



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO - UFPE  
CENTRO ACADÊMICO DE VITÓRIA - CAV  
Curso de Graduação em Licenciatura em Ciências Biológicas

**ANÁLISE HISTOQUÍMICA DAS CÉLULAS MIOEPITELIAIS E DO  
COLÁGENO PRESENTE NO OCTOCORAL *CARIJOA RIISEI*  
(CNIDARIA: ANTHOZOA) ENCONTRADO NO LITORAL SUL DE  
PERNAMBUCO**

**Vitória de Santo Antão, 2010**



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO - UFPE  
CENTRO ACADÊMICO DE VITÓRIA - CAV  
Curso de Graduação em Licenciatura em Ciências Biológicas

**ANÁLISE HISTOQUÍMICA DAS CÉLULAS MIOEPITELIAIS E DO  
COLÁGENO PRESENTE NO OCTOCORAL *CARIJOA RIISEI*  
(CNIDARIA: ANTHOZOA) ENCONTRADO NO LITORAL SUL DE  
PERNAMBUCO**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Graduação em Licenciatura em Ciências Biológicas pela aluna Meiriane Tamiris Sena da Cunha sob orientação da profa. Dra. Erika Maria Silva Freitas, como requisito para incremento de Carga Horária de Atividades Complementares do Curso de Licenciatura em Ciências Biológicas.

**Vitória de Santo Antão, 2010**

Catálogo na fonte  
Sistema de Bibliotecas da UFPE - Biblioteca Setorial do CAV

- C973a Cunha, Meiriane Tamiris Sena da  
Análise histoquímica das células mioepiteliais e do colágeno presente no Octocoral *carijoa riisei* (Cnidária Anthozoa) encontrado no Litoral sul de Pernambuco / Meiriane Tamiris Sena da Cunha. - Vitória de Santo Antão: O Autor, 2010.  
34 folhas: il.; fig.; graf.
- Monografia (Graduação) - Universidade Federal de Pernambuco. CAV. Ciências Biológicas, 2010.
- Inclui bibliografia e anexo.
1. Biologia marinha. 2. Invertebrado marinho – Litoral Sul (PE). 3. *carijoa riisei*. 4. Anthozoa. I. Título.
- CDD (21.ed.) 593.6

## **Agradecimentos**

Agradeço primeiramente a Deus, por ter iluminado os meus caminhos me dando forças permitindo chegar onde estou.

Aos meus pais que vem acompanhando de perto essa longa trajetória estando sempre ao meu lado.

Não posso deixar de agradecer a minha orientadora professora Dra. Erika Maria Silva Freitas pela dedicação, paciência, compromisso, confiança e amizade que vem tendo nesses anos de trabalho, estando sempre presente contribuindo de uma forma especial para minha formação.

Aos meus co-orientadores professores Dr. Carlos Daniel Pérez e Dr. Cristiano Aparecido Chagas pela dedicação e apoio estando sempre dispostos a nos ajudar no que fosse preciso.

A FACEPE e CNPq pelo apoio financeiro para execução deste trabalho.

Vitória de Santo Antão, 13 de dezembro de 2010.

**Banca examinadora:**

---

Profa. Dr. Érika Maria Silva Freitas (Orientadora)

---

Prof. Dr. Carlos Daniel Pérez

---

Prof. Dr. Cristiano Aparecido Chagas

---

Profa. Dra. Angélica Maria Kazue Uejima (Suplente)

## RESUMO

O cnidário *Carijoa riisei* é um invertebrado marinho encontrado no litoral de Pernambuco. São corais moles e seu corpo possui duas camadas germinativas, a epiderme e a gastroderme. Esse trabalho teve como objetivo avaliar as células mioepiteliais presentes na ectoderme e gastroderme, identificando sua disposição e suas características histoquímicas, e a presença de colágeno na mesogléia desses animais. As espécies foram coletadas na praia de Porto de Galinhas, litoral sul pernambucano, fixadas em solução de formoldeído a 10% e processadas para microscopia óptica. Cortes histológicos foram submetidos à realização da coloração hematoxilina e eosina e as técnicas histoquímicas dos Tricrômicos de Masson e Mallory. Os resultados mostraram que o pólipó apresenta uma extremidade oral e uma extremidade aboral, com revestimento epitelial externo (ectoderme) e na cavidade do celêntero (gastroderme), como já descritos para outros octocorais na literatura. As técnicas histoquímicas demonstraram a presença de células epiteliais com características semelhantes às fibras musculares, de fibras colágenas na região da mesogléia e de nematocistos (cnidocistos), localizadas na região da gastroderme desse animal. Os dados histoquímicos comprovam a existência de células mioepiteliais na região da ectoderme e gastroderme, corroborando com a hipótese da evolução de células musculares a partir de animais diblásticos e a presença da proteína colágeno na mesogléia desse octocoral.

Palavras-chave: *Carijoa riisei*, células mioepiteliais, colágeno, histoquímica

## Sumário

Introdução .....	8
Revisão de literatura .....	11
Objetivos .....	17
Hipóteses ou questões a investigar .....	18
Metodologia .....	19
Resultados .....	21
Discussão .....	25
Conclusões .....	27
Apoio financeiro .....	28
Referências bibliográficas .....	29
Anexos .....	32

## 1. INTRODUÇÃO

Os cnidários formam um grande grupo de invertebrados aquáticos, predominantemente marinhos, apresentando ampla diversidade de formas, tamanhos e cores. São encontrados em todos os mares do mundo, desde o mediolitoral até zonas abissais, nas formas solitária, colonial ou vivendo em associações com outras espécies. O filo Cnidaria está dividido nas classes Hydrozoa, Anthozoa, Cubozoa, Scyphozoa e Staurozoa (Marques e Collins, 2004).

Os octocorais ou corais moles (“soft corals”), pertencentes à classe Anthozoa, são organismos sedentários marinhos, encontrados desde o Ártico até a Antártica e geralmente são coloniais. A costa brasileira é rica em octocorais devido às águas quentes das correntes sul-equatoriais e as correntes brasileiras (Neves e Pires, 2002). No litoral pernambucano, cinco espécies estão registradas, incluindo a *Carijoa riisei* (Cnidaria: Anthozoa: Octocorallia: Alcyonacea: Clavulariidae), sendo considerada a mais abundante na costa do estado (Pérez, 2002).

Uma característica marcante do filo Cnidaria é a presença de nematocistos (cnidocistos), estruturas contendo toxinas utilizadas para defesa e alimentação, produzidas por células especializadas (cnidócitos) localizadas na epiderme do animal.

Os antozoários são exclusivamente polipóides, apresentando gametas e reproduzindo sexualmente, porém muitas espécies também se reproduzem assexuadamente (Fautin e Mariscal, 1991). Sobre a espécie *Carijoa riisei*, um estudo morfológico da biologia reprodutiva desenvolvido recentemente pelo nosso grupo mostrou que as colônias de machos e fêmeas desta espécie apresentam cistos espermáticos e ovócitos, respectivamente, em todas as fases de desenvolvimento durante todo ano (desenvolvimento assincrônico) e contínua liberação de gametas para fertilização externa, já que nenhuma larva plânula foi encontrada na cavidade dos pólipos coletados no litoral sul pernambucano (Barbosa et al., dados não publicados). Essas características também foram observadas nas espécies encontradas no Havaí (Kang et al., 2008).

