmetros fisiológicos de tilápia, *Oreochromis niloticus***. 2009. 91 f. Dissertação (Mestrado em Aquicultura) - centro de Aquicultura da UNESP, Universidade Estadual Paulista “ Júlio de Mesquita Filho”, Jaboticabal.

DRUMOND, G. V. F.; CAIXEIRO, A.P. A.; TAVARES – DIAS, M.; MARCON, J. L.; AFFONSO, E.G. Características bioquímicas e hematológicas do pirarucu *Arapaima gigas* Schinz, 1822 (Arapaimidae) de cultivo semi-intensivo na Amazônia. **Acta Amazonica**, Amazôni, v. 40, n. 3,p. 591 – 596, 2010.

GOLDENFARB, P. B., BOWYER, F.P., HALL, E. BROSIOUS, E. Reproducibility in the hematology laboratory: the microhematocrit determination. **Am. J. Clin. Pathol.**, New York, v. 56, p. 35-39, 1971.

RANZANI-PAIVA, M.J.T.; TABATA, Y.A.; EIRAS, A.C.das. Hematologia comparada entre diploides e triploides de truta arco-íres, *Oncorhynchus mykiss* Walbaum (Pisces, Salmonidae). **Revista brasileira Zoologia**, v.15,n.4, p.1093-1102, 1998.

RANZANI – PAIVA, M. J. T.; PÁDUA, S.B.; TAVARES – DIAS, M.; EGAMI, M.I., **Métodos para análise hematologia de peixes**. 1 ed. Maringá: Editora da Universidade Estadual de Maringá, 2013. 142p.

ROSENFELD, G. Corante pancrômico para hematologia e citologia clínica. Nova combinação dos componentes do May-Grünwald e do Giemsa num só corante de emprego rápido. **Memórias do Instituto Butantan**, v. 20, p.329-334, 1947.

SATAKE, F., BENITES DE PÁDUA, S. E ISHIKAWA, M. M. .Distúrbios morfológicos em células sanguíneas de peixes em cultivo: uma ferramenta

prognóstica. In: TAVARES-DIAS, M. (Ed). **Manejo e Sanidade de Peixes em Cultivo**. Amapá: Embrapa, 2009. cap 13, p. 330-345.

SERIANI, R.; MOREIRA, L. B.; ABESSA, D. M. S.; ABUJAMARA, L. D.; CARVALHO, N. S. B.; MARANHO, L. A.; KIRSCHBAUM, A. A.; RANZANI-PAIVA, M. J. T.. Hematological analysis of *Micropogonias furnieri*, Desmarest, 1823, Scianidae, from two Estuaries of Baixada Santista, São Paulo, Brazil **Brazilian Journal of Oceanography**, v. 58 (special issue IV SOB): p. 87-92, 2010.

TAVARES – DIAS, M.; RUAS DE MORAES, F. **Livro de hematologia de peixes teleósteos**, Ribeirão Preto: M. Tavares-Dias, 2004. P. 144, ISBN: 85-97136-1-6.).

WINTROBE, M.M. Variations in the size and haemoglobin content of erythrocytes in the blood of various vertebrates. **Folia Haematologica**, v. 51, p. 32-49, 1934.

ZAVALA – CAMIN, L.A., **O planeta água e seus peixes**. 1.ed. Santos: Comunicar, 2004. 326 p.

ANEXOS COM OS PROCEDIMENTOS

Punção sanguínea no pedúnculo caudal

Esse método de coleta é rápida, porém é necessário localizar o vaso corretamente para não lesionar o peixe. A agulha deve estar inclinada à 45° e deve ser inserida em direção a região ventral da coluna vertebral, esse é o local onde estão a artéria e veia caudais (Figura 1) (RANZANI-PAIVA et.al., 2013).



Figura 1: Coleta do sangue pelo pedúnculo caudal.

Fonte: RANZANI-PAIVA (2013.)

