

Índice mitótico em células epiteliais da brânquia de Guaru (*Poecilia vivipara*) tratados com frações da casca do caule e da folha de Pequi (*Caryocar brasiliensis*)

Mitotic index of epithelia cells in gills of Guppy (*Poecilia vivipara*) exposed to fractions of the leaf and bark of Pequi (*Caryocar brasiliensis*)

MOTTER, M.D.S.¹;
SILVA, L. D.¹;
RODINELLI BORGES-DE-
OLIVEIRA¹;
ÁUREO TATSUMI
YAMADA²;
SANTOS, S.C.³;
SIMONE MARIA TEIXEIRA
SABÓIA-MORAIS¹

1- Laboratório de Comportamento Celular do Instituto de Ciências
Biológicas da Universidade Federal de Goiás, Goiânia - GO
2- Laboratório de Citoquímica e Imunocitoquímica do Instituto de Biologia
da Universidade Estadual de Campinas, Campinas - SP
3- Laboratório de Produtos Naturais do Instituto de Química da
Universidade Federal de Goiás, Goiânia - GO

Resumo

Várias plantas nativas do bioma Cerrado são utilizadas como plantas medicinais. Dentre elas, o pequi possui ação moluscicida utilizada no combate a esquistossomose. Objetivamos neste trabalho a verificação da toxicidade de frações de pequi sobre outros organismos aquáticos, antes da utilização destas em mananciais. Para isso, analisamos alterações no índice mitótico das células epiteliais das brânquias de Guaru (*Poecilia vivipara*) expostas às frações da folha e da casca do caule de pequi extraídas com acetato de etila. Constatamos que nenhuma das frações se mostrou letal aos peixes. Os animais expostos à fração acetato de etila da folha não apresentaram modificações significativas no índice mitótico em relação ao grupo controle, mas os animais expostos à fração acetato de etila da casca do caule apresentaram aumento do índice mitótico das células epiteliais em duas regiões dos filamentos branquiais. Desta forma, a fração acetato de etila da folha poderia ser utilizada como moluscicida em mananciais, enquanto que a fração acetato de etila da casca do caule necessitaria passar por outros testes mais específicos.

Palavras-chave:
Brânquias.
Células epiteliais.
Frações de Pequi.
Índice mitótico.
Toxicidade.

Ccorrespondência para:
SIMONE MARIA TEIXEIRA DE SABÓIA-
MORAIS
Instituto de Ciências Biológicas
Departamento de Morfologia
Laboratório de Comportamento Celular
Universidade Federal de Goiás
Campus - ICB-IV
Caixa Postal 131
74001-970 - Goiânia - GO
saboias@terra.com.br

Recebido para publicação: 29/05/2003
Aprovado para publicação: 18/05/2004

Introdução

A biodiversidade de espécies vegetais do Cerrado é enorme e o potencial de pesquisa científica igualmente vasto. Muitos estudos têm demonstrado que a avaliação da bioatividade de plantas medicinais do Cerrado fornece subsídios para utilizá-las como fármacos pelo homem^{1,25}. Dentre estas espécies encontra-se o pequi, utilizado para alimentação e para tratamento

de várias enfermidades, devido aos seus diferentes efeitos medicinais.^{1,2}

Com o intuito de se averiguar novas possibilidades de utilização das plantas do Cerrado, Bezerra et al.³ verificaram a ação moluscicida dos extratos da folha e casca do caule de pequi. Este estudo teve o propósito de verificar uma possível erradicação da esquistossomose pela eliminação do molusco *Biomphalaria glabrata*, hospedeiro intermediário do parasito

Schistosoma mansoni, causador da esquistossomose. Como resultado encontraram mortalidade de 90% do molusco *Biomphalaria glabrata*, a partir de 12 horas de exposição aos extratos da folha e casca do caule de pequi a uma concentração de 100 ppm. Desta forma, extratos como o da folha e casca do caule de pequi seriam utilizados próximos a mananciais de água, provável nicho ecológico destes moluscos⁴.

Porém, análises laboratoriais complementares se fazem necessárias para verificar a bioatividade destas substâncias frente a outros organismos aquáticos. Agentes tóxicos como este podem promover reações adversas as quais podem ser detectadas por meio de análise morfológica dos tecidos que estejam em contato com eles. Uma das possíveis reações celulares frente a substâncias externas seria o aumento ou a diminuição dos índices proliferativos. Para identificar as respostas do comportamento de proliferação celular foi proposta a averiguação do índice mitótico das células epiteliais da brânquia do guaru tratadas por frações da folha e casca do caule de pequi extraídas com acetato de etila.

