

Efeitos do fluoreto de sódio no epitélio da brânquia do peixe Guaru (*Poecilia vivipara*)

Effects of sodium fluoride in gill epithelium of Guppy fish (*Poecilia vivipara*)

Leandro BRESEGHELO¹;
Márcia Pereira CARDOSO¹;
Rodinelli BORGES-DE-
OLIVEIRA¹;
Marcelo Ferreira da COSTA²;
José Clecildo Bezerra
BARRETO²;
Simone Maria Teixeira de
SABÓIA-MORAIS¹;
Áureo Tatsumi YAMADA³

1- Laboratório de Comportamento Celular do Departamento de Morfologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade Federal de Goiás, Goiânia - GO
2- Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública da Universidade Federal de Goiás, Goiânia - GO
3- Laboratório de Citoquímica e Imunocitoquímica do Instituto Biológico do UNICAMP, Campinas - SP

Resumo

O flúor é muito utilizado pelo homem e facilmente encontrado na natureza. Por isso, vários estudos foram realizados visando a toxicidade e o seu efeito cumulativo nos tecidos animais. É descrito que o fluoreto de sódio pode ser empregado no controle do hospedeiro da esquistossomose (*Biomphalaria glabrata*). Visando a preservação do meio aquático, propõe-se a verificação do efeito do fluoreto de sódio em peixes (*Poecilia vivipara*). Dez peixes foram submetidos à água de cloração (GC) e o restante foi submetido à água contendo fluoreto de sódio na concentração de 5 ppm (GE), por vinte e um dias. Após esse período, os animais foram sacrificados e suas brânquias foram retiradas. As brânquias foram fixadas, pós-fixadas e desidratadas de acordo com o protocolo das técnicas de histoquímica e análise ultra-estrutural, respectivamente. As peças foram diafanizadas em xilol. Para observação histológica das células mucosas e células do cloro, foi utilizada a técnica de coloração de Hematoxilina + eosina. E para a detecção histoquímica de glicoconjugados utilizou-se as técnicas de P.A.S., P.A.S + amilase salivar, P.A.S. + acetilação, P.A.S. + acetilação reversível, alcian Blue (AB) pH 2,5 + metilação, AB pH 2,5 + metilação reversível, AB pH 2,5 e AB pH 0,5. Observou-se aumento na secreção de muco e na quantidade de células mucosas do epitélio branquial, além de diferenças na reatividade histoquímica das células mucosas do GE comparados ao GC, sugerindo uma resposta adaptativa desses animais ao novo ambiente.

Palavras-chave:

Brânquias.
Células do cloro.
Células mucosas.
Esquistossomose.
Fluoreto de sódio.

Correspondência para:

SIMONE MARIA TEIXEIRA DE SABÓIA-MORAIS
Laboratório de Comportamento Celular
Departamento de Morfologia
Instituto de Ciências Biomédicas
Universidade Federal de Goiás
CAMPUS II - ICB IV - Caixa Postal 131
74001-970 - Campinas - SP
saboias@terra.com.br

Recebido para publicação: 19/05/2003
Aprovado para publicação: 18/05/2004

Introdução

O flúor é uma substância facilmente encontrada no meio ambiente. Ele é amplamente usado em processos industriais¹, em tratamentos de saúde bucal², em tratamentos de doenças ósseas³, e no controle biológico de hospedeiros da

esquistossomose.⁴ Por seu vasto uso, verifica-se que sua importância ambiental é relevante.

Por tamanha importância, o conhecimento sobre a absorção, distribuição, eliminação e toxicidade dos fluoretos nos tecidos animais, tem impulsionado os estudos feitos em animais de laboratório.

Devido às ações anatómicas,

têm-se aumentado as oscilações do ambiente aquático, permitindo a liberação indiscriminada de agentes poluidores⁵, o que afeta diretamente os animais aquáticos.

