

FABIO CARNEIRO STERZELECKI

Como o peixe eurihalino *Bathygobius soporator* lida com as alterações de salinidade ambiental: um estudo morfo-funcional do fígado.

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

ORIENTADORA: Dra. Edith Susana Elisabeth Fanta.

**CURITIBA
2006**

AGRADECIMENTOS

Desde meu ingresso na Universidade Federal do Paraná venho recebendo apoio e ajuda de diversos professores, funcionários, amigos, e familiares.

Aos meus pais agradeço a liberdade e a compreensão por não somente terem me deixado ao longo de minha vida escolher o meu futuro, como também por terem sido meus primeiros orientadores, formando a base do que sou hoje. Não podendo também esquecer a ajuda financeira, que sem essa não seria possível a minha formação no curso.

Aos funcionários, que sempre bem dispostos me recebiam e me instruíram para os funcionamentos e regulamentos dessa instituição.

Aos amigos que na alegria e nos diversos trabalhos sempre estiveram ao meu lado, e que me ensinaram bastante em conversas informais no centro acadêmico sobre suas diferentes atuações na área de Biologia.

Aos professores Lucélia, Marco, Ciro, Silvia, Célia e muitos outros que suportaram minhas insistentes visitas para me darem auxílio as minhas dúvidas técnicas e teóricas na extensa área de Biologia Celular.

A minha orientadora Edith Fanta, que acreditou em meu trabalho e me aceitou em seu grupo de pesquisa, proporcionando-me experiências e pesquisas de nível internacional.

E finalmente, à minha pikinik, que sempre acreditou em minha pessoa e ajudou-me a crescer, seja na vida pessoal, seja na vida profissional. Agradeço aquele que te pôs em meu caminho e que me deu esse grande sentimento que sinto por ti. Amo-te minha nanica.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	iv
RESUMO	vi
1 INTRODUÇÃO	1
2 OBJETIVOS	7
3 MATERIAL E MÉTODOS	8
3.1 MODELO BIOLÓGICO	8
3.2 LOCAL DE ESTUDO	8
3.3 COLETA DO MATERIAL BIOLÓGICO	10
3.4 ACLIMATAÇÃO E EXPERIMENTO	10
3.5 MICROSCOPIA ÓTICA	11
3.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA	13
4 RESULTADOS	14
4.1 SALINIDADE DE 34ppt	14
4.2 SALINIDADE DE 17ppt	16
4.3 SALINIDADE DE 06ppt	18
4.4 SALINIDADE DE 00ppt	20
5 DISCUSSÃO	26
6 CONCLUSÃO	31
REFERÊNCIAS	32

