



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE SANTA CRUZ - UESC
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS - DCB
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOLOGIA APLICADA



CAROLINE SANTOS TAMANDARÉ

CÉLULAS MARRONS EM *Lucina pectinata* (GMELIN, 1791)

(BIVALVIA: LUCINIDAE)

ILHÉUS, BAHIA

2012

CAROLINE SANTOS TAMANDARÉ

CÉLULAS MARRONS EM *Lucina pectinata* (GMELIN, 1791)

(BIVALVIA: LUCINIDAE)

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Zoologia Aplicada da Universidade Estadual de Santa Cruz, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Guisla Boehs

ILHÉUS, BAHIA

2012

T153

Tamandaré, Caroline Santos.

Células marrons em *Lucina pectinata* (Gmelin, 1791)
(Bivalvia: Lucinidae) / Caroline Santos Tamandaré. –
Ilhéus, BA : UESC, 2012.
viii, 39 f. : il.

Orientadora: Guisla Boehs.

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de
Santa Cruz, Programa de Pós-graduação em Zoologia.
Inclui referências.

1. Bivalve (Moluscos). 2. Excreção. 3. Histoquímica.
4. Células sanguíneas. 5. Pigment cell. I. Título.

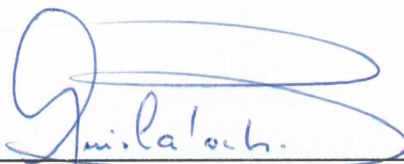
CDD 594.4

CAROLINE SANTOS TAMANDARÉ

“CÉLULAS MARRONS” EM *Lucina pectinata* (GMELIN, 1791)

(BIVALVIA: LUCINIDAE)

Ilhéus, BA- 12/2012



Guisla Boehs - Dra.

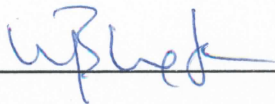
Universidade Estadual de Santa Cruz/DCB

(Orientadora)



Helena Costa - Dra.

Universidade Estadual de Santa Cruz/DCB



Mercia Barcellos da Costa - Dra.

Universidade Federal do Espírito Santo



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE SANTA CRUZ - UESC
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO - PROPP
SECRETARIA GERAL DE CURSOS - SECREGE
PROGRAMA DE PÓS - GRADUAÇÃO EM ZOOLOGIA
MESTRADO EM ZOOLOGIA APLICADA

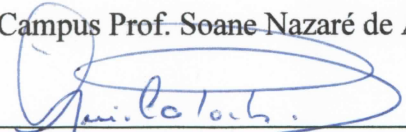


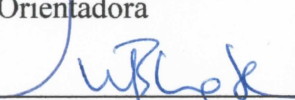
ATA DA DEFESA PÚBLICA Nº 105

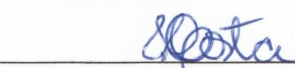
DISSERTAÇÃO DE **Caroline Santos Tamandaré** NO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOLOGIA *stricto sensu* – ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: ZOOLOGIA APLICADA – NÍVEL: MESTRADO ACADÊMICO.

Aos dezessete dias do mês de dezembro do ano de dois mil e doze, às nove horas, reuniu-se na sala 3008 do Pavilhão Jorge Amado, na Universidade Estadual de Santa Cruz, a Comissão Examinadora, composta pelas Doutoradas, Mercia Barcellos da Costa, Helena Costa examinadoras, e por mim, Guisla Boehs, orientadora, para julgar o trabalho intitulado: “Brown cells” em *Lucina pectinata* (Gmelin, 1791) (Bivalvia: Lucinidae) da Baía de Camamu, Bahia, de autoria de Caroline Santos Tamandaré. Após arguição e discussão, a banca examinou, analisou e avaliou o referido trabalho, chegando à conclusão que este está APROVADA. Nada mais havendo a ser tratada, esta Comissão Examinadora encerrou a Reunião da qual eu, Guisla Boehs, Presidente desta Banca, lavrei a presente ATA que, após lida e aprovada vai assinada pelos seus membros.

Campus Prof. Soane Nazaré de Andrade, Ilhéus, Bahia, 17 de dezembro de 2012.


Dra. Guisla Boehs
Orientadora


Dra. Mercia Barcellos da Costa
Examinadora


Dra. Helena Costa
Examinadora

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos meus queridos pais, Rosemary e Declieux Tamandaré, pelo amor, amizade e apoio nesta conquista.

AGRADECIMENTOS

À CAPES pela concessão da bolsa.

À FAPESB, pelo financiamento do projeto.

À Profª Dra. Guisla Boehs por ter acreditado em mim e pela sua orientação e amizade, que me fizeram aprender muito neste período do mestrado.

Aos meus amados pais Rosemary e Declieux Tamandaré e minhas irmãs e amigas Catira e Catiúcia, pelo carinho e apoio constante. Ao meu cunhado Gey, que se tornou meu irmão. Não chegaria a lugar nenhum sem vocês!

A meu querido esposo Franck, que desde o começo tem sido a fonte da minha força, pelo seu amor e cuidado em todos os momentos e ainda pela paciência ao me ajudar a mexer nos programas de computador.

À tia Zú e Fanny (prima), por terem me acolhido e apoiado quando estava me preparando para conquistar este sonho.

A todos os professores do Programa de Pós-Graduação em Zoologia da UESC pelas orientações, especialmente à Profª Romari Martinez.

Aos professores Fábio Flores e Cristina Oliveira pela prestatividade.

Aos pescadores de Porto do Campo (Cristiano, Valdir e Eleilton), pela ajuda nas coletas.

Aos queridos amigos de laboratório, em especial a Mariane Aguiar, pela paciência em me ensinar os procedimentos. Obrigada também a Rosana, Verena e Guido por terem contribuído.

Aos colegas da turma que se tornaram meus amigos, especialmente Milane, Luciano, Muriel, Yamid, Ana, Aline e Paulo.

Às meninas da república, Driele, Dhâmara, Carol, Ariadne e Jack, pela companhia e apoio nos primeiros meses.

E finalmente, ao meu Deus que sempre esteve do meu lado me dando sabedoria.

RESUMO

Os hemócitos, células sanguíneas dos moluscos, exercem várias funções, tais como reparo de lesões dos tecidos e da concha, digestão, transporte de nutrientes, defesa e excreção. Os tipos hemocitários compreendem os hialinócitos, os granulócitos e uma terceira linhagem, cujas células são denominadas de "brown cells", a que propomos denominar de células marrons. Este estudo investigou as células marrons em *Lucina pectinata* (Bivalvia: Lucinidae), quanto a: morfologia, ocorrência, quantidade e distribuição nos órgãos e composição bioquímica. Os exemplares de *L. pectinata* (n = 48) foram coletados na Baía de Camamu (Bahia) em abril de 2012. Foram feitos cortes de 5 mm de tecido, que foram fixados, parte em formalina a 10% e outra parte em fixador de Carnoy. Os cortes foram processados por técnica rotineira de histologia, com inclusão em parafina e obtenção de seções de tecidos com 6-7 µm de espessura. Para o estudo morfológico e controle, usou-se o corante hematoxilina de Harris e eosina (HE). O Ácido Periódico de Schiff (PAS) foi usado para evidenciar glicogênio, glicoproteínas e mucoproteínas, o Azul da Prússia (= "Método de Perls"), para evidenciar Fe⁺⁺⁺ e o Azul de Turnbull, para evidenciar Fe⁺⁺. A estereologia foi utilizada para avaliar a área ocupada pelas células marrons em cada órgão. O material foi analisado em microscopia de luz. Todos os exemplares apresentaram células marrons, que estiveram sempre presentes no rim e na gônada. O rim apresentou o maior número de células marrons, o que provavelmente está relacionado à função de excreção dessas células. Sua presença no interior dos folículos sugere papel de fagocitose de gametas residuais. A glândula digestiva e o manto também apresentaram alta prevalência dessas células. Baixa prevalência foi observada nas brânquias e no sifão exalante e no pé estas estiveram ausentes. O resultado histoquímico positivo ao PAS pode indicar: armazenamento de carboidrato, presença de mucoproteína, glicoproteína ou de lipofuscina, polímero relacionado com o envelhecimento. A positividade aos métodos de Perls e Azul de Turnbull possivelmente indica presença de hemossiderina, depósito amorfo de ferro. Esse fato pode estar relacionado ao ambiente em que vive *L. pectinata*, o manguezal, conhecido por apresentar teor significativo de compostos de ferro.

Palavras-chave: Bivalves; excreção; hemócitos; histoquímica; "pigment cells"; "serous cells".

ABSTRACT

The hemocytes, molluscs blood cells, perform several functions, such as tissue repair and shell lesions, digestion, transport of nutrients, defense and excretion. The types of hemocyte comprise hyalinocytes, granulocytes and a third lineage, whose cells are called brown cells. This study investigated the brown cells in *Lucina pectinata* (Bivalvia: Lucinidae), regarding its the morphology, occurrence, quantity and distribution in organs and biochemical composition. Specimens of *L. pectinata* (n = 48) were collected in Camamu Bay, Bahia, NE-Brazil, in April 2012. Tissue-sections of approximately 5 mm were cut, were fixed part in 10% formalin and part in Carnoy's fixative. The fixed tissues were processed using the routine histological technique, which included paraffin embedding, and microtome sections of 6-7 μm in thickness. For morphological studies and control, we used Harris hematoxylin and eosin (H&E). The Periodic Acid Schiff (PAS) was used to demonstrate glycogen, glycoproteins and mucoproteins, Prussian Blue to highlight Fe^{+++} and Turnbull's blue to highlight Fe^{++} . The tissue area occupied by the brown cells was evaluated through the stereological technique. The preparations were analyzed by light microscopy. All specimens showed brown cells that were mainly present in the kidney and gonad. The kidney had the highest number of brown cells, which is probably related to the function of excretion of these cells. Its presence within the follicles suggests phagocytosis of residual gametes. Digestive gland and mantle also showed a high prevalence of these cells. Low prevalence was observed in the gills and exhalant siphon, and in the foot they were absent. The positive histochemical result to PAS may indicate: storage carbohydrate, presence of mucoproteins, glycoproteins or even of lipofuscin, polymer-related aging. Positive results to Perls and Turnbull Blue possibly indicates the presence of hemosiderin, amorphous iron deposit. This fact may be related to the environment where *L. pectinata* lives, the mangrove, known for high amount of iron compounds.

Keywords: Bivalves; excretion; hemocytes; histochemistry; "pigment cells"; "serous cells".

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. (Introdução geral) Lambretas (<i>Lucina pectinata</i>) recém-coletadas no manguezal da Baía de Camamu, Bahia.....	02
Figura 1. (Artigo) Área de coleta de <i>Lucina pectinata</i>	27
Figura 2. Prevalência (%) de células marrons em <i>Lucina pectinata</i> da Baía de Camamu, Bahia (n = 48).....	27
Figura 3. Células marrons em <i>Lucina pectinata</i> corados com hematoxilina de Harris e eosina (HE) na região da gônada.....	28
Figura 4. Células marrons em <i>Lucina pectinata</i> corados com hematoxilina de Harris e eosina (HE) no tecido conjuntivo da glândula digestiva.....	28
Figura 5. Células marrons em <i>Lucina pectinata</i> corados com hematoxilina de Harris e eosina (HE) no manto.....	28
Figura 6. Células marrons em <i>Lucina pectinata</i> corados com hematoxilina de Harris e eosina (HE) no músculo adutor.....	28
Figura 7. Células marrons em <i>Lucina pectinata</i> corados com hematoxilina de Harris e eosina (HE) no rim e nas brânquias.....	28
Figura 8. Células marrons em <i>Lucina pectinata</i> corados com hematoxilina de Harris e eosina (HE) no sifão.....	28
Figura 9. Frequência absoluta de positividade para as técnicas histoquímicas em células marrons de <i>Lucina pectinata</i> (n = 48).....	29
Figura 10. Células marrons fracamente coradas (+) com o PAS no rim.....	30
Figura 11. Células marrons coradas (++) com o PAS no rim.....	30
Figura 12. Células marrons coradas (++) com o Método de Perls no rim.....	30
Figura 13. Células marrons fracamente coradas (+) com o Azul de Turnbull no rim.....	30
Figura 14. Células marrons fracamente coradas (+) com o Método de Perls no manto.....	31
Figura 15. Células marrons coradas (++) com o Azul de Turnbull no manto.....	31
Figura 16. Células marrons fracamente coradas (+) com o Método de Perls na gônada....	31
Figura 17. Células marrons coradas (++) com o Azul de Turnbull na gônada.....	31

LISTA DE TABELAS

Tabela I. Tamanho médio das células marrons em μm (micrômetros) nos órgãos de <i>Lucina pectinata</i>	25
Tabela II. Média dos valores da intensidade de ocorrência das células marrons nos órgãos de <i>Lucina pectinata</i> (n = 10).....	25
Tabela III. Resultado da ANOVA e teste de Tukey da intensidade de ocorrência das células marrons entre os órgãos de <i>Lucina pectinata</i>	26
Tabela IV. Intensidade das reações histoquímicas mostrando o número de indivíduos em cada categoria.....	26

SUMÁRIO

RESUMO.....	v
ABSTRACT.....	vi
LISTA DE FIGURAS.....	vii
LISTA DE TABELAS.....	viii
1. INTRODUÇÃO GERAL.....	1
Objetivos.....	6
Objetivo geral.....	6
Objetivos específicos.....	6
2. ÁREA DE ESTUDO.....	6
3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	7
 ARTIGO: Células marrons em <i>Lucina pectinata</i> (Bivalvia: Lucinidae).....	 12
RESUMO.....	12
INTRODUÇÃO.....	13
MATERIAL E MÉTODOS.....	15
RESULTADOS.....	16
DISCUSSÃO.....	17
LITERATURA CITADA.....	22
ANEXO (Normas da revista).....	32

1. INTRODUÇÃO GERAL

Os bivalves são moluscos lateralmente comprimidos, tipicamente com conchas divididas em duas metades, também denominadas de valvas, que são articuladas dorsalmente por um ligamento elástico quitinoso interno ou externo. Os locais da dobradiça das valvas são travados por dentes, que evitam que estas deslizem uma na outra ou se fechem indevidamente. A concha é mantida fechada pela ação de um par de músculos adutores, que por sua vez, agem contra a tensão do ligamento elástico, que tende a manter as valvas afastadas (LEAL, 2002).

