

SANDALY OLIVEIRA DA SILVA

**ESTUDO COMPARATIVO DA MORFOLOGIA DAS BRÂNQUIAS DE
Salminus maxillosus VALENCIENNES, 1840 E *Prochilodus scrofa*
STEINDACHNER, 1881, DA BACIA DO RIO MOGI GUAÇU, REGIÃO
DE PIRASSUNUNGA, SÃO PAULO**

Monografia apresentada ao curso de Ciências
Biológicas para obtenção do título de Bacharel
em Biologia, Departamento de Biologia Celular,
Setor de Ciências Biológicas, Universidade
Federal do Paraná.

Orientadora: Dra. Edith Susana E. Fanta

CURITIBA

1997

*“O coração do homem pode
fazer planos, mas a resposta
certa vem dos lábios do
Senhor.”*

(Salomão)

À vocês, papai e mamãe, que nos momentos mais importantes e decisivos de minha vida, sempre estiveram presentes, oferecendo o que de mais precioso eu poderia receber: sua sabedoria na forma de conselhos. Na alegria, vocês riram comigo. Na tristeza, dividimos o sofrimento em três. No desespero, vocês ouviram o meu desabafo, ofereceram seus ombros para que eu chorasse e com suas mãos enxugaram as minhas lágrimas. Muitas vezes adormeci em seus colos e com carinho vocês me conduziram até a cama. Com paciência infinita, me chamaram a cada manhã lutando comigo contra o sono e a fadiga.

Suas vidas são para mim um eterno exemplo de amor, dedicação e muita sabedoria. E é somente a vocês, que com profunda gratidão, dedico este trabalho.

AGRADECIMENTOS

Muitas pessoas foram fundamentais para que hoje eu pudesse ter em minhas mãos o produto do primeiro passo de minha jornada científica e portanto, de grande significado para mim.

Sendo assim, gostaria de registrar aqui o meu **MUITO OBRIGADO**, individualmente, a cada um de vocês que contribuiu direta ou indiretamente para esta vitória.

Primeiramente, ao Grande Amigo e Arquiteto deste Universo - DEUS - pela oportunidade que me concedeu de desenvolver o meu intelecto e aperfeiçoar os meus talentos no estudo de Sua tão perfeita e maravilhosa criação. Por caminhar comigo sempre, dirigindo cuidadosamente a minha vida, indicando o melhor caminho para que eu pudesse ser feliz.

À minha orientadora, Professora Dra. Edith Fanta, pelos valiosos conselhos que direcionaram e enriqueceram este trabalho. Pela confiança depositada em minha pessoa e as preciosas oportunidades, que me fizeram crescer não apenas academicamente, mas de forma integral.

Aos meus pais, Sansão e Doraci, por não medirem esforços para que eu pudesse vencer mais esta etapa de minha vida.

À equipe dinâmica e atuante do PROJETO DOURADO, sob a responsabilidade da Dra. Maria José Tavares Ranzani Paiva, pela amizade e acolhida. Com certeza, os frutos de nosso trabalho vão brilhar muito!

Ao PqC. Marcos Antonio Cestarolli pela concessão das instalações do Laboratório de Biologia de Peixes Fluviais "Dr. Pedro de Azevedo" da Base do Instituto de Pesca, Cachoeira de Emas, Pirassununga - SP e à equipe de apoio técnico pela apoio na pesca, transporte e sacrifício dos animais.

Às amigas do Grupo de Estudos de Impacto Ambiental, Sônia Grötzner, Lucélia Donatti, Flávia Rios, Sandra Freiburger, Ana Cristina Vianna, Silvia da Cruz, Nilce Folle, Ana Meyer, Liliane Moreira, Patrícia Calil, Paula Nakayama, Giselle Nicaretta, Paula Gottschild e Roberta Takada, pela amizade a importante convivência científica que em muito me fez crescer.

A equipe do Centro de Microscopia Eletrônica da Universidade Federal de São Paulo, Profa. Dra. Edna Haapalainen, Prof. Flávio Paulo de Faria, Biomédica Márcia Tanakai, André Aguilera e Patrícia Milanez, pela atenção e auxílio no processamento, análise e documentação do material em microscópio eletrônico de varredura.

Ao Departamento de Biologia Celular da UFPR, especialmente ao Professor Alécio José Grzybowski e a secretária Ângela Satler.

À bióloga Lucélia Donatti pela orientação técnica na estruturação textual deste trabalho.

Aos meus irmãos Shirlei, Rose Kelly, Jacy e Wesley, pela força dada na digitação e outras, pequenas, mas imprescindíveis tarefas.

À amiga Mirian Cúnico, presente em todas as horas.

Ao professor Edson de Lara Rodrigues, pela prova de Biologia aplicada no 3º ano de 2º grau ... Ali, certamente, foi o início de tudo! Hoje ao amigo e companheiro de projeto MsC. Edson de Lara Rodrigues, pelo estímulo constante à pesquisa, pelo empenho em meu crescimento profissional, pelos ideais em comum e, especialmente, pela dedicação de verdadeiro amigo.

A equipe do Laboratório de Impacto Ambiental e Histopatologias do Instituto Adventista de Ensino: Prof. Edson de Lara Rodrigues, Marcelo Veiga, Fábio Pacheco, Antenor dos Santos, Eliane Pinheiro e Andressa Veiga, pela oportunidade de dividirmos os mesmos ideais dentro do meio científico, pela atenção dispensada a minha pessoa durante o período de estágios nesta instituição e pela amizade que nos mantém sempre juntos.

Ao querido Fábio Juliano Pacheco pelo brilho todo especial que tem trazido aos meus dias ao ensinar-me, carinhosamente, a valorizar as pequenas coisas desta vida. Também pelo incentivo dado à realização deste trabalho e por compreender a minha ausência quando precisei concluí-lo.

Ao CNPq pelo apoio financeiro.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	vii
LISTA DE TABELAS	ix
RESUMO	x
1.0 INTRODUÇÃO	1
2.0 OBJETIVOS	9
3.0 MATERIAL E MÉTODOS	
3.1 Material Biológico	
3.1.1 Dourado	12
3.1.2 Curimatá	13
3.2 Local de Coleta	14
3.3 Manutenção	14
3.4 Obtenção do Material para Estudo Histológico e Ultraestrutural	
3.4.1 Dissecção	15
3.4.2 Fixação e Processamento para Microscopia de Luz	15
3.4.3 Colorações para Microscopia de Luz	16
3.4.4 Fixação e Processamento para Microscopia Eletrônica de Varredura	17
4.0 RESULTADOS	
4.1 Arcos branquiais	21
4.2 Rastros branquiais	21
4.3 Filamentos branquiais	22
5.0 DISCUSSÃO	33
6.0 CONCLUSÕES	38
ANEXO: TÉCNICAS DE PREPARO DAS SOLUÇÕES UTILIZADAS	41
ROTEIROS PARA PROCESSAMENTO	49
PROCOLOS DE COLORAÇÃO PARA MICROSCOPIA DE LUZ	51
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	54

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1: Material Biológico - <i>Salminus maxillosus</i>	18
FIGURA 2: Material Biológico - <i>Prochilodus scrofa</i>	18
FIGURA 3: Mapa do Local de Coleta do Material Biológico.....	18
FIGURA 4: Tanques para manutenção dos peixes.....	18
FIGURA 5: A- Corte longitudinal de um filamento branquial de <i>Salminus maxillosus</i> ... 25	
B- Corte longitudinal de um filamento branquial de <i>Prochilodus scrofa</i>	25
C- Detalhe do epitélio respiratório de <i>Salminus maxillosus</i>	25
D- Detalhe do epitélio respiratório de <i>Prochilodus scrofa</i>	25
E- M.E.V. do ápice da lamela primária de <i>Salminus maxillosus</i>	25
F- Vista lateral de uma lamela primária de <i>Salminus maxillosus</i>	25
G- M.E.V. do ápice da lamela primária de <i>Prochilodus scrofa</i>	25
H- M.E.V. do ápice da lamela primária de <i>Prochilodus scrofa</i>	25
FIGURA 6: A- Corte transversal dos filamentos branquiais de <i>Salminus maxillosus</i>	26
B- Corte transversal dos filamentos branquiais de <i>Prochilodus scrofa</i>	26
C- Corte transversal dos filamentos branquiais de <i>Salminus maxillosus</i>	26
D- Corte transversal dos filamentos branquiais de <i>Prochilodus scrofa</i>	26
E- Vista superficial de uma lamela secundária de <i>Salminus maxillosus</i>	26
F- Vista superficial de uma lamela secundária de <i>Prochilodus scrofa</i>	26
G- Epitélio branquial de <i>Salminus maxillosus</i>	26
H- Lamela secundária de <i>Prochilodus scrofa</i>	26
FIGURA 7: A- Corte longitudinal das lamelas secundárias de <i>Salminus maxillosus</i>	27
B- Corte longitudinal das lamelas secundárias de <i>Prochilodus scrofa</i>	27
C- Epitélio da região apical da lamela secundária de <i>Salminus maxillosus</i>	27
D- Epitélio da região apical da lamela secundária de <i>Prochilodus scrofa</i>	27
E- M.E.V. do ápice da lamela primária de <i>Salminus maxillosus</i>	27
F- Células de cloro no ápice da lamela primária de <i>Prochilodus scrofa</i>	27
G- M.E.V. do ápice da lamela primária de <i>Salminus maxillosus</i>	27
H- Células de cloro no ápice da lamela primária de <i>Prochilodus scrofa</i>	27
FIGURA 8: A- Células de cloreto nos filamentos branquiais de <i>Salminus maxillosus</i>	28

B-	Células de cloreto nos filamentos branquiais de <i>Prochilodus scrofa</i>	28
C-	M.E.V. da região interlamelar de <i>Salminus maxillosus</i>	28
D-	Lamela primária de <i>Prochilodus scrofa</i> com células de cloro.....	28
FIGURA 9:	A- Células secretoras do filamento branquial de <i>Salminus maxillosus</i>	29
B-	Células secretoras do filamento branquial de <i>Prochilodus scrofa</i>	29
C-	Corte oblíquo do ápice da lamela primária de <i>Salminus maxillosus</i>	29
D-	Corte oblíquo do ápice da lamela primária de <i>Prochilodus scrofa</i>	29
E-	M.E.V. do ápice de um filamento branquial de <i>Salminus maxillosus</i>	29
F-	M.E.V. do ápice de um filamento branquial de <i>Prochilodus scrofa</i>	29
FIGURA 10:	A- Células secretoras do filamento branquial de <i>Salminus maxillosus</i>	30
B-	Células secretoras do filamento branquial de <i>Prochilodus scrofa</i>	30
C-	Reação histoquímica - lamelas secundárias de <i>Salminus maxillosus</i>	30
D-	Reação histoquímica - lamelas secundárias de <i>Prochilodus scrofa</i>	30
FIGURA 11:	A- Células secretoras do filamento branquial de <i>Salminus maxillosus</i>	31
B-	Células secretoras do filamento branquial de <i>Prochilodus scrofa</i>	31
C-	Corte oblíquo do filamento branquial de <i>Salminus maxillosus</i>	31
D-	Corte longitudinal do filamento branquial de <i>Prochilodus scrofa</i>	31
FIGURA 12:	Brânquias de <i>Salminus maxillosus</i> após retirada da cápsula opercular.....	32

LISTA DE TABELAS

TABELA 1: Detecção de células secretoras de muco nas brânquias de <i>Salminus maxillosus</i> e de <i>Prochilodus scrofa</i>	24
---	----

RESUMO

Salminus maxillosus e *Prochilodus scrofa* são espécies de peixes que convivem numa mesma área, no trecho do Rio Mogi Guaçu, situado em Cachoeira de Emas, região de Pirassununga, Estado de São Paulo. Possuem hábitos alimentares distintos. Enquanto *S. maxillosus* é ictiófago, *P. scrofa* é iliófago. No ambiente aquático, estes animais estão sujeitos à agressões de parasitas que com frequência são encontrados em sua pele, musculatura, narina, trato digestivo e brânquias. Lesões teciduais também podem ser causadas por poluentes que são lançados no leito dos rios pelas indústrias ou através da atividade agrícola. O reconhecimento e a análise das lesões causadas pelos fatores agressores só serão possíveis mediante o conhecimento da condição morfológica normal, que também esclarece melhor aspectos da biologia dos animais. Desta forma, este estudo se propôs a descrever e comparar a morfologia das brânquias de *S. maxillosus* e *P. scrofa*, relacionando a estrutura a seus hábitos alimentares e condições ecológicas a que estão sujeitos em seu habitat. Em geral, tanto as brânquias de *S. maxillosus* como as de *P. scrofa* seguem os padrões descritos para peixes teleósteos. *S. maxillosus* possui rastros branquiais curtos, rígidos, espaçados e de forma laminar, permitindo a esta espécie ingerir grandes presas. Rastros branquiais longos, pouco consistentes e bem próximos são observados em *P. scrofa* e evitam a passagem de partículas para a região respiratória das brânquias onde poderiam lesar o tecido. Os filamentos branquiais inserem-se no arco esquelético e apresentam extremidade mais afilada em *S. maxillosus*. O mesmo não ocorre em *P. scrofa* cujos filamentos possuem extremidade dilatada. O espaço interlamelar reduzido e as lamelas respiratórias situadas bem próximas umas das outras foram características observadas em ambas as espécies. Da mesma forma, a presença de micropregas na superfície celular do epitélio do filamento branquial e na base das lamelas secundárias que nele se inserem. A ocorrência de células de cloreto ficou restrita à região interlamelar e à base das lamelas respiratórias. Estas lamelas apresentam-se mais longas e com o ápice dilatado em *S. maxillosus*. Em *P. scrofa* são curtas e sem dilatação apical. Células secretoras de muco ocorrem em grande quantidade na região apical dos filamentos branquiais de *S. maxillosus* e *P. scrofa*. Na secreção ácida desta primeira espécie, predominam os grupos sulfatados e a reação para os grupos carboxilados foi negativa. Em *P. scrofa* a reação ao Alcian Blue pH 2,5 e 0,5 foi mais intensa, revelando a presença dos grupos sulfatados em maior quantidade

que os carboxilados. Secreção mucosa de natureza ácida foi observada em ambas as espécies. Portanto, todas as características das brânquias destas duas espécies parecem ter sido selecionadas permitindo a estes peixes perfeita adaptação ao ambiente em que vivem.

INTRODUÇÃO

1.0 INTRODUÇÃO

Sob o ponto de vista filogenético, os peixes são vertebrados inferiores. Constituem o grupo mais numeroso dentre os vertebrados, compreendendo cerca de 25.000 espécies, o equivalente a aproximadamente 42% do total dos vertebrados conhecidos (POUGH et al., 1993).

Estes animais ocorrem nos ambientes mais distintos: dos mares polares até o Equador, desde a superfície até profundidades superiores a 9.000 metros, em poças de marés costeiras ou em lagos a mais de 4.500 metros de altitude nos Andes. Vivem em águas abertas, em fundo arenosos, rochoso e lodoso, em fendas dos recifes de corais, em baías salgadas e estuários, em rios e lagos de água ácida ou alcalina, em águas de cavernas, em fontes quentes, ou em águas polares (ROMER e PARSONS, 1985).

Segundo DELBEEK e WILLIAMS (1987), a morfologia de um organismo geralmente pode ser considerada como um reflexo das pressões ecológicas exercidas sobre ele. Sendo assim, as características físicas, químicas e biológicas de um determinado ambiente são fatores determinantes de características morfo-funcionais.

As brânquias dos peixes atuam como uma interface seletiva entre o meio interno e o ambiente (meio externo). Ao lado da função respiratória, atuando como o principal sítio de trocas gasosas (HUGHES, 1966; HUGHES, et al., 1982), as brânquias desempenham outros papéis como osmorregulação do organismo (GONZALEZ e McDONALD, 1992; FLIK e VERBOST, 1993; VERBOST et al., 1994), manutenção do equilíbrio ácido-básico (EPSTEIN et al., 1980; EVANS et al., 1982; LIN e RANDALL, 1991, McDONALD et al., 1991; GOSS et al., 1992), excreção de compostos nitrogenados (GOLDSTEIN, 1982; EVANS e CAMERON, 1986; SAYER e DAVENPORT, 1987) e gustação (HUGHES, et al., 1982).

Através das brânquias há um fluxo contínuo de água que entra pela boca e sai através da abertura opercular. Da água que passa através das brânquias, os peixes são capazes de utilizar até 80% do oxigênio dissolvido, enquanto o homem só utiliza 25% do oxigênio inalado. A eficiência nas trocas gasosas se deve a dois fatores: primeiro pela estrutura branquial e seu sistema de circulação sanguínea e, segundo, pelo fluxo contínuo da água pelas brânquias, em qualquer estágio da respiração (GREENWOOD, 1975).

As brânquias são órgãos multifuncionais e esta característica se reflete na complexidade de sua estrutura.

A morfologia branquial de peixes teleósteos tem sido descrita por diversos autores (HUGHES e BYCZKOWSKA-SMKY, 1974; HUGHES e DATTA-MUNSHI, 1978; HUGHES, 1979; LEWIS e POTTER, 1982; COUGHLAN e GLOOS, 1984; DATTA-MUNSHI e HUGHES, 1986; METCALFE e BUTLER, 1986; HOSSLER et al., 1986; PREIN e KUNZMANN, 1987; PERERA, 1993; MACHADO e FANTA, 1995).

De maneira geral, as brânquias dos teleósteos são morfologicamente muito semelhantes, com algumas variações em função do modo de vida, hábito alimentar e habitat do peixe (GRAY, 1954; HUGHES 1966; RAJBANSHI, 1977; EIRAS-STOFFELLA, 1994), bem como por fatores filogenéticos (SCHMIDT-NIELSEN, 1990).

Na maioria dos teleósteos, estes órgãos estruturam-se em quatro pares de arcos dispostos quatro a quatro lateralmente na faringe. De cada arco projetam-se anteriormente duas fileiras de rastros, direcionados à cavidade faríngea. Estes rastros podem variar em forma, tamanho, quantidade e distribuição no arco branquial para cada espécie, servindo para a proteção dos filamentos branquiais e gustação (pela presença dos botões gustativos), sendo ainda vinculados a hábitos alimentares da espécie (HUGHES et al., 1982, 1984; EIRAS-STOFFELLA, 1994; RIOS, 1997). Posteriormente, projetam-se do arco branquial duas fileiras de filamentos branquiais ou lamelas primárias. Inseridas ao longo de cada filamento branquial, estão as lamelas respiratórias ou lamelas secundárias, dispostas alternadamente nos lados dorsal e ventral do filamento (KEYS e WILMER, 1932; GRAY, 1954; NEWSTEAD, 1967; LAGLER et al., 1977; HUGHES e WRIGHT, 1970; HOSSLER et al., 1979 a, 1985, 1986; HOSSLER e MARCHANT, 1983; KARLSSON, 1983; BARLETTA e CORRÊA, 1992).

