

METODOLOGIA DE COLETA DE SANGUE PERIFÉRICO EM ALEVINOS DE PEIXE-REI PARA CONFECÇÃO DE EXTENSÕES SANGUÍNEAS

ZAFALON-SILVA, Bruna¹; ZEBRAL, Yuri¹; ROBALDO, Ricardo¹

1. Departamento de Fisiologia e Farmacologia, Laboratório de Fisiologia aplicada a Aquicultura, Instituto de Biologia da Universidade Federal de Pelotas (UFPEL). brunazs@gmail.com

1 INTRODUÇÃO

O Peixe-rei *Odontesthes bonariensis* é uma espécie de Aterinídeo da América do Sul introduzida em vários países, inclusive no Japão, como um promissor candidato a aqüicultura continental. Durante o confinamento, as técnicas de manejo freqüentes na piscicultura tais como elevadas densidades de estocagem, limpeza dos tanques, transporte dos peixes e deterioração da qualidade da água, geralmente determinam uma resposta de estresse nos indivíduos confinados (BARCELLOS et al., 2006).

A condição de estresse induz ao distúrbio homeostásico, seguido de resposta compensatória fisiológica chamada de resposta integrada ao estresse, coordenada basicamente pela rota neuroendócrina do hipotálamo – hipófise - sistema nervoso simpático – células interrenais e células cromafins do rim cefálico produzindo respectivamente o cortisol e as catecolaminas. Assim, este tipo de distúrbio compensatório induz a uma gama de respostas que podem ser analisadas direta e indiretamente pelas variáveis hematológicas, mais precisamente pela série leucocitária (WEDEMEYER, 1996; BONGA, 1997).

Estas variáveis podem ser mensuradas via esfregaços sanguíneos, onde são analisadas as séries sanguíneas branca e vermelha (leucograma e hemograma), de maneira rápida, prática e com baixo custo (ISHIKAWA, 2010), fornecendo assim, subsídios para o auxílio diagnóstico e prognóstico de condições mórbidas em populações de peixes (MODRÁ, et al., 1998 apud TAVARES-DIAS, 2004).

No entanto, para o exame hematológico em pequenos peixes ou em alevinos, a coleta de sangue periférico, visando à obtenção de um volume relativamente apropriado para confecção de extensões sanguíneas, torna-se uma das principais problemáticas devido aos indivíduos serem relativamente pequenos para utilização de seringas hipodérmicas. Partindo deste contexto, tivemos como objetivo, neste

trabalho, descrever um método de coleta de sangue periférico em alevinos de peixe-rei para confecção de extensões sanguíneas.

2 METODOLOGIA

Para a determinação de um padrão de coleta de sangue periférico em alevinos, indivíduos da espécie *Odontesthes bonariensis* ($n=10$), com 10 dias após eclosão, foram aclimatados em aquário de 30L e mantidos sob condições controladas (temperatura - 20°C, oxigênio dissolvido - 6-8mg/L, pH 6-7, nitrogenados - <0,1 mg/L).

Para o ensaio de coleta, cada indivíduo foi submetido à captura e submerso em solução fisiológica resfriada por alguns segundos para crioanestesia. Após isto, estes foram submetidos a uma secagem com papel absorvente para retirada do excesso de soro fisiológico e muco presente na superfície do corpo.

Posteriormente, com o animal em decúbito lateral sobre uma lâmina de vidro, foi realizada uma incisão, com auxílio de um bisturi, transecionando o pedúnculo caudal com rompimento da veia e artéria caudal, ocorrendo assim, por diferença de pressão, o extravasamento do sangue para o meio.

Visando a obtenção de volume de sangue periférico suficiente para realização de uma extensão sanguínea foram utilizados 0,5 microlitros de plasma sobre o local da transecção. O plasma foi obtido através de centrifugação de sangue periférico extraído de outra espécie de peixe, o jundiá *Rhamdia quelen*. Para a coleta e extração do plasma destes peixes foi empregada a técnica de anestesia e coleta de sangue descrita por Thrall (2006).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados obtidos no uso da técnica mostraram-se positivos, sendo indicativo da viabilidade de coleta de sangue em alevinos, visando à obtenção de extensões sanguíneas (Fig. 1). Segundo Tavares-Dias (2004), também se recomenda como metodologia em espécimes de tamanho pequeno a punção intracardiaca com exposição do coração ou ainda decapitação do animal. Todavia, o volume de sangue obtido é variável e ainda os padrões celulares encontrados podem diferir quando coletados de tecidos mielóides e linfóides, podendo estes ser

acometidos via metodologia de decapitação, devido a proximidade anatômica ao rim cefálico.

