

CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA DAS CÉLULAS SANGUÍNEAS DA IRAPUCA (TESTUDINES, PODOCNEMIDIDAE) DO MÉDIO RIO NEGRO, AMAZONAS

Santos¹, M. Q. C.; Oliveira¹, A. T.; Sales², R. S. A.; Carmo³, I. B.; Tavares-Dias⁴, M.; Affonso³, E. G.; Marcon², J. L.

¹Programa de Pós-Graduação em Diversidade Biológica da Universidade Federal do Amazonas - Av. General Rodrigo Octávio Ramos, 3000, Campus Universitário, Coroado I, Manaus – AM. E-mail: marcioquara@hotmail.com

²Laboratório de Fisiologia da Universidade Federal do Amazonas - Av. General Rodrigo Octávio Ramos, 3000, Campus Universitário, Coroado I, Manaus – AM

³Laboratório de Fisiologia Aplicado à Piscicultura do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia - Av. André Araújo, 2936, Aleixo, Manaus – AM

⁴Laboratório de Aquicultura e Pesca da Embrapa Amapá – Rod. Juscelino Kubitschek, Km 5, 2600, Macapá – AP

Palavras-chave: hematologia, quelônio, sanidade

INTRODUÇÃO

O acompanhamento das características qualitativas e quantitativas das células sanguíneas constitui uma das maneiras mais elementares para avaliar o estado de saúde dos animais (TAVARES-DIAS e MORAES, 2007). Em mamíferos, as células do sangue são facilmente identificadas com base em suas diferenças morfológicas (PISTOL *et al.*, 2007). Contudo, nos répteis, a identificação destas células ainda é controversa (WORK *et al.*, 1998), sendo que a inconsistência na classificação ocorre em função das diferentes colorações utilizadas e principalmente, pela falta de conhecimento sobre as linhagens celulares desses animais (WORK *et al.*, 1998).

Essas informações são mais escassas ainda para as espécies amazônicas da família Podocnemididae (OLIVEIRA-JUNIOR *et al.*, 2009; OLIVEIRA *et al.*, 2011) e inexistentes para a irapuca, *Podocnemis erythrocephala*. Esta espécie encontra-se distribuída pelo sul da Colômbia, sudoeste da Venezuela e pela região Norte do Brasil, habitando preferencialmente pequenos rios e lagos de água preta da bacia do Rio Negro, podendo ser encontrada também em ambientes de água clara (MITTERMEIER e WILSON, 1974). De acordo com VOGT (2001), das três espécies de *Podocnemis* que ocorrem na bacia do Rio Negro, *P. erythrocephala* é a mais abundante, representando 85% dos quelônios capturados. Entretanto, dentre os podocnemídeos amazônicos, esta é a espécie menos conhecida do ponto de vista biológico, contribuindo para que fosse classificada pela IUCN como uma espécie vulnerável à extinção (IUCN, 2010).

Este trabalho teve como objetivo identificar e caracterizar morfológicamente as células sanguíneas de *P. erythrocephala*, gerando informações básicas para futuros trabalhos hematológicos com a espécie.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram capturados 15 espécimes de irapuca, de ambos os sexos, com peso (média \pm DP) de $442,9 \pm 31,5$ g e comprimento da carapaça de $17,8 \pm 0,4$ cm. Os animais foram coletados com auxílio de rede de arrasto em lagos e igarapés do Arquipélago de Mariuá, médio Rio Negro, Amazonas. Em seguida, foram transportados até a Estação de Piscicultura da Coordenação de Pesquisas em Aquicultura (CPAQ/INPA), onde permaneceram em aclimação em tanques de fibra de vidro por um período de 45 dias. Durante a aclimação, os animais foram alimentados duas vezes ao dia com vegetais (alfaca e couve) e com ração para peixe com 32% de proteína bruta, correspondendo a cerca de 5% do peso total dos animais.