Com relação a ultraestrutura do epitélio branquial, observa-se basicamente dois tipos de epitélio, que se distinguem na anatomia, desenvolvimento embrionário, vascularização e ultraestrutura dos componentes celulares. Cobrindo praticamente todo o arco branquial, inclusive os rastros, filamentos e regiões interlamelares, encontra-se o epitélio primário. Este é pluriestratificado, composto por diferentes tipos celulares, incluindo as células pavimentosas, células secretoras de muco, botões gustativos, células de cloro e células de suporte (PHILPOTT e COPELAND, 1963; SARDETT, 1977; DUNEL-ERB e LAURENT, 1980; LAURENT, 1984; HOSSLER, et al. 1986; MAINA, 1990). As lamelas respiratórias são cobertas pelo epitélio secundário ou respiratório, sendo simples ou

biestratificado. No segundo caso, a camada externa é constituída por células pavimentosas e a camada interna por células indiferenciadas (NEWSTEAD, 1967; HUGHES e WRIGHT, 1970; MORGAN e TOVEL, 1973; KARNAKY, 1980, 1986; LAURENT e DUNEL, 1980).

O epitélio de revestimento das brânquias apresenta grande quantidade de células linfóides e células grandes com grânulos eosinófilos. Apresenta-se, ainda, mais espesso na região de inserção dos filamentos branquiais e se repete na extremidade (ponta) destes filamentos (ROBERTS, 1981).

As células pavimentosas recobrem o epitélio externamente, são poligonais e dispõem-se em mosaico. Sua membrana parietal apresenta-se com dobras arranjadas concentricamente, denominadas de micropregas (“microridges”). A presença das micropregas é universal nos peixes e se tem sugerido que a sua função relacione-se com a formação de uma possível turbulência local que se crie na água, que as micropregas aumentem a superfície respiratória ou ainda, que tenham por função primária, reter uma fina película de muco sobre o epitélio para protegê-lo de agressões ambientais, tais como alterações de temperatura e pH da água (HOOSLER, 1980; MAFLATT, 1985).

As micropregas predominam por todo o arco branquial, inclusive nos rastros, nos filamentos, na região interlamelar (PHILPOTT e COPELAND, 1963; STRAUS, 1963; KARNAKY e KINTER, 1977; SARDET, 1977; EVANS, 1980; HOOSLER et al., 1979 a, b, , 1985, 1986; HOOSLER, 1980; HOOSLER e MARCHANT, 1983; KING e HOOSLER, 1988; EIRAS-STOFFELLA, 1994) e nas lamelas respiratórias (OLSON e FROMM, 1973; LEWIS e POTTER, 1976; RAJBANSHI, 1977; HUGHES e DATTA-MUNSHI, 1978; HUGHES, 1979; KENDAL e DALE, 1979; DUNEL-ERB e LAURENT, 1980; FRANKLIN, 1990). Em algumas espécies entretanto, observa-se a ausência das micropregas nas células pavimentosas das lamelas respiratórias (HOOSLER et al., 1979 a, 1986).

O epitélio das lamelas primárias é interrompido ocasionalmente por células secretoras de muco, botões gustativos, espinhos e células de cloro. As células secretoras de muco distribuem-se por todo o epitélio do rastro e no filamento tem sua área de concentração associada à região da artéria branquial eferente (HOOSLER e MARCHANT, 1983; HOOSLER et al., 1985; FRANKLIN, 1990; EIRAS-STOFFELLA, 1994). Os botões gustativos localizam-se principalmente nos rastros branquiais (HOOSLER e MARCHANT, 1983).

As células de cloro distinguem-se por apresentarem um formato colunar, possuírem o núcleo situado na base da célula e uma grande quantidade de mitocôndrias associadas a um sistema tubular bem desenvolvido (DOYLE & EPSTEIN, 1972; DOYLE e GOREKY, 1961; STRAUS e DOYLE, 1961; PHILPOTT, 1965 e PHILPOTT e COPELAND, 1963), contínuo à membrana basolateral (KESSEL e BEAMS, 1960, 1962; DOYLE e GOREKY, 1961; VICKERS, 1961; STRAUS, 1963; PHILPOTT e COPELAND, 1963; THREADGOLD e HOUSTON, 1964; PHILPOTT, 1965; OBERG, 1967; KARNAKY et al., 1976; SARDET et al., 1979; HOOTMAN e PHILPOTT, 1978, 1979; PISAM, 1981). A região adjacente à membrana apical é caracterizada pela ausência de mitocôndrias e elementos tubulares (SHIRAI e UTIDA, 1970; KARNAKY, 1986), porém está preenchida por vesículas e microfilamentos (SARDET et al., 1979; PISAM, 1981; LAURENT, 1984).

Nas brânquias as células de cloro são encontradas principalmente: na região do filamento branquial que está associada à artéria branquial aferente, nas bases das lamelas respiratórias e na região interlamelar (KEYS e WILMER, 1932; COPELAND, 1948, 1950; VICKERS, 1961; DOYLE e GOREKY, 1961; PHILPOTT e COPELAND, 1963; SHIRAI e UTIDA, 1970; SARDET, 1977; HOOTMAN e PHILPOTT, 1978, 1979; HOOSLER et al., 1979a, b, 1985; HOOSLER, 1980; LAURENT e DUNEL, 1980; DUNEL-ERB e LAURENT, 1980; HOOSLER e MARCHANT, 1983; FRANKLIN, 1990). Em casos de estresse ambiental podem ser encontradas também no epitélio secundário (LAURENT e PERRY, 1990).

As células de cloro normalmente diferenciam-se a partir de células epiteliais pavimentosas do epitélio respiratório, durante o desenvolvimento das lamelas respiratórias. Assim sendo, estas células são mais numerosas nas brânquias em desenvolvimento do que nas brânquias do peixe adulto (BOYD et al, 1980).

As células de cloro, de núcleo alongado e levemente basal, apresentam um sistema de Golgi desenvolvido, muitas vesículas citoplasmáticas e são ricas em mitocôndrias, as quais aparecem em contato íntimo a um sistema membranoso bem desenvolvido. Tal sistema parece estar envolvido no transporte iônico, uma vez que é acentuadamente desenvolvido quando a salinidade do meio aumenta (PISAM, 1981). A superfície celular das células de cloro apresentam muitos microvilos, associados às células epiteliais adjacentes. Nesta região apical, existe também um grande número de vesículas de vários tamanhos (LAURENT, 1982 e HUGHES, 1984). Em teleósteos marinhos ou adaptados à água do mar, a membrana apical das células de cloro encontra-se mais ou menos profunda

circundada pelas células epiteliais adjacentes. Em peixes de água doce, as células de cloreto, quando presentes, apresentam uma superfície mais exposta ao meio externo (LAURENT, 1982). Ainda tem se relatado que estas células podem formar um complexo multicelular.

As células secretoras produzem muco, composto por diferentes categorias de mucopolissacarídeos, que realiza a proteção do organismo contra agressões ambientais.

A estrutura básica das lamelas respiratórias dos teleósteos consiste de duas camadas de células epiteliais pavimentosas apoiadas sobre a membrana basal e separadas por células pilares com suas flanges e pelos espaços sanguíneos, delimitados pelas flanges de células pilares adjacentes (HUGHES e GRIMSTONE, 1965; TOVEL et al., 1970; LAURENT e DUNEL, 1980). Esta constituição define a barreira para as trocas gasosas entre o sangue e a água.

A barreira água sangue está relacionada com a atividade do peixe. Peixes ativos possuem barreiras curtas para a difusão de gases, enquanto que peixes de pouca atividade possuem barreiras mais espessas (HUGHES e UMEZAWA, 1983). O fato de que a área de superfície de uma brânquia deva ser grande o suficiente para prover uma troca de gases adequada é bem definido nos peixes. As brânquias dos peixes altamente ativos apresentam as maiores áreas relativas (SCHMIDT-NIELSEN, 1996).

As células pavimentosas epiteliais apresentam um complexo sistema de Golgi e muito retículo endoplasmático, além de grandes quantidades de organelas e mitocôndrias em determinadas regiões da célula (BOYD et al., 1980). Estas características podem sugerir um envolvimento no processo ativo de difusão dos gases (HUGHES, 1966 a) ou relacionar-se com a permeabilidade a gases e não a íons e água, no caso de peixes marinhos. Em alguns peixes, estas células epiteliais pavimentosas podem formar mais de uma camada de células, separadas pelas células pilares como ocorre em *Pseudopleuronectes americanus*, que possui duas camadas celulares (BOYD et al., 1980) e estas podem estar interdigitadas (HUGHES e GRIMSTONE, 1965).

Tem se observado a presença de colunas de colágeno entre as duas membranas basais, nas quais estão apoiadas as células pavimentosas. Estas células provavelmente atuam como sistema esquelético da célula para resistir à distensão provocada pela circulação do sangue nos espaços sanguíneos (HUGHES e GRIMSTONE, 1965; BETTEX-GALAND e HUGHES, 1973; HUGHES, 1981).

Os espaços sanguíneos não são considerados vasos verdadeiros pela ausência de endotélio. Estes espaços possuem conexões com os vasos aferentes do filamento branquial.

Ocorrem nas lamelas respiratórias e podem ocupar até 70% do volume total da lamela (HUGHES e GRIMSTONE, 1965).

Outros tipos celulares, observados nas lamelas respiratórias, são as células de cloreto e as células secretoras de muco (HUGHES e DATTA-MUNSHI, 1978; HUGHES e MONDOLFINO, 1983). Contudo, estas não ocorrem em todas as espécies (BOYD et al., 1980).

As brânquias tem sido objeto de pesquisas quanto ao seu comportamento morfológico sob condições variadas do ambiente aquático (REITE et al., 1974; MAETZ e BORNANCIN, 1975; DAS e SRIVASTAVA, 1978; HOSSLER et al., 1979 a; PEEK e YOUSON, 1979; BOYD et al., 1980, PISAM et al., 1980; CHERVINSKI, 1984; LEINO e McCORMICK, 1984; GALAT et al., 1985; SAYER e DAVENPORT, 1987; FRANKLIN, 1990). Elas podem modificar sua estrutura histológica quando expostas a um fluxo de água que contenham substâncias como sais (NaCl), alumínio, mercúrio, ácidos (HCl), bases (NaOH), subprodutos industriais, como a lixívia negra e detergentes (DUNEL-ERB e LAURENT, 1980; ZACCONE, 1981; MALLAT, 1985; ROY, 1988; OHJA et al., 1989; SABÓIA-MORAIS, 1992; LUVIZOTTO, 1994; NETO, 1995; MACHADO, 1995; FOLLE, 1997).

O conhecimento da morfologia das brânquias, ao qual se propõe este trabalho, possibilita uma compreensão mais profunda dos processos fisiológicos que envolvem a adaptação destes animais às condições ecológicas nas quais se encontram.

As espécies selecionadas para o presente estudo são *Salmimus maxillosus* (Valenciennes, 1840), conhecido como Dourado, e *Prochilodus scrofa* (Steindachmer, 1881), o Curimatá. São espécies de valor econômico e têm sido exploradas a tal ponto que os pesquisadores da área de biologia populacional já se preocupam com a possibilidade de declínio e extinção das mesmas em áreas onde são abundantes, como a Bacia do Rio Mogi Guaçu, na região de Pirassununga, Estado de São Paulo.

O Rio Mogi Guaçu percorre 377,5 Km e abastece uma importante região agroindustrial do Estado de São Paulo. É ainda considerado um dos rios mais piscosos do Estado, apesar de ser depositário de grande carga de poluentes domésticos e industriais, graças à grande capacidade de depuração, ao número significativo de lagoas marginais e áreas de preservação. O pequeno número de barragens hidrelétricas instaladas ao longo de seu percurso é outro fator que tem favorecido a sobrevivência de espécies de peixes de valor econômico já extintas em outras bacias hidrográficas do Estado de São Paulo.

Uma série de estudos estão em andamento procurando-se conhecer mais a respeito da biologia e da fisiologia destes animais, bem como da biologia populacional, a fim de que medidas preservadoras racionais e atualizadas possam ser tomadas. No momento é preferível uma proteção conscienciosa dos peixes em seu ambiente natural a uma criação artificial, dada a dificuldade para a reprodução destes animais em ambientes fechados.

Exemplares de *S. maxillosus* capturados na natureza, com frequência, encontram-se parasitados. Agentes patogênicos são removidos de sua musculatura, intestino, narinas, vísceras em geral e brânquias. Estas espécies também estão sujeitas a efeitos de poluentes. Diante desse fato, a compreensão da relação de parasita-hospedeiro, bem como o diagnóstico da ação patogênica do agente agressor frente ao organismo alvo, torna-se mais fácil através da análise histopatológica.

Para a definição de qualquer patologia celular ou tecidual é importante o conhecimento prévio da condição morfológica normal. Sendo assim, a descrição da estrutura normal das brânquias do dourado e do curimatá é o objetivo deste trabalho.

OBJETIVOS

2.0 OBJETIVOS

Constituem objetivos deste trabalho:

1. Descrever a morfologia das brânquias de *Salminus maxillosus* e *Prochilodus scrofa*, através de microscopia de luz e microscopia eletrônica de varredura.
2. Comparar os aspectos morfológicos das brânquias de *Salminus maxillosus* e *Prochilodus scrofa*, relacionando a estrutura a seus hábitos alimentares e às condições ecológicas que caracterizam o ambiente do Rio Mogi Guaçu, Cachoeira de Emas, região de Pirassununga, Estado de São Paulo, no qual vivem.

MATERIAL E MÉTODOS

3.0 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 MATERIAL BIOLÓGICO

Neste trabalho serão estudadas as brânquias de duas espécies de peixes de água doce: o dourado e o curimatá.

3.1.1 DOURADO

Filo: Chordata

Subfilo: Vertebrata

Subclasse: Gnathostomata

Grau: Pisces

Classe: Osteichthyes

Subclasse: Actinopterygii

Infraclasse: Neopterygii

Divisão: Halecostomi

Subdivisão: Teleostei

Infradivisão: Euteleostei

Superordem: Ostariophysi

Ordem: Characiformes

Família: Characidae

Subfamília: Salmininae

Gênero: *Salminus*

Espécie: *Salminus maxillosus* Valenciennes, 1840

Salminus maxillosus, classificado sistematicamente segundo NELSON (1984), é conhecido vulgarmente como dourado (Fig. 1). É espécie de piracema que desova nas correntezas dos rios (MORAIS FILHO & SCHUBART, 1955). Caracteriza-se por apresentar corpo amarelo-dourado atravessado por uma faixa longitudinal de cor marrom variando até o negro, 92 a 98 escamas na linha lateral e 14 a 16 séries de escamas entre a dorsal e a linha lateral. Os exemplares adultos que são capturados na pesca comercial ou

esportiva têm mais comumente de 40 a 50cm de comprimento e peso variando entre 500 a 1500g, sendo possível encontrar indivíduos ainda maiores e mais pesados. Possui distribuição geográfica bastante abrangente sendo um habitante típico da Bacia do Prata. No Brasil, o dourado é encontrado no Rio Amazonas, Alto Amazonas, Rio Paraná superior, médio e inferior. Ocorre também na Bolívia, Colômbia, Peru e Uruguai (RINGUELET, ET AL., 1967). A larva de dourado até o 4º dia se alimenta do conteúdo do saco vitelino. A partir do 5º dia de vida, seu regime alimentar inclui elementos do plâncton - algas unicelulares e protozoários - e microcrustáceos. O alevino e o dourado jovem já se alimentam de pequenos peixes e, quando adultos, assumem regime exclusivamente ictiófago (MORAIS FILHO & SCHUBART, 1955).

3.1.2 CURIMBATÁ

Filo: Chordata

Subfilo: Vertebrata

Subclasse: Gnathostomata

Grau: Pisces

Classe: Osteichthyes

Subclasse: Actinopterygii

Infraclasse: Neopterygii

Divisão: Halecostomi

Subdivisão: Teleostei

Infradivisão: Euteleostei

Superordem: Ostariophysi

Ordem: Characiformes

Família: Curimatidae

Subfamília: Prochilodontinae

Gênero: *Prochilodus*

Espécie: *Prochilodus scrofa* Steindachner, 1881

O curimatá, classificado segundo NELSON (1984) como *Prochilodus scrofa* (Fig 2), é o peixe mais comum dos rios brasileiros, especialmente do Estado de São Paulo, onde

ocorre na proporção de 70% do total dos peixes. Segundo MARTINS (1970), caracteriza-se por apresentar lábios grossos, móveis e dentição atrofiada. Sua alimentação consiste em restos vegetais microscópicos existentes no lodo do fundo dos rios. Possuem um estômago musculoso, semelhante a moela das aves, adaptado, portanto, a digerir a carapaça silicosa das diatomáceas. Devido a este hábito alimentar, preferem ambientes lânticos embora realizem migrações em massa, rio acima, por ocasião da desova.

3.2 LOCAL DE COLETA

Os peixes a serem estudados foram coletados no Rio Mogi Guaçu, na região de Pirassununga, Estado de São Paulo. Neste trecho foi construído uma barragem conhecida como Cachoeira de Emas (Fig. 3). Em pontos delimitados, acima ou abaixo da barragem, os peixes foram capturados com auxílio de tarrafas. O trabalho de pesca foi efetuado por técnicos da Base do Instituto de Pesca de São Paulo (I.P.) instalada às margens do Rio Mogi Guaçu em Cachoeira de Emas, Pirassununga - SP.

3.3 MANUTENÇÃO

Após a captura, os exemplares de dourado e curimatá foram transportados até o Laboratório de Biologia de Peixes Fluviais "Dr. Pedro de Azevedo", na base do I.P., em tanques instalados na carroceria da caminhonete do I.P..

Em seguida, procedeu-se a transferência dos animais para tanques de amianto com capacidade para 1000 L, instalados em sistema de fluxo contínuo (Fig. 4). A água que abastece os tanques é proveniente do Rio Mogi Guaçu e nesta, os peixes permaneceram por um período máximo de duas horas até o sacrifício.

3.4 OBTENÇÃO DO MATERIAL PARA ESTUDO HISTOLÓGICO E ULTRAESTRUTURAL

3.4.1 DISSECÇÃO

Para este estudo foram utilizados 16 exemplares de *Salminus maxillosus* com comprimento total médio de 60,4 cm e 2920 g de peso total. Os espécimes de *Prochilodus scrofa* capturados somam um total de 5 com 41,3 cm de comprimento total médio e 1096 g de peso total.

Os animais foram submetidos à descerebração e posterior extirpação da cápsula opercular para exposição das brânquias. Com auxílio de material cirúrgico adequado, as brânquias foram removidas e lavadas com solução salina a 0,7% desde a sua exposição até a fixação. O formato e características dos quatro arcos branquiais foram descritas.

3.4.2 FIXAÇÃO E PROCESSAMENTO PARA MICROSCOPIA DE LUZ

Apenas o 2º arco branquial foi utilizado para estudo histológico e histoquímico. Amostras do 2º arco branquial foram fixadas em Fluido de Bouin (CULLING et al., 1985) e em ALFAC (modificado de CULLING et al., 1985) durante 24 horas. Após o tempo de fixação, todas as peças foram transferidas para o álcool a 70%. Foram lavadas e conservadas nesta mesma solução durante o transporte até o Laboratório de Impacto Ambiental (LIA), Departamento de Biologia Celular da Universidade Federal do Paraná.

Nas instalações do LIA, as peças fixadas para análise histológica e histoquímica foram lavadas algumas vezes em álcool a 70% para a retirada do excesso de ácido pícrico. Em seguida, foram separadas as hemibrânquias com auxílio de pinças e bisturi de lâmina curva. De cada uma das hemibrânquias três segmentos foram separados para estudo: as duas extremidades e a região central. Foi removida a região faríngea do arco branquial, de cada um dos conjuntos de lamelas a serem processados.

