PRODUÇÃO DE MUCINA NEUTRA E ÁCIDA AO LONGO DO DESENVOLVIMENTO DO INTESTINO DE GALINHAS.

Bruno Hartmann (PIBIC/Fundação Araucária/UEPG), Yasmin Fidler, Nauana Hay Paiva, Maria Marta Loddi, Maria Albertina de Miranda Soares e José Rosa Gomes (Orientador), e-mail: 1967jrgomes@gmail.com

Universidade Estadual de Ponta Grossa/Departamento de Biologia Estrutural Molecular e Genética.

Área: biologia geral
Subárea: biologia celular; morfologia; embriologia

Palavras-chave: células caliciformes, intestino, mucinas, galinha

Resumo

Este estudo teve por objetivo investigar, por meio de reação histoquimica, a produção de mucina neutra e ácida pelas células caliciformes no epitélio intestinal de galinhas (Galus galos) com diferentes idades ao longo do desenvolvimento. Cortes do intestino, montados em laminas, foram submetidos a 2 tempos diferentes para a reação do acido periódico de Schiff (PAS) e para mucinas ácida pelo Alcian Blue pH 2.7. Para controle das reações foi incluída uma lâmina com corte de intestino de rato. Os resultados mostraram que o melhor tempo para evidenciar tanto mucina neutra quanto ácida são 2 horas e 3 horas respectivamente. Comparado com o rato foi observado uma reação menos intensa para mucina do tipo neutra enquanto que a mucina ácida é observadaa em todos os tempos avaliados. Conclui-se que em galinhas, diferentemente do que ocorre em mamíferos, há um predomínio na produção de mucina ácida comparada com as neutras, ao longo do desenvolvimento do intestino sugerindo uma relação com o hábito alimentar e possivelmente com a microbiota intestinal.

Introdução

O tempo do desenvolvimento de aves é semelhante ao de ratos, ou seja cerca de 21 dias, entretanto enquanto ratos tem um desenvolvimento interno e está sob o controle nutricional da mãe via placenta, em aves o desenvolvimento é externo sendo a nutrição fornecida pela reservas nutritivas do ovo. Em relação ao desenvolvimento e diferenciação do epitélio intestinal, a literatura mostra que as fases do desenvolvimento são muito semelhantes tanto em aves quanto em ratos. A diferenciação em ambos animais partem de um epitélio estratificado que aos poucos se diferencia em estruturas funcionais denominadas de vilosidades intestinais. As vilosidades são de crucial importância para o funcionamento do intestino e do organismo, uma vez que ampliam a sua superfície, aumentando a absorção de água, íons e nutrientes provenientes dos alimentos. (PAIVA, 2017)

Para executar suas funções, o epitélio que forma as vilosidades intestinais contém diferentes tipos de células, resultantes do processo de diferenciação que pode iniciar durante o período intra-uterino ou intra-ovo mas que é finalizado após a eclosão ou o nascimento. Estudos sugerem que após o nascimento a diferenciação das células do epitelio intestinal é influenciada ou controlada pela hábito alimentar mas também pela influencia da microbiota existente na luz intestinal.

Uma das células presentes no eptelio intestinal e que tem merecido destaque na literatura recente são as células caliciformes que são responsáveis pela produção de uma camada de glicoproteinas denominadas de mucina e que formam diferentes camadas ao redor do epitelio. De modo geral as mucinas podem ser classificadas como neutras ou ácidas. Resultados recentes da literatura, em mamíferos tem mostrado o importante papel das mucinas na proteção do organismo contra a ação de determinadas toxinas produzidas pela microbiota intestinal, especialmente algumas que podem desencadear processos inflamatórios que podem levar a síndrome metabólica. Resultados recentes do nosso laboratório (GOMES et al., 2017) mostraram que durante o desenvolvimento do epitelio intestinal de ratos ocorre o predomínio de mucina neutra. Entretanto, em aves ainda não se tem relato se esse predomínio é semelhante. Dessa forma o objetivo desse estudo preliminar foi investigar, por meio de reação histoquímica, a produção de mucina neutra e ácida pelas células caliciformes no epitélio intestinal de galinhas (Galus galos) com diferentes idades ao longo do desenvolvimento.

