

MINISTÉRIO DA MARINHA

RIO DE JANEIRO

BRASIL

HISTOQUÍMICA E HISTOFOTOMETRIA DAS GLÂNDU-
LAS DE CIMENTO DE *BALANUS TINTINNABULUM*
(BALANIDAE - CIRRIPIEDIA)

POR
DYRCE LACOMBE

PUBLICAÇÃO Nº 011

DO

INSTITUTO DE PESQUISAS DA MARINHA

**ESTA PUBLICAÇÃO PODE SER REPRODUZIDA EM PARTE OU
NO TOTAL, DESDE QUE SEJA EXPRESSAMENTE CITADA A FONTE.**

**PEDE-SE PERMUTA
PIDESE CANJE
ON DEMANDE L ÉCHANGE
EXCHANGE DESIRED**

I N D I C E

- I. INTRODUÇÃO
- II. DESENVOLVIMENTO TECNICO DO TRABALHO
- III. AVALIAÇÃO DA INTENSIDADE DAS REAÇÕES OBTIDAS PELO
ALCIAN BLUE E GALOCIANINA
- IV. TRATAMENTO ESTATISTICO DOS DADOS
- V. ANÁLISE DAS TABELAS OBTIDAS
- VI. APRECIÇÃO DOS RESULTADOS
- VII. SUMARIO
- VIII. SUMMARY
- IX. SUZAMMENFASSUNG
- X. REFERÊNCIAS BIBLIOGRAFICAS

HISTOQUÍMICA E HISTOFOTOMETRIA DAS GLÂNDULAS DE CIMENTO DE
BALANUS TINTINNABULUM (BALANIDAE-CIRRIPIEDIA)

por Dyrce Lacombe

I. INTRODUÇÃO

Após realizarmos os estudos de Anatomia e Histologia das glândulas de cimento de Balanus tintinnabulum (Lacombe, 1966) verificamos a necessidade dos estudos mais apurados sôbre a secreção do cimento destas glândulas.

Como nosso objetivo inicial sempre foi o de determinar, quimicamente, a substância responsável pela adesão destes ani mais aos diferentes substratos, isto é, o cimento pròpriamente dito, procuramos, através da histoquímica, encontrar uma solução para o problema.

Conforme mencionamos em trabalho anterior (Lacombe, 1966), as glândulas de cimento de Balanus tintinnabulum originam-se das células hipodermais que formam a parede do manto. São revestidas externamente pelas células do tecido conjuntivo, que são achatadas, e, citològicamente diferentes das hipodermais.

Nos indivíduos jovens encontramos as glândulas de cimento localizadas bem na base da carapaça calcárea e, a medida que o animal vai crescendo, as glândulas vão sendo deslocadas para o interior do mesmo em direção ao ovário. Isto ocorre devido ao contínuo crescimento dos canais principais e secundários. Desta forma, as células glândulares mais antigas são encontradas na região interna da zona ovariana entre os folículos do ovário. Conhecendo a localização e o mecanismo, pelo qual o cimento secretado pelas glândulas atinge a diversos substratos, nos foi possível empreender o presente trabalho. Para êsse estudo, solicitamos o auxílio do Departamento de Embriologia e Histologia da Faculdade de Medicina do Estado de S. Paulo, na figura do Dr. Antônio Sesso, que gentilmente colocou seu laboratório a nossa disposição e, também, orientou-nos nesta pesquisa. A êste cientista nossos sinceros agradecimentos.

II. DESENVOLVIMENTO TECNICO DO TRABALHO

Desenvolvemos nossas pesquisas em indivíduos jovens e adultos da espécie Balanus tintinnabulum, prosseguindo da seguinte maneira: Para a obtenção de animais jovens, colocamos na água do mar diversas placas revestidas de papel celofane, de 20 cm de comprimento por 10 cm de largura. Deixamo-as mergulhadas por um período de 4 a 5 dias, quando então retiramos o papel celofane da água. Fixados no mesmo, encontramos muitos exemplares de Balanídeos pequenos em pleno crescimento. A seguir, cortamos o celofane em tiras de 1 cm a 2 cm contendo os animais e, usamos diferentes fixadores, dos quais os mais empregados foram:

- 1) líquido de Bouin preparado com água do mar.
- 2) líquido de Bouin preparado com álcool a 70%.
- 3) Fixador segundo Susa.
- 4) Fixador preparado com formol e fosfato de sódio.
- 5) Fixador segundo Flemming.

No caso dos Balanídeos adultos, a técnica empregada foi a de dissecação. Retiramos do animal a região contendo as glândulas de cimento, logo após a coleta dos mesmos, e fixamos o ovário com as glândulas, nos fixadores acima referidos. Tivemos o cuidado de manter a mesma espessura dos cortes histológicos e as mesmas colorações, a fim de evitar possíveis erros técnicos.

Após a fixação, cujo tempo de duração varia com o fixador empregado, desidratamos a peça pela série de álcool-benzol incluindo, finalmente, as glândulas e o ovário em parafina com látex. Todos os cortes histológicos obedeceram a 10 μ de espessura.

Inicialmente procuramos através de diferentes reações histoquímicas determinar o grupo a que pertence a substância de cimento das glândulas. Assim, aplicamos diversos métodos histoquímicos no decorrer do trabalho. Para os 5 fixadores empregados usamos várias técnicas de coloração. Pudemos, no final, verificar a correlação dos métodos de coloração e sua concentração com os fixadores usados.

Para a evidenciação do ácido ribonucléico nas células glandulares dos Balanídeos, empregamos inicialmente a técnica de coloração pelo Azul de metileno de maneira corrente, isto é, hidratamos, gradativamente os cortes histológicos até água destilada, passando pela série dos alcoois (100%, 96%, 70% e 40%) e, finalmente, água destilada.