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - <i>Bathygobius soporator</i> (TASSEL, 2000) EM VISTA LATERAL. -----	8
FIGURA 2 - IMAGEM DE SATÉLITE DA BAÍA DE GUARATUBA. -----	9
FIGURA 3 - MANGUEZAL NA MARÉ BAIXA ONDE FORAM OBTIDOS EXEMPLARES DE MARIA-DA-TOCA. -----	10
FIGURA 4 - ESQUEMA REPRESENTATIVO DO PROCESSO DE EXPERIMENTAÇÃO-----	11
FIGURA 5 - ESQUEMA EXPLICATIVO DO PROCEDIMENTO LABORATORIAL. -----	12
FIGURA 6 - FÍGADO DE <i>Bathygobius soporator</i> . SALINIDADE 34% -----	14
FIGURA 7 - COMPARAÇÃO DA ÁREA DO NÚCLEO, ÁREA DE VACUOLIZAÇÃO E ÁREA DA CÉLULA ENTRE OS DIFERENTES TEMPOS NA CONCENTRAÇÃO DE 34ppt. -----	15
FIGURA 8 - SALINIDADE 17ppt -----	16
FIGURA 9- COMPARAÇÃO DA ÁREA DO NÚCLEO DOS HEPATÓCITOS DE <i>B. SOPORATOR</i> , DE VACUOLIZAÇÃO E DA CÉLULA ENTRE OS DIFERENTES TEMPOS DA SALINIDADE 17ppt. -----	17
FIGURA 10 - EXPERIMENTO COM CONCENTRAÇÃO DE 6ppt. -----	18
FIGURA 11- COMPARAÇÃO DA ÁREA DO NÚCLEO, DE VACUOLIZAÇÃO E DA CÉLULA ENTRE OS DIFERENTES TEMPOS DA SALINIDADE 06ppt -----	19
FIGURA 12 - TESTE DE SALINIDADE DE CONCENTRAÇÃO 0ppt. -----	20
FIGURA 13 - COMPARAÇÃO DA ÁREA DO NÚCLEO, DE VACUOLIZAÇÃO E DA CÉLULA ENTRE OS DIFERENTES TEMPOS DA SALINIDADE 0ppt. -----	21
FIGURA 14 - COMPARAÇÃO DA ÁREA DO NÚCLEO, DE VACUOLIZAÇÃO E DA CÉLULA ENTRE AS DIFERENTES SALINIDADES NO TEMPO DE DOZE HORAS. -----	22
FIGURA 15 - COMPARAÇÃO DA ÁREA DO NÚCLEO, DE VACUOLIZAÇÃO E DA CÉLULA ENTRE AS DIFERENTES SALINIDADES NO TEMPO DE VINTE E QUATRO HORAS. -----	23
FIGURA 16 - COMPARAÇÃO DA ÁREA DO NÚCLEO, DE VACUOLIZAÇÃO E DA CÉLULA ENTRE AS DIFERENTES SALINIDADES NO TEMPO DE QUARENTA E OITO HORAS. -----	24

FIGURA 17 - COMPARAÇÃO DA ÁREA DO NÚCLEO, DE VACUOLIZAÇÃO E DA CÉLULA ENTRE AS DIFERENTES SALINIDADES NO TEMPO DE NOVENTA E SEIS HORAS. -----25

FIGURA 18 - NÚMERO TOTAL DE INDIVÍDUOS QUE APRESENTARAM ALTERAÇÕES NAS DIFERENTES SALINIDADES DE UM TOTAL DE 27 DE INDIVÍDUOS PARA CADA CONCENTRAÇÃO. -----28

RESUMO

Os estuários são regiões formadas por água salobra, ou seja, sujeitas tanto à água doce dos rios quanto às marés do mar. Essas áreas, nas quais a salinidade pode variar rapidamente, estão entre os ecossistemas mais produtivos do planeta. Foram verificadas as respostas morfológicas do fígado da espécie de *Bathygobius soporator*, um peixe estuarino, sob as diferentes salinidades de 0ppt, 6ppt, 17ppt e 34ppt expostos por 12, 24, 48 e 96 horas. Através da microscopia óptica foi observado que a grande maioria das amostras apresentou um grande depósito de lipídeos. O fato da concentração de 34ppt ter alcançado uma significativa queda de vacuolização nas últimas 48 horas e ter mostrado as maiores frequências de alterações do tecido hepático, como a infiltração leucocitária e a necrose, denota que essa concentração não apresentou a melhor condição de adaptação da espécie. Durante as 96 horas, os hepatócitos dos peixes frente às salinidades 0ppt e 17ppt apresentaram uma estabilidade na variação de vacuolização e também demonstraram as menores porcentagens de alterações, constituindo as salinidades com a melhor adequação para essa espécie. Com o pior resultado apareceu à concentração de 6ppt, na qual as células hepáticas sofreram um aumento significativo de seus vacúolos durante as 96 horas, assim como a segunda maior taxa de alteração histológica. Esse aumento contínuo de sua área vacuolar e celular poderá em longo prazo apresentar uma patologia severa e irreversível.

1. INTRODUÇÃO

Os primeiros sistemas vivos provavelmente surgiram no meio aquoso dos mares profundos, sendo que as regiões rasas teriam sido o local para o princípio da evolução animal. Portanto, não é surpreendente que os organismos vivos atuais estejam intimamente adaptados em nível molecular às propriedades especiais da água (POUGH, 1993; SCHIMIDT-NIELSEN, 1996; CARVALHO FILHO, 1999; RANDALL, 2000).

