

METACROMASIA PARA IDENTIFICAÇÃO DE BASÓFILOS SANGUÍNEOS EM SURUBIM HÍBRIDO: CONTRIBUIÇÃO METODOLÓGICA*

METACHROMASIA FOR BLOOD BASOPHILS IDENTIFICATION IN HYBRID SURUBIM CATFISH: METHODOLOGICAL CONTRIBUTION

Santiago Benites de Pádua¹ e Márcia Mayumi Ishikawa²

ABSTRACT. Pádua S.B. & Ishikawa M.M. [Metachromasia for blood basophils identification in hybrid surubim catfish: methodological contribution]. Metachromasia para identificação de basófilos sanguíneos em surubim híbrido: contribuição metodológica. *Revista Brasileira de Medicina Veterinária*, 33(3):147-150, 2011. Centro de Aquicultura da Unesp/Jaboticabal Rod. Paulo Donato Castellane, s/n Bairro Rural, Jaboticabal, 14884-900, SP. Brasil. E-mail: santiagopadua@live.com

Different protocols of fixation and hydrolysis of blood smears of hybrid surubim catfish for metachromasia to marking blood basophils were evaluated. For this reason, methanol, acid-alcohol and formalin vapor were tested as fixatives. For hydrolysis of blood smears, HCl, citric acid and 2-Mercaptoethanol + Urea + NaCl solutions was evaluated. After procedures, the blood smears was stained with toluidine blue (0.025%) diluted in McIlvaine buffer (pH 4). The different protocols for fixation and hydrolysis of blood smears for metachromasia influenced the quality of the reaction. Hydrolysis with 2-Mercaptoethanol + Urea + NaCl solutions provided negative results when using methanol and acid-alcohol as fixatives. The fixation with acid-alcohol associated with citric acid hydrolysis provides highest quality reason.

KEY WORDS. Basophils marking, toluidine blue, cytochemistry, fish hematology.

RESUMO. O presente estudo avaliou diferentes protocolos de fixação e hidrólise das extensões sanguíneas de surubim híbrido para reação de metacromasia e marcação de basófilos sanguíneos. Para isso, metanol, álcool-ácido e vapor de formol foram testados como fixadores. Para hidrólise das extensões sanguíneas foi avaliado HCl, ácido cítrico e soluções de 2-Mercaptoetanol + Uréia + NaCl. Após estes procedimentos, as extensões foram submetidas à coloração com azul de toluidina (0,025%) diluída em tampão de McIlvaine (pH 4). Diferentes protocolos para fixação e hidrólise das extensões sanguíneas destinadas à reação de metacromasia influenciam na qualidade da reação. A hidrólise com soluções de 2-Mercaptoetanol + Uréia + NaCl proporcionaram resultados negativos quando utilizado

metanol e álcool-ácido como fixadores. A fixação com álcool-ácido associada à hidrólise com ácido cítrico proporciona reações com melhor qualidade.

PALAVRAS-CHAVE. Marcação de basófilos, azul de toluidina, citoquímica, hematologia de peixes.

INTRODUÇÃO

A utilização do hemograma para o monitoramento das condições de higidez dos peixes em cultivo tem sido amplamente utilizada, visto que se trata de um exame laboratorial que pode ser realizado dentro de pouco tempo, requer poucos recursos e é de fácil execução (Ishikawa et al. 2010a). No entanto, as técnicas hematológicas aplicadas aos peixes possuem algumas peculiaridades metodológicas quando comparadas à hematologia clínica de mamíferos.

*Recebido em 18 de dezembro de 2010.

Aceito para publicação em 14 de maio de 2011.

¹ Médico-veterinário. Centro de Aquicultura da Unesp (CAUNESP), Rod. Paulo Donato Castellane, s/n Bairro Rural, Jaboticabal, SP 14884-900, Brasil. E-mail: santiagopadua@live.com

² Médica-veterinária, DSc. Embrapa Agropecuária Oeste, BR 163 km 253,6, Caixa Postal 661, Dourados, MS 79804-970, Brasil. E-mail: marcia@cpao.embrapa.br

Além disso, existe grande variação morfológica dos elementos figurados do sangue entre as diversas espécies de peixes cultivados, tornando inconsistente a identificação e nomenclatura adotada para as células sanguíneas de algumas espécies (Tavares-Dias & Moraes 2004).