Em relação à fisiologia dos cnidários, eles apresentam uma extremidade oral (eixo oral-aboral) pelo qual o alimento é capturado, em seguida, ele é parcialmente digerido por enzimas na cavidade gastrovascular (celêntero) e a digestão e a absorção são completadas por células que revestem esta cavidade (Faustin e Mariscal, 1991). Os processos de excreção e respiração ocorrem por difusão. Dentre os cnidários, os corais são os primeiros animais na biologia evolutiva a apresentar sistema nervoso organizado (Faustin e Mariscal, 1991).

Durante a fase embrionária de gástrula nos cnidários, originam-se dois folhetos embrionários: a ectoderme ou epiderme (camada de células que recobre a parte externa desses animais) e a endoderme ou gastroderme (camada celular interna que reveste a cavidade gastrovascular) (Faustin e Mariscal, 1991). Separando estas duas camadas, há a mesogléia, camada acelular composta por proteínas fibrilares como o colágeno e outros componentes de matriz extracelular (MEC) (Tillet-Barret et al., 1992; Peterson e Eernisse, 2001).

Nos cnidários (animais com simetria radial), há presença de células epiteliais especializadas (mioepiteliais) na ectoderme e gastroderme que tem como uma das funções contrair os tentáculos, auxiliando no processo de digestão (Martindale et al., 2002). Essas células epiteliais se assemelham ao conhecido tecido muscular liso. Foram identificados genes na ectoderme ou endoderme de anêmonas-do-mar que em vertebrados estão envolvidos no desenvolvimento da mesoderme como, por exemplo, o gene *nv-GATA*, e no desenvolvimento e diferenciação do tecido muscular (*mef2* e família LIM) (Martindale et al., 2004). Esses dados sugerem que os genes mesodermais estão presentes antes do aparecimento de animais triblásticos (com terceiro folheto germinativo) durante a evolução.

Dados presentes na literatura sobre cnidários se relacionam principalmente sobre o isolamento de substâncias bioativas e à presença de atividades farmacológicas e citotóxicas desses componentes químicos, ou sobre os mecanismos de defesa e reprodução desses animais.

Os cnidários, principalmente os antozoários, são animais interessantes para o estudo evolucionário, pois são de estrutura simples a primeira vista, porém análises bioquímicas e moleculares já identificaram a presença de

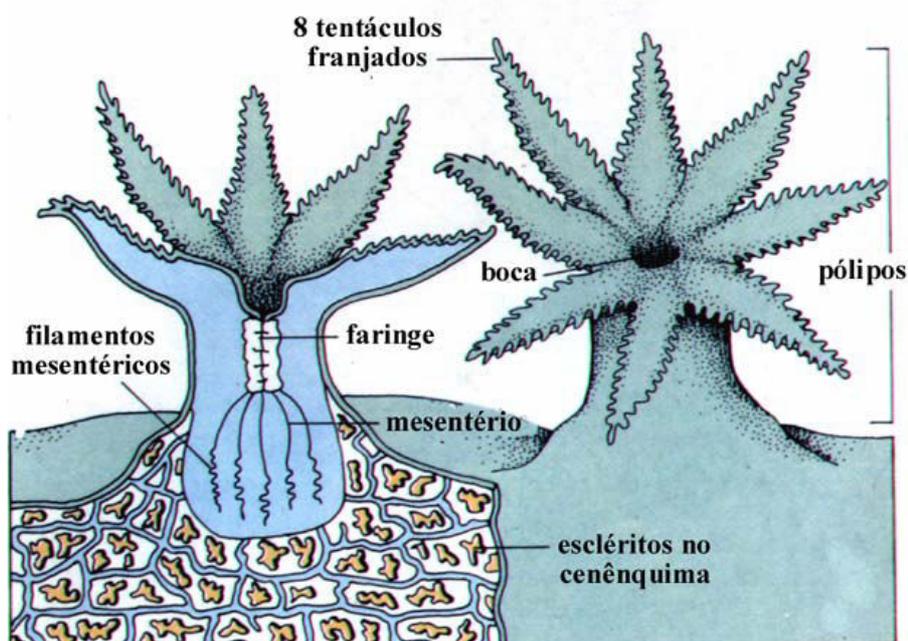
genes e proteínas, cujas estruturas se mantêm conservadas em animais superiores. Desta maneira, há necessidade de estudos que explorem a biologia e a morfologia dos antozoários, principalmente de espécies encontradas no Brasil, onde há carência de profissional nesta área de pesquisa.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

O filo Cnidaria (água-vivas, corais, anêmonas, hidras, etc) são animais altamente diversificados e bem sucedidos, exibindo uma grande variedade de habitats, morfologias e ciclos de vida (Brusca e Brusca, 2003; Collins et al, 2006 apud Denker et al, 2008). Suas dimensões variam desde microscópicas até dois metros de diâmetro. São abundantes no plâncton e no bento, desde as regiões entremarés até as grandes profundidades abissais, do equador aos pólos. A maior diversidade ocorre em áreas tropicais rasas, onde se destacam as águas vivas, os corais pétreos, os zoantídeos e os octocorais (Ribeiro-Costa e Rocha, 2006).

O filo Cnidaria está dividido nas seguintes classes: Hydrozoa, Anthozoa (organismos exclusivamente polipóides), Cubozoa e Scyphozoa (apresentando as fases polipóide e medusóide, sendo esta última predominante) e Staurozoa (recentemente proposta e representada por medusas bentônicas) (Marques e Collins, 2004).

A classe dos antozoários, que compreende o maior número de espécies, divide-se em duas subclasses: os hexacorais (número de tentáculos múltiplos de seis) e os octocorais (oito tentáculos com projeções laterais, as pínulas) (Fig. 1) (Fautin e Mariscal, 1991).



**Figura 1:** Diagrama de pólipos de corais alcionáceos (Talbot & Steene, 1990 apud Lages, 2003).

Das 59 espécies de octocorais descritas para o litoral brasileiro, 25 ocorre na região Nordeste (42,37 %), sendo o estado da Bahia o que apresenta a maior quantidade (17) (Silva e Pérez, 2002 apud Pérez, 2005).

No litoral de Pernambuco, *Carijoa riisei* é a espécie de octocoral encontrada em maior número na costa do Estado (Pérez, 2002).

*Carijoa riisei* foi visto pela primeira vez no Havaí, em 1966 (Kahng et al., 2008 apud Wagner, Kahng e Toonen, 2009). Seu primeiro registro foi publicado em 1972, quando foi descoberto dentro da comunidade incrustante de Pearl Harbor (Evans et al., 1974 apud Wagner, Kahng e Toonen, 2009). A partir destas descobertas iniciais, *C. riisei* se espalhou ao longo das ilhas havaianas principalmente, onde se tornou comum em habitats com substrato duro, pouca luz e fluxo de corrente moderada (Devaney e Eldredge, 1977; Thomas, 1979; Coles e Eldredge, 2002; Kahng, 2006 apud Wagner, Kahng e Toonen, 2009). Esta espécie pode ser encontrada em toda costa rochosa ou recifal brasileira, geralmente nas áreas sombreadas de pequenas grutas, caverna e túneis, da zona entremarés ao infralitoral raso. As colônias são fixas e pouco ramificadas, com 10 a 25 cm de altura, coloração acinzentada ou marrom e antocódios brancos. Na forma de colônia, os pólipos primários, longos e delgados, originam-se no estolão. Da parede desse pólipos primário, brotam lateralmente pólipos secundários e, destes, pólipos terciários, até o quarto grau de ramificação (Fig. 2) (Ribeiro-Costa e Rocha, 2006).