Mais de dois terços (71%) da superfície terrestre é recoberta por água, sendo a maior parte oceano. No ambiente terrestre, há vida em uma estreita camada, um pouco abaixo e acima da superfície, mas em sua maioria, os animais são marinhos, excetuando-se os insetos. Os organismos não vivem apenas no fundo do mar, mas se distribuem em toda massa de água até as profundidades mais extremas dos oceanos, que podem passar dos 10.000 m (POUGH, 1993; SCHIMIDT-NIELSEN, 1996).

O oceano é contínuo, não separado como os habitats terrestres e de água doce. Todos os oceanos estão interconectados por corredores de água, possuindo biota diferenciada afetada por diferentes fatores como a profundidade, a temperatura, a oxigenação e a salinidade dentre outros (LOWE-MCCONNELL, 1987; ODUM, 1988; RICKLEFS, 1996).

Os corpos de água contêm substâncias dissolvidas, como sais, gases, compostos orgânicos e poluentes. Além da temperatura da água, esses são os fatores de maior importância fisiológica (SCHIMIDT-NIELSEN, 1996).

Os minerais dissolvidos em água doce e água salgada diferem tanto na composição quanto na quantidade (RICKLEFS, 1996). A água do mar contém cerca de 3,5% de sal, ou seja, 35 partes de peso de sal por 1000 partes de água. Os principais íons são sódio e cloreto, com magnésio, enxofre e cálcio presentes em quantidades substanciais. Cerca de 2,7% são de cloreto de sódio e a maior parte do restante consiste em sais de magnésio, de cálcio e de potássio (ODUM, 1988; RICKLEFS, 1996; SCHIMIDT-NIELSEN, 1996). A solubilidade do cloreto de sódio é de 0,36g por grama de água, o que excede de longe a sua concentração na água do mar, sendo assim encontrado dissolvido no oceano (RICKLEFS, 1996).

A concentração total de sal varia segundo a localização geográfica. Em regiões litorâneas, o conteúdo de sal é relativamente mais baixo que em mar aberto. Dependendo da estação do ano ou até mesmo durante o mesmo dia é possível observar repentinas modificações ambientais (SCHIMIDT-NIELSEN, 1996; FANTA, 1997).

Os estuários são regiões formadas por água salobra, ou seja, sujeitas tanto à água doce dos rios quanto à água salgada do mar. Estas áreas, nas quais a salinidade pode variar rapidamente com as marés e o aporte de água dos rios, estão entre os ecossistemas mais produtivos do planeta (LOWE-MCCONNELL, 1987; ODUM, 1988; POUGH, 1993; RICKLEFS, 1996; SCHIMIDT-NIELSEN, 1996; FANTA, 1997; RANDALL, 2000).

É difícil determinar exatamente a partir de que ponto a água do mar torna-se salobra e quando essa, mais diluída, torna-se doce. Como uma definição comumente aceita, pode-se dizer que a água salobra corresponde a uma salinidade entre 3,0 e 0,05‰ (SCHIMIDT-NIELSEN, 1996).

A água salobra é extremamente importante do ponto de vista fisiológico, pois representa uma barreira para a distribuição de muitos animais marinhos, assim como para animais de água doce. Também constitui área de alimentação importante para as larvas e para as distintas fases da vida de muitos peixes e invertebrados, que continuam mais tarde seus ciclos de vida no mar (LOWE-MCCONNELL, R.H. 1987; RICKLEFS, 1996; SCHIMIDT-NIELSEN, 1996).

A estrutura e a fisiologia dos organismos evoluem em resposta às características dos seus ambientes. A sobrevivência de cada indivíduo depende de sua habilidade em lidar com as variações do meio ambiente. As características do meio possibilitam a algumas espécies que estão adaptadas estruturalmente e fisiologicamente viverem em determinadas regiões (RICKLEFS, 1996; FANTA, 1997).

Os peixes podem ser expostos a uma grande variedade de agentes naturais ou artificiais em seus ambientes. Estudos têm cada vez mais se concentrados nas conseqüências eco-fisiológicas e eco-toxicológicas da exposição de agentes estressantes em animais aquáticos (RANKIN & JENSEN, 1993).