Materiais e Métodos

Idades e coleta do intestino: este experimento foi aprovado pela CEUA-..... As idades avaliadas foram; embriões com 18, 20 e 21 dias e pintinhos com 1,7 e 14 dias. Em cada tempo os animais foram sacrificados após leve analgesia com isofluorano e os fragmentos da região do jejuno foram coletadas.

Processamento histológico: Os fragmentos foram f**ixados em paraformaldeído 2%,** desidratados em soluções crescentes de etanol (70% a 100%), por 60 minutos cada, à temperatura ambiente, e diafanizados em xilol, por 2 vezes, por 30 minutos cada, à temperatura ambiente. Os fragmentos foram emblocados em parafina. Cortes seriados longitudinais de 5 µm foram obtidos, e submetidos a reação de ácido periódico de Schiff (PAS) e Azul de Alcian pH 2.7. O tempo para cada protocolo foi alterado de acordo com testes feitos para a observação das estruturas em estudo coradas. A reação de PAS baseia-se na oxidação de radicais 1,2-glicol de polissacarídeos pelo ácido periódico, gerando resíduos de aldeído, os quais podem ser revelados pelo reagente de Schiff. Já o Alcian Blue promove dissociação dos radicais -COOH e HSO_3 dos carboidratos, os quais formam complexos corados com o Alcian Blue.

Teste dos tempos de reação: o tempo de protocolo das reações comumente usados na literatura para intestino de ratos foi testado previamente e se observou que a coloração ficava muito fraca; então se decidiu fazer um teste com tempos maiores para verificar se o tempo da reação influenciava na evidenciação das células caliciformes e munias correspondentes. Para PAS foram testados os tempos de 1 e 2 horas de coloração. Para a reação com Alcian Blue foram testados os tempos de 1hora e 30 minutos e 3 horas. Para um controle positivo das reações, em cada tempo testado, foi colocada uma lamina contendo corte de intestino de rato

adulto cujo tempo de coloração descrito na literatura é suficiente para evidenciar tanto mucina neutra e ácida.

Para a coloração em PAS os cortes foram rapidamente lavados em água destilada, por duas vezes, e imersos em ácido periódico 0,5%, por 1 hora. Os cortes foram lavados em água destilada, por 3 vezes, e submetidos ao reativo de Schiff, por 1 e 2 horas. Após esse tempo, os cortes passaram por 3 banhos de água sulfurosa, por 5 minutos cada, e foram lavados em água corrente, por 10 minutos, corados com hematoxilina de Harris, por 1 minuto, desidratados em soluções alcoólicas crescentes (70% a 100%), por dois minutos cada, e montados com lamínula usando a resina Permount.

Para a coloração Azul de Alcian (pH 2.7), nos dois tempos testados os cortes foram desparafinizados, lavados em água destilada, imersos em Azul de Alcian, lavados em água corrente por 5 minutos, em água destilada e contracorados com Safranina 0,1% por 1 minuto, desidratados em soluções alcoólicas crescentes (70% a 100%), por 2 minutos cada, e montados com lamínula usando a resina Permount.

Resultados e Discussão

As análises histológicas permitiram perceber que há variação na distribuição das células ao longo do tempo. A distribuição de células caliciformes coradas com PAS (mucina neutra) e azul de Alcian (mucina ácida) apresentou algumas variações nas vilosidades, indicando uma distribuição espacial e temporal ao longo do desenvolvimento do intestino delgado nas idades avaliadas.

Para a coloração de Alcian Blue, só a partir do dia 21 (intra ovo) foi possível observar a presença de mucina ácida nas vilosidades intestinais e, ao longo das idades avaliadas 1, 7 e 14 dias (pós ovo) é evidente o predomínio de células caliciformes produzindo mucina ácida. Em relação aos testes dos tempos de reação foi possível observar que o tempo de 3 horas, apresentou células mais intensamente coradas.

