

A era digital e suas implicações sociais: Desafios e contribuições

ANÁLISE HISTOQUÍMICA DAS BRANQUIAS DE BIVALVES *Brachidontes exustus* DE ANCHIETA, ES

Ezio Henrique da Silva Gomes, Adriane Araújo Braga, Erika Takagi Nunes

Universidade Federal do Espírito Santo, s/n° - Alto Universitário - 29500000 - Alegre-ES, Brasil.
eziohrs@gmail.com, dricrab@yahoo.com.br, erika.nunes@ufes.br.

Resumo

Para aquisição de alimentos, bivalves utilizam de batimentos ciliares e secreção de muco nas brânquias. O muco além de exercer papel importante na captura de alimentos, tem também sido utilizado como biomarcador de poluição. O presente estudo objetivou caracterizar, histoquimicamente, as brânquias de mexilhões *Brachidontes exustus* provenientes de Anchieta, litoral sul do Espírito Santo. Para isso, as brânquias foram dissecadas e submetidas à técnica para inclusão em historesina e submetidas às técnicas histoquímicas de Azul de Bromofenol e Ácido Periódico Schiff (PAS). No epitélio branquial constatou-se a presença de células que secretam mucoproteínas neutras; o vaso hemolinfático é circundado por uma estrutura constituída por polissacarídeos associados a fibras colágenas por onde circulam hemócitos reagentes aos testes histoquímicos. As células e estruturas aqui observadas auxiliam na defesa, alimentação e sustentação mecânica do órgão.

Palavras-chave: Filamentos branquiais. Mexilhão.

Área do Conhecimento: Ciências Biológicas – Morfologia.

Introdução

Brachidontes exustus é um pequeno bivalve epifaunal, com tamanho máximo de 25 mm, que se fixa em substratos rochosos e tem ampla tolerância à salinidade e temperatura (SEED, 1980; WINGARD; STONE; HOLMES, 2001). Esses animais, por serem bivalves marinhos, possuem grande importância para alguns processos ecológicos (RUSSELL-HUNTER, 2013), uma vez que os movimentos ciliares de células branquiais durante a alimentação contribuem para a autopurificação em ecossistemas aquáticos (MORTEZA et al., 2012) por remover o material em suspensão e contaminantes da coluna de água (OSTROUMOV, 2006).

Além dos batimentos ciliares, o muco secretado pelas brânquias dos bivalves também exercem papel importante na captura de alimentos (SZE; LEE, 1995) e tem sido utilizado como biomarcador de poluição. Neste sentido, Tan; Lim (1984) notaram um aumento na produção de muco em mexilhões *Perna viridis* expostos a chumbo assim como David; Fontanetti (2009) que observaram aumento em número de células mucosas em mexilhões *Mytella falcata* provenientes de uma região poluída.

Perante a importância desse órgão para alimentação e defesa, este estudo objetivou caracterizar, histoquimicamente, as brânquias de mexilhões *B. exustus* provenientes de Anchieta, litoral sul do Espírito Santo, para verificar a atividade das células produtoras de proteínas e polissacarídeos.

Metodologia

As coletas do material biológico ocorreram durante a primavera do ano de 2020, no município de Anchieta, litoral sul do Espírito Santo (Fig. 1), durante maré baixa (0,0) e dentro de um transecto de 20 metros. Os mexilhões foram retirados do costão rochoso com uma espátula, e acondicionados em baldes com água do mar e transportados para o Laboratório de Morfologia Animal do Centro de Ciências Exatas, Naturais e da Saúde da Universidade Federal do Espírito Santo (CCENS/UFES). As brânquias de vinte indivíduos foram dissecadas e fixadas em formol 10% tamponado para análises morfológicas e histoquímicas.

Seguindo a rotina de preparação histológica para inclusão em historesina (Leica Historesin), o material foi desidratado, por 30 minutos, em soluções crescentes de álcool (70-95%) e submetido à resina de embebição por 24 horas. Posteriormente, foi incluído em moldes contendo resina com

A era digital e suas implicações sociais: Desafios e contribuições

catalisador e, após a polimerização dos blocos, foi seccionado com espessura de 4 μm em micrótomo manual (Lupetec MRP 09) com navalha de carboneto de tungstênio Leica. As secções foram coletadas em lâminas de vidro e submetidos às seguintes técnicas:

Azul de Bromofenol para detecção de proteínas (PEARSE, 1985):

