

Análise citoquímica e morfométrica das células mucossecretoras do epitélio branquial de *Poecilia vivipara* frente a variações de salinidade.

ROCHA, Thiago Lopes¹ ; **SABOIA- MORAIS**, Simone Maria Teixeira²

Palavras-chave: Salinidade, células mucosas, *Poecilia vivipara*, teleósteo.

INTRODUÇÃO (justificativa e objetivos)

Os peixes são formas de vida abundante no meio aquático. Colonizam os mais variados habitats, sendo por isso, submetidos às mais variadas condições ambientais. O guaru (*Poecilia vivipara*) caracteriza-se por ser eurialino, possuindo tolerância suficiente para se manter vivo em ampla variação de salinidade que vai desde a condição de água doce 0 µl/L até a água salobra com 20 µl/L, foi também verificado que esta condição está diretamente relacionada ao aumento do número de células mucosas e pelo aumento da liberação do conteúdo dos seus grânulos, o que promove a formação de uma camada superficial protetora (Sabóia & Ferri; 1987; Sabóia-Moraes, *et al.*;1996). Por estar em íntimo contato com o meio externo, as brânquias representam um dos principais órgãos afetados pela toxicidade de produtos químicos e variações no meio aquático (Araújo, 2001; Vigário 2005), além de desempenharem numerosas funções, incluindo respiração, osmorregulação, excreção de produtos nitrogenados e balanço ácido-básico, sendo a célula rica em mitocôndria, o principal tipo responsável pela regulação iônica em nível epitelial (Laurent, 1985). O estudo do desenvolvimento nesta espécie, considerando as fases embrionárias e de alevinos, com conseqüente diagnóstico da ativação de suas células permitirá uma melhor compreensão dos mecanismos morfo-fisiológicos responsáveis pela adaptação desta espécie às diferentes ambientes, o que permitirá a caracterização da mesma para testes de toxicidade ambiental. No presente trabalho pretende-se avaliar e caracterizar os tipos celulares presente no epitélio branquial de embriões expostos à água salobra através da citoquímica de glicoconjugados e morfometria.

2. METODOLOGIA

2.1. Coleta do material biológico e procedimentos experimentais

Os guarus foram coletados em córregos do entorno de Goiânia-GO (S 16° 34' 24"; W 48° 56' 17"; 769m) e transportados em caixa térmica (isopor) até o Laboratório de Comportamento Celular (LCC) – ICB - UFG, onde passaram por um período de adaptação em aquários de 40 litros à temperatura ambiente, durante 24 horas. A qualidade da água foi monitorada diariamente para pH, temperatura, amônia, oxigenação e iluminação.

Vinte fêmeas de *Poecilia vivipara* foram retiradas aleatoriamente do tanque de adaptação e colocadas em outro aquário contendo água dechlorinada. Ao nascerem, os alevinos foram retirados da água doce e expostos em água com diferentes concentrações de salinidade (0 µl/L, 5 µl/L , 10 µl/L, 15 µl/L e 20 µl/L) por um período de 2 horas, totalizando 25 alevinos (5 alevinos para cada tratamento). O grupo controle foi composto por 5 peixes para os quais também foram mantidas as mesmas condições acima citadas. Para reconstituição da salinidade

foi utilizado sal marinho comercial (Tetra - Alemanha). A manutenção dos animais, bem como todo o experimento, foi realizado de acordo com as normas de conduta ética em experimentação animal (Brasil, 1979).

2.2. Preparação para Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

Após a exposição dos embriões e alevinos às diferentes concentrações de salinidade, os mesmos foram fixados por imersão em solução Karnovsky, pós-fixados com Tetróxido de Ósmio (O_5O_4) 1% aquoso, desidratados em concentrações crescentes de etanol, imersos em acetona, submetidos a ponto crítico e metalização, montados em "stubs" próprios para MEV e analisados no MEV – JEOL 240 do CEMIE – UNIFESP – São Paulo.

2.3. Processamento dos embriões e alevinos

Para detecção das fases embrionárias e larvais em microscópio estereoscópio, os embriões foram fixados em formol 10% e conservados em álcool 70%.