A subclasse Heterodonta (Neumayr, 1884) possui conchas com dobradiça, tendo dentes cardinais e laterais, um ligamento posterior aos bicos, assim como lobos do manto juntos desenvolvendo sífões e concha com uma estrutura lamelar ou prismática, nunca nacarada, sendo que esta subclasse inclui a ordem Veneroida (RIOS, 2009).

A ordem Veneroida (H. & A. Adams, 1856) é constituída por bivalves cujas conchas têm geralmente os lados diferentes entre si, com as duas cicatrizes musculares do mesmo tamanho e dobradiças com dentes cardinais e laterais. Os moluscos desta ordem raramente são sedentários (RIOS, 2009).

Dentro dos Veneroida está incluída a superfamília Lucinoidea (Fleming, 1828), que, por sua vez, inclui a família Lucinidae (Fleming, 1828). Esta última caracteriza-se por possuir valvas quase circulares, espessas e equivalentes; a cicatriz do músculo adutor anterior é alongada e a posterior é arredondada; o ligamento é externo ou parcialmente interno e a dobradiça contém dois dentes cardinais, um anterior e um posterior lateral (RIOS, 2009). Muitos Lucinoidea (e.g., *Lucina*, *Divaricella*, *Codakia*) perderam completamente o sífão inalante, porém os mesmos fazem tocas de 25 a 30 cm de profundidade com a ação de um pé alongado, construindo assim um túnel revestido de muco que funciona como um sífão inalante. As correntes respiratórias e de alimentação entram anteriormente por esse canal e saem pelo sífão exalante (RUPPERT et al., 2005; RIOS, 2009).

Os bivalves podem viver em diversas condições de habitat. Por exemplo, as ostras se fixam permanentemente a substratos duros, os mexilhões vivem temporariamente ligados aos substratos por feixes de fibras proteicas chamados de bisso e a maioria das amêijoas (nome comum dado a várias espécies da família Veneridae) enterram-se na areia ou na lama (LEAL, 2002).

Os bivalves da Família Lucinidae vivem em águas rasas e em habitats sujeitos à ação das marés. Geralmente são coletados manualmente e consumidos localmente. São aptos a

viver até em áreas quimicamente tóxicas e, além disso, membros desta família tipicamente hospedam bactérias simbióticas em suas brânquias (LEAL, 2002). O gênero *Lucina* (Bruguière, 1797) tem valvas que variam de tamanho médio a grande, subtrapézoidais em vez de comprimidas e que são esculpidas por sulcos concêntricos. O ligamento elástico é totalmente externo e os dentes cardinais são bem pequenos nos adultos (RIOS, 2009).

Lucina pectinata (Gmelin, 1791), pertencente à esta família, distribui-se da Carolina do Norte até a Flórida e Texas (EUA), nas Índias Ocidentais, Venezuela, Suriname e no Brasil do Amapá até Santa Catarina (RIOS, 2009). Tem valvas circulares (5,1 x 4,8 cm), pouco infladas e de cor branco-amarelada (Figura 1). A superfície externa é esculpida com sulcos bem espaçados. As áreas da dobradiça e das margens são tingidas com amarelo ou laranja. Esta espécie vive em substrato lodoso de águas rasas. É uma espécie comestível e conhecida popularmente como "Lambreta" ou "Sernambi" (RIOS, 2009).



Figura 1. Lambretas (*Lucina pectinata*) recém-coletadas no manguezal da Baía de Camamu, Bahia. Barra = 3 cm (Foto de acervo pessoal).

O sistema circulatório dos moluscos bivalves é do tipo aberto, o que significa que a hemolinfa está presente tanto no coração e nos vasos, como banha continuamente todos os tecidos do corpo (CHENG, 1981).

Os hemócitos, células sanguíneas dos bivalves, exercem várias funções, tais como: reparo de lesões dos tecidos e da concha, digestão e transporte de nutrientes, defesa e

excreção (CHENG, 1981). Podem ser de dois tipos: hialinócitos e granulócitos. Os hialinócitos são células sem grânulos e têm um núcleo central rodeado por relativamente pouco citoplasma, enquanto que os granulócitos são maiores que estes e têm o núcleo bem menor (CHENG, 1981; CARBALLAL et al., 1997). Além desses dois tipos de hemócitos, existe uma terceira linhagem que compreende as "serous cells", "pigment cells" ou "brown cells" (MACKIN, 1955; CHENG, 1981). As "brown cells" não tem nome equivalente na Língua Portuguesa, então propomos, doravante, chamá-las de células marrons.

A função excretora dos hemócitos envolve as glândulas pericárdicas, que também são conhecidas como glândulas de Keber. Essas glândulas, que compreendem uma parte do sistema excretor, são proeminentes em muitos bivalves e ocorrem em dois locais: nas aurículas e/ou no manto e dentro da cavidade pericárdica. Essas glândulas são também os locais de produção das células marrons (CHENG, 1981). Ao contrário desse autor, Stein e Mackin (1955) assumem que as células marrons se formam a partir dos leucócitos e são resultado de processos metabólicos.

Conforme Cheng (1981), as células marrons mais novas, ou seja, aquelas que continuam dentro da glândula de Keber ou que foram recentemente produzidas, são caracterizadas por serem essencialmente sem motilidade e possuírem grande quantidade de glóbulos pigmentados no citoplasma, com coloração que varia de um marrom claro a marrom escuro. Esses glóbulos conferem a cor marrom para essas células, por isso a atribuição do nome célula marrom (ZAROOGIAN e YEVICH, 1994; ZAROOGIAN, 1997; ZAROOGIAN e JACKIM, 2000).

Essas células ocorrem em tecidos e algumas vezes, dentro de porções fechadas do sistema circulatório e por isso compreendem um tipo celular de circulação e migração (CHENG, 1981). Conforme Ruddell e Wellings (1971), as células marrons são ovóides ou esféricas. Já Takatsuki (1934a) e Kato (1960) afirmaram que as mesmas são ameboides. Esses autores verificaram, mediante uso de carmim, atividade fagocitária dessas células.

Muitas funções têm sido atribuídas às células marrons, incluindo defesa contra doenças causadas por patógenos (STEIN e MACKIN, 1955). Essas células podem ter, também, um importante papel na excreção e na osmorregulação (HAIGLER, 1964), no armazenamento de gordura e secreção do material formador da concha (WHITE, 1942; HAIGLER, 1964) e na proteção da musculatura auricular (TAKATSUKI, 1934b; HAIGLER, 1964). Zaroogian e Yevich (1994) observaram ainda um aumento destas células em associação com hemócitos em respostas inflamatórias agudas e crônicas, sugerindo que talvez estas participem da acumulação e detoxificação (= desintoxicação) de poluentes. Guzmán-

García et al. (2009), estudando os efeitos de metais pesados em *C. virginica* sugeriram que o aumento de células marrons e a reação hemocitária são respostas específicas do processo de detoxificação e recuperação celular.

Além das funções mencionadas, White (1942) propôs que as células marrons teriam função excretora e, desse modo, extrairiam ácidos do sangue, os quais seriam carregados para o rim (órgão de Bojanus) através de canais renopericardiais ciliados. Ruddell e Wellings (1971), por sua vez, sugeriram que essas células poderiam estar envolvidas no movimento e no processamento de fluidos biológicos. Cheng e Burton (1966) sugeriram que as células marrons agem como fagócitos na remoção de resíduos e outros produtos associados com parasitismo e outras condições patológicas. Cheng (1981) mencionou ainda que esta seria a função mais importante dessas células e que estas removem produtos de degradação de parasitos mortos ou moribundos, assim como produtos metabólicos de parasitos bem sucedidos.

A primeira publicação que considerou uma possível associação funcional das células marrons com parasitismo é atribuída a Mackin (1951), que notou um crescimento em número destas células em *C. virginica*, parasitada pelo fungo *Perkinsus marinus* (= *Labyrinthomyxa marina* ou *Dermocystidium marinum*). Mackin (1951) também notou um crescimento em número destas células em *Macoma balthica* (Linnaeus, 1758) parasitada por *Perkinsus* sp. e de modo semelhante, Cheng e Burton (1965) notaram que embora as células marrons estivessem presentes em ostras *C. virginica* não parasitadas, sua quantidade era aumentada em ostras parasitadas por esporocistos do trematódeo *Bucephalus* sp.

Stein e Mackin (1955) mostraram que as vesículas das células marrons contêm lipídios e proteínas, que podem estar combinados em lipofuscina, um pigmento lipogênico que aumenta no citoplasma de muitas células à medida que estas envelhecem. Alguns anos depois, Haigler (1964) relatou a presença de “grânulos” de lipídio e tirosina em células marrons de *C. virginica*. Esse autor também verificou que a lipofuscina presente nas células marrons dessa ostra é solúvel em ácidos e bases diluídos. Porém, Stein e Mackin (1955) observaram que as células marrons na mesma espécie de ostra são insolúveis em ácidos e bases diluídos, o que, segundos esses autores, seria de se esperar de lipofuscinas verdadeiras.

Além de lipídios e proteínas, as vesículas das células marrons contêm grandes quantidades de ferro (KATO, 1960; RUDDELL e WELLINGS, 1971; PIRIE e GEORGE, 1979). Ruddell e Wellings (1971) observaram também glicogênio nestas células em *C. gigas*, porém, segundo esses mesmos autores, as mesmas não parecem estar envolvidas no armazenamento desse componente. Kato (1960) observou, nas células marrons da glândula

pericárdica de *Corbicula* sp. (Bivalvia: Corbiculidae), bilirrubina, amônia, uréia, alantoína, creatina, ácido hipúrico e ácido úrico.

Conforme Zaroogian e Yevich (1994), essas células possuem ainda glutathione reductase, fosfatase ácida e lisozima, indicando que as vesículas contidas nas mesmas são lisossomos. A glutathione das células marrons está envolvida na manutenção da integridade da membrana celular, equilíbrio de oxidação-redução e detoxificação de muitas substâncias orgânicas e inorgânicas (ZAROOGIAN, 1997; ZAROOGIAN e NORWOOD, 2002). Esta atua na capacidade celular de destruir os radicais livres e espécies reativas de oxigênio, diminuindo o potencial oxidativo da célula, ou seja, essa substância e as enzimas associadas à mesma exercem um papel protetor da célula (JESUS e CARVALHO, 2008). A fosfatase ácida desempenha papel fundamental na autólise de tecidos e por isso é considerada um marcador lisossomal (LANELLA e ITOYAMA, 2004). A lisozima compõe a defesa imunológica e está presente em células fagocíticas, possuindo, também, atividade bactericida e sua estimulação/produção varia diretamente em função da situação de estresse do organismo (JESUS e CARVALHO, 2008).

Além desses componentes, foi também verificada a presença de metalotioneína nas células marrons, que foi relacionada à ligação metálica e proteção contra a toxicidade de metais (ROESIJADI, 1994; ZAROOGIAN e JACKIM, 2000). Além da homeostase de íons metais e sua detoxificação, as metalotioneínas estariam ainda envolvidas em outros processos fisiopatológicos, como na eliminação de espécies reativas de oxigênio, proliferação e apoptose celular, além da quimio-resistência e resistência à radioterapia (FABRIK et al., 2008). Estes mesmos autores, considerando a significativa detoxificação de metais pesados por parte dessas proteínas, indicaram o uso das mesmas como biomarcadores de poluição ambiental por metais pesados.

Cheng e Burton (1966) analisaram células marrons de vários tamanhos em *C. virginica* e observaram a presença de ácido mucopolissacarídeo nas células de tamanho médio (entre 6 e 12 µm de diâmetro). Microanálises de raios-X mostraram que estas contêm vários metais, incluindo: zinco, cálcio, chumbo e cádmio (PIRIE e GEORGE, 1979). Análises de raios-X com microsonda também indicaram altas concentrações de enxofre, inclusive no interior dos lisossomos destas, o que reafirma ainda mais o seu papel de detoxificação (RIFKIN et al., 1969).

No Brasil não há estudos publicados sobre as células marrons. *Lucina pectinata* foi escolhida no presente para a investigação dessas células, com base em estudos prévios (não publicados) realizados no Litoral Sul da Bahia, em que foi observada conspícua presença de

células marrons nesta espécie em comparação com outros bivalves. Em um desses estudos, Souza (2008) comparou a frequência de ocorrência dessas células em *L. pectinata*, *Crassostrea rhizophorae* (Guilding, 1828) e em *Mytella guyanensis* (Lamarck, 1819) e observou prevalência mais alta na primeira.

OBJETIVO GERAL

Investigar a morfologia (tamanho e forma), os locais de ocorrência, a prevalência, a intensidade e aspectos da composição bioquímica das células marrons em *Lucina pectinata*.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Verificar a distribuição e possíveis locais de concentração das células marrons nos diferentes órgãos de *L. pectinata*;
- Constatar existência de variação morfológica (forma e tamanho) das células marrons nos diferentes órgãos;
- Inferir sobre a composição bioquímica das células marrons nessa espécie e nos seus diferentes órgãos;
- Atribuir possíveis funções das células marrons em *L. pectinata*;
- Observar possível associação das células marrons com estes.