O guaru é um teleosteo eurialino que possui grande capacidade adaptativa, tornando-se assim um modelo biológico bastante utilizado para estudos dos efeitos das variações ambientais sobre o organismo do peixe.^{5,6,7,8}

Os caracteres merísticos, morfométricos e anatômicos das estruturas encontradas nas brânquias estão relacionadas com o meio ambiente em que o peixe vive, com o seu hábito alimentar e, possivelmente, com sua posição na escala evolutiva.^{9,10,11,12,13} A importância das brânquias na respiração e na regulação iônica dos peixes tem levado a numerosas investigações sobre os efeitos causados a este órgão resultantes de alterações nos fatores ambientais. Relativa abundância e mudanças na morfologia das células do cloro, hiperplasia das células epiteliais e fusão das lamelas secundárias¹⁴ são algumas das alterações apresentadas por este órgão em resposta a ação de substâncias tóxicas presentes

no meio externo. Por esta razão, foram escolhidas para verificação do índice mitótico, as células epiteliais das brânquias do guaru.

A análise do índice mitótico de células epiteliais de órgãos como brânquias, fígado, rins, trato gastro-intestinal e gônadas é bastante utilizada em estudos de toxicidade aquática.^{15,16,17} Estes parâmetros servem como indícios de proliferação celular nesses órgãos e, conseqüentemente, podem representar o desenvolvimento de tumores a longo prazo nesses órgãos, mesmo quando os animais são expostos a poluentes ambientais em baixas concentrações ou mesmo em espécies aquáticas relativamente insensíveis a poluentes já comprovadamente prejudiciais aos organismos de outros peixes.¹⁸

Materiais e Métodos

Obtenção do material para experimento:

O material botânico foi coletado na cidade de Goiânia (GO), (S16° 34' 24" / W48° 56' 17"; 769m). As frações utilizadas foram obtidas no Laboratório de Produtos Naturais do Instituto de Química da UFG. Para tanto, as folhas foram expostas à temperatura ambiente por 2 a 3 dias para secar, enquanto que a casca do caule foi colocada para secar em estufa a 40°C com ventilação forçada e a moagem do material botânico foi efetuada em moinho de faca com granulação definida. Na seqüência sofreram percolação a frio em etanol 96%, sob agitação. Filtração do sobrenadante e evaporação do solvente à pressão reduzida, conduziu ao extrato bruto etanólico. Parte do extrato bruto foi diluído em água destilada, no funil de separação, e acrescentou-se éter etílico resultando em uma proporção 1:1. Separação por polaridade, conduziu a fração etérea, enquanto que a porção aquosa, livre de graxas e clorofilas, foi transferida para outro funil de separação e acrescentou-se acetato de etila (1:1), o que resultou na fração acetato de etila. Esta fração

foi evaporada, e o resíduo submetido ao congelamento e, finalmente liofilizado.

O ensaio utilizou 15 peixes, de ambos os sexos, adultos, pertencentes à ordem Cyprinodontiforme, família Poeciliidae e espécie *Poecilia vivipara*. Estes 15 animais foram separados em 3 (três) grupos:

Grupo 1: Cinco animais submetidos a água em condição padrão (Grupo Controle) pelo período de 2 horas.

Grupo 2: Cinco animais tratados pela fração acetato de etila da folha de pequi à concentração de 20 ppm*, pelo período de 2 horas.

Grupo 3: Cinco animais tratados pela fração acetato de etila da casca do caule de pequi à concentração de 20 ppm*, pelo período de 2 horas.

*(concentração recomendada pela Organização Mundial de Saúde (OMS) para liberação de substâncias em mananciais (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 1978)).

Preparação dos tecidos para análise

Após este período, os animais foram decapitados e suas brânquias dissecadas. As brânquias foram fixadas em Karnovsky modificado (gluteraldeído a 2% e solução de paraformaldeído a 4% em tampão fosfato de sódio pH 7,2 - 0,1M). A seguir, o material foi desidratado em concentrações crescentes de etanol e incluído em historresina (LKB-2218). Cortes de 4 micrômetros de espessura foram corados em Azul de Toluidina a 1%.