Ao final da aclimação, os animais foram retirados da água e imobilizados através da revirada do corpo do animal. Após total imobilização, a amostra de sangue foi coletada através da punção da veia femoral utilizando seringas banhadas com heparina 5.000 UI e destinada à confecção de extensões sanguíneas.

As análises morfológicas das células do sangue foram feitas em extensões sanguíneas confeccionadas em lâminas de vidro previamente limpas com solução de etanol-éter. Em seguida, as extensões foram coradas com May Grunwald-Giemsa-Wright (Tavares-Dias e Moraes, 2003). Todas as extensões sanguíneas foram analisadas em microscópio óptico

Olympus BX51 com câmera acoplada Olympus modelo DP72. As células sanguíneas tiveram o maior e menor diâmetro, bem como a área celular, mensurados com auxílio do programa de análise de imagens Cell^D. Todas as células foram analisadas quanto aos padrões de forma, tamanho e afinidade tintorial. As identificações e descrições morfológicas foram realizadas com base nos estudos de CLAVER e QUAGLIA (2009), OLIVEIRA *et al.* (2011) e STACY *et al.* (2011).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Nas extensões sanguíneas de *P. erythrocephala* coradas com May Grunwald-Giemsa-Wright (MGGW) foram identificados sete tipos celulares: eritrócitos, trombócitos, linfócitos, azurófilos, heterófilos, eosinófilos e basófilos.

Os eritrócitos (Fig. 1-A) apresentaram tamanho, forma e coloração homogênea, não sendo observadas células irregulares ou com indícios de poiquilocitose. O formato da célula foi tipicamente oval apresentando área de $167,75 \pm 23,03 \mu\text{m}^2$ (Tab. 1). O núcleo foi central e alongado, apresentando pólos arredondados ou irregulares. O maior diâmetro do núcleo foi posicionado paralelamente ao maior diâmetro da célula. No interior do núcleo dos eritrócitos foi observada cromatina densa e com coloração variando do azul ao roxo escuro. Eventualmente foram encontrados eritrócitos infectados por gametócitos de um hemoparasita intraeritrocitário da família Haemogregarinidae, com o núcleo deslocado lateralmente (Fig. 1-A). O citoplasma foi abundante e acidófilico com coloração variando do alaranjado ao rosa.

Os trombócitos (Fig. 1-B) apresentaram área celular inferior às demais células (Tab. 1) e formato variando de elipsóide a circular. O citoplasma foi escasso, sem presença de grânulos e levemente acidófilico com coloração hialina ou rosa claro. O núcleo, disposto no centro da célula, geralmente acompanhou o formato da célula, podendo ser oval ou circular e com cromatina densa e de coloração azul clara a roxa.

Os linfócitos (Fig. 1-C) apresentaram tamanho inferior aos eritrócitos (Tab. 1). O formato variou de circular a amorfo, com citoplasma escasso e basófilico de coloração azul claro, circundando um núcleo largo posicionado centralmente na célula.

Os azurófilos (Fig. 1-D) apresentaram tamanhos e formatos variados com área média de $78,43 \pm 18,36 \mu\text{m}^2$ (Tab. 1). O citoplasma apresentou bordas distintas com coloração característica variando de azul claro a escuro.

Os heterófilos (Fig. 1-E) são células grandes, podendo ser maior que os eritrócitos e com área média de $171,54 \pm 30,85 \mu\text{m}^2$ (Tab. 1). O formato foi predominantemente circular, com citoplasma preenchido por grânulos fusiformes brilhantes de coloração variando de alaranjado a rosa. O núcleo apresentou coloração azul clara, disposição excêntrica e formato redondo ou oval, podendo ocasionalmente ser segmentado.