Após, os cortes permaneceram 24 horas no corante. A preparação do mesmo encontra-se descrito mais abaixo. Finalmente, lavamos os cortes em água, e mergulhamo-os no álcool butílico terciário por duas vezes e, depois, em xilol. A montagem foi feita em Bálsamo de Canadá.

Em posterior exame ao microscópio, verificamos a intensa quantidade de ácido ribonucléico, bem corado no citoplasma das células glandulares de cimento, e para comprovação destes resultados obtidos realizamos um segundo teste para R.N.A. empregando, entretanto, outro corante que é o conhecido Galocianina, com um pH 1.64 ou 1.67. Deixamos outras lâminas neste corante durante 48 horas. O resultado obtido através do corante Galocianina confirmou a grande quantidade de ácido ribonucléico citoplasmático nas células das glândulas de cimento de ambas idades de Balanus tintinnabulum.

Preparação do Azul de Metileno:

pH 4.0 Azul de Metileno 10^{-3} em solução tamponada por acetato de sódio 0,1 M de pH 4,05. $10^{-3}M$

Preparação da Galocianina:

100ml de alumen de cromo a 5%. Juntar 0,3g de Galocianina e ferver durante 5 minutos. Deixar esfriar e filtrar. o pH deve ser 1,64.

Usamos um terceiro teste histoquímico na comprovação dos dados anteriores, através da enzima ribonuclease. Conservamos os cortes hidratados no sentido horizontal e os recobrimos com a ribonuclease. A seguir colocamo-os em uma câmara úmida, na estufa a $50^{\circ}C$ durante 3 horas. Depois disto, os cortes, foram lavados e mergulhados na solução de azul de metileno, técnica semelhante à descrita acima. Devido a digestão do ácido ribonucleico feito pela enzima ribonuclease, não evidenciamos o corante azul de metileno nas células glandulares. Esta técnica comprovou que o material corado, anteriormente pela Galocianina e azul de metileno corresponde ao ácido ribonucleico.

O resultado destas técnicas, anteriormente usadas, foi a prova evidencial de uma grande concentração de ácido ribonucleico nas glândulas de cimento Balanus tintinnabulun, jovens e adultos indicando serem as mesmas positivas para o ácido ribonucleico.

Para testar a presença do grupo vic-glicóis nestas células glandulares, usamos a reação de P.A.S. segundo Mac Manus. Consiste em submergir os cortes histológicos em uma solução aquosa de 0,5% de ácido periódico durante 15 minutos. Depois, lavá-los em água corrente (5 minutos) e deixá-los no reativo de Schiff por alguns 40 minutos. Após, passamos os cortes em

3 banhos de água sulfurosa, para finalmente, fazer ou não uma coloração de fundo.

O resultado indicou-nos uma coloração negativa, ligeiramente rósea, para o reativo de Schiff.

Para a evidenciação e comprovação de polissacarídeos ácidos na constituição da substância intra e extracelular das células de cimento, empregamos a técnica de demonstração pelo corante Alcian Blue. Esta foi introduzida por Stedman (1950) para coloração seletiva de mucinos, sendo empregada atualmente como um bom método para demonstração de polissacarídeos ácidos. Por algumas vezes combinamos este corante com a coloração de P.A.S e outras vezes usamos, somente, o Alcian Blue 8 G.

O procedimento consiste em hidratar os cortes e colocá-los no corante Alcian blue durante 30 minutos. Após, lavamos os mesmos e desidratamos até xilol montando-os, finalmente, em Bálsamo de Canadá. Através deste método verificamos uma acentuada presença de mucopolissacarídeos ácidos nas células glandulares de cimento de indivíduos adultos e jovens de Balanus tintinnabulum e na secreção extra-celular dos jovens.

Constituição do Alcian blue 8 G:

Alcian blue 8G 1%	50ml
Ácido acético a 1%	50ml
Timol	10 a 20 mg.

O pH do Alcian blue foi de 2.2 ou 2.3.

Com a finalidade de verificar, se as glândulas de cimento acumulam proteínas no citoplasma, aplicamos o método de de-

monstração do radical indol que corresponde ao ácido triptofano, segundo Lison, (1960). Consiste em passar as lâminas histológicas do álcool absoluto, mudando duas vezes neste álcool, para ácido acético glacial (1') e depois, deixar em uma mistura denominada P.A.B.A durante 40 minutos. Lavar, após, duas vezes pelo ácido acético glacial e tratar por uma mistura de ácidos e nitrito de sódio durante 3' a 5'. De novo lavar duas vezes pelo ácido acético glacial e, passar 1 minuto pelas duas misturas a) xilol uma parte e ácido acético uma parte e b) xilol - 4 partes e ácido acético uma parte. Finalmente, deixar em xilol 5' e a seguir montagem em Bálsamo de Canadá.

O resultado desta reação para as glândulas de cimento foi negativo, indicando que as glândulas de cimento de Balanus tintinnabulum, jovens e adultos, não acumulam proteínas no citoplasma.

Composição do P.A.B.A.

Mistura A

paradimetilaminobenzaldeído 1g
 ácido acético glacial 30ml
 ácido clorídrico concentrado 10ml.

Mistura B

ácido acético glacial 40ml.
 ácido clorídrico normal 0,3ml.
 nitrito de sódio a 1% 0,7ml.