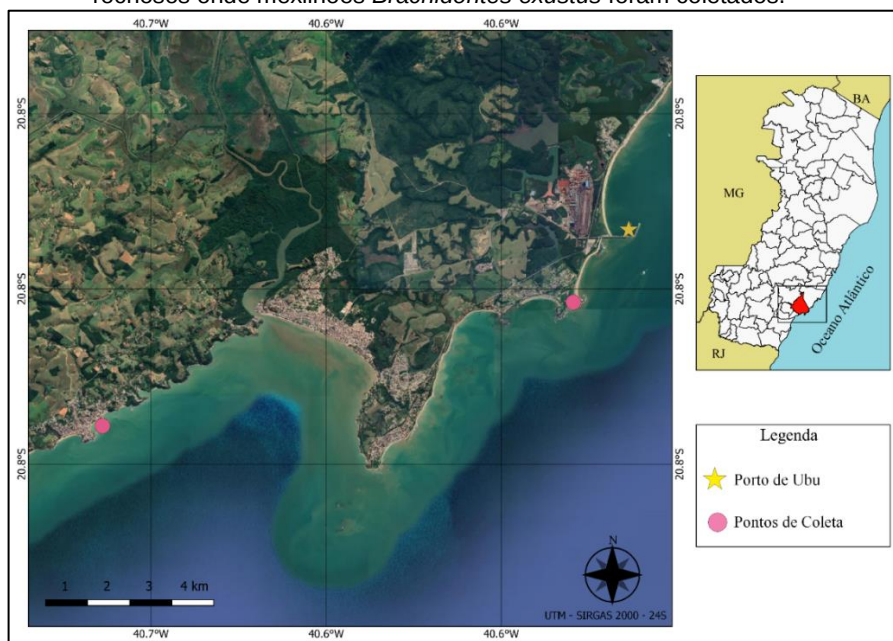
As lâminas permaneceram no Azul de Bromofenol durante 2 horas, em temperatura ambiente. Em seguida, foram lavadas com ácido acético 0,5% por 5 minutos e, posteriormente, em água corrente por 15 minutos.

Ácido Periódico Schiff (PAS) para detecção de polissacarídeos (JUNQUEIRA; JUNQUEIRA, 1983):

As lâminas foram colocadas em ácido periódico 1% durante 10 minutos, lavadas em água destilada e, em seguida, mantidas no reagente de Schiff por uma hora e meia, no escuro. Posteriormente, as lâminas foram lavadas em água corrente por 10 minutos.

Em ambas as técnicas, após secagem, as lâminas foram montadas em bálsamo do Canadá e analisadas sob microscópio de luz Leica DM750 equipado com câmera fotográfica Leica ICC50 HD acoplada ao computador e fotodocumentadas utilizando o software LAZ EZ 3.0 Leica.

Figura 1- Área de estudo no Município de Anchieta, Espírito Santo. Os pontos em rosa indicam os costões rochosos onde mexilhões *Brachidontes exustus* foram coletados.



Fonte: Autor, 2021.

Resultados

Na zona frontal dos filamentos branquiais, a célula pós laterofrontal (CPL), não ciliada, apresentou fraca reação ao PAS (Fig. 2A)

Na zona lateral dos filamentos branquiais encontram-se células glandulares com inúmeros grânulos que, segundo as análises histoquímicas, demonstraram caráter misto, pois foram evidenciadas por ambos Azul de Bromofenol e PAS (Fig. 2C, D, E, F). Entretanto, *B. exustus* parece conter mais um tipo de célula secretora no epitélio da zona lateral, a célula secretora tipo 2, com grânulos fracamente reagente ao Azul de Bromofenol e negativo ao PAS (Fig. 2E) (Tabela 1).

No epitélio da zona abfrontal foi possível visualização do rompimento da membrana plasmática de algumas células, com liberação dos grânulos serosos marcados pelo Azul de Bromofenol (Fig. 2B).

O epitélio branquial repousa sobre uma camada espessa, a base fibrosa, fracamente evidenciada pelo PAS (Fig. 2C, F).

A era digital e suas implicações sociais: Desafios e contribuições

As células epiteliais e a base fibrosa recobrem o vaso hemolinfático, em cujo lúmen é frequente a visualização de hemócitos com citoplasma contendo grânulos (granulócitos) ou não (agranulócitos), sendo os granulócitos maiores e com grânulos marcados pelos testes aplicados (Fig. 2B, E, F). Células endoteliais que revestem esse vaso foram por vezes fortemente evidenciadas pelo PAS (Fig. 2A, C).

As reações das estruturas branquiais aos testes histoquímicos são mostradas na tabela 1.