Os peixes teleósteos marinhos mantêm suas concentrações osmóticas em torno de um quarto a um terço da concentração da água do mar, sendo chamados de hiposmóticos. Assim, há tendência desses peixes em perderem água para o meio, especialmente através do epitélio das brânquias (LOVE, 1980; SCHIMIDT-NIELSEN, 1996; RANDALL, 2000; EVANS, 2005). Para repor o volume perdido de água, eles bebem água do mar. A maior parte da absorção de sal ocorre por ingestão de água do mar, e não por absorção de sal pela superfície corpórea ou pelas brânquias (LOVE, 1980; POUGH, 1993; CARVALHO FILHO, 1999; RANDALL, 2000).

Através do epitélio intestinal, ocorre a absorção para a corrente sanguínea de 70 a 80% da água ingerida e da maior parte do NaCl e da KCl presentes na água do mar. Inicialmente a água do mar ingerida é diluída a 50% por absorção passiva dos sais através do esôfago. No

intestino delgado, ocorre a absorção ativa secundária na membrana apical, por meio de um co-transportador Na/2Cl/K, seguida de transporte ativo na membrana basolateral pela ATPase Na⁺/K⁺. A maioria dos íons divalentes tais como Ca⁺⁺, Mg⁺⁺ e SO₄⁻, permanece no trato gastrointestinal sendo expelido pelo ânus (LOVE, 1980; RANDALL, 2000).

O excesso de sal absorvido junto com a água é posteriormente eliminado do sangue para a água do mar por transporte ativo de Na⁺, Cl⁻ e K⁺. Isso ocorre através do epitélio das células de cloreto, localizado nas brânquias e por secreção de sais divalentes pelo rim. O resultado do trabalho osmótico com gasto de energia das brânquias e dos rins, no teleosteo marinho, é a retenção de água (LOVE, 1980; POUGH, 1993; RICKLEFS, 1996; SCHIMIDT-NIELSEN, 1996; RANDALL, 2000).

O fígado é a maior glândula do corpo de qualquer vertebrado alcançando o máximo de 25% da massa corpórea em alguns tubarões. Em todos os vertebrados o fígado produz secreções digestivas, processa nutrientes absorvidos e metabólicos, e desintoxica substâncias nocivas. Além disso, está envolvido na hematopoese durante a fase larval e na produção de anticorpos. Estas funções são facilitadas pela posição do fígado no sistema circulatório: ele recebe sangue proveniente das paredes intestinais e que carregam moléculas absorvidas do material digerido (HIBIYA, 1982; POUGH, 1993; BERNET et al., 1999)

A artéria hepática e veia porta penetram no fígado. A última transporta sangue venoso vindo do estômago e do intestino, ramifica-se gradualmente e eventualmente divide-se em extensos capilares conhecidos como sinusóides. Os hepatócitos estão localizados entre os sinusóides formando uma espécie de cordão, sendo o conjunto desse conhecido como cordões de células hepáticas. Canais biliares estão localizados centralmente em cada cordão (HIBIYA, 1982).

Em algumas espécies de Osteichthyes, o tecido pancreático mistura-se com o tecido hepático através das ramificações da veia porta. Essa combinação de tecidos é chamado de hepatopâncreas (HIBIYA, 1982; POUGH, 1993).

O fígado produz secreções exócrinas liberadas ao lúmen intestinal. As secreções exócrinas estão combinadas na bile, que em parte é resíduo, ou seja, toxinas neutralizadas, e em parte são substâncias digestivas. Os componentes biliares são moléculas orgânicas emulsificadoras que agem como detergentes antes que esta entre no intestino. Formam gotículas submicroscópicas de gordura com poucas moléculas, permitindo-lhes ser absorvidas pelo epitélio intestinal. Sem estas secreções biliares as gorduras e os óleos dos alimentos não

poderiam ser absorvidos e passariam simplesmente pelo trato digestivo (HIBIYA, 1982; POUGH, 1993; JOBLING, 1995; SCHIMIDT-NIELSEN, 1996; RANDALL, 2000).