Os eosinófilos (Fig. 1-E) apresentaram tamanhos variados, mas relativamente menores aos heterófilos, com área média de $139,07 \pm 36,37 \mu\text{m}^2$ (Tab. 1). As células apresentaram formato variando de circular a oval, com citoplasma abundante e preenchido por grânulos circulares acidófilicos com coloração variando de alaranjado a rosa. O núcleo apresentou coloração azul clara, disposição excêntrica e formato variando de circular a oval, podendo raramente ser segmentado.

Os basófilos (Fig. 1-F) apresentaram tamanhos variados, com área média de $113,14 \pm 33,06 \mu\text{m}^2$, sendo encontradas células menores aos eritrócitos e de tamanho semelhante aos heterófilos (Tab. 1). O formato foi predominantemente esférico e raramente oval. O citoplasma foi abundante e preenchido com grânulos esféricos basofílicos de coloração roxa e tamanhos variados. O núcleo circular e excêntrico geralmente foi coberto pelos grânulos citoplasmáticos, dificultando a visualização.

OLIVEIRA-JÚNIOR *et al.* (2009) estudando o sangue de adultos de *Podocnemis expansa*, identificaram e caracterizaram sete tipos celulares: eritrócitos, trombócitos, linfócitos, heterófilos, eosinófilos, basófilos e azurófilos. OLIVEIRA *et al.* (2011), estudando os aspectos morfológicos e citoquímicos das células sanguíneas de recém-eclodidos de *P. expansa*, *P. unifilis* e *P. sextuberculata*, também encontraram os mesmos tipos celulares nas três espécies. As características morfológicas das células sanguíneas de *P. erythrocephala* foram semelhantes às descritas para as demais espécies de podocnemídeos.

Com exceção dos azurófilos, os demais tipos celulares também foram identificados em outras espécies de quelônios, tais como *Caretta caretta* (CASAL e OROS, 2007), *Mauremys caspica* e *M. rivulata* (METIN *et al.*, 2008) e *Ocadia sinensis* (CHUNG *et al.*, 2009). Segundo STACY *et al.* (2011), os azurófilos são variações dos monócitos, existindo apenas em répteis e

sendo frequentemente encontrados em squamatas e crocodilianos e, ocasionalmente, em quelônios.

Em relação aos leucócitos granulócitos, a presença de eosinófilos, heterófilos e basófilos foi relatada em várias espécies (CASAL e OROS, 2007; METIN *et al.*, 2008; CHUNG *et al.*, 2009; OLIVEIRA-JÚNIOR *et al.*, 2009 e OLIVEIRA *et al.*, 2011). Entretanto, WOOD e EBANKS (1984), CANNON (1992) e PISTOL *et al.* (2007) relataram a presença de eosinófilos, basófilos e neutrófilos no sangue de *Chelonia mydas*, *Lepidochelys kempi* e *Phrynosoma hilarii*, respectivamente. Segundo CANFIELD (1998), CLAVER e QUAGLIA (2009) e STACY *et al.* (2011), os répteis não possuem neutrófilos na corrente sanguínea, sendo os heterófilos funcionalmente análogos aos neutrófilos dos mamíferos. WORK *et al.* (1998) considera a presença dos neutrófilos nas extensões sanguíneas como artefato e suspeita que os neutrófilos descritos por WOOD e EBANKS (1984) sejam, na verdade, eosinófilos degranulados.

Tabela 1. Diâmetro maior, diâmetro menor e área (média \pm desvio padrão) das células sanguíneas de *Podocnemis erythrocephala* do médio Rio Negro, Amazonas. N = número total de células analisadas.

