

### Aspectos citoquímicos do sangue da arraia *Potamotrygon* sp. (arraia cururu)<sup>1</sup>

Adriano Teixeira de Oliveira<sup>2</sup>, Jefferson Raphael Gonzaga Lemos<sup>3</sup>, Marcio Quara de Carvalho Santos<sup>4</sup>,  
Rejane Souza de Aquino Sales<sup>5</sup>, José Fernando Marques Barcellos<sup>6</sup>, Elizabeth Gusmão Affonso<sup>7</sup>,  
Jaydione Luiz Marcon<sup>8</sup>, Marcos Tavares-Dias<sup>9</sup>

<sup>1</sup>Parte da tese de doutorado do primeiro autor, financiada pela CAPES, CNPq e FAPEAM

<sup>2</sup>Doutorando do Programa de Pós-Graduação em Diversidade Biológica – UFAM. e-mail: ateixeira@ufam.edu.br

<sup>3</sup>Mestrando do Programa de Pós-Graduação em Diversidade Biológica - UFAM. Bolsista da CAPES.

<sup>4</sup>Mestrando do Programa de Pós-Graduação em Diversidade Biológica - UFAM. Bolsista da FAPEAM.

<sup>5</sup>Mestranda do Programa de Pós-Graduação em Agricultura no Trópico Úmido – INPA.

<sup>6</sup>Professor Adjunto do Laboratório de Histologia - UFAM/Manaus, AM.

<sup>7</sup>Pesquisadora do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia – INPA – Manaus, AM.

<sup>8</sup>Professor Adjunto do Laboratório de Ciências Fisiológicas - UFAM/Manaus, AM. Bolsista do CNPq.

<sup>9</sup>Pesquisador da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – EMBRAPA – Macapá, AP. Bolsista do CNPq.

**Resumo:** Este trabalho teve como objetivo descrever as principais reações citoquímicas de eritrócitos, leucócitos e trombócitos da arraia *Potamotrygon* sp. (arraia cururu). O glicogênio apresentou reação positiva em trombócitos e heterófilos, bem como reação fraco-positiva em linfócitos e monócitos, entretanto, não foi observada reação positiva de peroxidase nas células do sangue da arraia cururu. Metacromasia foi observada apenas em basófilos e marcações positivas de lipídios foram observadas em trombócitos e linfócitos, além de coloração fraco-positiva em heterófilos. A reação de proteínas apresentou marcação positiva apenas em heterófilo e basófilo, a presença de reticulócitos foi observada em eritrócitos. As informações geradas pelo presente estudo indicam que o heterófilo é a principal célula do sistema imunológico da arraia cururu e que pode auxiliar no monitoramento das condições de saúde dessa espécie nos exportadores.

**Palavras-chave:** arraia, células, citoquímica, sistema imunológico, manejo, sangue

### Cytochemical aspects of the blood of stingray *Potamotrygon* sp. (cururu ray)

**Abstract:** the aim of this paper is to describe the main cytochemical's reactions of erythrocytes, leukocytes and thrombocytes of the freshwater stingray *Potamotrygon* sp. (cururu stingray). The positive glycogen reactions were observed in thrombocytes and heterophils, and weak positive reaction in lymphocytes and monocytes. However, no peroxidase reaction was observed in blood cells of the cururu stingray. Metachromasia was observed only in basophils and lipids positive reactions were observed in thrombocytes and lymphocytes, and weak positive staining in heterophils. Proteins were identifying only in heterophil and basophil. The presence of reticulocytes was observed in erythrocytes of *Potamotrygon* sp.. The information generated by this study indicates that the heterophil is the main cell of the immune system of the cururu stingray and that can assist in monitoring the health condition of this species on exporters

**Keywords:** blood, cells, cytochemical, handling, immune system, stingray

### Introdução

A determinação de parâmetros hematológicos fornece importantes informações sobre o monitoramento do estado de saúde em elasmobrânquios. A análise do leucograma ainda é motivo de dúvidas e controvérsias, devido aos diferentes métodos de colorações empregados e da identificação dos diferentes tipos leucocitários (Tavares-Dias, 2004). Devido às variações morfológicas das células granulocíticas uma análise baseada somente na morfologia pode ser insuficiente para identificação dos tipos de leucócitos. Os constituintes enzimáticos e não enzimáticos destas células podem ser demonstrados por métodos citoquímicos. Estes métodos são úteis para identificação das populações dos leucócitos em vários grupos de vertebrados, e podem ser também utilizados em espécies de arraias que possuem grande representatividade no mercado de peixes ornamentais no estado do Amazonas, como *Potamotrygon* sp. (arraia cururu). Desta forma, este trabalho tem por objetivo descrever as reações citoquímicas de eritrócitos, leucócitos e trombócitos da arraia cururu que podem ser úteis em planos de manejo e estratégias de conservação.

### Material e Métodos

As arraiais estavam acondicionadas em tanques com aeração constante na Coordenação de Pesquisa em Aquicultura do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA), e recebiam minhocas vivas uma vez ao dia até a saciedade. O sangue foi coletado com seringas contendo EDTA (10%) de dez espécimes da arraia cururu, os animais apresentaram peso corpóreo (média  $\pm$  DP) de  $226,0 \pm 48,5$  g, largura do disco de  $17,4 \pm 1,1$  cm e comprimento total de  $19,1 \pm 2,5$  cm. Extensões sanguíneas foram preparadas e serviram para a coloração tradicional por May Grunwald-Giemsa-Wright e para as colorações citoquímicas. Para a demonstração do glicogênio foi utilizado o método do ácido periódico Schiff/PAS, a peroxidase foi determinada utilizando-se orto-toluidina na presença do peróxido de hidrogênio. Na reação de metacromasia as extensões sanguíneas foram coradas em azul de toluidina a 0,5%. Os lipídeos foram corados pelo método do Sudan black B, na identificação de proteínas totais as extensões sanguíneas foram fixadas em vapor de formol e coradas em azul de bromofenol. Os reticulócitos foram identificados usando a solução de azul de cresil brilhante. Os resultados foram expressos em função da intensidade das reações citoquímicas: -, reação negativa; + reação fraco positiva; ++, reação positiva.