Em seguida, o material separado foi submetido à desidratação gradual em série alcoólica, diafanizado em xileno, sendo embebido e incluído, direcionadamente, em Paraplast-Plus®. A inclusão foi realizada dentro de estufa a 58°C, utilizando-se moldes

cúbicos de papel para emblocagem das peças. Os blocos foram posteriormente trimados em forma de pirâmide para microtomia (STEEDMAN, 1960).

O material emblocado foi cortado em micrótomo para parafina histológica, marca Leitz Wetzlar ®. Os cortes, com 2 e 3 µm de espessura, representam secções longitudinais dos filamentos branquiais e das lamelas respiratórias. Estes cortes foram colocados em lâminas histológicas, recobertas com Albumina de Meyer diluída em água (CULLING et al., 1985), para sua adesão ao vidro. A distensão do material foi feita em placa aquecedora.

3.4.3 COLORAÇÕES PARA MICROSCOPIA DE LUZ

A fim de analisar e descrever as características estruturais e histoquímicas em microscopia de luz, o material foi tratado com diferentes técnicas de coloração.

O emprego de Hematoxilina de Harris e Eosina (CLARK, 1981) permitiu o estudo da estrutura geral das brânquias, bem como a identificação e localização dos diferentes tipos celulares do epitélio branquial.

Outras técnicas foram realizadas para identificação das células secretoras de muco e determinar a natureza química do produto de secreção. A evidenciação de glicosaminoglicanas ácidas foi feita por meio de Alcian Blue pH 2,5 (CLARK, 1981) contrastado com Orange G (CULLING et al., 1985). O corante Azul de Alcian pH 0,5 (CLARK, 1981), também contrastado com Orange G, demonstrou grupos ácidos sulfatados (éster sulfúrico - OSO_3H). Os grupos ácidos carboxilados foram evidenciados pelo tratamento com Alcian Yellow modificado a partir de CULLING et al. (1985).

Os polissacarídeos neutros foram evidenciados por meio da técnica do P.A.S., Ácido Periódico de Schiff (CLARK, 1981) contrastado com Verde Luz (BEÇAK & VANRELL, 1970).

Por meio da coloração Novelli (BEÇAK & VANRELL, 1970), que evidencia células ricas em mitocôndrias, foi possível confirmar a presença das células de cloreto.

As lâminas a serem coradas foram submetidas aos procedimentos de rotina: desparafinização com xileno, hidratação em série de álcoois até água filtrada e destilada. Após as colorações, o material nas lâminas foi desidratado em série alcoólica crescente e diafanizados em xileno. Para o preparo de lâminas permanentes, após a diafanização, o material foi recoberto com meio de montagem, resina Polymont ®, e lamínulas de vidro.

A análise e documentação das lâminas foi realizada em fotomicroscópio Olympus® PM 10 AD do Laboratório de Impacto Ambiental (LIA) da UFPR. O registro fotográfico foi feito com filmes Kodak Gold Plus®, asa 100, de 35 mm.

3.4.4 FIXAÇÃO E PROCESSAMENTO PARA MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA

Amostras do 2º arco branquial de *Salminus maxillosus* e *Prochilodus scrofa* foram colocadas em placa de Petri plástica com solução salina a 0,9%. Após a extirpação da região faríngea do arco branquial os seguintes segmentos foram separados para o estudo ultraestrutural: filamentos branquiais do epibrânquial, filamentos branquiais do ceratobrânquial e filamentos branquiais do ponto de fusão do epibrânquial com o ceratobrânquial.

Os segmentos separados foram fixados em Glutaraldeído a 3% em Tampão Cacodilato 0,2 M pH 7,2 a 4°C. As peças permaneceram no fixador durante o transporte até o LIA e posteriormente até o Centro de Microscopia Eletrônica - CEME - da Universidade Federal de São Paulo, onde se deu a continuidade do processamento.

Em solução tampão cacodilato 0,2 M pH 7,2, o material foi novamente seccionado. As hemibrânquias foram separadas e, após mapeamento, cortadas transversalmente em 2 ou 3 partes de acordo com a altura dos filamentos branquiais.

As peças foram lavadas em tampão cacodilato 0,2 M pH 7,2 e o processamento seguiu-se pelo método O-T-O (Tetróxido de Ósmio - Ácido Tânico - Tetróxido de Ósmio) que melhora a condutividade dos elétrons através dos tecidos. O material foi lavado com água bidestilada e desidratado em série alcoólica crescente.

A secagem com gás carbônico foi realizada no aparelho de Ponto Crítico BALZERS CPD 030. Em seguida, o material foi colado em suportes adequados e submetido ao processo de metalização no aparelho BALZERS SCD 050, sendo as peças recobertas com uma camada de 25 nm de ouro.

A análise e documentação do material foi realizada em microscópio eletrônico de varredura marca JEOL modelo JSM 5300 do CEME.

FIGURA 1



O DOURADO - *Salminus maxillosus*

FIGURA 2



O CURIMBATÁ - *Prochilodus scrofa*

FIGURA 3

Localização de Cachoeira de Emas, Pirassununga - SP, onde foram capturados os peixes estudados. Fonte: KOHN & FERNANDES, 1987

FIGURA 4**Tanques para manutenção dos peixes**

RESULTADOS

4.0 RESULTADOS

4.1 ARCOS BRANQUIAIS

Salminus maxillosus e *Prochilodus scrofa* apresentam quatro arcos branquiais em forma de “V”. Na face voltada para a boca fica a porção faríngea do arco e voltado para o opérculo ficam as lamelas respiratórias (Fig 12).

4.2 RASTROS BRANQUIAIS

Os arcos branquiais de *S. maxillosus* apresentam, na face voltada para a região faríngea, uma série de rastros de consistência rígida. Estes são mais longos na região mediana, correspondendo ao encontro do osso epibrânquial com o ceratobrânquial e vão se tornando mais curtos a medida em que se aproxima a extremidade destes ossos. Os rastros são mais proeminentes no primeiro arco branquial. Ficam menos salientes no segundo, terceiro e quarto arcos branquiais, sendo neste último, sendo neste último quase que totalmente aderidos ao arco.

A face do arco branquial de *S. maxillosus* voltada para o meio externo é lisa no primeiro e segundo arcos branquiais. Ao longo do terceiro arco, ocorrem rastros relativamente curtos e pouco salientes, estando ausentes na extremidade do mesmo. O quarto arco branquial apresenta rastros curtos no ceratobrânquial e a região do epibrânquial é unida com a faringe.

Rastros branquiais estão presentes nos quatro arcos de *Prochilodus scrofa*, na face voltada para a cavidade faríngea, exceto no epibrânquial do quarto arco que é unido à faringe. Os rastros são menos consistentes e menos espaçados que os de *S. maxillosus*. Possuem formato lamelar e são mais proeminentes no epibrânquial do primeiro arco. No quarto arco branquial os rastros são pouco salientes.

A face dos arcos branquiais de *P. scrofa* voltada para o meio externo apresenta dupla fileira de rastros. Superficialmente, estes são curtos e consistentes e os da fileira inferior são longos e frágeis.

4.3 FILAMENTOS BRANQUIAIS

Cada arco branquial dá suporte a dois conjuntos de filamentos branquiais. Cada um destes é denominado de hemibrânquia. Estas encontram-se unidas por um septo conjuntivo formando a holobrânquia. Os filamentos branquiais inseridos nos arcos diferem quanto a altura. Em ambas as espécies, observa-se, na região onde há o encontro do epibranquial com o ceratobranquial, que os filamentos são mais curtos. Tornam-se mais longos a partir do ponto de fusão dos ossos até a região média dos mesmos, voltando a decrescer nas extremidades do arco.

A análise da estrutura branquial através de microscopia de luz revelou que a região respiratória do 2º arco branquial segue os padrões descritos para os teleósteos. As lamelas respiratórias ou secundárias partem dos filamentos branquiais, também denominados de lamelas primárias. As lamelas secundárias estão dispostas alternadamente nos lados opostos do filamento branquial. Esta configuração é bem mais evidente nas brânquias de *S. maxillosus* que nas de *P. scrofa* (Figuras 5A e 5B).

Através de microscopia eletrônica de varredura foi possível observar que, em *S. maxillosus*, a extremidade apical dos filamentos branquiais é mais ponteguda e livre de lamelas secundárias (Fig. 5E). Em *P. scrofa*, o ápice das lamelas primárias também são livres de lamelas secundárias porém difere quanto à forma, sendo mais dilatado (Figura 5G e 5H).

As primeiras lamelas secundárias a se projetarem lateralmente no filamento branquial tem formato triangular em ambas as espécies. Este formato altera-se do ápice para a base das lamelas primárias, quando vão assumindo forma retangular (figura 5E e 5H). *S. maxillosus* possui lamelas secundárias mais longas e com extremidade da lamela secundária mais dilatada que em *P. scrofa* (Figuras 5F e 5H, 7A e 7B).

Tanto em *S. maxillosus* como em *P. scrofa*, a superfície das células do epitélio branquial é aumentada pela presença de micropregas. Estas ocorrem também nas células epiteliais da base da lamela secundária e vão desaparecendo ao longo da mesma (Figuras 6E, 6G, 6F e 6H).

As células do ápice da lamela secundária possuem superfície lisa em ambas as espécies (Figuras 7C e 7D). Já na extremidade apical das lamelas primárias as células do epitélio apresentam micropregas em sua superfície. Porções apicais de células especializadas

do tecido podem ser observadas nas figura 7E e 7F. Nesta região observa-se ainda a parte apical de células de cloreto conforme está demonstrado nas figuras 7F e 7H.

A região do filamento branquial compreendida entre duas lamelas secundárias é denominada região interlamelar. Tanto no dourado como no curimatá, é constituída por células epiteliais cúbicas, formadoras do epitélio estratificado de revestimento do filamento branquial. Apresenta células de cloreto que também são observadas na base das lamelas respiratórias (Figuras 5C e 5D). Em ambas as espécies a região interlamelar é curta, estando as lamelas secundárias muito próximas umas das outras (Figuras 5F e 5H). Células secretoras de muco podem lançar o produto de secreção neste espaço conforme registrado na figura 8C.

A estrutura do epitélio respiratório está representada nas figuras 5C e 5D. Este epitélio é biestratificado em ambas as espécies. As células pilares têm projeções citoplasmáticas denominadas flanges. As flanges delimitam os espaços sangüíneos que normalmente contém de um a três eritrócitos.

Tanto as lamelas primárias de *S. maxillosus* como as de *P. scrofa* são achatadas. As lamelas da extremidade do arco branquial podem ter formato mais próximo ao cilíndrico. A nível do septo conjuntivo que une as hemibrânquias o epitélio branquial é contínuo e os filamentos branquiais se individualizam acima do nível do septo permanecendo livres as extremidades (Figuras 6A, 6B, 6C e 6D).

Células de cloreto foram evidenciadas nas brânquias de *S. maxillosus* e de *P. scrofa* (Figuras 5C e 5D). Sua ocorrência foi confirmada na região interlamelar e na base das lamelas respiratórias através da técnica de Novelli, em microscopia de luz. A microscopia eletrônica de varredura da região do filamento branquial próxima à inserção da lamela secundária também revelou a presença destas células, cuja parte apical é visível na interface das células do epitélio (Figura 8D).

Células secretoras de muco e a natureza da secreção foram evidenciadas através de reações histoquímicas (Tabela 1) tanto no epitélio branquial como no epitélio respiratório de *S. maxillosus* e de *P. scrofa* (Figuras 9A e 9B; 10A e 10B; 11A e 11B). Cortes oblíquos do ápice das lamelas primárias de dourado e curimatá revelaram a presença de grande quantidade de células secretoras (Figuras 9C; 9D e 11C). A microscopia eletrônica de varredura da extremidade apical do filamento branquial de *S. maxillosus* revelou a presença de muco sobre as células do epitélio, encobrendo as micropregas (figura 9E). Em *P. scrofa* a

superfície celular está livre de secreção e as microssaliências ficam evidentes, bem como a região apical de células epiteliais especializadas (Fig. 9F).

TABELA 1

DETECÇÃO DE CÉLULAS SECRETORAS DE MUÇO

REAÇÕES HISTOQUÍMICAS	<i>Salminus maxillosus</i>	<i>Prochilodus scrofa</i>
Alcian Blue pH 2,5	++	+++
Alcian Blue pH 0,5	+	+
Alcian Yellow	- ?	+
P.A.S.	+++	+++

As reações indicam a presença de células secretoras de muco de natureza neutra, pois nas duas espécies estudadas a reação ao P.A.S. foi intensa. Tais células em ambas as espécies foram encontradas no epitélio branquial, na região interlamelar e nas lamelas respiratórias., porém em *S. maxillosus* a ocorrência nestas últimas foi escassa. No ápice do filamento branquial também foi detectada a presença de grande número de células secretoras.

Secreção ácida das células foi detectada em ambas as espécies, porém maior intensidade da reação ocorreu em *P. scrofa*, sugerindo maior acidez da secreção nesta espécie.

Em *S. maxillosus* não houve reação das células secretoras de muco ao Alcian Yellow indicando a ausência de grupos ácidos carboxilados. Entretanto a reação foi positiva em *P. scrofa* que, portanto, apresenta grupos ácidos carboxilados e também grupos sulfatados, conforme indicou a positividade ao Alcian Blue 0,5.

FIGURAS 5A e 5B

Estrutura geral do filamento branquial (LP) ou lamela primária, da qual partem as lamelas respiratórias (LS) ou lamelas secundárias. Tanto em *S. maxillosus* (fig. 5A) como em *P. scrofa* (fig. 5B) a região interlamelar (RI) é constituída por células epiteliais cúbicas, formadoras do epitélio estratificado de revestimento do filamento branquial. Este espaço interlamelar apresenta-se reduzido pela proximidade das lamelas respiratórias que estão dispostas alternadamente nos lados opostos do filamento branquial. (H.E. - 200 X)

FIGURAS 5C e 5D:


Em aumento maior (1000 X) observar o epitélio respiratório biestratificado da lamela secundária (LS) de *S. maxillosus* (fig. 5 C) e *P. scrofa* (5D). Na camada externa estão as células pavimentosas () e na camada interna, as células indiferenciadas (\rightarrow). As células pilares (\longleftrightarrow) adjacentes com suas flanges (\triangleright) delimitam os espaços sanguíneos (ES). Células de cloreto (\square) são observadas na região interlamelar e na inserção das lamelas respiratórias no filamento branquial. Estas células têm núcleo posicionado na região basal e seu citoplasma é bastante eosinofílico (H.E.).


FIGURA 5E

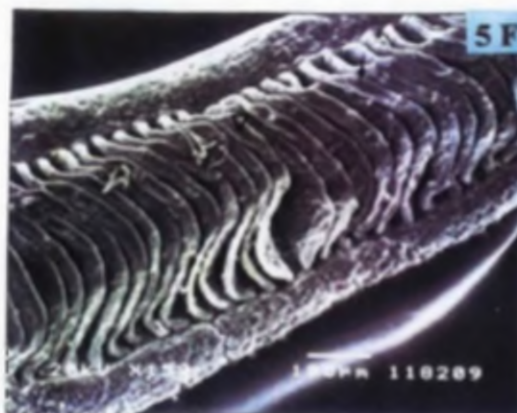
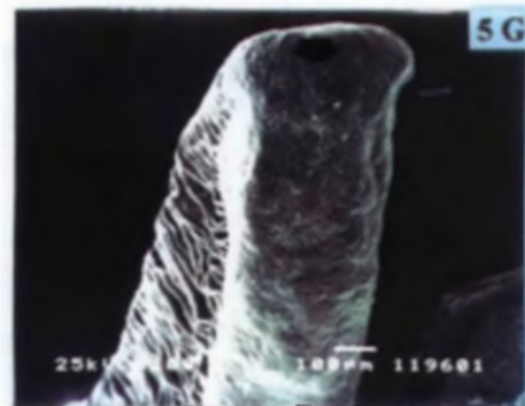
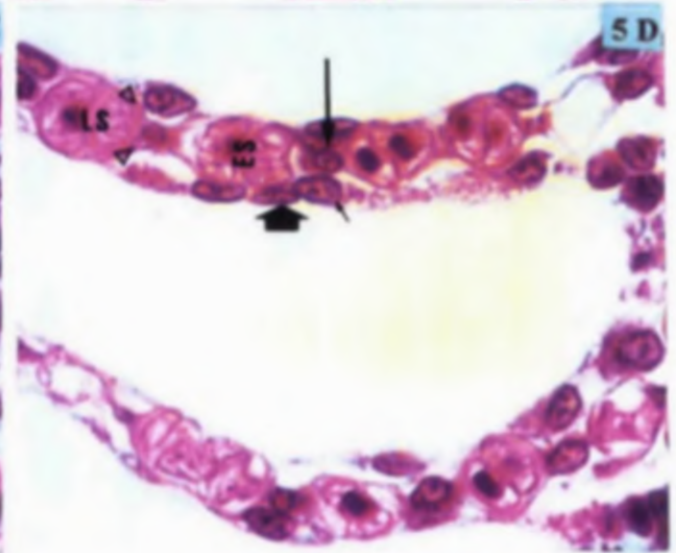
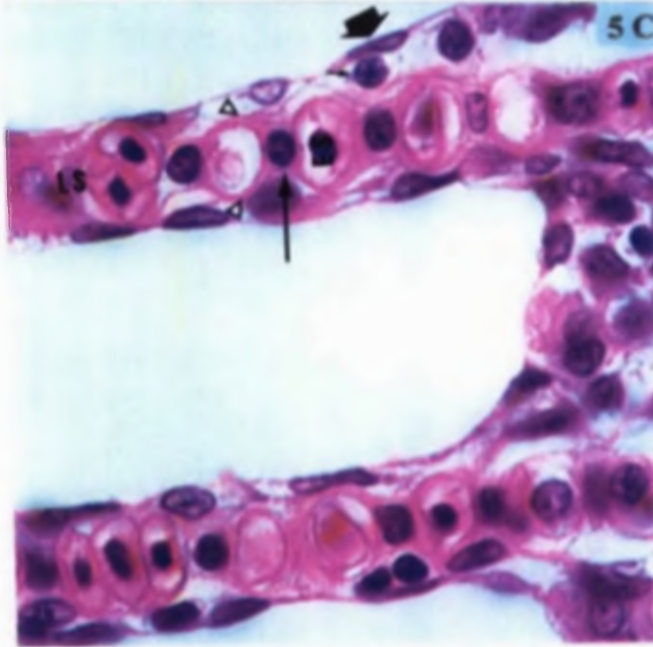
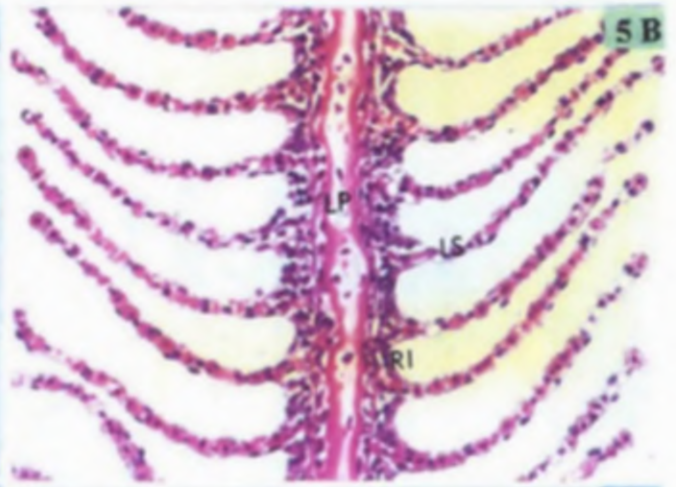
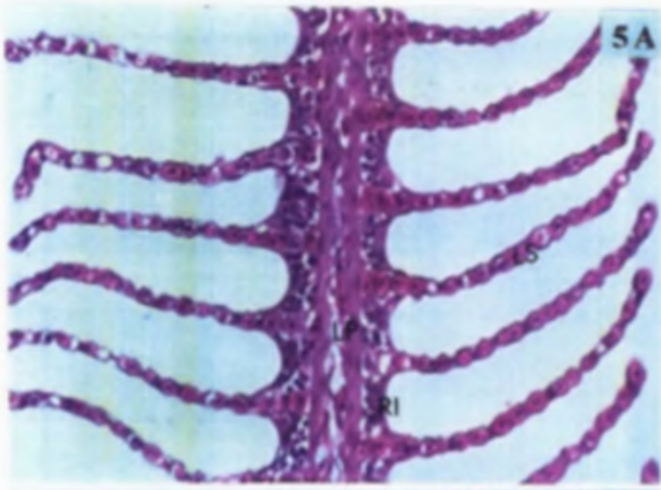
Microscopia eletrônica de varredura do ápice das lamelas primárias (\star) de *S. maxillosus*. Note que a extremidade destas lamelas é mais pontiaguda e livre de lamelas secundárias. As primeiras lamelas secundárias que se projetam lateralmente apresentam formato triangular (\rightarrow). Este formato se altera do ápice para a base das lamelas primárias quando vão assumindo o formato retangular.