2. ÁREA DE ESTUDO

A Baía de Camamu, localizada no Litoral Sul da Bahia, é a terceira maior baía navegável do Brasil, ficando atrás apenas da Baía de Guanabara e da Baía de Todos os Santos. No seu interior encontram-se várias ilhas, sendo as principais as ilhas Grande e Pequena. No entorno da baía, extensas áreas de manguezal ocupam mais de 40 km² e são consideradas de grande importância no contexto da região sul do litoral do Estado da Bahia, como fator econômico de produção primária, com fornecimento de pescado para consumo e subsistência das populações locais (OLIVEIRA et al., 2002). A ilha de Porto do Campo (13°57'84"S;39°02'94"W) tem dimensão territorial de aproximadamente 200 ha e sua população é composta aproximadamente por cerca de 300 habitantes. É principalmente no manguezal e nos rios (Matapera e Conduru) que se concretizam as relações de trabalho e de

sobrevivência dessa população. A economia local é de subsistência e consiste principalmente na pesca, mariscagem e na produção do azeite de dendê (GOMES, 2008).

3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

CARBALLAL, M.J.; LÓPEZ, M.C.; AZEVEDO, C.; VILLALBA, A. Hemolymph cell types of the mussel *Mytilus galloprovincialis*. **Diseases of Aquatic Organisms**, v. 29, p. 127-135, 1997.

CHENG, T.C. **Bivalves**. In: N.A. RATCLIFFE e A.F. ROWLEY. Invertebrate blood cells, Academic Press, 1981, v.I, p. 233-299.

CHENG, T.C.; BURTON, R.M. Relationships between *Bucephalus* sp. and *Crassostrea virginica*: Histopatology and sites of infection. **Chesapeake Science**, v. 6, p. 3-16, 1965.

CHENG, T.C.; BURTON, R.M. Relationships between *Bucephalus* sp. and *Crassostrea virginica*: a histochemical study of some carbohydrates and carbohydrate complexes occurring in the host and parasite. **Parasitology**, v. 56, p. 111-122, 1966.

FABRIK, I.; RUFEROVA, Z.; HILSCHEROVA, K.; ADAM, V.; TRNKOVA, L. ; KIZEK, R. A determination of metallothionein in larvae of freshwater midges (*Chironomus riparius*) using brdicka reaction. **Sensors**, v. 8, p. 4081-4094, 2008.

GOMES, A.E.C. A Baía de Camamu e a Diáspora Africana: vivências, memórias, territorialidade e a construção da identidade em Porto do Campo. In: XIII Encontro de História Anpuh. **Resumos...** Rio de Janeiro, 2008, 10 p.

GUZMÁN-GARCÍA, X.; BOTELHO, A.V.; MARTINEZ-TABCHE, L.; GONZÁLEZ-MÁRQUEZ, H. Effects of heavy metals on the oyster (*Crassostrea virginica*) at Mandinga Lagoon, Veracruz, Mexico. **Revista de Biología Tropical**, v. 57, n. 4, p. 955-962, 2009.

HAIGLER, S.A. A histochemical and cytological study of the “brown cells” found in “auricular pericardial gland” and other tissues of the oyster, *Crassostrea virginica* (Gmelin). Master’s thesis, University of Delaware, 1964.

JESUS, T.B.; CARVALHO, C.E.V. Utilização de biomarcadores em peixes como ferramenta para avaliação de contaminação ambiental por mercúrio (Hg). **Oecologia Brasiliensis**, v. 12, n. 4, p. 680-693, 2008.

KATO, K. Excretion of the Keber's Organ in some Lamellibranchs. **The Science Reports of the Saitama University**, v. 3B, n. 3, 1960.

LANELLA, P. ; ITOYAMA, M.M. O papel das fosfatases nos organismo. **Revista Unorp** (Centro Universitário do Norte Paulista), v. 5, n. 12, p. 63-77, 2004.

LEAL, J. H. **Bivalves**. In: K.E. CARPENTER. Introduction, molluscs, crustaceans, hagfishes, sharks, batoid fishes and chimaeras, Western Central Atlantic, 2002, 599 p.

MACKIN, J. G. Histopathology of Infection of *Crassostrea virginica* (Gmelin) by *Dermocystidium marinum*. **Bulletin of Marine Science of the Gulf and Caribbean**, v.1, n. 1, p. 72-87, 1951.

OLIVEIRA, O. M. C.; QUEIROZ, A. F. S.; ARGOLO, J. L. ROESER, H. M. P.; ROCHA, S.R. S. Estudo mineralógico do sedimento de manguezal da Baía de Camamu-Ba. **Revista Escola de Minas**, v. 55, n. 2, p. 1-9, 2002.

PIRIE, B. J. S.; GEORGE, S. G. Ultrastructure of the heart and excretory system of *Mytilus edulis* (L.). **Journal of Marine Biological Association of the United Kingdom**, v. 59, p. 819-829, 1979.

RIFKIN, E.; CHENG, T. C.; HOHL, H. R. A electron-microscope study of the constituents of encapsulating cysts in the American oyster, *Crassostrea virginica*, formed in response to *Tylocephalum* metacestodes. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 14, p. 211-226, 1969.

RIOS, E. C. **Compendium of Brazilian Sea shells**. Rio Grande, Evangraf, 2009, 676 p.

ROESIADI, G. Metallothionein induction as a measure of response to metal exposure in aquatic animals. **Environmental Health Perspectives**, v. 102, p. 91–95, 1994.

RUDELL, C. L.; WELLINGS, S. R. The Ultrastructure of the oyster brown cell, a cell with a fenestrated plasma membrane. **Zeitschrift für Zellforschung und Mikroskopisch Anatomic**, v. 120, p. 17-28, 1971.

RUPPERT, E. E.; FOX, R. S.; BARNES, R. D. **Zoologia dos Invertebrados, uma abordagem funcional e coevolutiva**. 7ª ed., São Paulo, Rocca, 2005, v.7, 1168 p.

SOUZA, R. A. R. **Ocorrência de “Brown cells” em bivalves marinhos do sul da Bahia**. Monografia em Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Santa Cruz, 35 p., 2008.

STEIN, J. E.; MACKIN, J. G. A Study of the Nature of Pigment Cells of Oysters and the Relation of Their Numbers to the Fungus Disease Caused by *Dermocystidium marinum*. **The Texas Journal of Science**, v. 1, p. 422-429, 1955.

TAKATSUKI, S. On the nature and function of the amebocytes of *Ostrea edulis*. **The Quartertely Journal Microscopical Science**, v. 76, p. 379-436, 1934a.

TAKATSUKI, S. Beiträge zur Physiologie des Austerherzens. **Science Reports of the Tokyo Bunrika Daigaku**, sec. B 2, p. 55-62, 1934b.

WHITE, K. M. The pericardial cavity and the pericardial gland of the Lamellibranchia. **Proceedings of the Malacological Society of London**, v. 25, p. 37-88, 1942.

ZAROOGIAN, G. Use of monochlorobimane to determine the in vivo effect of cadmium, copper and lead on glutathione status in *Mercenaria mercenaria* brown cells. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 116C, p. 117-123, 1997.

ZAROOGIAN, G.; JACKIM, E. In vivo metallothionein and glutathione status in an acute response to cadmium in *Mercenaria mercenaria* brown cells. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 127C, p. 251-261, 2000.

ZAROOGIAN, G.; NORWOOD, C. Glutathione and metallothionein status in an acute response by *Mercenaria mercenaria* brown cells to copper in vivo. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 53, n. 2, p. 285-292, 2002.

ZAROOGIAN, G.; YEVICH, P. The nature and function of the brown cell in *Crassostrea virginica*. **Marine Environmental Research**, v. 37, p. 355-373, 1994.

Artigo

Submissão para o Periódico **“Zoologia”** (= Revista Brasileira de Zoologia – Sociedade Brasileira de Zoologia - **ISSN 0101-8175**)

(Normas em anexo)

Células marrons em *Lucina pectinata* (Bivalvia: Lucinidae)

Caroline S. Tamandaré¹ & Guisla Boehs^{1,2}

¹ Universidade Estadual de Santa Cruz-UESC, DCB.

Rodovia Ilhéus-Itabuna, km 16, 45662-900, Ilhéus, Bahia, Brasil.

² Autor para correspondência: gboehs@uesc.br

Resumo:

As células marrons, células da linhagem hemocitária em moluscos, realizam diversas funções, como defesa, excreção, osmorregulação, detoxificação e recuperação celular. Este estudo investigou estas células em *Lucina pectinata* (Bivalvia: Lucinidae), quanto a morfologia, locais e quantidade de ocorrência e composição bioquímica. Os exemplares de *L. pectinata* (n = 48) foram coletados na Baía de Camamu, sul da Bahia (NE-Brasil), em abril de 2012. Cortes de 5 mm foram fixados em formalina a 10% e em Carnoy, que foram processados por técnica rotineira de histologia, com inclusão em parafina e obtenção de cortes com 6-7 µm. Estes foram corados com: (a) hematoxilina de Harris e eosina (HE), para o estudo morfológico e controle, (b) Ácido Periódico de Schiff (PAS), para evidenciar glicogênio, glicoproteínas e mucoproteínas, (c) Azul da Prússia (= “Método de Perls”), para evidenciar Fe⁺⁺⁺ e (d) Azul de Turnbull, para evidenciar Fe⁺⁺. A estereologia foi utilizada para avaliar a área ocupada pelas células marrons em cada órgão. O material foi analisado em microscopia de luz. Todos os exemplares apresentaram células marrons, que estiveram em prevalência absoluta no rim e na gônada, em alta prevalência na glândula digestiva e no manto, em baixa prevalência nas brânquias e no sifão exalante e ausentes no pé. O rim apresentou o maior número de células marrons, o que provavelmente está relacionado à função de excreção dessas células. Já a sua presença no interior dos folículos sugere papel de fagocitose de gametas residuais. O resultado histoquímico positivo ao PAS pode indicar: armazenamento de carboidrato, defesa e presença de lipofuscina, polímero relacionado com o envelhecimento. A positividade aos métodos de Perls e Azul de Turnbull, indica presença de hemossiderina, depósito amorfo de ferro, o que pode estar relacionado ao ambiente em que vive *L. pectinata*, o manguezal, conhecido por apresentar teor significativo de compostos de ferro.

Palavras-chave: Bivalves; excreção; hemócitos; histoquímica; "serous cells".

Introdução

Os hemócitos, células sanguíneas dos bivalves, cumprem várias funções nestes moluscos, como defesa, excreção, digestão/transporte de nutrientes e reparo de lesões dos tecidos/concha (CHENG, 1981). Dentre estes, os hialinócitos são células sem grânulos que se caracterizam por apresentarem um núcleo central rodeado por relativamente pouco citoplasma, enquanto que os granulócitos são maiores que estes e têm o núcleo bem menor (CHENG, 1981; CARBALLAL *et al.*, 1997).

Além dos hialinócitos e granulócitos, ocorre nesses animais uma terceira linhagem de hemócitos, denominadas de "serous cells", "pigment cells" ou "brown cells" (CHENG, 1981). Essas células são caracterizadas por possuírem grande quantidade de glóbulos pigmentados no seu citoplasma, com coloração que varia de um marron claro a marron escuro, o que confere a cor marrom às mesmas, assim como o seu nome mais comum, células marrons (ZAROOGIAN & YEVICH, 1994; ZAROOGIAN, 1997; ZAROOGIAN & JACKIM, 2000). A função excretora dos hemócitos envolve as glândulas pericárdicas, também conhecidas como glândulas de Keber, que são também os locais de produção das células marrons (CHENG, 1981).

As células marrons ocorrem tanto nos tecidos quanto dentro de porções fechadas do sistema circulatório e por isso compreendem um tipo celular de circulação e migração para os bivalves (CHENG, 1981). A forma dessas células está relatada como sendo ameboide (TAKATSUKI, 1934a; KATO, 1960) ou ainda ovóide ou esférica (RUDDLELL & WELLINGS, 1971).

Muitas funções têm sido atribuídas às células marrons, incluindo defesa contra patógenos (MACKIN, 1951; STEIN & MACKIN, 1955; CHENG & BURTON, 1965), excreção, osmorregulação, armazenamento de gordura, secreção do material formador da concha (WHITE, 1942; HAIGLER, 1964), proteção da musculatura auricular (TAKATSUKI, 1934b; HAIGLER, 1964), acumulação e detoxificação de poluentes, recuperação celular (ZAROOGIAN & YEVICH, 1994; GUZMÁN-GARCÍA *et al.*, 2009), movimento e processamento de fluidos biológicos (RUDDLELL & WELLINGS, 1971) e remoção, via fagocitose, de resíduos e outros produtos associados com parasitismo ou de outras condições patológicas (CHENG & BURTON, 1966). CHENG (1981) considerou que esta última talvez seja a função mais importante dessas células.

As vesículas do citoplasma das células marrons contêm lipídios e proteínas, que podem estar combinados na forma de lipofuscina, um pigmento lipogênico que aumenta no citoplasma de muitas células à medida que estas envelhecem (STEIN & MACKIN, 1955), "grânulos" de lipídio e tirosina (HAIGLER, 1964), grandes quantidades de ferro (KATO, 1960; RUDDLELL & WELLINGS, 1971; PIRIE & GEORGE, 1979) e partículas de glicogênio (RUDDLELL &

WELLINGS, 1971). Em células marrons da glândula pericárdica de *Corbicula* sp (Corbiculidae) foram identificados bilirrubina, amônia, uréia, alantoína, creatina, ácido hipúrico e ácido úrico (KATO, 1960). Na ostra *Crassostrea virginica* (Gmelin, 1791), foram identificados glutathione reductase, fosfatase ácida e lisozima, indicando que as vesículas contidas nestas células serem lisossomos (ZAROOGIAN & YEVICH, 1994). A respeito dessas substâncias, a glutathione está envolvida na manutenção da integridade da membrana celular, equilíbrio de oxidação-redução e detoxificação de muitas substâncias orgânicas e inorgânicas (ZAROOGIAN, 1997; ZAROOGIAN & NORWOOD, 2002). A fosfatase ácida desempenha papel fundamental na autólise de tecidos e é considerada um marcador lisossomal (LANELLA & ITOYAMA, 2004). Quanto à lisozima, esta compõe a defesa imunológica e está presente em células fagocíticas, possuindo ainda atividade bactericida e sua estimulação/produção varia diretamente em função da situação de estresse do organismo (JESUS & CARVALHO, 2008).

