

COMPARAÇÃO ENTRE TRÊS FIXADORES HISTOLÓGICOS NA FIXAÇÃO DE PLATELMINTOS (PLANÁRIA)

SANDRA CRISTINA DE SOUZA*
LEANDRO PROCÓPIO ALVES**
EGBERTO MUNIN***
MIGUEL ANGEL CASTILLO SALGADO****

* mestranda em Engenharia Biomédica pelo Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento (IP&D) da Universidade do Vale do Paraíba (UNIVAP). Endereço: Av. Amaury Teixeira Vasques nº 40, Jardim Emília Jacareí, SP - cep: 12321420. E-mail: sandcristina@yahoo.com.br

**graduando em Engenharia Elétrica pela Faculdade de Engenharia Elétrica da Universidade do Vale do Paraíba (UNIVAP), situada na Av. Shishima Hifumi, 2911- cep: 12244-000 - São José dos Campos, São Paulo. E-mail leandro@univap.br

*** Professor Doutor da UNIVAP -Universidade do Vale do Paraíba - situada na Av. Shishima Hifumi, 2911- cep: 12244-000 - São José dos Campos, São Paulo. E-mail: munin@univap.br.

****Professor Doutor Responsável pela Disciplina de Histologia da UNESP – Universidade do Estado de São Paulo- Faculdade de Odontologia “Júlio de Mesquita Filho” situada na AV. Engenheiro Francisco José Longo nº 277- Vila São Dimas – cep. São José dos Campos, São Paulo.

Palavras-chave: planárias, fixadores histológicos, qualidade morfológica

Área do Conhecimento: Engenharias – Engenharia Biomédica

Resumo. A proposta deste estudo foi avaliar a qualidade morfológica e histológica da fixação por três diferentes fixadores histológicos: o formol 10%, o líquido de Bouin e o líquido de Helly. A população foi composta de planárias obtidas de seu habitat natural e mantidas em laboratório em recipientes com água não clorada. Quinze amostras de planárias foram selecionadas de acordo com a sua perfeita morfologia e a fixação histológica foi realizada utilizando três diferentes fixadores, o formol 10%, o líquido de Bouin e o Líquido de Helly. Os cortes histológicos foram obtidos através de procedimento de rotina. Macroscopicamente, obteve-se uma melhor disposição do corpo do animal quando foi utilizado o formol 10% como agente fixador. Observou-se um encurvamento menos acentuado do corpo do animal. Entretanto, o uso do formol 10% não resultou em boa qualidade do corte histológico. Na fixação em líquido de Bouin observou-se um maior encurvamento no momento da fixação, mas nos cortes histológicos foi possível observar estruturas compartimentadas. O líquido de Helly foi o menos satisfatório tanto macroscopicamente quanto microscopicamente. Concluímos que o tipo de fixador influencia na qualidade dos cortes histológicos de planárias, bem como na melhor disposição do corpo do animal no momento da fixação

INTRODUÇÃO

De todos os filos bilaterais, os vermes chatos de vida livre do filo *Platyhelminthes* são considerados há muito tempo os mais primitivos. As planárias constituem um grupo de vermes representantes desse filo, presentes predominantemente em água doce e mar que têm como característica anatômica, o corpo achatado dorsoventralmente e simetria bilateral. Assim, possuem uma região anterior (cabeça) e uma posterior (corpo), além de um dorso e um ventre. O achatamento observado no corpo desses animais caracteriza um aspecto de fita.

Na região anterior estão presentes os ocelos que são estruturas sensíveis à luz, porém não são olhos verdadeiros e, por isso, não formam imagens. Funcionam apenas como um mecanismo fotossensível que informa à planária se o ambiente tem pouca ou muita luz. Na região anterior, estão ainda as aurículas que são estruturas quimiorreceptoras. Na região posterior, na posição mediana ventral, encontra-se um orifício onde se localizam a boca e a faringe que se interiorizam em um tubo digestivo. A alimentação desses animais é a base de larvas de insetos e animais mortos, sendo portanto, animais carnívoros e necrófagos.