Figura 2 - Secções histológicas dos filamentos branquiais de *B. exustus* submetidas ao Ácido periódico Schiff (PAS) e Azul de Bromofenol. **A-** Note as células pós laterofrontal (CPL) e uma endotelial (EN) positiva para PAS. **B-** Observe o rompimento da membrana e liberação de grânulos serosos das células da zona abfrontal (cabeças de seta). **C-F-** Destaque as células glandulares mistas (GL) na zona lateral, os granulócitos (GR) e a base fibrosa (BF) reagindo positivamente aos testes histoquímicos. T2- Célula secretora tipo 2. Fonte: Autor (2020).

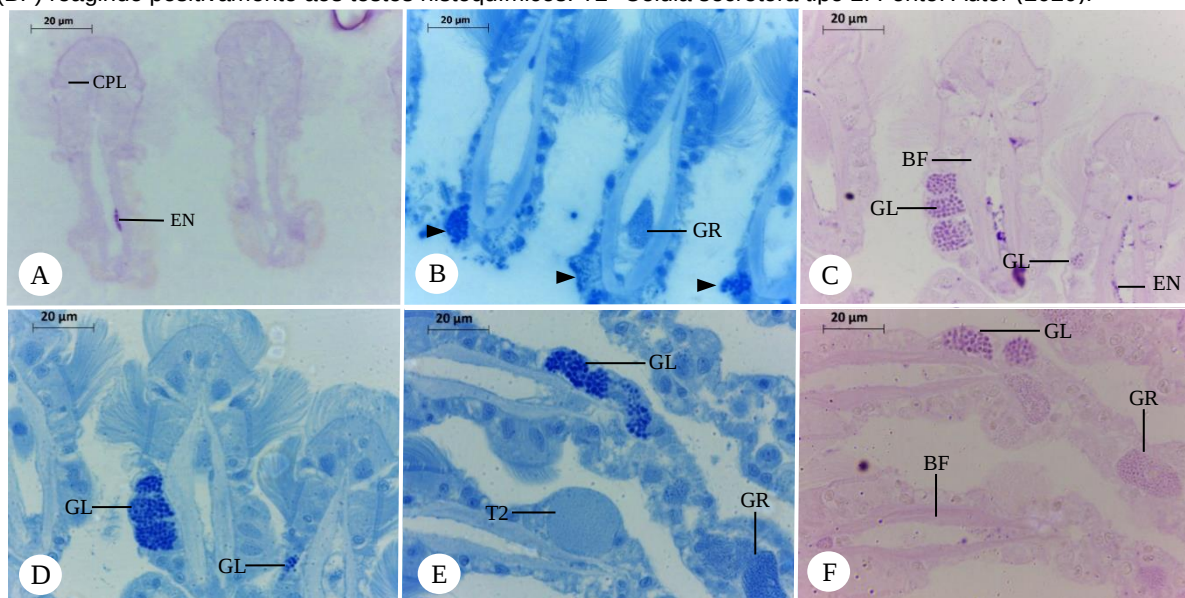


Tabela 1 - Reação, aos testes histoquímicos, das diferentes estruturas presentes nos filamentos branquiais de *B. exustus* provenientes de Anchieta, litoral sul do Espírito Santo. Fonte: o autor.

Zona/ Estrutura	Tipos Celulares	Ácido Periódico Schiff (PAS)	Azul de Bromofenol
Zona Frontal	Pós laterofrontal	+	-
Zona Lateral	Glandular mista	+++	+++
Zona Abfrontal	Glandular tipo 2	-	+
	Serosa	-	+++
	Célula endotelial	++ (citoplasma)	-
	Granulócito	++	++
	Agranulócito	-	-
Base fibrosa		+	-

Legenda: (-) negativa; (+) fraca reação; (++) moderada reação; (+++) intensa reação.

Discussão

A zona frontal em *B. exustus* apresentou somente um tipo celular aciliado, a célula pós laterofrontal, que teve fraca marcação para mucopolissacarídeo neutro (PAS). Nos estudos de Gómez-Mendikute et al. (2005) com *Mytilis galloprovincialis*, essas células foram evidenciadas pelo Azul de Alcian indicando,

A era digital e suas implicações sociais: Desafios e contribuições

portanto, serem predominantemente secretoras de mucopolissacarídeos ácidos. David, Salaroli, Fontanetti (2007) atribuem a essa célula a função de absorção de material do meio externo, devido a presença de microvilosidades e vesículas de pinocitose.