As células marrons estariam ainda envolvidas na remoção de metais das células. Fato é que em seu interior foi encontrada a proteína metalotioneína (ROESIJADI, 1994; ZAROOGIAN & JACKIM, 2000). Segundo FABRIK *et al.* (2008), as metalotioneínas estão envolvidas na homeostase de íons metais e sua detoxificação, eliminação de espécies reativas de oxigênio, proliferação e apoptose celular, quimio-resistência e resistência à radioterapia. Ainda segundo esse autor, por sua característica de ligação metálica, estas podem ser utilizadas como biomarcadores de poluição ambiental por metais pesados. Microanálises de raios-X mostraram que de fato essas células contêm vários metais, como o zinco, cálcio, chumbo e cádmio (PIRIE & GEORGE, 1979). RIFKIN *et al.* (1969), ao realizarem análises de raios-X com microsonda em *C. virginica*, também verificaram altas concentrações de enxofre, tanto no citoplasma quanto nos lisossomos dessas células, interpretado pelos autores como um possível papel de detoxificação.

Lucina pectinata (Gmelin, 1791) (Lucinidae), com distribuição geográfica da Carolina do Norte até a Flórida e Texas (EUA), nas Índias Ocidentais, Venezuela, Suriname e no Brasil do Amapá até Santa Catarina (RIOS, 2009), é um importante recurso extrativista no Litoral Sul da Bahia, principalmente para as populações tradicionais, que a utilizam para consumo próprio e comercialização. Em estudos prévios ainda não publicados realizados nessa região, foi sugestiva a presença de células marrons nessa espécie. *Lucina pectinata* vive em sedimento lodoso, principalmente em áreas de manguezal, onde enterra-se a cerca de 20 cm no substrato. Conforme RIOS (2009), graças à ação de um pé alongado, esta constrói um túnel revestido de muco, que funciona como um sifão inalante. As correntes respiratórias e de alimentação entram por esse canal e saem pelo sifão exalante.

Não há estudos publicados no Brasil sobre as células marrons. Este estudo objetivou investigar a morfologia (tamanho e forma), os possíveis locais de ocorrência, a prevalência, a intensidade (área ocupada no tecido) e a composição bioquímica das células marrons de *L. pectinata*, de uma população natural da Baía de Camamu, sul da Bahia.

Material e Métodos

Os exemplares de *L. pectinata* foram coletados na localidade de Porto do Campo (13°57'84"S; 39°02'94"W), Baía de Camamu, sul da Bahia (Figura 1), em abril de 2012. Os exemplares (n = 48) foram obtidos mediante coleta manual em área de manguezal e transportados a fresco ao Laboratório de Histologia Animal da Universidade Estadual de Santa Cruz (UESC), onde foram imediatamente processados. Após medidos quanto ao comprimento (eixo ântero-posterior) e altura (eixo dorso-ventral) com um paquímetro digital, estes foram abertos e examinados, sob microscópio estereoscópico, quanto a possíveis alterações anatômicas, presença de macroparasitos ou sinais de enfermidades. Cortes de aproximadamente 5 mm de tecido foram retirados do manto, pé, sifão, músculo adutor, brânquias, rim, gônada e glândula digestiva, sendo que 50% desse material foi fixado em formalina a 10% e 50% em fixador de Carnoy, nos quais foi mantido por 24 h e 1 h, respectivamente, conforme metodologia proposta por CAPUTO *et al.* (2010).

O material foi processado por técnica rotineira de histologia, com inclusão em parafina e obtenção, mediante microtomia, de cortes de 6-7 µm, após o que os tecidos foram submetidos a quatro tipos de coloração: o Ácido Periódico de Schiff (PAS) (CALDINI, 2002) foi utilizado para evidenciar glicogênio, glicoproteínas e mucoproteínas, o Azul da Prússia (CALDINI, 2002), também conhecido como "Método de Perls", para evidenciar ferrocianeto férrico (Fe^{+++}) e o Azul de Turnbull para evidenciar ferricianeto ferroso (Fe^{++}) (CALDINI, 2002); a hematoxilina de Harris e eosina (HE) (HOWARD *et al.*, 2004) foi utilizada para o estudo morfológico e também como controle das análises histoquímicas, já que as "brown cells" são negativas a estes corantes (STEIN & MACKIN, 1955). Para evidenciar a intensidade de reação dos três primeiros corantes, adotou-se a classificação descrita por ANDRIÃO *et al.* (2009). Assim, estes foram divididos, conforme a intensidade da cor da reação em: Fortemente corado (+++) (vermelho para PAS e azul escuro para Método de Perls e Azul de Turnbull), Corado (++) (rosa para PAS e azul para os outros dois corantes) e Fracamente Corado (+) (rosa claro para PAS e azul claro para os demais). O material foi analisado ao microscópio de luz, em qual também foi feita a sexagem, mediante a observação das gônadas.

As células marrons foram analisadas quanto aos locais de ocorrência, morfologia (forma e tamanho das células), prevalência (quantidade de animais/órgão específico com presença de células marrons/número total de animais analisados, expresso em porcentagem), intensidade de ocorrência e reação histoquímica. Utilizou-se uma lâmina graduada para realizar a medida das células ($n = 30$) células marrons/órgão. A captura das imagens dessas células foi feita com o uso de uma câmera digital marca Olympus, modelo E-330 acoplada ao microscópio de luz.

A intensidade de ocorrência das células marrons nos órgãos de *L. pectinata* foi avaliada através da técnica de estereologia (LOWE *et al.*, 1994). Essa técnica permite avaliar a área ocupada por determinado parasito ou célula em tecidos e órgãos do animal em análise e assim quantificar a intensidade de ocupação. Para tal, foi feito uso de uma grátula de Weibel, sendo que 10 exemplares de *L. pectinata* foram escolhidos aleatoriamente para essa análise. Em cada animal avaliou-se cinco campos/órgão com positividade para essas células, após o que foi calculada a média da área ocupada pelas células marrons por órgão e em cada animal. Os resultados foram ordenados em uma escala de classificação também sugerida por LOWE *et al.* (1994), sendo: I - ocupação leve = $< 5\%$ de área ocupada pelas células marrons; II - ocupação moderada = $5 - 25\%$; III - ocupação alta = $25 - 50\%$ e IV - ocupação muito alta = $> 50\%$. Análises de variância unifatoriais e o teste a posteriori de Tukey foram utilizados para verificar variações espaciais na intensidade de ocorrência das células marrons.

O teste de Qui-quadrado (χ^2) foi aplicado para verificar a existência de dependência da frequência de ocorrência das “brown cells” em *L. pectinata* no que se refere aos diferentes órgãos. O nível de significância adotado para todas as análises foi de 95%. As análises foram feitas no programa BioEstat 5.0.

Resultados

Os exemplares de *L. pectinata* mediram $4,3 \pm 0,27$ cm de altura e $4,9 \pm 0,31$ cm de comprimento ($n = 48$). A análise macroscópica não evidenciou sinais de enfermidades ou de parasitismo. A proporção sexual (PS) macho: fêmea (M: F) foi de 1: 1,4.

As análises microscópicas evidenciaram células marrons em todos os exemplares e todos estes apresentaram essas células no rim e na gônada. Neste último órgão, as células marrons foram encontradas quase sempre dentro dos folículos. O pé foi o único órgão no qual estas estiveram ausentes. A prevalência nos diferentes órgãos está apresentada na figura 2, sendo que o teste de Qui-quadrado (χ^2) mostrou que a frequência de ocorrência das células marrons é dependente do órgão ($p < 0,0001$).

Tanto a forma quanto o tamanho das células marrons foi variável nos diferentes órgãos (Figuras 3-8). Nas brânquias, gônada e glândula digestiva, estas se apresentaram sempre arredondadas, enquanto que no manto, rim, sifão e músculo adutor, estas apresentaram também outras formas, como em bastonete (manto), vírgula (músculo adutor) e em forma retangular (sifão e rim). Além disso, na gônada, rim e glândula digestiva, estas estavam geralmente agrupadas, por vezes pareadas, enquanto que nos demais órgãos (manto, sifão, músculo adutor e brânquias) estas apresentavam-se, quase sempre, isoladas. O tamanho médio das células marrons variou de 2,83 μm a 5,41 μm ($4,37 \pm 0,77$). As maiores células foram geralmente encontradas no manto e no sifão, com tamanhos que variaram de 2,5 a 10 μm (Tabela I).

A quantidade de células marrons variou expressivamente entre os órgãos. O rim apresentou a maior quantidade dessas células, com uma média de 7,51% de área ocupada, caracterizando-se, na escala de LOWE *et al.* (1994), como tendo “ocupação moderada” de células marrons. Os demais órgãos apresentaram “ocupação leve”, isto é, menos de 5% de área do órgão ocupada pelas células marrons (Tabela II), o que resultou em diferença estatística ($p < 0,05$) no que se refere a intensidade de ocorrência dessas células nos diferentes órgãos. A quantidade de células marrons no rim foi semelhante apenas às da gônada e do manto (Tabela III).

Os resultados histoquímicos apresentaram positividade apenas em três dos oito órgãos analisados (Figura 9). O rim apresentou grande número de indivíduos positivos nas três técnicas (PAS, Azul da Prússia e Azul de Turnbull) (Figuras 10-13). O manto apresentou positividade nas três técnicas, mas em poucos animais (Figuras 14-15). Já a gônada (Figuras 16-17) apresentou positividade somente ao Método de Perls e ao Azul de Turnbull, em apenas um indivíduo em cada técnica. Os resultados histoquímicos evidenciaram, também, que nenhum órgão foi classificado como “Fortemente Corado”. O rim destacou-se com o maior número de indivíduos positivos ao PAS como “Fracamente Corado” e ao Método de Perls na categoria “Corado”. O manto e a gônada apresentaram poucos indivíduos positivos às técnicas histoquímicas, como está apresentado na Tabela IV.

Discussão

Este estudo evidenciou a presença de células marrons na maioria dos órgãos de *Lucina pectinata*, o que está em concordância com os resultados obtidos por CHENG (1981) em *C. virginica* e por MORADO *et al.* (1998) em *Mytilus trossulus* Gould, 1850. Em relação à grande variação de forma e tamanho dessas células em *L. pectinata*, estudos anteriores mostraram as

mesmas características: ZAROOGIAN & YEVICH (1994) relataram o fato em *C. virginica* e ZAROOGIAN & JACKIM (2000) em *Mercenaria mercenaria* (Linnaeus, 1758). Referente ao tamanho e organização das células marrons, no presente estudo foram observadas médias de tamanho de 2,83 μm a 5,41 μm , com valores que variaram entre 2,5 e 10 μm . A média geral de tamanho nos órgãos foi de 4,37 μm . Esses resultados se assemelham aos observados em *C. virginica* por CHENG & BURTON (1966), que encontraram tamanho entre 6 e 12 μm , que foram classificadas por esses autores como células marrons de tamanho médio. Convergindo com os nossos resultados, os mesmos observaram, também, agrupamento dessas células. Similarmente ao observado nas células marrons deste estudo, em outra espécie de ostra, *Crassostrea gigas* (Thunberg, 1793), RUDELL & WELLINGS (1971) observaram células marrons com aproximadamente 12 a 20 μm e relataram que estas ocorriam isoladamente, mas que não foi incomum encontrá-las pareadas.

A presença de células marrons nos rins de todos os exemplares, órgão em que estas células se apresentaram, também, em maior quantidade, está provavelmente relacionada à sua função primária de excreção. Estudos de KATO (1960) relatam que substâncias contidas nas células marrons da glândula pericárdica, como bilirrubina, amônia, uréia, alantoína, creatina, ácido hipúrico e ácido úrico evidenciam claramente esta função. Além da remoção dessas substâncias, WHITE (1942) propôs que estas células extraem ácidos do sangue, os quais seriam carregados para o rim pelos canais renopericardiais.

Em relação à alta prevalência e altos valores de intensidade de ocupação das células marrons também no manto, isso está provavelmente relacionado ao fato de este órgão, juntamente com as aurículas e cavidade pericárdica, serem os locais de ocorrência das glândulas de Keber, produtoras dessas células (CHENG, 1981). No que se refere à conspícua presença dessas células na gônada, principalmente dentro dos folículos, isso pode sugerir que estas participam da fagocitose de gametas residuais. Por outro lado, a presença evidente destas na glândula digestiva foi relatada também em *Mytilus galloprovincialis* (Lamarck, 1819) (CAJARAVILLE & ÂNGULO, 1993). USHEVA & FROLOVA (2006), também relataram agregações de “brown cells” na glândula digestiva de *Crenomytilus grayanus* (Dunker, 1853) contendo vacúolos de cor marrom claro e marrom amarelado com lipofuscina no citoplasma. Já a baixa frequência das “brown cells” no sifão e no músculo adutor e sua ausência no pé, pode estar relacionado à natureza de tecido que predominantemente forma esses órgãos (tecido muscular). A estrutura do sifão é derivada da fusão de pregas opostas do manto nas proximidades das aberturas inalante e exalante e sua base é composta pelos músculos retratores do sifão. O músculo adutor é constituído por dois tipos de fibras: músculos de

contrações rápidas e músculos de contrações lentas (ANSELL *et al.*, 1999; RUPPERT *et al.*, 2005). Entretanto, ZAROOGIAN & YEVICH (1994) relataram a ocorrência de células marrons na superfície e dentro dos feixes musculares de *C. virginica*. A baixa frequência de ocorrência das células marrons nas brânquias foi também observada por SOUZA (2008) em *C. rhizophorae*, e em princípio, ainda não há uma explicação para esse fato.