FIGURA 5F

M.E.V. de um filamento branquial de *S. maxillosus*. Observar a disposição das lamelas respiratórias (∇) da região média do filamento branquial. Note a proximidade destas lamelas e a dilatação do ápice (\rightarrow) das mesmas.

FIGURAS 5G e 5H

Região apical de um filamento branquial de *P. scrofa*. Observar a extremidade dilatada da lamela primária ().



FIGURAS 6A, 6B, 6C, 6D

Cortes transversais dos filamentos branquiais de *S. maxillosus* (6A e 6C) e de *P. scrofa* (6B e 6D). Note o achatamento destes filamentos. Nas extremidades dos ossos epi e ceratobranquial as lamelas primárias são menos achatadas (fig. 6C). À nível do septo conjuntivo (∇) que une as hemibrânquias os filamentos branquiais apresentam uma continuidade tornando-se individualizados (\blacktriangleright) acima do nível do septo.

FIGURA 6E

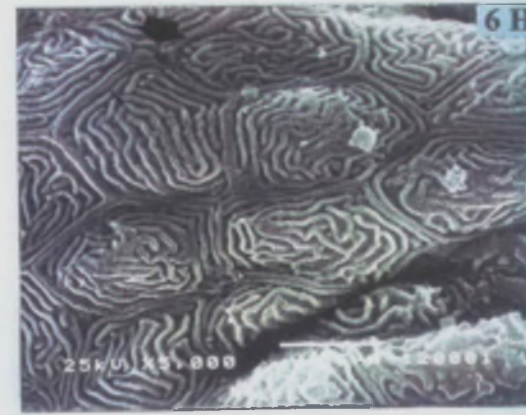
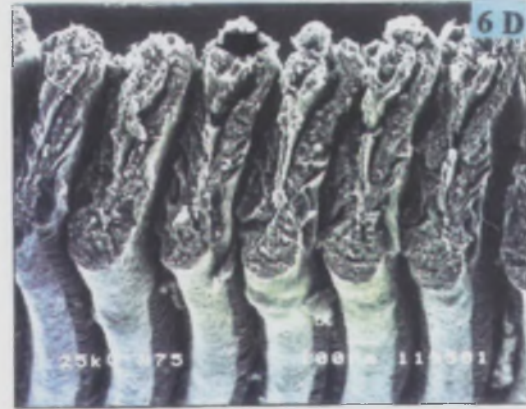
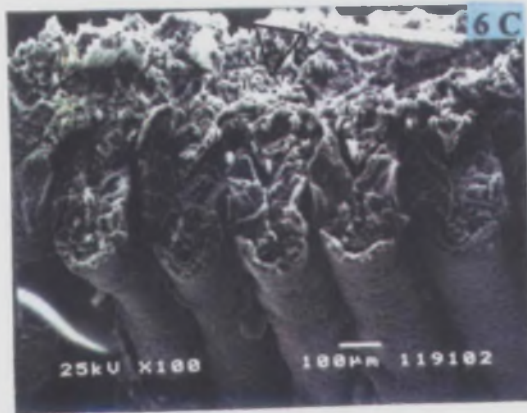
M.E.V. de uma lamela secundária de *S. maxillosus*, na região próxima à inserção desta no filamento branquial. Observar secreção mucosa (\rightarrow).

FIGURA 6G

M.E.V. da lamela primária de *S. maxillosus*, na região de inserção das lamelas secundárias. Observar células poligonais do epitélio branquial com microridges (\triangleright) e a região apical de células secretoras (\rightarrow).

FIGURA 6F e 6H

Lamela secundária de *P. scrofa*, região próxima à inserção na lamela primária. Observar as micropregas (\rightarrow) e a região apicais de células epiteliais especializadas (\blacktriangleright).



FIGURAS 7A e 7B

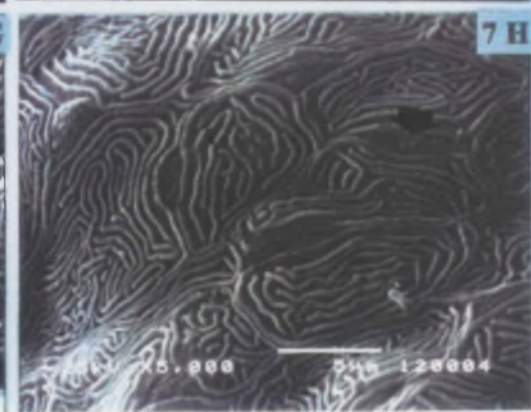
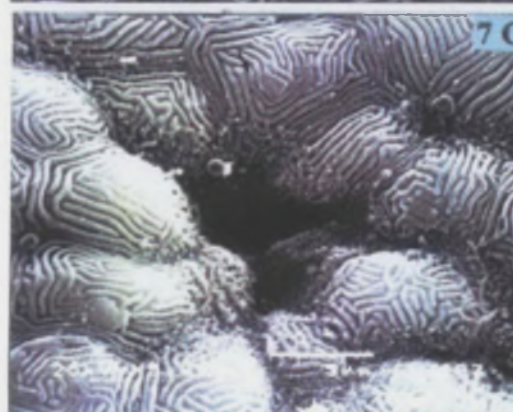
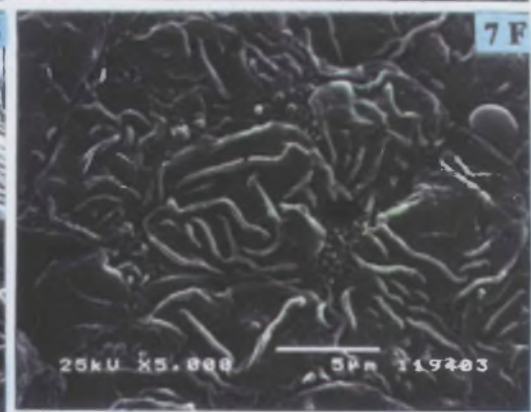
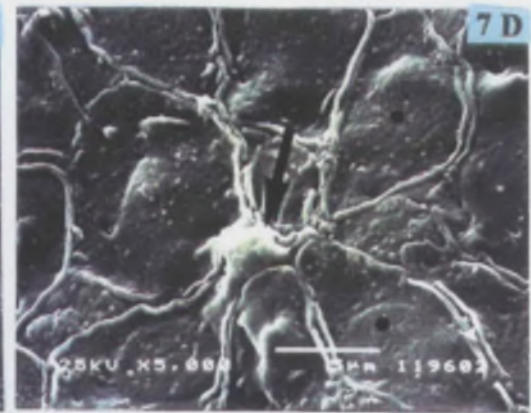
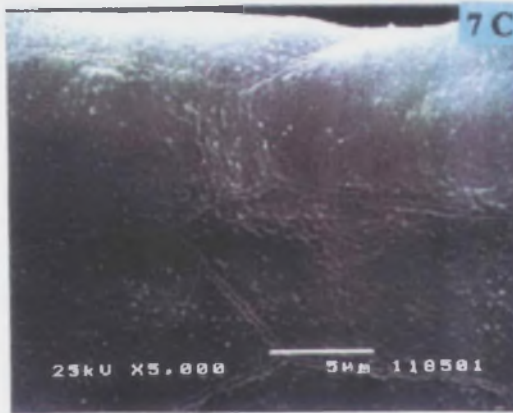
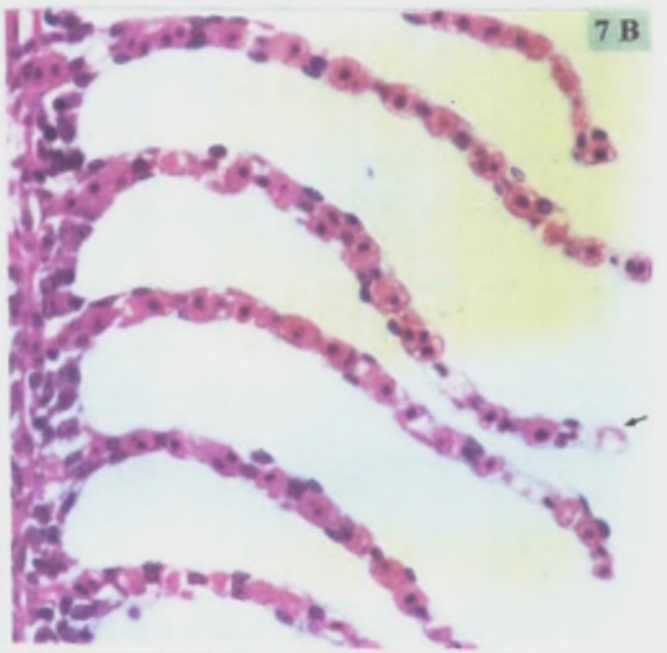
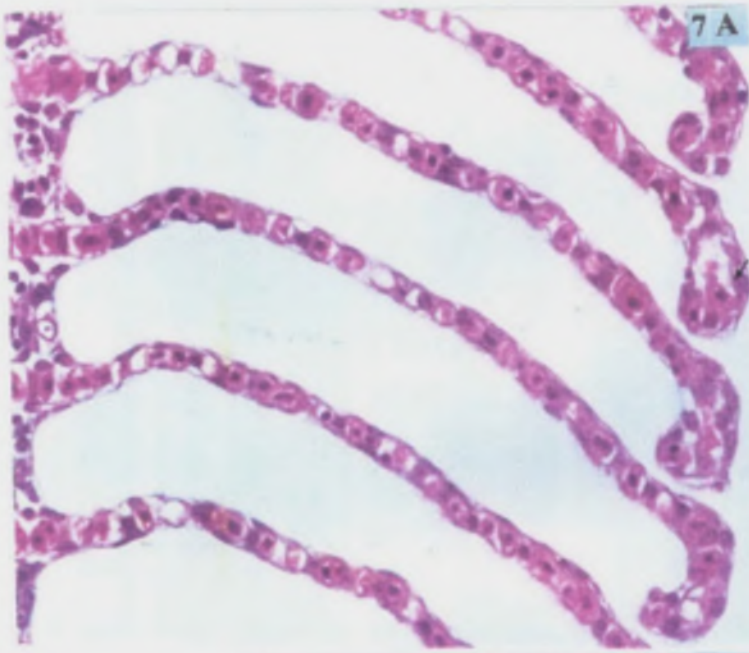
Observar lamelas secundárias de *S. maxillosus* (7A) e *P. scrofa* (7B). Note que a extremidade (→) das lamelas nesta primeira espécie é mais dilatada e se dobra com facilidade. (H.E. - 400 X)

FIGURAS 7C E 7D

M.E.V. do epitélio respiratório de *S. maxillosus* (7C) e *P. scrofa* (7D). Em 7D, note a secreção mucosa (↗) e a superfície lisa (*) das células epiteliais.

FIGURAS 7E , 7F, 7G e 7H

Ápice da lamela primária de *S. maxillosus* (7G e 7E) e *P. scrofa* (7F e 7H). Observar superfície das células com micropregas (→) e a região apical de células de cloro (◼) bastante evidentes em *P.scrofa*. Em *S. maxillosus*, regiões apicais de células especializadas (★).



FIGURAS 8A e 8B


Filamentos branquiais de *S. maxillosus* (8A) e *P. scrofa* (8B) mostrando a reação positiva das células de cloreto () ao Novelli. (1000X).

FIGURA 8C



M.E.V. da região interlamelar de *S. maxillosus* com região de secreção ().

FIGURA 8D

M.E.V. da região da lamela primária de *P. scrofa* próxima à inserção da lamela secundária. Note a presença de regiões apicais de células de cloro ().

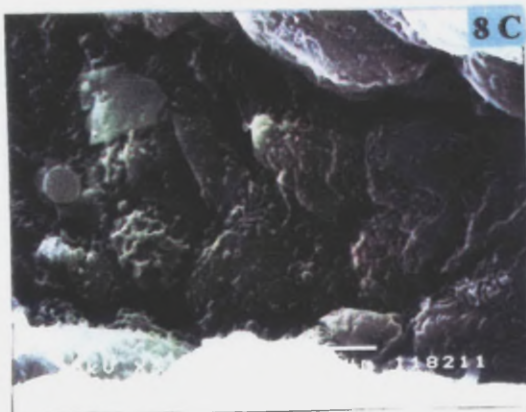
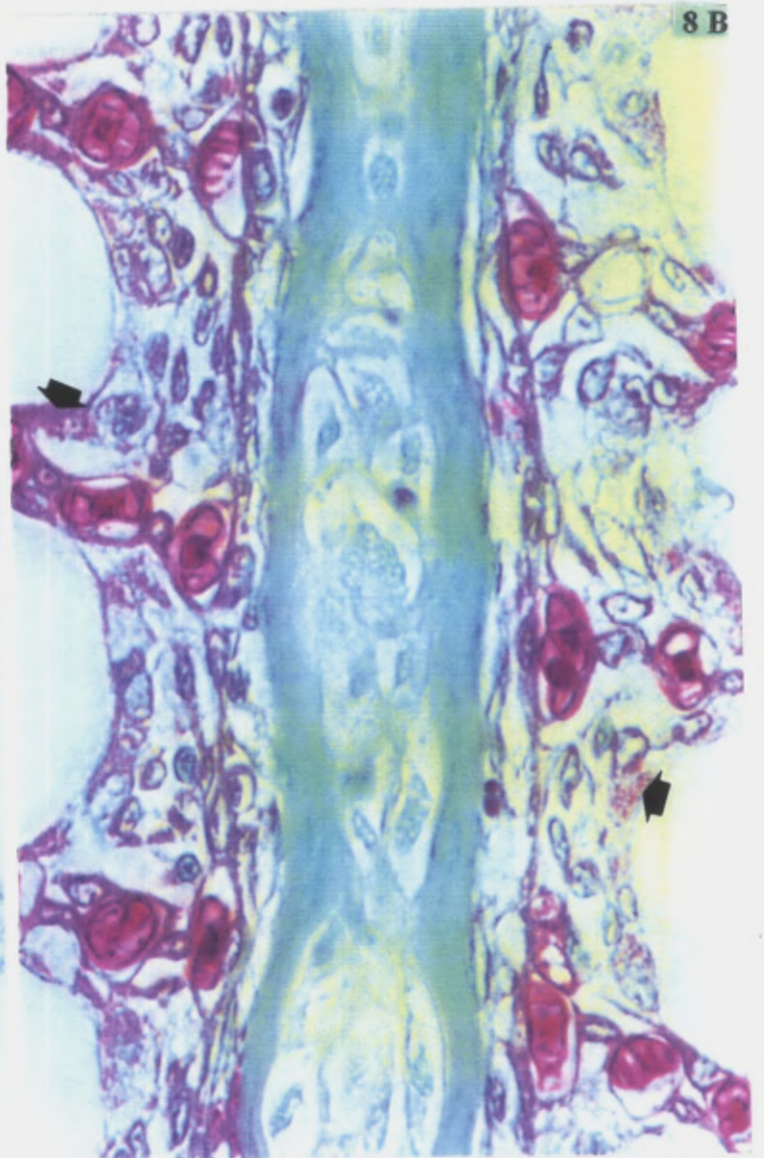
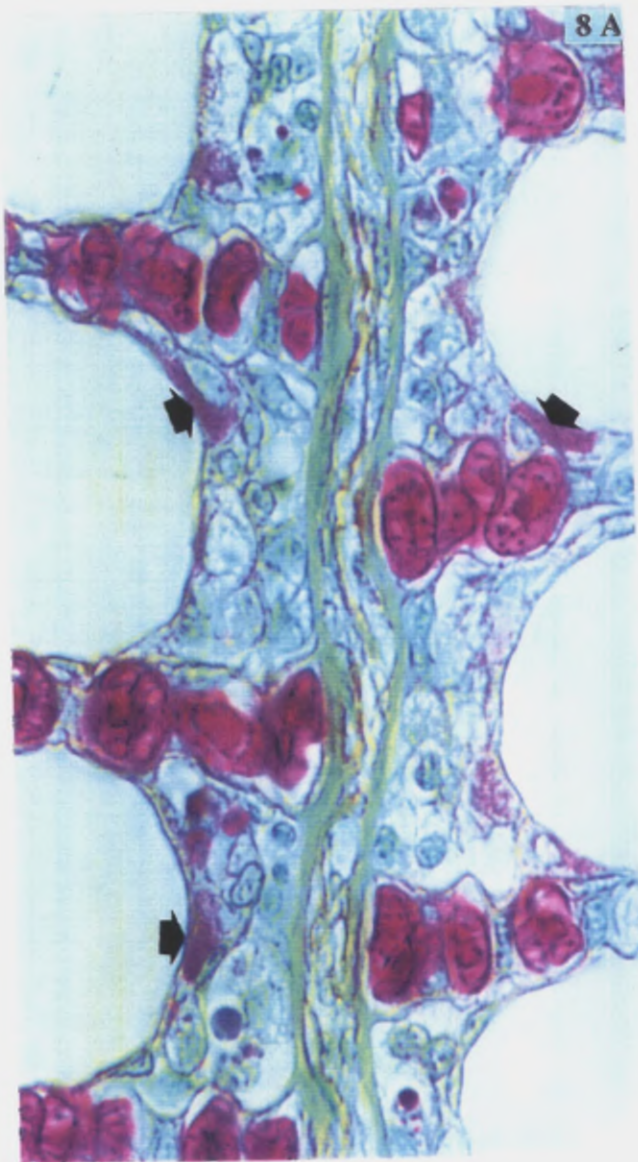


FIGURA 9A

Célula secretora de muco (→) no epitélio branquial de *S. maxillosus*. (Alcian Blue pH 2,5 - 400X)