### Resultados e Discussão

No sangue da arraia cururu foram observados eritrócitos, trombócitos, linfócitos, monócitos, heterófilos e basófilos com as mesmas características morfológicas que as observadas em espécies de elasmobrânquios (Old & Huveneers, 2006). O glicogênio apresentou reações positiva em trombócitos e heterófilos, bem como reação fraco positiva em linfócitos e monócitos (Tabela 1). Resultados similares foram obtidos por Chansue et al., (2010), quando analisando o sangue de uma espécie de arraia denominada *Potamotrygon* spp., porém, em seus estudos não foi determinado o tipo de granulócito que reagiu positivamente.

Não foi observada reação positiva de peroxidase nas células do sangue da arraia cururu (Tabela 1), a exemplo dos resultados obtidos por Chansue et al. (2010). A peroxidase é uma importante enzima lisossômica que participa na digestão intracelular e uma das suas principais características é a marcação em eosinófilos, que é um leucócito inexistente em arraiais de água doce, ou heterófilo através da marginação desse tipo leucocitário e de sua acumulação no local da inflamação (Tavares-Dias, 2004). A ausência da peroxidase em heterófilos pode estar associada à pequena quantidade dessa enzima, o que impossibilitou sua visualização em microscopia óptica, ou ainda ao desenvolvimento compensatório de outros componentes microbicidas, como por exemplo, as proteínas catiônicas (Tavares-Dias, 2004).

A reação da metacromasia tem como característica o uso de um reagente azul e a reação observada marca com coloração vermelha e é típica de basófilos. No sangue da arraia cururu foi constatada esse tipo de reação (Tabela 1), o que confirma a presença de basófilos no sangue desta espécie. Os leucócitos fagocíticos podem utilizar lipídios como fonte de energia e, podem degradar lipídios por atuação das enzimas citoplasmáticas (Lorenzi, 1999), marcações positivas foram observadas em trombócitos e linfócitos, além de coloração fraco-positiva em heterófilos (Tabela 1) e indicam que esses tipos celulares exercem grande atividade no sistema imunitário da arraia cururu. A identificação de proteínas marcou positivamente apenas em heterófilo e basófilo (Tabela 1). De acordo com Lorenzi (1999), a função das proteínas dentro de tipos leucocitários esta associada à defesa contra microrganismos, provocando sua morte quando são liberadas após a ruptura destas células. A presença de reticulócitos foi observada em eritrócitos e indicam a presença de fragmentos de material reticular que não cora com a utilização de corantes tradicionais. A composição citoquímica indicou que a principal célula de defesa do sistema imunológico da arraia cururu é o heterófilo.

Tabela 1 Reações citoquímicas das células do sangue da arraia *Potamotrygon* sp. (arraia cururu).

	PAS	Peroxidase	Azul de toluidina	Sudan Black B	Azul de bromofenol
Trombócitos	++	-	-	++	-
Linfócitos	+	-	-	++	-
Monócitos	+	-	-	-	-
Heterófilos	++	-	-	+	++
Basófilos	-	-	++	-	++

-, reação negativa; + reação fraco-positiva; ++, reação positiva.

### **Conclusões**

Em arraiais de água doce, a atividade fagocítica tende a ser executada principalmente pelos heterófilos, o que constitui um dos mecanismos mais importantes do sistema imunológico contra estresse, agentes infecciosos e parasitários. Embora ainda não existam criações de arraiais de água doce em cativeiro, devido o pouco conhecimento científico sobre esse grupo de elasmobrânquios, a compreensão sobre o sistema imunológico desses animais são de grande valia no monitoramento das condições de saúde dessas espécies nos exportadores, além do mais o entendimento das respostas imunológica através da identificação das células do sangue e das principais reações enzimáticas e não enzimáticas constituem-se em um dos primeiros passos para a implementação do cultivo dos potamotrigonídeos em condições de cativeiro.

### **Agradecimentos**

Agradecemos aos pesquisadores do Laboratório de Zoologia Aplicada do Centro Universidade Nilton Lins (CUNL) pela disponibilidade na obtenção das imagens fotográficas de microscopia óptica. Este trabalho foi financiado pela Universidade Federal do Amazonas (UFAM), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Amazonas (FAPEAM, processo 126/08) e Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq, processo 408795/2006-9).

### **Literatura citada**

- CHANSUE, N.; TANGTRONGPIROJ, J.; ASSAWAWONGKASEM, N.; SAILASUTA, A. Blood Cytochemical Staining of Freshwater Stingray (*Potamotrygon* spp.), In: **Proc. 9th CU. Vet. Sci. Ann. Con.**, p.95, 2010.
- LORENZI, T.F. **Manual de hematologia propedêutica e clínica**. São Paulo, MDSI, 1999. 641p.
- OLD, J.M.; HUVENEERS, C. Morphology of the blood cells from three species of wobbegong sharks (*Orectolobus* species) on the east coast of New South Wales. **Zoo Biology** 25, 73-82, 2006.
- TAVARES-DIAS, M. A morphological and cytochemical study of erythrocytes, thrombocytes and leukocytes in four freshwater teleosts. **Journal of Fish Biology**, v. 68, p. 1822-1833, 2006.