Contagem de células

Para essa análise será necessária uma câmara de Neubauer (Figura 2), que consiste de uma lâmina retângulas de vidro e contém dois retículos na porção central, e são separados por um sulco. Para ser realizada a contagem os leucócitos são contados nos quadrados laterais e os eritrócitos no quadrante central (em apenas 5 quadrados) como na Figura 3, 4 e 5.

O sangue deve ser diluído com uma solução fisiológica 0,65%, e sobre a câmara de Neubauer deve ser fixada uma lamínula, depois preencher cada retículo com a diluição do sangue, deixar repousar por alguns segundos e fazer a leitura em microscópio (RANZANI-PAIVA et.al., 2013).

Cálculo:

Número de eritrócitos = nº de células contadas x 10.000.

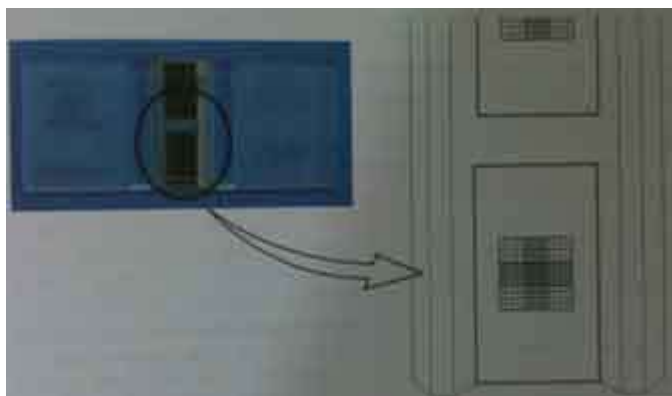


Figura 2: Câmara de Neubauer.
Fonte: RANZANI-PAIVA (2013.)

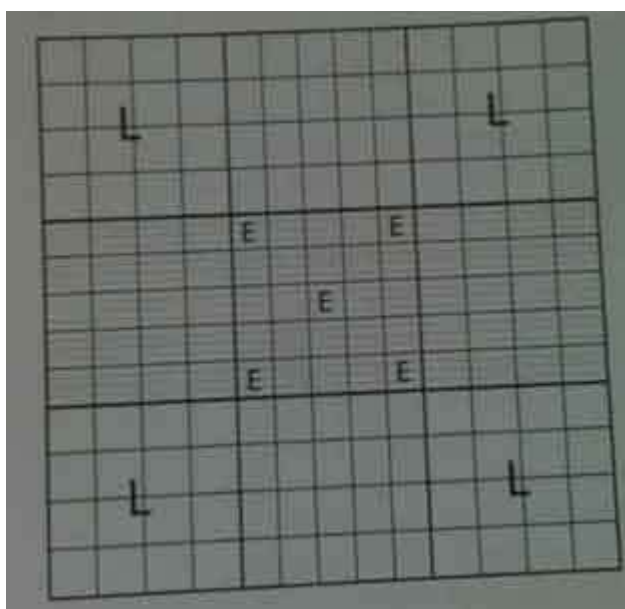


Figura 3: Contagem das células na Câmara de Neubauer.
Fonte: RANZANI-PAIVA (2013.)

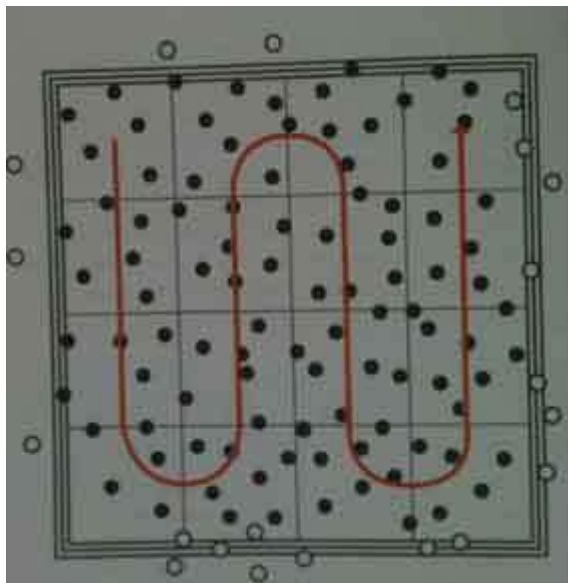


Figura 4: Contagem dos eritrócitos no quadrante central da Câmara de Neubauer.
Fonte: RANZANI-PAIVA (2013.)