FIGURA 9B

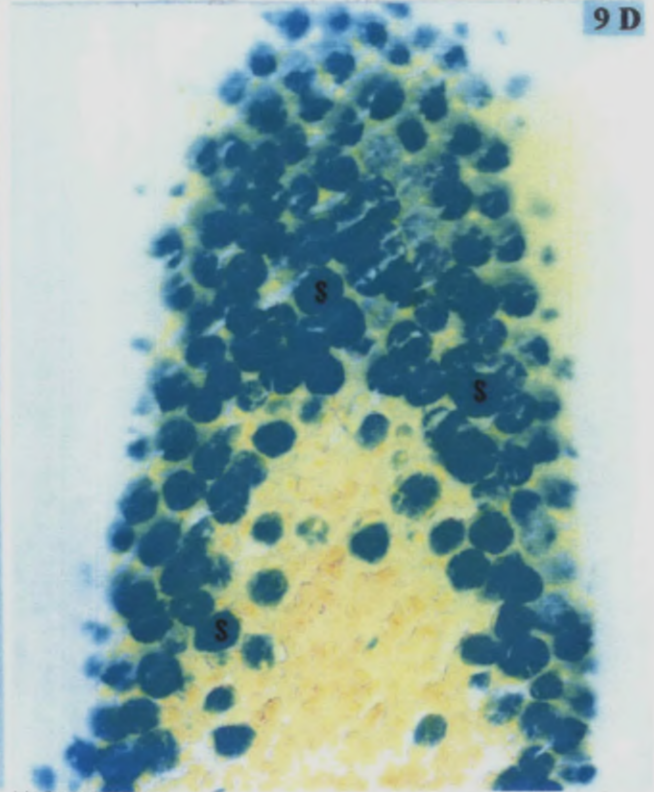
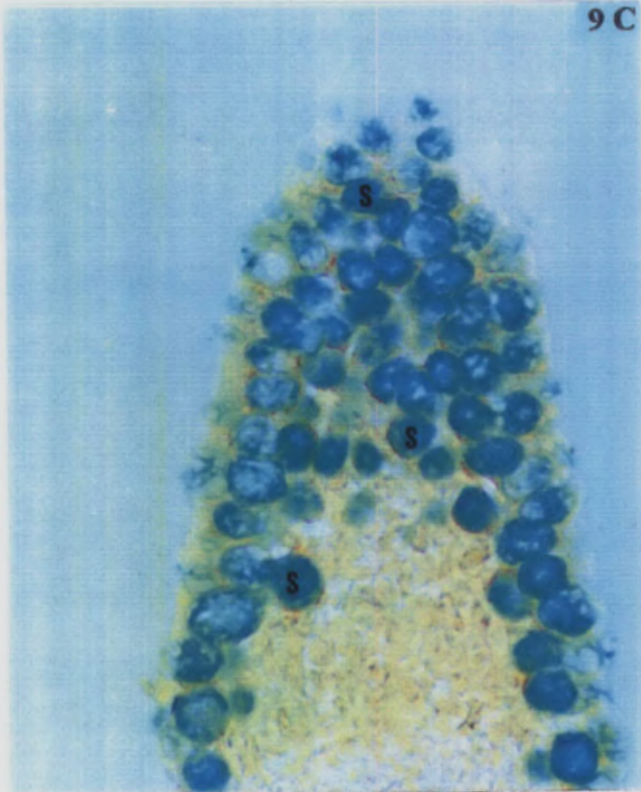
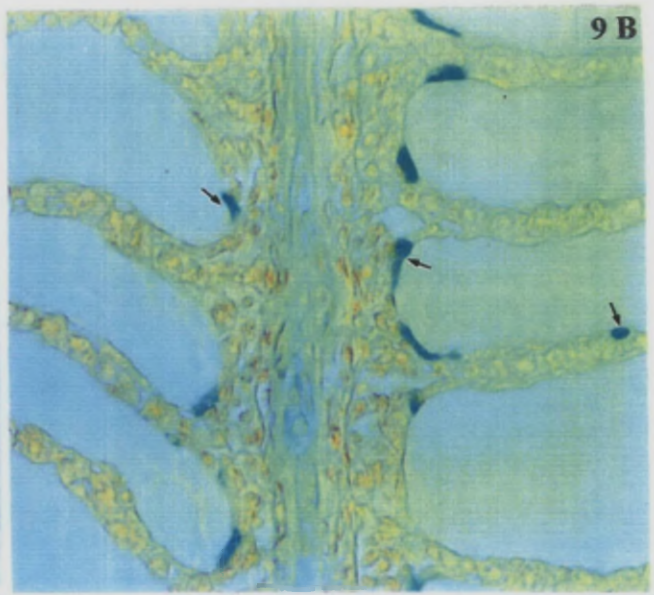
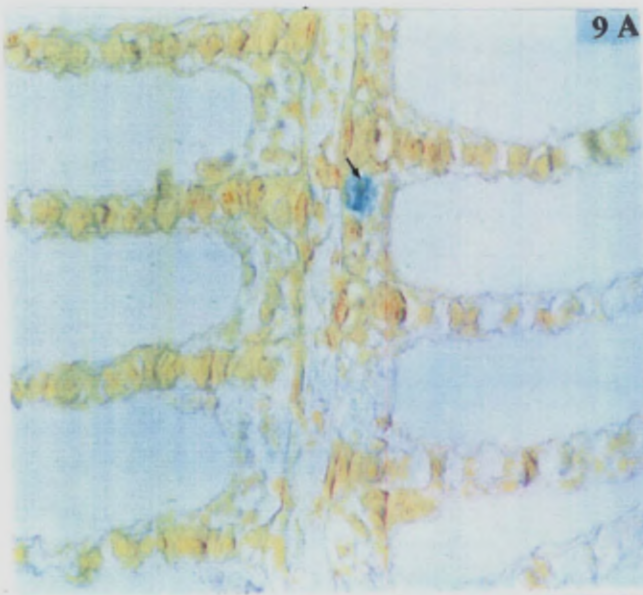
A presença de células secretoras (→) nas brânquias de *P. scrofa* é observada tanto no epitélio branquial como no epitélio respiratório. (Alcian Blue pH 2,5 - 400X)

FIGURA 9C e 9D

Corte oblíquo do ápice da lamela primária de *S. maxillosus* (9C) e *P. scrofa* (9D). Note a grande quantidade de células secretoras de muco (\$). (Alcian Blue pH 2,5 - 400X)

FIGURA 9E e 9F

M.E.V. do ápice do filamento branquial de *S. maxillosus* (9E) e *P. scrofa* (9F). Observar a porção apical das células secretoras (►) e a liberação do muco (*) sobre as células do epitélio branquial. Em 9E note a presença de muco sobre as células da lamela primária encobrendo as micropregas (→). Em 9F, superfície celular livre de secreção (☆).

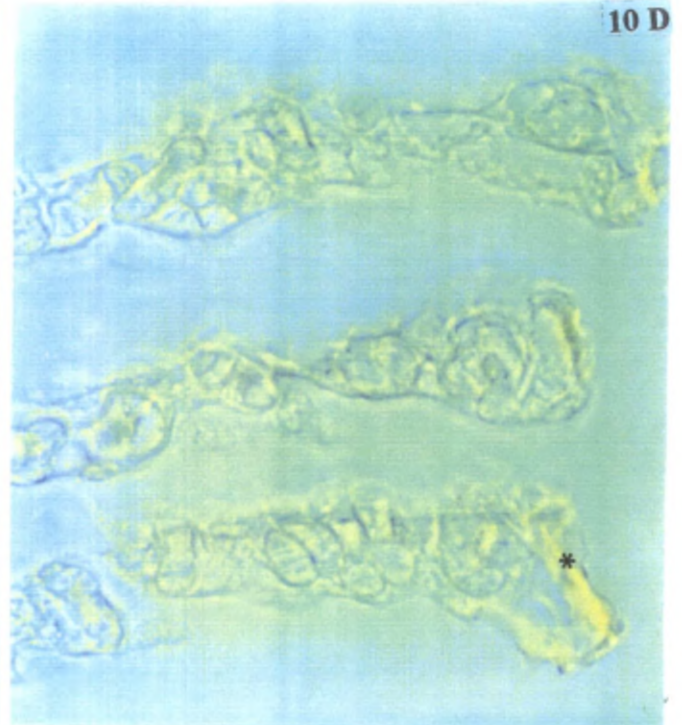
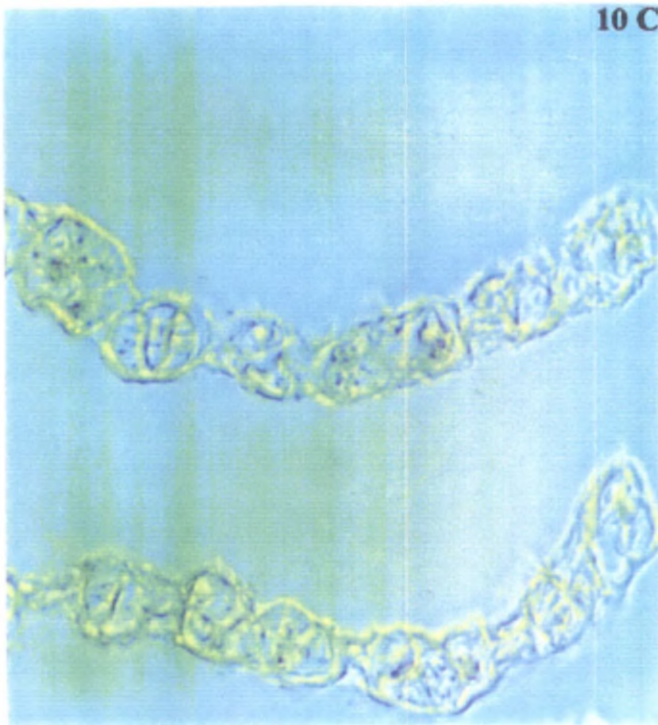
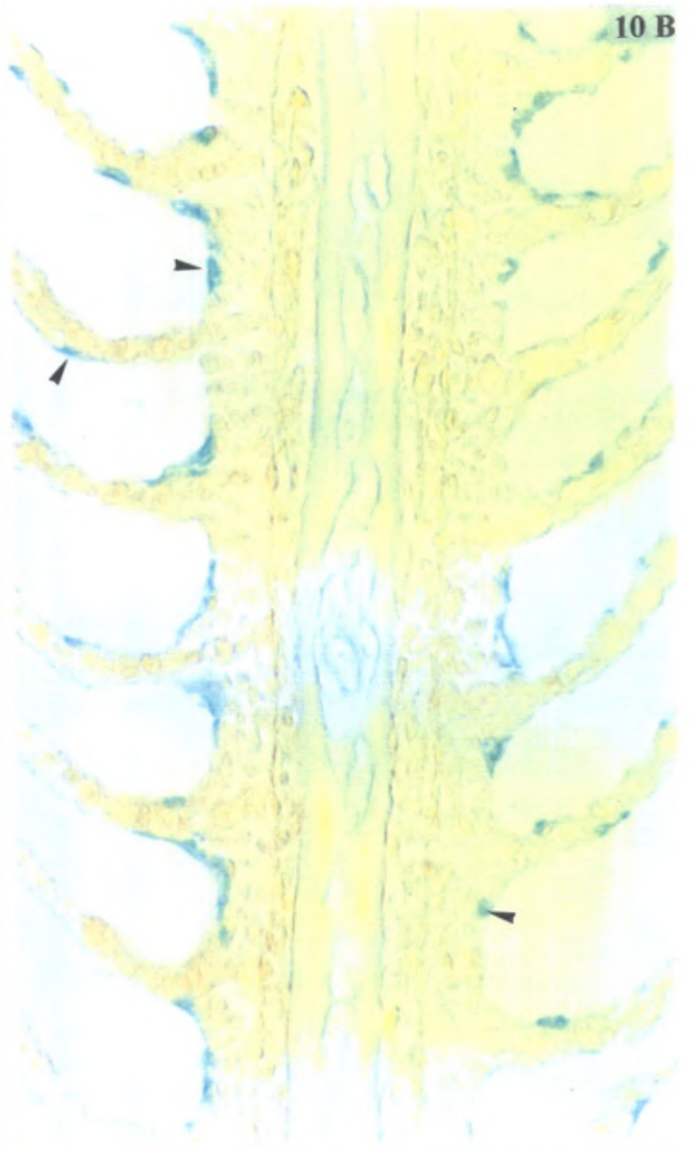
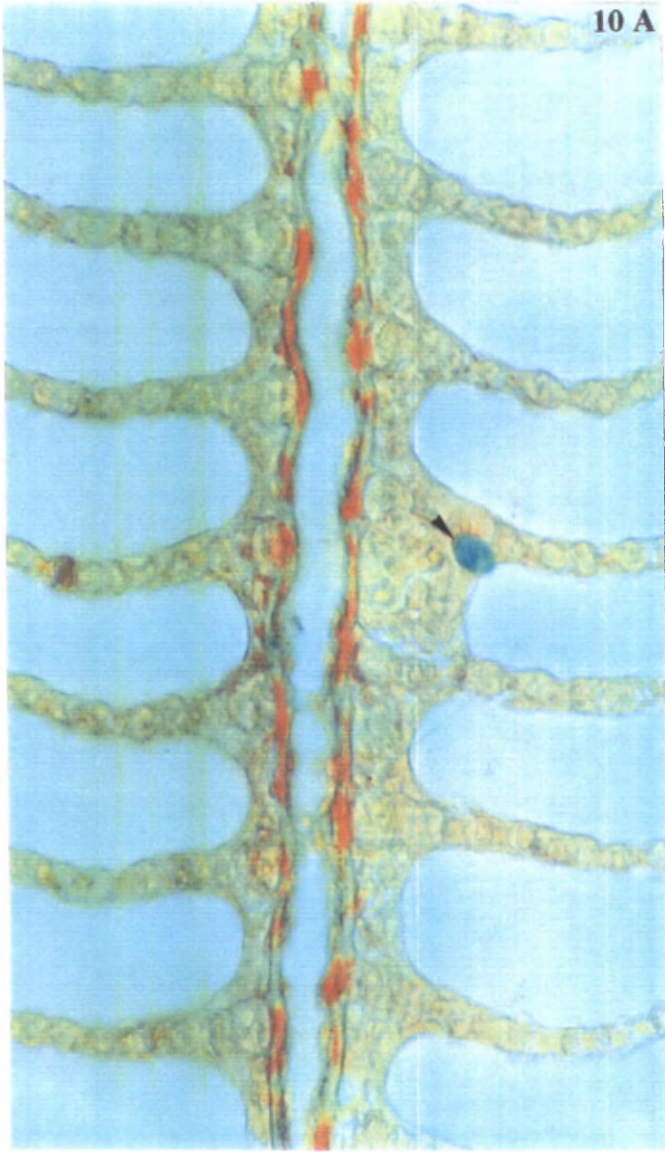


FIGURAS 10A e 10 B

Reação positiva ao Alcian Blue pH 0,5 evidenciando células secretoras de muco (►): em *S. maxillosus* (10A) presente apenas no epitélio branquial e em *P. scrofa* (10B) presente tanto nas lamelas primárias como nas secundárias. (400X)

FIGURAS 10C e 10 D

Reação positiva* ao Alcian Yellow na região apical das lamelas secundárias de *P. scrofa* (10D) e negativa nas de *S. maxillosus* (10C). (1000X)



FIGURAS 11A e 11B

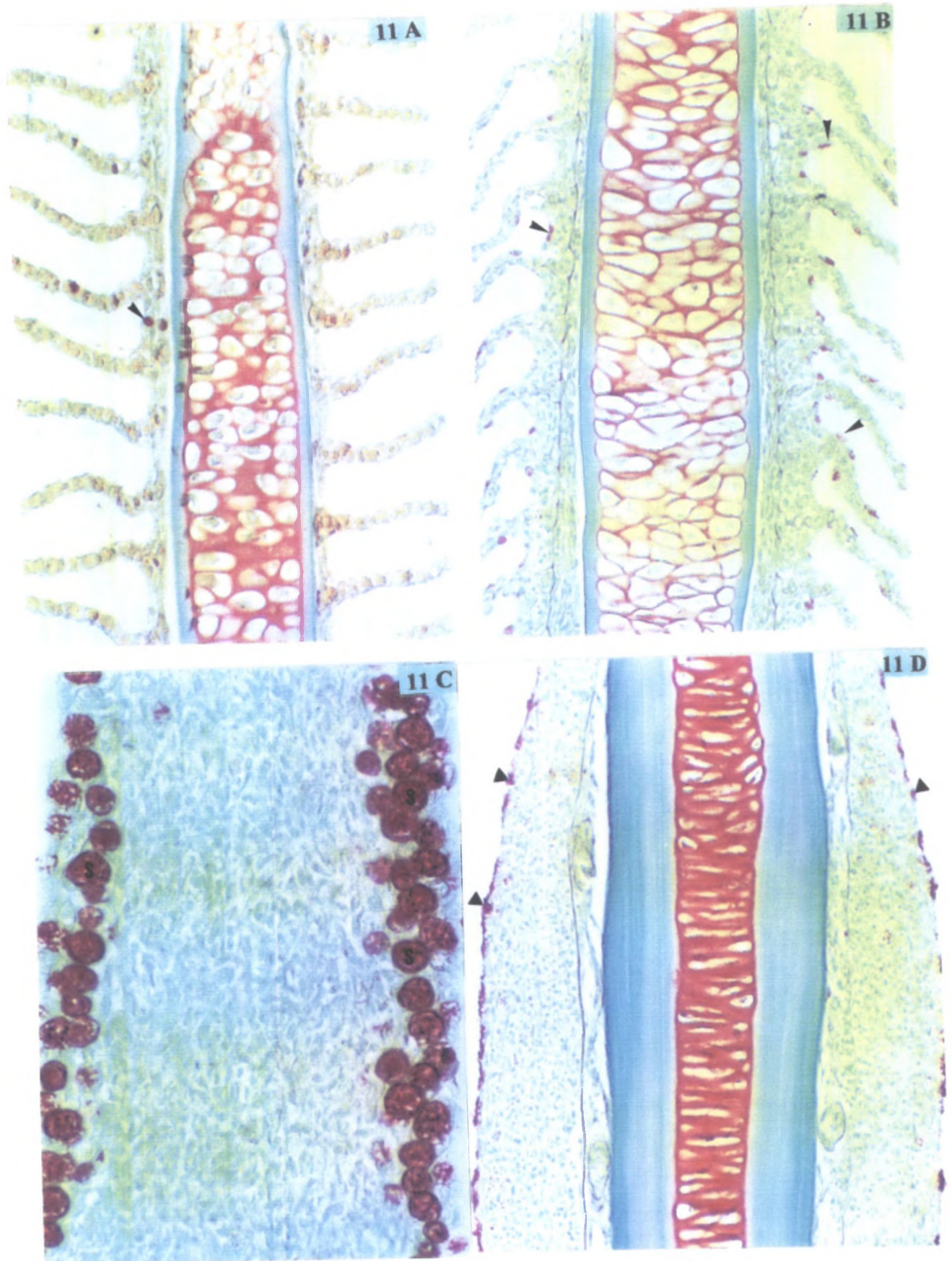
Reação positiva das células secretoras de muco (►) ao P.A.S. tanto em *S. maxillosus* (11A) como em *P. scrofa* (11B). (200X)

FIGURAS 11C

Corte oblíquo do filamento branquial de *S. maxillosus*. Observar células secretoras de muco (\$) intensamente coradas pelo P.A.S. (400X).

