

**Estudos sobre os elementos figurados do sangue
do crustaceo *Uca pugnax* (Smith) var.
brasiliensis Oliveira
(Decapoda: Ocypodidae)**

por

Lejeune P. H. de Oliveira e Cicero A. Moreira

(Com 1 estampa)

Estudamos os elementos morfológicos do sangue ou hemolinfa de *Uca pugnax* variedade *brasiliensis* (10) em parte por não existir na bibliografia dos globulos sanguineos dos crustaceos referencia a sangue no genero *Uca* e em parte por termos á mão abundante material. Tomamos como base para este trabalho os estudos já feitos sobre sangue de outros crustaceos, seguindo preferivelmente os indicados nas referencias bibliograficas.

COLHEITA DO SANGUE E MÉTODOS DE ESTUDO

Uma das maneiras mais simples de se obter pequenas quantidades de sangue de um carangueijo consiste no córte de um ou mais articulos de uma de suas patas, onde vem a brotar uma grande gota de sangue. Depois disto resta-nos apenas, para observarmos os seus elementos morfológicos, fazer um exame microscopico entre lamina e laminula, e tambem em gota pendente. Este método tão rudimentar oferece varias vantagens, mas em compensação tropeça com sérios embaraços. Por exemplo, quando nos achamos em presença de um protozoario ou de qualquer outra forma viva, sentimos grande duvida sobre sua proveniencia, pois eles poderiam ter vindo tanto do proprio sangue, quanto serem procedentes do material que recobre o crustaceo formando um inducto esverdeado. Além destes defeitos, esta tecnica tem o inconveniente de atingir outros tecidos, de cujas malhas recolhe uma série de células, acarretando elementos inteiramente estranhos para o sangue em exame. Tambem possui a desvantagem de

* Recebido para publicação a 7 de Março de 1940 e dado á publicidade em Agosto de 1940.

lesar o animal pelo corte vasto em suas patas e exgota-lo com a subsequente hemorragia.

Para impedir a reunião de outras células ao sangue, usou-se em larga escala a amputação de antenas, um processo ótimo indicado atualmente para varios camarões, lagostas e outros macrura, mas infelizmente impraticavel nos nossos carangueijos que possuem estes apêndices muito curtos.

Com a mesma finalidade de evitar elementos extranhos ao sangue do crustaceo, Hardy puncionava, na lagosta, diretamente o seio pericardico, por meio de uma pipeta capilar.

Observamos que podemos penetrar com a pipeta capilar, de vidro nas patas, através da membrana articular e recolhermos diretamente o sangue de dentro do articulo, em numerosos decapodos brachiura, como a *Uca pugnax* (Smith, 1870), var. *brasiliensis* Oliveira, 1939; *Panopeus herbsti* Milne Edwards, 1834; *Ucides cordatus* (Linnaeus, 1767); *Cardisoma guanhumi* (Latreille, 1825) e outros. Assim para a pinça de *Uca pugnax* var. *brasiliensis*, penetrariamos na cavidade quelipodo carpal, seguindo uma direção obliqua com a pipeta, passariamos entre os feixes dos musculos levantadores e abaixadores do datilo sem os lesar, e apanhariamos o sangue dentro do dedo imovel, sem contaminação por outras células nem por material externo. Com poucas tentativas feitas aprende-se a achar esta direção obliqua aonde a pipeta capilar não encontra resistencia alguma ao descer. Limpa-se bem com um algodão humedecido em alcool a membrana articular, e enfia-se a pipeta; quando ela chega ao local conveniente o sangue sóbe espontaneamente por capilaridade, claro, transparente, tornando-se, pelo contacto com o ar, ligeiramente azulado. Em seguida gelatinisa-se pouco tempo depois, sem formação de sôro e sem retração de coagulo e passados vinte minutos entra na segunda fase de coagulação, com formação de sôro. Não é recomendavel aspirar a pipeta, o que forçosamente trará fragmentos de tecidos musculares, cuticulares e outras tantas células extranhas se a pipeta se achar em má posição. Na pinça maior ou em qualquer outro articulo do crustaceo podemos chegar a retirar mesmo dois ou mais centimetros cubicos de sangue por aspiração com uma seringa, mas em geral o animal morre logo após tal sangria ou abandona a pinça autotilizando-a antes de chegarmos mesmo a um centimetro cubico.