Microhematócrito

- Preencher um capilar heparinizado com o sangue armazenado no tubo de EDTA, para isso incline o tubo e gire o capilar para que o sangue suba por dentro dele (Figura 5).
- Vedar um dos lados do capilar com um vedador próprio, ou aquecendo com a chama do bico de bunsen (Figura 6).
- Colocar o capilar em uma centrífuga de microhematócrito durante 5 minutos a 12.000rpm.
- No capilar será possível notar os três elementos separados (Figura 7), utilizar uma régua de microhematócrito para realizar a leitura dos resultados (Figura 8).

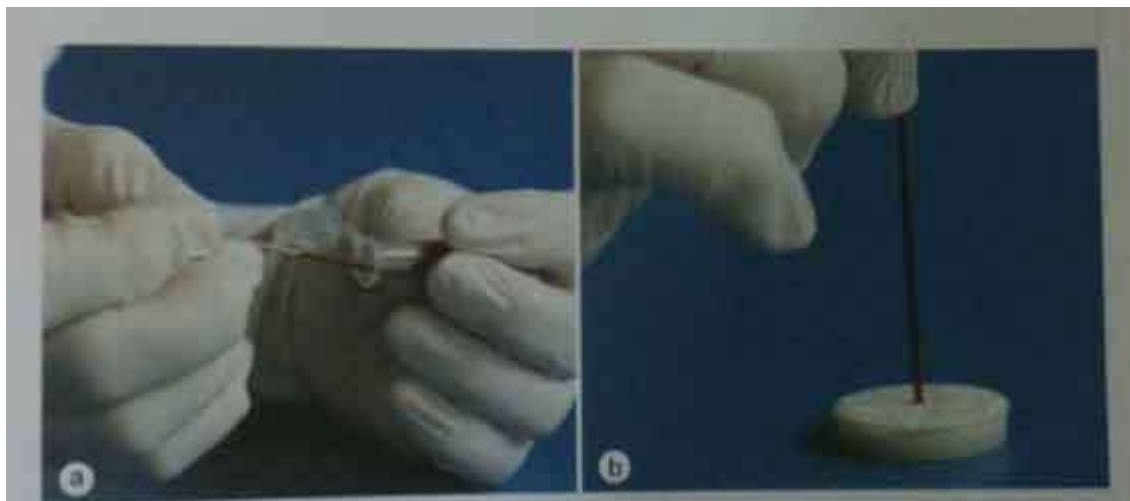


Figura 5: Preenchimento do capilar
Fonte: RANZANI-PAIVA (2013.)

Figura 6: Vedação do capilar
Fonte: RANZANI-PAIVA (2013.)

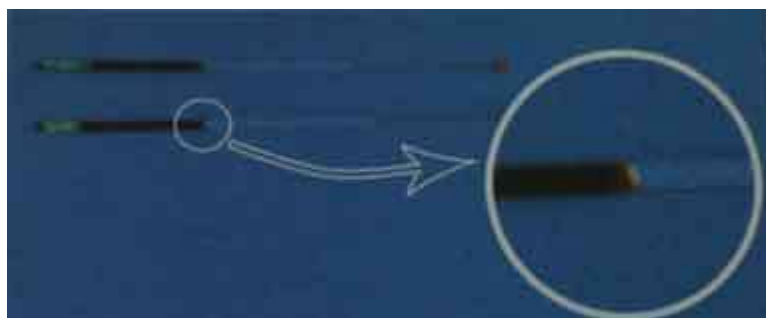


Figura 7: Capilar após centrifugação, nota-se as três elementos sanguíneos separados.