A bile entra no intestino via ducto biliar posteriormente a válvula pilórica no duodeno. Uma vesícula pode ou não ocorrer como saco de fundo cego ao longo do ducto biliar. Entre os vertebrados, a distribuição, o tamanho, e o ritmo de secreção da bile, estão relacionados com a quantidade de gorduras consumidas (HIBIYA, 1982; POUGH, 1993; JOBLING, M. 1995).

Transformações de compostos potencialmente tóxicos ocorrem em todos os tecidos do corpo, mas a grande maioria das enzimas que metabolizam os xenobiontes são encontrados no fígado. As reações de transformação usualmente envolvem uma oxidação inicial, redução e hidrólise da substância tóxica, seguida por uma reação na qual os resíduos são transformados em metabólitos solúveis em água que podem ser rapidamente excretados do corpo (HIBIYA, 1982; POUGH, 1993; JOBLING, 1995).

O fígado é o principal local da amniogênese, síntese de ácido graxo, e gluconeogênese e por causa de todas essas funções, o fígado é necessariamente envolvido diretamente na regulação do crescimento nos peixes (STRYER, 1992; PERAGO'N *et al.*, 1998 *apud* LAIZ-CARRIÓN, 2005).

A salinidade parece afetar inúmeros aspectos relacionados à regulação do crescimento (LAMBERT, 1994; WOO NYS, 1995; DUTIL, 1997 *apud* RUBIO, 2005), incluindo a taxa metabólica padrão no fígado e o balanceamento dos hormônios envolvidos com o metabolismo (BJÖRNSSON, 1998; MCCORNICK, 1996 *apud* RUBIO, 2005; LAIZ-CARRION, 2005).

O sistema neuroendócrino é a primeira ligação entre as mudanças ambientais e as respostas fisiológicas, sendo responsável por boa parte das adaptações osmorregulatórias. Assim como a prolactina e o cortisol (LOVE, 1980; JOBLING, 1995; MCCORMICK, 2001), evidências recentes mostram que o eixo hormônio do crescimento (GH)/fator de crescimento semelhante à insulina I (IGF I) é de extrema importância para a adaptação dos peixes teleósteos em águas marinhas (MACCORMICK, 2001).

Não está bem claro por quais mecanismos a salinidade afeta a secreção e os efeitos do GH, mas é apropriado especular que as respostas são mediadas pelas mudanças na osmolaridade do plasma ou composição dos íons (LOVE, 1980; BJÖRNSSON, 1998).

Em teleósteos, muitas das alterações osmorregulatórias entre outras mudanças provocadas no organismo pelo GH são realizadas em parte pela IGF-I (SAKAMOTO, 1993; RANDALL, 1994; BJÖRNSSON, 1997; MANCERA, 1998; MCCORMICK, 2001).

A secreção de GH pela glândula da hipófise e sua conseqüente ligação em seus receptores em órgãos alvos, principalmente no fígado, sinaliza a produção do fator de crescimento semelhante à insulina I (IGF-I) (SHAMBLOTT *et al.*, 1995 *apud* PEDROSO, 2006).

O IGF I, que pertence à família das insulinas, é um hormônio peptídico mitógeno que possui um importante papel na regulação do crescimento, na diferenciação, na regeneração, no metabolismo e osmorregulação. A produção ocorre em diversos tecidos como brânquias, rins, cérebro e músculo, mas são sintetizados principalmente no fígado (RANDALL, 1994; MCCORMICK, 2001; PEDROSO, 2006).

Recentes evidências demonstram que o eixo GH/IGF-I e cortisol trabalham conjuntamente na osmorregulação em teleósteos. Uma maneira para esses hormônios interagirem é através dos receptores de cortisol, os glicocorticóides e mineralocorticóides, nos quais o eixo GH/IGF-I pode ter certa influência para a interação desses com o cortisol. (MCCORMICK, 2001; LAIZ-CARRIÓN, 2004; SAKAMOTO, 2006).

Em diversas espécies de peixes em ambientes dulcícolas, o cortisol interagiu com a prolactina causando um influxo de íon. Essa recente descoberta da dúbia ação do cortisol, hora agindo juntamente com a prolactina e hora agindo com o GH, mostra-se presente em diversos teleósteos (MANCERA, 1998; MCCORMICK, 2001; SAKAMOTO, 2006).