Uso das amostras para obtenção de dados estatísticos

Para cada animal de cada grupo foram confeccionadas 10 lâminas contendo 3 cortes cada uma. Foram escolhidas as lâminas ímpares de cada animal para a contagem das células. Posteriormente, foram sorteados um corte de cada lâmina e três

filamentos branquiais (Figura 1) de cada corte como alvo de contagem. Cada filamento foi dividido em três regiões (Basal, Intermediária e Apical) e a partir deste momento foram contados os núcleos de todas as células epiteliais de cada região do filamento. Também foram contados apenas os núcleos que apresentavam sinais de mitose, isto é, com a cromatina condensada, com os cromossomos evidenciados ou até mesmo sem a carioteca.

A contagem foi realizada através de observação visual, contando-se primeiramente as células presentes no lado esquerdo do filamento em corte e posteriormente as células presentes no lado direito, somando-se então o número total de células por região do filamento. O material foi observado em microscopia fotônica, com aumento final de 400 vezes.

Com base nesses dados colhidos foram calculados os índices mitóticos de todos os filamentos observados. O índice mitótico (IM) foi obtido a partir da seguinte fórmula:

$$IM = N^{\circ}cm / N^{\circ}ct$$

Onde, $N^{\circ}cm$ representa o número de células em divisão mitótica por filamento e $N^{\circ}ct$ o número de células totais por filamento.

Foram calculadas as médias dos índices mitóticos encontrados nos três filamentos observados por lâmina e nas cinco lâminas observadas por animal, calculando-se separadamente as três regiões do filamento (Basal, Intermediária e Apical). Estas médias foram analisadas pelo teste estatístico ANOVA (Análise de Variância) e do teste de comparação de médias de Duncan ao nível de probabilidade de 0,05.

Resultados

Todos os animais sobreviveram ao tratamento por frações dos extratos durante as 2 horas testadas. Os resultados da comparação entre os índices mitóticos das células branquiais dos animais tratados por

extratos de pequi estão apresentados na tabela 1.

Com base nos resultados apresentados na tabela 1, podemos detectar que o índice mitótico das células epiteliais das brânquias dos animais tratados pela fração acetato de etila da folha de pequi não apresentou diferença estatística em relação ao grupo controle, para o nível de significância de 5%, em nenhuma das três regiões do filamento branquial (Basal, Intermediária e Apical), evidenciando que não ocorreu significativa alteração da proliferação celular nas brânquias destes animais (Figura 2).

Entretanto, o índice mitótico das células epiteliais das brânquias dos animais tratados pela fração acetato de etila da casca do caule de pequi diferiu estatisticamente do valor encontrado no grupo controle, para o nível de significância de 5%, em duas regiões do filamento branquial (Basal e Apical), evidenciando que ocorreu significativo aumento da proliferação celular nas brânquias destes animais. (Figuras 3 e 4).

Além disso, quando comparados com o grupo controle, os filamentos branquiais dos animais tratados pela fração acetato de etila da casca do caule de pequi apresentavam expressiva dilatação dos vasos sanguíneos com conseqüente aumento de volume nas lamelas branquiais.

Discussão e Conclusão

Alguns estudos anteriores

Tabela 1

Média dos índices mitóticos das células epiteliais em três regiões do filamento branquial de guaru (*Poecilia vivipara*) tratadas por frações acetato de etila da folha e casca do caule de pequi (*Caryocar brasiliensis*)

Região	Grupo Controle	Grupo Experimental	
		Folha (Acetato de Etila)	Casca do Caule (Acetato de Etila)
Basal	0,0049	0,0122	0,0226*
Intermediária	0,0165	0,0268	0,0225
Apical	0,0035	0,0092	0,0184*

Médias seguidas de asterisco (*) numa mesma linha diferem estatisticamente do grupo controle para o nível de significância de 5%

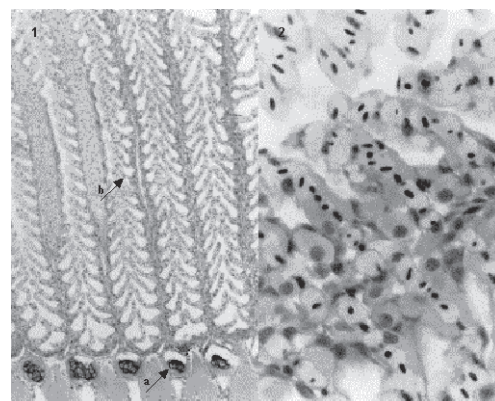


Figura 1

Fotomicrografia da estrutura das brânquias do Guarú (*Poecilia vivipara*); a) arcos branquiais cartilaginosos, b) filamentos branquiais. AT (Azul de Toluidina) 1%, 175X