Fonte: RANZANI-PAIVA(2013.)



Figura 8: Verificação dos resultados

Fonte: RANZANI-PAIVA(2013.)

Lâmina de esfregação sanguíneo (RANZANI-PAIVA et.al., 2013).

- As lâminas devem novas e limpas, desengorduradas.
- Após a coleta de sangue através das primeiras gotas da seringa na extremidade da lâmina.
- Colocar outra lâmina em frente a gota de sangue, formando um ângulo de 45°, encosta na gota e faça um pequeno movimento para a frente, para que o sangue se espalhe de maneira uniforme na superfície de contato entre as duas lâminas (Figura 9).
- Esperar secar para corar.

Coloração das Lâminas segundo Roselfed (1947):

- Colocar as lâminas em suporte de coloração na pia do laboratório.
- Com o auxílio de uma pipeta, colocar na extensão da lâmina o reagente 1 (Garrafa de líquido verde) esperar 30 segundos e escorrer o líquido na pia.
- Com outra pipeta, colocar na extensão da lâmina o reagente 2 (Garrafa de líquido vermelho) esperar 30 segundos e escorrer o líquido na pia.
- Utilizando uma 3ª pipeta colocar na extensão da lâmina o reagente 3 (Garrafa de líquido azul) esperar 30 segundos e escorrer o líquido na pia.
- Lavar com água destilada e esperar secar para a leitura da lâmina no microscópio.
- Como proceder leitura após lâmina pronta (Figura 10).

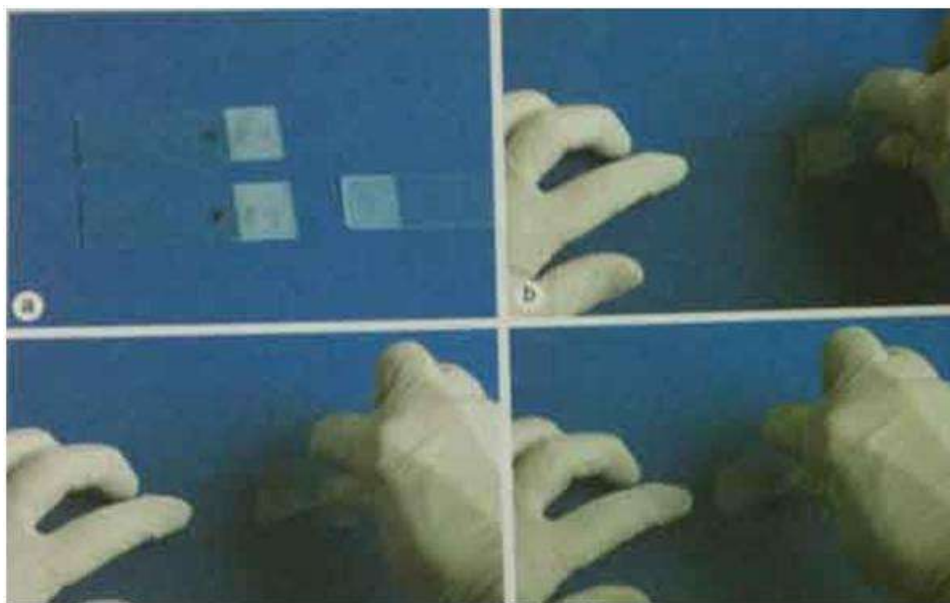


Figura 9: Esfregaços sanguíneos
Fonte: RANZANI-PAIVA(2013.)

