

**Similaridades na estrutura e composição de grânulos
intracitoplasmáticos presentes nos hepatócitos e agregados
macrofágicos de peixes teleósteos**

**RIBEIRO, H.J.¹; MORO, L.^{2(*)}; PROCÓPIO, M. S.³; RIZZO, E.²; SATO, Y.⁴;
BALZUWEIT, K.⁴; CHIARINI-GARCIA, H.⁵; CORRÊA-JÚNIOR, J.D.²**

1- Doutorando em Biologia Celular - Departamento de Morfologia - ICB/UFMG;
2- Professor Adjunto ICB/UFMG; 3- Iniciação Científica ICB/UFMG; 4- Biólogo,
Doutor – CODEVASF; 5- Professor Associado - ICB/UFMG.

Endereço para correspondência: correajr@icb.ufmg.br

RESUMO: Grânulos intracitoplasmáticos (GI) ocorrem em organismos de todos os níveis tróficos. A formação dessas estruturas está associada aos processos de manutenção da homeostase nos organismos. No fígado de peixes teleósteos, alguns autores têm descrito a ocorrência de IG em hepatócitos e em agregados macrofágicos (AM), entretanto estudos sobre a relação entre a ocorrência e a composição destas estruturas nesses tipos celulares são raros na literatura. Neste trabalho analisamos os GI de fêmeas de *Prochilodus argenteus* em repouso gonadal por técnicas de microscopia de luz e eletrônica. Foram analisados materiais processados para histologia de rotina, Hematoxilina-Eosina (HE) e histoquímicas (Perls e von Kossa), microscopias eletrônicas de transmissão (MET) e varredura (MEV) e microscopias analíticas com a detecção de elétrons retro-espalhados (BE) e raios-x (EDXA). Em cortes de fígado corados por HE e técnicas histoquímicas, os GI presentes nos hepatócitos e nos AM apresentaram estrutura circular contendo depósitos de hemossiderina, lipofuscina e cálcio. Os dados ultra-estruturais evidenciaram que os GI possuem sub-compartimentos contendo produtos de degradação celular, floculados elétron-densos similares à ferritina e agregados de bicamadas lipídicas. As regiões com maior elétron-densidade determinadas pela detecção de BE mostraram ser compostas principalmente por ferro, fósforo e cálcio conforme demonstrado pelos espectros obtidos pela EDXA. Esses resultados sugerem que os GI do fígado de *P. argenteus* possuem dinâmica metabólica similar em ambos os tipos celulares, entretanto diferenças na distribuição nos domínios desses grânulos podem ser um indicativo de que essas estruturas possuam funções metabólicas distintas.

Palavras-chave: Grânulos intracitoplasmáticos, *Prochilodus argenteus*, fígado, histoquímica, MET, MEV, EDXA.

INTRODUÇÃO: Grânulos intracelulares (GI) ocorrem em organismos em todos os níveis tróficos sendo estruturas relacionadas aos processos metabólicos de armazenagem, retenção, transporte e detoxificação. Esses grânulos podem ter sua origem mediada por vias anabólicas e/ou catabólicas (GEORGE, 1982; TAYLOR & SIMKISS, 1989). No fígado de peixes teleósteos, alguns autores têm demonstrando a maior ocorrência de GI em hepatócitos e em agregados de macrófagos (AM), associando-os ao sucesso reprodutivo, exposição metálica e exposição a agentes patogênicos (ROCHA et al., 2003, RABITTO et al., 2005). Adicionalmente os GI possuem afinidades seletivas a uma série de elementos metálicos já tendo sido utilizados no estudo de exposição de organismos de diferentes grupos filéticos a xenobióticos no meio ambiente.

(TAYLOR & SIMKISS, 1989; CORRÊA-JUNIOR et al., 2003). Na região à jusante da represa de Três Marias, a literatura relata que o insucesso reprodutivo da espécie *Prochilodus argenteus* ocorre em função das condições ambientais desfavoráveis (SATO et al., 2005). Essa espécie de alta importância ecológica representa 50% de todo o pescado na região da represa de Três Marias-MG (NAKATANI et al., 2001). Todavia, o conhecimento quanto à composição e dinâmica dos GI em teleósteos, bem como suas potenciais utilizações como elementos adjuvantes na avaliação da qualidade ambiental é escasso. Assim, o objetivo desse estudo foi a caracterização estrutural e composicional dos grânulos através das microscopias: de luz, eletrônica de rotina e analítica.

