

Células sangüíneas, eletrólitos séricos, relação hepato e esplenossomática de carpa-comum, *Cyprinus carpio* (Cyprinidae) na primeira maturação gonadal

Marcos Tavares-Dias^{1*}, Fabiana Rizzi Bozzo², Elziane Ferreira Silva Sandrin³, Eugênio de Campos-Filho⁴ e Flávio Ruas de Moraes^{1,2}

¹Centro de Aquicultura da Unesp (Caunesp). Via Prof. Paulo Donato Castellane, 14884-900, Jaboticabal, São Paulo, Brasil.

²Departamento de Patologia Animal da FCAV-Unesp, Via Prof. Paulo Donato Castellane, 14884-900, Jaboticabal, São Paulo, Brasil. ³Piscicultura São Geraldo, Rodovia Armando Salles Oliveira, Km 342, Caixa Postal 518, Sertãozinho, São Paulo, Brasil..

⁴Laboratório de Análises Clínicas do Hospital Veterinário, FCAV-Unesp, Via Prof. Paulo Donato Castellane, 14884-900, Jaboticabal, São Paulo, Brasil. *Autor para correspondência. e-mail: tavares-dias@bol.com.br

RESUMO. Foram estudados em ambos os sexos de *Cyprinus carpio* o fator relativo de condição (Kn), a relação hepato (RHS) e esplenossomática (RES), o eritrograma, trombograma, leucograma, a localização de glicogênio pelo método de PAS em trombócitos e leucócitos e os níveis séricos de proteína total e de eletrólitos. O Kn nas fêmeas foi maior que nos machos. Os valores médios da RES nas fêmeas foram inferiores aos dos machos, enquanto que o número de leucócitos, linfócitos e neutrófilos foram superiores; porém os níveis séricos de magnésio e de cloreto nos machos foram maiores quando comparados aos das fêmeas. Os valores médios da RHS, hematócrito, concentração de hemoglobina, volume corpuscular médio (VCM), concentração da hemoglobina corpuscular média (CHCM), número de eritrócitos, trombócitos, monócitos, eosinófilos e leucócitos granular PAS-positivos (LG-PAS), níveis séricos de proteína total, sódio, potássio e cálcio não evidenciaram diferença estatisticamente significativa ($P > 0,05$), entre machos e fêmeas. O método de PAS mostra grânulos de glicogênio no citoplasma de trombócitos, eosinófilos e neutrófilos. Entretanto, no citoplasma dos LG-PAS foram detectados grânulos de glicoproteínas neutras. Monócitos, linfócitos foram PAS negativos. Nos teleósteos o amadurecimento das gônadas apresenta forte relação com o fator de condição. Na fase de reprodução nem sempre é possível detectar os efeitos do sexo isoladamente no hemograma, pois muitas vezes esse pode não ser o único fator ocasionando dimorfismo.

Palavras-chave: peixe de água doce, PAS, *Cyprinus carpio*, leucócitos, trombócitos, eritrócitos.

ABSTRACT. Blood cells, seric electrolyte and *Cyprinus carpio* (Cyprinidae) common carp hepatosomatic and splenosomatic relation in the first gonadal maturation. This research studied the condition (Kn) relative factor, the hepatosomatic (HSR), the splenosomatic (SSR) relation, the erythrocytes, thrombocytes and leukocytes number, the glycogen locality by PAS method in thrombocytes and leukocytes and the total protein and electrolytes serices levels in both *Cyprinus carpio* L. sex. The female Kn showed higher value than the males. The female HSR average values were lower than the ones observed in males, while the leukocytes, lymphocytes and neutrophils percentage number were the highest. However, the males magnesium and choride serices levels were higher than the females. The HRS average values, hematocrit, haemoglobin concentration, average corpuscular volume (ACV), average corpuscular haemoglobin concentration (ACHC), erythrocytes number, thrombocytes, monocytes, oesinophils, positive PAS leukocyte granular (PAS-LG), and total protein, sodium, potassium and calcium serices levels did not show significant statistics difference ($p > 0.05$) between males and females. The PAS method showed glycogen granules into the thronbocytes, eosinophils and neutrophils cytoplasm. Nevertheless, in the PAS-LG cytoplasm, neutral glicoprotein granules were also observed. Monocytes and lynfocytes showed negative reaction to PAS. In the teleosts, the gonodas matureness presents higher relation with the factor of condition. During the reproduction

period it is unlikely to find the sexual effects isolated in the hemogram, because most of the time that is not the only factor to cause dimorphism.

Key words: freshwater fish, PAS, *Cyprinus carpio*, leukocytes, thrombocytes, erythrocytes.

Introdução

Nos peixes o desenvolvimento das gônadas mostra estreita relação com o aumento do fator de condição (Zanuy e Carrilo, 1985). A relação hepatossomática em fêmeas de *Repromucenns beniteguri* apresentam valores superiores aos dos machos, mas no período de reprodução ocorre decréscimo nesse índice em ambos os sexos (Zhu *et al.*, 1989), ocasionado pelo processo reprodutivo e pela vitelogênese (Agostinho *et al.*, 1990). Em *Mugil platanus* a RES não é influenciada pelo sexo (Ranzani-Paiva e Tavares-Dias, 2002). A literatura não faz, todavia, referências a outros estudos sobre a influência do sexo na RES de peixes dulciaquícolas ou marinhos.

A composição sangüínea nos peixes teleósteos pode estar sujeita a fatores como o sexo e o estágio de desenvolvimento gonadal. Isto está demonstrado em relação ao eritrograma em *Cyprinus carpio* (Sopinska, 1983) e em *Acanthopagrus latus* (Al-Hassan *et al.*, 1993) e o leucograma em *Coregonus macrophthalmus* (Cavicchioli e Zavarini, 1977), em *C. carpio* (Sopinska, 1983), em *Salmo salar* (Pickering, 1986), em *Salmo trutta* (Pickering e Pottinger, 1987) e em *Pimephales promelas* (Thomas *et al.*, 1999). Estudos referentes ao trombograma, no entanto, são escassos.