Esses animais, como os teleósteos, possuem o epitélio branquial em íntimo contato com a água. A água pode receber diversos componentes químicos que nela são dissolvidos, alterando-a.^{6,7,8,9} Forças físicas e abrasivas, invasões parasitárias e predação podem acometer os organismos aquáticos^{10,11}. Um dos mecanismos de proteção deste epitélio é a secreção de uma camada de glicoproteínas e glicolípídeos^{2,12,13}.

Tal mecanismo é verificado pelo aumento do número de células mucosas do epitélio branquial.¹⁴

Dessa forma, o epitélio branquial mostra-se altamente sensível à variações ambientais do meio aquático, atendendo a uma necessidade funcional pela modificação quantitativa e constitutiva da sua celularidade. Tal sensibilidade e capacidade de resposta, têm capacitado o teleósteo eurialino *Poecilia vivipara* como bioindicador no biomonitoramento do ambiente aquático.

A partir desses dados, o presente estudo investigou o grau de toxicidade do fluoreto de sódio no guaru.

Materiais e Métodos

a) modelo biológico

Foram utilizados vinte espécimes de *Poecilia vivipara* (Cyprinodontiformes, Poeciliidae) procedentes de riachos da zona rural de Goiânia, Goiás, Brasil.

b) constituição dos grupos experimentais e controles

Os animais foram divididos em quatro aquários da seguinte forma:

1. Grupo controle: dez animais foram mantidos em dois aquários com 1 (um) litro de água decolorada, onde foram controladas as condições padrões: aeração, pH 6,9 e alimentação “ad libitum” (Tetrafood-Alemanha)

2. Grupo experimental: constituído por dez animais que foram mantidos em dois aquários com 1 (um) litro de água decolorada com fluoreto de sódio a 5 ppm por um período de 21 dias.

c) preparação de amostras para microscopia de luz

Os animais foram decapitados e deles retiraram-se as brânquias, que foram imersas por 2 horas em solução de fixação contendo aldeído glutárico a 2 % e paraformaldeído a 4% em tampão fosfato de sódio 0,1M (pH 7,4). As peças foram desidratadas em concentrações crescentes de etanol (70%, 80%, 90% e 100%) e diafanizadas em xilol. As inclusões foram feitas em parafina (Histosec-Merck) e foram obtidos cortes com 5 mm de espessura. Este procedimento foi realizado para os tecidos a serem estudados pelos métodos histológicos de rotina e pelos métodos histoquímicos para detecção de glicoconjugados.

Para observação histológica das células mucosas e células do cloro foi utilizada a técnica de coloração de hematoxilina + eosina.

Para a detecção histoquímica empregou-se P.A.S. (detecção de glicoconjugados neutros), associação P.A.S. + amilase salivar (detecção do glicogênio), P.A.S. + acetilação (detecção de grupamentos Vic-glicol), P.A.S. + acetilação reversível (detecção de grupamentos Vic-glicol - glicoconjugados neutros), Alcian blue (AB) pH 2,5 + metilação (detecção de glicoproteínas ácidas), AB pH 2,5 + metilação reversível (detecção de glicoproteínas / glicoconjugados ácidos sulfatados e carboxilados), AB pH 2,5 (detecção de glicoconjugados sulfatados e carboxilados) e AB pH 0,5 (detecção de glicoconjugados ácidos sulfatados).

O registro fotográfico deste material foi realizado no fotomicroscópio Olympus CH-30.

d) preparação de amostras para microscopia eletrônica de transmissão

Os animais foram decapitados e deles

retiraram-se as brânquias, que foram imersas por 2 horas em solução fixadora contendo aldeído glutárico a 2 % e paraformaldeído a 4% em tampão fosfato de sódio 0,1M (pH 7,4) a 4 °C. As amostras foram pós-fixadas em solução aquosa de tetróxido de ósmio a 1% por uma hora e, em seguida, lavadas em água destilada e submetidas ao acetato de uranila a 0,5% por uma hora. Posteriormente, as brânquias foram desidratadas em concentrações crescentes de etanol e acetona, infiltradas, e incluídas em resina Spurr. Secções de 70 nm de espessura foram contrastadas com acetato de uranila a 0,5%³ e citrato de chumbo a 1%³. Este material foi observado ao Zeiss EM-9S 70 KV, onde foram obtidas as eletronicografias.

