

ANÁLISE ULTRA-ESTRUTURAL DA ABSORÇÃO INTESTINAL DE MACROMOLÉCULA PROTÉICA COM O USO DE PEIXE COMO MODELO EXPERIMENTAL

RENATO LAMOUNIER BARBIERI *

FRANCISCO JAVIER HERNÁNDEZ-BLAZQUEZ **

* Professor Doutor do Depto. de Saúde da UNINOVE; Pós-doutorando no Departamento de Histologia e Embriologia do Instituto de Ciências Biomédicas - ICB/USP

** Professor livre-docente do Departamento de Cirurgia, Setor de Anatomia da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia - FMVZ/USP

Agradecimentos

Os autores são gratos ao Prof. Dr. José Roberto Machado Cunha da Silva do Laboratório de Histofisiologia Evolutiva do Departamento de Histologia e Embriologia do ICB/USP pelas facilidades concedidas no Biotério de Organismos Aquáticos e à bióloga Magna Ap. Maltauro Soares, pelo valioso e qualificado auxílio nas técnicas de microscopia para o processamento do material.

Resumo

Vários tipos celulares apresentam uma relação histotopográfica na mucosa intestinal, estando os enterócitos posicionados como o primeiro tipo celular envolvido no processo absorptivo. Com o uso de uma macromolécula eletrondensa (ferritina de baço de cavalo) administrada via oral, foi estudado o segmento intestinal (previamente determinado) de *Prochilodus scrofa* para que o processo fosse mais bem estabelecido. Assim, observou-se a ferritina na luz intestinal e entre as microvilosidades, a endocitose (pinocitose), com subsequente agrupamento dos grânulos em vesículas de diferentes concentrações eletrondensas, bem como a migração da ferritina nas diferentes alturas do epitélio absorptivo, nas etapas precedentes à interação dos enterócitos com os demais tipos celulares presentes na mucosa intestinal, o que, por sua vez, é um processo de auxílio à resposta defensiva local.

Palavras-chave: absorção intestinal; ferritina; epitélio intestinal; microscopia eletrônica de transmissão; *Prochilodus scrofa*.

INTRODUÇÃO

O transporte de macromoléculas intactas através dos enterócitos é observado em diversos animais. Ocorre nos bovinos, por um processo de absorção não-seletivo, o qual é interrompido após os dois primeiros dias de vida. Essa situação é definida pelo termo 'fechamento do intestino' (BRANDTZAEG & KRAJCI, 1995). Nos peixes, há um processo semelhante, quando se observa a passagem inespecífica de proteínas pelo epitélio, embora o sistema de transporte transepitelial persista mesmo depois de o animal chegar à vida adulta. Das proteínas de origem alimentar ingeridas pelos peixes, cerca de 80% sofrem digestão enzimática e são absorvidas no segmento proximal do intestino, já os restantes 20% passam para os outros segmentos intestinais posteriores (SHCHERBINA *et al.*, 1981; STROBAND & VAN DER VEEN, 1981). Nesses segmentos foi descrita a presença de proteínas marcadoras de pinocitose no citoplasma dos enterócitos, como a

Abstract

Many cellular types presents histotopographically relations with the intestinal mucosa and the enterocytes. The latter is the very first type involved during the intestinal absorption process. By means of electrondense protein macromolecule (horse's spleen ferritin), orally administered, a gut segment, previously called, *Prochilodys scrofa* was studied in order to have this process clarified. Then the ferritin was observed in the intestinal lumen and among the microvilli of the epithelial cells. The occurrence of endocytosis, (more a pinocytotic-like process) with subsequent granule-gathering, in vesicles of different electrondense concentration as well as the ferritin migration process, through the absorptive epithelium, were also observed before the interaction between the enterocytes and the other cellular types that live in the intestinal mucosa, which play a helpful role in the course of the local defense response.

Key words: intestinal absorption; ferritin; intestinal epithelium; transmission electron microscopy; *Prochilodus scrofa*.

peroxidase, a ferritina e a bactéria *Vibrio anguillarum* (STROBAND & VAN DER VEEN, 1981; DAVINA *et al.*, 1982; IIDA & YAMAMOTO, 1985; ROMBOUT *et al.*, 1985; GEORGOPOLU *et al.*, 1985, 1986a e b; ROMBOUT & VAN DEN BERG, 1989; NACHI, 1993; NACHI *et al.*, 1998). As proteínas marcadoras são encontradas em grande quantidade na matriz de vesículas citoplasmáticas, ou em grandes vesículas digestivas supranucleares contendo enzimas hidrolíticas, sendo consideradas, portanto, fagolisossomos (SIRE & VERNIER, 1992). Foram atribuídas pelo menos três funções à absorção de proteínas por pinocitose nos enterócitos de peixes, apesar de cada autor atribuir, de acordo com seu ponto de vista, um grau diferente de importância a cada função.

A presença de leucócitos, macrófagos e células linfóides, que se situam entre as células epiteliais e a lâmina própria, foi considerada um sinal de que o segmento intestinal envolvido pode ter importância imunológica (DAVINA

et al., 1982; ROMBOUT *et al.*, 1985, NACHI, 1993; NACHI *et al.*, 1998). Os trabalhos de ROMBOUT & VAN DEN BERG (1989) e ROMBOUT *et al.*, (1989 a e b), demonstrando a presença de anticorpos em peixes como resposta à absorção intestinal de antígenos solúveis, e as publicações de SIRE *et al.*, (1981), mostrando a captura de antígenos administrados via oral em trutas pelas células granulosas da mucosa intestinal, vieram reforçar esta hipótese. Sugere-se ainda que a via oral seja empregada como meio de administração de vacinas e hormônios em peixes (SUZUKI, 1988 a, b; SIRE & VERNIER, 1992). Nestes, os enterócitos do segmento intestinal são frequentemente comparados funcionalmente às células M dos mamíferos, as quais parecem estar especialmente adaptadas para o transporte de antígenos, devido à sua grande capacidade absorção e escassez de glicocálix, microvilos e lisossomos. (ROMBOUT *et al.*, 1985; WALKER & SANDERSON, 1995)

Acredita-se ainda que o processo de pinocitose nos segmentos posteriores se comporte como um mecanismo auxiliar da absorção de proteína, dada a digestão inadequada das proteínas em peixes (GAUTHIER & LANDIS, 1972; NOAILLAC-DEPEYRE & GAS, 1973 a e b, 1976; STROBAND & VAN DER VEEN, 1981). Assim, atribuiu-se aos segmentos intestinais posteriores uma função de apoio ou prontidão (*stand by*) quando grande quantidade de nutrientes se torna disponível. (STROBAND & VAN DER VEEN, 1981; DAVINA *et al.*, 1982)

Outra função foi sugerida por SIRE & VERNIER (1992), quando observaram que a atividade proteolítica no fluido entérico diminui ao longo do intestino, apesar de as enzimas digestivas serem resistentes ao processo digestivo presente no conteúdo intestinal. Eles concluem que esta redução de atividade está associada à pinocitose de enzimas pelas regiões posteriores do intestino. A hipótese da absorção intestinal de enzimas hidrolíticas pancreáticas também foi defendida por DIAMOND (1978), que afirma que de 80 a 90% das enzimas pancreáticas secretadas para o intestino dos mamíferos são recirculadas.