Através destes métodos, repetidos várias vezes para melhor comprovação dos resultados, verificamos que as glândulas de cimento dos indivíduos de Balanus tintinnabulum tem alto teor de ácido ribonucléico e, portanto, apresentam intensa basofi-

lia removível pelo RNA-ase.

Nas nossas condições de fixações não foi possível detectar a presença de material PAS positivo no citoplasma das células glandulares de cimento.

A secreção intra e extra-celular das glândulas de cimento, mostrou-se fortemente positivo para as reações histoquímicas de polissacarídeos ácidos, indicando ser a mesma enquadrada na classe dos mucopolissacarídeos ácidos.

Não desejando incorrer no risco de alterar, quimicamente, a substância extra-celular e intra-celular nos exemplares de Balanus adultos, não empregamos nenhum descalcificador. Limitamo-nos a fazer o estudo nos adultos, somente, nas células glandulares. Entretanto, nos indivíduos jovens de 3 a 5 dias de idade, e que se fixaram no papel celofane colocado na água do mar, foi-nos possível fazer cortes histológicos sem grandes dificuldades e sem a temida descalcificação, e assim, realizar a análise do cimento intra e extra-celular.

A negatividade da reação para o triptofano indica que nestas células não existe proteínas acumuladas em alta concentração.

Os resultados obtidos através dos métodos aplicados, em relação a secreção intra e extra-celular, podem ser resumidos no seguinte quadro:

Tabela - I

Métodos	Adultos	Jovens	
	Secr. intra Celular	Secr. extra Celular	Secr. intra Celular
P.A.S	-negativa	-negativa	-negativa
Triptofano (P.A.B.A.)	-negativa	-negativa	-negativa
Alcian blue pH 2.2	positiva	positiva	positiva
Galocianina pH 1.6	positiva	-negativa	positiva
Azul de metileno pH 4,0	positivo citocromática	positivo citocromática	positivo citocromática

III. AVALIAÇÃO DA INTENSIDADE DA REAÇÃO OBTIDAS PELA COLORAÇÃO ALCIAN BLUE E GALOCIANINA.

Embora os resultados obtidos, através da histoquímica, nos mostrasse ser a secreção intra e extra-celular um tipo de mucopolissacarídeo ácido, resolvemos aumentar nossos conhecimentos a cerca desta secreção, responsável pela fixação dos Balanidae aos diferentes substratos, fazendo o análise histofotométrico da concentração da secreção intra e extra-celular.

O histofotômetro permite-nos expressar, numêricamente, a intensidade de coloração de um material em corte histológico, após uma reação histoquímica conhecida. Tendo feito diversas reações histoquímicas para a classificação da secreção na célula e no substrato, verificamos a necessidade de saber, em que quantidade aproximada esta é formada, e assim, usamos o Histofotômetro Reichert.

O processar do trabalho, foi o seguinte: Escolhemos alguns cortes histológicos contendo maior número de células glandulares nos indivíduos jovens e adultos fixados em Bouin água do mar; Bouin normal, formol-fosfato e Susa. Após, separamos as lâminas coradas pelas diferentes reações histoquímicas de Alcian blue e Galocianina, visto a secreção extra-celular e as glândulas de cimento apresentarem reação fortemente positiva para ambos os corantes. Para os métodos P.A.S e de Trip-tofano, conforme mencionado anteriormente, o cimento e as glândulas apresentaram resultados negativos e, assim sendo, não nos interessou histofotometrar estas lâminas.

Dividimos o conjunto de lâminas histológicas em três grupos, levando em consideração o fixador e o corante usado. Assim, tivemos:

1º grupo: Avaliação da concentração do material Alcian blue positivo no citoplasma das células de cimento de Balanus tintinnabulum de indivíduos jovens e adultos.

2º grupo: Avaliação da concentração do material Galocianina positivo no citoplasma das células glandulares de cimento de indivíduos jovens e adultos de B. tintinnabulum.

3º grupo: Avaliação da concentração do material Alcian blue positivo na secreção intra-celular e extra-celular, em indivíduos jovens de B. tintinnabulum.

Realizamos tôdas as medidas no microfotômetro Reichert nas condições seguintes: objetiva de aumento 63X e de abertura numérica 0,75; condensador aplanático e acromático de $A=1,35$; iluminação de Kohler; a abertura de medida no aparelho foi tal a corresponder a uma área circular do citoplasma de $6,5\mu$ de diâmetro ou em outros casos de $4,0\mu$; comprimentos de onda de $600m\mu$ para as medidas do material Alcian blue positivo e de $540m\mu$ para o Galocianina positivo. Para cada animal escolhemos 7 células e em cada célula foram realizadas 4 medidas em áreas diferentes para os animais adultos e 3 medidas para os jovens. Utilizamos a média das densidades ópticas das 4 ou 3 medidas como representando a densidade óptica da célula.

IV. TRATAMENTO ESTATÍSTICO DOS DADOS

Os dados coletados foram submetidos à análise de variância. Ilustraremos a título de exemplo como tal análise foi executada, quando confrontamos a concentração relativa (expressos em unidades arbitrárias, densidade óptica x 1000) do material Alcian blue positivo das células glândulares do cimento, de animais jovens e adultos, fixados em líquido de Bouin normal. Nas colunas a e b estão, respectivamente, as médias dos valores em unidades arbitrárias (3 medidas por células para os animais jovens e 4 medidas por células para os animais adultos) de cada célula medida no animal jovem e no adulto.

Jovem	Adulto	
<u>a</u>	<u>b</u>	
262	517	$n_a = 7$, número de medidas no animal <u>a</u> .
489	550	$n_b = 7$, número de medidas do animal <u>b</u> .
314	404	$n = n_a + n_b = 14$.