Figura 2

Fotomicrografia das células epiteliais das brânquias de Guarú (*Poecilia vivipara*) pertencentes ao Grupo Controle evidenciando poucos núcleos em mitose. AT 1%, 874X

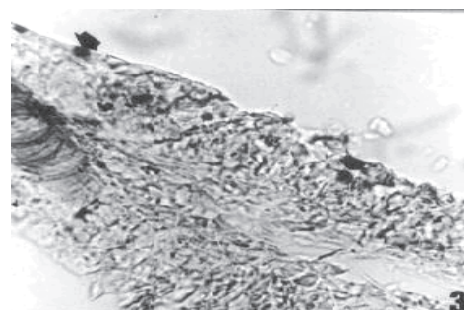


Figura 3

Fotomicrografia das células epiteliais das brânquias de Guarú (*Poecilia vivipara*) expostos à fração acetato de etila da casca do caule de pequi (*Caryocar brasiliensis*) em região apical do filamento branquial. No epitélio interlamelar observa-se núcleo de célula em metáfase (seta preta). AT (Azul de Toluidina) 1%, 874X

testaram outras espécies de plantas medicinais e suas respectivas ações moluscicidas. Chiofundera, Baluku e Mashinango¹⁵ testaram extratos aquosos e etanólicos de cinco espécies de plantas medicinais típicas do Zaire e atestaram que todas possuíam ação moluscicida contra os moluscos *Biomphalaria pfeifferi* e *Lymnaea natalensis*. Porém, estes extratos também mostraram efeito tóxico em peixes e insetos aquáticos, inviabilizando sua utilização em mananciais.

Outros estudos demonstraram que os extratos brutos de pequi à concentração de 20ppm não causaram mortalidade nos guarus expostos por 24 horas.²⁰ Mesmo os extratos fracionados de pequi à concentração de 20 ppm, também não foram letais a esses peixes, com exceção da fração aquosa da folha.⁷ Isto significa que todos esses extratos, com exceção da fração aquosa da folha, poderiam ser utilizados em mananciais para combater a esquistossomose pela eliminação do molusco *Biomphalaria glabrata*, hospedeiro intermediário do *Schistosoma mansoni*, sem que isso afetasse o restante da vida aquática nesses mananciais.

Nosso estudo observou que a fração acetato de etila da casca do caule de pequi causou mudanças significativas no epitélio branquial, não chegando a ser letal aos peixes.

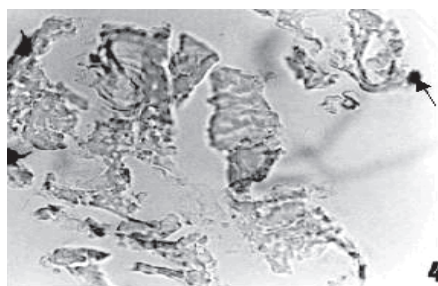


Figura 4

Fotomicrografia das células epiteliais das brânquias de Guaru (*Poecilia vivipara*) expostos à fração acetato de etila da casca do caule de pequi (*Caryocar brasiliensis*) em região basal do filamento branquial. Neste ponto as fibras musculares estriadas esqueléticas se cruzam dando mobilidade ao filamento (* asterisco branco), cartilagem hialina (seta branca) promove sustentação nesta região e os vasos sanguíneos (seta estreita preta) são abundantes. Na região basal do epitélio interlamelar observam-se figuras de mitose, prófase (seta larga) e metáfase (seta menor preta). AT (Azul de Toluidina) 1%, 874X

O aumento do índice mitótico das células epiteliais nas regiões basal e apical dos filamentos branquiais caracteriza aumento da proliferação celular. Isto significa que provavelmente as modificações físico-químicas do meio externo, provocadas pela ação deste extrato, causaram uma resposta morfológica do epitélio branquial, a fim de se proteger de uma substância agressiva.

As células mucosas podem ter se proliferado com o intuito de aumentar a camada surfactante que protege as lamelas branquiais, como também as células do cloro podem ter se proliferado para aumentar a troca iônica e manter a homeostasia do animal¹⁹. Silva et al.⁷ analisaram um aumento da densidade numérica de células do cloro nas regiões apical e basal do filamento branquial de guaru tratadas pela fração acetato de etila da casca do caule de pequi, embasando esta hipótese.

