

DEPARTAMENTO DE HISTOLOGIA E EMBRIOLOGIA

Diretor: Prof. Dr. Antonio G. Ferri

FIXAÇÃO DE TECIDOS DE PEIXES DE ÁGUA DOCE \*

(FRESH WATER FISH TISSUE FIXATION)

MIKICO TOKUMARU  
Instrutor

HELOISA GODINHO \*\*

A. G. FERRI  
Prof. Catedrático

Em técnica histológica, a preparação de tecidos tem se constituído um dos mais importantes problemas. No que diz respeito à fixação, inúmeros investigadores têm se preocupado com êsse estudo que, gradativamente, vem passando da fase empírica para a científica, existindo sôbre o tema excelentes pesquisas de BAKER (6, 7).

Os pesquisadores que trabalham com tecidos de peixes têm se utilizado dos variados líquidos ou misturas fixadoras para preservar adequadamente a morfologia (1, 2, 3, 4, 5, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 18, 19, 20), mas experiências conduzidas precípua-mente com êsse objetivo não têm, ao que parece, sido realizadas.

Êste trabalho foi planejado para verificar o comportamento de tecidos de peixes de água doce frente a diversos fixadores, subsídio indispensável para futuras observações.

MATERIAL E MÉTODOS

O material utilizado consta de fragmentos de 2-3 mm de espessura do fígado, baço, rim, esôfago, estômago, intestino e pele de dez espécimens de *Pimelodus maculatus* (mandi). Êstes animais foram, depois de pescados em rêde, transportados vivos em latões especiais para o laboratório, onde foram sacrificados por comoção cerebral e a seguir necropsiados.

Os fragmentos dos vários tecidos foram colocados nos se-

\* Trabalho realizado com o auxílio da Comissão Inter-estadual da Bacia Paraná-Uruguaí.

\*\* Biologista do Departamento de Produção Animal da Secretaria da Agricultura do Estado de São Paulo.

guintes fixadores: formol a 10%, formol-cálcio, formol a 10% tamponado a pH 7, formol a 10% a 60°C, formol com detergente (ODD), Bouin, Bouin alcoólico, Gendre gelado, Susa, Helly, Carnoy, Stieve e mais a mistura fixadora constituída de formol a 10% — 100 ml, bicloreto de mercúrio — 1,0 g, ácido acético — 0,5 ml.

Antes de estabelecer esta última fórmula, tentativas foram realizadas, fazendo-se variar a concentração de bicloreto de mercúrio e ácido acético.

As peças permaneceram nos fixadores, em geral por 24 horas, exceção feita em relação ao formol quente e Carnoy, onde ficaram respectivamente 30 e 60 minutos, e ao Bouin, Bouin alcoólico, Gendre, Helly e Stieve, nos quais foram conservadas durante 6 horas.

Sempre que nos líquidos fixadores existia bicloreto de mercúrio, os tecidos foram tratados por lugol, que era adicionado ao álcool 90°.

Após a desidratação em álcoois de concentração crescente e diafanização pelo xilol, o material foi incluído em parafina, cortado com 5  $\mu$  de espessura, corado pela hematoxilina-eosina e montado entre lâmina e laminula com resina sintética.

## RESULTADOS

Para a avaliação dos resultados, que refletem a média das observações, foram considerados todos os detalhes histológicos e citológicos, observáveis com a metodologia usada.

A tabela I sumariza os dados obtidos com os vários tecidos e diferentes fixadores empregados, enquanto que as figuras de 1 a 6 ilustram os resultados observados no presente trabalho, quando a mistura formol-bicloreto de mercúrio-ácido acético foi utilizada.

## DISCUSSÃO

Os resultados aqui obtidos mostram que os tecidos de peixes de água doce não são preservados com regularidade nos diferentes fixadores utilizados comumente, como o formol a 25% (5), formol a 10% (5, 14, 16), formol a 4% (3), Bouin (1, 2, 4, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 15, 18, 19, 20), Stieve (5), Helly (10, 19), Helly e Zenker (19), Maximow e Sousa (4), Boling (1, 4), entre outros.