Usando a pipeta capilar e recolhendo o sangue do modo descrito, atribuímos haver: facilidade e rapidez de manipulação; ausencia de contaminação com elementos extranhos, provenientes de outros tecidos ou do exterior; minimo de mutilação e consequente economia de material.

Outro processo que também usamos com bom resultado foi o de Knover (6), modificado pelo professor Dr. Paulo Sawaya(11): consiste em se trabalhar com uma pipeta tendo uma parte globosa onde o aquecimento da mão e o posterior esfriamento pelo ambiente faz a pipeta se encher e se esvasiar. Aqui no Rio de Janeiro em dias frios este processo dá ótimos resultados, mas no verão ele se torna muito moroso.

É conveniente notar que os glóbulos do sangue de *Uca pugnax* riedade *brasiliensis* como o de numerosos invertebrados são de constituição muito instável. Assim logo que saem dos vasos eles se deformam e muitas vezes quando colocados entre lamina e laminula, as células se lisam, restando ao examinarmos o material apenas massas de protoplasma provenientes da sua destruição. Sendo objeto primordial de um estudo perfeito a preservação da forma natural, a fixação deve ser imediata e feita a humido, usando nós de preferencia o sublimado alcoolico de Schaudinn. Não podemos obter esfregaços como os de sangue humano com *Uca pugnax brasiliensis*, em primeiro lugar pela grande viscosidade de seu plasma impossibilitar a distensão do sangue e em segundo lugar por apresentar num grande volume de plasma pequena quantidade de elementos figurados.

Entre os fixadores empregados pelos autores que têm trabalhado neste assunto destaca-se o acido osmico. Varios autores proscvem sem explicação do motivo por que assim procedem, o alcool metilico, os fixadores a base de acido picrico e o formol. Este ultimo tem sido usado sobre a forma de vapores, em larga escala, assim como o iodo. Para nosso material os fixadores que deram os melhores resultados foram feitos usando o sublimado corrosivo, o sublimado acetico a 5% e o sublimado alcoolico de Schaudinn. Os fixadores á base de alcool só foram empregados para o estudo da influencia dos azues basicos sobre o citoplasma: verificação de varias granulações cromatofilas.

As principais colorações empregadas por nós foram: a hematoxilina ferrica de Heidenhein, segundo a tecnica indicada para protozoarios; o Giemsa, aplicado aos frotis humidos, segundo a tecnica recomendada por M. Langeron (12); frotis feito a sêco, tendo como fixador alcool metilico, e coloridos pelo Giemsa, para observar as granulações cromatofilas. Usamos também como fez Tait e Gunn (7) com os glóbulos do sangue do camarão europeu *Astacus fluviatilis* (Fabricius), um exame pelo iodo. Empregamos para isso solução de lugol usual em bacteriologia. Esse exame complementar pode ser feito de acordo com a seguinte tecnica: Coloca-se uma gôta de sangue sobre a lamina, mistura-se com uma de lugol, recobre-se com laminula; ou então coloca-se o lugol na margem da laminula, com uma pipeta, e deixa-se que penetre pouco a pouco por difusão.

ELEMENTOS MORFOLOGICOS DO SANGUE DE *UCA PUGNAX* VAR. *BRA-SILIENSIS*

Quando se examina entre lamina e laminula uma gota de sangue (ou hemolinfa tirado da pinça maior de *Uca pugnax brasiliensis* verifica-se em primeiro lugar dois tipos diferentes de células: 1.º) Umas células grandes, medindo em média 10 micra de diametro, muito brilhantes, de grande refringencia, de côr amarelada, de contornos muito definidos, com varios grãos enormes de cerca de 2 micra cada um. Estes são os *histiocitos granulares*. 2.º) Outras células claras — os *tigmocitos* — palidas, que quasi não aparecem devido á sua pouca refringencia. Logo que uns dois ou tres minutos se passaram observamos que os tigmocitos se apresentam de dois modos: Com o tempo uns vão ficando com aspecto estrelado, apresentando vacuolos em seu interior e possuem umas granulações finissimas como uma poeira brilhante muito leve; outros não se alteram tanto; parece-nos que se esvaziam pela transparencia que vai tomando o protoplasma, e possuem ao redor de si o ectoplasma com contorno semelhante a um anel. Estes dois tipos de células constituem os principais elementos morfologicos encontrados no sangue de *Uca pugnax brasiliensis*, em estado normal: *Tigmocitos* e *Histiocitos granulares*.