FIGURAS 11D

Corte longitudinal do filamento branquial de *P. scrofa* revelando a presença de células secretoras (►) nas margens da lamela primária (P.A.S. - 200X)



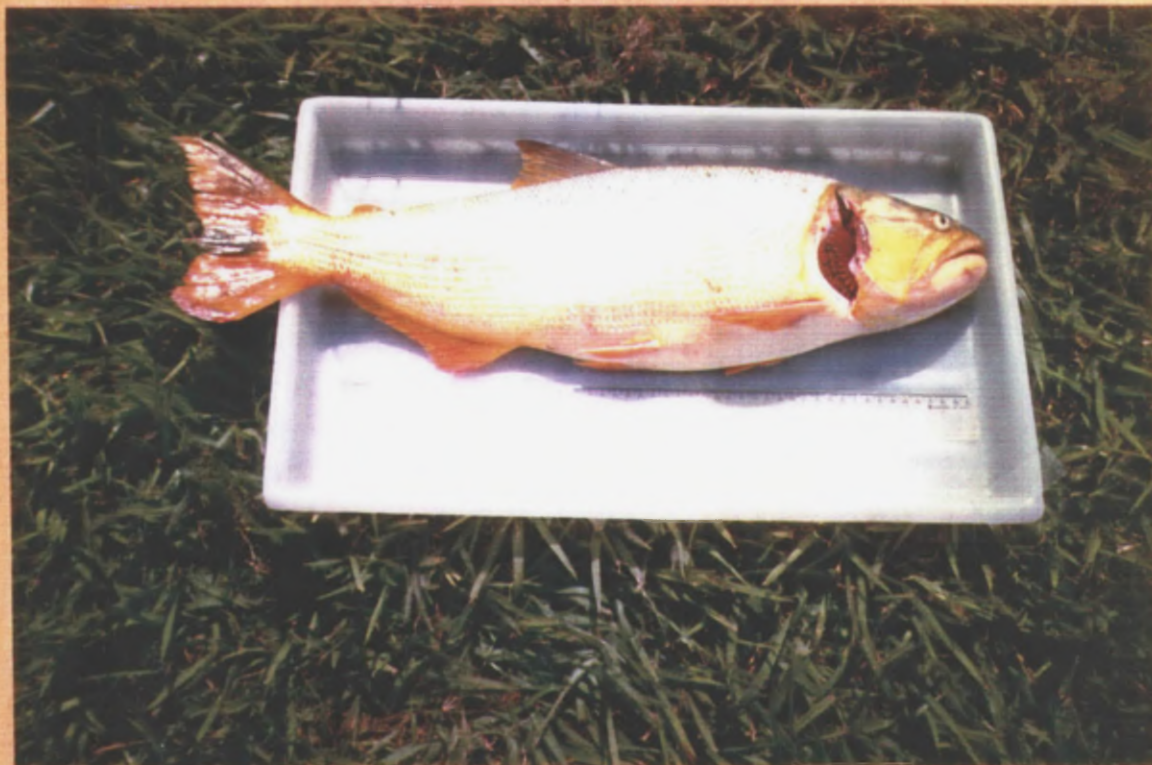


FIGURA 12: Porção respiratória das brânquias de *Salminus maxillosus* exposta após extirpação da cápsula opercular.

DISCUSSÃO

5.0 DISCUSSÃO

O estudo macroscópico da região faríngea dos arcos branquiais de *Salminus maxillosus* permite reconhecer nesta espécie o hábito alimentar de predador. Os rastros branquiais nesta espécie são bem espaçados e de consistência rígida. Em *P. scrofa* o espaço interrastros é menor que em *S. maxillosus* e os rastros branquiais são menos consistentes. Tal fato permite o desenvolvimento de hábito alimentar iliófago em *P. scrofa*. A pequena distância entre os rastros se constitui em uma barreira de proteção à região respiratória das brânquias, evitando danos a que estão sujeitos os peixes com este tipo de alimentação (MUNSHI et al., 1984).

Segundo MAGNUSON e HEITZ, 1971 e SMITH, 1989, a seleção de alimento em relação ao tamanho do organismo ingerido está relacionada também com o espaço entre os rastros branquiais. O espaçamento entre os rastros revelam a capacidade de ingerir presas grandes (GALBRAITH, 1967; ALEXANDER, 1970; CARVALHO, 1980; HESSEN et al., 1988). Embora as espécies estudadas apresentem as características discutidas acima, os estudos de KLIEWER (1970) indicaram não haver correlação entre o espaço absoluto dos rastros e o tamanho do alimento. LANGERLAND e NOST (1995) enfatizaram que os peixes podem se alimentar dos mesmos tipos de presa a despeito de grandes diferenças no espaçamento dos rastros branquiais.

Os rastros branquiais de primeiro arco de *S. maxillosus* tem forma laminar. Segundo GEEVARGHESE (1983), a estrutura e a morfologia dos rastros branquiais anteriores do primeiro arco branquial mostram importante relação com o alimento consumido pelos peixes. Estes rastros freqüentemente são modificados em relação aos das demais fileiras (IWAI, 1963; CARVALHO, 1980; HOURIGAN et al., 1989; MEZA et al., 1993). De acordo com MUNSHI (1968), peixes insetívoros e piscívoros possuem rastros modificados para controlar a saída da abertura inalante na câmara supra branquial. Rastros em forma de folha permitem ao peixe controlara o fluxo laminar através da primeira fenda branquial, possibilitando ao peixe continuar respirando durante a lenta ingestão de presas muito grandes.

Também o número de rastros branquiais presentes ao longo do arco esquelético é um caráter genético estudado e sistemático (BAIEY e SMITH, 1981), mas estudos

morfométricos seriam necessários para relacionar o número de rastros e seu espaçamento com as características do alimento ingerido.

A descrição da região respiratória das brânquias foi feita com base no 2º arco branquial já que este tem sido considerado como modelo para brânquias

A disposição alternada das lamelas respiratórias do filamento branquial, em ambas as espécies estudadas, pode favorecer o fluxo da água do sentido basal apical. Ao entrar pela boca a água percorre a cavidade faríngea e atinge o meio externo depois de banhar as lamelas secundárias. Considerando a posição intercalada de lamelas respiratórias de filamentos adjacentes, o fluxo da água segue para o ápice destas lamelas que se voltam para cima. Segundo GREENWOOD (1975), a constância deste fluxo, em qualquer estágio da respiração, torna mais eficiente as trocas gasosas.

As lamelas respiratórias são cobertas pelo epitélio secundário ou respiratório, que tanto em *S. maxillosus* como em *P. scrofa* é biestratificado. Através deste tecido ocorrem as trocas gasosas entra a água e o sangue. Quanto menor for esta barreira mais eficiente são as trocas.

A dilatação da superfície apical das lamelas respiratórias pode ocorrer devido a dilatação dos espaços sanguíneos desta região de retorno do sangue para os vasos do filamento branquial.

Nas duas espécies de peixes estudadas, o epitélio do filamento branquial é constituído de células cuja superfície apresenta micropregas. A existência dessas microssaliências na lamela primária provavelmente está relacionada à retenção de uma fina película de muco sobre o epitélio a fim de protegê-lo de agressões ambientais, tais como alterações de pH da água e temperatura (HOOSLER, 1980 e MAFLATT, 1985). Ao longo da lamela primária e na região interlamelar foram encontradas células com micropregas recobertas por muco, aparentando serem as mesmas de superfície lisa.

A presença das micropregas na base da lamela secundária sugere um aumento da superfície respiratória. Em ambas as espécies estudadas, não se observam micropregas nas células que recobrem a superfície apical das lamelas secundárias, que se apresentam lisas O mesmo foi registrado por NETO (1995) em juvenis de *Mugil platamus* assim como em exemplares adultos de *Mugil platamus*, *Mugil liza* e *Mugil curema* (EIRAS-STOFELLA, 1994) e *Mugil cephalus* (HOOSLER et al., 1979 a). Segundo OJHA et al. (1987), a presença de micropregas nas lamelas provavelmente aumentariam a distância entre o sangue e a água pela presença da camada de muco. Poderia ocorrer ainda a adesão de partículas

neste muco, dificultando as trocas gasosas. No entanto, micropregas foram observadas nas lamelas de *Salmo gairdneri* (HUGHES, 1979), *Fundulus heteroclitus* (HOOSLER et al., 1985), *Saccobranchus fossilis* (HUGHES e DATTA-MUNSHI, 1978), *Seriola quinqueradiata* (HUGHES e MONDOLFINO, 1983) e *Oncorhynchus nerka* (FRANKLIN, 1990).

No epitélio do filamento branquial de *S. maxillosus* e de *P. scrofa* foram observadas, na interface das células da camada superficial, regiões apicais de células de cloro. Estas foram reconhecidas, através de microscopia eletrônica de varredura, devido a existência de digitações (SARDET et al., 1979; PISAM, 1981; LAURENT, 1984) na sua porção apical membrana. Na microscopia de luz, com o emprego da técnica de Novelli, foi possível comprovar a ocorrência das células de cloreto. Estas se coram intensamente com fucsina pelo grande número de mitocôndrias que apresentam em seu citoplasma. Tal ocorrência concorda com o que se descreve na literatura.

Devido a presença das células de cloreto nas brânquias de *S. maxillosus* e *P. scrofa* podemos constatar o envolvimento destes órgãos nos processos de osmorregulação. Em animais de água doce as células de cloro absorvem íons (KIKUCHI, 1977; LAURENT et al., 1985; FRANKLIN, 1990).

A ocorrência de células secretoras de muco é observada tanto nas lamelas primárias como nas lamelas secundárias. Grande número destas células é observada no ápice dos filamentos branquiais.

Muitas funções, inclusive a de proteção química têm sido descritas para a camada de muco que reveste as brânquias (HARRIS e HUNT, 1973). A função protetora é particularmente relevante no caso do hidrogênio livre, já que o muco apresenta uma “rede” negativa (devido a presença de ácido siálico), atuando comumente como tampão, protegendo as superfícies contra atrito e desgaste. Já o muco neutro, mais fluido, mais liquefeito, estaria relacionado à proteção das superfícies epiteliais, formando uma barreira protetora contra as injúrias causadas por parasitas (ALLEN, 1981; ZACCONE, 1981; ALTMANN, 1990).

As reações histoquímicas realizadas identificaram as categoriais de mucossubstâncias produzidas pelas células secretoras. A secreção mucosa contém mucopolissacarídeos ácidos, evidenciados pelo Alcian Blue pH 2,5, Alcian Blue pH 0,5 e Alcian Yellow. Estes grupos ácidos contém mais radicais éster sulfúrico (OSO_3H), evidenciados pelo Alcian Blue pH 0,5 do que radicais carboxila (COOH) evidenciados pelo Alcian Yellow. Tal fato foi

observado em ambas as espécies, porém as reações foram sempre mais fortes em *P.scrofa* do que em *S. maxillosus*.

A reação com P.A.S. para detecção de mucossubstâncias neutras foi igualmente positiva para as duas espécies, sugerindo que ambas produzem um muco mais fluido, pela própria natureza química, que serve de proteção às superfícies epiteliais.

Pela análise histológica e ultraestrutural das brânquias de *Salminus maxillosus* e *Prochilodus scrofa*, fica claro que estes órgãos exercem um importante papel na fisiologia dos peixes, estando a sua estrutura diretamente relacionada ao funcionamento. Desta forma torna-se importante a análise deste órgão no biomonitoramento ambiental, principalmente a região respiratória que é bastante sensível às alterações do meio externo.

CONCLUSÕES

6.0 CONCLUSÕES

- ↳ O aparato faríngeo de *Salminus maxillosus* lhe permite exercer hábito alimentar predador, sendo capaz de ingerir presas grandes, enquanto que *Prochilodus scrofa* pode exercer hábito alimentar iliófago.
- ↳ O formato dos filamentos branquiais em ambas as espécies é achatado, exceto nas extremidades dos ossos epi e ceratobranquial que possuem filamentos mais cilíndricos.
- ↳ Os filamentos branquiais de *Salminus maxillosus* possuem extremidade mais afilada, enquanto que o ápice dos filamentos branquiais de *Prochilodus scrofa* são mais dilatados.
- ↳ Em ambas as espécies a região interlamelar é bastante reduzida estando as lamelas respiratórias muito próximas umas das outras.
- ↳ As lamelas secundárias de *Salminus maxillosus* são longas e possuem o ápice dilatado, enquanto que as de *Prochilodus scrofa* apresentam-se mais curtas e sem dilatação apical.
- ↳ Micropregas são evidentes nas células do epitélio do filamento branquial e na base das lamelas secundárias tanto de *Salminus maxillosus* como de *Prochilodus scrofa*. O ápice destas lamelas apresenta células com superfície lisa.
- ↳ A região apical de células de cloreto são visíveis na região interlamelar e na base das lamelas respiratórias.
- ↳ Células secretoras de muco foram observadas na região interlamelar das duas espécies, porém nas lamelas secundárias foi registrada presença das mesmas apenas em *Prochilodus scrofa*.

- ↳ Nas duas espécies, as lamelas primárias apresentam grande número de células secretoras de muco, principalmente no ápice da lamela.

- ↳ Em ambas as espécies, as células secretoras produzem muco de natureza ácida e neutra. Quando ao muco ácido, predominam os mucopolissacarídeos sulfatados.

- ↳ Sendo assim, as duas espécies têm proteção contra agentes patogênicos presentes no meio, bem como uma camada protetora e tamponada que protege contra o atrito e o desgaste. Esta é uma adaptação útil para estes animais na região em que vivem, de águas turvas e com partículas em suspensão.

- ↳ Filamentos branquiais finos, numerosos e achatados, proporcionando grande superfície de trocas gasosas, é útil para peixes ativos como o dourado e o curimatá, que gastam muita energia e portanto, necessitam de um suprimento maior de oxigênio.

- ↳ Rastros branquiais curtos, rígidos e espaçados permitem que *Salminus maxillosus* seja eficientemente um predador capaz de ingerir grandes presas, uma vez que estas não escaparão através das fendas branquiais. Rastros branquiais alongados, pouco consistentes, numerosos e muito próximos, formam uma barreira que impede a passagem de partículas alimentares para a cavidade opercular, portanto são características convenientes para o hábito iliófago de *Prochilodus scrofa*.

ANEXO

ANEXO

TÉCNICAS DE PREPARO DAS SOLUCÕES UTILIZADAS

1. SOLUÇÃO FISIOLÓGICA

SOLUÇÃO SALINA 0,9%

Fonte: CULLING et al., 1985

REAGENTE	QTIDADE
NaCl	0,9 g
Água destilada	100 mL

Preparo:

1. Dissolver o NaCl na água destilada

2. SOLUCÕES FIXADORAS

FLUIDO DE BOUIN

Fonte: CULLING et al., 1985

REAGENTE	QTIDADE
Solução aquosa saturada de ácido picrico	75 mL
Formaldeído	25 mL
Ácido Acético Glacial	5 mL

Preparo:

1. Misturar os reagentes

ALFAC

Fonte: modificado a partir de CULLING et al., 1985

REAGENTE	QTIDADE
Álcool 80%	85 mL
Formaldeído	10 mL
Ácido Acético Glacial	5 mL

Preparo:

1. Misturar os reagentes

GLUTARALDEÍDO A 3% EM TAMPÃO CACODILATO 0,2 M pH 7,2

Fonte: modificado a partir de GLAUERT, 1986 e CULLING et al., 1985

REAGENTE	QTIDADE
Glutaraldeído em solução aquosa a 25%	6 mL
Ácido cacodílico (PM=160)	1,6 g
Água destilada	q.s.p. 50 mL

Preparo:

1. Misturar os reagentes sob capela, com máscaras e luvas.
2. Conservar a solução sob refrigeração e acertar o pH para 7,2 com HCl ou NaOH.

3. SOLUÇÃO PÓS-FIXADORA

TETRÓXIDO DE ÓSMIO 2%

Fonte: modificado a partir de GLAUERT, 1986 e CULLING et al., 1985

REAGENTE	QTIDADE
OsO ₄	2 mL
Água destilada	q.s.p. 50 mL

Preparo:

1. Dissolver o OsO₄ na água destilada, sob capela, com máscaras e luvas.
2. Manter a solução sob refrigeração e conservá-la em três frascos, sendo o primeiro de dentro para fora o portador da solução.

Obs: Para o preparo de OsO₄ a 1%, diluir a solução de OsO₄ a 2% em Tampão cacodilato 0,4 M na proporção 1:1

4. SOLUÇÃO DE ADESÃO DOS CORTES À LÂMINA

ALBUMINA DE MEYER

Fonte: CULLING et al., 1985

REAGENTE	QTIDADE
Glicerina	1 parte
Clara de ovo	1 parte
Cristais de Timol	

Preparo:

1. Agitar a glicerina com a clara de ovo por 30 minutos
2. Filtrar e acrescentar cristais de timol para evitar fungos
3. Conservar sob refrigeração.
4. Para utilizá-la diluída, colocar 8 gotas de Albumina de Meyer concentrada em 20 mL de água destilada

5. SOLUÇÃO TAMPÃO

SOLUÇÃO TAMPÃO CACODILATO 0,2 M

Fonte: GLAUERT, 1986.

REAGENTE	QTIDADE
Ácido cacodílico (PM=160)	4,8 g
Água destilada	q.s.p. 150 mL

Preparo:

Dissolver o ácido na água destilada até completa dissolução.

6. CORANTES

SOLUÇÃO DE ÁCIDO TÂNICO A 1%

Fonte: GLAUERT, 1986.

REAGENTE	QTIDADE
Ácido Tânico	0,5 g
Água destilada	q.s.p. 50 mL

Preparo:

Dissolver o ácido na água destilada até completa dissolução.

HEMATOXILINA

Fonte: CLARK, 1981

Solução útil

REAGENTE	QTIDADE
Hematoxilina	1,0 g
Alúmen de potássio, Sulfato de Alúmen de Potássio ou Amônio	20,0 g
Oxido de Mercúrio Amarelo (ou vermelho)	0,5 g
Álcool 95% (PA)	10,0 ml
Água destilada	200 ml
Ácido acético glacial (Para ser adicionado a cada 95 ml de solução na hora do uso.)	5 ml

Preparo:

1. Dissolver a hematoxilina no álcool.
2. Dissolver o alúmen de potássio na água destilada com auxílio do agitador magnético e aquecimento, de preferência em um erlenmeyer.
3. Misturar as duas soluções no agitador magnético e deixar entrar em ebulição. Deixar de um dia para outro.
4. Colocar para esfriar em água corrente.
5. Filtrar.
6. Adicionar o ácido acético na hora do uso (Pode ser utilizado logo após preparo).

EOSINA

EOSINA 1% (Solução Estoque)

Fonte: CLARK, 1981

REAGENTE	QTDADE
Eosina 1%	1,0 g
Água destilada	20 ml
Álcool 95 PA	80 ml

Preparo:
Misturar e obter solução homogênea

EOSINA ÚTIL

REAGENTE	QTDADE
Eosina 1%	1 parte
Álcool 80% PA	3 partes
Acido Acético Glacial (Para ser adicionado a cada 100 ml de solução corante apenas na hora de uso)	0,5 ml

FUCSINA ÁCIDA 1%

Fonte: CLARK, 1981

REAGENTE	QTIDADE
Fucsina Ácida	1,0 g
Água destilada	100 ml

Preparo:
1. Dissolver a fucsina ácida em água destilada.
2. Filtrar.

VERDE LUZ 2%

Fonte: BEÇAK E VANRELL, 1970

REAGENTE	QTIDADE
Verde Luz	2,0 g
Água destilada	100 ml

Preparo:
1. Dissolver o verde luz em água destilada.
2. Filtrar.