As células secretoras foram encontradas majoritariamente na zona lateral do filamento branquial, identificadas como células que produzem uma secreção mista, sendo evidenciadas pelo PAS e Azul de Bromofenol, corroborando com o observado em outros estudos (BENINGER et al., 1993; BENINGER; ST-JEAN, 1997; DUFOUR; BENINGER, 2001).

Com relação ao muco secretado, esse tem um papel importante no transporte de partículas - podendo ser este para ingestão como para rejeição- e na lubrificação do epitélio branquial, assim, reduzindo a fricção da água (BENINGER et al., 1993; BENINGER; ST-JEAN, 1997; DUFOUR; BENINGER, 2001), além também de prevenir a perda de água quando esses animais estão expostos ao ar (SZE; LEE, 1995). Ademais, essas secreções tem importante papel nos processos de digestão, uma vez que o muco agrupa as partículas e os grânulos proteicos de modo a auxiliar na digestão enzimática do alimento antes de chegar à boca do mexilhão.

A secreção de moléculas que neutralizam possíveis patógenos também pode ser uma das funções dos grânulos proteicos. Owen; McCrae (1976) observaram que as células mistas em *Chlamys varia* não eram evidenciadas pelo PAS e Azul de Bromofenol -que sugerira ser mucopolissacarídeo ácido - porém as de *Ostrea edulis* mostram ser, assim como neste estudo, uma mucoproteína neutra.

Em análises ultraestruturais, Bigas, Durfort, Poquet (2001) identificaram mais de um tipo de célula secretora nas brânquias de *O. edulis*, entretanto essas localizavam-se na zona frontal do filamento branquial. Neste estudo, mais de um tipo de célula secretora na zona lateral foi identificada: a célula secretora tipo 2. Esta diferiu das células mistas em composição e tamanho dos grânulos, contudo, não se descarta a possibilidade de serem o mesmo tipo celular, em diferentes fases de síntese e/ou liberação granular. Nogarol et al. (2016) encontraram células secretoras nessa zona evidenciadas pelo Azul de Alcian com especificidade para mucinas ácidas. Portanto são necessários realizar mais testes histoquímicos para melhor entendimento sobre as funções e propriedades químicas da secreção eliminada por este tipo celular da brânquia de *B. exustus*.

Poucos autores discutem a composição da base fibrosa; Peck (1877) descreve essa estrutura como constituída por quitina. Nogarol et al. (2016), ao submeter os filamentos branquiais de *Diplodon expanseus* à histoquímica, identificaram fibras colágeno e cálcio nessa estrutura. A fraca reação desta base ao PAS aqui observada, bem como a presença de elementos fibrosos, corroboram com os estudos de David, Salaroli, Fontanetti (2007) com brânquias de *Mytella falcata*, indicando que a base é constituída por polissacarídeos associados a fibras colágenas.

Algumas células endoteliais apareceram intensamente coradas ao PAS, podendo ser explicadas pelo fato de que moléculas existentes no meio extracelular adentram o citoplasma pela formação de vesículas de pinocitose. Nos epitélios simples pavimentosos que revestem os capilares sanguíneos e linfáticos (endotélio), essa atividade ocorre de forma intensa para transportar moléculas entre o vaso e seu tecido conjuntivo subjacente ou sentido contrário (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2013).

Os granulócitos foram marcados moderadamente pelo Azul de Bromofenol e PAS. David, Salaroli, Fontanetti (2007) retratam que os hemócitos fazem fagocitose para renovação do epitélio e para isso atravessam o vaso da hemolinfa e alcançam o tecido. Apesar desses autores tratarem este como um processo fisiológico, Sunila (1988) aponta ser mecanismos de defesa contra poluentes. Os grânulos proteicos dos granulócitos além de exercer funções na defesa, podem também conter proteases e collagenases que auxiliariam no rompimento da base fibrosa para assim atingirem o epitélio.

Conclusão

As análises histoquímicas apontaram estruturas e células nos filamentos branquiais de *B. exustus* com diferentes composições químicas e até caráter misto, dentre elas células secretoras da zona lateral e abfrontal, hemócitos, células endoteliais e tecido conjuntivo- base fibrosa, nas quais exercem funções vitais no órgão, como a aquisição e digestão de alimentos, defesa do organismo e sustentação.

Referências

BENINGER, P. G., ST-JEAN, S. D. The role of mucus in particle processing by suspension-feeding marine bivalves: unifying principles. **Marine Biology**, v. 129. p. 389-397, 1997.