Jovem	Adulto
<u>a</u>	<u>b</u>
262	422
344	363
283	439
<u>320</u>	<u>397</u>

Médias $\bar{x}_a = 325$ $\bar{x}_b = 442$

$Sx_a = 2.274$ $Sx_b = 3.092$

$Sx_a^2 = 775.831$ $Sx_b^2 = 1.393.188$

As médias do grupo jovem \bar{x}_a , e adulto \bar{x}_b bem como as respectivas somas dos valores Sx_a , e Sx_b e as respectivas somas dos quadrados Sx_a^2 e Sx_b^2 , também estão indicadas na base das colunas a e b.

O termo de correção C foi calculado do seguinte modo:

$$C = \frac{(Sx_a + Sx_b)^2}{n} = \frac{(2274 + 3092)^2}{14} = 2.056.711$$

A soma dos quadrados da variação total, para n-1 graus de liberdade (GL) é:

Variação total: $Sx_a^2 + Sx_b^2 - C = 774.831 + 1.393.188 -$

$- 2.056.711 = 112.308$ (para 14-1 GL = 13 GL).

A soma dos quadrados da variação devida a "diferença entre idades" ou "tratamento" (como são 2 grupos, o número de graus de liberdade associado é 2-1 = 1 GL) é:

$$\text{Tratamento} = \frac{(Sx_a)^2}{n_a} + \frac{(Sx_b)^2}{n_b} - c = \frac{(2274 + 3092)^2}{7} - c =$$

$$= 47.794 \text{ (para 2-1 + 1 GL)}$$

Com os valores acima construímos o quadro da análise de variância.

Análise de variância dos valores das concentrações (relativas) do material Alcian blue positivo do citoplasma das células glandulares do cimento de Balanus, jovem e adulto, fixadas em Bouin Normal.

Fonte de Variação	Soma dos quadrados	Graus de Liberdade	Quadrado médio	Valor de "F" (A/B)	P
A - Tratamento	47.794	1	47.794	8,89	0,05
B - Erro residual	64.514	12	5.376		
Variação total	112 308	13			

O valor de "F" obtido 8,89 para 1 e 12 GL, indica que a diferença entre as médias (325 para o jovem e 442 para o adulto) é significativa ao nível de probabilidade $P = 0,05$.

A partir do quadrado médio do erro residual podemos estimar o desvio padrão das medidas (σ) que é a raiz quadrada daquele valor. O desvio padrão comum aos dois grupos é:

$$\sigma = \sqrt{5376} = 73,3$$

A partir do desvio padrão calculamos o erro padrão da média (EPM) que por ser comum aos dois grupos aparecerá nas tabelas com um mesmo valor diante das médias dos grupos aparecerá nas tabelas como um mesmo valor diante das médias dos grupos comparados.

$$EPM = \frac{\sigma}{n} = \frac{73,3}{7} = 27,8.$$

V. ANÁLISE DAS TABELAS OBTIDAS

Os resultados das medidas histofotométricas bem como os das respectivas análises de variâncias (executadas segundo o modelo apresentado no item IV.), e das quais nós indicamos apenas o valor de "F" obtidos com os respectivos níveis de probabilidade do material Galocianina positivo e Alcian blue positivo, no citoplasma das células glândulares de cimento de *Balanus tintinnabulum*, jovens e adultos, são apresentados nas tabelas II e III. Na tabela IV estão os resultados referentes à medida do material Alcian blue positivo no cimento extracelular e do citoplasma das células de *Balanus tintinnabulum* jovens. O exame da tabela II mostra que, com exceção das medidas feitas em células fixadas em Susa, a concentração média do material Galocianina positivo no citoplasma das células dos animais jovens revelou-se, significativamente, maior que aquela dos animais adultos. Com relação à esses dados podemos então dizer, que tanto nos animais jovens como nos adultos as células glandulares de cimento coram-se intensamente pelo Azul de metileno a pH= 4,0 e pela Galocianina (veja tabela I). Estas colorações são removíveis pela ribonuclease. A concentração média do RNA plasmático é avaliada citocimicamente, sendo maior nos jovens que nos adultos.

O exame da tabela III indica que nos exemplares, fixados

em Bouin normal, formol-fosfato e Susa, a concentração média do material Alcian blue positivo no citoplasma das células glandulares do cimento foi, significativamente (com $P < 0,05$ para o Bouin normal e $P < 0,01$ para o formol-fosfato e Susa) maior nos Cirripédios adultos que nos jovens.

A tabela IV mostra que para os três fixadores empregados, isto é, Bouin normal, formol-fosfato e Susa, a concentração (relativa) do material Alcian blue positivo no cimento extracelular do Balanídeo jovem é, significativamente, maior que aquela do citoplasma das células glandulares do cimento, do mesmo animal.

As tabelas apresentadas permitem ver, também, que a concentração (relativa) tanto do material Alcian blue positivo do citoplasma como do material Galocianina positivo variou, apreciavelmente, nos indivíduos fixados nas várias misturas fixadoras. Em outras experiências repetimos as observações apresentadas nas tabelas II, III e IV. A apreciação qualitativa dos preparados não permitiu constatar nenhuma discrepância com os dados quantitativos agora apresentados, tanto, no que se refere às diferenças entre jovens e adultos como aos diferentes efeitos dos vários fixadores na preservação do material Alcian blue positivo e Galocianina positivo. Como a basofilia indicativa do ácido ribonucléico é muito intensa, imaginamos se a basofilia devida ao Alcian blue não poderia ser, em parte ao menos, devida à alta concentração do RNA citoplasmático das células glandulares do cimento. Vale dizer que, desde já na literatura à nossa disposição menciona-se que o Alcian blue é incapaz de corar o ácido ribonucléico da célula (Morwaj, 1963). Submetemos cortes de Balanus fixados em Susa, Bouin água do mar, Bouin normal e formol-fosfato à digestão pela ribonuclease segundo as indicações de Gonçalves e Haddad (1966). As lâminas foram imersas em solução de ribonuclease cristalina

(cristalizada três vezes) a 0,5 mg/ml em água destilada com pH 7,0, durante 4 horas a 37° c. Lâminas contrôles foram tratadas pela água a pH 7,0 nas mesmas condições. Em seguida, os preparados foram corados pelo Alcian blue pH 2,3 e outros corados pelo Galocianina. Constatamos que a RNA-ase remove quase toda a basofilia corável pela Galocianina.