Entretanto, necessitamos de estudos mais profundos para analisarmos se esta proliferação é apenas uma resposta morfológica às mudanças do meio externo. Devemos saber quais tipos de células epiteliais estão se proliferando ou até mesmo se estas células estão se diferenciando em outras. O aumento da atividade mitótica em células epiteliais expostas a poluentes ambientais pode promover o desenvolvimento de tumores nesses órgãos, mesmo o organismo sendo relativamente insensível ao efeito tóxico deste poluente, como já observado em outros estudos de ecotoxicidade¹⁸.

Provavelmente, o acetato de etila concentra a quantidade de taninos presente na casca do caule de pequi. De acordo com Ribeiro et al.²¹, a casca da árvore do pequi apresenta 1,6% de taninos. Os taninos são responsáveis por inúmeras atividades biológicas devido principalmente à capacidade de se complexar com proteínas, polissacarídeos, alcalóides, íons metálicos e por apresentarem atividade antioxidante e sequestradora de radicais livres. Estas substâncias contribuem para a defesa das plantas contra o ataque de insetos e tem sido

relacionadas com inibição do crescimento de microrganismos.^{22,23} Estes taninos podem ser os agentes químicos causadores dessas alterações apresentadas no epitélio branquial dos guarus.

Os dados obtidos nos permitem concluir que a fração acetato de etila da folha de pequi na concentração de 20 ppm, pode

ser utilizada como moluscicida em mananciais, sem afetar drasticamente a morfologia do epitélio branquial do guaru e provavelmente de outras espécies de peixes. Entretanto, a fração acetato de etila da casca do caule de pequi na concentração de 20 ppm, necessitaria passar por testes mais específicos antes de ser utilizada em mananciais.

Abstract

Many wild plants of the Cerrado bioma are used as medicinal plants. The pequi (*Caryocar brasiliensis*) is representative of those equipped with molluscicidal action against schistosomiasis. This paper sets out to verify the toxic action of pequi fractions in other aquatic animals before they are used in rivers or lakes. Analysis were made of the alterations to the mitotic index of epithelia cells in the gills of guppy (*Poecilia vivipara*) exposed to ethyl-acetate fraction of leaf pequi and bark. Animals exposed to ethyl-acetate fraction (leaf), no significant change was observed in the mitotic index when compared with the control group, whereas in fish exposed to ethyl-acetate fraction (bark) we detected an increase in mitotic index of the epithelia cells in two regions of the branchial filaments. Thus, ethyl-acetate fractions (leaf) could be used against schistosomiasis, given their high efficacy and low action as piscicide.

Key-words:

Gills.
Epithelia cells.
Mitotic index.
Fractions of pequi.
Toxicity.

Referências

- HELOU, J. H. et al. **Farmacotécnica**. São Paulo: Artpress, 1975.
- OLIVEIRA, M. M. et al. *Caryocar brasiliensis* – Isolamento e identificação de algumas substâncias. **Arq. Inst. Biol**, 1970.
- BEZERRA, J. C. B. et al. Molluscicidal activity against *Biomphalaria glabrata* of Brazilian Cerrado medicinal plants. **Rev. Fitoterapia**, Dublin, 2002.
- BOFFI, A. V. **Moluscos brasileiros de interesse médico e econômico**. São Paulo: Hucitec, 1979.
- ARAÚJO, E. J. A. et al. Effects so irritants agents on surface ultrastructure of gill rays and a filaments of guppy (*Poecilia vivipara*). In: XVI CONGRESS OF THE BRAZILIAN SOCIETY FOR MICROSCOPY AND MICROANALYSIS, 14., 1999, Santos. **Proceedings...**
- SABÓIA-MORAIS, S. M. T. et al. Evaluation of the effect of extracts of Cerrado plants of gill cells of guppies (*Poecilia vivipara*) used as biomonitors. In: CONGRESS OF THE BRAZILIAN SOCIETY FOR MICROSCOPY AND MICROANALYSIS, 17., 1999, Santos. **Proceedings...**
- SILVA, L. D. et al. Análise morfométrica das células do cloro de *Poecilia vivipara* expostas a frações da folha e casca do caule de *Caryocar brasiliensis*. **Acta Scientiarum: Biological Sciences**. Maringá, v. 25, n. 1, p. 195-201, 2003.
- SOUZA, P. R. et al. Cytochemical and morphometric study of chloride cell modulation behavior in the presence of changes in salinity guppies. In: CONGRESS OF THE BRAZILIAN SOCIETY FOR MICROSCOPY AND MICROANALYSIS, 17., 1999, Santos. **Proceedings...**
- EIRAS-STOFELLA, D. R. **Variabilidade morfológica da região faríngea dos arcos branquiais de algumas espécies de peixes (Teleostei), estudada pela microscopia eletrônica de varredura**. 1994. 125 f. Tese (Doutorado) – Departamento de Zoologia, Universidade do Paraná, Curitiba, 1994.
- HUGHES, G. M. Gill of a living coelacanth, *Latimeria chalumnae*. *Experientia*, Basel, v. 28, p. 1301-1302, 1972.
- HUGHES, G. M. General anatomy of gills. In: HOAR, W. S.; RANDALL, D. J. (Ed.). **Fish physiology**. Orlando: Academic Press, 1984. p. 1-72.
- HUGHES, G. M.; MUSHI, J. S. D. Scanning electron micrograph of the respiratory surfaces of *Saccobranhus* (Heteropneutes) fossilis (Block). **Cell Tiss. Res.**, Heidelberg, v. 195, p. 99-109, 1978.
- MOYLE, P. B.; CECH Jr., J. **Fishes: An introduction to ichthyology**. New Jersey: Prentice-Hall, 1982. 593 p.
- HINTON, D. E. et al. Normal versus abnormal structure: considerations in morphologic responses of teleosts to pollutants. **Environmental Health Perspective**, v. 71, p. 139-146, 1987.