Em teleósteos, os níveis de eletrólitos podem variar com a espécie e o ambiente. Assim, em peixes de clima temperado, os valores basais esperados para os níveis plasmáticos de sódio são de aproximadamente 150,0mmol/L, cloreto 130,0 Meq/L, potássio 3,2mmol/L e cálcio 5,0mg/dL (Stoskopf, 1993). Para peixes cultivados em clima tropical, os níveis séricos de proteína total variam de 2,3 a 8,2g/dL, sódio de 127,0 a 190,0mmol/L, potássio de 0,8 a 8,5mmol/L, cálcio de 1,4 a 5,5mmol/L, magnésio de 0,5 a 2,8mmol/L e cloreto de 58,0 a 193,0mmol/L (Tavares-Dias e Moraes, 2003).

Os níveis plasmáticos de eletrólitos podem estar correlacionados com os hormônios sexuais (esteróides e gonadotropinas), uma vez que o cálcio está relacionado com a vitelogênese e com os níveis de estrógenos. Além disso, outros eventos endocrinológicos podem também influenciar esse íon (Zuim *et al.*, 1988). Assim, o presente ensaio teve como objetivo descrever o eritrograma, trombograma, leucograma,

localização de glicogênio pelo método de PAS em trombócitos e leucócitos, níveis séricos de proteína total e eletrólitos, relação hepato e esplenossomática em machos e fêmeas de *Cyprinus carpio* Linnaeus, 1758, na primeira maturação gonadal.

Material e métodos

Peixes e características de criação

Alevinos de *Cyprinus carpio* foram alimentados com ração comercial contendo os seguintes níveis de proteína bruta: inicialmente, a farelada com 42%, a extrusada (2 mm de espessura) com 35% e depois, passaram a receber ração extrusada (4mm de espessura) com 28% de proteína, em viveiro da Piscicultura São Geraldo (Sertãozinho, São Paulo, Brasil). Ao fim desse período quando os peixes contavam com aproximadamente 6 meses de idade (com 174 dias), 40 espécimes saudáveis (16 machos e 24 fêmeas) foram coletados e transportados para o Laboratório de Patologia de Organismos Aquáticos do Centro de Sanidade Animal da FCAV-Unesp (CPPAR) e aclimatados, sendo então submetidos aos exames hematológico, bioquímico, citológico e biométrico.

Exame hematológico

Por punção do vaso caudal, foram colhidas duas alíquota de 0,5mL de sangue, sendo uma com auxílio de seringas contendo EDTA (10%) e outra contendo EDTA fluoretado e, uma terceira alíquota de 2mL sem anticoagulante. Nestas amostras de sangue com EDTA, foram determinadas a contagem de eritrócitos, leucócitos e trombócitos totais, o hematócrito, a hemoglobina, o volume corpuscular médio (VCM) e a concentração da hemoglobina corpuscular média (CHCM) de acordo com metodologia usual previamente descrita (Tavares-Dias *et al.*, 2000 a,b). Para a contagem diferencial, contagem de leucócitos e de trombócitos totais, extensões sangüíneas foram confeccionadas e coradas pancromicamente com May-Grünwald-Giemsa-Wright (para detalhes veja Tavares-Dias e Moraes, 2003). Em 10 campos homogêneos, de cada extensão sangüínea, foram quantificados o número de eritrócitos, anotando-se o número de leucócitos e de trombócitos e de posse desses resultados e da contagem de eritrócitos (μ L de sangue) em hemocítmetro, de cada peixe, foi

realizado o seguinte cálculo (Tavares-Dias e Moraes, 2003):

$$1. \text{Leucócitos } (\mu\text{L}) = \frac{\text{número de leucócitos} \times \text{contagem de eritrócitos}/\mu\text{L}}{\text{número eritrócitos na extensão sangüínea}}$$

$$2. \text{Trombócitos } (\mu\text{L}) = \frac{\text{número trombócitos} \times \text{contagem de eritrócitos}/\mu\text{L}}{\text{número eritrócitos na extensão sangüínea}}$$

Exame bioquímico

Amostras sangüíneas foram colhidas com seringas contendo $\pm 0,1\text{mL}$ de EDTA fluoretado, destinadas à determinação da glicose plasmática. Porém, tal quantidade de anticoagulante causou grande hemólise em todas as amostras sangüíneas, impossibilitando essa determinação. Somente, posteriormente chegou-se a uma metodologia mais adequada para obtenção de sangue destinado a determinação da glicemia, nessa espécie.

A terceira alíquota de sangue sem anticoagulante foi deixada em repouso, na temperatura ambiente, durante 45 minutos e depois centrifugada por 10 minutos a 750G, para dosagem sérica de proteína total e de eletrólitos. A determinação da proteína total foi realizada pelo método do Biureto, a concentração de sódio (Na^+) e potássio (K^+) em espectrofotômetro de chama e do cálcio (Ca^{++}), magnésio (Mg^{++}) e cloreto (Cl^-) pelo método colorimétrico.

Exame citoquímico de trombócitos e leucócitos

Confeccionaram-se também extensões sangüíneas que foram fixadas com Gendre gelado para demonstração de glicogênio pelo método do ácido periódico de Schiff (PAS), seguindo as recomendações de McManus (1946) e tratamento com amilase salivar como controle da especificidade (Lison, 1960).