Em nenhum exemplar de *L. pectinata* foi observado parasitismo. Isso pode explicar, em parte, os valores geralmente baixos de intensidade de ocorrência das células marrons nos diferentes órgãos. A ausência de parasitos nessa espécie foi também observada por ZEIDAN *et al.* (2012). Em ostras *C. virginica* parasitadas por *Perkinsus marinus* (Mackin *et al.*, 1950), foi observado um aumento do número de células marrons em relação a ostras não infectadas (MACKIN, 1951). Isso foi atribuído a um desequilíbrio no metabolismo lipídico dessa ostra, possivelmente devido a um crescimento nos processos de oxidação e redução resultante desta doença. O mesmo autor também notou um crescimento em número destas células em *Macoma balthica* (Linnaeus, 1758) parasitada por *Perkinsus* sp. e concluiu que a resistência desse molusco a esse patógeno seria o resultado da grande quantidade de células marrons produzidas. Também CHENG & BURTON (1965) observaram que embora estas células estivessem presentes em ostras *C. virginica* não parasitadas, sua quantidade aumentava em ostras parasitadas por esporocistos do trematódeo *Bucephalus* sp.

Com relação aos resultados histoquímicos observados neste estudo, as células marrons são melhor evidenciadas quando coradas com o Ácido Periódico de Schiff (PAS). Os resultados positivos dessas células a esta técnica indicam possível presença de glicogênio no interior das mesmas, o que pode remeter a uma função de armazenamento de carboidrato. Porém, por não ser um método específico para o glicogênio, o PAS também pode indicar presença de proteínas conjugadas a carboidratos, como glicoproteínas, que entre outras funções, compõem o glicocálix das células animais e estão envolvidas no reconhecimento celular (CARVALHO & HAINES, 2000) ou ainda mucoproteínas que atuam no transporte de substâncias e em mecanismos de defesa (NAKAIE *et al.*, 1983). STEIN & MACKIN (1955) também encontraram “brown cells” positivas ao PAS em *C. virginica*. CHENG & BURTON (1966) estudando esta mesma espécie de ostra, observaram apenas algumas “brown cells” positivas ao PAS e diástase resistentes (resistentes à ação dessa enzima, conhecida hoje como amilase, que catalisa a hidrólise de carboidratos). CHENG (1981) considerou que a natureza deste material poderia ser uma substância como mucoproteína, glicoproteína, glicolipídio ou ainda um esfingolipídio. Esse autor argumenta ainda que desde que HAIGLER (1964) mostrou que as células marrons são compostas por lipídios e por proteínas com propriedades similares

às de lipofuscinas, o material positivo ao PAS e diástase resistente poderia ser classificado como esfingomielina e que a reação positiva ao PAS não seria devido à presença de carboidrato, mas sim devido à presença de uma amina primária acilada adjacente ao grupo hidroxila, que é capaz de reagir com o ácido periódico. Entretanto, RUDELL & WELLINGS (1971) observaram partículas de glicogênio em células marrons de *C. gigas*, embora considerassem que essas células não estariam envolvidas no armazenamento de carboidrato.

A positividade ao PAS das células marrons pode indicar ainda a presença de lipofuscina, substância intralisossomal polimérica, formada principalmente por resíduos de ligação cruzada de proteínas devido a processos oxidativos catalisados pelo ferro e que é composta principalmente de proteína e lipídio (30-70% e 20-50%, respectivamente), carboidratos (4-7%) e metais, especialmente ferro, que também são encontrados em quantidades consideráveis (BRUNK & Terman, 2002). De acordo com esses autores, a formação inevitável e o acúmulo de lipofuscina em células, parecem conduzir a uma variedade de defeitos em função celular e homeostase e que a natureza indigestível deste material está associada com uma diminuição progressiva da função lisossômica, que tem efeitos secundários em diversas atividades celulares, constituindo assim, um importante aspecto do envelhecimento. Portanto, permanece incerta a questão sobre a natureza química evidenciada pelo PAS nas células marrons.

Os compostos de ferro evidenciados pelo Método de Perls e pelo Azul de Turnbull nas células marrons de *L. pectinata* neste estudo podem estar relacionados à presença de hemossiderina e/ou ainda da lipofuscina, já mencionada acima. Conforme KURZ *et al.* (2008), o ferro pode se acumular em alguns lisossomos na forma não degradável, seja como lipofuscina ou, principalmente, como hemossiderina. Segundo GROTO (2008), quando o ferro está em excesso, a capacidade de armazenamento de apoferritina (proteína não combinada com ferro) recém-sintetizada pode ser ultrapassada, o que levaria à deposição de ferro adjacente às esferas de ferritina, proteína que é responsável pelo armazenamento e transporte controlado de ferro e histologicamente, tal depósito amorfo de ferro é chamado de hemossiderina. Ferro é um mineral vital para a homeostase celular, sendo essencial para o transporte de oxigênio, síntese de DNA e metabolismo energético, porém seu acúmulo é extremamente nocivo para os tecidos, uma vez que em sua forma livre induz o estresse oxidativo através da síntese de espécies reativas de oxigênio, que por sua vez são tóxicas e lesam proteínas, lipídios e DNA (KOURY & DONANGELO, 2003; GROTO, 2008). Portanto, a presença de hemossiderina e/ou lipofuscina nas “brown cells” de *L. pectinata* pode sugerir que estas células têm um possível papel no controle da quantidade de ferro, metal que em

excesso torna-se tóxico. Ainda com relação à presença desse metal nas células marrons, STEIN & MACKIN (1955), mediante o uso do Método de Perls, observaram reação negativa em *C. virginica*, o que indicaria que estas células são livres de ferro. Porém, KATO (1960) demonstrou, através desse mesmo método que as células marrons de alguns bivalves são ferro-positivas, o que foi confirmado por RUDDALL & WELLINGS (1971) e por PIRIE & GEORGE (1979).

Com relação à conspícua presença das células marrons em *L. pectinata*, é possível que haja uma relação ao ambiente e profundidade com que essa espécie vive no substrato. De acordo com PRADA-GAMERO *et al.* (2004), a combinação dos elevados conteúdos de matéria orgânica com a condição anaeróbia, as fontes de Fe reativo e de SO_4^{2-} (íon sulfato) prontamente disponíveis, fazem dos solos dos manguezais ambientes propícios à ocorrência da redução bacteriana do sulfato a sulfeto e seu consequente acúmulo sob a forma de pirita (FeS_2). É muito provável que as células marrons tenham um importante papel na remoção de compostos de ferro e enxofre dos tecidos de *L. pectinata*, possibilitando que a mesma possa habitar o ambiente do manguezal.

Em conclusão, ficou claro que as células marrons têm ampla distribuição em *L. pectinata*, mas com maior concentração no manto, rim, gônada e glândula digestiva. Sugerimos que a ocorrência dessas células no manto deve-se à presença de glândulas de Keber nesse local, produtoras desses hemócitos. Já no rim indica papel de excreção e na gônada fagocitose de produtos da gametogênese. A positividade aos métodos para evidenciar ferro, indica que as células marrons atuam na remoção desse metal do meio, o que permite a essa espécie habitar camadas mais profundas do sedimento do manguezal. Consideramos importante o aprofundamento e a continuidade dos estudos sobre essas células em bivalves da costa brasileira, principalmente em função de sua evidente multiplicidade funcional, o que pode levar a um melhor entendimento da fisiologia e ecologia desses organismos, principalmente em ambientes de manguezal.

Agradecimentos

À CAPES pela concessão da bolsa e à FAPESB pelo financiamento do projeto. Os autores são gratos, também, a Verena Rebeca Andrade e à Mariane Aguiar Luz pela ajuda nos processamentos e ao Maxwell Messias Ribeiro pela confecção do mapa.

Literatura citada

- ANDRIÃO, N.A.; ARAÚJO, M.L.; IBRAHIM, A.F.; CATTELAN, J.H.; CRUZ, C. 2009. Histologia, histoquímica e morfometria da epiderme e ductos sudoríparos do tegumento de equinos. **Revista de Medicina Veterinária e Zootecnia** **25** (1): 32-37.
- ANSELL, A.D.; HARVEY, R.; GÜNTHER, C.P. 1999. Recovery from siphon damage in *Donax vittatus* (Da Costa) (Bivalvia: Donacidae). **Journal of Molluscan Studies** **65**: 223-232.
- BRUNK, U.T.; TERMAN, A. 2002. Lipofuscin: mechanisms of age-related accumulation and influence on cell function. **Free Radical Biology & Medicine** **33** (5): 611–619. doi: S0891-5849(02)00959-0.
- CAJARAVILLE, M.P.; URANGA, J.A.; ÂNGULO, E. 1993. Light microscopic catalase histochemistry in mussel digestive gland tissue. **Histology and Histopathology** **8** (3): 537-546.
- CALDINI, E.G. 2002. Métodos Histoquímicos, p. 40-82. In: E.G. CALDINI (Ed.). Manual de técnicas em histologia e biologia celular do laboratório de biologia celular da faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. São Paulo, Universidade de São Paulo, 154 p.
- CAPUTO, L.F.G.; MOTA, E.M.; GITIRANA, L.B. 2010. Técnicas citológicas, p. 189-213. In: E. MOLINARO (Ed.). Conceitos e métodos para formação de profissionais em laboratórios de saúde. Rio de Janeiro, Fiocruz, II + 254 p.
- CARBALLAL, M.J.; M.C. LÓPEZ; C. AZEVEDO & A. VILLALBA. 1997. Hemolymph cell types of the mussel *Mytilus galloprovincialis*. **Diseases of Aquatic Organisms** **29**: 127-135.
- CARVALHO, I; HAINES, A.H. 2000. Síntese de aminoglicosídeos, precursores de pseudo-dissacarídeos potencialmente ativos. **Química Nova** **23** (1): 37-41.
- CHENG, T.C. 1981. Bivalves, p. 233-299. In: N.A. RATCLIFFE E A.F. ROWLEY (Ed.). Invertebrate blood cells. London, Academic Press, I + 641p.
- CHENG, T.C.; BURTON, R.M. 1965. Relationships between *Bucephalus* sp. and *Crassostrea virginica*: Histopatology and sites of infection. **Chesapeake Science** **6** (1): 3-16.
- CHENG, T.C.; BURTON, R.M. 1966. Relationships between *Bucephalus* sp. and *Crassostrea virginica*: a histochemical study of some carbohydrates and carbohydrate complexes occurring in the host and parasite. **Parasitology** **56** (1): 111-122.
- FABRIK, I.; RUFEROVA, Z.; HILSCHEROVA, K.; ADAM, V.; TRNKOVA, L.; KIZEK, R. 2008. A determination of metallothionein in larvae of freshwater midges (*Chironomus riparius*) using brdicka reaction. **Sensors** **8** (4): 4081-4094. doi: 10.3390/s8074081.

- GUZMÁN-GARCÍA, X.; A.V. BOTELHO; L. MARTINEZ-TABCHE & H. GONZÁLEZ-MÁRQUEZ. 2009. Effects of heavy metals on the oyster (*Crassostrea virginica*) at Mandinga Lagoon, Veracruz, Mexico. *Revista de Biología Tropical* 57(4): 955-962.
- GROTTO, H.Z.W. 2008. Iron metabolism: an overview on the main mechanisms involved in its homeostasis. *Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia* 30 (5): 390-397.
- HAIGLER, S.A. 1964. A histochemical and cytological study of the “brown cells” found in “auricular pericardial gland” and other tissues of the oyster, *Crassostrea virginica* (Gmelin). Master’s thesis, University of Delaware.
- HOWARD, D.W.; LEWIS, E.J.; KELLER, B.J.; SMITH, C.S. 2004. Histological techniques for marine bivalve mollusks and crustaceans. *NOAA Technical Memorandum NCCOS* 5 (1): 1-218.
- JESUS, T.B.; CARVALHO, C.E.V. 2008. Utilização de biomarcadores em peixes como ferramenta para avaliação de contaminação ambiental por mercúrio (Hg). *Oecologia Brasiliensis* 12 (4): 680-693.
- KATO, K. 1960. Excretion of the Keber s Organ in some Lamellibranchs. *The Science Reports of the Saitama University* 3B (3): 233-244.
- KOURY, J. C.; DONANGELO, C.M. 2003. Zinco, estresse oxidativo e atividade física. *Revista de Nutrição* 16 (4): 433-441.
- KURZ, T; TERMAN, A.; GUSTAFSSON, B.; BRUNK, U.T. 2008. Lysosomes and oxidative stress in aging and apoptosis. *Biochimica et Biophysica Acta* 1780 (2008): 1291–1303. doi: doi:10.1016/j.bbagen.2008.01.009.
- LANELLA, P.; ITOYAMA, M.M. 2004. O papel das fosfatases nos organismo. *Revista Unorp (Centro Universitário do Norte Paulista)* 5 (12): 63-77.
- LOWE, D.M.; SALKELD, P.N.; CARR, M.R. 1994. The effect of geographical location on the cellular composition of the mantle tissue of the mussel, *Mytilus edulis*. *Journal of Marine Biology Association* 74 (1): 225-232.
- MACKIN, J.G. 1951. Histopathology of Infection of *Crassostrea virginica* (Gmelin) by *Dermocystidium marinum*. *Bulletin of Marine Science of the Gulf and Caribbean* 1 (1): 72-87.
- MORADO, J.F.; MOONEY, L.L.; BABCOCK, M.M.; HARRIS, P.M. 1998. Histopathological Observation of Bay Mussels, *Mytilus trossulus*, Exposed to Exxon Valdez Crude Oil in Prince William Sound, p. 133-153. In: M.M. BABCOCK et al. (Ed.). *Mussel Bed Restoration and Monitoring, Juneau-Alaska, Auke Bay Laboratory*, 242p.