Os basófilos são leucócitos de baixa frequência na circulação periférica, cuja função não está elucidada por completo em peixes (Tavares-Dias & Moraes 2004), no entanto, existem evidências que estas células possam atuar no processo de defesa orgânica, como na realização da fagocitose (Satake et al. 2009). Nos peixes, este leucócito exibe variação morfológica entre as diferentes espécies, bem como em uma mesma espécie devido à ocorrência de células em diferentes estágios de maturação (Satake et al. 2009, Tavares-Dias et al. 2009), o que dificulta sua identificação quando empregada coloração pancrômica, como a combinação dos corantes May Grünwald + Giemsa (Rosenfeld 1947), assim como May Grünwald + Giemsa + Wright (Tavares-Dias & Moraes 2003).

Por outro lado, a utilização de técnicas citoquímicas como marcadores para determinada variedade celular pode facilitar a identificação precisa dos leucócitos. A habilidade de metacromasia dos grânulos de basófilos e mastócitos, quando submetidos à coloração com azul de toluidina, azul de metileno e/ou tionina permite sua identificação devido à mudança de coloração destes para vermelho-púrpura. Assim, alguns estudos utilizam estes protocolos para marcação de basófilos em mamíferos (Ishizaka et al. 1972, Irani et al. 1998) e em peixes (Suzuki 1986, Tavares-Dias 2006). Tavares-Dias (2006) preconiza a fixação das extensões sanguíneas com subacetato de chumbo (1%) e posterior coloração com azul de toluidina ácida (pH 3,2) para obter a reação de metacromasia em peixes. No entanto, esta técnica não foi reproduzida com sucesso no Laboratório de Piscicultura da *Embrapa Agropecuária Oeste*. A obtenção do subacetato de chumbo na pureza adequada pode ser um dos fatores que limitam a técnica (Tavares-Dias, comunicação pessoal).

Dessa forma, o presente estudo avaliou diferentes protocolos para fixação e hidrólise das extensões sanguíneas de surubim híbrido (*Pseudoplatystoma reticulatum* ♀ x *P. corruscans* ♂) para reação de metacromasia e marcação de basófilos sanguíneos.

MATERIAL E MÉTODOS

Este estudo foi conduzido no Laboratório de Piscicultura da *Embrapa Agropecuária Oeste*, em

Dourados, Mato Grosso do Sul. Cinco peixes aparentemente hígidos e sem lesões superficiais com peso médio de 386,7±24,3g e comprimento total médio de 38,7±6,4cm foram mantidos em tanques circulares com capacidade de 1.000L, com fluxo contínuo de água proveniente de poço artesiano (10L min⁻¹). Os peixes foram alimentados com ração comercial para carnívoros (45% PB, 8-10mm), fornecida em duas parcelas ao dia. Semanalmente, foi realizada a limpeza do tanque de manutenção, por meio de sifonagem para a retirada de eventuais resíduos orgânicos (fezes e sobras de ração).

Os surubins híbridos foram capturados com auxílio de puçá, submetidos à anestesia com óleo de cravo (50mg L⁻¹) e realizada a colheita sanguínea por punção do vaso caudal, com auxílio de seringa estéril (3 mL) e agulha hipodérmica (25 x 7 mm), previamente banhadas com EDTA (3%) (Ishikawa et al. 2010a,b). Imediatamente após a venopunção foram confeccionadas 12 extensões sanguíneas de cada indivíduo para avaliação dos protocolos de metacromasia e outras duas para coloração pancrômica com a combinação de May Grünwald-Giemsa-Wright (Tavares-Dias & Moraes 2003).

Para fixação das extensões sanguíneas foram testados três protocolos, compreendidos por: fixação com metanol PA durante 10 min; fixação com álcool-ácido durante um minuto (álcool etílico comercial 96% e ácido acético PA na proporção de 3:1) com posterior lavagem no álcool 70% por 3 min; fixação no vapor de formol durante 10 minutos, utilizando cuba de vidro contendo algodão embebido em formalina 35%.