Assim como respostas em órgãos osmorregulatórios, experimentos em peixes utilizando GH demonstraram um aumento no nível de glicose plasmática e mudanças metabólicas no fígado, como o decréscimo do potencial glicolítico e de sua capacidade de exportar glicose. Parece também ter efeitos na quebra de lipídeos, no glicogênio e na síntese de proteínas (BJÖRNSSON, 1997; SANGIAO-ALVARELLOS, 2005). O citocromo p450 da célula hepática também mostrou sensibilidade à exposição do hormônio, diminuindo sua quantidade em um período de 15 dias (CRAVEDI, 1995).

Tratamentos com cortisol em peixes desencadearam mudanças metabólicas no fígado, refletidas pela ativação dos potenciais glicogênico e gliconeogênico (VIJAYAN, 2003; LAIZ-CARRIÓN, 2004). A constatação do aumento das proteínas de choque térmico (hsp) nas células hepáticas, assim como a depressão imunológica não específica, aumentando a susceptibilidade para doenças, demonstraram o papel do hormônio glicocorticóide no processo de estresse no fígado e no sistema imune (JOBBLING, 1995; VIJAYAN, 2003; WANG, 2005).

Os hormônios esteróides são removidos do sangue quando passam pelo fígado e lá são degradados em um íon de sulfato ou ácido glucariônico, sendo excretados pela bile ou urina. (JOBBLING, 1995).

Bathygobius soporator (Valenciennes, 1837) são peixes teleósteos da família Gobiidae de águas rasas, abundante desde a costa até as ilhas oceânicas. Ocupam o Pacífico Oriental Tropical, o Atlântico Oriental, do Senegal a Angola e o Atlântico ocidental, desde a Flórida nos EUA até o Rio Grande do Sul, no Brasil (MENEZES & FIGUEIREDO, 1976; MAUGÉ, 1986; CARVALHO-FILHO, 1999). Não são migratórios, vivem em águas rasas, entre 0-16 metros na maior parte das vezes, entre rochas, corais, raízes de mangues, bordas de canais, lagoas salobras, rios costeiros e estuários. Suportam grande variação de salinidade, temperatura, oxigenação, turbidez e permanecem vivos em poças de marés, entre pedras e areia (FANTA, 1997; CARVALHO FILHO, 1999; FROESE & PAULY, 2006).

Um de seus nomes populares é Maria-da-Toca, uma referência ao fato destes peixes buscarem abrigo em pequenos espaços entre rochas. Ficam imóveis, camuflados e, se assustados, aprofundam-se nas tocas ou fogem. Outras vezes podem ser facilmente pegos com as mãos, conforme relatos de pescadores (FANTA, 1997; CARVALHO FILHO, 1999).

Territoriais, disputam espaço e comida com indivíduos da mesma espécie e são extremamente vorazes, comendo todo o tipo de invertebrados bentônicos, ovos, zooplâncton e larvas de peixes. São de hábitos principalmente diurnos, mas também ativos à noite (CARVALHO FILHO, 1999; FROESE & PAULY, 2006).

Podem passar de uma poça de maré para outra, saltando pela areia ou pelas rochas; os casais são perenes e a reprodução ocorre por quase todo o ano, o casal guardando os ovos depositados em superfícies lisas e duras por eles preparadas. As larvas são planctônicas e têm desenvolvimento rápido, passando a habitar o fundo. (CARVALHO FILHO, 1999).

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Verificar alterações histológicas do fígado do peixe *Bathygobius soporator* Valenciennes sob as salinidades 0ppt, 6ppt, 17ppt e 34ppt durante os tempos de 12h,24h,48h e 96h.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Observar possíveis alterações morfológicas no fígado de *B. soporator* expostos a diferentes salinidades através da microscopia óptica;
- Quantificar estatisticamente algumas das possíveis alterações morfológicas encontradas no fígado de *B. soporator* expostos as diferentes salinidades e tempos.
- Interpretar os resultados morfológicos discutindo suas funções.