ALCIAN YELLOW

Fonte: modificado a partir de CULLING et al., 1985

REAGENTE	QTIDADE
Alcian Yellow	0,5 g
Água destilada	97 mL
Acido Acético Glacial	3 mL

Preparo:

1. Dissolver o Alcian Yellow em água destilada.
2. Acrescentar o ácido Acético Glacial

ALCIAN BLUE pH 2,5

ALCIAN BLUE pH 2,5

Fonte: CLARK, 1981

REAGENTE	QTIDADE
Alcian Blue	1,0 g
Água destilada	97 mL
Acido Acético Glacial	3 mL

Preparo:

1. Dissolver o Alcian Blue em 90 mL água destilada.
2. Acrescentar o ácido Acético Glacial.
3. Verificar o pH e ajustá-lo com HCl concentrado ou NaOH a 10 N para o valor 2,5.
4. Completar o volume para 100 mL.

ORANGE G

Fonte: CULLING et al., 1985

REAGENTE	QTIDADE
Orange G	2 g
Ácido Fosfotúngstico, solução aquosa a 5% (5 g em 100 mL de água destilada)	100 mL

Preparo:

1. Dissolver o Orange G no Ácido Fosfotúngstico.
2. Deixar repousar durante 24 horas.
3. Utilizar apenas o sobrenadante.

ALCIAN BLUE pH 0,5

Fonte: CLARK, 1981

REAGENTE	QTIDADE
Alcian Blue	1,0 g
Água destilada	97 mL
Ácido Acético Glacial	3 mL

Preparo:

1. Dissolver o Alcian Blue em 90 mL água destilada.
2. Acrescentar o ácido Acético Glacial.
3. Verificar o pH e ajustá-lo com HCl concentrado ou NaOH a 10 N para o valor 0,5.
4. Completar o volume para 100 mL.

PAS (Periodic Acid-Schiff)

REATIVO DE SCHIFF

Fonte: modificado a partir de CLARK, 1981

REAGENTE	QTIDADE
Fucsina básica	1,0 g
HCl 1 N	20 mL
Metabissulfito de Sódio ou Potássio	1,0 g
Carvão ativado * se necessário	0,2 g *
Água destilada	q.s.p. 200 mL

Preparo:

1. Dissolver a Fucsina básica na água destilada fervendo e ferver por mais 5 minutos
2. Abaixar a temperatura para 50°C, filtrar e adicionar o HCl.
3. Deixar esfriar até 25°C e adicionar o metabissulfito.
4. Colocar em frasco escuro e deixar *overnight*. No dia seguinte, a solução deverá apresentar cor "palha".
Caso apresente a cor rósea adicionar o carvão ativado.
5. Filtrar e manter sob refrigeração.

ROTEIROS PARA PROCESSAMENTO

MICROSCOPIA DE LUZ

Fonte: modificado a partir de CULLING et al., 1985

BIBLIOTECA DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS / UFPA

PROCEDIMENTOS	TEMPO
Fixação em Fluido de Bouin ou ALFAC	24 horas
Lavagens em álcool 70%	algumas vezes
Desidratação em álcool 80%	1 hora
Desidratação em álcool 85%	30 minutos
Desidratação em álcool 90%	1 hora
Desidratação em álcool 95%	30 minutos
Desidratação em álcool 100%	1 hora
Desidratação em álcool 100%	30 minutos
Desidratação em álcool 100%	1 hora
Desidratação em álcool + xilol (1:1)	1 hora
Diafanização em xilol (1º banho)	15 minutos
Diafanização em xilol (2º banho)	10 minutos
Em estufa a 56°C, impregnação com paraplast plus ® (1º banho)	1 hora
Em estufa a 56°C, impregnação com paraplast plus ® (2º banho)	overnight
Emblocagem	-
Microtomia	-

MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA

Fonte: modificado a partir de CULLING et al., 1985

PROCEDIMENTOS	TEMPO
Fixação em Glutaraldeído 3% em tampão cacodilato 0,2 M pH 7,2	60 dias
Lavagem com tampão cacodilato 0,2 M pH 7,2	4 x 1 hora
Pós-fixação com tetróxido de ósmio 1% em tampão cacodilato 0,2 M pH 7,2	1 hora
Lavagem com tampão cacodilato 0,2 M pH 7,2	2 x 10'
Coloração condutiva com ácido tânico 1%	30'
Lavagem com água bidestilada	2 x 5'
Impregnação com tetróxido de ósmio 1% em tampão cacodilato 0,2 M pH 7,2	30'
Lavagem com água bidestilada	3 x 5'
Desidratação em álcool 50%	2 x 5'
Desidratação em álcool 70%	2 x 5'
Desidratação em álcool 90%	2 x 5'
Desidratação em álcool 100%	3 x 5'
Ponto crítico	-
Colagem nos "stubs"	-
Metalização com ouro	-
Análise e documentação fotográfica ao microscópio eletrônico de varredura	-

PROTÓCOLOS DE COLORAÇÃO PARA MICROSCOPIA DE LUZ

HEMATOXILINA DE HARRIS E EOSINA

Fonte: CLARK, 1981

Procedimento	Tempo
Xilol I	(3')
Xilol II	(3')
Alcool 100%	(3')
Alcool 90%	(3')
Alcool 70%	(3')
Lavar com água filtrada e destilada	
Corar com Hematoxilina de Harris	(3')
Lavar com água filtrada e destilada	
Corar com Eosina	(30'')
Lavar com água filtrada e destilada	
Alcool 95%	(3')
Alcool 100% I	(3')
Alcool 100% II	(3')
Alcool 100% + xilol 1:1	(3')
Xilol diafanizador	(3')
Xilol montagem	(3')
montagem com resina Polymont	

NOVELLI

Fonte: modificado a partir de BEČAK E VANRELL, 1970

Procedimento	Tempo
Xilol I	(3')
Xilol II	(3')
Alcool 100%	(3')
Alcool 90%	(3')
Alcool 70%	(3')
Lavar com água filtrada e destilada	
HCl IN a 60° C (na estufa)	(3')
Lavar com água filtrada e destilada	
Corar com Fucsina Ácida	(30'')
Lavar com água filtrada e destilada	
Contraste com verde luz 2%	(3')
Alcool 95%	(3')
Alcool 100% I	(3')
Alcool 100% II	(3')
Alcool 100% + xilol 1:1	(3')
Xilol diafanizador	(3')
Xilol montagem	(3')
montagem com resina Polymont	

ALCIAN YELLOW

Fonte: modificado a partir de CULLING et al., 1985

Procedimento	Tempo
Xilol I	(3')
Xilol II	(3')
Alcool 100%	(3')
Alcool 90%	(3')
Alcool 70%	(3')
Lavar com água filtrada e destilada	
Corar com Alcian Yellow	(20')
Lavar com água filtrada e destilada	
Alcool 95%	(3')
Alcool 100% I	(3')
Alcool 100% II	(3')
Alcool 100% + xilol 1:1	(3')
Xilol diafanizador	(3')
Xilol montagem	(3')
montagem com resina Polymont	

ALCIAN BLUE pH 2,5

Fonte: CLARK, 1981

Procedimento	Tempo
Xilol I	(3')
Xilol II	(3')
Alcool 100%	(3')
Alcool 90%	(3')
Alcool 70%	(3')
Lavar com água filtrada e destilada	
Ácido Acético a 3%	(3')
Corar com Alcian Blue pH 2,5	(15 a 20')
Lavar com água filtrada e destilada	
Contracorar com Orange G	(3')
Lavar com água filtrada e destilada	
Alcool 95%	(3')
Alcool 100% I	(3')
Alcool 100% II	(3')
Alcool 100% + xilol 1:1	(3')
Xilol diafanizador	(3')
Xilol montagem	(3')
montagem com resina Polymont	

ALCIAN BLUE pH 0,5

Fonte: CLARK, 1981

Procedimento	Tempo
Xilol I	(3')
Xilol II	(3')
Alcool 100%	(3')
Alcool 90%	(3')
Alcool 70%	(3')
Lavar com água filtrada e destilada	
Acido clorídrico 1 N	(3')
Corar com Alcian Blue pH 0,5	(15 a 20')
Lavar com água filtrada e destilada	
Contracorar com Orange G	(3')
Lavar com água filtrada e destilada	
Alcool 95%	(3')
Alcool 100% I	(3')
Alcool 100% II	(3')
Alcool 100% + xilol 1:1	(3')
Xilol diafanizador	(3')
Xilol montagem	(3')
montagem com resina Polymont	

P.A.S. (Periodic Acid-Schiff)

Fonte: CLARK, 1981

Procedimento	Tempo
Xilol I	(3')
Xilol II	(3')
Alcool 100%	(3')
Alcool 90%	(3')
Alcool 70%	(3')
Lavar com água filtrada e destilada	
Acido Periódico 0,5%	(5')
Lavar com água filtrada e destilada	
Enxugar a lâmina com papel filtro	
Corar com Reativo de Schiff	(30')
Lavagem em água sulfurosa (3 banhos)	(3 x 5')
Lavar com água filtrada (Becker) e destilada (pisseti)	
Contracorar com Verde Luz (pode ser Orange G)	(3')
Lavar com água filtrada (Becker) e destilada (pisseti)	
Alcool 95%	(3')
Alcool 100% I	(3')
Alcool 100% II	(3')
Alcool 100% + xilol 1:1	(3')
Xilol diafanizador	(3')
Xilol montagem	(3')
montagem com resina Polymont	

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALEXANDER, R. M. **Functional design in fishes**. London: Hutchinson Univ. Lib. p.89 - 114, 1970.
- ALLEN, A. Structure and function os gastrointestinal mucus. In: **PHYSIOLOGY Gastrointestinal Tract**. Cap.21, 1981.
- ALTMANN, G. G. Renewal of the intestinal epithelium: new aspects as indicates by recent ultrastructural observations. **J. Electron Microsc. Tech.**, 16:2-14, 1990.
- BAIEY , R. M.; SMITH, G. R. Origin and geography of the fish fauna of the Laurentian Great Lakes basin. **Can. J. Fish. Aquat. Sci.**, Ottawa, 38:15391561, 1981.
- BARLETTA, M. & CORRÊA, M. F. M. **Guia para a identificação de peixes da costa do Brasil**. Curitiba: Ed. Universidade Federal do Paraná, 1992. 131p.
- BEÇAK, W. Y. & VANRELL, J. P. **Técnicas de citologia e histologia**. São Paulo, Nobel, 1970. 470p.
- BETTEX-GALAND, M. & HUGHES, G. M. **Contractile filamentous material in the pillacells of fish gills**. *Cell Sci.*, Cambridge, 13:359-370, 1973.
- BOYD, R. D.; DeVRIES, A. L.; EASTMAN, J. T.; PIETRA, G. G. **The secondary lamellae of the gills of cold water (high latitude) teleosts. A comparative light and eletron microscopy study**. *Cell Tissue Res.*, Heideiberg, 213:361-367, 1980.
- CARVALHO, F. M. Alimentação do maparé (*Hypophthalmus edentatus* Spix, 1829) do lago do Castanho, Amazonas (Siluriformes, Hypophthalmidae). **Acta Amazonica**, Manaus, 10(3):545-555, 1980.

- CHERVINSKI, J. Salinity tolerance of guppy *Poecilia reticulata* Peters. **J. Fish. Biol.**, **24**: 449-52, 1984.
- CLARK, G. [Ed]. **Staining produceres.** 4 Ed. Baltimore: The willians & Wilkins Company, 1981. 512p.
- COPELAND, D.E. The cytological basis of chloride tranfer in the gills os *Fundulus heteroclitus*. **J. Morphol.** , **82**: 201-28, 1948.
- COPELAND, D.E. Adaptative behavior of the chloride cell in the gills of the *Fundulus heteroclitus*. **J. Morphol.** , **87**: 369-79, 1950.
- COUGHLAN, D. J. & GLOOS, S. P. Early morphological developmente of gills in smallmouth bass (*Micropterus dolomieu*). **Can. J. Zool.** **62**:951-958, 1984.
- CULLING, C. F. A.; ALILISON, R. T.; BARR, W. T. 4 ed. **Cellular Pathology Tecnique.** London: Butterworth & Co. , 1985.
- DAS, S. & SRIVASTAVA, G. J. Responses of gill to various changes in salinity in freshwater teleost *C. fasciatus* (Bl and Schn) z. **Mikrosk. Anat. Forsch.**, **92**: 770-80, 1978.
- DATTA-MUNSHI, J. S. & HUGHES, G. M. Scanning eletron microscopy of the respiratory organs of juvenile and adult climbing perch, *Anabas testudineus*. **Japanese Journal of Ichthyology.** **33(1)**:39-45, 1986.
- DELBEEK, J. C. & WILLIAMS, D. D. Morphological differences among females of four species of stickleback (Gasterosteidae) from New Brunswick and their possible ecological significance. **Can. J. Zool.**, Ottawa, **65**:289-295, 1987.
- DOYLE, W. & EPSTEIN, F. H. Effects of cortisol treatment and osmotic adaptation in the chloride cells in the eel *Anguilla rostrata*. **Cytobiologie**, **6**:58-73, 1972

- DOYLE, W. L. & GOREKY, D. The so-called chloride cell of the fish gill. **Physiol. Zool.**, **34**: 81 - 85, 1961.
- DUNEL-ERB, S. & LAURENT, P. Ultrastructure of marine teleost gill epithelia: SEM and TEM study of the chloride cell apical membrane. **J. Morphol.**, **165**: 175-186, 1980.
- EIRAS-STOFFELLA, D. R. Variabilidade morfológica da região faríngea dos arcos branquiais de algumas espécies de peixes (teleostei), estudada através de microscopia eletrônica de varredura. Tese (Doutorado) Universidade Federal do Paraná. Curitiba, 1994. 125p.
- EPSTEIN, F. H.; SILVA P; KORMANICK, G. Role of Na-K-ATPase in chloride cell function. **Am. J. Physiol.**, **238**: R246-250, 1980.
- EVANS, D. H. Kinetic studies of ion transport by fish gills. **Am. J. Physiol.** **238**:224-230, 1980.
- EVANS, D. H & CAMERON, J. N. Gill ammonia transport. **Journal of Experimental Zoology**, **239**:17-23, 1986
- EVANS, D. H.; CLAIRBONE, J. B.; FARMER, L.; MALLERY, C.; KRASNY E. J. Fish gill ionic tranporte: methods and models. **Biol. Bull.** **163**:108-130, 1982.
- FLIK G. & VERBOST, P.M. Calcium transport in fish gills and intestine. **J. Exp. Biol.**, **184**:17 - 29, 1993.
- FOLLE, N. M. T. Histopatologia dos efeitos da interação de mercúrio inorgânico e água acidificada em níveis subletais no peixes *Metynnis roosevelti* (Eigenmann, 1915). Tese (Mestrado) Universidade Federal do Paraná. Curitiba, 1997. 125p.

- FRANKLIN, C.E. Surface ultrastructural changes in the gills of sockeye salmon (Teleostei: *Oncorhynchus nerka*) during seawater transfer. Comparison of successful and unsuccessful seawater adaptation. **J. Morphol.**, **206**:13-23, 1990.
- GALAT, D. L.; POST, G.; KEEFE, T. J.; BOUCK, G. R. Histological changes in the gill, kidney and liver of Lahontan cutthroat trout, *Salmo clarki henshawi*, living in lakes of different salinity-alkalinity. **J. Fish. Biol.**, **27**:533-52, 1985.
- GALBRAITH Jr., M. G. Size-selective predation on *Daphnia* by Rainbow trout and Yellow perch. **Trans. Am. Fish. Soc.**, Bethesda, **96(1)**:1-10, 1967.
- GEEVARGHESE, C. Morphology of the alimentary tract in relation to diet among gobioid fishes. **J. Nat. Hist.**, London, **17**:731-741, 1983.
- GLAUERT, A. M. [Ed]. **Practical methods in electron microscopy**. 4 ed. V. 5, part I, New York: Elsevier Biomedical Press, 1986. 311p.
- GOLDSTEIN, L. Gill nitrogen excretion. In: HOULIHAN, D. F.; RANKIN, J. C. ; SHUTTLEWORTH, T. J. **Gills**. Cambridge University Press, p. 193-206, 1982.
- GONZALEZ, R. J. & McDONALD, D. G. The relationship between oxygen consumption and ion loss in a freshwater fish. **J. Exp. Biol.**, **163**:317-332, 1992.
- GOSS, G. G.; PERRY, S. F.; WOOD, C. M.; LAURENT, P. Mechanisms of ion and acid-base regulation at the gills of freshwater. **Journal of Experimental Zoology.**, **263**: 143-159, 1992.
- GRAY, I. E. Comparative study of the gill area of marine fishes. **Biol. Bull.**, **107**:219-255, 1954.
- GREENWOOD, P. H. **A history of fishes**. 3 ed. London, Ernest Benn Ltda, 1975.

- HARRIS, J. E. & HUNT, S. Epithelial mucins of the atlantic salmon, *Salmo salar* L. **Trans, Biochem. Soc.**, 1:153-155, 1973.
- HESSEN, D. O.; ANDERSEN R.; HINDAR, K.; SKURDAL, J. Food selection competition in salmonids as reflected by gill raker number and morphology. **J. Appl. Ichthyol.**, Berlin, 4(3):121-129, 1988.
- HOOSLER, F. E.; RUBY, J. R.; McWIWAIN, T. D. The gill arch of the mullet, *Mugil cephalus*. I. Surface ultrastructure. **J. Exp. Zool.**, 208: 379-398, 1979 a
- HOOSLER, F. E.; RUBY, J. R.; McWIWAIN, T. D. The gill arch of the mullet, *Mugil cephalus*. II. Modification in surface ultrastructure and Na-K-ATPase content during adaptation to various salinities. **J. Exp. Zool.**, 208: 39-406, 1979 b
- HOOSLER, F. E. Gill arch of the mullet, *Mugil cephalus*. III. Rate of response to salinity change. **Am. J. Physiol.** 238:160-164, 1980;
- HOOSLER, F. E. & MARCHANT, L. H. Morphology os taste buds on the gill arches of de mullet, *Mugil cephalus*, and the *Fundulus heteroclitus*. **Am. J. Anat.**, 166: 299-312, 1983;
- HOOSLER , F. E.; MUSIL G.; KARNAKY, K. J.; EPSTEIN, F. H. Surface ultrastructure of the gill arch of the killifish, *Fundulus heteroclitus*, from seawater, with special reference to the morphology of apical cripts of chloride cells. **J. Morphol.**, 185: 377-386, 1985.
- HOOSLER, F. E.; HARPOLE, Jr., J. H.; KING, J. A. The gill arch of the striped bass *Morone saxatilis*. I. Surface ultrastructure. **J. Submicrosc. Cytol.**, Bologna, 18(3): 519-528, 1986
- HOOTMAN S. R. & PHILPOTT, C. W. Rapid isolation of chloride cells from pinfish gill. **Anat. Rec.**, 190: 687-702, 1978.