Resultados

Pela análise da morfologia geral das brânquias, detectamos que no grupo experimental as lamelas branquiais estavam colabadas e havia pouco espaço interlamelar quando comparadas ao grupo controle. Ao realizarmos o estudo ultra-estrutural do epitélio branquial, ficou claramente demonstrado que o pouco espaço interlamelar se deu devido ao surgimento de hipertrofia no tecido epitelial em decorrência da hiperplasia das células pavimentosas e do cloro (Figuras 1 e 2), diferente do observado no grupo controle.

Tabela 1

Dados relativos às análises histoquímicas de glicoconjugados em células mucosas do epitélio interlamelar de *Guarus (P. vivipara)*

Técnicas histoquímicas	Grupo Controle	Grupo Experimental
P.A.S.	+	+
P.A.S. + amilase salivar	++	++
P.A.S. + acetilação	++	++
P.A.S.+ acet.reversível	+	++
A.B. pH 2,5 + metilação	+	++
A.B.pH 2,5 + met.rev.	+	++
Alcian blue pH 2,5	+	++
Alcian blue pH 0,5	+	+

+ = intensidade de reação fraca; ++ = intensidade de reação forte

Comparamos o grupo controle com o grupo experimental no que se refere às reações histoquímicas para detecção de glicoconjugados e, constatamos diferentes reações. Pois, enquanto as células mucosas interlamelares (do tipo III) foram reativas ao AB pH 2,5 no grupo experimental, estas tiveram reação moderada no grupo controle (Figuras 3 e 4 e Tabela 1). As células mucosas tipo III de ambos os grupos foram moderadamente reativas ao AB pH 0,5 (Tabela 1), indicando uma maior presença de glicoconjugados carboxilados. Frente ao AB pH 2,5 + metilação e o AB pH 2,5 + metilação reversível as células mucosas de ambos os grupos apresentaram reatividade, confirmando a presença de glicoproteínas/ glicoconjugados ácidos carboxilados como conteúdo dos grânulos das células mucosas.

Por meio da análise utilizando o P.A.S (Figuras 5 e 6) e P.A.S. + amilase salivar, o grupo controle e o grupo experimental apresentaram positividade nas células mucosas (Tabela 1), indicando a presença de glicoconjugados neutros do grupamento 1 - 4 vic - glicol e a ausência de glicogênio.

No P.A.S. + acetilação reversível (Tabela 1) constatamos uma variação na intensidade da reatividade do conteúdo dos grânulos das células mucosas grupo controle comparado ao grupo experimental tanto da região interlamelar quanto da região do rastelo demonstrando a presença de radicais