- NAKAIE, C.M.A.; CARDIERI, J.M.A.; ROZOV, T. 1983. Drogas mucolíticas e expectorantes. **Revista Paulista de Pediatria** 5: 339-346.
- PIRIE, B.J.S.; GEORGE, S.G. 1979. Ultrastructure of the heart and excretory system of *Mytilus edulis* (L.). **Journal of Marine Biological Association of the United Kingdom** 59: 819-829.
- PRADA-GAMERO, R.M.; VIDAL-TORRADO, P.; FERREIRA, T.O. 2004. Mineralogia e físico-química dos solos de mangue do rio Iriri no canal de Bertioiga (Santos, SP). **Revista Brasileira de Ciência do Solo** 28 (2): 233-243. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-06832004000200002>.
- RIFKIN, E., CHENG, T.C., HOHL, H.R. 1969. A electron-microscope study of the constituents of encapsulating cysts in the American oyster, *Crassostrea virginica*, formed in response to *Tylocephalum* metacestodes. **Journal of Invertebrate Pathology** 14 (2): 211-226.
- ROESIADI, G. 1994. Metallothionein induction as a measure of response to metal exposure in aquatic animals. **Environmental Health Perspectives** 102 (12): 91-95.
- RUDELL, C.L.; WELLINGS, S. R. 1971. The Ultrastructure of the Oyster Brown Cell, a Cell with a Fenestrated Plasma Membrane. **Zeitschrift für Zellforschung und Mikroskopisch Anatomic** 120:17-28.
- RUPPERT, E.E.; FOX, R.S.; BARNES, R.D. 2005. **Zoologia dos Invertebrados, uma abordagem funcional e coevolutiva**. Rocca, São Paulo, VII 1168 p.
- SOUZA, R.A.R. 2008. **Ocorrência de “Brown cells” em bivalves marinhos do sul da Bahia**. Monografia em Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Santa Cruz, 35 p.
- STEIN, J.E.; MACKIN, J.G. 1955. A Study of the Nature of Pigment Cells of Oysters and the Relation of Their Numbers to the Fungus Disease Caused by *Dermocystidium marinum*. **The Texas Journal of Science** 7: 422-429.
- TAKATSUKI, S. 1934a. On the nature and function of the amebocytes of *Ostrea edulis*. **The Quarterly Journal Microscopical Science** 76: 379-436.
- TAKATSUKI, S. 1934b. Beiträge zur Physiologie des Austerherzens. **Science Reports of the Tokyo Bunrika Daigaku sec. B** 2: 55-62.
- USHEVA, L.N.; FROLOVA, L.T. 2006. Morphofunctional changes of the digestive gland in the bivalve mollusk *Crenomytilus grayanus* (Dunker, 1853) in normal conditions and after parasitic invasion by trematodes. **Russian Journal of Marine Biology** 32 (2): 96-105. doi: 10.1134/S1063074006020040.
- WHITE, K.M. 1942. The pericardial cavity and the pericardial gland of the Lamellibranchia. **Proceedings of the Malacological Society of London** 25 (2): 37-88.

- ZAROOGIAN, G. 1997. Use of monochlorobimane to determine the in vivo effect of cadmium, copper and lead on glutathione status in *Mercenaria mercenaria* brown cells. **Comparative Biochemistry and Physiology** **116C**: 117-123.
- ZAROOGIAN, G.; JACKIM, E. 2000. In vivo metallothionein and glutathione status in an acute response to cadmium in *Mercenaria mercenaria* brown cells. **Comparative Biochemistry and Physiology** **127** (3): 251-261.
- ZAROOGIAN, G.; NORWOOD, C. 2002. Glutathione and metallothionein status in an acute response by *Mercenaria mercenaria* brown cells to copper in vivo. **Ecotoxicology and Environmental Safety** **53** (2): 285-292.
- ZAROOGIAN, G.; YEVICH, P. 1994. The nature and function of the brown cell in *Crassostrea virginica*. **Marine Environmental Research** **37** (4): 355-373.
- ZEIDAN, G.; LUZ, M.S.A.; BOEHS, G. 2012. Parasites of economically important bivalves from the southern coast of Bahia State, Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária** **21** (4): 391-398.

Tabela I. Tamanho médio das células marrons em μm (micrômetros) nos órgãos de *Lucina pectinata*.

Órgão	Manto	Sifão	Músculo Adutor	Brânquias	Rim	Gônada	Glândula Digestiva
Tamanho	5,16 $\pm 2,32$	5,41 $\pm 2,42$	4,08 $\pm 1,64$	2,83 $\pm 0,84$	4,5 $\pm 1,97$	4,41 $\pm 1,53$	4,25 $\pm 1,84$

Tabela II. Média dos valores da intensidade de ocorrência das células marrons nos órgãos de *Lucina pectinata* (n = 10).

	Manto	Sifão	Músculo Adutor	Brânquias	Rim	Gônada	Glândula Digestiva
Ocupação Leve	3,42%	1,14%	1,04%	0,95%	-	3,61%	3,04%
Ocupação Moderada	-	-	-	-	7,51%	-	-
Ocupação Alta	-	-	-	-	-	-	-
Ocupação Muito alta	-	-	-	-	-	-	-

Tabela III. Resultado da ANOVA e teste de Tukey da intensidade de ocorrência das células marrons entre os órgãos de *Lucina pectinata*. GL = graus de liberdade; SQ = soma dos quadrados; QM = quadrado médio; F = estatística de teste; p = valor; 2 = sifão; 3 = músculo adutor; 4 = brânquias; 5 = rim; 7 = glândula digestiva.

Fontes de Variação	GL	SQ	QM	F	p	Tukey (p < 0,01)
Tratamentos	6	324,312	54,052	5,3614	0,0003	5 > 2; 5 > 3;
Erro	63	635,144	10,082			5 > 4; 5 > 7

Tabela IV. Intensidade das reações histoquímicas mostrando o número de indivíduos em cada categoria.

	Fortemente Corado (+++)			Corado (++)			Fracamente Corado (+)		
	Rim	Manto	Gônada	Rim	Manto	Gônada	Rim	Manto	Gônada
AS	0	0	0	7	1	0	20	0	0
Perls	0	0	0	17	2	0	4	1	1
Turnbull	0	0	0	9	2	1	9	0	0

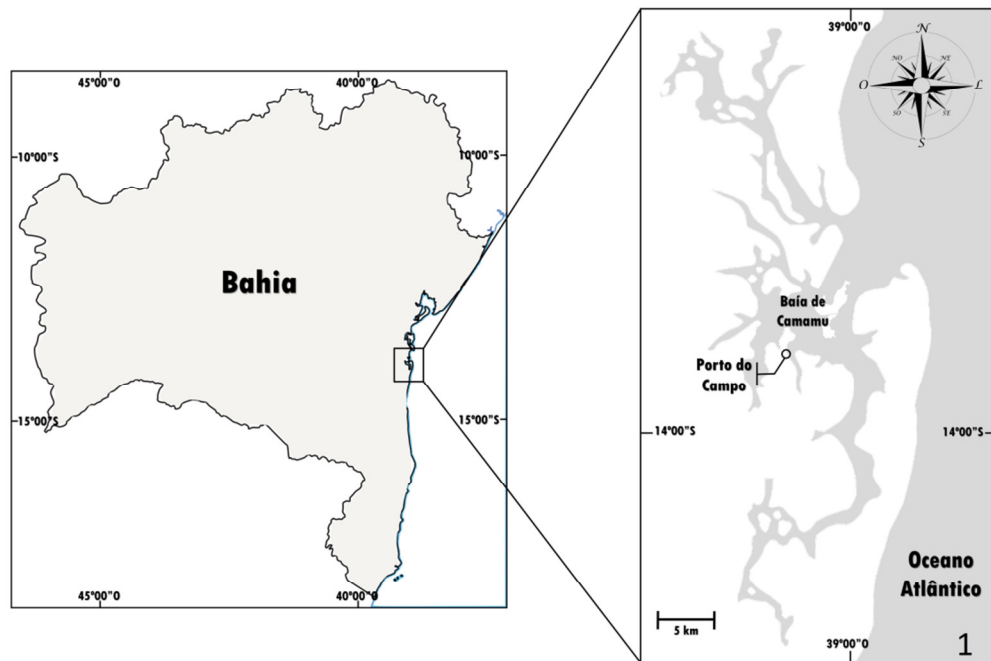


Figura 1. Área de coleta de *Lucina pectinata*.

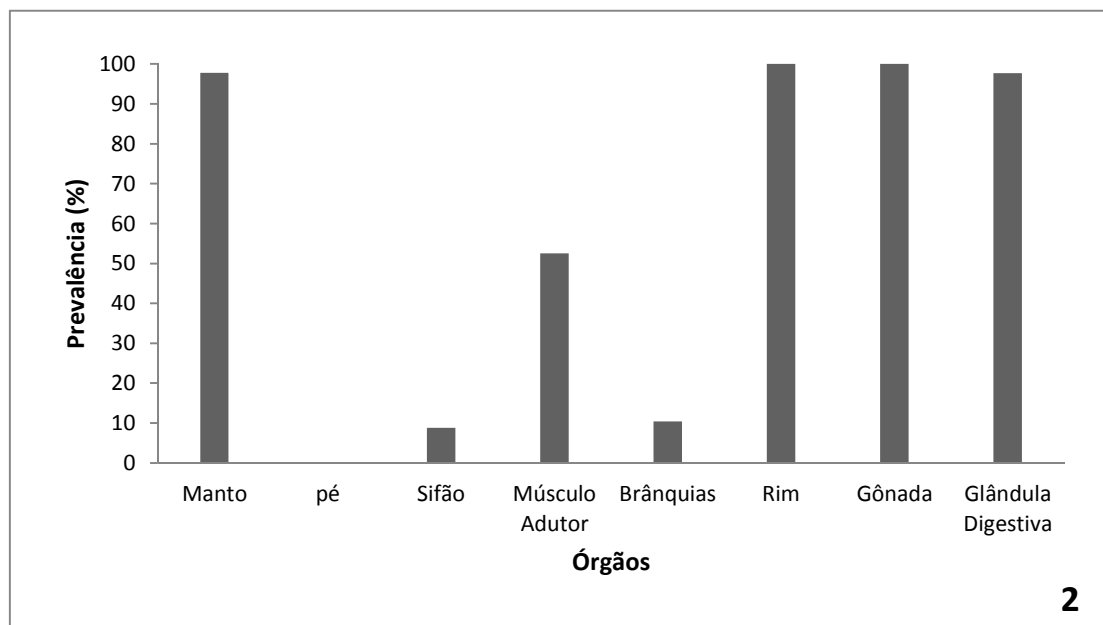


Figura 2. Prevalência (%) de células marrons em *Lucina pectinata* da Baía de Camamu, Bahia (n = 48).

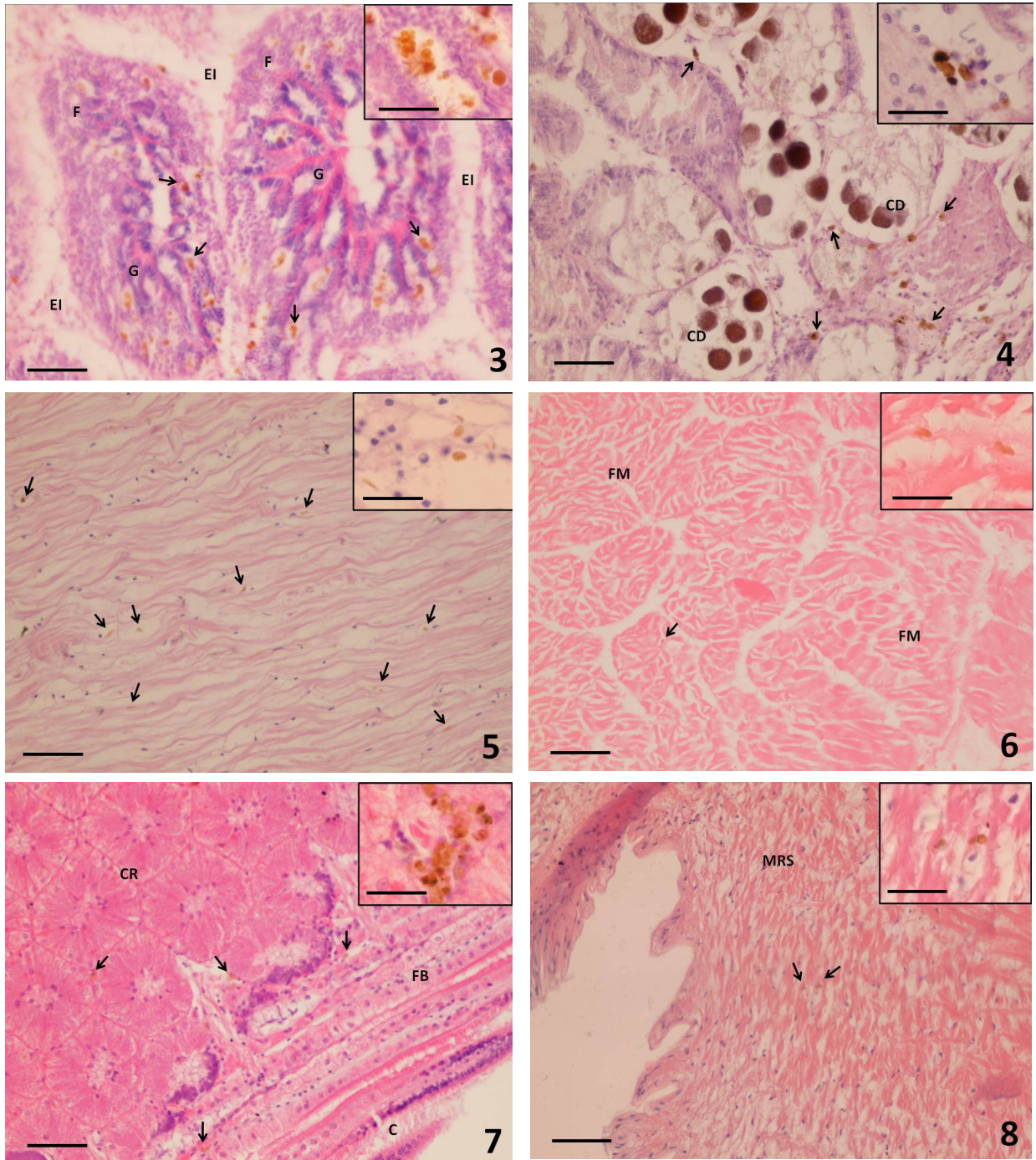


Figura 3-8. Células marrons, indicadas por setas e no detalhe, em órgãos de *Lucina pectinata* corados com hematoxilina de Harris e eosina (HE). **3.** Na região da gônada, no interior de folículo masculino, sendo: F = folículo; G = gametas; EI = espaço interfolicular; **4.** No tecido conjuntivo da glândula digestiva, entre os ácinos, sendo: CD = células digestivas; **5.** No manto; **6.** No músculo adutor, sendo: FM = feixes musculares; **7.** No rim e nas brânquias, sendo: CR = células renais; FB = filamento branquial; C = cílios; **8.** No sifão, sendo MRS = músculos retratores do sifão; Barras = 50 μ m e detalhe das figuras = 20 μ m.