Em um dos Balanus adultos fixados em Susa fizemos as medidas histofotométricas do material Alcian blue positivo e Galocianina positivo em preparados tratados pela RNA-ase (segundo a técnica referida) e em preparados contrôles tratados pela água com pH 7,0. Em cada célula fizemos medidas em quatro diferentes áreas de 4 μ de diâmetro; usamos a média dessas quatro medidas como representando uma estimativa da concentração, no citoplasma (relativa) do material corado.

Na tabela seguinte (tabela V) estão os resultados das medidas:

Tabela I

Métodos e análises das lâminas (Vêja página 8 do texto).

Tabela I

Concentração de material Galocianina no citoplasma das glândulas de cimento de Balanus tintinnabulum. Expresso em unidades arbitrárias.

Balanus tintinnabulum Fixadores	ADULTOS	JOVENS	Valor de "F" entre C e D	Nível de Probabilidade
Bouin água do mar	276 ± 27,6	520 ± 27,6	39,14++	P < 0,01
Bouin normal	196 ± 12,0	246 ± 12,0	8,90+	P < 0,05
Formol - Fosfato	440 ± 31,7	579 ± 31,7	4,80	P < 0,01
Susa	395 ± 7,5	383 ± 7,5	1,36	P > 0,05

Tabela III

Concentração do material Alcian blue positivo no citoplasma das glândulas de cimento de Balanus tintinnabulum. Expresso em unidades arbitrárias.

<u>B. tintinnabulum</u> Fixadores	ADULTO	JOVEM	Valor estimado de "F" entre A e B	Nível de probabilidade
Bouin água do mar	456 ± 19,8	424 ± 19,8	1,31	P > 0,05
Bouin normal	442 ± 27,8	325 ± 27,8	8,89 ⁺	P < 0,05
Formol Fosfato	391 ± 16,9	140 ± 16,9	110,51 ⁺⁺	P < 0,01
Susa	1046 ± 39,2	346 ± 39,2	16,01 ⁺⁺	P < 0,01

Tabela IV

Concentração do material Alcian blue no cimento intracelular e extra celular das glândulas de cimento de jovens de Balanus tintinnabulum.

Expresso em unidades arbitrárias.

<u>B. tintinnabulum</u> Fixadores	Cimento intracelular	Cimento extra celular	Valor de "F"	Nível de Probabilidade
Bouin normal	394 ± 30,11	1320 ± 30,11	474,47 ⁺⁺	P < 0,01
Formol-Fosfato	702 ± 33,25	1247 ± 33,25	112,20 ⁺⁺	P < 0,01
Susa	1268 ± 40,71	1442 ± 40,71	9,14 ⁺	P < 0,05

Tabela V

Efeitos da digestão pela ribonuclease sobre a intensidade da basofilia citoplasmática, em células glandulares do cimento de B. tintinnabulum (fixadas em Susa), devida aos materiais Alcian blue positivo e Galocianina positivo.

Tratamento	a) Concentração relativa do material Alcian blue positivo	b) Concentração relativa do material galocianina positivo
Água destilada (controle)	596 ± 18,0	833 ± 16,9
Digestão pela Ribonuclease	184 ± 6,50	178 ± 10,5

Médias de medidas feitas em 10 células diferentes com os respectivos erros padrão da média:

a = densidade óptica medida em 600 mμ

b = densidade óptica medida em 540 mμ

Os dados mostram que neste caso a ribonuclease removeu cerca de 78% do material galocianina positivo e que removeu, também, cerca de 69% do material Alcian blue positivo.

Fizemos ainda em cortes provenientes de Balanus fixados em Bouin normal, formol-fosfato e Susa, a hidrólise ácida segundo Quintarelli e col., para a pesquisa do ácido siálico. A presença do ácido siálico se traduz por uma diminuição da colorabilidade pelo Alcian blue, após a hidrólise ácida. Em nosos preparados submetidos à hidrólise ácida constatamos em células glandulares do cimento a diminuição (aparentemente da mesma ordem de grandeza) da coloração citoplasmática tanto pe

lo Alcian blue como pelo Galocianina.

Submetemos ainda as células glandulares de cimento usando os mesmos fixadores, à ação da hialuronidase testicular (utilizamos o produto comercial Hyalozima da Opoterápica Nespa) em técnica semelhante a usada por Quintarelli. Após a ação desta preparação de hialuronidase, a coloração do citoplasma das células glandulares do cimento permaneceu inalterada.

Hidrólise ácida segundo Quintarelli e col.

acetato de sódio a 0,2 N 1 parte

ácido clorídrico a 0,02N 1 parte

O pH é 2,5.

Hidrolizamos os cortes durante 2 horas, na estufa a 55°C. Para contrôlo do método usamos outras lâminas cobertas com soro fisiológico (cloreto de sódio a 0,85%).