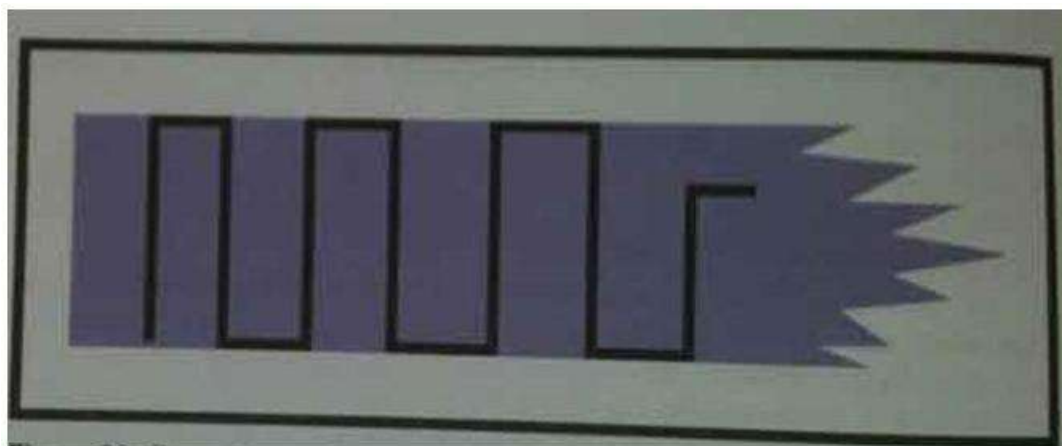


Figura 10: Procedimento de leitura dos esfregaços sanguíneos
Fonte: RANZANI-PAIVA(2013.)

ANEXOS

Reconhecimento das células sanguíneas

Abaixo estão as células que irão observar nos microscópios.

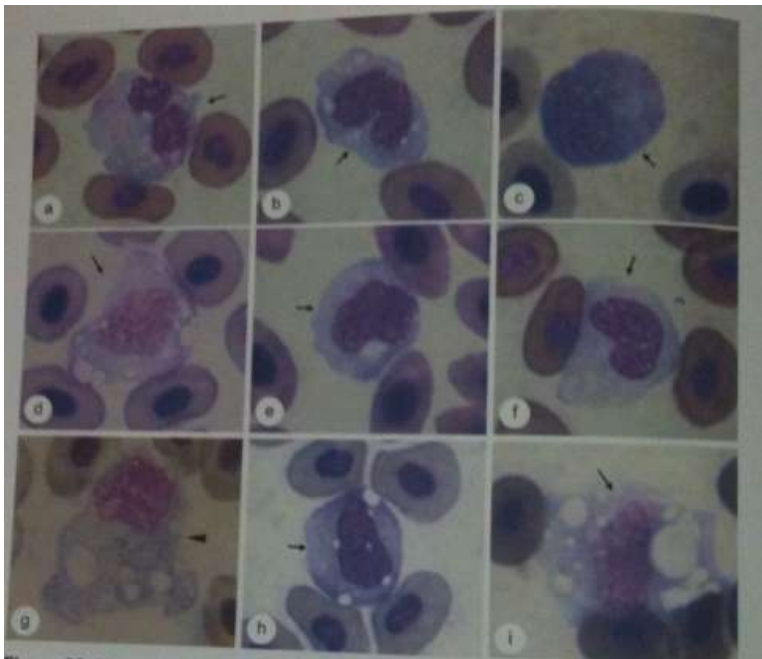
Eritrócitos



Fonte: RANZANI-PAIVA (2013.)