A era digital e suas implicações sociais: Desafios e contribuições

BENINGER, P. G., ST-JEAN, S. D., POUSSART, Y., WARD, J. E. Gill function and mucocyte distribution in *Placopecten magellanicus* and *Mytilus edulis* (Mollusca: Bivalvia): the role of mucus in particle transport. **Marine Ecology Progress Series**, v. 98. p. 275-282, 1993.

BIGAS, M.; DURFORT, M.; POQUET, M. Cytological effects of experimental exposure to Hg on the gill epithelium of the European flat oyster *Ostrea edulis*: ultrastructural and quantitative changes related to bioaccumulation. **Tissue and Cell**, v. 33, n. 2, p. 178-188, 2001.

DAVID, J. A. O.; SALAROLI, R. B.; FONTANETTI, C. S. Fine structure of *Mytella falcata* (Bivalvia) gill filaments. **Micron**, v. 39, n. 3, p. 329-336, 2007.

DAVID, J. A. O.; FONTANETTI, C. S. The Role of Mucus in *Mytella falcata* (Orbigny 1842) gills from polluted environments. **Water, air, and soil pollution**, v. 203, n. 1, p. 261-266, 2009.

DUFOUR, S. C.; BENINGER, P. G. A functional interpretation of cilia and mucocyte distributions on the abfrontal surface of bivalve gills. *Marine Biology*, v. 138, n. 2, p. 295-309, 2001. BENINGER, P. G., ST-JEAN, S. D. The role of mucus in particle processing by suspension-feeding marine bivalves: unifying principles. **Marine Biology**, v. 129. p. 389-397, 1997.

GÓMEZ-MENDIKUTE, A.; ELIZONDO, M.; VENIER, P.; CAJARAVILLE, M. P. Characterization of mussel gill cells in vivo and in vitro. **Cell and Tissue Research**, v. 321, n. 1, p. 131-140, 2005.

JUNQUEIRA, L. C. U.; JUNQUEIRA, L. M. M. S. **Técnicas básicas de citologia e histologia**. São Paulo: Editora Santos, 1983.

JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. **Histologia Básica**. 12.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2013, 556p.

MORTEZA, F.; MASNAVI, M. R.; KHALIGHI, N. Use of Natural Purification of Water Cycle and Water Management as a solution towards Ecodesign. **Design for Innovative Value Towards a Sustainable Society**. Springer, Dordrecht, p. 33-37, 2012.

NOGAROL, L. R.; BROSSI-GARCIA, A. L.; SOUZA, R. B.; FONTANETTI, C. S. Histopathological effects of the herbicide atrazine on gills of the Brazilian endemic bivalve *Diplodon expansus*. **International Journal of Environmental Analytical Chemistry**, v. 96, n. 4, p. 387-403, 2016.

OSTROUMOV, S. A. **Biological effects of surfactants**. CRC Press, 2006.

OWEN, G.; MCCRAE, J. M. Further studies on the latero-frontal tracts of bivalves. Proceedings of the Royal Society of London. **Series B. Biological Sciences**, v. 194, n. 1117, p. 527-544, 1976.

PEARSE, A. G. E. **Histochemical: Theoretical and applied**. Churchill, London, 1985.

PECK, F. L. S. The minute structure of the gills of lamellibranch mollusca. **Quarterly Journal of Microscopic Sciences**, v.65, p.43-66, 1877.

RUSSELL-HUNTER, W. D. Overview: Planetary Distribution of and Ecological Constraints upon the Mollusca. **Ecology**, 2013.

SEED, R. A note on the relationship between shell shape and life habits in *Geukensia demissa* and *Brachidontes exustus* (Mollusca: Bivalvia). **Journal of Molluscan Studies**, v. 46, p. 293-299, 1980.

SUNILA, I. Acute histological responses of the gill of the mussel, *Mytilus edulis*, to exposure by environmental pollutants. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 52, n. 1, p. 137-141, 1988.

A era digital e suas implicações sociais: Desafios e contribuições

SZE, P. W. C.; LEE, S. Y. The potential role of mucus in the depuration of copper from the mussels *Perna viridis* (L.) and *Septifer virgatus* (Wiegmann). **Marine Pollution Bulletin**, v. 31, n. 4-12, p. 390-393, 1995.

TAN, W. H.; LIM, L. H. The tolerance to and uptake of lead in the green mussel, *Perna viridis* (L.). **Aquaculture**, v. 42, n. 3-4, p. 317-332, 1984.

WINGARD, G. L.; STONER, J. D.; HOLMES, C. W. Molluscan faunal distribution in Florida Bay, past and present: an integration of down-core and modern data. **Bulletins of American Paleontology**, v. 361, 2001.