

ESTUDO HISTOQUÍMICO, BIOQUÍMICO E MORFOMÉTRICO DE CÉLULAS MUCOSAS DE PEIXES EURIALINOS ADULTOS E EM ESTÁGIO LARVAL

MENEZES, Janaína de Sousa¹; SILVA, Mirelle Garcia¹; CARVALHO, Rodolfo¹; SABOIA-MORAIS, Simone M. Teixeira².

Palavras-chave: alevinos, salinidade, *Poecilia vivipara* e células mucosas

1. INTRODUÇÃO

Uma das respostas para a busca por um hábito é que esses são desenvolvidos gradualmente, até a sua adaptação (Nepomnyashchikh *et al.*, 2003). Algumas espécies de peixes conseguem sobreviver em ambientes com mudanças de salinidade, dentre elas, está o guaru (*Poecilia vivipara*), que é um peixe moderadamente eurialino. Tal capacidade confere a esse peixe uma maior possibilidade de sobrevivência em diferentes ambientes aquáticos. Um dos mecanismos utilizados por esses peixes para a proteção dos tecidos epiteliais expostos ao ambiente é a secreção de uma camada superficial de glicoproteínas e glicolipídios (Burkhardt-Holm, 1997; Sabóia-Morais *et al.*, 2004). O guaru é frequentemente utilizado como modelo biológico devido ao seu curto ciclo de vida, às grandes quantidades de alevinos produzidos, proporcionando assim material suficiente para estudos da biologia do desenvolvimento de peixes com fecundação interna, porém sem troca materno-fetal (Araújo *et al.*, 2001). Neste sentido, uma vez que só a mãe entra em contato com alterações de salinidade e os filhotes estão resguardados dessas intervenções, tentou-se propor via de ativação celular do tipo mucoso de alevinos pós-nascimento e dentro de período de 24 horas de exposição as condições alteradas de salinidade do meio. Pois a salinidade altera uma gama de mecanismos que proporciona a adaptação desses animais ao meio por constituir revestimento extracelular, que pode ser protetor e lubrificante mas, em altas quantidades pode promover a morte do peixe por asfixia. Todas essas funções ficaram evidenciadas ao se qualificar os glicoconjugados de populações celulares submetidas a diferentes concentrações de salinidade. O estudo histológico e histoquímico será conduzido para ajudar a estabilizar casuais relações entre a exposição à salinidade e as várias respostas biológicas. Neste sentido, as espécies que desenvolverem mecanismo de resposta em nível celular certamente elaborarão essas respostas por alteração do comportamento celular. De acordo com Sabóia-Morais *et al.* (2004), seriam ativadas expressões de glicoproteínas distintas de acordo com o ambiente salino de exposição.

2. METODOLOGIA

Fêmeas adultas de *P. vivipara* obtidas no Córrego Cascavel, em Goiânia, foram transferidas para o Laboratório de Comportamento Celular – DMORF/UFG e permaneceram por 24 horas sob período de adaptação, 15 espécimes foram

aclimatizados por 05 dias em cada salinidade experimental nas concentrações decrescentes (15, 10, 5 e 0 μ L/L). Alevinos nascidos nesse período experimental permaneceram por 02 e 24 horas no ambiente salino e após isso, foram sacrificados. Amostras coletadas para análises de microscopia de luz, foram fixadas em Karnovsky (paraformaldeído 10%, glutaraldeído 2,5% em tampão fosfato de sódio 0,2M, pH 7,3). As estruturas dissecadas foram incluídas em parafina. Foram obtidos cortes de 4 μ m. Após isso, as lâminas foram submetidas à bateria histológica, e foram coradas segundo as metodologias de rotina histológica para analisar a morfologia geral (HE), e para detecção da presença de glicoconjugados (PAS, PAS + acetilação, PAS + acetilação + saponificação, Alcian Blue pH 0,5, Alcian Blue pH 2,5, Alcian Blue pH 2,5 + metilação e Alcian Blue pH 2,5 + metilação + saponificação). As imagens histológicas foram obtidas através de fotomicrografias realizadas no equipamento Olympus CH 30.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foi possível identificar nos alevinos a organização geral dos arcos branquiais e, diagnosticar as estruturas componentes do arco branquial. Os alevinos nessa fase inicial provavelmente receberão muitos sinais ativadores que permitirão a diferenciação celular em tipos ativos específicos. O monitoramento nos permitiu diagnosticar que a partir do terceiro dia de exposição, aparentemente os espécimes já haviam se adaptado. Durante o período de exposição às diferentes salinidades, verificou-se que após o nascimento dos alevinos, as fêmeas adultas prenhes ou não se alimentavam dos mesmos, e diante da alta frequência de canibalismo observada, foi elaborada uma metodologia adaptativa para que os animais pós-natal estivessem separados fisicamente dos peixes adultos. Durante o período de cinco dias de experimentação, quatro alevinos expostos à salinidade de 5 μ L/L morreram antes mesmo de completarem 2 horas de exposição. Após o nascimento, os sistemas mais funcionais do peixe são incompletos, por isso a morfogênese e a diferenciação são muito intensas durante o estágio de vida de desenvolvimento prematuro. O epitélio branquial dos guarus apresenta quatro tipos de células mucosas que se diferenciam de acordo com sua localização e a histoquímica de glicoconjugados em microscopia de luz (Sabóia-Morais et al., 1996; 1997), apresentando também diferenças morfológicas e, nos alevinos envolvem o surgimento precoce das células mucosas diferenciadas, as quais são detectadas na região do rastelo branquial (células mucosas do tipo IV). Foi possível verificar que essas células mucosas têm grânulos com conteúdo rico em glicoconjugados neutros, pelos métodos de PAS e PAS + acetilação, que foram observados em alta reatividade nas células tipo IV e em reação moderada nas células tipo III e, a presença de grupamentos ácidos carboxilados e/ou sulfatados, identificados pelas reações ao Alcian-blue pH 2,5 e ao Alcian Blue pH 0,5, respectivamente. As células marcadas pelo PAS e pelo Alcian Blue pH 2,5 estão aderidas à superfície interna do opérculo. Além desse diagnóstico, foi possível identificar células Alcian-blue e PAS-reativas no epitélio de revestimento branquial. As análises preliminares permitem identificá-las como do tipo III e do tipo IV. Através da reação de Alcian Blue pH 0,5 + metilação, as células III e IV apresentaram reatividade, sendo indicativo de presença de sialomucinas. No tecido branquial dos peixes controle, após 2 horas de exposição, não foi observado a presença de células mucosas, mas