3. MATERIAIS E MÉTODOS.

3.1 MODELO BIOLÓGICO

A maior família de peixes marinhos é a Gobiidae (cerca de 2000 espécies) e que apresentam as menores espécies. Algumas apresentam simbiose com os invertebrados, como os camarões (FROESE & PAULY, 2006).

Bathygobius soporator (Fig. 1) é diferenciado das outras cinco espécies atualmente aceitas do gênero do atlântico por possuir entre 18 e 20 espinhos na nadadeira peitoral, 37 a 41 escamas laterais e 0,12-0,14 % do comprimento da maxila/comprimento padrão (LIMA, 2005), podendo alcançar até 15cm no comprimento total (FROESE & PAULY, 2006).

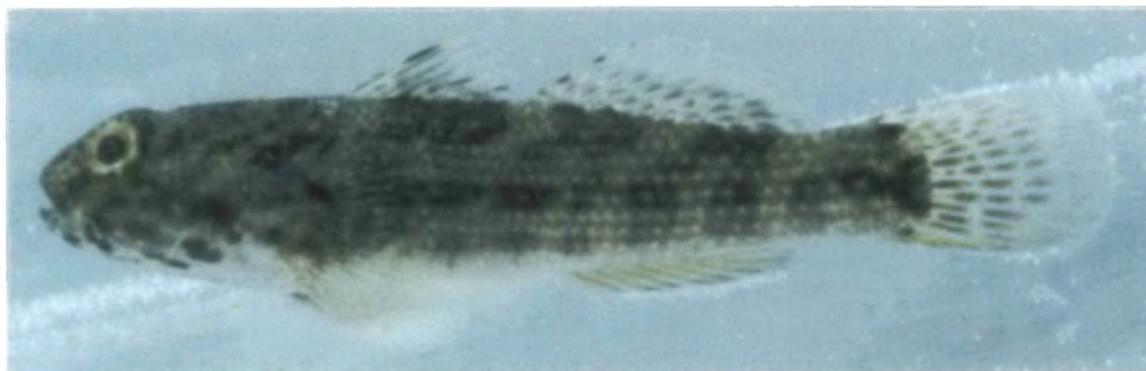


FIGURA 1. *Bathygobius soporator* (TASSEL, 2000) EM VISTA LATERAL.

3.2. LOCAL DE ESTUDO

A costa brasileira estende-se ao longo de 9200km, entre as latitudes de 4°N e 32°S (Silveira, 1964). Em função da marcante presença da Serra do Mar que ocorre desde o sul do estado de Santa Catarina, o litoral do estado do Paraná enquadra-se no setor da costa brasileira, designada como litoral sudeste ou das escarpas cristalinas pré-cambrianas (SURGUIO & TESSELER, 1984).

De acordo com a configuração geomorfológica e características da dinâmica costeira, é possível identificar no Paraná três tipos principais de costas: estuarinas ou protegidas (1316,8Km), oceânicas ou de mar aberto (61,1Km) e de desembocaduras de rios (105,1Km) (ÂNGULO *et al.*, 1996).

A Baía de Guaratuba (Fig. 2) é um estuário encontrado na planície costeira do litoral do Paraná. Está localizada no litoral sul do estado ($25^{\circ}51.80'S$, $48^{\circ}38.20'W$). A baía tem uma área de $48,57\text{Km}^2$ e está inserida no município de Guaratuba (BIGARELLA *et al.*, 1978). Esta Baía comunica-se com o mar por uma abertura de aproximadamente 500m e adentra no continente cerca de 15 Km, no eixo leste-oeste (JAKOBI & SOUZA 1968) por 2,5 Km de largura média e 6 m de profundidade máxima. A vegetação local é típica de manguezal, com predomínio de sedimentos finos (VENDEL, 2004).

A média de temperatura da água varia aproximadamente entre 18°C e 30°C , a salinidade oscila entre 0ppt e 30ppt, e a média do pH encontra-se geralmente entre 8,0 e 9,0. Quando consideradas as frações orgânicas e minerais do sedimento, o setor continental destaca-se por possuir a maior porcentagem de grãos finos, compreendendo silte e argila, bem como de matéria orgânica. Quanto mais próximo da saída da baía para o mar, maior é a porcentagem de areia, assim como a influência do fluxo marinho (VENDEL, 2004).