As planárias escondem-se na superfície inferior de plantas submersas, rochas e gravetos, apresentando preferência por locais de penumbra e pertencem à classe Turbellaria, ordem Tricladida.

Esses animais desafiam a imaginação científica pela surpreendente capacidade regenerativa de fragmentos amputados de seu corpo (SALO *et al.*, 1984; GREMIGNI *et al.*, 1980; HORI, 1997; PASCOLINI *et al.*, 1984; ITO *et al.*, 2001). Diversas gerações de pesquisadores, em áreas interdisciplinares da ciência, têm encontrado razões para enfrentar os desafios

Os compartimentos teciduais desses animais constituem-se de epiderme ciliada simples em que cada célula possui muitos cílios, uma lâmina basal que se constitui de três elementos estruturais, uma zona eletroluscente, uma camada limitante e uma camada microfibrilar (HORI, 1992). O tecido conjuntivo, chamado parênquima têm células mesenquimais e matriz extracelular. São células mesenquimais, as células de reposição epidérmica que migram do parênquima para a superfície corporal e repõe quaisquer célula epidérmica danificada ou destruída, os neoblastos que são as células totipotentes importantes na cicatrização e na regeneração dos ferimentos, a célula parenquimal fixa que por ser ramificada estabelece contato e se interpõe com outras células e tecidos, as células pigmentares parenquimais presentes em algumas planárias e os cromatóforos que podem fazer com que o animal clareie quando o pigmento no cromatóforo concentra-se em direção ao núcleo.

O tecido muscular consiste de camadas longitudinais e circulares sendo de fibras lisas. As células glandulares encontram-se geralmente submersas no interior ou abaixo das camadas musculares, com somente o colo da glândula penetrando na epiderme ou na gastroderme. Rabdóides são secreções em forma de bastão limitado por membrana que são liberados na superfície do corpo do animal onde incham e se dissolvem para formar muco, o tipo mais comum de rabdóide é o rabdito.

A parede do intestino tem camada única e é composta de células fagocitárias e glandulares. As planárias têm um intestino composto de três ramos principais, um anterior e dois posteriores. Cada um desses ramos porém, têm muitos divertículos laterais.

Uma tendência evolutiva comum dentro do sistema nervoso da classe Turbellaria é a saída da rede nervosa em

direção a uma concentração de nervos no interior de um cérebro bilateral bem desenvolvido e de dois cordões nervosos longitudinais ventrolaterais, como ocorre na planária *Dugesia*. Embora, a *Dugesia* retenha uma rede nervosa periférica, os cordões longitudinais reúnem-se em intervalos regulares por meio de comissuras transversais que, junto com os cordões, dão ao sistema nervoso uma aparência segmentada e semelhante a uma escada. Nos gânglios cerebrais encontram-se presentes neurônios típicos.

Para SILVA et al.,1997 a fixação dos Turbelários muitas vezes representa um problema nas pesquisas que necessitem preparar estes animais para estudos taxonômicos ou para trabalho histológico.

A proposta deste estudo foi avaliar a qualidade morfológica e histológica da fixação por três diferentes fixadores histológicos, o formol 10%, o líquido de Bouin e o líquido de Helly..

METODOLOGIA

A população foi composta de planárias obtidas de seu habitat natural e mantidas em recipientes plásticos com água não clorada sendo alimentadas de uma a duas vezes por semana com fígado bovino. A temperatura do laboratório variou entre 19 e 21° C.

Quinze amostras de planárias foram selecionadas de acordo com a sua perfeita morfologia, utilizando para isso um microscópio estereoscópico com magnificação de 10x e 30x.

A fixação foi realizada em placa de petri com o uso de pincéis pelo de marta nº 0 para a manipulação das amostras. Três diferentes fixadores foram utilizados, o formol 10%, o líquido de Bouin e o líquido de Helly. Os animais foram mergulhados diretamente sem recurso anestésico para que se pudesse avaliar apenas o efeito dos fixadores e deixados por um período de 24 horas.