nos animais controles que permaneceram durante um período de 24 horas de exposição, foi verificada células mucosas do tipo IV. E em grupos experimentais tratados, em ambos os tempos de exposição, também foram observadas células III e IV. Alguns autores argumentam de diferentes modos que a variabilidade do comportamento intrínseco é parte essencial para a adaptação comportamental (Nepomnyashchikh *et al.* 2003; Woo *et al.*, 1995). Sugere-se que o mesmo ocorra na espécie *Poecilia vivipara*.

4. CONCLUSÃO

Pode-se distinguir duas fases no desenvolvimento de *P. vivipara*, sendo que a primeira consiste desde a formação do embrião até a iniciação da vida externa (pós-natal) enquanto que a outra começa após este período até a transformação para o estágio adulto. Altas salinidades, possivelmente refletem no elevado metabolismo na osmorregulação. Por isso, sugerimos para essa fase do desenvolvimento, aumento do número bem como da diferenciação celular por ativação imposta pelo ambiente. A histoquímica de glicoconjugados indica a presença de grupamentos vic-glicol (mucinas neutras) e grupamentos ácidos sulfatados e carboxilados freqüentes nas células mucosa do tipo IV, as primeiras a serem detectadas nas larvas do guaru. Na seqüência surgiram as células do tipo III como as primeiras no epitélio de revestimento dos filamentos branquiais, que foram observadas desde o grupo controle com exposição sub-aguda de 2 horas (presente em baixa freqüência) até o grupo experimental submetido à uma salinidade de 20 µL/L com exposição aguda de 24 horas, porém células do tipo III aparecem com menor freqüência do que as células do tipo IV. Indica-se que elas seriam induzidas a surgirem pela ativação feita pelo aumento da salinidade.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Araújo, E.J. *et al* (2001). Efeito de poluentes químicos cumulativos e mutagênicos durante o desenvolvimento ontogênico de *Poecilia vivipara* (Cyprinodontiformes, Poeciliidae). *Acta Microsc.*, Maringá. v. 23, n. 2, p. 391-399.
- Burkhardt-Holm, P.; Wahli, T.; Meier, W. (2000). Nonylphenol Affects the Granulation Pattern of Epidermal Mucous Cells in Rainbow Trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, v. 46, Issue 1, 34-40.
- Nepomnyashchikh, V.A.; Podgornyj, K.A. (2004) Emergence of Adaptive searching rules from the Dynamics of a Simple Nonlinear System. *Adaptive Behavior*. 11: 245-264.
- Sabóia-Morais, S.M.T.; Hernandez-Blazquez, F.J.; Mota, D.L.; Bittencourt, A.M. (1996). Mucous cells types in the branchial epithelium of the euryaline fish *Poecilia vivipara*. *J. Fish. Biol.*, 49: 545-548.
- Sabóia-Morais, S.M.T., Borges-de-Oliveira, R.; Breseghelo, L. Watanabe, I.; Yamada, A.T. (2004) Cytochemical and biochemical detection of euryhaline fish (*Poecilia vivipara*) gills submitted to salty changes. Prgs in VI Internacional Congress on the Biology of fish – Symposium I and Acid-Base Regulation in Fish, 79-83.

FONTE DE FINANCIAMENTO – CNPq/PIBIC

¹ Bolsista de iniciação científica. Instituto de Ciências Biológicas - LCC - Laboratório de Comportamento Celular, jana@biologia.grad.ufg.br

² Orientadora/Instituto de Ciências Biológicas/UFG, saboias@terra.com.br