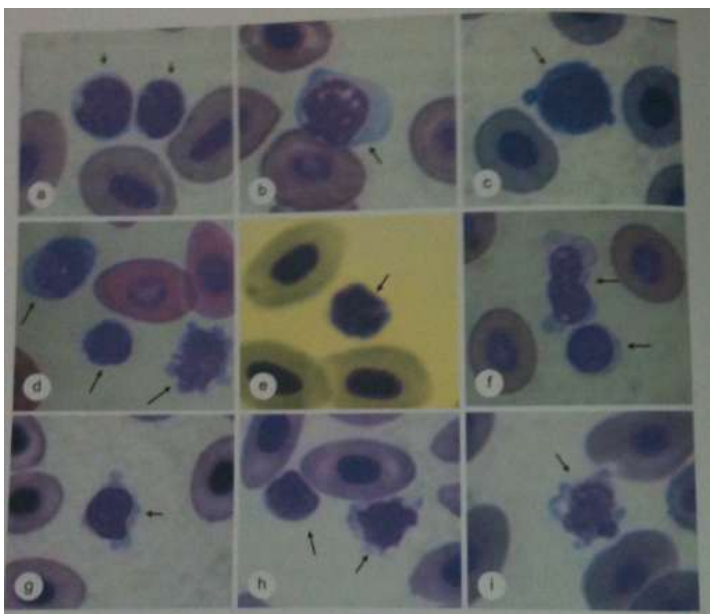
Leucócitos

Monócito



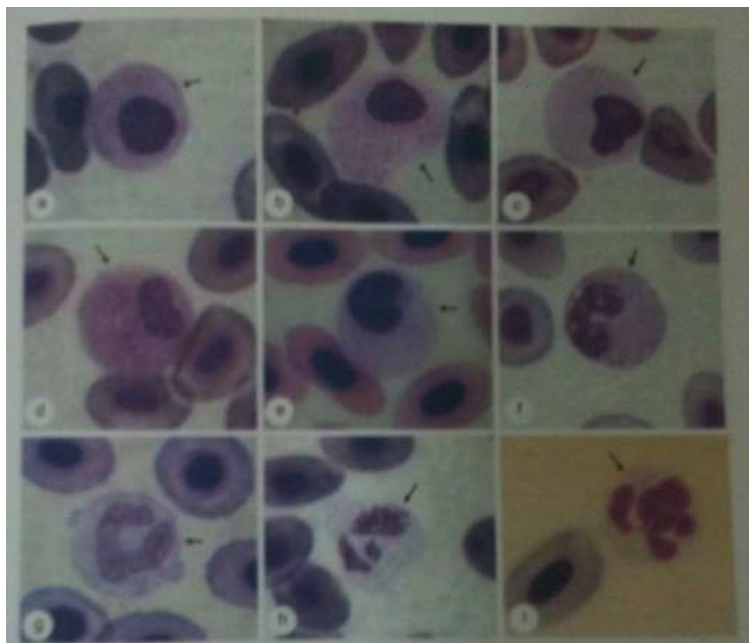
Fonte: RANZANI-PAIVA (2013.)

Linfócito



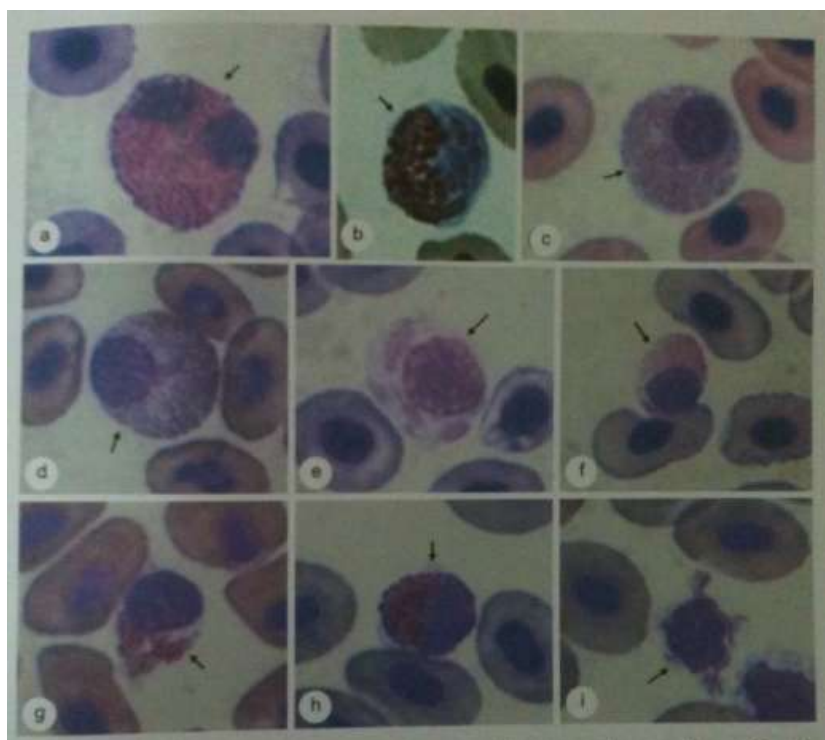
Fonte: RANZANI-PAIVA (2013.)