**Figura 2:** Fotografia de uma colônia da espécie *Carijoa riisei*  
(por Carlos D. Pérez)

Contudo, estudos moleculares recentes revelaram a presença de pelo menos duas espécies diferentes de *Carijoa* no Havaí, e expôs que este gênero necessita de revisão taxonômica (Conceição et al., 2008 apud Wagner, Kahng e Toonen, 2009).

Em sua forma básica, o corpo saculiforme de um cnidário se assemelha a uma gástrula. Esse corpo consiste em uma cavidade semelhante a um tubo digestivo, envolvido por uma parede corpórea sólida. A cavidade, chamada celêntero ou cavidade gastrovascular, se abre para o exterior por uma boca cercada por uma ou mais fileiras de tentáculos. O corpo dos cnidários exhibe simetria radial ao redor do eixo oral-aboral, o qual se estende da boca para a base respectivamente (Ruppert, Fox e Barnes, 2005).

A cavidade gastrovascular é dividida em câmaras radiais por mesentérios longitudinais, que se dispõem no sentido oral-aboral. Os mesentérios são dobras radiais da gastroderme e mesogléia (Ribeiro-Costa e Rocha, 2006).

Os pólipos são principalmente animais bentônicos sésseis, fixos, com uma orientação com a boca voltada para cima (Ruppert, Fox e Barnes, 2005). Os pólipos de Anthozoa diferem dos pólipos das outras classes de Cnidária: a superfície oral expande-se em um disco oral, com a boca oval ou em forma de fenda ao centro, e tentáculos periféricos ocos (Ribeiro-Costa e Rocha, 2006).

A maioria dos cnidários é carnívora. Capturam as presas com os tentáculos, que se retraem e se dobram e as levam à boca. Células glandulares da região oral produzem secreções mucosas que auxiliam na ingestão da presa. Na cavidade gastrovascular, ocorre a digestão extracelular com enzimas secretadas pelas células glandulares da gastroderme (Ribeiro-Costa e Rocha, 2006).

Além das células glandulares, os epitélios de revestimento da endoderme e gastroderme são constituídos por células secretórias, mioepiteliais, sensoriais e músculos (Faustin e Mariscal, 1991).

Os tentáculos e a parede geral do corpo equivalem a superfícies branquiais, e a circulação da água sobre essa superfície corpórea, promovida pelas células epiteliais ciliadas, facilita a troca gasosa (Ruppert, Fox e Barnes, 2005).

Os cnidários empregam uma grande variedade de mecanismos de sustentação. Nos pólipos, o conteúdo fluido da cavidade gastrovascular forma um esqueleto hidrostático, que é composto principalmente pela água que entra através da boca e atua antagonicamente à contração muscular (Ribeiro-Costa e Rocha, 2006). Além disso, o mesênquima pode ser enrijecido por fibras, particularmente nos antozoários. Antozoários coloniais podem incorporar partículas de sedimentos e fragmentos de conchas na coluna, o que aumenta a sustentação (Brusca, 2007).

Corais pedregosos (subclasse Hexacorallia), que são os principais construtores de recifes, começam a precipitar carbonato de cálcio imediatamente após a formação das plânulas. Esta calcificação inicial serve como base para a deposição do esqueleto do adulto (esqueleto aragonítico), que é anexado ao substrato do recife (Vandermeulen e Watabe, 1973 apud Barneah, Malik e Benayahu, 2002). A subclasse Octocorallia sintetiza escleritos de cálcio (endoesqueleto) que é secretado pela mesogléia através de células denominadas de escleroblastos (Faustin e Mariscal, 1991).

Invertebrados sésseis marinhos muitas vezes encontram forças dinâmicas, tais como correntes e ondas. Os organismos bentônicos dos recifes de coral, entre outros, enquanto dependentes do fluxo de água para alimentação, transporte, gás e resíduos de compensação, são ameaçados por ela, se a intensidade do fluxo for demasiada (Koehl, 1984). Firmeza ao substrato é, portanto, crucial para o seu desenvolvimento e sobrevivência (Koehl 1984; Ward, 1995 apud Barneah, Malik e Benayahu, 2002).

Os cnidários apresentam uma célula que desempenha papel central na captura de presa e na defesa, o cnidócito. Cada cnidócito tem uma cnida, uma cápsula membranosa preenchida por fluido que contém uma longa invaginação tubular da parede da cápsula. Existem três tipos gerais de cnidas – nematocisto, espirocisto e pticocisto, estas células especializadas estão localizadas na epiderme do animal (Ruppert, Fox e Barnes, 2005).

Elas ocorrem em uma concentração particularmente elevada sobre os tentáculos e boca. Todos os nematocistos consistem de duas estruturas primárias, uma cápsula e um túbulo. Modificações na estrutura do nematocisto, tais como o tamanho da cápsula e a armadura do túbulo com espinhos gera diferentes tipos de nematocistos. Anthozoa têm tipos simples de nematocisto

enquanto medusozoa (Hydrozoa, Cubozoa e Scyphozoa) possuem nematocistos complexos, exibindo vários túbulos (Hwang, 2010).

Registros em antozoários e hidrozóários mostram que os sistemas gastrovasculares são distintos um do outro principalmente pela presença de células flageladas endodermais que revestem o epitélio interno gastrovascular dos anthozoa (Gateno, 1998). O sistema gastrovascular tem sido descrito como uma rede de canais ramificados com extremidades cegas e com circulação do fluido interno (Blackstone, 1996), impulsionado pelos flagelos (Gladfelter, 1983 apud Gateno, 1998 ).

O sistema nervoso dos cnidários, assim como o de todos os eumetazoários, consiste de neurônios sensoriais superficiais que monitoram o ambiente; neurônios motores que ativam efetores como os músculos ou cnidocistos; e interneurônios que unem os receptores sensoriais aos neurônios motores (Ruppert, Fox e Barnes, 2005).

Gastrulação é o primeiro evento morfogenético na embriogênese, e resulta na formação dos folhetos embrionários. Durante a fase embrionária de gástrula nos cnidários, originam-se dois folhetos: a ectoderme (camada de células que recobre a parte externa desses animais) e a gastroderme (camada celular interna que reveste a cavidade gastrovascular). Separando estas duas camadas, há a mesoglêia, camada acelular composta por proteínas fibrilares como o colágeno e outros componentes de matriz extracelular (MEC) (Tillet-Barret et al, 1992; Peterson e Eernisse, 2001; Gröger e Schmid, 2001).