Este estudo teve por objetivo investigar o comportamento do epitélio intestinal de *Prochilodus scrofa* (Teleostei - Characiformes), conhecido popularmente como curimatá, no processo absorptivo com a administração de uma macromolécula protéica (ferritina), visando a uma melhor compreensão dos aspectos concernentes às modificações celulares ultra-estruturais (microscopia eletrônica de transmissão), sem que fossem descartados os aspectos da fisiologia da digestão. Tal abordagem é importante para fornecer subsídios aos estudos vinculados à atuação de possíveis antígenos intestinais em espécies de peixes com potencial para o cultivo, mesmo em tolerância ou imunidade, ainda com a possibilidade de utilizar a via oral como técnica para a imunização contra patógenos da mucosa em geral.

MATERIAL E MÉTODOS

Os exemplares de *Prochilodus scrofa* utilizados neste trabalho foram obtidos no Instituto de Pesca (Secretaria de Agricultura e Abastecimento – Divisão de Pesca Interior) e no Laboratório de Piscicultura – Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos (USP – campus de Pirassununga). Estes exemplares, que já se encontravam em fase adulta, foram acondicionados em aquários equipados com filtros biológico e externo (lã acrílica e carvão ativado), a uma temperatura constante de 21°C controlada por termostato e com arejamento contínuo, no Laboratório de Citologia, Histologia e Embriologia da Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos (FZEA – USP) e no Laboratório de Histofisiologia Evolutiva do Instituto de Ciências Biomédicas (ICB – USP). A densidade populacional não excedeu 10 peixes/m², mantendo-se os aquários próximos de janelas para que não houvesse alteração do fotoperíodo. Foram utilizados lotes homogêneos de peixes (na relação peso/comprimento), tanto para os grupos utilizados experimentalmente quanto para o grupo controle, tendo sido registrados o peso médio de 252±12 g e o comprimento total médio de 24±3 cm.

Apesar de o jejum ter um efeito rápido na renovação das células epiteliais do intestino, provocando atrofia nas células absorptivas e picnose em seus núcleos – creditados à ausência do estímulo do epitélio intestinal pelos hormônios, o qual é induzido pelo alimento (CHEVILLE, 1994) – antes do início de cada uma das etapas deste experimento, os exemplares de *P. scrofa* foram submetidos a um jejum prévio de 24 horas para assegurar o completo esvaziamento do trato digestivo (BARBIERI *et al.* 1992, 1993, 1995, 1998), sem que houvesse prejuízo à integridade das células da mucosa intestinal. Antes dessa fase de jejum prévio, os peixes foram alimentados diariamente *ad libitum* com ração padronizada para peixes, produzida na Estação de Pindamonhangaba do Instituto de Pesca (SAA/SP).

Os exemplares foram anestesiados com benzoato de etilo a 40 ppm em aquários reservados para essa finalidade e, a seguir, receberam, por via oral e diretamente no estômago cárdico (por sonda orogástrica), uma solução contendo ferritina de baço de cavalo (FERRITIN TYPE I-SIGMA - 108 mg/l) diluída em solução salina (0,9%), na proporção de 1:1. Os estudos morfométricos, desenvolvidos por LEITE *et al.* (1988) para essa espécie, permitiram o cálculo da capacidade volumétrica estomacal dos exemplares, possibilitando a administração da quantidade ideal do marcador para a repleção gástrica.

Os tempos utilizados para a obtenção das amostras destes exemplares, após a administração do marcador, foram de 7h30, 24h, 48h, 72h, 96h, 120h (5 dias), 192h (8 dias) e 288h (12 dias), com 3 exemplares para cada prazo. Para o grupo de controle, foram utilizados 3 exemplares que receberam apenas solução salina via oral.

Os exemplares foram sacrificados pela exposição ao anestésico (benzoato de etilo) em aquários reservados para esta finalidade, numa dosagem excessiva e suficiente para o sacrifício (60 ppm), constatada pela parada respiratória (interrupção dos movimentos operculares) (BARBIERI *et al.*, 1998). A parada cardíaca sobreveio em poucos instantes.

Os peixes foram abertos por incisão longitudinal na linha média da cavidade corporal, para a exposição das vísceras após cada um dos tempos acima citados. Procedeu-se à extração do intestino da cavidade corporal e à sua dissecação para obterem-se as amostras. A identificação do segmento intestinal, responsável pela absorção macromolecular, foi obtida por NACHI *et al.*, (1998), que adotou, no reconhecimento dos segmentos e alças intestinais, os critérios anátomo-topográficos estabelecidos por BARBIERI *et al.*, (1987, 1989, 1997). Além das amostras obtidas do segmento-alvo, também foram colhidas amostras dos cecos pilóricos, do segmento proximal e do distal.

O material foi fixado em glutaraldeído (tampão cacodilato - pH 7,2), pós-fixado em tetróxido de ósmio, banhado em acetato de uranila (0,5 %) e desidratado em soluções alcoólicas crescentes. O processo teve seqüência com a infiltração e inclusão em resina pura (SPURR) com conseqüente disposição em moldes e posicionamento em estufa a 70°C por 5 dias (BANCROFT & STEVENS, 1982). Seguiram-se os cortes semifinos (0,5 µm) dos blocos em ultramicrotomo LKB Porter Blum MT-1 e, posteriormente, os cortes ultrafinos (\pm 70 nm), em ultramicrotomo LKB Porter Blum MT-2. As amostras foram montadas em telas de cobre especiais para microscopia eletrônica de transmissão (200 MESH) e contrastadas por acetato de uranila a 2% em H₂O destilada (WATSON, 1958) e, a seguir, por citrato de chumbo a 0,5% (REYNOLDS, 1963). Depois do processamento, as amostras foram observadas e documentadas no microscópio eletrônico de transmissão JEOL - 100 CX II, do Departamento de Histologia e Embriologia do Instituto de Ciências Biomédicas (USP).

RESULTADOS

Com a finalidade de uniformizar as descrições dos eventos observados pelo microscópio eletrônico, foi adotada a seguinte terminologia: as moléculas de ferritina observadas nas micrografias eletrônicas, como um ponto eletrondenso e um halo claro ao seu redor, foram denominadas partículas de ferritina; as vesículas com membrana presentes no citoplasma dos enterócitos, e contendo a ferritina, foram denominadas grânulos citoplasmáticos, devido à sua eletrondensidade elevada. Após 7h30 da administração do marcador, os enterócitos do segmento intestinal médio de *P. scrofa* que, caracteris-

ticamente, apresentam microvilosidades curtas e espaçadas, com glicocálix, além de uma trama terminal bem desenvolvida, mostraram, logo abaixo da membrana apical, uma zona desprovida de organelas e rica em microfilamentos, na qual foram encontradas vesículas contendo ferritina em seu interior. No estrato citoplasmático seguinte, foram observadas vesículas eletrondensas entremeadas por mitocôndrias, com eletrondensidade dos grânulos variável (Figs. 1 e 2).