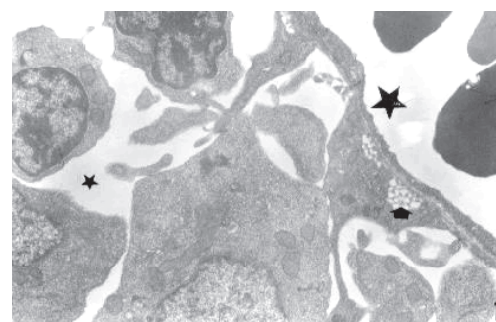
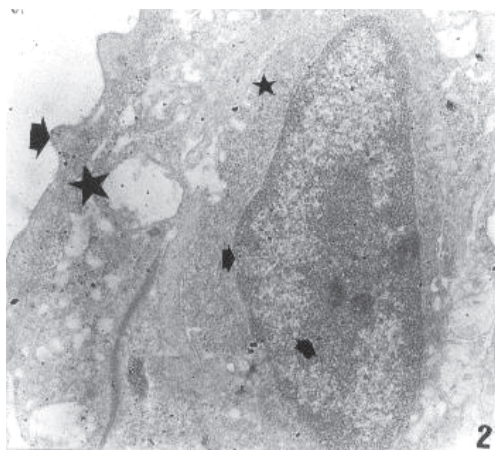
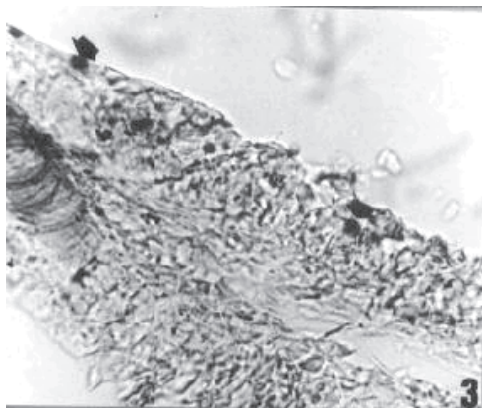


Figura 1

Eletronmicrografia de transmissão da região intermediária do filamento, nota-se presença de células do cloro com retículo endoplasmático liso (seta), internamente o capilar (asterisco maior) margeando outros tipos celulares onde observam-se células muito esparsas demonstrando hipertrofia (asterisco menor). 6.000 X

**Figura 2**

Eletronmicrografia de transmissão de células da superfície epitelial, células pavimentosas, da região intermediária do filamento, observam-se micropregas (seta maior) com muitas vesículas volumosas denotando hiperplasia (asterisco maior), o citoplasma apresenta-se muito alterado (asterisco menor) e, o núcleo (setas menores) com suas características estruturais bem preservadas. 16.000 X

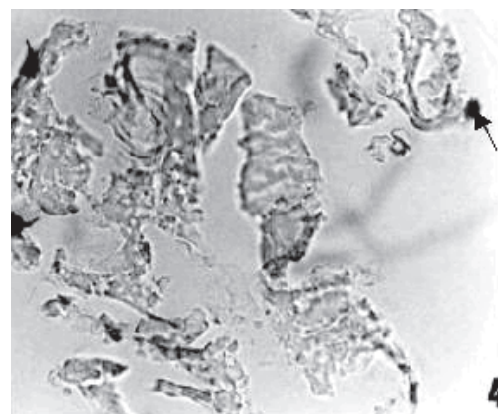
**Figura 3**

Fotomicrografia das brânquias de peixe submetido ao flúor 5 ppm, observam-se células mucosas fortemente alcian-blue-reativas (setas largas). Reação: A.B. pH 2,5. 205 X

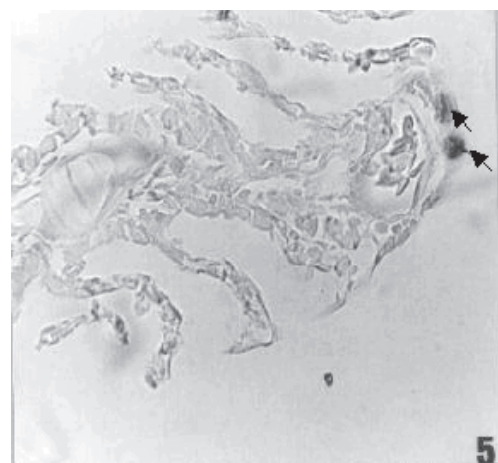
do grupamento vic-glicol e de glicoconjugados e glicoproteínas neutras.