Exame biométrico e identificação do sexo

De cada peixe foram medidos o comprimento e o peso total. Em seguida, os peixes foram sacrificados por comoção cerebral para retirada e pesagem do baço e fígado e identificação do sexo. De posse desses dados determinou-se o fator relativo de condição (Kn), a relação hepatossomática (RHS) e esplenossomática (RES), seguindo metodologia previamente descrita (Tavares-Dias *et al.*, 2000c).

Durante a identificação do sexo, as observações macroscópicas das gônadas mostraram que os todos peixes estavam sexualmente maduros. As fêmeas estavam com ovócitos e os machos espermiando, com leve pressão no abdome.

Análise estatística

Utilizou-se o delineamento inteiramente casualizado com 2 tratamentos. Os valores médios foram comparados por teste de Tukey a 5% de probabilidade; para isto empregou-se o programa *Statistical Analysis System/SAS*.

Resultados

Os valores médios do eritrograma não evidenciaram diferença estatisticamente significativa ($P > 0,05$), entre machos e fêmeas de *C. carpio*. Já o peso corporal e o Kn das fêmeas foram maiores que nos machos, enquanto seus valores médios da RES são menores (Tabela 1).

Os níveis séricos de magnésio e cloreto dos machos de *C. carpio* foram superiores aos das fêmeas. Porém os níveis séricos de proteína total, sódio, potássio e cálcio não evidenciaram diferença estatisticamente significativa ($P > 0,05$) (Tabela 2).

O número de trombócitos, monócitos, eosinófilos e células granulocíticas especiais não foi influenciado pelo sexo, em *C. carpio*. Entretanto o número de leucócitos totais, linfócitos e neutrófilos das fêmeas foi maior quando comparado aos machos (Tabela 3).

Tabela 1. Valores médios $\pm$ desvio padrão do fator relativo de condição (Kn), dados biométricos e eritrograma em *Cyprinus carpio*. A amplitude de variação é mostrada entre parênteses. Os valores médios seguidos da mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey ($P > 0,05$).

Parâmetros	Machos	Fêmeas
Peso corporal (g)	327,1 $\pm$ 46,2 ^b (264,5–431,5)	368,3 $\pm$ 61,9 ^a (258,5–509,0)
Comprimento (cm)	26,1 $\pm$ 1,1 ^a (24,5–29,0)	26,9 $\pm$ 1,7 ^a (25,0–31,0)
Kn	0,99 $\pm$ 0,02 ^b (0,97–1,02)	1,00 $\pm$ 0,02 ^a (0,98–1,05)
RHS (%)	1,72 $\pm$ 0,29 ^a (1,20–2,30)	1,85 $\pm$ 0,22 ^a (1,35–2,28)
RES (%)	0,178 $\pm$ 0,074 ^a (0,114–0,409)	0,132 $\pm$ 0,022 ^b (0,091–0,166)
Eritrócitos ($\times 10^6/\mu\text{L}$)	3,852 $\pm$ 0,61 ^a (2,700–5,130)	3,580 $\pm$ 0,62 ^a (2,510–5,360)
Hemoglobina (g/dL)	11,0 $\pm$ 3,2 ^a (7,7–16,6)	10,1 $\pm$ 3,4 ^a (6,8–20,2)
Hematócrito (%)	35,0 $\pm$ 4,8 ^a (30,0–42,0)	33,7 $\pm$ 3,8 ^a (22,0–38,0)
VCM (fL)	91,9 $\pm$ 12,2 ^a (62,7–117,3)	96,9 $\pm$ 21,0 ^a (56,0–139,4)
CHCM (g/dL)	31,6 $\pm$ 9,1 ^a (20,5–48,4)	30,3 $\pm$ 9,9 ^a (20,6–55,5)

Tabela 2. Valores médios $\pm$ desvio padrão das variáveis bioquímicas no soro de *Cyprinus carpio*. A amplitude de variação é mostrada entre parênteses. Os valores médios seguidos da mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey ($P>0,05$).

Parâmetros	Machos	Fêmeas
Proteína total (g/dL)	2,7 $\pm$ 0,2 ^A (2,4–3,0)	2,7 $\pm$ 0,2 ^A (2,4–3,0)
Sódio (mmol/L)	136,3 $\pm$ 4,2 ^A (130,0–145,0)	135,3 $\pm$ 4,3 ^A (127,0–142,0)
Potássio (mmol/L)	1,1 $\pm$ 0,5 ^A (0,6–2,3)	1,2 $\pm$ 0,7 ^A (0,6–2,9)
Cálcio (mmol/L)	2,3 $\pm$ 0,1 ^A (2,0–2,5)	2,2 $\pm$ 0,1 ^A (2,1–2,5)
Magnésio (mmol/L)	1,4 $\pm$ 0,2 ^A (1,2–1,9)	1,3 $\pm$ 0,3 ^B (0,9–1,7)
Cloreto (mmol/L)	106,8 $\pm$ 8,4 ^A (99,0–130,0)	103,1 $\pm$ 4,9 ^B (95,0–113,0)

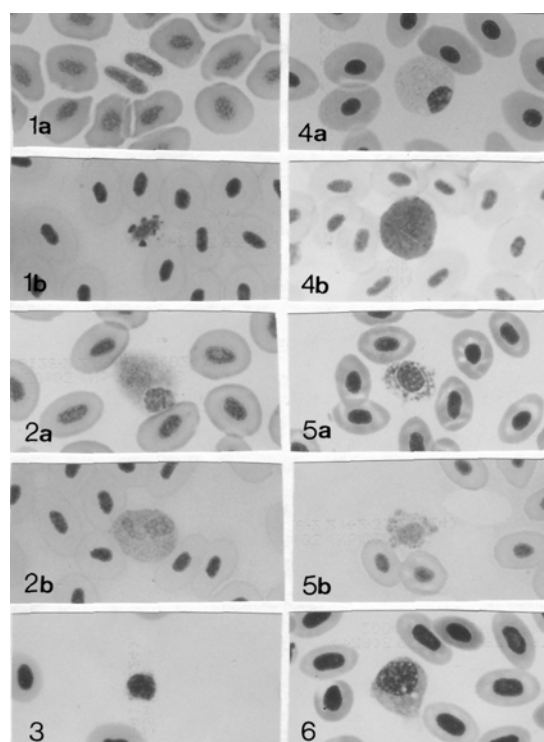
Tabela 3. Valores médios $\pm$ desvio padrão do trombograma e leucograma em *Cyprinus carpio*. A amplitude de variação é mostrada entre parênteses. LG-PAS= leucócito granular PAS positivo. Os valores médios seguidos da mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey ($P>0,05$).