Após, submetemos os cortes às colorações de Alcian blue e Galocianina e o resultado foi a diminuição da intensidade de coloração em ambos os corantes, indicando a presença do ácido siálico nestas células glandulares de Balanus tintinnabulum.

Hialuronidase segundo Quintarelli e col.

1ª Solução Fosfato dissódico anidro M/10 Solução tampão
Sørensen
Fosfato monossódico anidro M/10 a pH 6,5

1 ml da solução tampão

2ª solução Hialozima 200 unidades turbo redutora (U.T.R)
pH 6,5.

Colocamos em uma 1ª série de lâminas a hialuronidase, na

estufa a 37°C durante 24 horas. Como teste, uma 2ª série de lâminas somente com a solução tampão.

Após, coramos pelo Alcian blue e Galocianina e verificamos que não houve alteração na coloração citoplasmática.

VI. APRECIACÃO DOS RESULTADOS

Os estudos histoquímicos bem como a histofotometria das glândulas de cimento, de indivíduos jovens e adultos de Balanus tintinnabulum, levou-nos a interessantes resultados que poderão facilitar posteriores estudos bioquímicos do cimento. O análise histoquímico da secreção intra e extracelular foi realizado, somente, em exemplares jovens, de uma semana de idade, onde não houve a necessidade de uma descalcificação. Em adultos receiosos de alterarmos o análise do cimento pela descalcificação, limitamos nossos estudos, somente, as células glandulares.

Empregamos as técnicas histoquímicas, comuns na evidênciação do ácido ribonucléico, verificando a sua ocorrência em quantidade nestas células glandulares de jovens e adultos. Inicialmente utilizamos as técnicas pelos corantes Azul de Metileno e Galocianina (Lison, 1960).

Para comprovarmos que o material, intensamente corado, correspondia ao ácido ribonucléico fizemos o teste pela enzima ribonuclease. O resultado deste teste foi positivo, indicando grande concentração de ácido ribonucleico nas células glandulares do cimento e na secreção intracelular de Balanus tintinnabulum, jovens e adultos.

Pelo método de Mac Mannus realizamos a reação de P.A.S.

O resultado foi negativo para glucídios neutros com ligeira coloração rósea do reativo Schiff.

Para demonstração de polissacarídeos ácidos na secreção intra e extracelular destas glândulas usamos o corante Alcian blue, observando que estas células ficam fortemente positivas o que indica grande acumulação de polissacarídeos ácidos no seu citoplasma e na região de adesão do animal com o substrato.

Aplicamos o método de Triptofano (veja Lison, 1960) para observações sobre o acúmulo ou não de proteínas no citoplasma.

As informações assim obtidas indicaram que as glândulas de cimento não armazenam proteínas no seu interior, porém, devemos ressaltar que estas podem ser formadas e imediatamente lançadas para o exterior, em forma de secreção. Os resultados destas técnicas estão resumidas na tabela I, incluída no texto.

Separamos as lâminas histológicas da região glandular dos Balanus contendo maior número de células de cimento, nos exemplares jovens e adultos, de acordo com os fixadores empregados e as colorações usadas.

Fizemos 4 medidas para cada célula glandular em diferentes áreas do citoplasma. O número de células para cada corte corresponde em um total de 28 medidas para cada lâmina. Os valores numéricos obtidos foram analisados e notamos sua diferença de acordo com os fixadores usados. O formol-fosfato extraiu muito material da glândula juntamente com o fixador Bouin preparado com água do mar. O melhor deles usado, pois conserva bem o citoplasma e a secreção extra-celular foi, aparentemente, o fixador segundo Susa. A confecção deste, porém, já foi alterada, anteriormente, durante o trabalho histológico-

co das Glândulas de cimento e seus canais (Lacombe, 1966).

Finalmente, resumimos todos os dados encontrados em 5 tabelas, que procuram explicar os resultados a que chegamos em relação a estas células e a sua secreção.

Em células de mamíferos o Alcian blue não cora o RNA citoplasmático (Mowry, 1963). Em glândula salivar do inseto (Kato e Sirlin, 1963) constataram que a RNAase remove um pouco da basofilia, devida ao material Alcian blue positivo. Interpretando êste fato, os autores mencionam que isso não quer, necessariamente dizer, que o Alcian blue esteja corando o ácido nucléico, tanto mais que o tratamento pela hialuronidase remove o material Alcian blue positivo. A digestão enzimática pela hialuronidase indica a presença de mucopolissacarídeos ácidos do tipo ácido hialurônico no citoplasma das células da glândula salivar de Smittia.

Nossas observações em células glandulares do cimento em Balanus tintinnabulum, sobre a natureza da basofilia, devida ao material Alcian blue positivo, não foram exaustivas e nem esgotaram o arsenal de testes possíveis. No entanto, mostraram fatos curiosos, quais sejam o de que o tratamento pelo RNAase diminui, apreciavelmente, a colorabilidade pelo Alcian blue e que a hidrólise ácida diminui a colorabilidade pelo Alcian blue e também pelo galocianina. As coisas se passam como se o Alcian blue estivesse se unindo ao RNA citoplasmático.

No entanto, na medida em que a colorabilidade pelo Alcian blue em pH 2,3 a 2,5 é índice fidedigno da presença de mucopolissacarídeo ácidos, devemos aceitar que a célula glandular de cimento secrete êsse tipo de mucopolissacarídeos já que em B. tintinnabulum jovem, o cimento extracelular se cora intensamente pelo Alcian blue. Lembramos, também que a não existên

cia de paralelismo de comportamento, entre a concentração relativa dos materiais Alcian blue positivo e galocianina positivo, no citoplasma das células de Balanus, jovens e adultos (vide tabelas 2 e 3), pode favorecer a idéia que os corantes Alcian blue e Galocianina não estejam necessariamente corando um mesmo material.