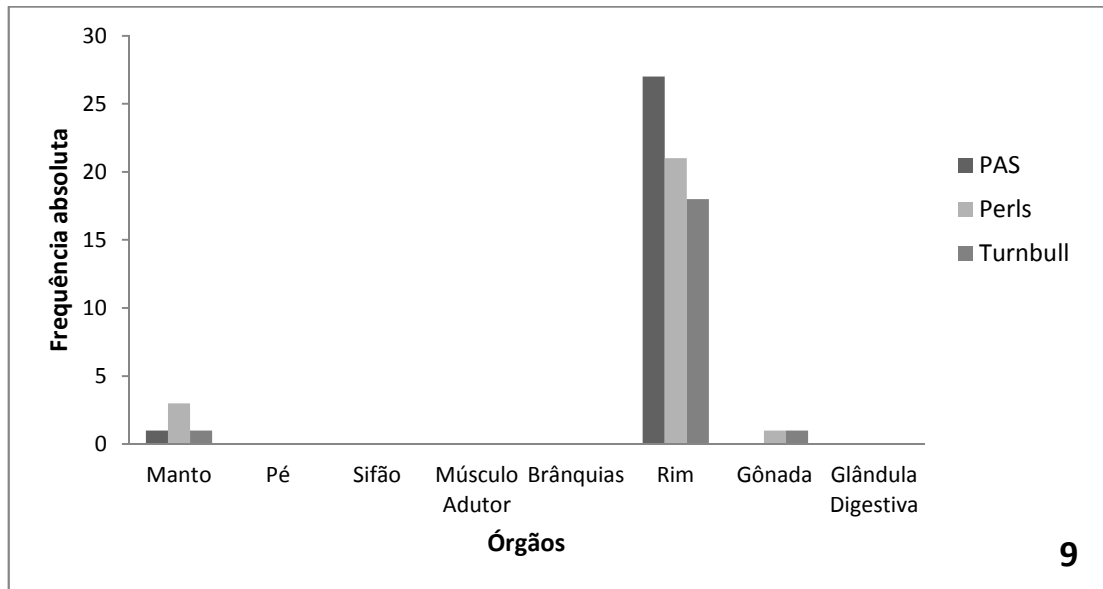
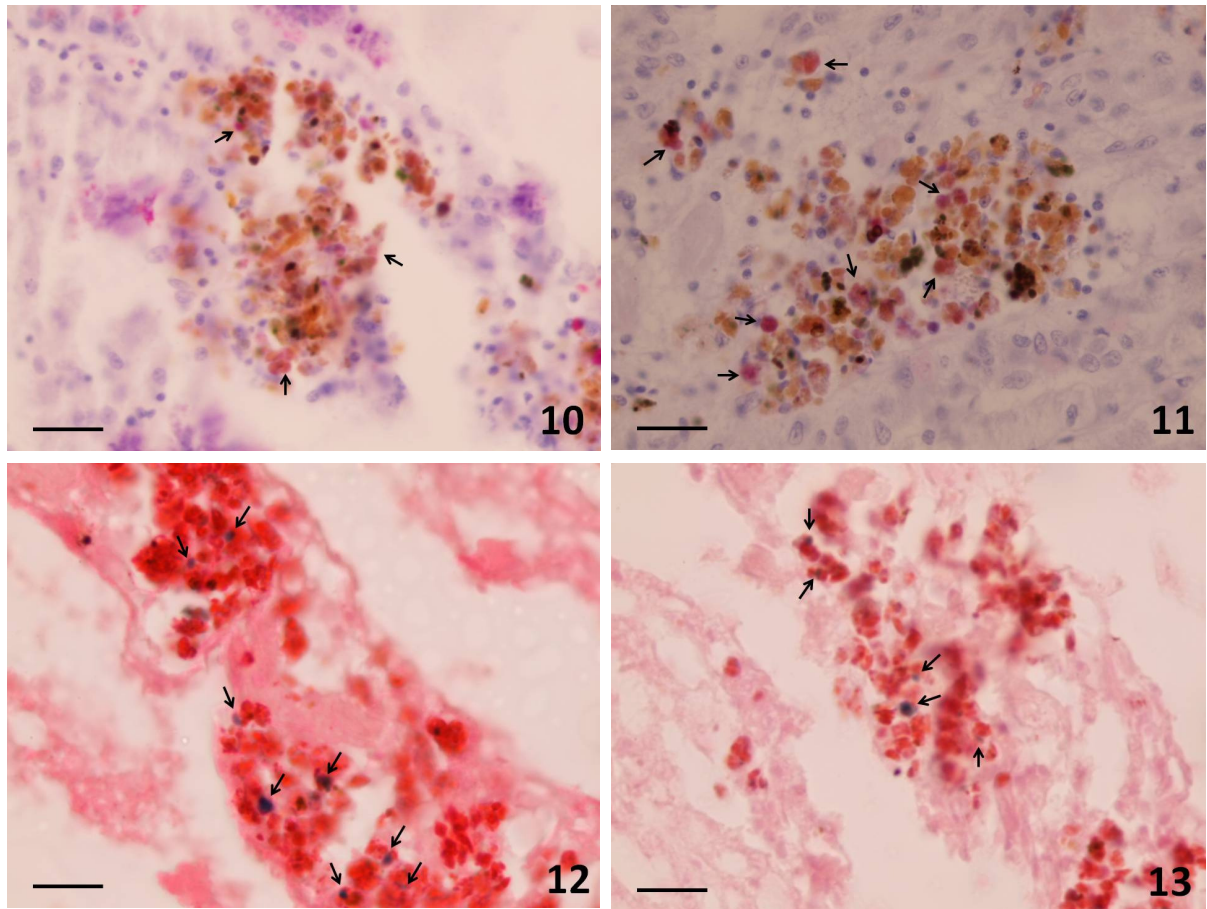
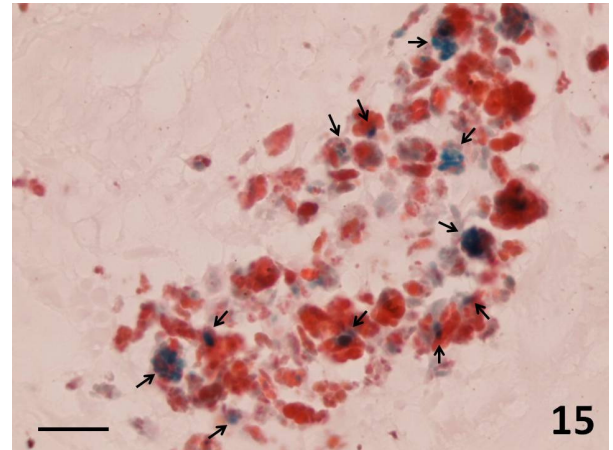
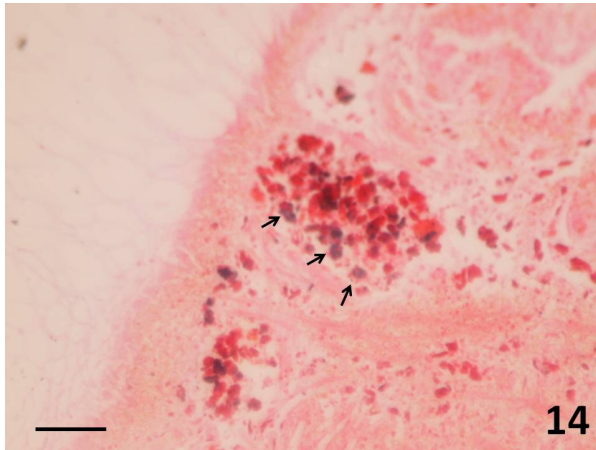


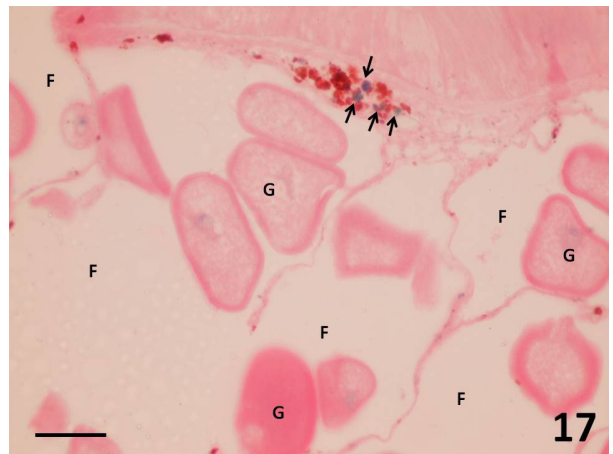
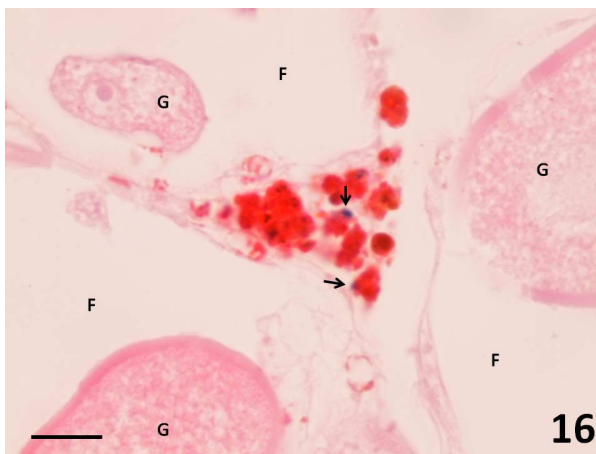
Figura 9. Frequência absoluta de positividade para as técnicas histoquímicas em células marrons de *Lucina pectinata* (n = 48). PAS = Ácido Periódico de Schiff; Perls = Método de Perls; Turnbull = Azul de Turnbull.



Figuras 10-13. Reações histoquímicas no rim. **10.** Células marrons fracamente coradas (+) com o PAS; **11.** Células marrons coradas (++) com o PAS; **12.** Células marrons coradas (++) com o Método de Perls; **13.** Células marrons fracamente coradas (+) com o Azul de Turnbull. Setas = células marrons reativas; Barras = 20 μ m



Figuras 14-15. Reações histoquímicas no manto. **14.** Células marrons fracamente coradas (+) com o Método de Perls; barra = 50 μm ; **15.** Células marrons coradas (++) com o Azul de Turnbull; barra = 20 μm . Setas = células marrons reativas.



Figuras 16-17. Reações histoquímicas na gônada. **16.** Agrupamento de células marrons no espaço interfolicular fracamente coradas (+) com o Método de Perls, mostrando positividade ao Fe^{+++} ; barra = 50 μm ; **17.** Grupos de células marrons coradas com Azul de Turnbull mostrando positividade ao Fe^{++} ; barra = 20 μm . Setas = células marrons reativas; F = folículos e G = gametas.

ANEXO (Normas da Revista)

GENERAL ORIENTATIONS

ZOOLOGIA, the journal of the Sociedade Brasileira de Zoologia (SBZ), publishes original scientific articles on Zoology, authored by members and non-members of the Society. Members of the SBZ publish free of charge, whereas non-members are required to pay page charges, as indicated in the updated price list published in the Society's homepage (www.sbzoologia.org.br).

Manuscripts should be prepared solely in American English. Manuscript submission to ZOOLOGIA is available online only at <http://mc04.manuscriptcentral.com/zool-scielo>. The system is user-friendly and allows authors to monitor the submission process. If you have any difficult with the system, there are many tutorials at the SBZool site that can help you. All documents should be prepared with a word-processor software (preferably MS Word or compatible).

ZOOLOGIA refrains from publishing simple occurrence notes, new records (e.g. geographic, host), distribution notes, case studies based on observation of few specimens, list of species, and similar purely descriptive studies, unless well justified by the authors. Justification should be sent prior submission to the Managing Editor.