Parâmetros	Machos	Fêmeas
Trombócitos (μ L)	25492,1 $\pm$ 19981,0 ^A (1764,7–82782,7)	30940,0 $\pm$ 28461,3 ^A (1259,8–110594,1)
Leucócitos (μ L)	26500,0 $\pm$ 18334,6 ^B (8823,5–77350,1)	51794,1 $\pm$ 43704,1 ^A (10083,6–218913,3)
Linfócitos (μ L)	18873,5 $\pm$ 16977,9 ^B (6000,0–73482,6)	39878,1 $\pm$ 37314,5 ^A (7461,8–188265,4)
Neutrófilos (μ L)	5652,4 $\pm$ 3576,3 ^B (2320,5–14636,0)	9765,7 $\pm$ 7131,0 ^A (2218,4–30647,9)
Monócitos (μ L)	502,7 $\pm$ 454,6 ^A (0,0–1608,6)	456,0 $\pm$ 735,3 ^A (0,0–3289,4)
LG-PAS (μ L)	1435,3 $\pm$ 1246,5 ^A (0,0–3217,2)	1540,3 $\pm$ 1731,5 ^A (0,0–6437,9)
Eosinófilos (μ L)	36,2 $\pm$ 107,1 ^A (0,0–402,1)	191,3 $\pm$ 368,2 ^A (0,0–1430,7)

As principais características morfológicas observadas em trombócitos e leucócitos em *C. carpio*, após coloração com May-Grünwald-Giemsa-Wright e aplicação do método de PAS com controle de especificidade pela amilase salivar, estão descritas na Tabela 4 e Figuras 1-6. Nos trombócitos, elípticos ou arredondados, a concentração dos grânulos de glicogênio é variável, sendo que estes se localizam principalmente na periferia da célula, seguindo o contorno ou concentram-se nos pólos da célula (Figura 1b). Os grânulos de glicogênio dos neutrófilos são finos e distribuem-se homogeneamente por todo o citoplasma (Figura 2b). Nos LG-PAS os grânulos formam uma massa uniforme e intensamente corada pelo PAS, mesmo após digestão com amilase salivar, sugerindo a presença de glicoproteínas neutras ligadas a um componente protéico (Figura 4b). Os grânulos de glicogênio dos eosinófilos são maiores que dos neutrófilos e distribuem-se pelo citoplasma (Figura 5b). Monócitos e linfócitos mostraram reação negativa ao PAS.

Tabela 4. Principais características morfológicas e citoquímicas dos trombócitos e leucócitos de *C. carpio*. LG-PAS= leucócito granular PAS positivo; – =Reação negativa; += Reação fraca; ++= Reação positiva; +++= Reação intensa.

Células	Coloração com May-Grünwald-Giemsa-Wright (MGGW)	PAS
Trombócitos	Formato fusiforme, ocasionalmente arredondado, de citoplasma hialino sem granulações e núcleo fusiforme.	++
Linfócitos	Formato arredondado, tamanho variado e citoplasma basofílico. O núcleo é arredondado, sendo elevada a sua relação com o citoplasma.	—
Neutrófilos	Formato arredondado, de citoplasma com granulação fina e neutrofilica. O núcleo em forma de bastonete e ocasionalmente segmentado.	++
Monócitos	Formato arredondado e citoplasma basofílico. O núcleo é geralmente excêntrico e ocasionalmente pode ser chanfrado.	—
Eosinófilos	Formato arredondado, citoplasma com grânulos eosinofílicos. O núcleo é geralmente excêntrico.	++
LG-PAS	Formato arredondado, o citoplasma não se cora com corantes do tipo ácido ou básico e o núcleo é pequeno e geralmente excêntrico.	+++



Figuras 1-6. Células sanguíneas de *C. carpio*. Trombócitos corados com MGGW (1a) e PAS (1b). Neutrófilos corados com MGGW (2a) e PAS (2b). Linfócito corado com MGGW (3). LG-PAS corados com MGGW (4a) e PAS (4b). Eosinófilos corados com MGGW (5a) e PAS (5b). Monócito corado com MGGW (6). Aumento: 1050x.

Discussão

Fator relativo de condição, relação hepato (RHS) e esplenosomática (RES)

O peso corporal e o Kn das fêmeas de *C. carpio* foram maiores que nos machos e, nas observações

macroscópicas das gônadas, as fêmeas estavam com ovócitos. Assim, o peso dos ovários das fêmeas pode ter aumentado seu peso corporal, ocasionando o aumento observado no seu fator de condição, semelhante ao que ocorre em *Repromucenns beniteguri* (Zhu *et al.*, 1989). Em *Dicentrarchus labrax*, o desenvolvimento gonadal está estreitamente relacionado com o aumento do fator de condição, sendo que, inicialmente, ocorre elevação deste índice quando o peixe estoca reserva para posterior crescimento gonadal, mas, quando ocorre a desova, esse diminui progressivamente (Zanuy e Carrilo, 1985). Por outro lado, em *Rhinelepis aspera*, também oriundos de ambiente lótico, o peso das gônadas não influenciou o fator de condição (Agostinho *et al.*, 1990).