MATERIAIS E MÉTODOS: Espécimes medindo $37,86 \pm 0,8$ foram capturados com o auxílio de tarrafas à jusante da barragem de Três Marias na cidade de Três Marias – MG. Esses foram sacrificados via transecção cranial e dissecados para a obtenção de fragmentos hepáticos. Partes das amostras foram destinadas ao processamento de microscopia de luz (ML) e microscopia eletrônica de varredura (MEV) e outra parte foi processada para microscopia eletrônica de transmissão (MET). Para o processamento em ML os fragmentos hepáticos obtidos foram imediatamente fixados por imersão em líquido de Bouin por 24 horas. Após esse período foram desidratados em concentrações crescentes de etanol, impregnados e incluídos em parafina. Os blocos foram seccionados a $6\mu\text{m}$ de espessura. Um conjunto dos cortes obtidos foram corados pelos seguintes métodos: a) Hematoxilina-Eosina (HE); b) Perls; c) von Kossa. Para MEV outro conjunto de cortes foi posicionado sobre lamínulas de vidro ou sobre lamínula de carbono (Termanox®), desparafinado, desidratado e metalizado com carbono (JUNDT et al., 1974). Essas amostras foram analisadas por elétrons retro-espalhados (BE) e micro análise de raio-x (EDXA) utilizando-se da micro sonda Jeol 8900. Para MET os fragmentos foram fixados em Karnovsky em tampão cacodilato de sódio pH 7,4 e 0,1 M. Após fixação foram lavados no mesmo tampão e pós-fixados em tetróxido de ósmio a 1%. Após lavagem no mesmo tampão, os espécimes foram desidratados em concentrações crescentes de acetona e emblocados em resina Polybed 812. Os blocos foram piramidados e seccionados obtendo-se cortes ultrafinos com 80 nm de espessura que foram contrastados com soluções de acetato de uranila e citrato de chumbo, observados e fotografados ao microscópio eletrônico de transmissão Zeiss-EM10 a 80 keV.

RESULTADOS E DISCUSSÃO: De modo geral, os hepatócitos de *P. argenteus* apresentaram grânulos intracitoplasmáticos (GI). Nesses espécimes, os GI não apresentaram afinidade distinta a corantes ácidos ou básicos, revelando uma coloração amarelo-acastanhada característica quando os cortes eram corados por Hematoxilina-Eosina (Fig. 1a) Características de coloração e morfológicas similares também foram observadas nos GI dos agregados macrofágicos (AM, Fig. 1a). Através da histoquímica de Perls constatou-se a presença de hemossiderina e lipofuscina e a de von Kossa evidenciou também o cálcio, (Fig. 1c e 1d). Trabalhos de revisão (WOLKE, 1992; GIUS & ROBERTS, 2003) relataram a ocorrência dessas mesmas substâncias em GI de AM. Ainda assim, não há na literatura nenhum estudo conclusivo sobre a dinâmica de desses GI nem em hepatócitos, nem nos AM. Em cortes oriundos de

fragmentos incluídos em parafina e analisados via BE, confirmou-se a presença dos GI elétrondensos nos hepatócitos e nos macrófagos (Fig. 2a e 2c) e também mostrou-se que há grande concentração de Fé, P e Ca nesses GI. A presença majoritária desses elementos químicos foi confirmada pelos espectros obtidos pela técnica de micro análise de raios-x (Fig. 2b e 2d). Esse resultado sugere um sincronismo metabólico entre os grânulos dos hepatócitos e dos AM. Através da MET, os GI dos hepatócitos e dos AM apresentaram material floculado elétron-denso, material de baixa elétron-densidade além de varias unidades de membranas compactadas, sendo delimitados por membrana (Fig. 3a e 3b). Entretanto, também foram observadas diferenças importantes entre os IG dos hepatócitos e dos AM. Os GI dos hepatócitos apresentaram maior área contendo particulados elétron-densos, enquanto os GI presentes nos AM apresentaram menor elétron-densidade (Fig. 3b e 3d) Esses últimos, eram circundados por várias unidades de membrana. Isso indica que existe uma diferença no processo de fusão das membranas quando comparados ao observado nos GI dos AM. As diferenças estruturais entre os dois tipos de GI sugerem que embora possa haver uma relação metabólica entre os GI dos hepatócitos e dos AM, os mesmos possuem dinâmicas distintas. O conhecimento da dinâmica destes grânulos e sua relação com a condição metabólica dos animais fornecerá subsídios pra futuras aplicações no campo da piscicultura bem como em atividades de monitoramento ambiental.