Após a fixação, as extensões sanguíneas oriundas de cada protocolo foram submetidas à hidrólise, compreendidas pelos seguintes tratamentos: Hidrólise 1: HCl 4N durante 5 min (Mello 1982, Naves et al. 2004); Hidrólise 2: Ácido Cítrico 0,67% durante 35 min e lavagem com água destilada (Roy et al. 1982); Hidrólise 3: solução de 2-Mercaptoetanol 0,2 mol/L, Uréia 4 mol/L e NaCl 0,8 mol/L por 20 min e lavagem com água destilada (Mello 1982); Hidrólise 4: ou solução de 2-Mercaptoetanol 0,2 mol/L, Uréia 0,2 mol/L e NaCl 0,8 mol/L por 10 min e lavagem com água destilada (Belleli & Mello 1996).

Após o procedimento de hidrólise, as extensões foram submetidas à coloração durante 5 min com azul de toluidina (0,025%) diluída em tampão de McIlvaine (pH 4) (Mello & Vidal 1980), como segue:

Azul de toluidina.....0,25g
 Ácido cítrico (0,1M).....21,01g
 Na₂HPO₄ (0,2M).....28,39
 Água destilada (q.s.p.)..... 1000 mL

Depois do procedimento de coloração, as lâminas foram lavadas rapidamente em água corrente, secas ao ar em temperatura ambiente e examinadas em fotomicroscópio óptico (Nikon®, E200, Japão) para confecção de fotomicrografias. Os resultados obtidos foram expressos em função da intensidade da reação citoquímica: -: reação negativa; +: reação fracamente positiva; ++: reação positiva; +++: fortemente positiva.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Diferentes protocolos para fixação e hidrólise das extensões sanguíneas destinadas à reação de metacromasia avaliados neste estudo influenciaram na qualidade da reação. Os resultados obtidos para esta análise citoquímica em surubim híbrido utilizando diferentes fixadores e agentes para hidrólise estão relacionados na Tabela 1. Pode-se verificar que as soluções de 2-Mercaptoetanol + Uréia + NaCl proporcionaram resultados negativos quando utilizados o metanol e álcool ácido como fixadores. Por outro lado, as reações com melhor qualidade foram obtidas quando empregado o ácido cítrico

como hidrolisante, especialmente quando a fixação foi realizada com álcool-ácido.

A propriedade de metacromasia dos grânulos de basófilos quando submetidos à coloração com azul de toluidina facilita sua identificação na extensão sanguínea, especialmente em peixes que apresentam poucos basófilos na circulação. Além disso, quando utilizado o metanol e álcool-ácido como fixadores, as únicas estruturas coradas foram os núcleos das células sanguíneas e os grânulos metacromáticos dos basófilos (Figura 1e-f). Por outro lado, na fixação com vapor de formol, mesmo após as hidrólises, é possível observar o citoplasma das células sanguíneas (Figura 1 b-d), o que pode dificultar a localização dos basófilos.

A marcação de basófilos sanguíneos em peixes teleósteos pela técnica de metacromasia foi descrita em *Cyprinus carpio* e *Takifugu vermicularis*

Tabela 1. Intensidade da reação de metacromasia em surubim híbrido (*Pseudoplatystoma reticulatum* ♀ x *P. corruscans* ♂) utilizando diferentes fixadores e agentes para hidrólise.

Fixador	Hidrólise			
	1	2	3	4
Metanol	+	++	-	-
Álcool-ácido	+	+++	-	-
Vapor de formol	++	++	+	+