Em *C. carpio*, dessas observações, a RHS não foi influenciada pelo sexo durante o período de reprodução, mas os valores médios da RES dos machos foram superiores aos das fêmeas. Ranzani-Paiva e Tavares-Dias (2002) descreveram que em *Mugil platanus*, a RHS e a RES não apresentaram dimorfismo sexual. Porém estudo sazonal mostra que em fêmeas de *Repromucenns beniteguri* os valores de RHS foram superiores aos dos machos, mas, no período de reprodução, ocorre decréscimo nesse índice em ambos os sexos (Zhu *et al.*, 1989). Essa redução nos valores de RHS está relacionada ao processo reprodutivo e à vitelogênese (Agostinho *et al.*, 1990). A escassez de estudos sobre os efeitos do sexo na RES em peixes dulciaquícolas, todavia, impossibilitou maiores discussões dos dados aqui obtidos.

Glicemia, proteína total e eletrólitos

O uso de aproximadamente 0,1mL de EDTA fluoretado, nas seringas, momentos antes da obtenção de 0,5mL de sangue, ocasionou alto grau de hemólise em *C. carpio*. Porém resultados deste laboratório demonstram que isso não ocorre com outras espécies dulciaquícolas como *Piaractus mesopotamicus*, *Oreochromis niloticus*, *Colossoma macropomum*, *Brycon cephalus*, híbrido tambacu, *Leporinus macrocephalus*, híbrido de tilápia vermelha e *Prochilodus lineatus*. Assim, para amostragem de pequena quantidade de sangue para dosagem da glicemia, nessa espécie de carpa, a melhor maneira de obter plasma não-hemolisado é umedecer as seringas com o EDTA fluoretado no mínimo com 16 horas de antecedência da colheita sanguínea. Possivelmente, tais resultados estejam relacionados à diferença interespecífica na fragilidade dos eritrócitos quando em presença da substância anticoagulante. Field *et al.* (1943), relatam que o

sangue de *Salvelinus fontinalis*, quando colhido com oxalato de sódio, é mais resistente à hemólise que o de *C. carpio*. Similarmente, estudos sugerem que o anticoagulante EDTA causa mais hemólise nas amostras sanguíneas de *C. carpio* que em *Oreochromis mossambicus* (Smit e Hattingh, 1980).

Nessas observações, os níveis séricos de proteína total, sódio, potássio e cálcio em machos e fêmeas de *C. carpio* foram similares mas as concentrações de magnésio e de cloreto nos machos foram superiores. Diferenças fisiológicas entre sexos em indivíduos de uma mesma espécie estão geralmente relacionadas às características sexuais primárias e secundárias ou as adaptações resultantes das diferentes estratégias empregadas para a reprodução (McCormick e Naiman, 1985; Zuim *et al.*, 1988). Assim estudos sazonais em *Esox lucius* relatam baixos níveis de proteína sérica em machos e fêmeas, no período de desova (Lenhardt, 1992) e em *Dicentrarchus labrax* aumento transitório de proteína plasmática na pré-desova, seguido de declínio na desova (Ozretic *et al.*, 2001). Isso sugere possivelmente uma redistribuição das proteínas essenciais necessárias à formação dos gametas no período que antecede a reprodução. Zuim *et al.* (1988) estudando sazonalmente os níveis plasmáticos de eletrólitos, em *P. mesopotamicus*, observaram que durante a maturação avançada ocorre aumento de sódio, cálcio, potássio e magnésio em machos e fêmeas, sendo os níveis de potássio mais elevados nos machos e os de cálcio, nas fêmeas.

Eritrograma, trombograma e leucograma

Em teleósteos, o dimorfismo sexual que ocorre em relação às características hematológicas pode estar associado à presença de andrógenos (Slicher, 1961) e a espermição nos machos (McCormick e Naiman, 1985). Durante o período de desova em *C. carpio* de cativeiro, do presente trabalho, não houve, contudo, influência do sexo na contagem de eritrócitos, hematócrito, hemoglobina, VCM e CHCM à semelhança do que ocorre em *Oreochromis niloticus* oriundos também de cultivo (Tavares-Dias e Faustino, 1998). Porém, em *M. platanus* de estuarino somente o hematócrito dos machos é maior que das fêmeas (Ranzani-Paiva e Tavares-Dias, 2002). Em *Schizodon borelli* e *P. lineatus* de ambiente natural, também ocorre dimorfismo sexual no eritrograma, sendo que em *S. borelli* o hematócrito e o VCM sofrem influência do estágio de desenvolvimento gonadal (Ranzani-Paiva *et al.*, 2000). Sopinska (1983) relatou que em machos de *C. carpio* cultivados, durante todos os estágios gonadais o número de eritrócitos, de concentração de hemoglobina e de hematócrito foram superior ao das fêmeas mas os

valores de VCM e CHCM destas foram maiores que nos machos.

Embora a desova seja um processo fisiológico natural ela impõe aos peixes forte estresse, podendo levá-los à morte. Neste período, as características sangüíneas são afetadas mas podem responder com algum atraso, pois o efeito da desova é usualmente mascarado por outros fatores, tais como a sazonalidade e a dinâmica da hematopoiese. Assim, esse processo natural não pode ser inequivocadamente tomado como via de regra (Lusková, 1998). Portanto, quando se avalia o quadro hematológico de peixes adultos, nem sempre é possível determinar a influência desse ou daquele fator isoladamente (Tavares-Dias e Moraes, 2004).