A partir de meados do século 19 Cnidaria foi considerado como diploblasto ou formado por duas camadas de células sem um mesoderma. A composição das anatomias embrionária, larval e adulta baseado em apenas duas camadas de células, ectoderme e endoderme é bem estabelecido na literatura (Seipel e Schmid, 2006).

Na escala evolutiva, o aparecimento de um terceiro folheto germinativo (mesoderma) não é claro. Nos animais bilaterais, o tecido muscular é derivado do mesoderma. Já nos cnidários (animais com simetria radial), há presença de células epiteliais com características de células musculares (mioepiteliais) na ectoderme e gastroderme (Martindale et al., 2002). Estas células mioepiteliais são geralmente flageladas, de aspecto cuboidal e têm atividades secretórias,

glandular ou digestivo. Elas são as primeiras células a se diferenciar nas plânulas de hidrozoário (Gröger e Schmid, 2001).

Além da presença de células epiteliais com características musculares (mioepiteliais), os cnidários apresentam musculatura na região ectodérmica e endodérmica. Na ectoderme, os músculos são difusos e confinados na porção oral e nos tentáculos. Na endoderme (gastroderme), as fibras musculares são longitudinais e bem desenvolvidas (Faustin e Mariscal, 1991). Estas células musculares geralmente têm uma morfologia achatada, alongada, com grande quantidade de miofilamentos, podendo apresentar característica de musculatura lisa ou estriada (Calgren, 1949). Eles podem ser epiteliais ou subepiteliais formando camadas bidimensionais ou feixes tridimensional.

As células musculares em cnidários podem reativar programas de células-tronco e exibem uma plasticidade celular inigualável no reino animal. Além disso, elas constituem uma fonte celular, não só para a regeneração, mas também para a desenvolvimento de estruturas como o mesoderma na transição medusa pólipó-hidrozoário (Seipel e Schmid, 2006).

Uma das conquistas evolutivas mais notáveis dos cnidários é sua relação íntima com parceiros unicelulares fotossintetizantes. A relação é muito difundida e ocorre em muitos cnidários de águas rasas. Nos cnidários marinhos, os protistas são criptomonadinos, dinoflagelados e de morfologia arredondada denominados “zooxantelas” (provavelmente muitos gêneros, incluindo *Zooxanthella*[= *symbiodinium*]). Essas algas são capazes de viver livres de seus hospedeiros e é provável que normalmente o façam, mas muito pouco se sabe sobre sua história natural. As algas tipicamente residem na gastroderme ou epiderme do hospedeiro, embora alguns cnidários abriguem zooxantelas extracelulares em sua mesoglêia. São geralmente os simbiossomas que dão aos cnidários suas cores verde, verde-azulada ou amarronzada. Corais que constroem recifes (denominados corais hermatípicos) abrigam tipicamente zooxantelas (isto é, são corais zooxantelados) ( Brusca e Brusca, 2007). O aumento de sedimentação e temperatura em ambientes marinhos causam um aumento no número dessas algas em recifes de corais (Vargas-Ángel et al., 2007).

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1. Objetivo geral:

Analisar a histologia de espécies do octocoral *Carijoa riisei* encontrado no litoral sul pernambucano através de microscopia óptica.

#### 3.2. Objetivo específico:

Analisar as células mioepiteliais presentes na ectoderme e gastroderme do octocoral *Carijoa riisei*, identificando sua disposição e suas características histoquímicas, na tentativa de correlacioná-las com as características descritas para células musculares presentes em vertebrados, e também identificar a presença de colágeno na mesoglêia desses animais através de métodos histoquímicos.

#### 4. HIPÓTESES OU QUESTÕES A INVESTIGAR

Pretende-se neste trabalho investigar as seguintes questões:

- ✓ Semelhanças ou diferenças das características histoquímicas das células mioepiteliais presentes na ectoderme e gastroderme do octocoral *Carijoa riisei* em relação às células musculares encontradas em vertebrados quando submetidas às técnicas de tricrômicos de Masson e Mallory.
- ✓ Semelhança ou diferença da característica histoquímica do colágeno presente na mesogléia dessa espécie em relação ao colágeno encontrado em tecido conjuntivo de vertebrados.

## 5. METODOLOGIA

### 5.1. Local de estudo e coletas das espécies

As coletas da espécie do octocoral *Carijoa riisei* foram realizadas através da técnica de Mergulho Autônomo (SCUBA) na praia de Porto de Galinhas, litoral sul de Pernambuco (8° 30'20" S, 35° 00'34" W) pelo pesquisador Dr. Carlos Daniel Pérez. O ponto de coleta é conhecido como "Piscina dos oito" ou "Boca da barra", por possuir ligação com o mar aberto e chegar até a profundidade de oito metros.

As amostras mensais foram obtidas durante os meses de agosto a dezembro de 2009 e de agosto a setembro de 2010. A cada mês foi coletado aleatoriamente um total de 10 colônias, cinco na profundidade de dois metros, e outras cinco na profundidade de seis metros. Para garantir o status de colônias diferentes foram retiradas amostras com dois metros de distância uma da outra. Após a coleta, as colônias foram acondicionadas em sacos plásticos com etiquetas de identificação e fixadas com solução de formaldeído a 10% com água do mar por 24 horas em temperatura ambiente.

### 5.2. Microscopia óptica

Após a fixação, as amostras foram lavadas em água corrente e submetidas ao processo de descalcificação com solução de ácido nítrico a 2% para a retirada da matriz inorgânica composta de carbonato de cálcio por 24 horas. Em seguida, desidratadas em concentrações crescentes de álcool etílico (70 – 100%), diafanizadas em xilol, embebidas e incluídas em parafina. Cortes histológicos com 5 µm de espessura obtidos em micrótomo Leica RM2025 (Leica Microsystems GmbH Wetzlar, Germany) foram corados pela hematoxilina-eosina para estudo da morfologia geral.

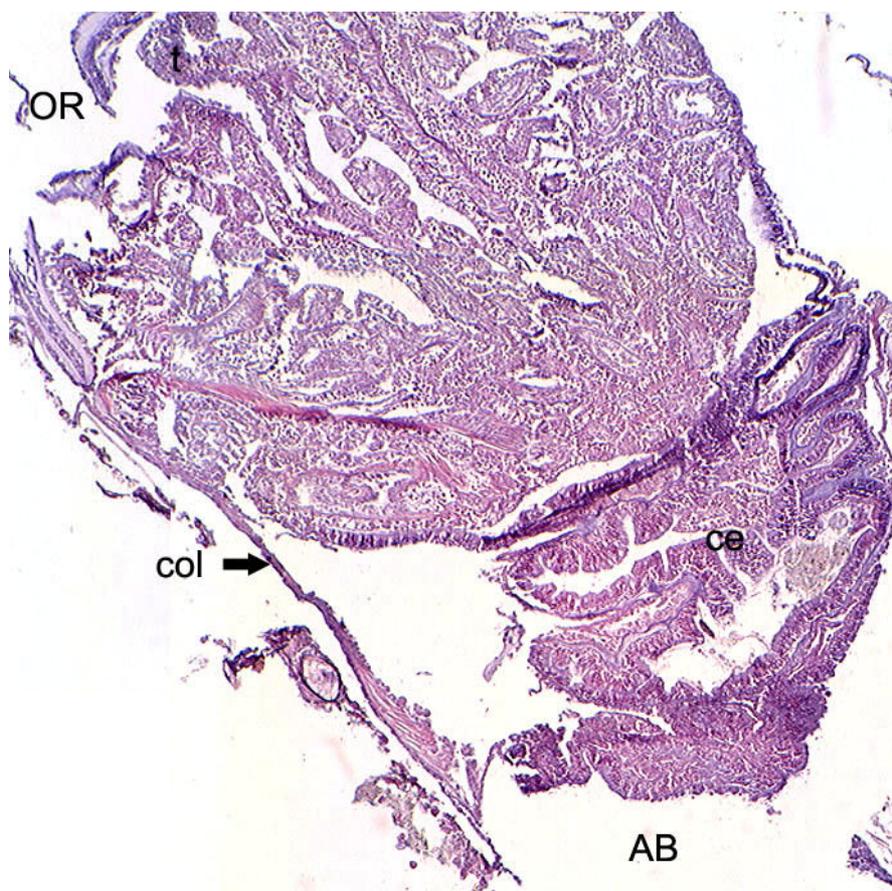
Os cortes histológicos foram submetidos à realização de técnicas histoquímicas como os tricrômicos de Masson e Mallory para o diagnóstico de células com características musculares e análise de colágeno. As preparações histológicas foram analisadas e documentadas em microscópio de luz convencional.