TIGMOCITOS (de *Uca pugnax brasiliensis*)

(Figs. 4, 5, 6, 7, 10)

Os tigmocitos de *Uca pugnax brasiliensis* correspondem aproximadamente, em sangue de outros crustaceos, aos seguintes elementos: —

- «Globules sanguins» de Bruntz, 1906.
- «Hyaline thygmocits» e
- «Thygmocits» de Tait & Gunn, 1918.
- «Fine granular elements» de Hertzmann.
- «Explosive body» de Tait & Gunn, 1918.
- «Explosive corpuscle» (?) de Hardy, 1892.

Estes elementos logo que são removidos do corpo do crustaceo se apresentam como células de 8 a 13 micra de diametro, em média, menores que os histiocitos granulares. São células claras, ovoides ou arredondadas e não possuem os contornos muito nitidos. O tigmocito vae deixando aparecer um ou mais vacuolos, seu contorno vae se tornando pouco a pouco estrelado, são muito caracteristicos por isto.

A aparencia estrelada com que fica o tigmocito de *Uca pugnax brasiliensis* com 11 ou mais prolongamentos finos irradiando de seu corpo já aparece em tres ou quatro minutos depois que o sangue saiu do corpo do crustaceo.

Outros tigmocitos ficam com a forma esferica (fig. 6), mas quasi sempre apresentam no ectoplasma um pequenino começo de emissão de prolongamentos, havendo formas intermediarias entre o esferico e a forma estrelada.

Estes tigmocitos quando ficam com a forma esferica, são elementos muito

particulares do sangue de *Uca pugnax brasiliensis*. Medem em média 6 a 7 micra de diametro. O interior de seu protoplasma é claro e possui menos granulações que quando toma a forma estrelada. O que mais o caracteriza é a forma em anel circular, delgado e muito brilhante com que fica o ectoplasma. Neste anel se encontram pontuações de maior refringencia que mais o realçam, e donde ás vezes parte um pequeno começo de emissão de prolongamentos.

Os elementos mais jovens (figs. 8 e 9) são em pequeno numero, são de pequeno talhe (4 a 5 micra), de citoplasma mais denso, finissimamente granuloso, nucleo de 2,5 a 3 micra.

Quando os tigmocitos são coloridos pelo método de Romanowski, Giemsa, May-Grünwald e outras variantes, apresentam o protoplasma palido, hialino, vacuolar, tornando muito fracamente as substancias corantes. O nucleo é ovoide, geralmente central, ás vezes periferico, com membrana nuclear delgada e bem visivel. Poucas massas de cromatina aderem á membrana nuclear. Dentro do nucleo a cromatina se dispõe irregularmente. Os tigmocitos apresentam-se em tamanhos diferentes: os que se encontram em maior numero têm 10 a 12 micra de tamanho e possuem nucleo de 4 micra. Os de tamanho menor, mais abundantes na corrente sanguinea, medem 5 a 8 micra; os menores de 5 micra são muito raramente encontrados. Muito pouco numerosos são os de mais de 12 micra; destes os que vão até 15 micra possuem o protoplasma muitissimo palido.

A hematoxilina ferrica de Heidenhein evidencia mais o nucleo, que aparece como no Giemsa. Não possuem granulações evidenciaveis pelos métodos de Romanowski. Apresentam, depois de fixados pelo sublimado alcool, mesmo sem coloração, algumas granulações pardas, que somente poucas células possuem.

Coloridos pelo lugol não apresentam particularidades.

HISTIOCITOS GRANULARES (do sangue de *Uca pugnax brasiliensis*)

(Figs. 1, 2 e 3)

Outras células descritas em sangue de outros crustaceos que são aproximadamente correspondentes aos histiocitos granulares de *Uca pugnax brasiliensis*:

- « Globules sanguins » de Bruntz, 1905.
- « Granular cells » de Lowitt.
- « Coarsely granular cells » de Hertzmann, 1873.
- « Amebocits » (?) de Tait & Gunn, 1918.
- « Amibocytes » (?) de Cuenot, 1895.

O exame a fresco mostra: no sangue de *Uca pugnax brasiliensis* os histiocitos granulares são as maiores células encontradas e constituem 60% do total dos elementos figurados. Medem em média desde 9 até 12 micra de diametro. São células de contorno ovoide ou esferico apresentando na massa central do endoplasma numerosos grãos em média com 1 a 2 micra cada um. Os grãos extraordinariamente grandes medem 3 a 4 micra, geralmente são ovoides, ou de contorno poligonal, mas sempre com as quinas arredondadas. Em cada célula ha aproximadamente desde 20 até uns 60 grãos.