Em grande aumento, partículas eletrondensas, identificadas como partículas de ferritina, foram observadas na luz intestinal, entre as microvilosidades das células absorptivas e agrupadas em vesículas na região supranuclear do citoplasma (Fig. 3). Depois de 24 horas, as células colunares do epitélio absorptivo intestinal apresentaram as mesmas características descritas no tempo anterior para a presença da ferritina intracelular; com 48 horas, os enterócitos apresentaram poucos grânulos contendo ferritina; no intervalo de 72 horas, foram observados poucos enterócitos contendo a ferritina compartimentalizada em grânulos (Fig. 4).

Nesse período, foi possível observar a passagem dos grânulos contendo ferritina para um tipo celular de defesa fagocítica não residente, denominado macrófago intraepitelial (Fig. 5). A ferritina, nesta fase, era observada em vesículas envolvidas por unidades de membrana, algumas vezes apresentando alterações de eletrondensidade (Fig. 6).

Após 96 horas, ainda era evidente a presença da ferritina nos enterócitos, apesar de os macrófagos intraepiteliais se apresentarem sob diversas etapas de decomposição (Figs. 7 e 8); com 120 horas (5 dias), observaram-se mudanças nas características morfológicas e de distribuição da ferritina nos enterócitos, verificadas no tempo anterior: os macrófagos intraepiteliais apresentavam o citoplasma repleto de ferritina em vários estágios de decomposição; o núcleo deslocado, e os enterócitos contendo ferritina tanto agrupada em vesículas digestivas quanto dispersa no citoplasma, mas com processo de decomposição em diversos estágios (Fig. 9).

Passadas 192 horas (8 dias), os enterócitos apresentaram agrupamentos, envolvidos por membrana e contendo a ferritina compartimentalizada em grânulos, apesar de a forma dispersa também ter estado presente como grânulos citoplasmáticos isolados contendo ferritina. Os macrófagos intraepiteliais também observados continham grandes porções do citoplasma ocupadas pela ferritina absorvida (Fig. 10). Com 288 horas (12 dias), a maior parte da ferritina presente no epitélio intestinal do segmento médio de *P. scrofa* ocorreu predominantemente nos enterócitos, em agrupamentos de grânulos e em grânulos isolados (Fig. 11).

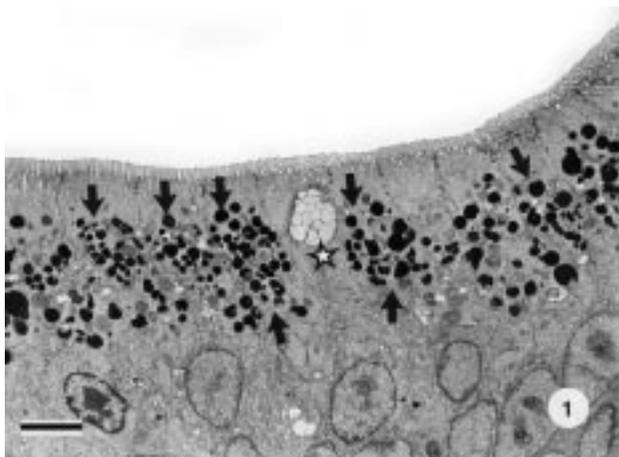


Fig. 1 - Região do citoplasma apical dos enterócitos do intestino médio. 7,5 horas. As partículas da ferritina absorvida podem ser observadas no interior dos grânulos citoplasmáticos (➡) em aparente processo de deslocamento apical-basal, porém ainda situada na porção supranuclear das células absorptivas. Pode-se observar a presença de célula caliciforme entre os enterócitos (★). barra = 4 μm

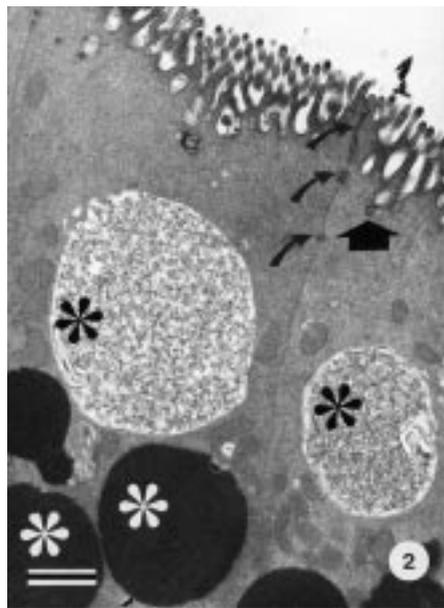


Fig. 2 - Região do citoplasma apical dos enterócitos. 7,5 horas. As estruturas vacuolares podem ser observadas acumulando as partículas de ferritina em diferentes concentrações (★). Observa-se ainda uma vesícula de pinocitose (➡), além do complexo juncional entre dois enterócitos (setas em curva). barra = 1 μm



Fig. 3 - Região do citoplasma apical dos enterócitos. 7,5 horas. As partículas de ferritina podem ser observadas na luz intestinal (★) e sendo absorvidas por meio de invaginações nas porções basais dos microvilos (➡), em região denominada trama terminal. Observa-se a ferritina, nesta etapa da absorção, sendo armazenada em grânulos de diferentes concentrações (★), bem como uma zona de oclusão entre duas células do epitélio absorptivo (setas em curva). barra = 500 nm

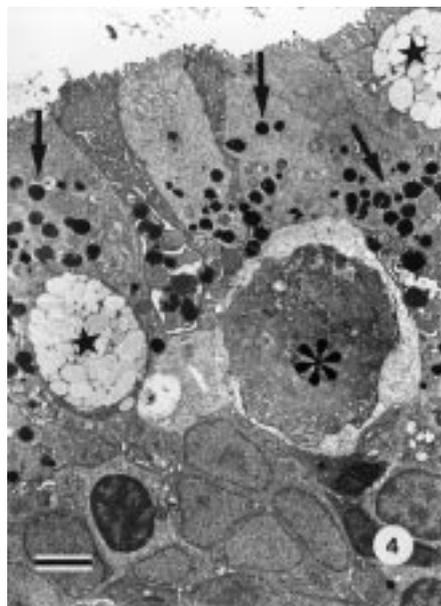


Fig. 4 - Epitélio absorptivo. 72 horas. Há uma grande concentração de grânulos contendo ferritina, dispersos nas várias alturas da região supranuclear (➡). Nas imediações, observa-se um macrófago intraepitelial (★), além de duas células caliciformes (★). barra = 3 μm