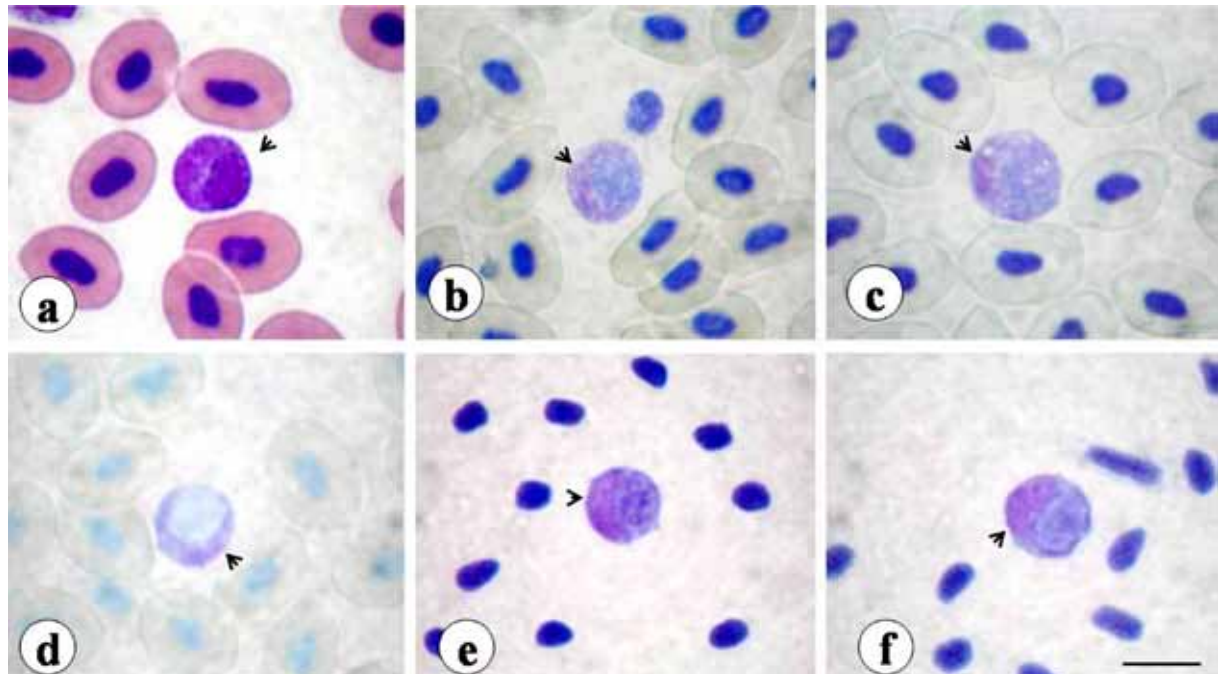


Figura 1. Metacromasia para identificação de basófilos sanguíneos em surubim híbrido (*Pseudoplatystoma reticulatum* ♀ x *P. corruscans* ♂). Coloração pancrômica com May Grünwald-Giemsa-Wright (a). Preparação fixada com vapor de formol + tratamento com HCl (4M) (b), fixada com vapor de formol + tratamento com ácido cítrico (c), fixada com vapor de formol + tratamento com 2-Mercaptoetanol 0,2 mol/L, Uréia 4 mol/L e NaCl 0,8 mol/L (d), fixada com álcool-ácido + tratamento com ácido cítrico (e), fixada com metanol + tratamento com ácido cítrico (f). Barra = 5 µm

(Suzuki 1986). No estudo de Tavares-Dias (2006) este leucócito foi observado em apenas quatro das quinze espécies estudadas, compreendidas por *Leporinus macrocephalus*, *Oreochromis niloticus*, híbrido *O. niloticus* x *O. aureus* e *Ictalurus punctatus*. Em adicional, basófilos foram marcados no híbrido *Pseudoplatystoma reticulatum* ♀ x *P. corruscans* ♂ deste estudo.

Diferentes protocolos têm sido empregados para reação de metacromasia em peixes. Suzuki (1986) descreveu resultados eficientes a partir da fixação das extensões sanguíneas com solução metanólica a 1% de azure A ou azul de toluidina e lavadas em solução de HCl. No entanto, este autor descreve que o pH da solução de HCl interfere da qualidade da reação, onde obtém-se reação positiva na faixa de 3,5 a 4,5 para *T. vermicularis* e 4,5 em *C. carpio*. Tavares-Dias (2006) ao avaliar o subacetato de chumbo (1%) e metanol como fixadores na reação de metacromasia, ácida e básica, para peixes concluiu que a fixação com o subacetato de chumbo (1%) e posterior coloração com azul de toluidina ácida (0,05 %) (pH 3,2) proporciona melhor preservação dos grânulos metacromáticos. No entanto, esta técnica não tem sido reproduzida com sucesso, dessa forma, metodologias adicionais como as que foram apresentadas neste estudo são de grande importância.