Toda a metodologia para processamento e inclusão das amostras em parafina e técnicas histoquímicas foram realizadas no Laboratório de Biotecnologia e Fármacos do Centro Acadêmico de Vitória (UFPE).

## 6. RESULTADOS

Os resultados obtidos mostraram que não houve diferença na morfologia das espécies de *Carijoa riisei* coletadas nos diferentes meses do ano de 2009 e 2010 na praia de Porto de Galinhas (litoral sul de Pernambuco), independente da profundidade e do ponto de coleta.

Os pólipos da *C. riisei* apresentam uma extremidade oral, onde visualizamos as estruturas dos tentáculos que dá acesso à cavidade gastrovascular (celêntero) e a extremidade oposta e fechada, a aboral (Fig. 3). A parede do pólipo (coluna) possui um revestimento epitelial por células da ectoderme e os tentáculos são revestidos pela ectoderme e gastroderme, com a mesogléia separando esses dois folhetos (Fig. 3).



**FIGURA 3:** Fotomicrografia da estrutura histológica (corte longitudinal) do pólipo de *Carijoa riisei*. **OR:** extremidade oral; **AB:** extremidade aboral; **col:** coluna do pólipo; **t:** tentáculos; **CE:** celêntero. Aumento:100x. Hematoxilina-Eosina.

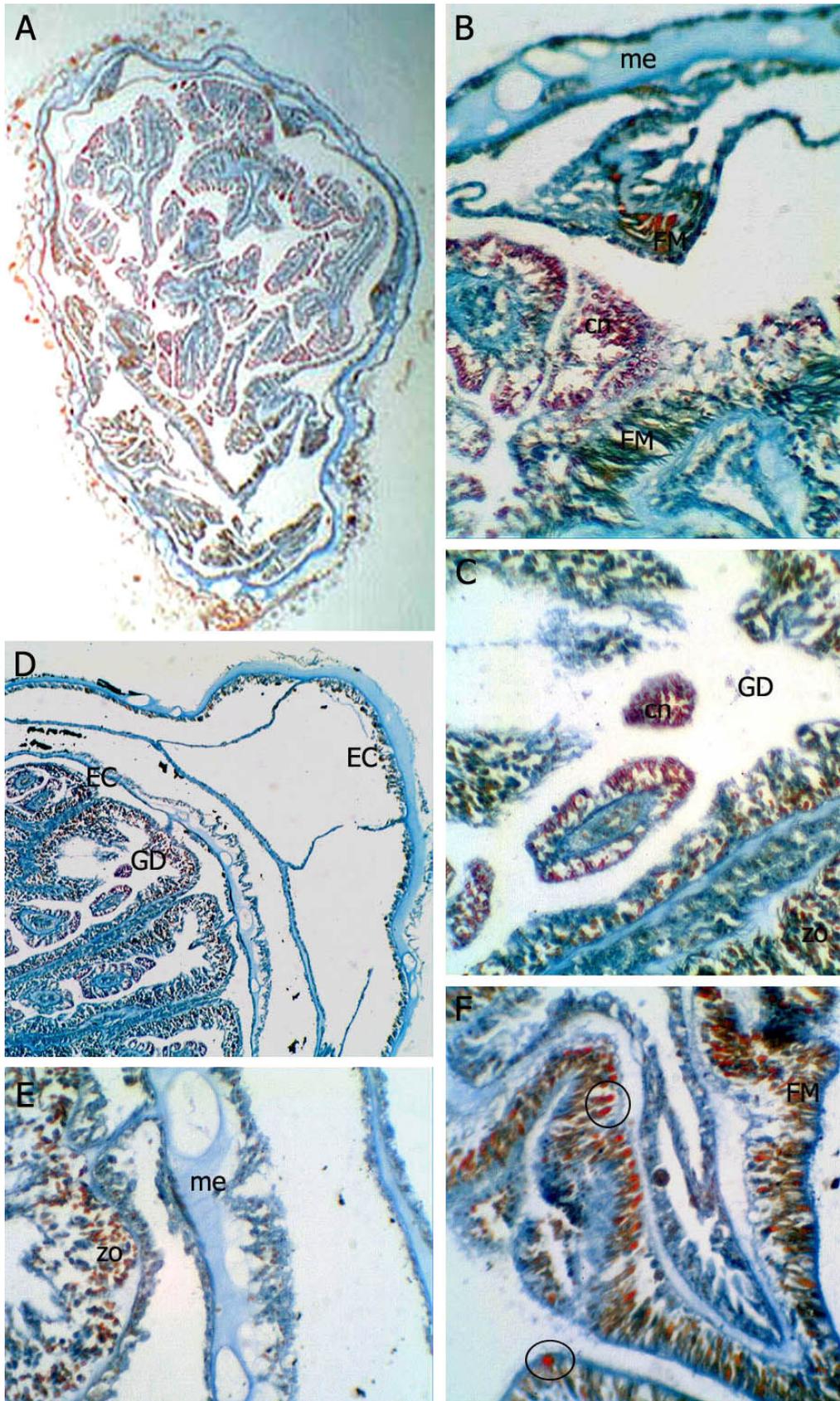
Pelos métodos dos tricrômicos, a maioria das células epiteliais da ectoderme e gastroderme foi corada pelo corante azul de anilina apresentando citoplasma azulado e núcleo basófilo devido à presença da hematoxilina férrica (Fig. 4 e 5).

Algumas células epiteliais se destacaram pela afinidade tintorial dos corantes alaranjado G (método do Mallory) e escarlata de Biebrich (método do Masson), ambos de caráter histoquímico ácido. Essas células apresentaram características histoquímicas semelhantes às células musculares de vertebrados. Assim sendo, nossos resultados indicam que essas células apresentam em seu citoplasma miofilamentos que são evidenciados pelos corantes ácidos presentes nos tricrômicos (Fig. 4 e 5). Dentre essas células, houve uma variação de tamanho e localização no epitélio. Certas células apresentam estrutura alongada, com disposição longitudinal dos miofilamentos e se localizando, principalmente na região dos tentáculos (Fig. 4B e 5D).