Em *C. carpio* deste ensaio, o número de trombócitos não mostrou diferença entre os sexos, mas houve aumento no número de leucócitos totais nas fêmeas causado pelo aumento do número de linfócitos e de neutrófilos. Similarmente, estudos com essa mesma carpa demonstrou aumento de leucócitos em fêmeas quando comparadas aos machos, sendo que esses últimos apresentaram os maiores percentuais de neutrófilos. Já o percentual de linfócitos em ambos os sexos dependeu do estágio de maturação das gônadas (Sopinska, 1983). Há, contudo, diferença entre machos e fêmeas de tilápias *Sarotherodon melanotheron*, *O. mossambicus* x *O. macrochir* (Lea Master et al., 1990) e *O. niloticus* (Tavares-Dias e Faustino, 1998) quando se compara o percentual de leucócitos. Na avaliação do leucograma durante a reprodução, nem sempre é possível observar o efeito do sexo isoladamente, pois este por si só pode não ser o responsável por alterações quantitativas dos leucócitos (Tavares-Dias e Moraes, 2004).

Aspectos citoquímico de trombócitos e leucócitos

Em machos e fêmeas de *C. carpio*, os trombócitos neutrófilos e eosinófilos apresentaram reação positiva ao método de PAS para identificação de glicogênio no citoplasma, enquanto monócitos e linfócitos foram negativos à semelhança do que ocorreu em *Salminus maxillosus* (Veiga et al., 2000) e em *Piaractus mesopotamicus* (Tavares-Dias, 2003). Nos trombócitos elípticos ou arredondados, deste trabalho, a concentração dos grânulos de glicogênio é variável, sendo que eles se localizam principalmente na periferia da célula, seguindo o contorno ou concentrando-se nos pólos da célula. Todas estas características foram descritas em trombócitos de *Pseudoplatystoma fasciatum* (Carvalho et al., 2000), *Hoplias malabaricus*, *Aristichthys nobilis* e

Astronotus ocellatus (Tavares-Dias e Moraes, 2004) quando submetidos ao método de PAS. Porém reação PAS negativa está relatada em trombócitos de *Oncorhynchus mykiss*, *O. kisutch* e *Morone saxatilis* e reação fracamente positiva em trombócitos de *Ictalurus punctatus* (Zinkil et al., 1991; Tavares-Dias, 2003), *Carassius auratus* (Zinkil et al., 1991) e *Leporinus macrocephalus* (Tavares-Dias e Moraes, 2003).

Os trombócitos de peixes, são geralmente elípticos, eventualmente as formas arredondados também ocorrem. Assim, durante a contagem diferencial de leucócitos, alguns pesquisadores (Cavicchioli e Zavarini, 1977; Thomas et al., 1999) relatam dificuldades na distinção morfológica entre linfócitos e trombócitos redondos. Neste caso, o método de PAS pode ser importante na diferenciação entre essas duas populações celulares, uma vez que trombócitos são PAS positivos e os linfócitos, negativos, como mostram os resultados em *C. carpio* deste ensaio.

A identificação de glicogênio nas células sangüíneas é relevante e tem valor diagnóstico, uma vez que em certas alterações patológicas as células modificadas, quando submetidas ao método de PAS, diferem das células normais (Dacie e Lewis, 1991). Além disso, a presença de glicogênio está intimamente associada ao fornecimento de energia para a realização da fagocitose (Veiga et al., 2000; Ueda et al., 2001). No presente estudo, eosinófilos e neutrófilos apresentaram grânulos de glicogênio no citoplasma assim como está descrito em *Acipenser transmontanus* (Zinkl et al., 1991) e em *Astronotus ocellatus* (Tavares-Dias e Moraes, 2004).

Neutrófilos de *O. mykiss* fagocitam *Vibrium anguillarum* e mostram forte reação positiva ao PAS (Lamas et al., 1994). Similarmente, trombócitos de *C. carpio* fagocitam partículas de carbono (Imagawa et al., 1989) e fragmentos de células, células inteiras e bactérias em *O. mykiss* (Hill e Rowley, 1996). Estes resultados da literatura e a grande quantidade de glicogênio em trombócitos de *C. carpio* sugerem a participação dos trombócitos na fagocitose. Assim, a função dos trombócitos como células sangüíneas de defesa orgânica como vem sendo proposto (Tavares-Dias et al., 2000a,b; Tavares-Dias, 2002; Tavares-Dias e Moraes, 2004), particularmente quando a abordagem enfoca o ponto de vista da patologia está certamente justificado.

Em *Colossoma macropomum* (Tavares-Dias et al., 1999; Tavares-Dias, 2003), *Piaractus mesopotamicus* (Tavares-Dias et al., 2000b), híbrido tambacu (Tavares-Dias et al., 2000c; Tavares-Dias, 2003), *Rhamdia quelen* (Tavares-Dias et al., 2000d) e

Aristichthys nobilis (Tavares-Dias e Moraes, 2004) está descrito um granulócito cujos grânulos não se coram com corantes do tipo ácido ou básico. No presente ensaio, com *C. carpio*, os grânulos citoplasmáticos dessa célula não se coram com tais corantes. Porém estes grânulos são fortemente PAS positivos, mesmo após digestão com amilase salivar, sugerindo a presença de glicoproteínas neutras à semelhança do que ocorre em *Aristichthys nobilis* (Tavares-Dias e Moraes, 2004). Célula, com tais características citoquímicas, também foi inicialmente descritas em *Catostomus commersoni* e, por isso, chamada de leucócito granular PAS-positivo (GL-PAS) (Barber e Westerman, 1975), assim foi a terminologia aqui adotada. Estudos citoquímicos em *P. maculatus* demonstraram que tal célula difere morfológica e citoquimicamente dos demais granulócitos conhecidos nos peixes (neutrófilo, eosinófilo e basófilo), então considerou-se um quarto granulócito, o qual foi denominado célula granulocítica especial (Ribeiro, 1991). Esse granulócito, todavia, pode ser encontrado na literatura com outras denominações (Tavares-Dias e Moraes, 2004).