Para a Coloração PAS, percebe-se que nos dias 18 e 20 (intra ovo), não há presença de células com características morfológicas semelhantes a caliciformes, entretanto, há presença de glicoproteínas neutras em células indiferenciadas no epitelio. No dia 21 (intra ovo), são observadas células com formato de caliciformes entretanto, não apresentavam reação positiva para PAS indicando a ausência de mucina neutra nessa idade e em nenhum dos tempos de reação avaliados. Células caliciformes com a presença de mucinas básicas são observadas somente no dia 01 (pós ovo), não apresentando diferença ente os testes de tempo 01 e 02, e com intensidade de reação fraca quando comparada com a do epitelio intestinal de ratos utilizado com controle. No dia 07 (pós ovo), as células caliciformes são observadas e apresentam diferença na reação para as mucinas entre os tempos avaliados. Com 1 hora houve apenas a definição da forma da célula caliciforme PAS positiva, e no tempo de 2 horas, as células caliciformes apresentaram-se mais coradas. Aos 14 dias (pós ovo) a forma das células e a intensidade da reação para o PAS acompanha a descrição feita para o dia 07.

Em microscopia de transmissão é possível notar que o conteúdo das células caliciformes se acumulam na região apical da célula e compõem os grânulos de secreção recém liberados pelo complexo de Golgi. Em microscopia eletrônica de transmissão é possível observar que cada granulo é envolvido por uma membrana.

Entretanto, em microscopia de luz é possível observar em células caliciformes do epitélio de rato, por exemplo, que a região apical das células apresentam uma reação homogênea tanto para mucinas ácidas quanto para básicas. Já no epitélio das galinhas é possível observar que o conteúdo da região apical não se apresenta homogêneo, sendo notado que algumas regiões possuem uma maior intensidade da reação. Essas regiões são mais periféricas sugerindo que possam ser as regiões das membranas que envolvem os grânulos, o que pode indicar uma diferença na composição química de mucina neutra e básica entre aves e ratos. Outra característica interessante que podemos notar é que diferentemente do que ocorre em ratos é que durante todas as fases do desenvolvimento do epitélio intestinal de aves o predomínio é de mucina ácida indicando talvez uma forte relação diferencial com a funcionalidade dessas proteínas e o conteúdo luminal, seja o alimento ou a microbiota ao qual a ave estará sujeita ao se tornar adulta (LILJA, 1983; NOY; SKLAN, 2001,(DYCE; SACK; WENSING, 2010).

Conclusões

Conclui-se que no epitélio de galinhas, são necessários tempos maiores de reação com os corantes para melhor evidenciar as mucinas e que diferentemente do que ocorre em mamíferos, há um predomínio na produção de mucina ácida comparada com a neutra ao longo do desenvolvimento do intestino.

Agradecimentos

Ào laboratório de técnicas histológicas M60 e ao CNPq pela concessão de bolsa de mestrado para a aluna Nauana Hay Paiva que realizou os experimentos desse projeto.

Referências

BACHA, W.J.J.; BACHA, L.M. Digestive system.In:_____. **Color atlas of veterinary histology**. 2.ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2000. cap. 13, p. 119-162.

PAIVA, Nauana Hay. O papel da bifurcação das projeções da mucosa durante a morfogênese das vilosidades intestinais em embriões de galinhas. 2017. 45 páginas. Dissertação (Mestrado em Ciências Biomédicas) - Universidade Estadual de Ponta Grossa. Ponta Grossa, 2017.

DYCE, K.M.; SACK, W.O.; WENSING, C.J.G. **Tratado de Anatomia Veterinária**. 4. ed. Rio de Janeiro: Elsevier Saunders, 2010. 834p.

GOMES, J.R. et al. Goblet cells and intestinal Alkaline phosphatase expresson (IAP) during the development of the rat small intestine. Acta Histochem. 2017, 119(1); 71-77.