A mesogléia foi evidenciada pela coloração azul claro pelos métodos dos tricrômicos. Esse tecido se mostrou acelular e com lacunas (escleritos) formadas pela retirada de partículas de minerais no processo de descalcificação (Fig. 4B, 4E, 5B-D).

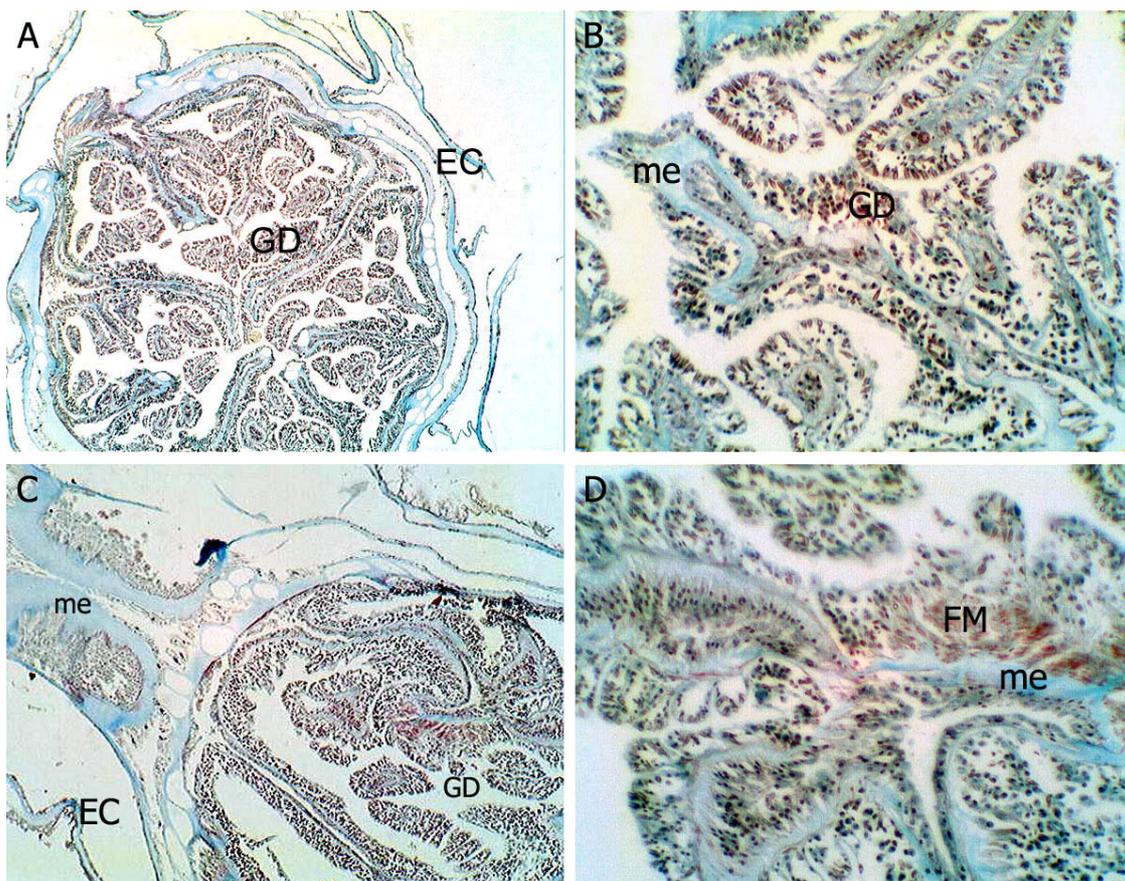
Na região da gastroderme observamos a presença de cnidócitos (Fig. 4B e 4C) evidenciados pela cor vermelha magenta brilhante dado pelo corante fucsina ácida no método do tricrômico de Mallory.

Curiosamente, visualizamos algumas células com morfologia arredondada e de coloração alaranjado forte, aderidas a gastroderme ou livres na cavidade gastrovascular. Essas células apresentam características histológicas de dinoflagelados (zooxantelas) já descritos em outros cnidários (Fig. 4E e 4F).



**FIGURA 4:** Fotomicrografias de secções histológicas transversais de pólipos de *Carijoa riisei*, (A) Corte histológico de um pólipos evidenciando a ectoderme (lado

externo) e o sistema gastrovascular (lado interno) próximo à região oral do animal; **(B-C)** Na região do celêntero, observe a detecção de células musculares (FM) no epitélio da gastroderme (GD) e fibras colágenas na mesoglêia (me). Note também a presença de cnidócitos (cn); **(D)** Visualização do revestimento epitelial da gastroderme (GD) e ectoderme (EC); **(E-F)** Presença de células arredondadas na região da gastroderme, com características de zooxantelas (zo). Aumentos: 100X (A), 200X (D) e 400X (B, C, E e F). Tricrômico de Mallory.



**FIGURA 5:** Fotomicrografias de secções histológicas de pólipos de *Carijoa riisei*, Corte transversal **(A)** e longitudinal **(C)** de pólipos evidenciando a ectoderme (EC - lado externo) e o sistema gastrovascular (GD - lado interno) próximo a região oral do animal; **(B-D)** Presença de células musculares (FM) no epitélio da gastroderme (GD) e fibras colágenas na mesoglêia (me). Aumentos: 100X (A), 200X (C) e 400X (B e D). Tricrômico de Masson.

## 7. DISCUSSÃO

Estudos bioquímicos e moleculares com anthozoários identificaram certos genes e proteínas que se mantêm conservados em animais superiores, tornando assim esses animais interessantes para o estudo evolucionário. Entretanto, existem poucos estudos que explorem a biologia e a morfologia dos antozoários, principalmente de espécies encontradas no Brasil. Em relação à espécie *C. riisei* não há dados na literatura sobre a estrutura histológica do pólip, estando restrita apenas a estudos de sua reprodução (Kahng et al., 2008) e isolamento de substâncias bioativas (Maia et al., 2000; Kossuga et al., 2007).

Nesse estudo, foi observado que o pólip apresenta uma extremidade oral e uma extremidade aboral, e possui um revestimento epitelial externo (ectoderme) e um revestimento da cavidade do celêntero (gastroderme), como já descritos para outros octocorais na literatura (Faustin e Mariscal, 1991).

Algumas células epiteliais presentes na ectoderme e gastroderme apresentaram características histoquímicas semelhantes às fibras musculares, evidenciadas pela coloração alaranjada no tricrômico de Mallory ou avermelhada no Masson. De acordo com a literatura, essas células têm como função contrair os tentáculos, auxiliando no processo de digestão (Martindale et al., 2002) e, por isso, são denominadas de células mioepiteliais.

Entre esses epitélios, observamos a mesogléia com um grande número de lacunas (escleritos) formadas pelas partículas de minerais retiradas pelo processo de descalcificação.

