

Análise ontogenética, citoquímica, bioquímica e morfológica de células mucosas de peixes eurialinos estuarinos de águas continentais

SILVA, Mirelle Garcia¹; **MENEZES**, Janaína de Souza²; **CARVALHO**, Rodolfo¹; **SABÓIA-MORAIS**, Simone Maria Teixeira³.

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

1. INTRODUÇÃO

Os peixes têm sido usados em pesquisas acadêmicas por um longo tempo, menos que outros animais como ratos e camundongos, mas tem sido objeto de análises crescentes desde 1960. Eles vivem em uma ampla variedade de habitats aquáticos; que vão desde a água doce, passando pelas salobras até a salgada, de mares polares frios a recifes quentes e tropicais e de rasas superfícies de água a profundidades oceânicas (BOLIS *et al.*, 2001). Nesse sentido, o organismo selecionado para estes experimentos foi o *Poecilia vivipara*, vulgarmente conhecido como guaru, espécime neotropical, adaptável ao cativeiro, onde se reproduz com facilidade, possuindo fecundação interna. Eles são flexíveis a variações ambientais, facilmente adaptados em águas continentais, assim como em águas salobras (MARSHALL *et al.*, 2000), o que possibilita a análise do comportamento de suas células frente a diferentes fatores bióticos e abióticos de corpos d'água, destacando-se alterações na salinidade do ambiente. O processo de adaptação a águas salobras, assim como outras alterações no ambiente aquático (variações de pH, temperatura, demanda de oxigênio, entre outros poluidores, por exemplo), podem provocar modificações celulares em alguns tecidos deste organismo, principalmente no epitélio branquial. As brânquias são órgãos multifuncionais e com uma organização interna complexa que é similar para muitos teleósteos (FERNANDES & PERNA-MARTINS, 2001). Desempenham atividades vitais para a sobrevivência do peixe, tais como, trocas entre sangue e água, controle da osmolaridade sanguínea, participação no equilíbrio ácido-base e excreção de nitrogênio, além de desempenhar um papel central no estresse osmótico (ARAÚJO *et al.*, 1999). A brânquia dos guarus, bem como de outros teleósteos é revestida por um epitélio estratificado pavimentoso constituído por quatro tipos de células que são, as pavimentosas, do cloro (ricas em mitocôndrias), neuroepiteliais e mucosas (SABÓIA-MORAIS, 1996), sendo a última nosso enfoque de estudos. Sugere-se, para tanto, que as células pavimentosas sejam o principal local de trocas gasosas, enquanto as células mucosas secretam muco contendo substâncias de defesa para proteger o revestimento branquial. Há ainda 4 tipos de células mucosas distintas, tipo I, II, III e IV. O tipo I situa-se na região apical do filamento branquial; o tipo II, na região apical e também na interlamelar; a do tipo III localiza-se somente na região interlamelar; e a do tipo IV no arco branquial. Estas células têm importante função em mecanismos adaptativos (SABÓIA-MORAIS 1996) como, por exemplo, o aumento da secreção de muco quando os peixes estão expostos a ambientes adversos. O muco é uma substância composta por glicoconjugados que tem sido grandemente estudado por outros pesquisadores (BJERKNES e CHENG, 1985). O estudo das células mucosas frente as diferentes salinidades tem demonstrado a formação e o papel dos

glicoconjugados para a sobrevivência do peixe (SABÓIA-MORAIS *et al.*, 2004). Assim, têm sido importantes as pesquisas que demonstrem a alteração do conteúdo de glicoconjugados durante as modificações das condições abióticas do meio aquático, e no decorrer do desenvolvimento pós-natal dos peixes. Nesse sentido, é necessária a investigação de como esses glicoconjugados mudam em resposta a diferentes ações ambientais após o nascimento e no indivíduo adulto. Seriam os tipos celulares mucosos ativados em função da concentração de salinidade?