Enfim, a metodologia de colheita sanguínea adequada é de extrema importância na determinação da composição sanguínea em peixes. O amadurecimento das gônadas possui forte relação com o fator de condição. Na fase de reprodução nem sempre é possível detectar os efeitos do sexo isoladamente no hemograma dos peixes, pois muitas vezes este pode não ser o único fator ocasionando dimorfismo. O método de PAS, empregado na localização de carboidratos, pode ser usado rotineiramente para corar os grânulos de LG-PAS diferenciando tal granulócito dos demais e além disso, auxiliar na diferenciação de trombócitos redondos e linfócitos.

Referências

- AGOSTINHO, A.A. *et al.* Variação do fator de condição e do índice hepatossomático e seus relações com o ciclo reprodutivo em *Rhinelepis aspera* (Agassiz, 1829) (Osteichthyes, Loricariidae) no rio Paranapanema, Porecatu, Pr. Cienc. Cult., Rio Janeiro, v. 42, p. 711-714, 1990.
- AL-HASSAM, L.A.J. *et al.* Some haematological parameters in relation to the biology of the fish *Acanthopagrus latus*. *J. Environ. Sci. Health (A): Environ. Sci. Eng.*, Moticello, v. 28, p. 1599-1611, 1993.
- BARBER, D.L.; WESTERMANN, J.E.M. Morphological and histochemical studies on a PAS-positive granular leukocyte in blood and connective tissue of *Catostomus commersonnii* Lacépède (Teleostei: Pisces). *Am. J. Anat.*, Antwerpen, 142:205-220, 1975.
- CARVALHO, V.A.L. *et al.* Observações morfológicas, citoquímicas e ultra-estruturais de trombócitos do surubim cachara, *Pseudoplatystoma fasciatum* (Linnaeus, 1766) (Osteichthyes, Siluriformes) Braz. J. Morphol. Sci., Campinas, v. 17, p.130, 2000.
- CAVICCHIOLLI, G.; ZAVARINI, A. Observations on the morphology and seasonal variations of blood cells in the whitefish bondella, *Coregonus macrophthlamus* Nussl. of lake Maggiore (North Italy). *Monitore Zool. Ital.*, Roma, v. 11, p.173-182, 1977.
- DACIE, J.V.; LEWIS, S.M. *Practical haematology*. London: Churchill Livingstone, 1991.
- FIELD, J.B. *et al.* A study of the blood constituents of carp and trout. *J. Biol. Chem.*, Ney York, v. 148, p. 261-269, 1943.
- HILL, D.J.; ROWLEY, A.F. The thromboxane mimetic, U-46619, induces the aggregation of fish thrombocytes. *Brit. J. Haematol.*, London, v. 92, p.200-211, 1996.
- IMAGAWA, T. *et al.* Morphology of blood cells in carp (*Cyprinus carpio*). *Jpn. J. Vet. Sci.*, Tokyo, v. 51, p. 1163-1172, 1989.
- LAMAS, J. *et al.* Non-specific cellular responses of rainbow trout to *Vibrio anguillarum* and its extracellular products (ECPs). *J. Fish Biol.*, London, v.45, p. 839-854, 1994.
- LEA MASTER, B.R. *et al.* Hematologic and blood chemistry values for *Sarotherodon melanotheron* and a red hybrid tilapia in freshwater and seawater. *Comp. Biochem. Physiol.*, Oxford, v. 97A, p. 525-529, 1990.
- LENHARDT, M. Seasonal changes in some blood chemistry parameters and in relative liver and gonadal weights of pike (*Esox lucius* L.) from the River Danube. *J. Fish Biol.*, London, v.40, p.709-718, 1992.
- LISON, L. Lipides et lipoproteines. In: LISON, L. *Histochemie et cytochimie animales. Principes et méthodes*. Paris: GauthierVillars, 1960, p. 449-530.
- LUSKOVÁ, V. Factors affecting haematological indices in free-living fish populations. *Acta Vet.*, Brno, v. 67, p.249-255, 1998.
- MCCORMICK, S.D.; NAIMAN, R.J. Hypoosmoregulation in an anadromus teleost: influence of sex and maturation. *J. Exp. Zool.*, London, v.234, p.193-198, 1985.
- McMANUS, J.F.A. Histological demonstration of mucin after periodic acid. *Nature*, London., v. 158, p.202, 1946.
- OZRETIC, M.K. *et al.* Seasonal variations of some blood parameters in farmed sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *Periodicum Biol.*, Kraków, v.103, p. 67-75, 2001.
- PICKERING, A.D. Changes in blood cell composition of the brown trout, *Salmo trutta* L., during the spawning season. *J. Fish Biol.*, London, v. 29, p. 335-347, 1986.
- PICKERING, A.D.; POTTINGER, T.G. Lymphocytopenia and interrenal activity during sexual maturation in the brown trout, *Salmo trutta* L. *J. Fish Biol.*, London, v. 30, p.41-50, 1987.
- RANZANI-PAIVA, M.J. Células do sangue periférico e contagem diferencial de leucócitos de tainha *Mugil*