Através das técnicas histoquímicas empregadas nesse estudo, foi visualizado a presença de fibras colágenas na mesogléia (evidenciada pelo corante azul de anilina nos tricrômicos), corroborando com os dados da literatura sobre a presença desta proteína fibrilar em cnidários (Tillet-Barret et al., 1992; Peterson e Eernisse, 2001). A mesogléia de hidras também apresenta proteínas de matriz extracelular (MEC) como colágenos do tipo I e IV e laminina (Sarras, 2005; Shimizu et al., 2008). A presença da MEC é considerada como um fator fundamental para o processo de interação entre célula-célula e, conseqüentemente, para evolução de animais multicelulares

(Morris, 1993; Magie e Martindale, 2008). Mecanismos de adesão são intimamente envolvidos na montagem de células para as estruturas multidimensionais de tecidos e órgãos (Magie e Martindale, 2008).

Estudos ultra-estruturais com mesogléia isolada de hidras mostraram também a presença de poros, evidenciando que as células mioepiteliais da ectoderme e gastroderme emitem projeções celulares para o interior da mesogléia, estabelecendo junções comunicantes entre o lado externo e a cavidade interna, podendo estas ser importantes nos processos de contração realizados por essas células em ambos os folhetos (Shimizu et al., 2008).

Na região da gastroderme observou-se a presença de cnidócitos evidenciados pelo método do tricrômico de Mallory. Os cnidócitos são células especializadas do filo Cnidaria que possuem os cnidocistos, estruturas importantes para a defesa e a alimentação desses animais devido a liberação de toxinas (Ruppert, Fox e Barnes, 2005).

Essa espécie de octocoral é classificada como azooxantelado, porém a morfologia dos pólipos coletados no litoral sul de Pernambuco apresentou a presença de células arredondadas na região da gastroderme com características histológicas de zooxantelas (Vargas-Ángel et al., 2007). As zooxantelas são algas unicelulares de morfologia arredondada que vivem em simbiose com corais.

A simbiose entre zooxantelas e hexacorais é bem descrita na literatura. Entretanto, existem espécies de octocorais que também são zooxantelados como, por exemplo, a espécie *Heteroxenia fuscescens* que apresenta plânula azooxantelada mas que pode ser infectada se tornando um pólipo primário zooxantelado, dependendo das condições ambientais (Yacobovitch et al., 2003).

Estudos aprofundados e isolamento dessas células serão necessários para concluirmos se essa espécie seria zooxantelada.

## 8. CONCLUSÕES

Através dos métodos dos tricrômicos de Mallory e de Masson empregados neste trabalho, concluímos que uma população de células epiteliais que revestem a ectoderme e a gastroderme das espécies de *C. riisei* presentes no litoral sul de Pernambuco, apresentam características histoquímicas semelhantes às fibras musculares presentes em vertebrados, corroborando com a hipótese da evolução do tecido muscular a partir dos animais diblásticos. Também foi evidenciado através destas técnicas, características histoquímicas semelhantes às fibras colágenas na região da mesogléia, comprovando a existência destas proteínas nesses animais.

## **9. APOIO**

Esse trabalho teve aprovação da pró-reitoria de pesquisa da UFPE (PIBIC/UFPE/CNPQ) e apoio financeiro da FACEPE (APQ-0845-2.10/08).

## 10. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Barneah, Orit; Malik, Zvi; Benayahu, Yehuda. Attachment to the substrate by soft coral fragments: desmocyte development, structure, and function. **Invertebrate Biology**, v. 12 l(2), pag. 81-90, 2002.

Brusca, Richard C.; Brusca, Gary J. **Invertebrados**. 2 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogon, 2007.

Denker et al. Ordered progression of nematogenesis from stem cells through differentiation stages in the tentacle bulb of *Clytia hemisphaerica* (Hydrozoa, Cnidaria). **Developmental Biology**, v. 315, pag. 99–113, 2008.

Fautin, D. G. ; Mariscal, R. N. **Cnidaria: Anthozoa**. In: Harrison, F. W. ; J. A. Westfall (Eds). *Microscopic Anatomy of Invertebrates*,: Placozoa, Porifera, Cnidaria, and Ctenophora. v. 2. (New-York): Willey-Liss, pag. 267-358, 1991.

Gateno et al. Gastrovascular Circulation in an Octocoral: Evidence of Significant Transport of Coral and Symbiont Cells. **Biol. Bull**, v. 194, pag. 178-186. 1998.

Groeger, H.; Schmid V. Larval development in Cnidaria: a connection to bilateria. **Genesis**, v. 29, pag. 110-114, 2001.

Holtmann, Matthias; Thurm, Ulrich. Variations of Concentric Hair Cells in a Cnidarian Sensory Epithelium (*Coryne tubulosa*). **The Journal of Comparative Neurology**, v. 432, pag. 550–563, 2001.

Hwanga et al. Nematogalectin, a nematocyst protein with GlyXY and galectin domains, demonstrates nematocyte-specific alternative splicing in *Hydra*. **PNAS**, v. 107, n. 43, pag. 18539–18544. 2010.

Hwang, S. J. ; Song, J.I. Reproductive biology and larval development of the temperate soft *Dendronephthya gigantean* (Alcyonacea: Nephtheidae). **Marine Biol**, v.152, pag. 273-284, 2007.

Kang, S.E. et al. Sexual reproduction in the invasive octocoral *Carijoa riisei* in Hawaii. **Bull. Marine Sci**, v. 82, pag. 1-17, 2008.

Kossuga, Miriam H., et al. Isolamento e atividades biológicas de produtos naturais das esponjas *Monanchora arbuscula*, *Aplysina* sp., *Petromica ciocalyptoides* e *Topsentia ophiraphidites*, da ascídia *Didemnum ligulum* e do octocoral *Carijoa riisei*. **Quim. Nova**, v. 30, n. 5, pag. 1194-1202, 2007.

Lages, Bruno Gualberto. **Avaliação do potencial invasor do coral alcionáceo *Stereonephthya* aff. *curvata* (Nephtheidae - Alcyonacea) na Reserva Extrativista Marinha de Arraial do Cabo (RJ)**. 2003. 49 f.

Dissertação (Mestrado em Biologia Marinha) - Universidade Federal Fluminense. Rio de Janeiro, 2003.

Magie, Craig R.; Martindal, Mark Q. Cell-cell adhesion in the Cnidaria: insights into the evolution of tissue morphogenesis. **Biol. Bull**, v. 214, pag. 218–232, Jun. 2008.

Maia, Lenize F.; Epifanio, Rosângela de A.; Fenical, William. New Cytotoxic Sterol Glycosides from the Octocoral *Carijoa (Telesto) riisei*. **Journal of Natural Products**, v. 63, pag. 1427-1430, 2000.

Marques, A. C. ; Collins, A. G. Cladistic analysis of Medusozoa and Cnidarian evolution. **Invertebrate Biol**, v. 43, pag. 9-16, 2004.

Martindale, M. Q.; Finnerty, J. R. ; Henry, J. Q. The radiate and the evolutionary origins of the bilaterian body plan. **Mol. Phylogen**, v. 24, pag. 358-365, 2002.