Para estudos microscópicos, após a exposição dos embriões e dos alevinos às diferentes concentrações de salinidade, os mesmos foram fixados em solução de formol neutro a 10%, desidratados em concentrações crescentes de etanol, diafanizados em xilol e incluídos parafina Plaraplast. Foram obtidos cortes de 4 μm .

2.3.1. Preparação para reação com lectinas

As reações com lectinas, os cortes foram desparafinizados, hidratados, lavados com água destilada, tratados com tampão PBS 0,1M pH 7,4, inibidos com H_2O_2 1 % em tampão fosfato 0,1M pH 7,4, lavagem com PBS 0,05M pH 7,4, incubados com SAV- Peroxidase, revelação com DAB 0,5mg/ml, contra-coloração com Hematoxilina e montagem em Entelan.

2.4. Estatística da ocorrência de filhotes em fase embrionária, larval e pós-eclosão por fêmea.

Por meio da contagem total dos filhotes foram obtidos dados os quais foram trabalhados com o uso do teste T de Student e ANOVA a fim de definir a melhor metodologia para este tipo de amostra.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Para compreender o desenvolvimento ontogênico do guaru, foram padronizados parâmetros macroscópicos, evidenciando características morfológicas (Carvalho *et al.*, 2005). Assim sendo, o desenvolvimento do animal foi descrito em 5 fases. Essa forma de descrição está de acordo com os parâmetros de classificação estabelecidos por Borçato *et al.* (2004). Além disso, após efetuar esta classificação (Carvalho *et al.*, 2005), fez as medidas de diâmetro e comprimento dos embriões, utilizando os olhos e a cauda como pontos referenciais. Em continuidade àqueles dados, averiguou-se que, no grupo controle nasceram 14 alevinos com um comprimento total de $7,573 \pm 0,289$ mm e no grupo experimental (20ppm) nasceram 11 alevinos com $7,612 \pm 0,178$ mm. Contudo, devido ao diminuto tamanho dos espécimes foi inviável a determinação do peso dos animais ao nascimento. Os alevinos, após duas horas de nascimento, possuem comprimento total (boca a cauda) de $8,33 \pm 0,338$ mm, largura da cabeça (de um olho ao outro) de $1,52 \pm 0,132$ mm e comprimento da cauda de $2,20 \pm 0,248$ mm.

Verificou-se a presença de vitelo depois do nascimento nos alevinos ao microscópio óptico, confirmando a não alimentação exógena durante as primeiras horas após o nascimento. Mas o nascimento prematuro ou com grande quantidade de vitelo dificulta a sobrevivência dos mesmos, pois neste último caso, o alevino não conseguia nadar e permanecia girando no fundo do aquário. Caso este evento ocorresse na natureza, certamente este animal seria alvo fácil para predadores. Estudos acerca do canibalismo inter e intra-específico realizado por Manica

(2002) tem descrito dados que consubstanciam a observação experimental realizada no presente trabalho.

Nos alevinos de *Poecilia vivipara* foi possível observação dessas estruturas: arcos branquiais, filamentos e lamelas, todos em processos finais de formação. A análise do presente material permitiu a identificação de três tipos de células mucosas (as dos tipos II, III, IV) presentes no epitélio branquial dos alevinos de *Poecilia vivipara*. Averiguou-se, de acordo com descrito por Sabóia-Morais *et. al.* (1987) que em diferentes estágios de vida, o guaru consegue se adaptar em concentrações de salinidade, variando de 0 (zero) a 20 $\mu\text{L/L}$, sendo esta característica exclusiva de poucos peixes, isso porque parte da energia metabólica é empregada nos processos osmorregulatórios. As técnicas citoquímicas permitiram detectar a composição de glicoconjugados do muco e, conseqüentemente, sua viscosidade, em diferentes concentrações de salinidade. Nos embriões os glicoconjugados presentes e secretados pelas células mucosas de animais do grupo controle em 2 horas são ricos em 1,2-vic-glicol. Esse muco é mais fluido e 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 mais densa para o epitélio branquial.