Discussão

Pelas análises morfológicas das brânquias do GE comparado ao GC, ficou demonstrado que o flúor causou hipertrofia e hiperplasia das células mucosas apenas no sentido de aumentar o metabolismo para uma maior produção de muco, sem causar letalidade, alterações diferentes das

**Figura 4**

Fotomicrografia da região do meio do filamento do grupo controle (GC). Observa-se que houve reatividade moderada nas células mucosas (seta). Reação: A.B. pH 2,5. 205 X

**Figura 5**

Fotomicrografia da região do arco branquial do GC com filamentos apresentando reatividade moderada (setas), indicando a presença de glicoconjugados neutros do grupamento 1-4 vic-glicol. Reação: PAS. 205 X

observadas em casos de intoxicação por mudanças da composição dos corpos d'água.¹⁵ Para diagnosticar quão intensa havia sido a resposta ao uso crônico de fluoreto de sódio, realizamos análises histoquímicas que possibilitassem a detecção de glicoconjugados e viabilizassem uma análise da intensidade de reação, quando comparássemos as células provenientes de animais do grupo controle com as do grupo experimental, considerando que o único agente interveniente fosse a adição de

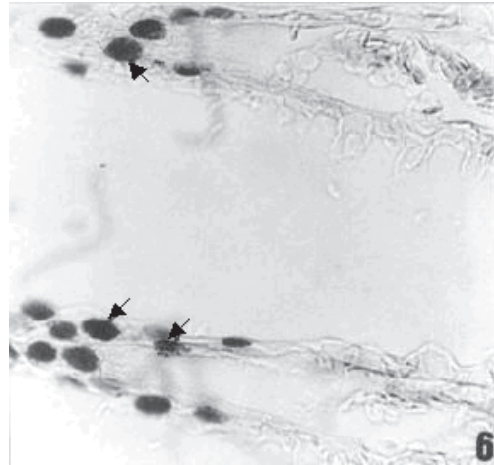


Figura 6

Fotomicrografia da região central do filamento branquial do GE apresentando várias células moderadamente reativas (setas), reação semelhante ao GC, demonstrando que não houve alteração dos glicoconjugados. Reação: PAS. 205 X

fluoreto de sódio à água do grupo experimental.

De acordo com estudos do conteúdo de muco em células, verificamos que há maior intensidade de glicoconjugados neutros no grupo controle e maior intensidade de glicoconjugados ácidos carboxilados no grupo experimental. Esta observação confirma a alteração do conteúdo dos glicoconjugados das células mucosas, semelhante ao que acontece no sistema digestório e urinário de peixes, anfíbios, répteis, aves e mamíferos.^{3,16} Como o muco ácido é mais denso, atribui-se a ele a maior capacidade de proteção e lubrificação artificiais, quando as células mucosas destes órgãos são expostos a agentes abrasivos e irritantes.^{17,18}

No período de exposição não se constatou sintomas de intoxicação ao fluoreto de sódio como: aparência apática,

perda de peso, movimentos violentos, perambulação errante, perda de equilíbrio e tetania¹⁹, apenas verificou-se uma resposta celular no sentido de adaptação ao meio para o retorno da homeostasia, detectada sobretudo pela secreção celular de muco com características de proteção das superfícies teciduais.

Alguns estudos utilizaram o fluoreto de maneira determinada e controlada e não constataram ação tóxica nos usuários da água²⁰. Estudos citoquímicos têm-se demonstrado eficazes na identificação e caracterização de células de peixes²¹ para uso como modelos biológicos aquáticos que se prestem na detecção de variações ambientais diversas.

Os efeitos relativos à intoxicação pelo flúor em animais e plantas só são vistos em uso prolongado, excessivo e inadequado deste elemento.²²

Conclusão

Como não houve mortalidade dos peixes durante o período de experimentação, com o uso de tratamento crônico, com valores acima dos recomendados pela OMS¹⁹ para uso desta substância e, que observamos somente respostas celulares adaptativas do peixe ao novo ambiente, entendemos que a concentração de 5 ppm de fluoreto de sódio não é letal e não apresenta para o guaru danos significativos ao comportamento do animal e as estruturas teciduais e celulares do mesmo.

Agradecimentos

Pela revisão do abstract, agradecemos ao Sr. James Mulholland.