Para os procedimentos de desidratação e diafanização foi realizada lavagem com água corrente para remoção do fixador e banhos em ordem crescente de álcool (75%, 95%, 100%) por quinze minutos cada banho. Retirado o álcool, realizou-se o banho em xilol por 20 minutos, com uma troca após os dez primeiros minutos.

A impregnação foi realizada por parafina PARAPLAST® por 3 horas e em seguida, as amostras foram incluídas em blocos de parafina.

Os cortes foram realizados em micrótomo MICROM HM 325 com espessura de 5µm, colocados em lâminas histológicas e corados com Hematoxilina-Eosina (HE).

RESULTADOS

Para a fixação no formol 10%, macroscopicamente, obteve-se uma melhor disposição do corpo do animal sem um encurvamento acentuado, tanto no sentido antero-posterior quanto no latero-lateral. Embora, histologicamente, as células aparecessem mais dispersas e a matriz extracelular apresentasse um aspecto grumoso, não sendo possível observar compartimentos estruturais.

Na fixação em líquido de Bouin, observou-se um maior encurvamento, mais acentuadamente no sentido antero-posterior. Microscopicamente, nos cortes histológicos foi possível observar estruturas compartimentadas como camadas musculares, pigmentos celulares, cílios e trabéculas de músculos dorso-ventrais.

O líquido de Helly foi o menos satisfatório tanto macroscopicamente quanto microscopicamente, observamos que no momento da fixação ocorre intensa contração do animal e os cortes histológicos apresentam células apinhadas e estruturas distintamente retraídas.

Na figura 1a observamos macroscopicamente a fixação pelo formol com melhor disposição corporal e encurvamento pouco pronunciado, embora nas figuras 1b e 1c, o corte histológico presente não boa qualidade estrutural.

Na figura 2a , o encurvamento antero-posterior é mais acentuado, porém os cortes histológicos aparecem mais distintamente definidos em estruturas.