A camada de protoplasma que envolve os grãos é imperceptível em alguns locais e excedente em outros. Os grãos de *Uca pugnax brasiliensis* medem em média 1 micra, sendo de tamanho mais ou menos uniforme, raio de 2 ou mais micra. Poucas células se apresentam com pequeno numero de grãos, raras são as que os possuem ainda pequenos. Às vezes o nucleo é perceptível em exame a fresco, outras vezes é invisível pelos grãos que estão por cima.

Tait & Gunn observaram que quando se examina os histiocitos granulares em filamentos removidos das branquias de *Astacus fluviatilis* eles mudam de forma, emitem pseudopodos, possuem movimentos ameboides e foram por estes autores denominados de « amebocitos ». Os histiocitos granulares de *Uca pugnax brasiliensis* não apresentam estes movimentos ameboides, ou se os apresentam, estes se pronunciam tão pouco que nos impediu de o denominarmos de « amebocitos » e seguir a antiga denominação referida por Tait « granular cells » dada por Bruntz para estes elementos no sangue da lagosta.

Os « amebocitos » do camarão nobre de pés vermelhos, europeu, dagua doce, *Astacus fluviatilis* Fabricius, mostram um alto poder de aderencia um para com outro, tanto em vivo como em vitro. Numa hemorragia de crustaceo, por exemplo em *Gammarus* (amphipoda) vêm-se enormes trombos constituídos quasi unicamente de amebocitos. No sangue de *Uca pugnax*, entre lamina e laminula, não ha esta aderencia de histiocitos granulares; os elementos do sangue se aglomeram em faixa, levados pelas correntes de liquido na preparação microscopica no fim de algum tempo, o que é visto principalmente em exame com objetiva fraca. Com objetiva forte observamos que a aderencia não se dá apenas nos histiocitos granulados entre eles, mas entre os tigmocitos e histiocitos granulares indiferentemente. Além disso, a maior parte se conserva livre.

Estas células quando coloridas pelo método de Giemsa apresentam-se como elementos ovoides ou esfericos de 10 a 12 micra, às vezes um pouco maiores ou um pouco menores, tendo no protoplasma numerosas massas (os grãos) corados uniformemente em roseo, deixando aparecer o ectoplasma em alguns locais (figs. 1 e 2). Além destes grãos que medem em média 1 a 2 micra cada um, algumas células apresentam umas granulações finissimas semelhantes a um precipitado. Essas granulações de côr acastanhada só aparecem em algumas células, e não sabemos a que referi-las. Outra pontuação muito tenue que recobre por vezes certas células é formada por granulações neutrofilas.

O nucleo apresenta quando em repouso a seguinte forma: ovoide, medindo 4,5 micra no seu diametro maior. É de posição central ou sub-central. Possui uma membrana nuclear visível á qual aderem alguns grãos de cromatina. No interior notam-se algumas (duas a quatro, raro mais) massas de cromatina ligadas umas ás outras por faixas menos coradas (fig. 3), podendo assumir às vezes formas em bastonetes.

Cuenot já em 1895, foi o primeiro a verificar divisões por mitose em globulos sanguineos de decapodos. Na maioria dos histiocitos de *Uca pugnax* o nucleo se acha em repouso apresentando cromatina periferica presa á membrana nuclear e tendo no seu interior duas massas coraveis pela hematoxilina. Vêm-se em poucos histiocitos (8 a 10%) outros nucleos numa fase mais adiantada da mitose: ha um começo de individualisação dos cromosomas; o nucleo neste estado toma o aspéto de um crivo pontuado por granulações de cromatina muito regularmente distanciadas. Em outras células estas massas de cromatina já estão dispostas em fileiras e em outras já podemos perceber um começo

de placa equatorial. E' de ser notado que no sangue colhido da pinça do crustaceo poucas formas com membrana nuclear desaparecida e em franca metafase se apresentem, estando a maioria dos histiocitos granulares com nucleo em repouso.

Lowitt começou em 1891 a descrever varias afinidades corantes dos glóbulos granulares do sangue de crustaceo. Granulações neutrofilas foram observadas em grande numero de glóbulos granulados de varios crustaceos. Existem, como dissemos, em *Uca pugnax brasiliensis*, sendo que dão a reação de Millon, são soluveis em alcalis e acidos fracos e com iodo tomam a coloração pardo escura.