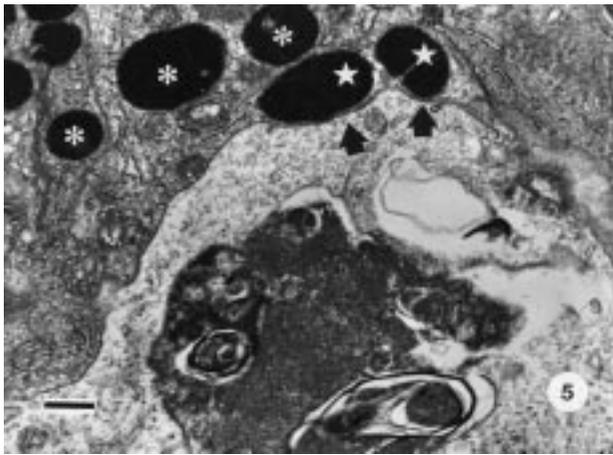


Fig. 5 - Epitélio absorptivo. 96 horas. A presença da ferritina sob a forma vesiculada pode ser observada nos enterócitos (✱) e também nos limites citoplasmáticos com célula vizinha, um macrófago intraepitelial (★), em aparente processo inicial de absorção (★). barra = 1µm

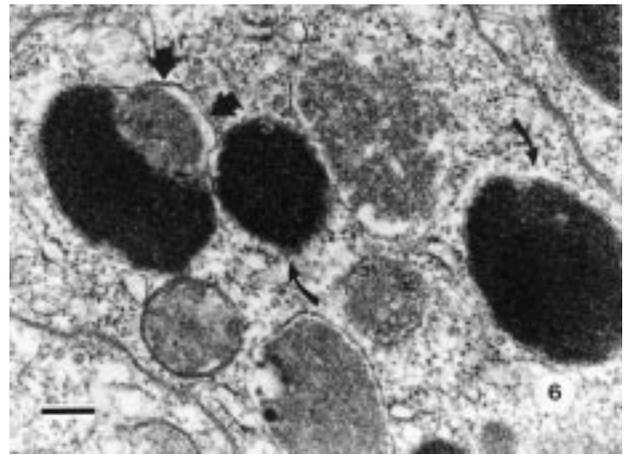


Fig. 6 - Enterócito. Detalhe dos grânulos de ferritina, envolvidos por membrana (setas em curva) e de um grânulo em que o grau de desenvolvimento do endossoma ainda não é semelhante aos demais (➡). barra = 250 nm

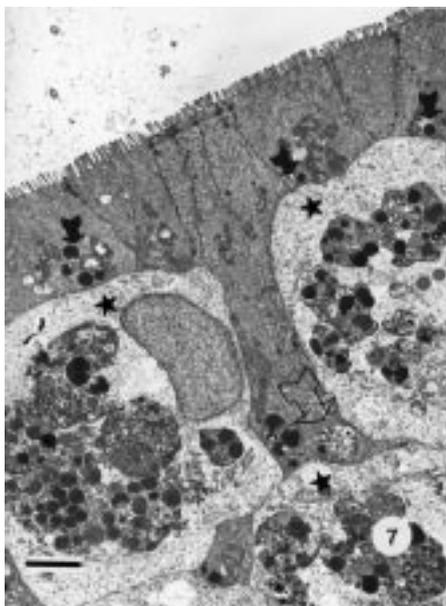


Fig. 7 - Epitélio absorptivo. Observa-se que uma maior porção do tecido de revestimento/absorção é ocupada por macrófagos com grande quantidade de ferritina no interior . Observa-se ainda uma porção ocupada por enterócitos com ferritina em grânulos dispersos na região apical (➡) e em agrupamentos maiores, com diferentes eletrondensidades (seta vazada). barra = 3 µm

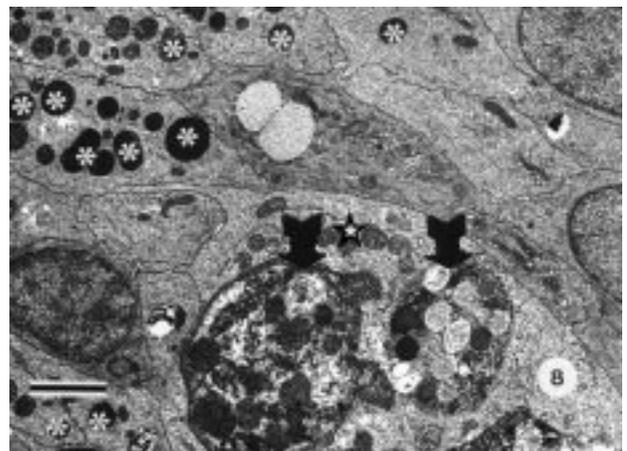


Fig. 8 - No macrófago intraepitelial (★), pode ser observada a presença de duas vesículas digestivas, com a ferritina sob a forma vesiculada e em diversos estágios de decomposição, com as vesículas agrupadas e sob a forma dispersa (➡). Nos enterócitos, a ferritina encontra-se agrupada em grânulos dispersos, de eletrondensidade uniforme (✱). barra = 2 µm

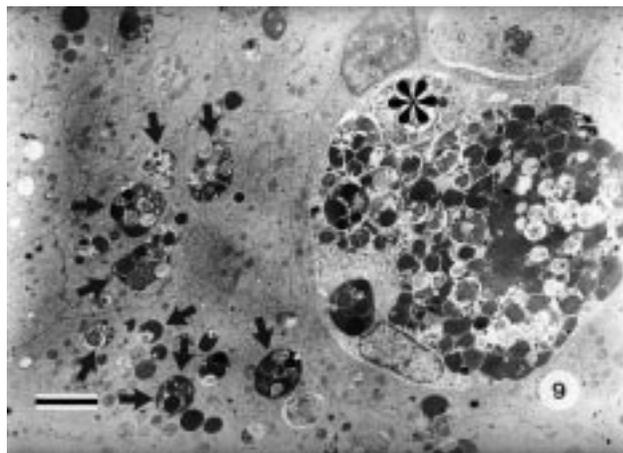


Fig. 9 - Epitélio absorptivo. 120 horas (5 dias). Macrófago intraepitelial (*) com grandes vesículas digestivas contendo o marcador sob a forma vesiculada e dispersa. É significativa a presença da ferritina nos enterócitos, em agrupamentos de grânulos e em grânulos dispersos (➡). barra = 3 µm

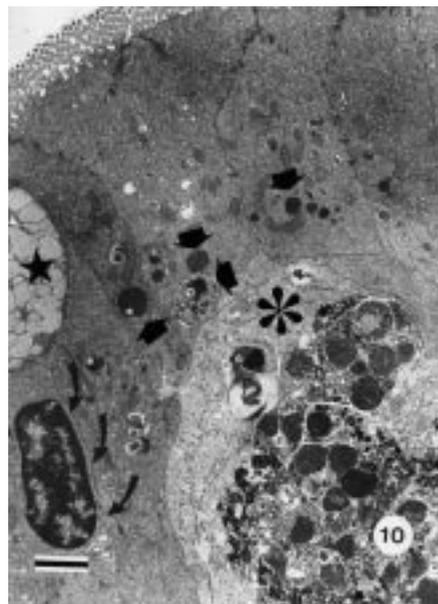


Fig. 10 - Epitélio absorptivo. 192 horas (8 dias). Pode ser observado o agrupamento de grânulos citoplasmáticos (➡) com a ferritina sob as formas vesiculada e dispersa. Também é possível observar a presença de grânulos contendo a ferritina no interior de macrófago intraepitelial (*), além de uma célula caliciforme, com seu típico produto de secreção (★) e o seu núcleo (setas em curva). barra = 2 µm