Martindale, M. Q.; Pang, K. ; Finnerty, J. R. Investigating the origins of triploblasty: 'mesodermal' gene expression in a diploblastic animal, the sea anemone *Nematostella vectensis* (phylum, Cnidaria; class, Anthozoa). **Development** , v.131, pag. 2463-2474, 2004.

Micaela Hellström; Kathryn D. Kavanagh; John A. H. Benzie. Multiple spawning events and sexual reproduction in the octocoral *Sarcophyton elegans* (Cnidaria: Alcyonacea) on Lizard Island. **Mar Biol**, v. 157, pag. 383-392. 2010.

Neves, E.G.; Pires, D.O. Sexual reproduction of Brazilian coral *Mussimilia hispida* (Verril, 1902). **Coral Reefs**, v. 21, pag. 161-168, 2002.

Pérez, C. D. **Octocorais (Cnidaria, Anthozoa) do litoral pernambucano (Brasil)**. In: *Secretaria do Estado da Ciência, Tecnologia e Meio Ambiente de Pernambuco (SECTMA), Governo de Pernambuco*, Tabarelli, M. & J.M.P. Silva (Eds). Diagnóstico da biodiversidade de Pernambuco. Recife. Editora Massangana, v. 2, pag. 365-368. 2002.

Pérez, C. D. Primeiro registro de *Leptogorgia punicea* (Milne-Edwards & Haime) (Cnidaria, Octocorallia) para o Estado do Maranhão, Brasil. **Bras. Zool**, Curitiba v.22, n.3, set. 2005.

Peterson, K. J. ; Eernisse, D. J. Animal phylogeny and the ancestry of bilaterians: Inferences from morphology and 18S rDNA gene sequences. **Evol. Dev.**, v. 3, pag. 170–205, 2001.

Ribeiro-Costa, Cibele S.; Rocha, Rosana Moreira. **Invertebrados: manual de aulas práticas**. Ribeirão Preto: Holos, 2006.

Ruppert, Edward E.; Fox, Richard S.; Barnes, Robert D. **Zoologia dos invertebrados: uma abordagem funcional-evolutiva**. 7 ed. São Paulo: Roca, 2005.

Seipel, Katja ; Schmid, Volker. Mesodermal anatomies in cnidarian polyps and medusae. Review , **Dev. Biol**, v. 50, pag. 589-599, 2006.

Tillet-Barret et al. Characterization of heterotrimeric collagen molecules in a sea-pen (Cnidaria, Octocorallia). **Eur. J. Biochem**, v. 203, pag. 179-184. 1992.

Vargas-Ángel, Bernardo et al. Cellular reactions to sedimentation and temperature stress in the Caribbean coral *Montastraea cavernosa*. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 95, pag. 140–145, 2007.

Wagner, Daniel; Kahng, Samuel E.; Toonen, Robert J. Observations on the life history and feeding ecology of a specialized nudibranch predator (*Phyllodesmium poindimiei*), with implications for biocontrol of an invasive octocoral (*Carijoa riisei*) in Hawaii. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**. v. 372, pag. 64–74, 2009.

Yacobovitch, T; Weis, V. M; Benayahu, Y. Development and survivorship of zooxanthellate and azooxanthellate primary polyps of the soft coral *Heteroxenia fuscescens*: laboratory and field comparisons. **Marine Biology**, v. 142, pag. 1055-1063, 2003.

## ANEXOS

### *Técnicas histológicas*

#### **Coloração Hematoxilina-Eosina (H.E)**

##### HEMATOXILINA DE HARRIS

Hematoxilina	0,5 g
Álcool Etílico Absoluto	5 ml
Alúmen de potássio	10 g
Óxido vermelho de mercúrio	0,25 g
Água destilada	100 ml
Ácido acético glacial	4 ml

##### EOSINA

Eosina	1 g
Álcool etílico 95%	100 ml

#### Procedimento:

- 1- Desparafinar e hidratar os cortes
- 2- Lavar em água da torneira por 1 minuto
- 3- Hematoxilina de Harris de 30 segundos a 1 minuto
- 4- Água de torneira por 10 minutos
- 5- Eosina alcoólica por 1 minuto
- 6- Lavar em água rapidamente
- 7- Desidratar, diafanizar e montar

**Coloração Tricômico de Mallory:**

## Solução A

Fucsina ácida	0,5 g
Água destilada	100 ml

## Solução B

Azul de Anilina	0,5 g
Orange G	2 g
Ácido Fosfotúngstico	1 ml
Água destilada	100 ml

## Procedimento

- 1- Desparafinar e hidratar os cortes
- 2- Corar pela solução fucsina ácida (solução A) por 5 minutos
- 3- Corar pela solução de Mallory (solução B) por 20 minutos
- 4- Diferenciar em álcool 95% (rapidamente)
- 5- Desidratar, diafanizar e montar

**Coloração Tricômico de Masson:****SOLUÇÃO DE BOUIN**

Solução saturada de Ácido Pícrico	75 ml
Formaldeído puro	25 ml
Ácido Acético Glacial	5 ml

**HEMATOXILINA FÉRRICA DE WEIGERT****Solução A**

Hematoxilina pó	1 g
Álcool 95%	100 ml

**Solução B**

Solução aquosa de Cloreto Férrico a 29%	4 ml
Água destilada	95 ml
Ácido Clorídrico Concentrado	1 ml

Solução de trabalho: juntar na hora do uso partes iguais da solução A e B

**SOLUÇÃO DE ESCARLATE DE BIEBRICH**

Solução aquosa de Escarlata de Biebrich 1%	90 ml
Solução aquosa de Fucsina Ácida 1%	10 ml
Ácido Acético Glacial	1 ml

**SOLUÇÃO ÁCIDA FOSFOTÚNGSTICA-FOSFOMOLÍBDICA**

Ácido Fosfotúngstico	2,5 g
Ácido Fosfomolíbico	2,5 g
Água destilada	100 ml

### SOLUÇÃO DE AZUL DE ANILINA

Azul de Anilina	2,5 g
Ácido Acético Glacial	2 ml
Água destilada	100 ml

### SOLUÇÃO DE ÁGUA-ÁCIDO

Água destilada	100 ml
Ácido Acético Glacial	1 ml

### PROCEDIMENTO:

1. Desparafinar e hidratar
2. Lavar em água corrente por 5 minutos
3. Mordentar em solução de Bouin por 1 hora na estufa a 60 graus ou preferencialmente deixar por uma noite em temperatura ambiente
4. Lavar em água corrente até desaparecer o amarelo deixado pela solução de Bouin
5. Passe em água destilada
6. Corar pela solução de Hematoxilina Férrica de Weigert (A e B) por 10 minutos
7. Lavar em água corrente por 10 minutos
8. Passe em água destilada
9. Corar pela solução de Escarlata de Biebrich por 5 minutos
10. Passe por água destilada
11. Diferencie pela solução de Ácido Fosfotúngstico-Fosfomolibdico durante 10 a 15 minutos
12. Passe por água destilada
13. Corar pela solução de Azul de Anilina durante 5 a 10 minutos
14. Lave em água destilada
15. Passe pela solução de Ácido Acético Glacial 1% por 3 a 5 minutos
16. Passe por água destilada
17. Desidrate, diafanize e monte em resina.