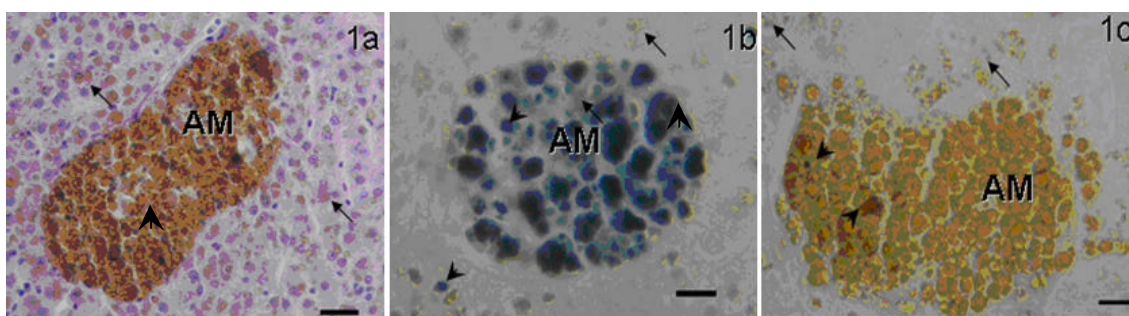


Figura 1. Micrografias do fígado de *Prochilodus argenteus*. Em **a**, secção corada em Hematoxilina-Eosina mostrando o aspecto circular dos grânulos intracitoplasmáticos (GI) dos hepatócitos (seta) e dos agregados macrófagos (AM) (cabeça de seta). Observe em **b**, corte corado pela técnica histoquímica de Perls, evidenciando em azul marcação para hemossiderina (cabeça de seta) em castanho para lipofuscina (seta) presente nos GI dos hepatócitos e GI do AM. Em **C**, note em corte corado pela histoquímica de von Kossa, a marcação para cálcio associados aos GI dos hepatócitos (seta) e os GI dos AM (cabeça de seta). Barra = 11 μ m.

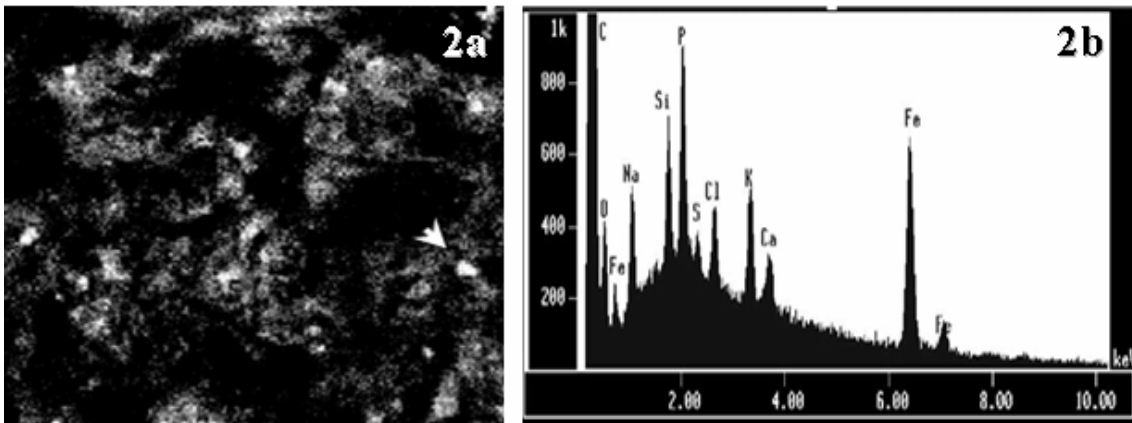
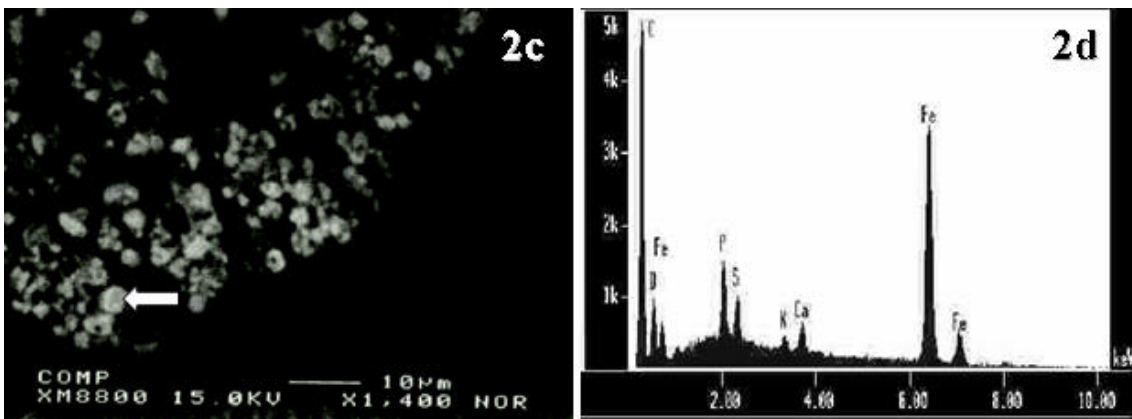