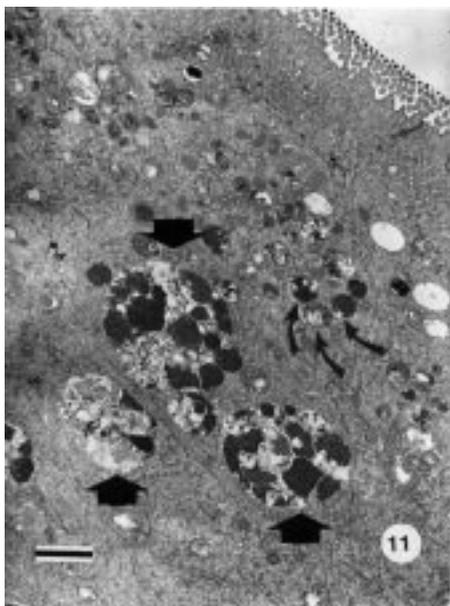


Fig. 11 - Epitélio absorptivo, enterócitos do intestino médio. 288 horas (12 dias). São observados diversos grânulos citoplasmáticos contendo a ferritina absorvida (➡), bem como grânulos dispersos contendo ferritina, ambas as formas em vários estágios de decomposição. barra = 2 µm

DISCUSSÃO

Após a administração da ferritina, sua localização foi identificada na região apical dos enterócitos do segmento-alvo do intestino de *P. scrofa*, aparentemente unida à membrana celular apical, formando invaginações vacuolares nas porções basais dos microvilos, mas não foi observada nas regiões basais (ou infranucleares) dos enterócitos. A ferritina parece ter sido absorvida sem seletividade no segmento-alvo do intestino de *P. scrofa*, em processo semelhante ao observado na carpa adulta, espécie cujos receptores específicos para esta macromolécula estão aparentemente ausentes na membrana celular dos enterócitos (ROMBOUT *et al.* 1985). Também foi verificado que a internalização da peroxidase (HRP) pelos enterócitos e a passagem da proteína para dentro dos vacúolos ocorrem via vesículas formadas na membrana apical (IIDA & YAMAMOTO, 1985), em processo semelhante ao observado no presente trabalho.

Em *P. scrofa*, a ferritina foi absorvida em fase fluida por endocitose, sendo acumulada em pequenas vesículas ou vacúolos. Neste processo, houve o armazenamento da ferritina em grânulos citoplasmáticos que, por estarem com a sua capacidade de carga completa, migravam no sentido apical basal da célula absorptiva, aparentemente em direção ao macrófago intraepitelial mais próximo. Esta conclusão tem por base o trabalho de DUNN & MAXFIELD (1992),

os quais observaram que, em pulsos intercalados de lipoproteína de baixa densidade (LDL) administrados em células, os endossomas são abastecidos até um determinado ponto, a partir do qual novos endossomas aparecem para se abastecerem da LDL. Segundo esses autores, isso significa que a porção vacuolar do endossoma primário interrompe a aceitação de um novo material endocitado, num processo considerado etapa de maturação. Julgamos haver um mecanismo semelhante para os grânulos citoplasmáticos no processo de armazenamento da ferritina no epitélio absorptivo de *P. scrofa*.

Como NACHI (1993) demonstrou a presença das enzimas lisossômicas β -glicerofosfatase, citidina 5' monofosfatase e trimetafosfatase nos grânulos dos enterócitos de *P. scrofa*, conclui-se que a ferritina contida nos grânulos citoplasmáticos dos enterócitos já se encontrava em processo lítico quando da excitação.

As observações ultra-estruturais realizadas no presente trabalho revelaram a diferença de eletrondensidade entre os grânulos citoplasmáticos situados logo abaixo da trama terminal dos enterócitos, indicando alternância de concentração macromolecular, que pode ser conseqüência de uma diferença de capacidade de armazenagem para cada endossoma, ou de uma diferença no estágio de degradação lítica entre os lisossomas secundários. Considera-se que nos ciprinídeos adultos, a digestão intracelular de macromolécula ocorre nos vacúolos supranucleares dos enterócitos do segundo segmento (NOAILLAC-DEPEYRE & GAS, 1973 a e b, 1976; STROBAND *et al.*, 1979; EZEASOR & STOKOE, 1981; WATANABE, 1981, 1984 a e b), com base na intensa atividade da fosfatase ácida na região supranuclear destes enterócitos. (GAUTHIER & LANDIS, 1972)

A etapa inicial do processo absorptivo, verificada no presente trabalho, assemelha-se aos mecanismos descritos por RODEWALD (1973); WILD (1976); WALKER (1981); ABRAHAMSOHN & RODEWALD (1981) e KING (1982), quando, após a absorção por pinocitose, a ferritina é agrupada em vesículas ou vacúolos logo abaixo da trama terminal na região apical dos enterócitos. Tais vesículas são consideradas primeiramente endossomas, com subsequente transformação em lisossomas secundários em que ocorre a digestão protéica. (RABINOWITCH, 1995)

Pela observação de atividade da fosfatase ácida nestes vacúolos (GEORGOPOLU *et al.*, 1985; IIDA & YAMAMOTO, 1984, 1985) e de proteases lisossômicas (GEORGOPOLU *et al.*, 1986 b), pode-se concluir que estes vacúolos característicos das células epiteliais são fagolisossomas, uma vez que possuem o substrato exógeno e as enzimas líticas que podem degradá-lo. GEORGOPOLU *et al.*, (1985) demonstraram a absorção de proteínas marcadas (peroxidase e ferritina) pelos enterócitos da truta (*S. gairdneri*) e sua digestão intracelular, sugerida pela observação de atividade da fosfatase ácida

no sistema vacuolar e pela atividade elevada da catepsina nestas células. ROMBOUT *et al.* (1985) observaram diferenças quantitativas de ferritina entre as células absorptivas, mesmo em células não vizinhas, diferentemente das observações evidenciadas no presente estudo, no qual verificamos que a ferritina esteve uniformemente distribuída entre os grânulos dos enterócitos vizinhos.