O líquido de Bouin e a fórmula idealizada neste experimento foram as misturas fixadoras que preservaram mais adequadamente e com maior regularidade os tecidos estudados, havendo pequena vantagem em relação à última. Esta foi idealizada tendo-se

TABELA I — Resultados relativos à fixação de tecidos de *Pimelodus maculatus*

Fixadores	T e c i d o s						
	Fígado	Baço	Rim	Esôfago	Estômago	Intestino	Pele
Formol	++	+	+	+	+++	++	+
Formol-cálcio	++	++	++	++	+	+	+
Formol pH 7	++	++	++	++	++	++	++
Formol quente	+++	++	+++	+++	++++	+++	++
Formol com ODD	++	+	++	++	+	+	+
Formol, Hg Cl <sub>2</sub> e ácido acético	+++	++++	+++	+++	++++	++++	++++
Bouin	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
Bouin alcoólico	++	+	++	+++	++	++	++
Gendre gelado	+++	+++	+++	+++	+	++	+
Susa	++	++	+	++	++	++	+
Helly	++	++	+	+	++	++	+
Carnoy	+	++	++	++	++	++	++
Stieve	+	++	+++	+++	++	++	++
+ fixação má	++ fixação regular	+++ fixação boa	++++ fixação muito boa				

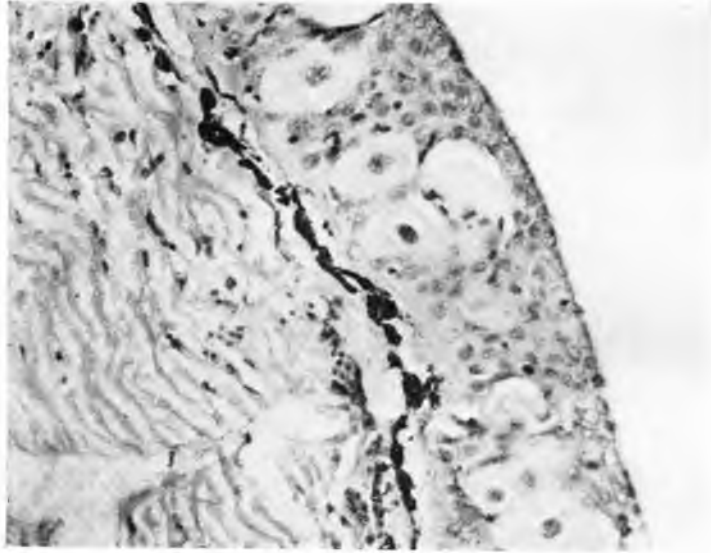


Fig. 1 — Pele — Coloração H.E. Aumento 350 X.



Fig. 2 — Esôfago — Coloração H. E. Aumento 350 X.

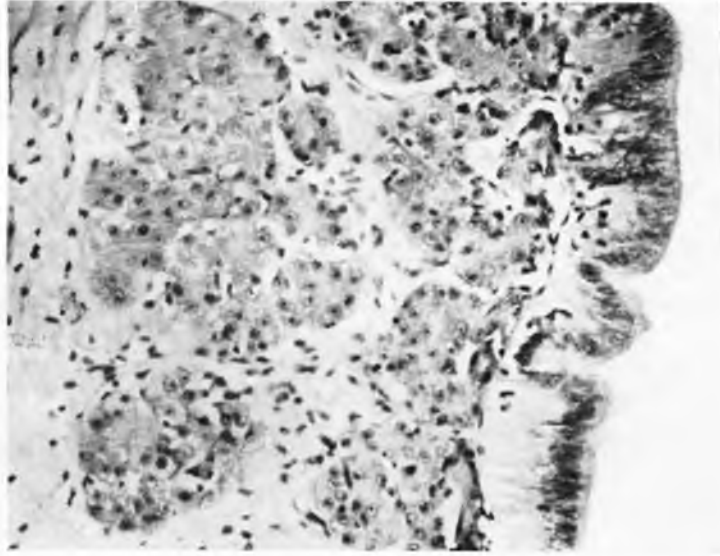


Fig. 3 — Estômago — Coloração H.E. Aumento 350 X.