- platanus* Günther, 1880 (Osteichthyes, Mugilidae) da região estuarino-lagunar de Cananóia-SP. (Lat. 25°00' S - Long. 47°55'W). *Boletim do Instituto de Pesca*, São Paulo, v. 22, p. 23-40, 1995.
- RANZANI-PAIVA, M.J.T. et al. Hematological evaluation in commercial fish species from the floodplain of the upper Paraná River, Brazil. *Acta Scientiarum*, Maringá, v.22, p.507-513, 2000.
- RANZANI-PAIVA, M. J. T.; TAVARES-DIAS, M. Eritograma, relação viscero-somática, hepatossomática e esplenossomática em tainhas *Mugil platanus* Günther, 1880 (Osteichthyes: Mugilidae) parasitadas. *Rev. Bras. Zool.*, Rio Janeiro, v. 19, p. 807-818, 2002.
- RIBEIRO, W.R. Leucócitos de peixes teleósteos, In: SANTOS, H.S.L. (Ed.). *Histologia de peixes*. Jaboticabal: FCAV-UNESP, 1991, p. 61-64.
- SLICHER, A.M. Endocrinological studies in *Fundulus heteroclitus* (Linn.). *Bull. Bingham Oceanog. Coll.*, New York, v.17, p.3-54, 1961.
- SMIT, G.L.; HATTINGH, J. Haematological assessment of generally used freshwater fish blood anticoagulants. *J. Fish. Biol.*, London. v.17, 337-341, 1980.
- SOPINSKA, A. Effects physiological factors, stress, and disease on hematological parameters of carp, with a particular reference to the leukocyte patterns. I. Variability of hematological indices of carp in relation to age and gonad maturity stage. *Acta Ichthyol. Piscat.*, Milano, v.13, p.59-81, 1983.
- STOSKOPF, M. K. *Fish medicine*. W.B Philadelphia: Saunders Company, 1993.
- TAVARES-DIAS, M.; FAUSTINO, C.D.. Parâmetros hematológicos da tilápia-do-Nilo *Oreochromis niloticus* (Cichlidae) em cultivo extensivo. *Ars Veterinaria*, Jaboticabal, v. 14, p. 254-63, 1998.
- TAVARES-DIAS, M.; MORAES, F.R. Características hematológicas da *Tilapia rendalli* Boulenger, 1896 (Osteichthyes: Cichlidae) capturada em "Pesque-Pague" de Franca, São Paulo, Brasil. *Bioscience J.*, Uberlândia, v. 19, p. 103-110, 2003.
- TAVARES-DIAS, M.; MORAES, F.R. *Hematologia de peixes teleósteos*. Ribeirão Preto: M. Tavares-Dias, 2004.
- TAVARES-DIAS, M. et al. Características hematológicas do tambaqui *Colossoma macropomum* Cuvier (Osteichthyes: Characidae) em sistema de monocultivo intensivo. II. Leucócitos. *Revta Bras. Zool.*, Curitiba, v. 16, p. 175-84, 1999.
- TAVARES-DIAS, M. et al. Hematological characteristics of hybrid Florida red tilapia, *Oreochromis urolepis hornorun* x *O. mossambicus* under intensive rearing. In. PROCEEDINGS FROM THE FIFTH INTERNATIONAL SIMPOSIUM ON TILAPIA AQUACULTURE, 5, 2000, Rio de Janeiro. *Anais...* Rio de Janeiro, 2000a. p. 533-541.
- TAVARES-DIAS, M. et al. Haematological characteristics of Brazilian teleosts. III. Parameters of the hybrid tambacu (*Piaractus mesopotamicus* Holmberg, 1887 x *Colossoma macropomum* Cuvier, 1818) (Osteichthyes: Characidae). *Rev. Bras. Zool.*, Curitiba, v.17, p. 899-926, 2000b.
- TAVARES-DIAS, M. et al. Relação hepatossomática e esplenossomática em peixes teleósteos de cultivo intensivo. *Rev. Bras. Zool.*, Curitiba, v.17, p. 273-281, 2000c.
- TAVARES-DIAS, M. et al. Características hematológicas de teleósteos brasileiros. IV. Variáveis do jundiá *Rhamdia quelen* (Pimelodidae). *Ciência Rural*, Santa Maria, v. 32, p.693-698, 2002d.
- THOMAS, M. B. et al. Seasonal leukocyte and erythrocyte counts in fathead minnows. *J. Fish Biol.*, London, v. 54, p. 1116-1118, 1999.
- UEDA, I. K. et al. Cytochemical aspects of the peripheral blood cells of *Oreochromis (Tilapia) niloticus* (Linnaeus, 1758) Cichlidae, Teleostei) – Part II. *Braz. J. Vet. Anim. Sci.*, São Paulo, v.38, p.273-277, 2001.
- VEIGA, M. L. et al. Aspectos morfológicos y citoquímicos de las células sanguíneas de *Salminus maxillosus* Valenciennes, 1840 (Characiformes, Characidae). *Rev. Chil. Anat.*, Temuco, v.18, p. 245-250, 2000.
- ZANUY, S.; CARRILLO, M. Annual cycles of growth, feeding rate, gross conversion efficiency and hematocrit levels of sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.) adapted to two different osmotic media. *Aquaculture*, Amsterdam, v.44, p.11-25, 1985.
- ZHU, Y. et al. Annual reproductive rhythm of the tobinumeri-dragonet *Repromucenns beniteguri* (Callionymidae) in Lake Hamana. *Nippon Suisan Gakkaishi*, Tokyo, v.55, p. 591-599, 1989.
- ZINKL, J.G. et al. Morphology and cytochemistry of leucocytes and thrombocytes of six species of fish. *Comp. Haematol. Internat.*, London, v. 1, p. 187-195, 1991.
- ZUIM, S.M.F. et al. Sex and sexual cycle influences on metabolic parameters in pacu *Piaractus mesopotamicus* (Holmberg, 1887). *Bull. Can. Aquacult. Assoc. Proc.*, Vancouver, v. 88, p.49-51, 1988.

Received on October 10, 2003.

Accepted on February 26, 2004.