Os resultados obtidos por STROBAND & DEBETS (1978) indicaram que a absorção de macromoléculas protéicas é a principal função das células absorptivas do segmento intestinal médio do teleósteo *Ctenopharyngodon idella*. WATANABE (1981) observou que os enterócitos do segundo segmento podem assemelhar-se funcionalmente às células M dos mamíferos, especialmente adaptadas para o transporte de antígenos (OWEN *et al.*, 1986; WALKER, 1981). As células M possuem como característica de grande importância funcional a capacidade de transportar, além da ferritina (FERGUSON, 1971; PABST, 1987), moléculas grandes e partículas como a tinta da China, a ferritina nativa, a peroxidase (HRP) e também lectinas. A função da célula M talvez esteja limitada ao transporte de antígenos intraluminais particulados ou parcialmente degradados para as células apresentadoras de antígeno (APC's) subjacentes (BRANDTZAEG & BJERKE, 1990). Também foi observada a absorção de ferritina por células M em suínos, sendo encontrada no sistema túbulo-vesicular, em corpos multivesiculares, e em alguns vacúolos, na porção central. Ela foi excitada lateralmente no espaço intercelular próximo às células M e, apesar de sua absorção por células intraepiteliais no epitélio associado ao folículo não ter sido documentada, a ferritina foi identificada nas vesículas de macrófagos subepiteliais (LIEBLER *et al.*, 1995). Dessa maneira, foi possível observar que os enterócitos do segmento intestinal médio de *P. scrofa* desempenham um papel semelhante ao exercido pelas células M dos mamíferos, especializadas na captura, processamento e apresentação de antígenos às células do sistema imune.

A via de absorção da ferritina é provavelmente a rota mais comum para a absorção de antígenos. Assim, é possível que a maioria dos antígenos seja absorvida inespecificamente e transferida para vesículas ou vacúolos que podem fundir-se a lisossomas. No segundo segmento, eles se acumulam em vacúolos supranucleares, em que aparentemente são lentamente digeridos. Os vacúolos encontram posição final em um grande vacúolo supranuclear, presente nos mamíferos apenas no estágio neonatal. Este método não-seletivo de absorção é bem conhecido no transporte epitelial dos mamíferos (WALKER, 1981; ABRAHAMSON & RODEWALD, 1981), com a sugestão da ocorrência da degradação dessas macromoléculas em fagolisossomas, sendo então este grande vacúolo supranuclear um local de intensa atividade lisossômica. Em *P. scrofa*, NACHI (1993) e NACHI *et al.* (1998) não observaram a presença de grandes vesículas digestivas nos

enterócitos do segmento intestinal médio. Entretanto, a formação de grandes vesículas digestivas com ferritina nos enterócitos apenas foram observadas no presente trabalho nos tempos de coleta de 192 e 288 horas. Estas vesículas, formadas pelo agrupamento dos grânulos citoplasmáticos de ferritina, estiveram diretamente relacionadas com a diminuição da densidade volumétrica da ferritina ainda presente no trato gastrointestinal, e apesar do prolongado tempo decorrido desde a sua administração, pareciam indicar um elevado grau de capacidade de processamento de antígenos das células absorptivas.

NOAILLAC-DEPEYRE & GAS (1974, 1976, 1979), EZEASOR & STOKOE (1981) e STROBAND & VAN DER VEEN (1981), ao observarem os aspectos ultra-estruturais do segmento médio de várias espécies de teleósteos, verificaram que os enterócitos dessa região possuem, na porção supranuclear, elevado número de lisossomos de tamanhos variados, algumas vezes exibindo imagens de coalescência. Em algumas espécies, foram observados grandes vacúolos digestivos perinucleares na face apical destes enterócitos (GEORGOPOLU *et al.*, 1985; ROMBOUT *et al.*, 1985; ROMBOUT & VAN DEN BERG, 1989). IIDA & YAMAMOTO (1985), expondo as células absorptivas *in vitro* à HRP, verificaram que as vesículas de endocitose pareciam descarregar seu conteúdo (e também a membrana envoltória) em vacúolos maiores, os quais pareciam fundir-se e liberar o conteúdo em um grande vacúolo digestivo.

Alguns antígenos são transferidos para macrófagos presentes entre as células epiteliais. GAS (1985) descreveu a presença de ferritina no espaço intercelular do segundo segmento da carpa; GEORGOPOLU *et al.* (1985) restringiram-se à observação do início da digestão intracelular nos enterócitos, mas não até a completa degradação. Estes autores concluíram a fundamental importância do local de absorção de macromoléculas protéicas na nutrição de peixes teleósteos, acreditando que pequenas proteínas ou grandes peptídeos resultantes da digestão intraluminal de proteínas de grande peso molecular em regiões anteriores do intestino sejam, dessa maneira, absorvidos no segmento intestinal médio. No presente estudo, as observações feitas com *P. scrofa* mostraram a eficiência da absorção, pelos enterócitos, da ferritina presente na luz intestinal, repassando-a para macrófagos intraepiteliais. Do ponto de vista imunológico, a participação dos enterócitos no processo absorptivo de macromolécula, que é repassada para os macrófagos, indica uma resposta local a um antígeno como agente patogênico oportunista. Consta na literatura disponível que o transporte de antígenos pelas células epiteliais, desde a luz intestinal até leucócitos ou macrófagos intraepiteliais, sugere um envolvimento imunológico como indução de uma resposta imune local (ROMBOUT *et al.*, 1985; ROMBOUT & VAN DEN BERG, 1989; ROMBOUT *et al.*, 1989a). A passagem de antígenos solúveis (macromolécula) e particulados (bactérias) da luz in-

testinal para o epitélio, tanto para as células absorptivas quanto para os macrófagos intraepiteliais, foi demonstrada por ROMBOUT *et al.* (1985, 1986) e GEORGOPOLU & VERNIER (1986). Nos mamíferos, a transferência de antígenos por meio dos enterócitos para o tecido linfóide induz uma resposta imune local, resultando na produção de imunoglobulina secretora (sIgA) (WALKER, 1981), com a mesma evidência para o intestino de peixes. (FLETCHER & WHITE, 1973)

A análise imunológica aliada à morfologia ultra-estrutural deste segmento demonstrou que, para certos antígenos solúveis, ocorre a produção inicial elevada de anticorpos, seguida de uma diminuição progressiva durante as três semanas posteriores, o que não acontece para antígenos particulados (ROMBOUT & VAN DEN BERG, 1989). Estes fatores suportam a tese de que o intestino médio desempenha um papel relevante no processo de imunização de algumas espécies de teleósteos. Pela análise dos resultados deste estudo, é possível concluir sobre esse processo que a solução teve um fluxo normal no interior do ducto intestinal, em cujo segmento-alvo a ferritina foi absorvida pelos enterócitos. A ferritina endocitada pelos enterócitos sob a forma vesiculada começou a ser digerida em lisossomas secundários. Houve a exocitose da ferritina absorvida dos enterócitos, numa descarga do material que os liberava para a tarefa de absorção do conteúdo intestinal. Observou-se um período de ausência da solução com marcador na luz intestinal. Evidenciou-se nova atividade absorptiva no intervalo de 8 dias após a administração do marcador, com reação positiva para a ferritina nos enterócitos. Pela primeira vez no experimento, foi observada a formação de figuras de fusão da ferritina compartimentalizada no interior dos enterócitos, com diversas eletrondensidades, sugerindo que a digestão protéica tinha continuidade nos próprios enterócitos.