2. METODOLOGIA

Os exemplares de *Poecilia vivipara* foram obtidos no Córrego Cascavel, em Goiânia, e levados para o Laboratório de Comportamento Celular, DMORF/UFG. Os peixes foram adaptados em aquário por um período de 24 horas. Quinze fêmeas de *Poecilia vivipara* foram retiradas aleatoriamente do tanque de adaptação e colocadas em outro aquário contendo água decolorada. Este grupo foi observado constantemente e os alevinos que nasceram (61 no total) foram distribuídos em recipientes contendo água em diferentes concentrações de salinidade (0µl/, 5µl/, 10µl/, 15 µl/e 20µl/). Para reconstituição da salinidade foi utilizado sal marinho comercial (Tetra - Alemanha). A exposição foi feita em períodos de 2 horas e 24 horas. Após a exposição dos alevinos às diferentes concentrações de salinidade, os mesmos foram fixados em solução Karnovsky (associação glutaraldeído 2,5% e paraformaldeído 4%, tampão fosfato de sódio 0,2M, pH 7,3). O material foi então incluído em parafina e, para a montagem das lâminas histológicas, foram obtidos cortes de 4 µm. Procedeu-se a coloração das lâminas, utilizando-se as seguintes técnicas histoquímicas: bateria histológica com HE, Periodic Acid Schiff (P.A.S.), P.A.S. + acetilação, P.A.S. + acetilação + saponificação, Alcian Blue pH 2,5, Alcian Blue pH 2,5 + metilação, Alcian Blue pH 2,5 + metilação + saponificação e Alcian Blue pH 0,5.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A análise do material permitiu a identificação dos diferentes tipos de células mucosas presentes no epitélio branquial dos alevinos de *Poecilia vivipara*. A visualização dos tipos celulares foi possível devido à utilização das técnicas que permitem a detecção de glicoconjugados, presentes na composição do muco secretado pelas células mucosas. Esse muco participa dos mecanismos adaptativos do animal desencadeados pelas células mucosas frente condições ambientais diversas. (SABÓIA-MORAIS, 1996). No grupo controle exposto à água doce por 2 horas e 24 horas foram observadas células mucosas tipo II, III e IV muito reativas ao PAS. Isso é um indicativo da presença de glicoconjugados neutros, ricos em 1,2-vic-glicolol, no muco secretado por essas células. Grande quantidade de células mucosas tipo IV com conteúdo de glicoconjugados contendo grupos ácidos carboxilados e sialomucinas foram observadas nos grupos controle (2 horas e 24 horas) e nos animais expostos as diferentes concentrações de salinidade (5µl/L, 10 µl/L, 15 µl/L e 20 µl/L). A visualização dessas células foi possível devido a utilização das técnicas Alcian Blue pH 2,5, Alcian Blue pH 2,5 + metilação e Alcian Blue pH 2,5 + metilação + saponificação, que detectam os grupos ácidos carboxilados. Células mucosas tipo III foram visualizadas com menor frequência e, no grupo controle 24 horas, mostraram-se muito reativas ao PAS, indicando a presença de glicoconjugados neutros no muco, e muito reativas ao Alcian Blue pH 2,5, sendo um indicativo de glicoconjugados com grupos ácidos carboxilados. Enquanto que, células tipo II foram visualizadas nos alevinos expostos por 2 horas à concentração de salinidade igual a 20 ppm. Os tipos celulares mucosos citados também foram visualizados pela técnica

HE. Essa técnica, entretanto, não marca as células mucosas especificamente de acordo com o conteúdo de glicoconjugados no muco, sendo utilizada para investigação da morfologia geral dos animais estudados.

4. CONCLUSÃO

As técnicas histoquímicas permitem detectar a composição de glicoconjugados do muco e, conseqüentemente, sua viscosidade, em diferentes concentrações de salinidade. O muco mais fluido é composto por glicoconjugados ricos em grupamentos 1,2-vic-glicol, enquanto aquele mais viscoso apresenta glicoconjugados ricos em sialomucinas (presença de ácido siálico). Os glicoconjugados presentes no muco secretado pelas células mucosas de animais do grupo controle são ricos em 1,2-vic-glicol (muco fluido). É provável que esta característica esteja relacionada a ausência de salinidade (grupo controle) já que, não tendo sido expostos a um ambiente rico em sal, os alevinos não necessitaram produzir uma barreira de proteção para o epitélio branquial tão eficiente.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Bolis, C. L.; Piccolella, M.; Dalla Valle, A. Z.; Rankin, J. C. Fish as a model in pharmacological and biological research. *Pharmacological research*, vol.44, nº 4, 2001.
- Marshall, W. S.; Bryson, S. E.; Luby, T. Control of epithelial Cl⁻ secretion by basolateral osmolality in the euryhaline teleost *Fundulus heteroclitus*. *Journal of experimental biology*, Vol.203, p. 1897 – 1905, 2000.
- Fernandes, M. N. and Perna-Martins, S. A. Epithelial gill cells in the armored catfish, *Hypostomus* CF. *plecostomus* (LORICARIIDAE) *Rev. Bras. Biol.*, vol.61 nº.1, São Carlos Feb. 2001
- Araújo, E. J. A.; Nascimento, O. R.; Ribeiro, D. P.; Carneiro, C. E. A.; Silva, L. D.; Da Mata, F. R.; Borges, G. L.; Morais, J. O. R. & Sabóia-Morais, S. M. T. Early ontogenetic development of mucous and chloride cells in the gills of guppies (*Poecilia vivipara*). *Acta Microscópica*, Vol.8 Supplement b, October, 1999.
- Sabóia- Moraes, S. M. T.; Hernandez-Blazquez, F. J.; Mota, D. L.; Bittencourt, A. M. Mucous cell types in the euryhaline fish *Poecilia vivipara*. *Journal of fish Biology*, 49, 545 – 548, 1996.
- Bjerknes, M.; Cheng, H. Mucous cells and cell migration in the mouse duodenal epithelium. *Anat Rec.* May; 212(1):69-73, 1985.
- Sabóia-Morais, S. M. T.; Borges-de-Oliveira, R. Cytochemical and biochemical detection of glycoconjugates in mucous cells of eurihaline fish (*Poecilia vivipara*) gills submitted to salinity changes. *Proceedings in: Internacional Congress on the Biology of Fish*, August 1-5, 2004.

FONTE DE FINANCIAMENTO – CNPq/PIVIC

¹Bolsista de Iniciação Científica - PIVIC. Instituto de Ciências Biológicas/Departamento de Morfologia - Laboratório de Comportamento Celular- UFG.

²Bolsista de Iniciação Científica - PIBIC. Instituto de Ciências Biológicas/ Departamento de Morfologia - Laboratório de Comportamento Celular - UFG

³Orientadora - Instituto de Ciências Biológicas/Departamento de Morfologia - Laboratório de Comportamento Celular - UFG saboias@terra.com.br