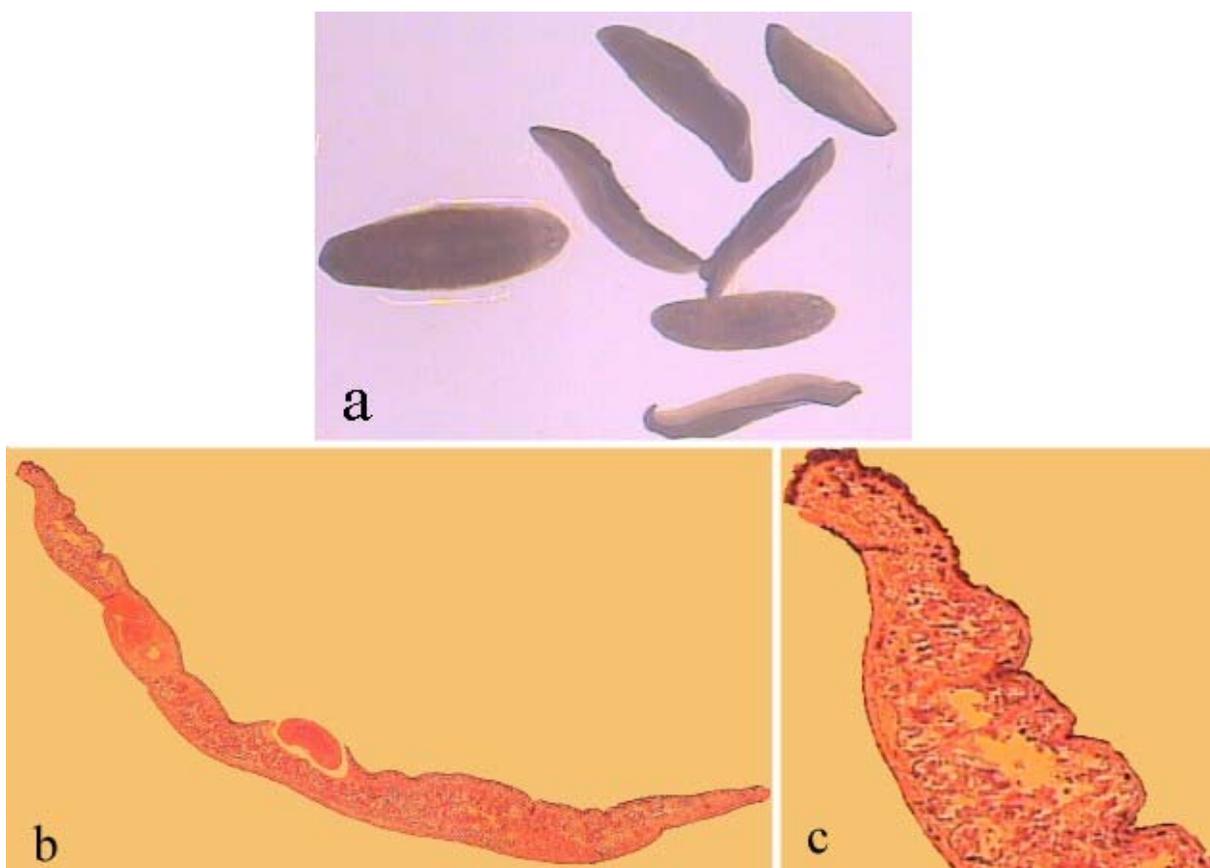


Figura1. Em a) está o aspecto macroscópico da fixação em formol e em b) o aspecto microscópico em corte longitudinal corado em HE com aumento de 400x. Em c) o corte em detalhe.

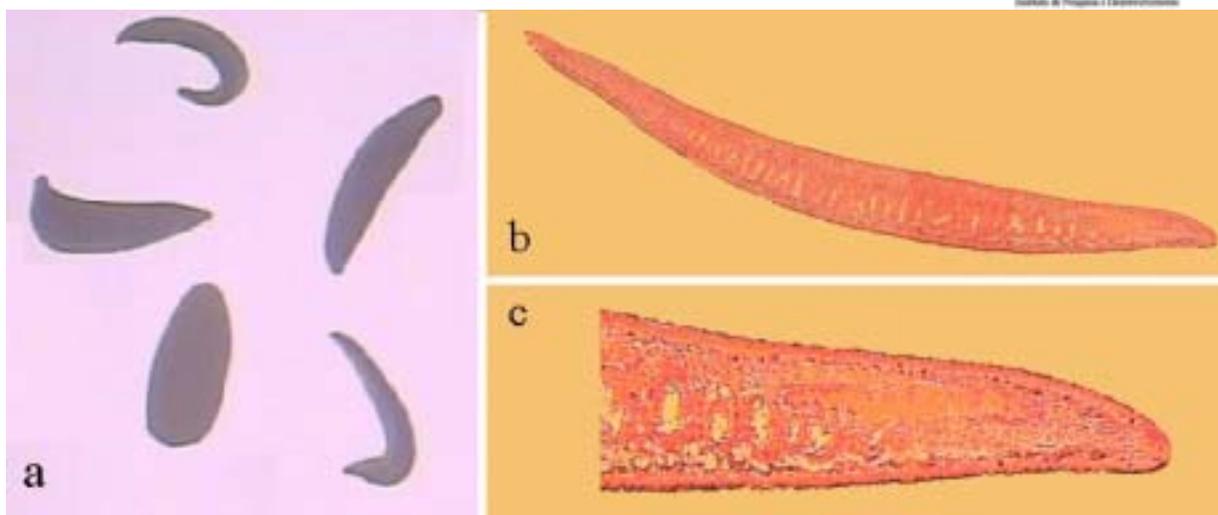


Figura 2. Em a) observa-se o encurvamento antero-posterior na fixação pelo líquido de Bouin e em b) a melhor qualidade estrutural do corte longitudinal (aumento de 400x). Em c) o corte em detalhe.

O líquido de Helly apresentou acentuada contração do corpo dos animais, como mostrado na figura 3a, bem como intensa retração dos tecidos com destruição de estruturas (3b).