VII. SUMÁRIO

É feito um estudo histoquímico e histofotométrico das glândulas de cimento da Balanus tintinnabulum em exemplares jovens e adultos, e da secreção extra-celular destas células, responsáveis diretamente pela adesão destes animais a diferentes substratos. Foram aplicadas diferentes técnicas histoquímicas com a finalidade de se evidenciar os diversos componentes citoplasmático da secreção intra e extracelular.

As glândulas de cimento apresentam intensa quantidade de ácido ribonucléico no seu citoplasma. De acôrdo com os métodos histoquímicos aplicados, estas glândulas em indivíduos jovens e adultos e, ainda sua secreção extra-celular nos jovens apresentam-se negativos para os métodos P.A.S. e Triptofano, porém, positivos para o Alcian blue, Galocianina e Azul de metileno.

Através dos corantes Azul de metileno e Galocianina foi constatado a presença de grande concentração de ácido ribonucléico no citoplasma das glândulas de cimento, removível, sensivelmente, pela ribonuclease.

Foi feita reação de P.A.S. segundo Mac Manus com resultado negativo em relação as glândulas. Para a evidenciação de mucopolissacarídeo ácido foi usado o corante específico Alcian

blue, que comprovou a forte concentração do mesmo no citoplasma das referidas células e na secreção extracelular das glândulas de cimento. Para o teste sobre aminoácidos foi usado o método pelo Dimetilaminobenzoaldeido, que demonstrou a não acumulação de proteínas no citoplasma das células de cimento de B. tintinnabulum.

A secreção das glândulas de cimento fica, através destes estudos, enquadrada no grupo de Mucopolissacarídeos ácidos.

É constatado pelo Histofotômetro a concentração do material corado histoquimicamente. Neste estudo foi levado em consideração três grupos:

- 1) Avaliação da concentração do corante Alcian blue no citoplasma das glândulas de cimento de jovens e adultos.
- 2) Avaliação da concentração do corante Galocianina no citoplasma das glândulas de cimento de jovens e adultos.
- 3) Avaliação da concentração do corante Alcian blue no cimento extra-celular e intra-celular de exemplares jovens de uma semana de idade.

Os fixadores usados para cada grupo foram: Bouin água do mar; Bouin original; Susa e Formol-fosfato.

A maior concentração do RNA citoplasmático nos Balanus jovens do que nos adultos, sugere uma maior síntese protéica nestes animais, provavelmente, para atender as demandas de um crescimento mais rápido.

Foram feitos, também, os testes pela ribonuclease, pela hidrólise ácida e pela hialuronidase.

Pela ribonuclease, constatou-se uma ligeira diminuição na posterior coloração pelo Alcian blue e acentuada remoção do RNA traduzida pela pouca colorabilidade da galocianina.

Pela hidrólise ácida, a diminuição de ambos os corantes deu-se com a mesma intensidade; através da hialuronidase não houve alteração significativa.

VIII. SUMMARY

A histochemic and histophotometric study was made of the cement glands in both young and adult forms of Balanus tinnabulum. In the course of the work, various histochemical techniques were employed in order to show various cytoplasmic components.

It has been verified that the cement glands show a large quantity of cytoplasmic R.N.A.

The cement glands of both young and adult forms and also the extra-cellular cement was found to be P.A.S. negative and Tryptophane negative, although Alcian blue positive, Galocianine positive.

Histophotometric technics measure the concentration of material stained histochemically. This study was concerned with three main points:

- 1) Correlation of the concentration of the stain Alcian blue in the cytoplasm of the cement glands of young

and adult forms.

- 2) Correlation of the concentration of the stain Galocianine in the cytoplasm of the cement glands of young and adult forms.
- 3) Correlation of the concentration of the stain Alcian blue in the extra- and intra-cellular cement in specimens of one week of age.

The fixatives used for each group were: Bouin (sea water) Bouin (normal), Susa and Formalin-phosphate. The number of transmissions per slides was 28, for a total of the 624 measurements.

In all the measurements the corresponding value was found between transmission and optic density.

Finally a statistical analysis is presented of the data obtained by histophotometry and is present in 3 fundamental tables.

The higher concentration of R.N.A in the cytoplasm of young forms of Balanus than that in adult indicates a higher synthesis of proteins in these animals which probably shows a greater necessity of material during the more rapid growing.

There were made also tests for ribonuclease by acid hydrolysis and by hialuronidase.

By ribonuclease we noted a small diminution of the posterior coloration by Alcian blue and an accentuated remotion of R.N.A., indicated by the reduced affinity to galocianine.

After acid hydrolysis we noted the some intensity of diminution of the two stains; by hialuronidase there did not occur a significant alteration.

IX. ZUSAMMENFASSUNG

Es wurden histochemische und histofotometrische Beobachtungen an den Zementdruesen junger und erwachsener Exemplare von Balanus tintinnabulum, sowie an dem extrazellulaeren Sekret der Druesenzellen durchgefuehrt. Es wurden verschiedene histochemische Methoden angewendet mit dem Zweck, die verschiedene Kimponenten der intra- und extrazellulaeren Sekrete festzustellen.

Die Zementdruesen besitzen im Cytoplasma grosse Mengen von RNS. Die Druesen junger und erwachsener Individuen, wie auch das extrazellulaere Sekret der jungen, zeigen negative Reaktion auf PAS und Tryptophan, dagegen positive auf Alcian blue, Galocyanin und Methylenblau.