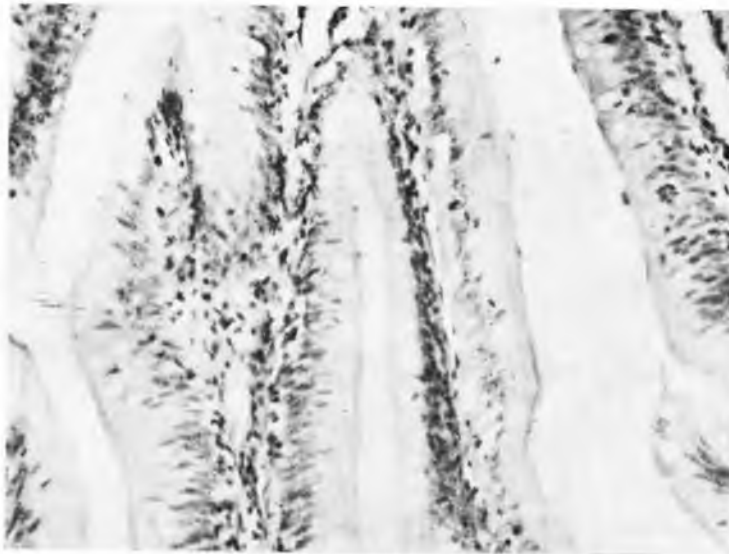


Fig. 4 — Intestino — Coloração H.E. Aumento 350 X.

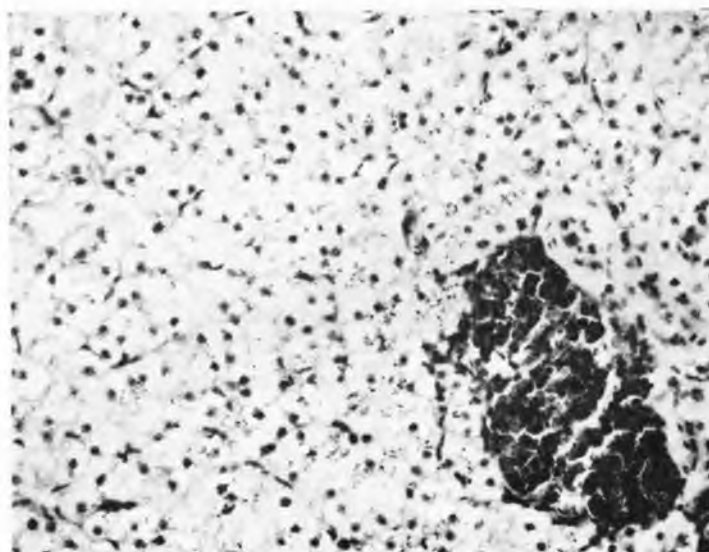


Fig. 5 — Fígado — Coloração H. E. Aumento 350 X.

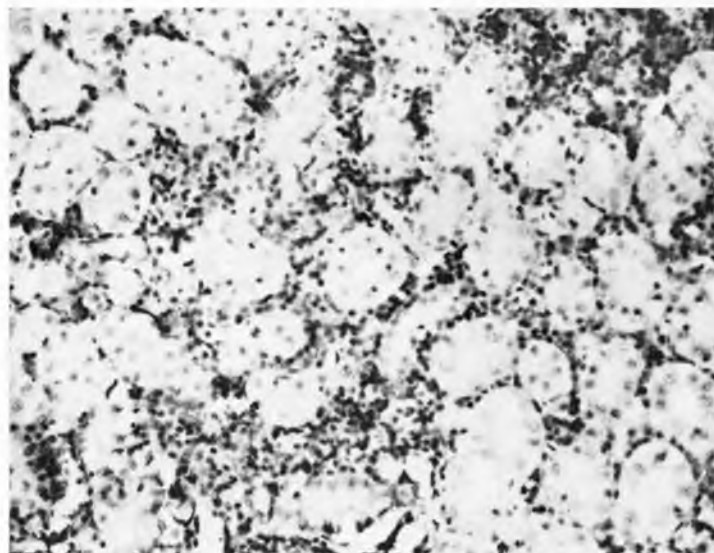


Fig. 6 — Rím — Coloração H.E. Aumento 350 X.

em vista que o formol preserva bem as células em geral, apesar de não impedir alterações subsequentes, bem como pela sua ação tânica sobre as proteínas fibrosas, segundo BAKER (6). Este mesmo autor aconselha o uso do formol-cálcio em virtude da pressão iônica desenvolvida pelo cloreto de cálcio. Entretanto, os resultados por nós obtidos não foram satisfatórios.

O bicloreto de mercúrio precipita as proteínas e prepara melhor os tecidos para os processos subsequentes de coloração (6, 7).

Por outro lado, o ácido acético que tem grande poder de penetração, foi utilizado por sua ação precipitante sobre os ácidos nucléicos, segundo PISCHINGER (17), não ocasionando alterações nas organelas citoplasmáticas na proporção indicada.