Uma reação que dá positiva no sangue de *Uca pugnax brasiliensis* é a seguinte: depois de um tratamento mais demorado pelo acido osmico a célula toma uma apparencia interessante — os grãos desaparecem, ficando a parte mais proeminente apenas; tratando-se pela eosina em seguida ha coloração das outras partes, deixando em vazio os lugares dos grãos, que parecem ter se dissolvido.

E', quando colorido pelo lugol, que os histiocitos granulares se tornam mais visiveis.

Ha elementos que são encontrados no sangue em pequeno numero em estado normal, aparecendo uma vez ou outra quando se corre o preparado, como por exemplo: Histiocitos granulares anucleados, que são elementos pouco menores que os histiocitos granulares nucleados e possuindo o mesmo aspéto. Não sabemos se se trata de um elemento que indique alguma alteração na saúde do crustaceo, pois aparece em porcentagem muito pequena no sangue normal. Possuem enormes grãos de 1 a 3 micra, não apresentam granulações neutrofilas, nem outras.

Os glóbulos de gordura somente existem em proporção muito pequena, vistos em exame a fresco, em poucas amostras.

Não encontramos histiocitos basofilos no sangue de animais normais de *Uca pugnax brasiliensis*.

Além destas formas reconhecemos no sangue tigmocitos e histiocitos granulares em via de evolução, bem como varias células em degenerescencia.

Ao terminar o nosso trabalho lembramos que Tait & Gunn (7) levantaram a hipótese, não satisfatoriamente provada, que os « explosive body » do sangue de *Astacus fluviatilis* na corrente sanguinea se transformam em tigmocitos e estes pela aquisição de grãos em histiocitos granulares.

Nós, devido á semelhança do nucleo dos tigmocitos e histiocitos granulares de *Uca pugnax brasiliensis*, achamos ser possivel a evolução de tigmocito em histiocito granular, neste crustaceo.

BIBLIOGRAFIA

- 1) CUENOT, L.
1897. Les Globules Sanguins et les Organes Lymphoides des Invertebrés. Arch. d'Anat. Microsc., **1** : 153.
- 2) CUENOT, L.
1905. L'Organe Phagocitaire des Crustacés Decapodes. Arch. Zool. Exper. ser. 4, **3** : 1.
- 3) BRUNTZ, L.
1906. Les Globules Sanguins des Crustacés Arthrostracés. C. R. Soc. Biol. Paris, **9**, 384.
- 4) BRUNTZ, L.
1907. Études sur les Organes Lymphoides Phagocitaires et Excreteurs des Crustacés Superieurs. Arch. Zool. Exp. et Gen. 4ème sér., **7** : 1-67.
- 5) KOLLMANN
1908. Recherches sur les Leucocytes et le Tissu Lymphoide des Invertebrés. Ann. Sci. Nat., **8**, Paris.
- 6) KNOVER, H. M. E.
1908. A new Sensitive Method of Injecting the Vessels of Small Embryos... Anat. Rec., **2** : 207-214.
- 7) TAIT, J. & GUNN, J. D.
1917. The Blood of *Astacus Fluviatilis*. Quart. Journ. Exper. Phys., **12** (1) : 35-80.
- 8) BETARCES, L.
1920. Sur l'Existence des Plaquetes chez *Astacus fluviatilis*. C. R. Acad. Sci. Paris, **171** : 320-322.
- 9) ARTON, C.
1927. Gli Elementi dell'Endolinfa dei Crostacei Eufilopodi. Rend. Acc. Lincei., **6** (6) : 257-260.
- 10) OLIVEIRA, L. P. H.
1939. Contribuição ao Conhecimento dos Crustaceos do Rio de Janeiro. Mem. Inst. Oswaldo Cruz, **34** (1) : 115-148, 14 est.
- 11) SAWAYA, P.
1939. Sobre a Mudança de Côr nos Crustaceos. Bol. Fac. Fil. Cien. Letras da Univ. S. Paulo, **13** (3) : 1-109.

12) LANGERON, M.