Neutrófilo



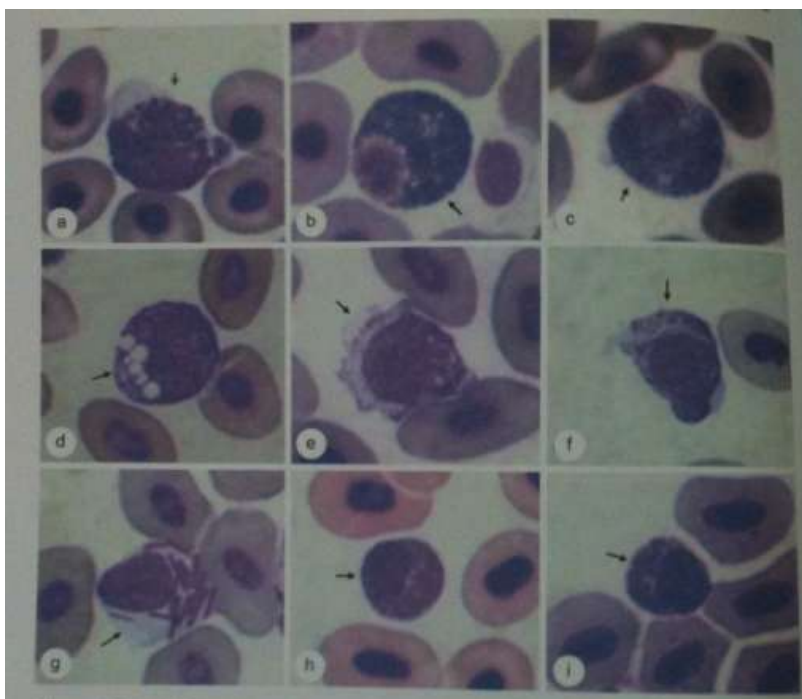
Fonte: RANZANI-PAIVA (2013.)

Eosinófilos



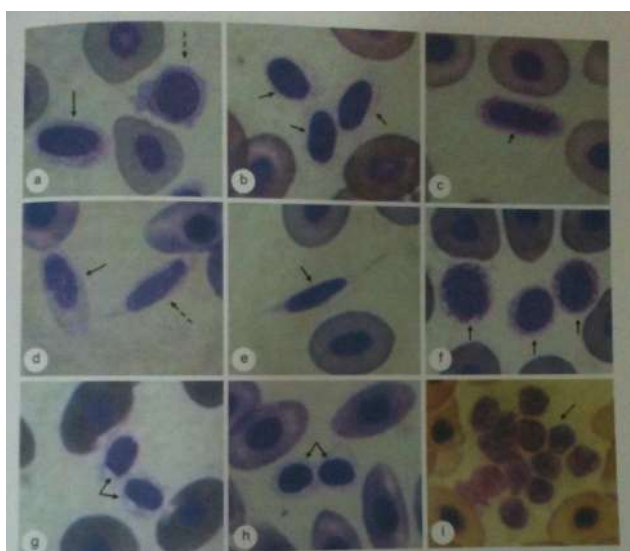
Fonte: Ranzani-Paiva (2013)

Basófilo



Fonte: RANZANI-PAIVA (2013.)

Trombócitos



Fonte: RANZANI-PAIVA (2013.)