Figura 2. Em **a**, micrografia de elétrons retro-espalhados evidenciando grânulo intracitoplasmático (GI) de hepatócito (cabeça de seta). Note em **b**, espectro gerado pela técnica de microanálise de raios-x de GI mostrado em **a**. Observe picos evidentes de C, O, Fe, Na, Si, P, S, Cl, K, Ca e Fe. Apenas os picos de P, Ca, S e Fe são provenientes do GI os demais são oriundos da lamínula de vidro.



Em **C**, Micrografia gerada por elétrons retro-espalhados mostrando grânulo dentro de agregado macrófago (seta). Observe em **d**, espectro obtido por microanálise de raios-x do grânulo destacado em **c**, evidenciando picos característicos de C, O, Fe, P, S, K, Ca e Fe. Apenas os picos de P, S, Ca e Fe são distintamente provenientes dos GI analisados.

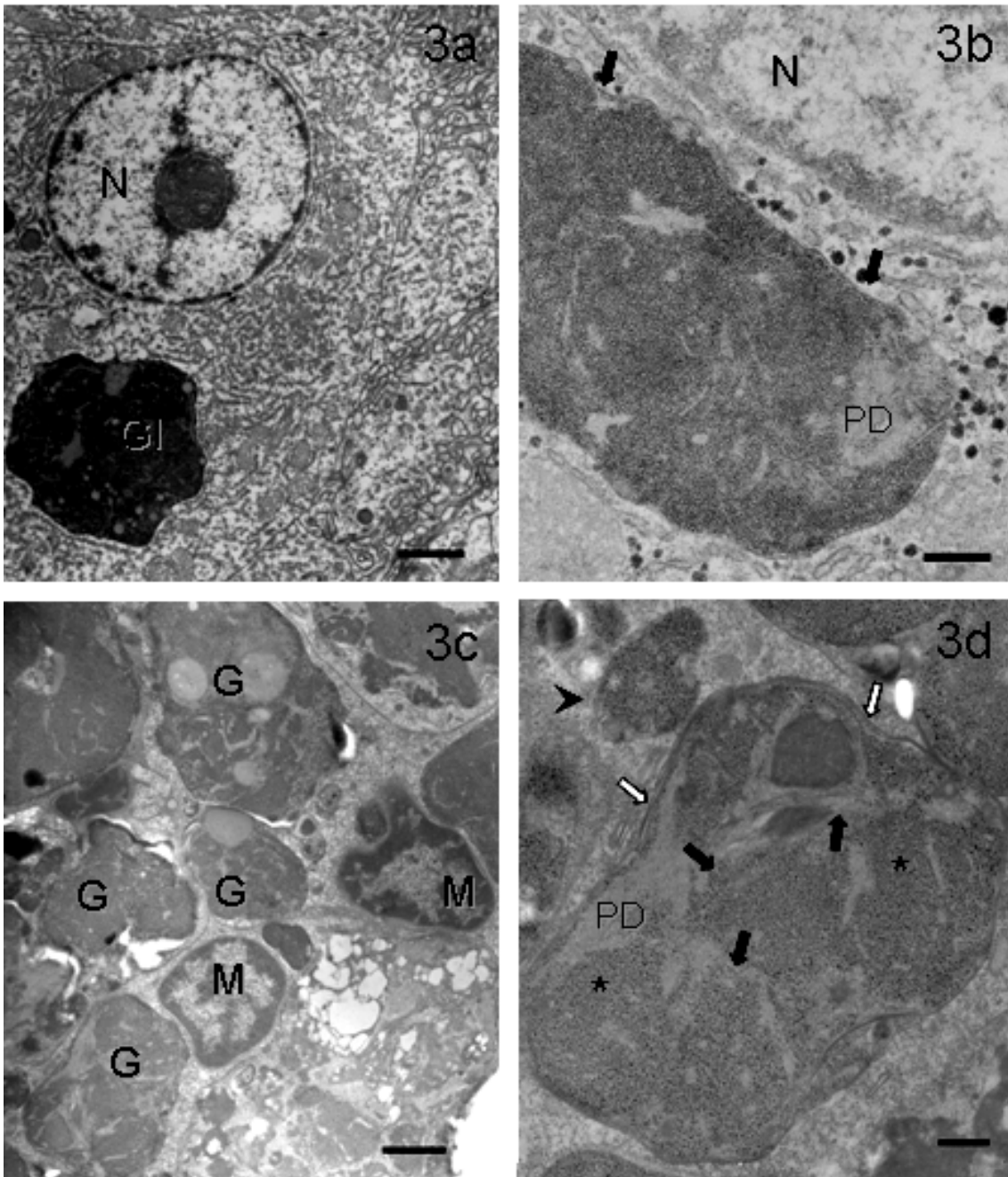


Figura 3. Micrografias eletrônicas de transmissão do fígado de *Prochilodus argenteus*. Em **a**, (GI) próximo ao núcleo hepatócito (N). **b**, Em maior aumento GI envolvidos por unidade de membrana simples (setas) contendo particulados elétron-densos compactados, unidades de membranas e regiões menos elétron-densas (PD). Em **c**, detalhes de agregado macrófágico caracterizado pela presença de núcleos de macrófagos (M) contendo grande número de GI (G). Observar em **d**, detalhe de GI envolvido por várias unidades de membrana (setas brancas). Internamente o GI apresenta grupos de particulados elétron-densos (asteriscos), várias unidades de membranas compactadas (setas pretas) e domínios típicos de áreas contendo produto de degradação (PD). Notar a proximidade de um grânulo de maior elétron-densidade (cabeça de seta). Barra: A e C = 0,4 μ m; B e D = 0,13 μ m.

4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGIUS, C.; ROBERTS, R.J. Melano-macrophage centres and their role in fish pathology. *J. Fish Dis.*, v. 26, p. 499-512, 2003.