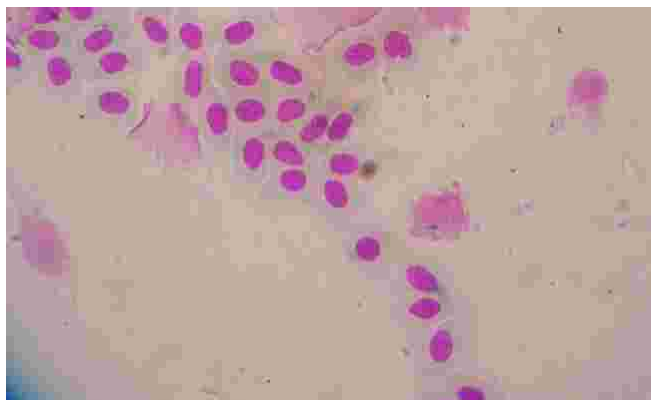


Figura 1. Esfregaço sanguíneo de alevino de Peixe-rei (*Odontesthes bonariensis*) corado com Giemsa 5%, observação em microscopia óptica aumento de 100X.

Com relação à metodologia descrita no presente trabalho, a utilização do plasma também se tornou relevante no processo de obtenção de um volume considerável para confecção da lâmina, pois além de aumentar o volume e fluidez ainda serviu como meio para o extravasamento do sangue. Contudo, a distribuição celular na lâmina torna-se mais heterogênea devido a hemodiluição.

Todavia, salientamos que a utilização de plasma de outras espécies na confecção das extensões sanguíneas pode ocasionar alterações nos padrões celulares e/ou de coloração, devido às concentrações plasmáticas interespecíficas diferirem (FREIRE et al., 2008). Corroboramos que seja mais indicado o uso de plasma ou soro de mesma espécie.

Ainda com relação a alterações de coloração, no que tange a obtenção do plasma, o uso de anticoagulantes para esse fim, o uso de EDTA e de heparina também podem causar alterações nos padrões de normalidade da morfologia celular e coloração, influenciando assim a contagem diferencial de leucócitos. Dentre as desvantagens do uso da heparina estão a tendência a agregação de leucócitos e trombócitos. Já o uso de EDTA possui como desvantagem a possível ocorrência de hemólise como descrito para algumas espécies de água-doce. (NOGA, EJ., 1996 apud THRALL, 2006).

Segundo Ishikawa (2010), o sangue de peixes também pode ser coletado utilizando-se capilares para microhematócrito, entretanto, esta técnica para os juvenis de peixe-rei não se mostrou eficiente, devido ao fato que os capilares

requerem um volume de sangue maior do que o volume total disponível no corpo dos alevinos o que leva ao não preenchimento do capilar, logo dificultando a extensão do material na lâmina.

4 CONCLUSÃO

Concluimos que técnica de coleta de sangue periférico de alevinos de *Odontesthes bonariensis* através da secção dos grandes vasos no pedúnculo caudal quando imerso em plasma de peixe é viável para a confecção de extensões sanguíneas e posterior estudos hematológicos.

5 REFERÊNCIAS

BARCELLOS, L.J.G.; KREUTZ, L.C.; QUEVEDO, R.M. Previous chronic stress does not alter the cortisol response to an additional acute stressor in jundia (*Rhamdia quelen*, Quoy and Gaimard) fingerlings. **Aquaculture**. 253(1-4): 317-321. 2006.

BONGA, S.E.W. The estresse response in fish, **Physiol**. 77 : 591–625. 1997.

FREIRE, C.A.; AMADO, E.M.; SOUZA, L.R.; VEIGA, M.P.T.; VITULE, J.R.S.; SOUZA, M.M.; PRODOCIMO, V. Muscle water control in crustaceans and fishes as a function of habitat, osmoregulatory capacity, and degree of euryhalinity. **Comparative Biochemistry and Physiology A-molecular & Integrative Physiology** 149(4): 435-446. 2008.

ISHIKAWA, N.M.; et.al. **Procedimentos Básicos para Colheita de Sangue em Peixes**; Manual Embrapa, 2010.

MODRÁ, H.; SVOBODAVÁ, Z. & KOLÁROVÁ, J; Comparison of differential leukocyte counts in fish of economic and indicator importance. **Acta vet. Brno**, 67:215-226, 1998.

NOGA, E.J. **Fish disease, diafnosis and treatment**. St Louis: Mosby, 1996.

TAVARES-DIAS, M.; MORAES, F.R. **Hematologia de peixes teleósteos**. Ribeirão Preto: M. Tavares-Dias, 2004. 144p.

THRALL, M.; et.al. **Hematologia e bioquímica veterinária**, São Paulo: Roca, 2006.

WEDEMEYER, G.A. Physiology of fish in intensive culture systems. **Chapman & Hall**, New York, 232p. 1996.