#### SUMÁRIO

As experiências realizadas demonstraram que a preservação dos tecidos de peixes de água doce varia com a natureza do material e do fixador. Tratando diferentes tecidos de *Pimelodus maculatus* com variados líquidos fixadores, os autores observaram melhores resultados com a seguinte mistura: formol, 10% — 100 ml, bicloreto de mercúrio, 1,0 g, ácido acético glacial, 0,5 ml.

#### SUMMARY

The authors show that the common fixative fluids currently used for the fixation of tissues for histological studies gave variable results when used with fresh water fish. Good results were obtained with the following mixture; formalin, 100 ml; mercuric chloride, 1,0 g; glacial acetic acid, 0,5 ml.

#### REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. AL-GAUHARI, A. E. I. — 1960 — The morphology of the pancreas in teleostei with special reference to the Nile-fish, *Clarias lazera* (C. & V). *Zool. Anz.*, 165:63-70.
2. AL-HUSSAINI, A. H. — 1946 — The anatomy and histology of the alimentary tract of the bottom-feeder, *Mulloidés awiflamma* (Forsk). *J. Morph.* 78:121-154.
3. AL-HUSSAINI, A. H. — 1947 — The anatomy and histology of the alimentary tract of the plancton feeder, *Atherina forskali* Rupp. *J. Morph.* 80:251-286.
4. AL-HUSSAINI, A. H. — 1949 — On the functional morphology of the alimentary tract of some fish in relation to differences in their feedings habits: anatomy and histology. *Quart. J. Micr. Sci.*, 90:109-140.

5. AMLACHER, E. — 1964 — Manual de enfermedades de los peces. Zaragoza Ed. Acribia.
6. BAKER, J. R. — 1950 — Cytological technique. 3rd ed. London. Methuen & Co. Ltd.
7. BAKER, J. R. — 1958 — Principles of biological micro technique. London, Methuen & Co. Ltd.
8. BELLISIO, N. B. — 1965 — Anatomia e Histologia del tracto digestivo de algunos Pimelodidos argentinos. *Anais do segundo congresso latino-americano de Zoologia*, São Paulo, 2:107-123.
9. CURRY, E. — 1939 — The histology of the digestive tube of the carp (*Cyprinus carpio communis*). *J. Morph.*, 65(1):53-78.
10. GIRGIS, S. — 1952 — On the anatomy and histology of the alimentary tract of an herbivorous bottom-feeding cyprinoid fish, *Labeo horie* (Cuvier). *J. Morph.*, 90(2):317-362.
11. HISAOKA, K. K. & BATTLE, H. I. — 1958 — The normal developmental stages of the zebrafish, *Brachydanio rerio* (Hamilton-Buchanan). *J. Morph.*, 103(2):311-328.
12. HISAOKA, K. K. & FIRLIT, C. F. — 1960 — Further studies on the embryonic development of the zebrafish, *Brachydanio rerio* (Hamilton-Buchanan). *J. Morph.*, 107(2):205-226.
13. NANDI, J. — 1961 — New arrangement of interrenal and chromaffin tissues of teleost fishes. *Science*, 134(3476):389-390.
14. OLIVEIRA E SILVA, S. L.; CHAGAS, W. A.; LOBO, B. A. — 1960 — Aspectos histológicos da mucosa gástrica de *Tilapia melanoptera* Dum (Actinopterygii, Cichlidae). *Anais do Colégio Anatómico Brasileiro*, 13:105-114.
15. PFEIFFER, W. — 1963 — Vergleichende untersuchungen über die schreckreaktion und den schreckstoff der ostariophysen. *Z. vergl. Physiol. Bd.*, 47:111-147.
16. PIGNALBERI, C. T. — 1965 — Evolución de las gonadas en *Prochilodus plutensis* y ensaio de clasificación de los estados sexuales (Pisces, Characidae). *Anais do segundo congresso latino-americano de Zoologia*, São Paulo, 2:203-208.
17. PISCHINGER, A. — 1937 — Cit. em Baker, J. R. (6).
18. STENGER, A. H. — 1959 — A study of the structure and development of certain reproductive tissues of *Mugil cephalus* Linnaeus. *Zoologia N. Y.*, 44:53-70.
19. STOLK, A. — 1961 — Pigment bodies of the spinal neurones of some teleosts. *Nature*, Lond., 191(4791):924.
20. WOOD, E. M. & YASUTAKE, W. Y. — 1956 — Ceroid in fish. *Amer. J. Path.*, 32(1-3):591-603.