A absorção da ferritina pelos enterócitos é indicativo da capacidade de endocitose de fase fluida inespecífica para macromoléculas protéicas no segmento intestinal médio; da habilidade deste segmento em manter o comportamento absorptivo, pois os enterócitos excitavam os lisossomas secundários, ficando livres para a função absorptiva; da semelhança funcional dos enterócitos com as células M dos mamíferos; da capacidade de processamento intracelular demonstrada pelos enterócitos para a ferritina em tempos posteriores de coleta.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABRAHAMSON, D.R. & RODEWALD, R. Evidence for the sorting of endocytic vesicle contents during receptor-mediated transport of IgG across the newborn intestine. *J. Cell Biol.*, New York, 91:270-80, 1981.
- BANCROFT, J.D. & STEVENS, A. *Theory and Practice of Histological Techniques*. 2nd ed. London, Churchill, 1982. 662p.

- BARBIERI, R.L.; LEITE, R.G.; HERNANDEZ-BLAZQUEZ, F. J. Anatomia do trato digestivo de curimatá, *Prochilodus scrofa*, Steindachner 1881. I. Intestino. In: Reunião Anual da Sociedade Brasileira para o Progresso da Ciência, 39. Brasília, DF, 1987. Resumos *Ciênc. & Cult.*, São Paulo, 3 (Supl.), p. 833.
- BARBIERI, R.L.; LEITE, R.G.; HERNANDEZ-BLAZQUEZ, F. J. Morfologia do tract digestif du curimatá *Prochilodus scrofa*. I. Anatomie Intestinale. *Ciênc. & Cult.*, São Paulo, 41:67-70, 1989.
- BARBIERI, R.L.; LEITE, R.G.; HERNANDEZ-BLAZQUEZ, F.J.; STERMAN, F.A. Utilização de Raio X na Observação do Trânsito de Alimentos em *Prochilodus scrofa*. In: Reunião Anual do Instituto de Pesca, 1, 1992. Livro de Resumos. p. 46. São Paulo.
- BARBIERI, R.L.; LEITE, R.G.; HERNANDEZ-BLAZQUEZ, F.J.; STERMAN, F.A. Observações Radiográficas do Trato Digestivo do Curimatá, *Prochilodus scrofa*. In: Encontro Brasileiro de Ictiologia, (IO/USP), 10., 1993. Livro de Resumos. p. 161.
- BARBIERI, R.L.; HERNANDEZ-BLAZQUEZ, F.J.; SILVA, J.R.M.C. Gut absorption of a protein macromolecule in a Brazilian teleost fish, *Prochilodus scrofa*. I. Enterocytes. *Acta Microsc.*, 4A:205, 1995. Brasília.
- BARBIERI, R.L.; LEITE, R.G.; HERNANDEZ-BLAZQUEZ, F.J. & STERMAN, F.A. "Food Passage Time Through the Alimentary Tract of a Brazilian Teleost Fish, *Prochilodus scrofa*, Using Radiography". *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science (Revista da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo)*, São Paulo, 35(1): 32-36, 1998.
- BRANDTZAEG, P. & BJERKE, K. Immunomorphological characteristics of human Peyer's patches. *Digestion*, Karger, Basel. 46:262-73, 1990.
- BRANDTZAEG, P. & KRAJCI, P. The enterocyte and immunoglobulin transport. In: AURICCHIOS, S.; FERGUSON, A. & TRONCONE, R. Eds. *Mucosal immunity and the gut epithelium*. Karger, Basel, 1995. v. 44, p. 1248-302.
- CHEVILLE, N.F. *Introdução à Patologia Veterinária*. São Paulo, Manole, 1994. 556 p.
- DAVINA, J.H.M.; PARMONTIER, H.K.; TIMMERMANS, L.P.M. Effect of oral administration of *vibrio bacterin* on the intestine of cyprinid fish. *Dev. Comp. Immun.* New York, (Suppl. 2): 157-66, 1982.
- DIAMOND, J.M. Reabsorption of digestive enzymes: playing with poison. *Nature*, 271: 111-2, 1978.
- DUNN, K.W. & MAXFIELD, F.R. Delivery of ligands from sorting endosomes to late endosomes occur by maturatin of sorting. *J. Cell Biol.*, 117:301-10, 1992.
- EZEASOR, D.N. & STOKOE, W.M. Light and electron microscopic studies on the absorptive cells of the intestine, *caeca* and *rectum* of adult rainbow trout, *Salmo gairdneri*, Rich. *J. Fish Biol.*, 18:527-44, 1981.
- FERGUSON, A. Intraepithelial lymphocytes in the small intestine. *Gut*, 18:921-37, 1971.
- FLETCHER, T.C. & WHITE, A. Antibody production in the plaice (*Pleuronectes platessa* L.) after oral and parenteral immunization with *Vibrio anguillarum* antigens. *Aquaculture*, 1:417-28, 1973.
- GAS, N. Cytophysiologie de l'appareil digestif et du tissu musculaire de la carpe. Modifications structurales et fonctionnelles induites par le jeune et la réalimentation. Thèse Doct. d'Etat, Toulouse, 1976 *apud*. ROMBOUT, H.W.M.; LAMERS, C.H.J.; HELFRICH, M.H.; DEKKER, A.; TAVERNE-THIELE, J.J. 1985.
- GAUTHIER, G.G. & LANDIS, S.C. The relationship of ultrastructural and cytochemical features to absorptive activity in the goldfish intestine. *Anat. Rec.*, 172:675-701, 1972.
- GEORGOPOULOU, U.; SIRE, M.F.; VERNIER, J.M. Macromolecular absorptions of proteins by epithelial cells of the posterior intestine segment and their intracellular digestion in the rainbow trout. *Biol. Cell.*, 53:269-82, 1985.
- GEORGOPOULOU, U. & VERNIER, J.M. Local immunological response in the posterior intestinal segment of the rainbow trout after oral administration of macromolecules. *Dev. Comp. Immunol.*, 10:529-37, 1986.
- GEORGOPOULOU, U.; SIRE, M.F.; VERNIER, J.M. Immunological demonstration of intestinal absorption of protein macromolecules in the trout (*Salmo gairdneri*). *Cell Tissue Res*, 245:387-95, 1986a.
- GEORGOPOULOU, U.; SIRE, M.F.; VERNIER, J.M. Absorption intestinale des protéines sous form macromoléculaires et leur digestion chez la truit arc-en-ciel. Étude ultrastructurale et biochimique en relation avec la première prise de nourriture. *Can. J. Zool*, 64:1224-31, 1986b.
- IIDA, H. & YAMAMOTO, T. Morphological studies of the goldfish hindgut mucosa in an organ culture. *Cell Tissue Res.*, 238:523-8, 1984.
- IIDA, H. & YAMAMOTO, T. Intracellular transport of horseradish peroxidase in the absorptive cells of goldfish hindgut *in vitro*, with special reference to the cytoplasmic tubules. *Cell Tissue Res*, 240:553-60, 1985.
- KING, B.F. The role of coated vesicles in selective transfer across yolk sac epithelium. *J. Ultrastr. Res.*, 79:273-84, 1982.
- LEITE, R.G.; BARBIERI, R.L.; HERNANDEZ-BLAZQUEZ, F.J. Morfologia do Trato Digestivo do Curimatá, *Prochilodus scrofa*. II Morfometria. *B.Inst. Pesca*, 15:221-7, 1988.
- LIEBLER, E.M.; LEMKE, C.; POHLENZ, J.F. Ultrastructural study of the uptake of ferritin by M-cells in the follicle-associated epithelium in the small and large intestines of pigs. *A. J. Vet. Res.*, 56:725-30, 1995.