Abstract

Fluorine is an element much used by man and easily found in nature. Some studies have been carried out on the toxicity of fluorine and its cumulative effect on animal tissues. Sodium fluoride is described as being used in controlling the host of schistosomiasis (*Biomphalaria glabrata*). With a view to preserve the aquatic environment, it is proposed to verify the effect of sodium fluoride on fish (*Poecilia*

Key-words:

Chloride cells.
Fluorine.
Gills.
Mucous cells.
Schistosomiasis.

vivipara). Ten fishes were divided into two groups. The first group was exposed to freshwater with sodium fluoride with a concentration of 5 ppm for a period of 21 days; the second group was exposed to freshwater. After 21 days the animals were sacrificed and their gills removed and processed according to histochemical/histologic methods and ultrastructural study. The gill leaflets were diaphanized in xylol. Histologic analyses using hematoxyline-eosin identified branchial epithelium and revealed mucous and chloride cells. The histochemical methods to detect glycoconjugate contents of mucous cells used: P.A.S, P.A.S. + salivar amylase; P.A.S. + acetylation ; P.A.S. + reversible acetylation; Alcian blue pH 2.5; Alcian blue pH 0.5; Alcian blue pH 2.5 + methylation; and Alcian blue pH 2.5 + reversible methylation. An increase in secretion of mucus and an alteration to the content of the granules were also observed, suggesting behavior changes of mucous type to enable these animals to adapt to the environment, thus altering the concentration of sodium fluoride.

Referências

1. WHITFORD, G. M. Intake and Metabolism of Fluoride. *Adv. Dent. Res.*, Georgia. v. 8, n.1, p. 5-14, 1994.
2. CASTELS, M. T. et al. Ultrastructural localization of glycoconjugates in human bronchial glands: the subcellular organization of N- and O-linked oligosaccharide chains. *J. Histochem. Cytochem.*, v. 40, p. 265-274, 1992.
3. MADRID, J. F. et al. Characterization on glycoconjugates in the intestinal mucosa of vertebrates by means of lectin histochemistry. *Acta Histochem. Cytochem.*, v. 22, p. 1-14, 1989b.
4. CITTANOVA, M. L. et al. Fluoride ion toxicity in human kidney collecting duct cells. *Anesthesiology*, Paris, v. 84, n. 2, p. 428-435, 1996.
5. ARAÚJO, E. J. A. et al. Efeito de poluentes químicos cumulativos e mutagênicos durante o desenvolvimento ontogenético de *Poecilia vivipara* (Cyprinodontiformes, Poeciliidae). *Acta Microsc.*, Maringá. v. 23, n.2, p. 391-399, 2001.
6. PARSONS, J. D. Effects of acidic mine wastes on aquatic ecosystems. *Water Air Soil Pollut.*, v.7, p. 333-354, 1976.
7. ROBERTS, R. J.; BULLOCK, A. M. The skin surface ecosystem of teleost fishes. *Proc. R. Soc. Edinburgh [Biol.]*, v. 79B, p. 87-91, 1980.
8. PERRY, S. F.; LAURENT, P. Environmental effects on fish gill structure and function. In: RANKIN, J.C.; JENSEN, F. B. (Ed.). *Fish ecophysiol.* Chapman and Hall, London: p. 231-264, 1993.
9. PAWERT, M.; MÜLLER, E.; TRIEBSKORN, R. Ultrastructural changes in fish gills as biomarker to assess small stream pollution. *Tissue & Cell*, v. 30, p. 617-626, 1998.
10. FLETCHER, T. C.; GRANT, C. Glycoproteins in the external mucus secretions of the plaice *Pleuronectes platessa* (L.) and others fishes. *Biochem. J.*, v. 18, p. 12, 1976.
11. BRAUN, R.; ARNENSEN, A.; RINNE, A. HJELMELAND, K. Immunological localization of trypsin in mucus-secreting cell layers of Atlantic salmon *Salmo salar* L. *J. Fish Dis.*, v.13, p. 233-238, 1990.
12. SCHULTA, R.; CELCH, S. Sialoglycoconjugates in the lipid droplets?. *Acta Histochem.*, Jena, v.88, p. 199-201, 1990.
13. BURKHARD-HOLM, P. Lectin histochemistry of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) gill and skin. *Histochem. J.*, London, v.29, p. 893-899, 1997.
14. SABÓIA-MORAIS, S. M. T.; HERNANDEZ-BLASQUEZ, F.J.; MOTA, D.L.; BITTENCOURT, A.M. Mucous cell types in the branchial epithelium of the euryaline fish *Poecilia vivipara*. *J. Fish. Biol.*, v.49, p. 545-548, 1996.
15. LEASE, H. M. et al. Structural changes in gills of Lost River suckers exposed to elevated pH and ammonia concentrations. *Comparative Biochemistry and Physiology*, Part C, v.134, p. 491-500, 2003.
16. MADRID, J. F. et al. Histochemistry of glycoconjugates in the gallbladder epithelium of ten animal species. *Histochemistry*, v. 9, p. 437-443, 1989a.
17. BEAMISH, R. J. Lethal pH for white sucker *Catostomus commersoni* (Lacépède). *Trans. Am. Fish. Soc.*, v.101, p. 335-358, 1972.
18. ZIESKE, J. D.; BERNSTEIN, I. A. Modification of cell surface glycoprotein: Addition of fucosyl residues during epidermal differentiation. *J. Cell Biol.*, v.95, p. 626-631, 1982.
19. WHO. Fluorine and Fluoride. Geneva: World Health Organization, (Environmental Health Criteria 36). 1984. 110 p.
20. NASTASA, V. et al. Environmental pollution studies of fluorine coming from industry. *Rev. Med. Chir. Soc. Med. Nat. Iasi*. v. 96 n. 3-4, p. 231-239, 1992.
21. UEDA, I. K.; EGAMI, M.I.; SASSO, W.S. Cytochemical aspects of the peripheral blood cells of *Oreochromis* (Tilapia) niloticus. (Linnaeus, 1758) (Cichlidae, Teleostei) – Part II. *J. Vet. Res. Anim. Sci.*