CONCLUSÃO

Neste trabalho concluiu-se que a fixação com álcool-ácido associada à hidrólise com ácido cítrico proporciona reações de metacromasia com melhor qualidade para identificação dos basófilos sanguíneos de surubim híbrido.

Agradecimentos. Os autores agradecem ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), ao Aquabrazil/Embrapa, ao Ministério da Pesca e Aquicultura e à Fundect (Processo n. 23/200.321/2008), pelo apoio financeiro

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Beletti M.E. & Mello M.L.S. Methodological variants contributing to detection of abnormal DNA: protein complexes in bull spermatozoa. *Braz. J. Genet.*, 19:97-103, 1996.
Irani A.-M.A., Huang C., Xia H.-Z., Kepley C., Nafie A., Fouda E.D., Craig S., Zweiman B. & Schwartz L.B. Im-

munohistochemical detection of human basophils in late-phase skin reactions. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 101:354-362 1998.

Ishikawa M.M., Pádua S.B., Satake F., Pietro P.S. & Hisano H. *Procedimentos básicos para colheita de sangue em peixes*. Circular Técnica, 17. Embrapa Agropecuária Oeste, Dourados, 2010a. 8 p.

Ishikawa M.M., Pádua S.B., Satake F., Hisano H., Jerônimo G.T. & Martins M.L. Heparina e Na₂EDTA como anticoagulantes para surubim híbrido (*Pseudoplatystoma reticulatum* x *P. corruscans*): eficácia e alterações hematológicas. *Ci. Rur.*, 40:1557-1561, 2010b.

Ishizaka T., Debernardo R., Tomioka H., Lichtenstein L.M. & Ishizaka K. Identification of basophil granulocytes as a site of allergic histamine release. *J. Immunol.*, 108:1000-1008, 1972.

Mello M.L.S. & Vidal B.C. Métodos, p.57-69. In: Mello M.L.S. & Vidal B.C. (Eds), *Práticas de biologia celular*. Edgard Blucher, São Paulo, 1980.

Mello M.L.S. Induced metachromasia in bull spermatozoa. *Histochemistry*, 74:387-392, 1982.

Naves C.S., Beletti M.E., Duarte M.B., Vieira R.C., Diniz E.G. & Jacomini J.O. Avaliação da cromatina espermática em eqüinos com Azul de Toluidina e "Acrinine Orange". *Biosci. J.*, 20:117-124, 2004.

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. *Mem. Inst. Butantan*, 20:329-334, 1947.

Roy J.K., Lakhotia S.C. & Mello M.L.S. Further observations on Hoeschst 33258 plus hypotonic treatment induced supercondensation of interphase heterochromatin in *Drosophila nasuta* cells. *Indian J. Exp. Biol.*, 20:791-796, 1982.

Satake F., Pádua S.B. & Ishikawa M.M. Distúrbios morfológicos em células sanguíneas de peixes em cultivo: uma ferramenta prognóstica, p.330-345. In: Tavares-Dias M. (Org.), *Manejo e sanidade de peixes em cultivo*. Embrapa Amapá, Macapá, 2009.

Suzuki Y. Cytochemistry of basophil granulocyte in carp and puffer. *Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish.*, 52:1895-1899, 1986.

Tavares-Dias M. Cytochemical method for staining fish basophils. *J. Fish Biol.*, 69:312-317, 2006.

Tavares-Dias M. & Moraes F.R. Características hematológicas de *Tilapia rendalli* Boulenger, 1896 (Osteichthyes: Cichlidae) capturada em "pesque-pague" no Município de Franca, São Paulo, Brasil. *Biosci. J.*, 19:107-114, 2003.

Tavares-Dias M. & Moraes F.R. *Hematologia de peixes teleosteos*. Villimpress, Ribeirão Preto, 2004. 144p.

Tavares-Dias M., Ishikawa M.M., Martins M.L., Satake F., Hisano H., Pádua S.B., Jerônimo G.T. & Sant'Ana A.R. Hematologia: ferramenta para o monitoramento do estado de saúde de peixes em cultivo, p.43-80. In: Saran-Neto A., Mariano W.S., Pozzobon-Soria S.F. (Org.). *Tópicos especiais em saúde e criação animal*. 1ª ed. São Carlos, Pedro & João Editores, 2009.