- HOOTMAN S. R. & PHILPOTT, C. W. Ultracitochemical localization of Na⁺, K⁺ - activated ATPase in chloride cells from the gills of a eurihaline teleost. **Anat. Rec.**, **190**: 687-702, 1979.
- HOURIGAN , T. F.; STANTON, F. G.; MOTTA, P. J.; KELLEY, C. D.; CARLSON, B. The feeding ecology of three species of Caribbean angelfishes (family Pomacanthidae). **Enviromental biology of Fishes.** **24(2)**:105-166, 1989.
- HUGHES, G. M. Species variation in gas excahnge. **Proc. R. Soc. Med.** London, **59(6)**: 494-500, jun. 1966.
- HUGHES, G. M. The dimension of fish gills in relation to their function. **Exp. Biol.**, Cambridge, **45**:177-195, mar, 1966 a.
- HUGHES, G. M. Scanning eletron microscopy of the respiratory surface of trut gills. **J. Zool.**, **188**:443-453, 1979.
- HUGHES, G. M. Fish gill - past, present & futures. **Biol. Bull. India, Bhagalrur**, **3(2)**: 69-87, 1981.
- HUGHES, G. M. General anatomy of the gills. In: HOAR, WS.; RANDAL, D. J. **Fish Physiology** . v XA, Orlando: Academic Press Inc., 1984.
- HUGHES G. M.; BELAUD, A; PEYRAUD, C.; ADCOCK , P. J. A comparasion of two methods for mensurament of O₂ contente of small (20µl) samples of fish blood. **Exp. Biol.**, Cambridge, **96**:417-420, 1982.
- HUGHES, G. M. & BYCZKOWSKA-SMKY, W. Ultrastrucyture of the secondary lamella of the icefish, *Chaenocephalus aceratus*. **J. Zool.**, London, **174**:79-87, 1974.

- HUGHES, G. M. & DATTA-MUNSHI, J. S. Scanning electron microscopy of the respiratory surface of *Saccobranchus* (= *Heteropneustes*) *fossilis* (Bloch). **Cell. Tiss. Res.**, Heidelberg, **195**:99-109, 1978.
- HUGHES, G. M. & GRIMSTONE, A. V. The fine structure of the secondary lamellae of gills of *Gadus pollachius*. **Quart. J. Micros. Sci.**, **106**(4):343-353, 1965.
- HUGHES, G. M. & WRIGHT, D. E. A comparative study of ultrastructural of the water pathway in the secondary lamellae of teleost and elasmobranch fishes benthic forms. **Z. Zellforsch. Mikrosk. Anat.**, **104**: 478-493, 1970.
- HUGHES G. M. & MONDOLFINO, R. M. Scanning electron microscopy of the gills of *Trachurus mediterraneus*. **Experimentia**, **39**:443-453, 1983.
- HUGHES G. M. & UMEZAWA, S. I. Gill structures of the yellowtail and frogfish. **Jpn. Ichthyol.**, Tokyo, **30**(2):176-186, 1983.
- IWAI, T. Taste buds on the gill rakers and gill arches of the Sea Catfish *Plotosus anguillaris* (Lacépède). **Copeia**, Carbondale, **1963**(2):271-274, 1963.
- KARLSSON L. Gill morphology in the zebrafish, *Brachydanio rerio* (Hamilton-Buchanan). **J. Fish Biol.** **23**: 511-524, 1983.
- KARNAKY, K. J. Jr. Ion-secreting epithelia: chloride cells in the head region of *Fundulus heteroclitus*. **Am. J. Physiol.**, **199**: R 185-R198, 1980.
- KARNAKY, K. J. Jr. Structure and function of the chloride cell of *Fundulus heteroclitus* and other teleosts. **Am. Zool.** **26**: 209-24, 1986.
- KARNAKY, K. J.; ERNEST, S.A; PHILPOTT, C.W. Teleost chloride cell. I. Response of pupfish *Cyprinodon variegatus* Na, K-ATPase chloride cell fine structure to various high salinity environments. **J. Cell Biol.**, **70**: 144-56, 1976.

- KARNAKY K. J. & KINTER, W. B. Killfish opercular skin: a flat epithelium with a high density of chloride cells. **J. Exp. Zool.**, **199**: 355-64, 1977.
- KENDAL, H. G. & DALE, J. E. Scanning and transmission electron microscopic observations of rainbow trout (*Salmo gairdneri*) gill. **J. Fish. Res. Board. Can.**, **36**: 1071-1079, 1979.
- KESSEL, R. G. & BEAMS, H. W. Na electron microscopy studies on the mitochondria-rich "chloride cells" from the gill filaments of freshwater and seawater-adapted *Fundulus heteroclitus*. **Biol. Bull.**, **119**: 322, 1960.
- KESSEL, R. G. & BEAMS, H. W. Electron microscope studies on the gill filaments of *Fundulos heteroclitus* from sea water and fresh water with special reference to the ultrastructural organization of the "chloride cell". **J. Ultrastruct. Res.**, **6**: 77-87, 1962.
- KEYS, A. B. & WILMER, E. N. "Choloride-secreting cells" in the gills of fish with special references to the commum ell. **J. Physiol. London**, **76**: 368-78, 1932.
- KIKUCHI, S. Mitochondria-rich (chloride) cells in the gill epithelia from four species of stenoahline freshwater teleosts. **Cell Tissue Res.**, **180**: 87-98, 1977.
- KING, J. A. C. & HOOSLER, F. E. The gill arch of the striped bass, *Morone saxatilis*. III. Morphology of the basal lamina arevealed by varius ultrasonic microdissection procedures. **J. Submicrosc.**, **20(2)**: 371-377, 1988.
- KLIEWER, E. V. Gill-raker variation and diet in lake whitefish, *Coregonus clupeaformis* in NortherManitoba. In: LINDSEY, C. C.; WOODS, C.S [Eds] **Biology of Coregonid Fishes**. Winnipeg: Univ. of Manitoba Press, p. 165-197, 1970.
- KOHN, A. & FERNANDES, B. M. M. Estudo comparativo dos helmintos parasitos de peixes do rio Mogi Guassu, coletados nas excursões realizadas entre 1927 e 1985. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, **82(4)**:483-500, 1987.

- LAGLER, K. A; BARDACH, J. E.; MILLER, R. R. & PASSINO, D. R. M. **Ichthyology**.
Johnwiley & Sons., p. 506, 1977.
- LANGERLAND, A; NOST, T. Gill raker structure and selective predation on plankton
by particulate feeding fish. **Journal of Fish Biology**., **47**:719-732, 1995.
- LAURENT, P. Structure of the vertebrate gills. In: HOULIHAN, D. F.; RANKIN, J. C.;
SHUTTEWORTH, T. H. (ed) **Gills**. Cambridge University Press, 1982.
- LAURENT, P. Gill internal morphology .In: HOAR, W. S. ; RANDALL, O J. **Fish
physiology**. v. 10 A . Academic Press Inc., 1984.
- LAURENT, P. & DUNEL, S. Morphology of gill epithelia in fish. **Am. J. Physiol.**,
238:147-159, 1980.
- LAURENT, P.; HOBE, H.; DUNEL-EB, S. The role of environmental sodium chloride
relative to calcium in gill morphology of freshwater salmonid fish. **Cell Tissue Res.**,
240: 675-95, 1985.
- LAURENT, P. & PERRY, S. F. the effects of cortisol on gill chloride cell morphology and
ionic uptake in the freshwater trout, *Salmo gaidneri*. **Cell Tissue Res.**, **259**: 429-442,
1990.
- LEINO, R. L. & McCORMICK, J. H. Morphological and morphometrical changes in
chloride cells of the gills of *Pimelodus promelas* after chronic exposure to acid water.
Cell Tissue Res.,**236**: 121-8, 1984.
- LEWIS, S. V. & POTTER, I. C. Ascanning electron microscope study of the gills of the
lamprey, *Lamprera fluviatilis* (L). **Micron** **7**:205-211, 1976.

- LEWIS, S. V.; POTTER, I. C. A light and electron microscope study of the gills of larval lampreys (*Geotria australis*) with particular reference to the water-blood pathway. **J. Zool. Lond.**, **198**:157 - 176, 1982.
- LIN, H. ; RANDALL, D. Evidence for the presence of na electrogenic proton pump on the trout gill epithelium. **J. Exp. Biol.**, **161**:119-134, 1991.
- LUVIZOTTO, M. F. Estudo do efeito de diferentes salinidades sobre as células de cloreto e as células caliciformes do epitélio branquial do peixe antártico *Nothotheniops nudifons* (Lönnberg, 1905). Tese (Mestrado) Universidade Federal do Paraná. Curitiba, 1994. 88p.
- MACHADO, M. R. Efeitos do organofosforado paration metílico na morfologia e ultraestrutura branquial do pacu *metynnis roosevelti* Eigenmann, 1915, e suas implicações ecotoxicológicas. Tese (Mestrado) Universidade Federal do Paraná. Curitiba, 1995. 74p.
- MACHADO, M & FANTA, E. Descrição histológica e ultraestrutural da brânquia do pacu prata *Metynnis roosevelti* Eigenmann, 1915. II Semana sobre Histologia de Peixes (17 - 21/7/1995). Jaboticabal (Brasil). Resumos: 96.
- MAETZ, J. & BORNANCIN, M. Biochemical and biophysical aspectes of salt excretion by chloride cells in teleosts. **Forsch. Zool.**, **23**:322-62, 1975.
- MAFLATT, J. - Fish gill structural changes induced by toxicants and other irritants: a statistical rewiew. **Can. J. Fish. Aquat. Sci.**, v.42, 1985.
- MAGNUSON, J.J.; HEITZ, J. G. Gill raker apparatus and food selective among mackerels, tunas and dolphins. **Fish. Bull.**, **62(2)**:361-370, 1971.
- MAINA, J. N. A Study of the morphology of the gills of an extreme alkalinity and hyperosmotic adaptec teleost *Oreochromis alcalicus grahami* (Boulenger) with

- particular emphasis on the ultrastructure of the chloride cells and their modifications with water dilution. A SEM and TEM study. **Anat. Embryol.**, **181**:83 -98, 1990.
- MALLAT, J. Fish structural changes induced by toxicants and others irritants: a statistical review. **Can. J. Fish Aquat. Sci.**, **42**: 630 - 47, 1985.
- MARTINS, M. A. B. Plâncton - Generalidades e sua importância na alimentação dos peixes In: **Poluição e Piscicultura**, C.I.B.P.U., p. 196-206, 1970.
- McDONALD, D. G.; CAVEDK, V. ; ELLIS, R. Gill desing in freshwater fishes: interrelationships among gas exchange, ion regulation, and acid-base regulation. **Physiological Zoology**, **64 (1)**:103 -123, 1991.
- METCALFE, J. D.; BUTLER, P. J. The funcional anatomy of the gills of the dogfish (*Scyliorhinus canicula*). **J. Zool. Lond (A)**., **208**:519 - 530,1986.
- MEZA, M.S.C.; BONILLA, F.L.; HERRERA, A. E. Desarrollo morfométrico del primer arco branquial de la macarela del Pacífico *Scomber japonicus* (Houttuyn) y sus implicaciones ecológicas. **Invest. Mar. CICIMAR**, La Paz, **13(1)**:39 -44, 1993.
- MORAIS FILHO, M. B. & SCHUBART, O. **Contribuição ao estudo do dourado (Salminus maxillosus Val.) do Rio Mogi Guassu (Pisces, Characidae)**. São Paulo, Min. Agric. Div. Caça e Pesca, 1955. 131p.
- MORGAN, M. & TOVEL, P. W. A. The structure of the gill of the trout, *Salmo gaidneri* (Richardson). **Z. Zellforsch.**, **142**:147-162, 1973.
- MUNSHI, J. S. D. Accessory respiratory organs of *Anabas testudines* (Block) (Anabantidae, Pisces). **Procc. Linn. Soc. Lond.**, Lodom, **179**:107 - 130, 1968.
- MUNSHI, J.S.D.; OHJA, J.; GHOSH, T.K.; ROY, P.K.; MISHRA, A K. Scanning Electron Microscopic Observations on the Structure of Gill-rakres of some freshwater

- Teleostean Fishes. **Proc. Indian Natl. Sci. Acad.**, New Delhi , **B50(6):549 -554**, 1984.
- NELSON, J. S. **Fishes of the world**. 2 ed. New York, John Wiley & Sons, 1984. 253p.
- NETO, J. C. F. Arco branquial de *Mugil platamus*: caracterização da ultraestrutura superficial e estudo sobre a variação do poro de células de cloro, frente a diferentes salinidades. Tese (Mestrado) Universidade Federal do Paraná. Curitiba, 1995. 85p.
- NEWSTEAD, J. D. Fine structure of the respiratory lamellae of teleostean gills. **Z. Zellforsch.**, **179:396-428**, 1967.
- OBERG, K. E. The reversatility of the respiratory inhibition in gills and the structural changes in chloride cells from the rotenone-oisoned marine teleost, *Gadus callarias* L. **Exp. Cell Res.**, **45:590-602**, 1967.
- OJHA, J.; MISHRA, A . K.; MUNSHI, J.S.D. Interspecific variations in the surface ultrastructure of the gills of freshwater mullets. **Japan. J. Ichthyol.**, Tokyo, **33(4): 388-392**, 1987.
- OHJA, J.; ROOJ, N. C. ; MITTAL, A. K.; DATTA MUNSHI, J. S. Light and scanning electron microscopic studies in the effect of bioxidial plant sap on the gill of a hill stream fish, *Gana lamta* (Ham). **J. Fish Biol.**, **34: 165 -70**, 1989.
- OLSON, K.R. & FROMM, P.O . A scanning electron microscopic study of secondary lamellae and chloride cells of rainbow trout (*Salmo gairdneri*). **Z. Zellforsch.**, **143:439-49**, 1973.
- PERERA, K. M. L. Ultrastructural of the primary gill lamellae of *Scomber australasicus*. **J. Fish Biol.**, **43:45-49**, 1993.

- PEEK W.D. & YOUSON, J. H. Ultrastructure of chloride cells in young adults of the anadromous sea lamprey, *petromyzon marinus* (L), in freshwater and during adaptation to sea water. **J. Morphol.**, **160**:143-64, 1979.
- PHILPOTT, C. W. Halide localization in the teleost chloride cell and its identification by selected area electron diffraction. Direct evidence supporting an osmoregulatory function for the sea water adapted chloride cell of *Fundulus*. **Protoplasma**, **60**:7-23, 1965.
- PHILPOTT, C. W. & COPELAND, D. E. Fine structure of the chloride cells from three species of *Fundulus*. **J. Cell Biol.**, **18**:389-404, 1963.
- PISAM, M. Membrane system in the "chloride cell" of teleostean fish environment. **Anat. Rec.**, **200**:401-14, 1981.
- PISAM, M.; SARDET, C. MAETZ, J. Polysaccharidic material in chloride cell of teleostean gill: modifications according to salinity. **Am. J. Physiol.**, **238**:213-8, 1980.
- POUGH, F. H.; HEISER, J. B.; McFARLAND, W. N. **A vida dos vertebrados**. São Paulo, Atheneu, 1993. 839p.
- PREIN, M. & KUNZMANN, A. Structural organization of the gills in pipefish (Teleostei, Syngnathidae). **Zoomorphology.**, **107**:161-8, 1987.
- RAJBANSHI, V. K. The architecture of the gill surface of the catfish, *Heteropneus fossilis* (Block): SEM study. **J. Fish. Biol.**, **10**:325-329, 1977.
- REITE, O. B.; MALOIY, G. M. O.; ASSEHAUG, B. pH salinity and temperature tolerance of lake magadi Tilapia. **Nature**, **247(5439)**:315, 1974.
- RINGUELET, R. A.; ARAMBURU, R. A.; ARAMBURU, A. A. **Los peces de agua dulce**. Buenos Aires, La Plata: Comisión de Investigación Científica, 1967.

- RIOS, F. S. Ecomorfologia do aparato branquial faríngeo do peixe antártico *Notothenia neglecta* Nybelin (1951) em relação ao hábito alimentar. Tese (Mestrado) Universidade Federal do Paraná. Curitiba, 1997. 127p.
- ROBERTS, R. J. **Patologia de los Peces**. Madri: Mundi-Prensa, 1981. 366p.
- ROMER, A. S. & PARSONS, T. S. **Anatomia comparada dos vertebrados**. São Paulo, Atheneu, 1985.
- ROY, D. Statistical analysis of amonic detergent-induced changes in the globet mucous cells of opercular epidermis and gill epithelium of *Rita rita* (Ham) (Bagridae - Pisces). **Ecotoxicol. Environ. Safety**, **15**:260-71, 1988.
- SABÓIA-MORAIS, S. M. T. Comportamento ambiental do epitélio secretor e de revestimento das brânquias de um teleósteo eurialino (*Poecilia vivipara* - Pisces - Poeciliidae) submetido a variações de salinidade. Análise histológica, histoquímica, histométrica e ao microscópio eletrônico de varredura. Tese (Mestrado) Universidade de São Paulo. São Paulo, 1992. 149p.
- SARDETT, C. Ordered arrays of intermembranae particles on surface of fish gills. **J. Cell Bioll. Int. Rep.**, **1**:409-18, 1977.
- SARDET, C.; PISAM, M. & MAETZ, J. The surface epithelium of teleostean fish gills. Celular and junctional adaptation of the chloride cell in relation to salt adaptation. **J. Cell. Biol.**, **80**:96-117, 1979.
- SAYER, M. D. J. & DAVENPORT, J. The relative importance of the gills to ammonia and urea excretion in five seawater and freshwater teleost species. **J. Fish Biol.**, **31**:561-70, 1987.
- SCHMIDT-NIELSEN, K. **Animal Physiology - adaptation and environment**. 4 ed. Cambridge, Univ. Press, 1990. 602p.

- SCHMIDT-NIELSEN, K. **Fisiologia Animal - Adaptação e Meio Ambiente.** 5 ed. São Paulo, Santos, 1996. 600p.
- SHIRAI, N & UTIDA,, S. Development and degeneration of the chloride cells during freshwater adaptation of the japanese eel *Anguilla japonica*. **Z. Zellforsch.**,**103**:247-64, 1970.
- SMITH, D. W. The feeding selectivity of silver carp, *Hypophthalmichthys molitrix* Val. **J. Fish Biol.**, London, **34**:819-828, 1989.
- STEEDMAN, H. F. **Section cutting in microscopy.** Springfield, Charles C. Thomas Publisher, 1960.
- STRAUS, L. P. A study of the fine structure of the so-called chloride cell in gill of the guppy *Lebistes reticulatus*. **Physiol. Zool.**, **36**(3):183-198, 1963.
- STRAUS, L. P. & DOYLE, W. L. Fine structure of the so-called chloride cells of the gill guppy, *Lebistes reticulatus*. **Physiol. Zool.**, **36**:183-198, 1961.
- THREADGOLD, L. T. & HOUSTON, A. H. Mitochondriogenesis in intertegumentary cells of the larval sardine *Sardinops caerulea*. **J. Ultrastruct. Res.**, **19**:238-249, 1964.
- TOVEL, P. W.; MORGAN, M.; HUGHES, G. M. **Ultrastructure of the trout gills.** Septime Congrès International de Microscopie Électronique, Grenoble, 1970.
- VERBOST, P. M.; SCHOENMAKERS, T. J. M.; FLICK, G.; WENDELAAR BONGA, S. E. Kinetics of ATP na Na⁺ gradient driven Ca⁺² transport in basolateral membranes from gills of freshwater and seawater adaptes tilapia. **J. Exp. Biol.**, **186**:95-108, 1994.

VICKERS, T. A study of the so-called "chloride secretory" cells of the gill of the teleost.
Q. H. Microsc. Sci., **104**:507-18, 1961.

ZACCONE, G. Effect of osmotic stress on the chloride and mucous cells in the epithelium of freshwater teleost *Barbus filamentosus* (Cyprinodontiformis - Pisces). A structural and histochemical study. **Acta Histochem.**, **68**:147-59, 1981.