- v. **38**, n. 6, p. 273-277, 2001. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/bjvras/v38n6/9661.pdf>>
Acesso em: 9 Maio 2003.
- 22.FUNG, K. F. et al. Fluoride contents in tea and soil from tea plantations and release of fluoride into tea liquor during infusion. **Environ. Poll.**, Hong Kong. **v. 104**, p. 197-205, 1999.
- 23.BENCHIMOL, M.; ATTIAS, M.; CUNHA, N. L.; CARVALHO, T. U. Métodos de Estudo da Célula. **TEATRAL**, Rio de Janeiro, v. 1, p. 142, 1996.
- 24.BOULTON, I. C.; COOKE, J. A. Fluoride Accumulation and Toxicity in Wild Small Mammals. **Environ. Poll.**, Great Britain, **v. 85**, p. 161-167, 1994.
- 25.CATE, J. M. T.; LOVEREN, C. V. Fluoride Mechanisms. **Cariology**, **v. 43**, n.4, p. 713-742, 1999.
- 26.COSTA, M. F. **A influência do fluoreto de sódio no controle biológico no ciclo do *Schistosoma mansoni* (Sambon, 1907)**, 2001. 76 f. Dissertação (Mestrado) – Instituto de Patologias Tropicais e Saúde Pública, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2001.
- 27.MURRAY, T. M.; STE-MARIE, L. G. Fluoride therapy for osteoporosis. **Can. Med. Assoc. J.** Toronto. **v. 155**, n. 7, p. 949-954, 1996.
28. WHITFORD, G. M.; BILES, E. D.; BIRDSONG, N. L. A comparative study of fluoride pharmacokinetics in five species. **J. Dent. Res.**, Georgia, **v. 70**, n. 6, p. 948-951, 1991.