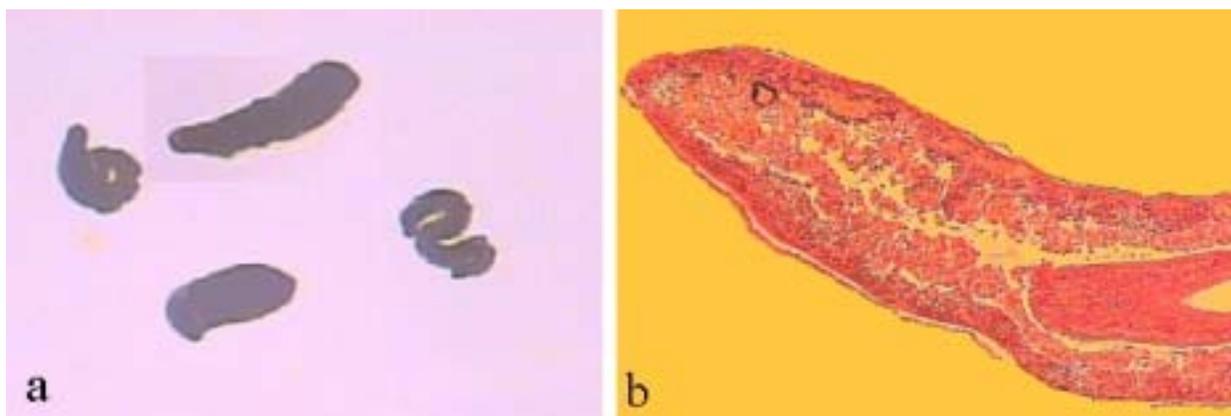


Figura 3. Em a) observa-se a contração acentuada dos animais e em b) o corte histológico retraído com destruição estrutural, descolamento da epiderme e células apinhadas. (aumento de 400x).

resultados insatisfatórios em pesquisas que necessitam de boa definição histológica.

CONCLUSÃO

Concluímos que o tipo de fixador influencia na qualidade dos cortes histológicos de planárias, bem como na melhor disposição do corpo do animal no momento da fixação e isso pode induzir a

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem o apoio financeiro da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, através do projeto no. 2001/12754-2.

BIBLIOGRAFIA

RUPPERT, E. E; BARNES, R. D. **Zoologia dos invertebrados**. São Paulo: Roca,1996. 6ª ed. 1029 p

SILVA, N. M. S.; ZANCHET, A.M.L.; HAUSER, J. Analysis of the efficiency of different solutions for the fixation of *Girardia tigrina* (Turbellaria, Tricladida, Paludicola). **Braz. J. morphol. Sci.** v.14, n.2, jul/dez. 1997.

HORI, I. Localization of Laminin in the Subepidermal Basal Lamina of the Planarian *Dugesia japonica*. **Biol. Bull.** v.183, p. 78-83, August. 1992.

SALO, E.; BAGUNA, J. Regeneration and pattern formation in planarians. The pattern of mitosis in anterior and posterior regeneration in *Dugesia (G) tigrina*, and a new proposal for blastema formation. **J. Embryol Exp Morphol.**, v.83, p.63-80, Oct.1984.

GREMIGNI, V.; MICELI, C.; PUCCINELLI, I. On the role of germ cells in planarian regeneration. I. A karyological investigation. **J. Embryol Exp Morphol.**, v.55, p.53-63, Feb.1980.

HORI, I. Cytological approach to morphogenesis in the planarian blastema. II. The effect of neuropeptides. **J. Submicrosc Cytol Pathol.**, v.29, n.1, p.91-7, Jan.1997.

PASCOLINI, R.; TEI, S.; VAGNETTI, D.; BOND, C. Epidermal cell migration during wound healing in *Dugesia lugubris*. Observations based on scanning electron microscopy and treatment with cytochalasin. **Cell Tissue Res.**, v.236, n.2, p.345-9, 1984.

ITO, H.; SAITO, Y.; WATANABE, K.; ORII, H. Epimorphic regeneration of the distal part of the planarian pharynx. **Dev Genes Evol.**, v.211, n.1, p.2-9, jan.2001.