RESPONSIBILITY

Manuscripts are received by ZOOLOGIA with the understanding that:

- all authors have approved submission;
- the results or ideas contained therein are original;
- the paper is not under consideration for publication elsewhere and will not be submitted elsewhere unless rejected by ZOOLOGIA or withdrawn by written notification to the Managing Editor;
- the manuscript has been prepared according to these instructions to authors;
- if accepted for publication and published, the article, or portions thereof, will not be published elsewhere unless consent is obtained in writing from the Managing Editor;
- reproduction and fair use of articles in ZOOLOGIA are permitted provided the intended use is for nonprofit educational purposes. All other use requires consent and fees where appropriate;
- the obligation for page charges and text revision fees is accepted by the authors.
- the authors are fully responsible for the scientific content and grammar of the article.
- the authors agree with additional fees associated with English revisions, if necessary.

FORMS OF PUBLICATION

Articles: original articles on all areas of the Zoology.

Short Communications: this form of publication represents succinct, definitive information (as opposed to preliminary results) that does not lend itself to inclusion in a typical, more comprehensive article. A new or modified technique may be presented as a research note only if the technique is not to be used in ongoing studies. Ordinarily, techniques are incorporated into the materials and methods section of a regular article.

Review articles: only invited reviews are published. Unsolicited reviews should not be submitted, but topics may be suggested to the editor or members of the editorial board.

Opinion: letters to the editor, comments on other publications and ideas, overviews and other texts that are characterized as the opinion of one or a group of scientists.

Book reviews: books having a broad interest to the membership of the Society are reviewed by invitation.

Short biography/Obituary: biography and/or obituary of important zoologists that significantly contributed with the knowledge on animal sciences.

MANUSCRIPTS

The text must be left-justified and the pages should be numbered. Use Times New Roman font, 12 points. The front page must include: 1) the title of the article including the name(s) of the higher taxonomic category(ies) of the animals treated; 2) the name(s) of the author(s) with their professional affiliation, only for correspondence purposes, additional affiliations should be included in the Acknowledgments section; 3) name of the Corresponding Author with complete addresses for correspondence, including e-mail; 4) an abstract in English; 5) up to five key words in English, in alphabetical order and different of those words used in the title. The total information on the items 1 to 5 cannot exceed 3,500 characters including the spaces, except if authorized by the Managing Editor.

Literature citations should be typed in small capitals, as follows: SMITH (1990), (SMITH 1990), SMITH (1990: 128), SMITH (1990, 1995), LENT & JURBERG (1965), GUIMARÃES *et al.* (1983). Articles by the same author or sequences of citations should be in chronological order.

Only the names of genera and species should be typed in italics. The first citation of an animal or plant taxon in the text must be accompanied by its author's name in full, the date (of plants, if possible) and the family.

The manuscript of scientific articles should be organized as indicated below. Other major sections and subdivisions are possible but the Managing Editor and the Editorial Committee should accept the proposed subdivision.

ARTICLES AND INVITED REVIEW

Title. Avoid verbiage such as “preliminary studies on...”, “aspects of ...”, and “biology or ecology of...”. Do not use author and date citations with scientific names in the title. When taxon names are mentioned in the title, it should be followed by the indication of higher categories in parenthesis.

Abstract. The abstract should be factual (as opposed to indicative) and should outline the objective, methods used, conclusions, and significance of the study. Text of the abstract should not be subdivided nor should it contain literature citations (exceptions are analyzed by the editors). It should contain a single paragraph.

Key words. Up to five key words in English, in alphabetical order and different of those words used in the title, separated by semicolon. Avoid using composite key words.

Introduction. The introduction should establish the context of the paper by stating the general field of interest, presenting findings of others that will be challenged or expanded, and specifying the specific question to be addressed. Accounts of previous work should be limited to the minimum information necessary to give an appropriate perspective. The introduction should not be subdivided.

Material and Methods. This section should be short and concise. It should give sufficient information to permit repetition of the study by others. Previously published or standard techniques must be referenced, but not detailed. If the material and methods section is short, it should not be subdivided. Avoid extensive division into paragraphs and sub items.

Results. This section should contain a concise account of the new information. Tables and figures are to be used as appropriate, but information presented in them should not be repeated in the text. Avoid detailing methods and interpreting results in this section.

Taxonomic papers have a distinct style that must be adhered to in preparing a manuscript. In taxonomic papers the results section is to be replaced by a section headed TAXONOMY, beginning at the left-hand margin. The description or redescription of species, in a single paragraph, is accompanied by a taxonomic summary section. The **taxonomic summary** section comprises a listing of site, locality and specimens deposited (with respective collection numbers). The appropriate citation sequence and format include: COUNTRY, *Province or State*: City or County (minor area as locality, neighborhood, and others, lat long, altitude, all in parenthesis), number of specimens, sex, collection date, collector followed by the word *leg.*, collection number. This is a general guideline that should be adapted to different situations and groups. Several examples can be found in the previous numbers of the ZOOLOGIA. The taxonomic summary is followed by a remarks section

(Remarks). The Remarks section replaces the discussion of other articles and gives comparisons to similar taxa. Museum accession numbers for appropriate type material (new taxa) and for voucher specimens (surveys) are required. Type specimens, especially holotypes (syntypes, cotypes), paratypes, and a representative sample of voucher specimens, should not be maintained in a private collection; deposition of specimens in established collections is required. Appropriate photographic material should be deposited if necessary. Frozen tissues must also include accession numbers if deposited in a museum/collection.

Discussion. An interpretation and explanation of the relationship of the results to existing knowledge should appear in the discussion section. Emphasis should be placed on the important new findings, and new hypotheses should be identified clearly. Conclusions must be supported by fact or data. Subdivisions are possible. A section labeled Conclusion is not allowed in ZOOLOGIA.

Results and Discussion. The combination of Results and of Discussion into a single section should be avoided. It will ONLY be acceptable if well justified and when the separation is clearly impossible.

Acknowledgments. These should be concise. Ethics require that colleagues be consulted before being acknowledged for their assistance in the study.

Literature Cited. Citations are arranged alphabetically. All references cited in the text must appear in the literature cited section and all items in this section must be cited in the text. Citation of unpublished studies or reports is not permitted, i.e., a volume and page number must be available for serials and a city, publisher, and full pagination for books. Abstracts not subjected to peer review may not be cited. Work may be cited as “in press” only exceptionally and until the copyediting stage when the reference should be completed or suppressed if not published by then. If absolutely necessary, a statement may be documented in the text of the paper by “pers. comm.”, providing the person cited is aware of the manuscript and the reference to his person therein. Personal communications do not appear in the Literature Cited section. The references cited in the text should be listed at the end of the manuscript, according to the examples below. The title of each periodical must be complete, without abbreviations.

Online Supplementary Material. Tables, movies, photographs, documents, and any other electronic supplementary material may be associated to the manuscript in the moment of submission and, upon approval and publication, will be made available in the site of the journal for free access by the readers.

Periodicals

Always add DOI whenever available (as shown below).

- GUEDES, D.; R.J. YOUNG & K.B. STRIER. 2008. Energetic costs of reproduction in female northern muriquis, *Brachyteles hypoxanthus* (Primates: Platyrrhini: Atelidae). **Revista Brasileira de Zoologia** **25** (4): 587-593. doi: 10.1590/S0101-81752008000400002.
- LENT, H. & J. JURBERG. 1980. Comentários sobre a genitália externa masculina em *Triatoma* Laporte, 1832 (Hemiptera, Reduviidae). **Revista Brasileira de Biologia** **40** (3): 611-627.
- SMITH, D.R. 1990. A synopsis of the sawflies (Hymenoptera, Symphita) of America South of the United States: Pergidae. **Revista Brasileira de Entomologia** **34** (1): 7-200.

Books

- HENNIG, W. 1981. **Insect phylogeny**. Chichester, John Wiley, XX+514p.

Chapter of book

- HULL, D.L. 1974. Darwinism and historiography, p. 388-402. *In*: T.F. GLICK (Ed.). The comparative reception of Darwinism. Austin, University of Texas, IV+505p.

Electronic publications

- MARINONI, L. 1997. Sciomyzidae. *In*: A. SOLIS (Ed.). **Las Familias de insectos de Costa Rica**. Available online at: <http://www.inbio.ac.cr/papers/insectoscr/texto630.html> [Accessed: date of access].

Illustrations. Photographs, line drawings, graphs, and maps should be termed figures. Photos must be clear and have good contrast. Please, organize, whenever possible, line drawings (including graphics, if it is the case) as plates of figures or pictures considering the size of the page of the journal. The size of an illustration, if necessary, should be indicated using horizontal or vertical scale bars (never as a magnification in the caption). Each figure must be numbered in Arabic numerals in the lower right corner. When preparing the illustrations, authors should bear in mind that the journal has a matter size of 17.0 by 21.0 cm and a column size of 8,3 by 21,0 cm including space for captions. Figures must be referred to in numerical sequence in the text; indicate the approximate placement of each figure in the margins of the manuscript. Half-tone illustrations must be saved and sent as separate TIFF files with LZW compression; vectorial images (maps, graphics, line drawings, diagrams) should be preferentially provided as vectors in Adobe Illustrator (AI), Corel Draw (CDR) or EPS formats. The required final resolution is 300 dpi for color photos and 600 dpi for half-tone photos or line art. The illustration files should be uploaded to the submission. Upload is limited to 10 MB per file. Color figures can be published if the additional costs are covered by the authors. Alternatively, the authors may choose to publish black and white illustrations in

the paper version of the manuscript and retain the color versions in the electronic version at no additional cost. Captions of the figures should be typewritten right after the Literature Cited. Use a separate paragraph for the caption of each figure or group of figures. Please, note previous publications and follow the pattern adopted for captions. *Tables*. Tables should be generated by the table function of the word-processing program being used, numbered in Roman numerals and inserted after the list of figures captions. Do not use paragraph marks inside of table cells. Legends are provided immediately before each respective table.

SHORT COMMUNICATIONS

Manuscripts are to be organized in a format similar to original articles with the following modifications.

Text. The text of a research note (i.e. Introduction + Material and Methods + Discussion) is written directly, without sections. Acknowledgments may be given, without heading, as the last paragraph. Literature is cited in the text as described for articles.

Literature cited, figures captions, tables, and figures. These items are in the form and sequence described for articles.

OPINIONS

Title. Simply provide a title for the opinion.

Text. Should be concise, objective and contain no figures (unless absolutely necessary).

Name and address of author. This information follows the text or, if present, the literature cited section. The reviewer's name should be in bold type.

BOOK REVIEWS

Title. Give the title of the book, cited as indicated below: **Toxoplasmosis of Animals and Man**, by J.P. DUBEY & C.P. BEATTIE. 1988. Boca Raton, CRC Press, 220p.

The words "edited by" are substituted for "by" when appropriate.

Text. The text usually is not subdivided. If literature must be cited, a headed literature cited section follows the text in the style described for articles. Figures and tables should not be used.

Name and address of author. This information follows the text or, if present, the literature cited section. The reviewer's name should be in bold type.

SHORT BIOGRAPHIES/OBITUARIES

Title. Give the name of the person for which this biography/obituary is being written in boldface, followed by the date of birth and death (if it is the case), in parenthesis:

Lauro Travassos (1890-1970)

Text. The text usually is not subdivided. If literature must be cited, a headed literature cited section follows the text in the style described for articles. Figures and tables should not be used.

Name and address of author. This information follows the text or, if present, the literature cited section. The reviewer's name should be in bold type.

PROCEDURES

Manuscripts submitted to ZOOLOGIA will be initially evaluated by the Administrative Editor for adequacy (for the scope) and formatting. A first evaluation of the English (if it is the case) is performed also at this moment by the Language Editor. Manuscripts with problems may be returned to the authors. The Administrator forwards the manuscript to the Managing Editor which will the adequate Section Editor. The Section Editor sends the manuscript to Reviewers. The copies of the manuscript with the Reviewers' comments and the Section Editor's decision will be returned to the corresponding author for evaluation. The authors have up to 30 days to respond or comply with the revision and return revised version of the manuscript to the adequate area of the electronic system. Once approved, the original manuscript, Reviewers comments, Section Editor's comments, together with the corrected version and the respective figure files, properly identified, are returned to the Managing Editor. Exceptionally, the Managing Editor may, after consultation with the Section Editors, modify the recommendation of the Reviewers and Section Editor, based on adequate justification. Later changes or additions to the manuscript may be rejected. A copyedited version of the manuscript is sent to authors for approval. This version represents the last chance for the author to make any substantial changes to the text, as the next stage is restricted to typographic and formatting corrections. Electronic proofs will be submitted to the corresponding author prior to publication for approval.

REPRINTS

The corresponding author will receive an electronic reprint (in PDF format) after publication. Authors may print and distribute hardcopies of their article on demand. Authors may also send the electronic file to individuals, as one would send a printed reprint. However, we would appreciate if you refrain from distributing PDF files via discussion groups and bulk-mail systems. It is important for ZOOLOGIA that users access the journal homepage for statistical purposes. By doing this, you are helping increase the indexes of quality of ZOOLOGIA.

VOUCHER AND TYPE SPECIMENS

Specimens including types (where appropriate) or vouchers that have received authoritative identification are the foundations for all biological studies from taxonomy and systematics to ecology and biogeography and including all aspects of biodiversity survey and inventory. Representative individuals (or parts of entire specimens that retain diagnostic information for identification) used in any study reported in the Journal should be deposited in a recognized biological collection, so that such are freely available to the research community. Vouchers should also be deposited to substantiate records of sequence data in all molecular studies (e.g., phylogeography and diagnostics), and ideally the physical voucher should be the remaining portion(s) of individual specimens that have been processed for DNA extraction. It is recommended that such specimens not be limited to the holotype and a limited number of paratypes in descriptions, or relatively few specimens derived from survey or from ecological studies. It is a requirement of ZOOLOGIA that all manuscripts must document the collection(s) where the specimens (types or vouchers) are deposited along with their respective catalogue or accession numbers in those repositories.