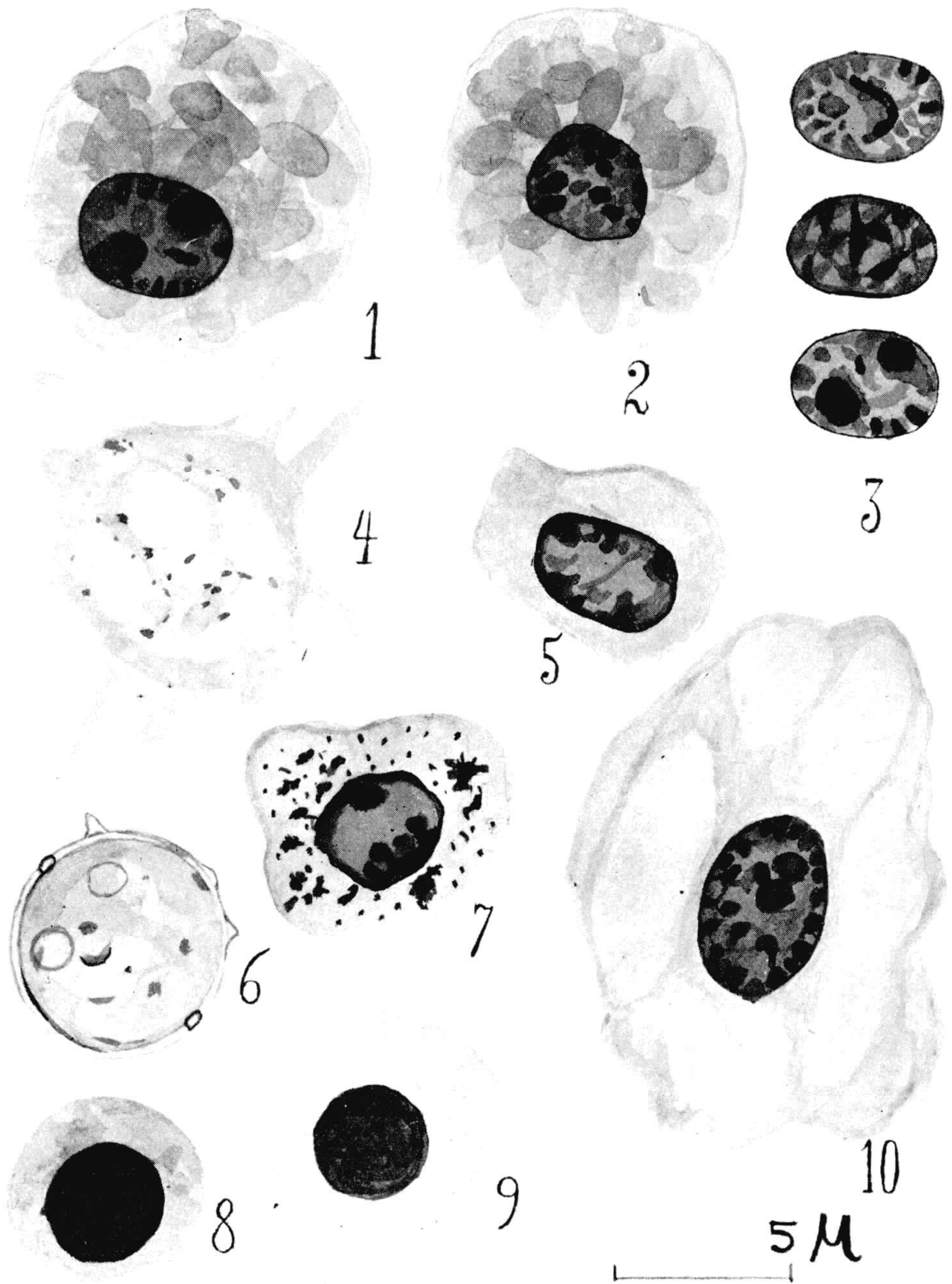
1936. Précis de Microscopie. Masson & Cie., Paris.

13) OLIVEIRA, L. P. H.

1940. Catalogo dos Crustaceos do Rio de Janeiro. Mem. Inst. Osw. Cruz,
35 (1) : 137-151.

Estampa 1

- Fig. 1 — Histiocito granular, colorido pela Hematoxilina ferrica de Heidenhein.
Fig. 2 — **Idem.**
Fig. 3 — Nucleos de histiocitos granulares.
Fig. 4 — Exame a fresco, mostrando o aspéto «estrelado» com que fica o tigmocito.
Fig. 5 — Tigmocito colorido pela Hematoxilina ferrica.
Fig. 6 — Exame a fresco, mostrando o aspéto esférico com que fica o tigmocito.
Fig. 7 — Tigmocito colorido pelo Heidenhein.
Figs. 8-9 — Jovens tigmocitos.
Fig. 10 — Um grande tigmocito.



Oliveira e Moreira: Sangue de Crustaceos.