In Cytoplasma der Zementdruesenzellen wurde mit Methylenblau und Gallocianin eine hohe Konzentration von RNS festgestellt, die durch Ribonuclease leicht entfernt werden kann.

Die PAS-Reaktion nach Mac Manus gab in den Zellen negative Ergebnisse. Fuer den Nachweis von saurem Muco-Polysaccharid wurde als spezifischer Farbstoff Alcian blue angewandt, wodurch eine hohe Konzentration dieser Verbindung im Cytoplasma der Zellen und im extrazellulaeren Sekret der Zementdruesen festgestellt wurde. Durch den Aminosaeuretest mit Dimethylaminobenzoaldehyd wurde nachgewiesen, dass keine Anhaeuftung von Proteinen im Cytoplasma der Zementdruesenzellen der bearbeiteten Art auftritt.

Nach den vorliegenden Beobachtungsergebnissen kann das Sekret der Zementdruesen in die Gruppe der sauren Mucopolysaccharide eingeschlossen werden.

Histofotometrisch wurde die Konzentration des histochemisch gefaerbten Materials festgestellt. Es wurden folgende drei Beobachtungsgruppen in Betracht gezogen:

- 1) Feststellung der Konzentration von Alcian blue im Cytoplasma der Zementdruesenzellen junger und erwachsener Tiere.
- 2) Feststellung der Konzentration von Galocyanin im Cytoplasma der Zementdruesenzellen junger und erwachsener Tiere.
- 3) Feststellung der Konzentration von Alcian blue im intra und extrazellulaeren Sekret eine Woche alter Tiere.

Zum Fixieren wurden in jeder Gruppe verwendet: Bouin (zubereitet mit Meerwasser), Bouin (original), Susa und Formol-Natriumsulfat.

Die hoehere Konzentration von RNS im Cytoplasma junger Tiere laesst eine staerkere Proteinsynthese in diesen als in alten Exemplaren vermuten, was wahrscheinlich mit dem staerkeren Bedarf waehrend des schnellen Wachstums zusammenhaengt.

Es wurden ebenfalls Teste mit Ribonuclease durchgefuehrt: Hierdurch zeigte sich eine leichte Verminderung der folgenden Faerbung mit Alcian blue und eine starke Entfernung der RNS, die sich in der schwachen Faerbbarkeit mit Galocyanin zeigte.

Durch saure Hydrolyse ergab sich eine gleichmaessige Ver-

minderung der Faerbbarkeit mit beiden genannten Farbstoffen; die Anwendung von Hialuronidase ergab keine deutliche Aenderung.

X. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Freiberger, A. and Cologer, C.P., 1965, Rearing Barancles in the laboratory. Naval Research Rev. Oct. 65: 8 - 13, 12 figs.

Fullmer, H., 1960, Effect of Peracetic Acid on the Enzymatic digestion of various Mucopolysaccharides, reversal of the PAS staining reaction of Mucin. Journ. Histochem. and Cytochem., 8 (2): 113 - 121, 4 figs., 2 tbs.

Gruvel, A., 1905., Monographie des Cirripides ou Thecostaces, XII + 472 pages, 427 figs. Masson et Cic. ed., Paris.

Lacombe, D. 1965, Observações sobre a corrosão biológica em placas de aço na Baía de Guanabara. Notas Técnicas do Instituto de Pesquisas da Marinha do Rio de Janeiro, 22: 1 - 20 pages., 30 figs.

Lacombe, D., 1966, Glândulas de cimento e seus canais em *Balanus tintinnabulum* (Cirripedia - Balanidae). Notas Técnicas do Instituto de Pesquisas da Marinha. 32: 1 - 39 pages., 12 figs., VI pranchas com 36 fotogr.

Lison, L., 1958, Statistique appliqué à la biologie expérimentale. La planification de l'expérience

et l'analyse des résultats. 346 págs., Gauthier-Villars, ed., Paris.

Lison, L., 1960, Histochemie et Cytochimie animales. Principes et Méthodes. Vols. I e II. XII + 842 págs., 30 figs., Gauthier-Villars, ed. Paris.

Meyer, K., and colab, 1941, Hyaluronidases of Bacterial and animal origin. Jour. Exp. Med., 73(3): 309 - 326.

Meyer, K., 1947, The Biological significance of Hyaluronic acid and hyaluronidase. Physiological 27/(3): 335 - 359.

Mowry, , 1963, The special value of Methods that color both acidic and vicinal Hydroxyl groups in the Histochemical study of Mucins with revised directions for the colloidal iron stain, the use of Alcian blue G8 and their combinations with the periodic acid-schiff reaction. Ann. N.Y. Acad. Sci., 106 : 402 - 423.

Quintarelli, G., and col. 1961, Studies of Sialic acid containing mucins in bovine submaxillary and rat sublingual glands. Journ Histochem. and Cytochem. 9(2): 176 - 183, 21 figs. 1 pr. 2 tbs.

Quintarelli, G., 1963, Histochemical Identification of Salivary Mucins. Ann. N.Y. Acad. Sci., 106: 339 - 363, 16 figs., 1 tb.

Spicer, S.S. and Warren, L., 1960, The hystochemistry of sialic acid containing mucoproteins. Journ. Histochem and Cytochem., 8(2): 135 - 137.

**PARA POSTERIORES CONSULTAS OU INFORMAÇÕES
DIRIGIR-SE AO ENDEREÇO ABAIXO:**

**INSTITUTO DE PESQUISAS DA MARINHA
MINISTÉRIO DA MARINHA - RIO DE JANEIRO
TEL. :
CETEL: 06 - 96-2040**