CORRÊA JUNIOR, J. D.; ALLODI, S.; FARINA, M., Enzymatic, analytical and structural aspects of electron-dense granules in cells of *Ucides Cordatus* (Crustacea, decapoda) hepatopancreas. *Cell Tissue Res.*, v. 311, 107-116, 2003.

GEORGE, S. G. Subcellular accumulation and detoxication of metals in aquatic animals. In: Vernberg WB, Calabrese A, Thurberg FP, Vernberg FJ (eds) *Physiological mechanisms of marine pollutant toxicity*. Academic, New York, p. 3-52, 1982.

JUNDT, F. C.; PURSER, K. H.; KUBO, H; SCHENK, E. A. Proton-induced x-ray analysis of trace elements in tissue sections. *J. Histochem. Citochem.*, v. 22, p. 1-6. 1974.

NAKATANI, K.; AGOSTINHO, A. A.; BAUMGARTNER, G.; BIALETZKI, A.; SANCHES, P. V.; MAKRAKIS, M. C.; PAVANELLI, C. S. Ovos e larvas de peixes de água doce. *Desenvolvimento e manual e identificação*. Eduem: Maringá, PR, 203-205. 2001.

RABITTO, I.S.; ALVES-COSTA, J.R.M.; SILVA DE ASSIS, H.C.; PELLETIER, É.; AKAISHI, F.M.; ANJOS, A.; RANDI, M.A.F.; OLIVEIRA-RIBEIRO, C.A. Effects of dietary Pb(II) and tributyltin on neotropical fish, *Hoplias malabaricus*: histological and biochemical findings. *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, p. 1-10, 2006.

ROCHA, E; ROCHA, M.J; MONTEIRO, R.A.F. Seasonal changes in fish hepatocytes and correlations with the endocrine system. in: *Fish Adaptations*. Editora, Science Publisher, 384-403, 2003.

SATO, Y.; BAZOLLI, N.; RIZZO, E.; BOSCHI, M.B.; DE MIRANDA, M.O.T. Influence of the river Abaeté in the reproductive success of the neotropical migratory teleost *Prochilodus argenteus* in the São Francisco river, downstream from the Três Marias dam, southeastern Brazil – *River Res. Appl.*, v. 8, 939-950, 2005.

TAYLOR, G. M.; SIMKISS, K. Structural and analytical studies on metal ion-containing granules. In: Mann S, Webb RJ, Williams RJP (eds) *Biom mineralization: chemical and biochemical perspectives*. VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim, p. 427–460, 1989.

WOLKE, R.E. Piscine macrophage aggregates: a review. *Ann. Rev. Fish*, 91-108, 1992.