15. BUCHMANN, A. et al. Immunohistochemical localization of the cytochrome P450 Isoenzymes LMC2 and LM4B (P4501A1) in 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin-treated zebrafish (*Brachydanio rerio*). **Toxicol. Appl. Pharmacol.**, v. 123, p. 160–169, 1993.
16. SMOLOWITZ, R. M.; HAHN, M. E.; STEGEMAN, J. J. Immunohistochemical localization of cytochrome P-4501A1 induced by 3,3',4,4'-tetrachlorobiphenyl en 2,3,7,8-tetrachlorodibenzoafuran in liver and extrahepatic tissues of the teleost *Stenotomus chrysops* (scup). **Drug Metab. Dispos.**, v. 19, p. 113–123, 1991.
17. STEGEMAN, J. J.; SMOLOWITZ, R. M.; HAHN, M. E. Immunohistochemical localization of environmentally induced cytochrome P4501A1 in multiple organs of the marine teleost *Stenotomus chrysops* (Scup). **Toxicol. Appl. Pharmacol.**, v. 110, p. 486–504, 1991.
18. GRINWIS, G. C. M. et al. Toxicity of TCDD in European flounder (*Platichthys flesus*) with emphasis on histopathology and cytochrome P450 1A induction in several organ systems. **Aquatic Toxicology**, v. 50, p. 387-401, 1999.
19. CHIFUNDERA, K.; BALUKU, B.; MASHIMANGO, B. Phytochemical screening and molluscicidal potency of some zairean medicinal plants. **Pharmacological research**, v. 28, p. 8-12, 1993.
20. CARNEIRO, C. E. A. **Efeitos de extratos de plantas do Cerrado com comprovada ação moluscicida testados em peixes (*Poecilia vivipara*) para diagnosticar suas ações e as respostas celulares.** 2002. Dissertação (Mestrado em Biologia) - Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2002.
21. RIBEIRO, M. T. de A. Estudo sobre o pequi do ponto de vista botânico e industrial. **Ver. Tecnol. Bebidas**, p. 25-27, 1949.
22. HASLAM, E. Natural polyphenols (Vegetable Tannins) as drugs and medicines: possible modes of action. **J. Nat. Prod.**, v. 59, p. 205, 1996.
23. LEE, M. H. et al. DNA polymerase inhibition of tannins from *Eugenia uniflora*. **Cancer Letter**, p. 131-136, 2000.
24. ALMEIDA, S. P. A. et al. **Cerrado: espécies vegetais úteis.** Planaltina: Embrapa/CPAC, 1998.
25. VIEIRA, R. F.; MARTINS, M. V. M. Estudos etnobotânicos de espécies medicinais de uso popular no cerrado. In: SAVANA SIMPOSIUM, 1998, Brasília. **Anais...** Brasília: Embrapa/CPAC.