- NACHI, A.M. Absorção de macromoléculas e atividade fagocitária no epitélio intestinal de *Prochilodus scrofa*. São Paulo, 1993. 81 p. (Tese de Doutorado - Instituto de Ciências Biomédicas - Univ. de São Paulo).
- NACHI, A.M.; HERNANDEZ-BLAZQUEZ, F.J.; PHAN, M.; BARBIERI, R.L. & LEITE, R.G. Intestinal Histology of a Detritivorous (iliophagous) Fish *Prochilodus scrofa*. (CHARACIFORMES - PROCHILODONTIDAE). *Annales des Sciences Naturelles*, 2:81-88, 1998.
- NOAILLAC-DEPEYRE, J. & GAS, N. Absorption of protein macromolecules by the enterocytes of the carp (*Cyprinus carpio* L.). Ultrastructural and cytochemical study. *Zellforsch. Mikrosk. Anat.*, 146:525-41, 1973a.
- NOAILLAC-DEPEYRE, J. & GAS, N. Mise en evidence d'une zone adaptée au transport des ions dans l'intestine de carpe commune (*Cyprinus carpio* L.). *C. R. Acad. Sci.*, 276:773-6, 1973b.
- NOAILLAC-DEPEYRE, J. & GAS, N. Fat absorption by the enterocytes of the carp (*Cyprinus carpio* L.). *Cell Tissue Res.*, 155:353-65, 1974.
- NOAILLAC-DEPEYRE, J. & GAS, N. Electron microscopic study on the gut epithelium of the tench (*Tinca tinca* L.) with respect to its absorptive functions. *Tissue Cell*, 8:11-30, 1976.
- NOAILLAC-DEPEYRE, J. & GAS, N. Structure and function of intestinal epithelial cells in the perch (*Perca fluviatilis* L.). *Anat. Rec.*, 195:621-40, 1979.
- OWEN, R.L.; PIERCE, N.F.; APPLE, R.T.; CRAY, W.C. Jr. M cell transport of *Vibrio cholerae* from the intestinal lumen into Peyer's patches: a mechanism of antigen sampling and for microbial transepithelial migration. *J. Infect. Dis.*, 153:1108-18, 1986.
- PABST, R. The anatomical basis for the immune function of the gut. *Anat. Embryol.*, 176:135-44, 1987.
- RABINOVITCH, M. Professional and non-professional phagocytes: an introduction. *Trends Cell Biol.*, 5:85-7, 1995
- REYNOLDS, E.S. The use of lead citrate at high pH as an electron opaque stain in electron microscopy. *J. Cell Biol.*, 17:208-13, 1963.
- RODEWALD, R. Intestinal transport of antibodies in the newborn rat. *J. Cell Biol.*, 58:189-211, 1973.
- ROMBOUT, J.H.W.M.; LAMERS, C.H.J.; HELFRICH, M.H.; DEKKER, A. TAVERNE-THIELE, J.J. Uptake and transport of intact macromolecules in the intestinal epithelium of carp (*Cyprinus carpio* L.) and the possible immunological implications. *Cell Tissue Res*, 239:519-30, 1985.
- ROMBOUT, J.H.W.M.; BLOK, L.J.; LAMERS, C.H.J.; EGBERTS, E. Immunization of carp with *Vibrio anguillarum bacterin*: indication for a common mucosal immune system. *Dev. Comp. Immun.*, 10:341-51, 1986.
- ROMBOUT, J.H.W.M. & van den BERG, A.A. Immunological importance of the second segment of the carp. I. Uptake and processing of antigens by epithelial cells and macrophages. *J. Fish Biol.*, 35: 13-22, 1989.
- ROMBOUT, J.H.W.M.; BOT, H.E.; TAVERNE-THIELE, J.J. Immunological importance of the second segment of the carp. II. Characterization of mucosal leucocytes. *J. Fish Biol.*, 35: 167-78, 1989a.
- ROMBOUT, J.H.W.M.; van den BERG, A.A.; van den BERG, C.T.G.A.; WITTE, P.; EGBERTS, E. Immunological importance of the second segment of the carp. III. Systemic and mucosal immune responses after immunization with soluble or particulate antigen. *J. Fish Biol.*, 35: 79-186, 1989b.
- SHCHERBINA, M.A.; TROFIMOVA, L.N.; KAZLAUSKENE, O.P. The activity of protease and the resorption intensity of protein with the introduction of different quantities of fat into the food of carp, *Cyprinus carpio* L. *J. Ichthyol.*, 16:632-6, 1976.
- intestinal absorption of lipids in teleostean fishes: an ultrastructural and biochemical study in the rainbow trout. *J. Lipid Res.*, 22:81-94, 1981.
- SIRE, M.F. & VERNIER, J.M. Intestinal absorption of protein in teleost fish. *Comp. Biochem. Physiol.*, 103A:771-81, 1992.
- STROBAND, H.W.J. & DEBETS, F.M.H. The ultrastructure and renewal of the intestinal epithelium of juvenile grasscarp, *Ctenopharyngodon idella* (Val.). *Cell Tissue Res.*, 187:181-200, 1978.
- STROBAND, H.W.J.; van der MEER, H. & TIMMERMANS, L.P.M. Regional functional differentiation in the gut of grasscarp, *Ctenopharyngodon idella* (Val.). *Histochemistry*, 64: 235-49, 1979.
- STROBAND, H.W.J. & van der VEEN, F.H. Localization of protein absorption during transport of food in the intestine of grasscarp *Ctenopharyngodon idella* (VAL.). *J. Exp. Zool.*, 218: 149-56, 1981.
- SUZUKI, Y; KOBAYASHI, M.; AIDA, K. & HANYU, I. Transport of physiologically active salmon gonadotropin into circulation in goldfish, following oral administration of salmon pituitary extract. *J. Comp. Physiol.*, 157B:753-8, 1988a.
- WALKER, W.A. Intestinal transport of macromolecules. In: JOHNSON, L.R. ed. Physiology of the gastrointestinal tract. New York, Haven Press, 1981. p. 1271-89.
- WALKER, W.A.; & SANDERSON, I.R. The enterocyte and antigen transport In: AURICCHIOS, S.; FERGUSON, A.; TRONCONE, R. eds. Mucosal immunity and the gut epithelium. New York, Karger, 1995. v. 4, p. 18-31.
- WATANABE, Y. Ingestion of horseradish peroxidase by intestinal cells in larvae or juvenile of some teleosts. *Bull. Jap. Soc. Sci. Fisher.*, 47:1299-307, 1981.
- WILD, A.E. Mechanism of protein transport across the rabbit yolk sac endoderm. In: HEMMINGS, W.A. ed. Maternofetal transmission of immunoglobulins. London, Cambridge University Press, 1976. p. 155-65.