Células	N	Medições		
		Diâmetro maior (μm)	Diâmetro menor (μm)	Área (μm^2)
Eritrócitos	200	18,89 \pm 1,50	11,29 \pm 1,07	167,75 \pm 23,03
Trombócitos	150	15,14 \pm 2,47	6,69 \pm 0,83	72,11 \pm 14,30
Linfócitos	150	12,90 \pm 1,79	10,21 \pm 1,14	98,43 \pm 14,89
Heterófilos	150	15,76 \pm 1,68	14,31 \pm 1,44	171,54 \pm 30,85
Eosinófilos	100	14,84 \pm 2,03	12,30 \pm 2,02	139,07 \pm 36,37
Basófilos	80	12,62 \pm 1,86	11,89 \pm 1,86	113,14 \pm 33,06
Azurófilos	50	11,01 \pm 1,43	9,37 \pm 1,14	78,43 \pm 18,36

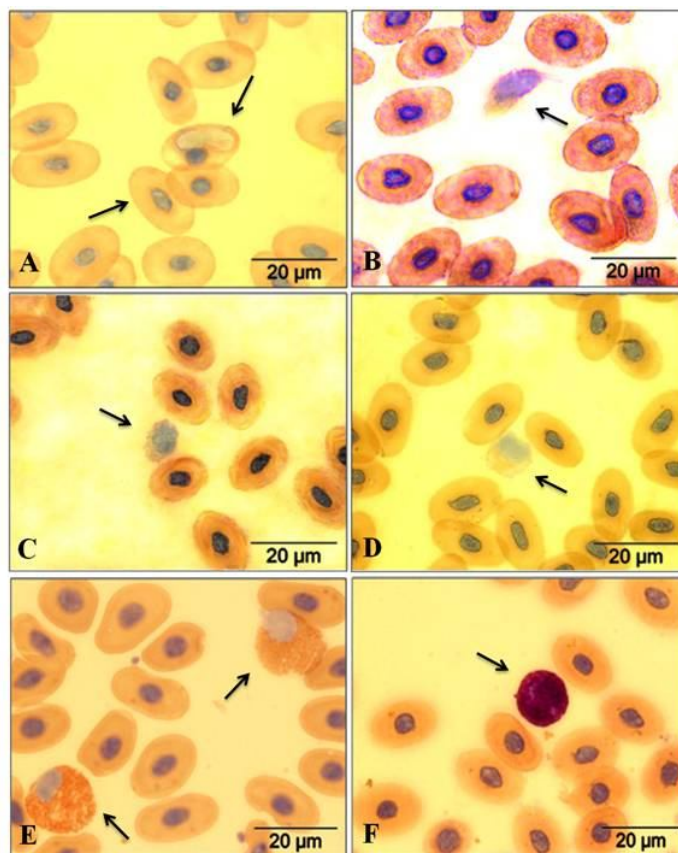


Figura 1. Fotomicrografias das células sanguíneas de *Podocnemis erythrocephala* coradas com MGGW. Eritrócito (A, seta inferior), eritrócito com núcleo deslocado pela presença de hemoparasita (A, seta superior), trombócito (B), linfócito (C), azurófilo (D), heterófilo (E, seta inferior), eosinófilo (E, seta superior) e basófilo (F).