Células mucosas tipo III foram detectadas, porém com baixíssima ocorrência no epitélio interlamelar mais próximo à base dos filamentos e presentes, mas com menor incidência, ainda foram detectado as células mucosas do tipo II. Neste sentido, a análise do material permitiu a identificação de três tipos de células mucosas (as dos tipos II, III, IV), dos quatro descritos por SABÓIA-MORAIS *et al.* (1996) como presentes no epitélio branquial dos adultos de *Poecilia vivipara*, os quais foram reativos à PHA-E4, LTA e MAM.

4. CONCLUSÃO

*Nas fases embrionárias e larvais, o guaru possui um grande desenvolvimento cranial, os globos oculares, o intestino, comprimento da cauda bem formados e desenvolvidos.

*Ao nascer o alevino está na fase 5 e, a cada 2 horas, provavelmente ocorrem mudanças significativas para as fases subseqüentes.

*A diferença de concentrações salinas não interfere no comprimento total do alevino.

*A análise do material permitiu a identificação de três tipos de células mucosas (as dos tipos II, III, IV).

*Nos embriões os glicoconjugados secretados pelas células mucosas de animais do grupo controle em 2 horas são ricos em 1,2-vic-glicol e parecem exercer função protetora.

* Verificou-se a presença de vitelo, depois do nascimento, nos alevinos ao microscópio óptico.

* O vitelo presente em grande quantidades após o nascimento é fator de risco de predação, conseqüentemente de morte.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Araújo, E. J. A.; Morais, J. O.R.; Souza, P. R. Sabóia-Morais, S. M. T. Efeito de poluentes químicos cumulativos e mutagênicos durante o desenvolvimento ontogenético de *Poecilia vivipara* (Cyprinodontiformes, Poeciliidae). **Acta Scientiarum**, **23(2)**: 391-399, 2001.

Brasil. Normas para a prática didática – científica da vivisseção de animais e determinação de outras providências. Lei nº. 6.638, 8 de maio de 1979. Lex, v. 43, p. 416, 1979.

- Laurent, P.; Hobe, H.; Dunel, S. The role of enviromental sodium chloride relative to calcium in gill morphology of freshwater salmonid fish. **Cell Tis. Res.**, **240**: 675-692, 1985.
- Manica, A. Filial cannibalism in teleost fish. **Biol. Rev.** **77**: 261 – 277, 2002.
- Sabóia, S. M. T.& Ferri- P.H.-M; Estudo da biologia e das glicosaminaglicanas nas brânquias do guaru *P. vivipara* (Pisces - Poeciliidae) **Anais da Sociedade Nordestina de Zoologia Supl.A**: 21-31,1987.
- Sabóia-Morais, S. M. T.; Hernandez-Blazquez, F.J.; Mota, D.L.; Bittencourt, A.M. Mucous cell types in the branchial epithelium of the euryaline fish *Poecilia vivipara*. **J. Fish. Biol.** **49**: 545-548, 1996.
- Sabóia-Morais, S.M.T.; Menezes, J.S; Morais, J.O R.; Watanabe, I.; Yamada, A.T. Glycoconjugates superficial in the epithelium of gills of *Poecilia vivipara* under effects of water salinity variations. **Proceedings in: VII International Fish Biology Congress**, St. John – Canadá; 194-195, 2006.
- Sabóia-Morais, S.M.T. Detection of paraneuronal cells in guppy (*Poecilia vivipara*) gill filament epithelium determined by histochemistry and transmission electron microscopy. **Revista de Biol. Neotropical**, **4**: 25-32, 2006 .
- Vigário, A.F. ; Sabóia-Morais, S.M.T. ; Yamada, A.T. **Toxic Action of the 2,4-D herbicide on gills epithelium and liver of the fish *Poecilia vivipara*. Proceedings in: VII International Fish Biology Congress, St. John – Canadá; 84-88, 2006.**

FONTE DE FINANCIAMENTO: FAPESP; FUNAPE.

¹ Bolsista de iniciação científica. Instituto de Ciências Biológicas – Laboratório de Comportamento Celular, thiagorochabio@hotmail.com

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