CONCLUSÕES

O estudo das células sanguíneas de irapuca demonstrou que os podocnemídeos amazônicos apresentam um padrão conservativo quanto aos tipos celulares e às características morfológicas. Os resultados deste trabalho podem ser aplicados em vários estudos hematológicos com a espécie, norteando a identificação das células do sangue e possibilitando uma avaliação mais precisa do estado de saúde dos animais.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- CANFIELD, P.J. 1998. Comparative cell morphology in the peripheral blood film from exotic and native animals. **Australian Veterinary Journal**, 76: 793-800.
- CANNON, M.S. 1992. The morphology and cytochemistry of the blood leukocytes of Kemps Ridley Sea turtle (*Lepidochelys kempi*). **Canadian Journal of Zoology**, 70: 1336-1340.
- CASAL, A.B.; OROS, J. 2006. Morphologic and cytochemical characteristics of blood cells of juvenile loggerhead sea turtles (*Caretta caretta*). **Research in Veterinary Science**, 82:158-165.
- CHUNG, C.; CHENG, C.; CHIN, S.; LEE, A.; CHI, C. 2009. Morphologic and cytochemical characteristics of asian yellow pond turtle (*Ocadia sinensis*) blood cells and their hematologic and plasma biochemical reference values. **Journal of Zoo and Wildlife Medicine**, 40: 76–85.
- CLAVER, J.A.; QUAGLIA, A.I.E. 2009. Comparative morphology, development and function of blood cells in nonmammalian vertebrates. **Journal of Exotic Pet Medicine**, 18(2): 87-97.
- IUCN 2010. **IUCN Red List of Threatened Species**. Versão 2010.4. Disponível em: <http://www.iucnredlist.org>. Acessado em 14 de Novembro de 2010.
- METIN, K.; BASIMOGLU KOCA, Y.; KARGIN KIRAL, F.; KOCA, S. 2008. Blood cell morphology and plasma biochemistry of captive *Mauremys caspica* (Gmelin, 1774) and *Mauremys rivulata* (Valenciennes, 1833). **Acta Veterinaria Brno**, 77: 163-174.
- MITTERMEIER, R.A.; WILSON, R.A. 1974. Redescription of *Podocnemis erythrocephala* (Spix, 1824), an Amazonian Pelomedusid turtle. **Papéis Avulsos de Zoologia**: 28, 147-162.
- OLIVEIRA, A.T.; CRUZ, W.R.; LIMA, J.P.; ARAÚJO, S.B.; ARAÚJO, M.L.G.; MARCON, J.L.; TAVARES-DIAS, M.T. 2011. Morphological and cytochemical characterization of thrombocytes and leukocytes in hatchlings of three species of Amazonian freshwater turtles. **Veterinarski arhiv**, in press.
- OLIVEIRA-JUNIOR, A.A.; TAVARES-DIAS, M.; MARCON, J.L. 2009. Biochemical and hematological reference ranges for Amazon freshwater turtle, *Podocnemis expansa* (Reptilia: Pelomedusidae), with morphologic assessment of blood cells. **Research in Veterinary Science**, 86: 146-151.
- PISTOL, D.L.; ISSA, J.P.M.; CAETANO, F.H.; LUNARDI, L.O. 2007. Morphological characterization of the leukocytes in circulating blood of the turtle (*Phrynops hilarii*). **International Journal of Morphology**, 25: 677-682.
- STACY, N.I.; ALLEMAN, R.; SAYLER, K.A. 2011. Diagnostic hematology of reptiles. **Clinics in Laboratory Medicine**, 31(1): 87-108.
- TAVARES-DIAS, M.; MORAES, F.R. 2003. Características hematológicas da Tilapia rendalli Boulenger, 1896 (Osteichthyes: Cichlidae) capturada em "Pesque-Pague" de Franca, São Paulo, Brasil. **Bioscience Journal**, 19: 103-110.
- TAVARES-DIAS, M.; MORAES, F.R. 2007. Leukocyte and thrombocyte reference values for channel catfish (*Ictalurus punctatus*), with an assessment of morphologic, cytochemical, and ultrastructural features. **Veterinary Clinical Pathology**, 36, 49-54.
- VOGT, R.C. 2001. Turtles of the Rio Negro. In: Chao, N.L.P.; Prang, G.; Sonneschien, L.; Tlusty, M. (Eds.). **Conservation and Management of Ornamental Fish Resources of the Rio Negro Basin, Amazonia, Brazil - Projeto Piaba**. Editora da Universidade Federal do Amazonas: Manaus. p.245-264.
- WOOD, F.E.; EBANKS, G.K. 1984. Blood cytology and hematology of the green sea turtle, *Chelonia mydas*. **Herpetologica**, 40: 331-336.
- WORK, T.M.; RASKIN, R.E.; BALAZS, G.H.; WHITTAKER, S.D. 1998. Morphologic and cytochemical characteristics of blood cells from Hawaiian green turtles. **American Journal of Veterinary Research**, 59: 1252–1257.