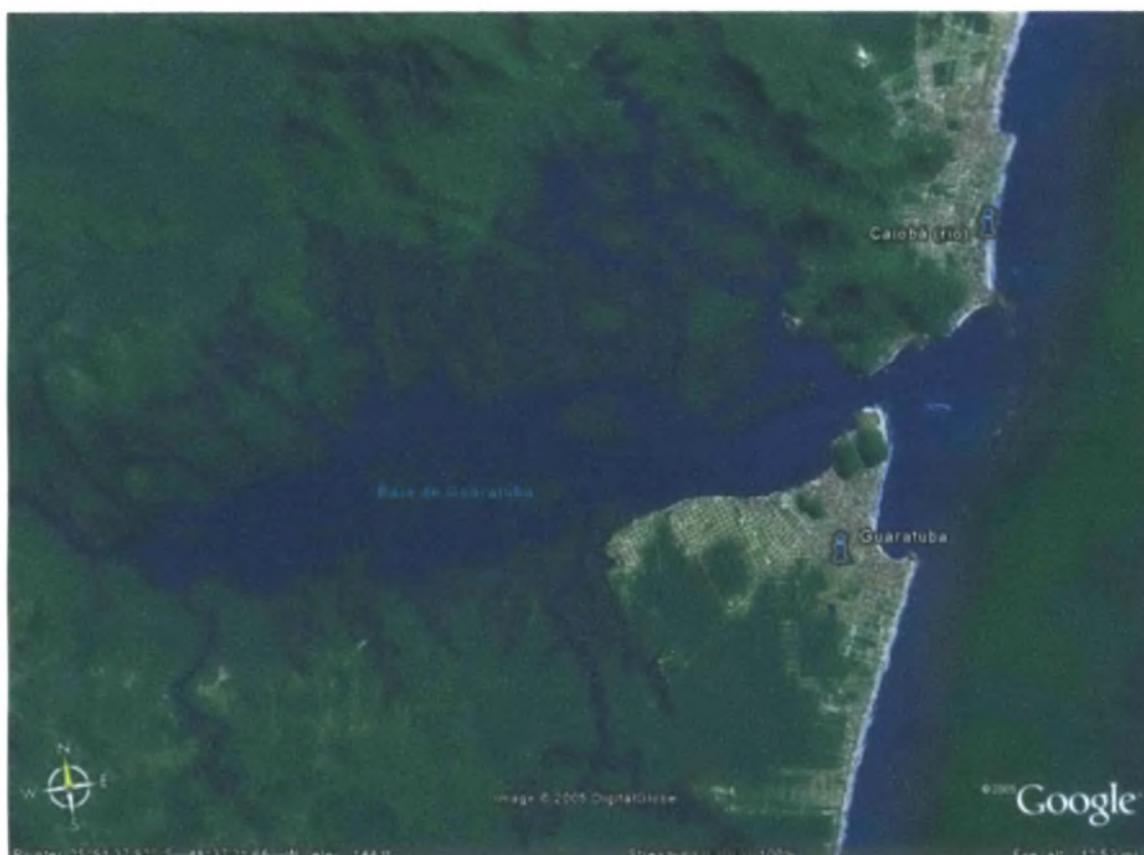


FIGURA 2. IMAGEM DE SATÉLITE DA BAÍA DE GUARATUBA.

3.3. COLETA DO MATERIAL BIOLÓGICO

Foi realizado no município de Guaratuba, na Baía de Guaratuba, a coleta dos exemplares de *Bathygobius soporator* Valenciennes (Gobiidae) através da linha e anzol com isca de camarão. Tijolos também foram utilizados para a captura, sendo colocados pela manhã em pontos estratégicos e retirados rapidamente da água, à tarde. As coletas foram efetivadas em poças de maré que se formam em rochedos próximas à praia durante a maré baixa e em regiões rasas nos manguezais (Fig. 3). Os peixes foram transportados para a Universidade Federal do Paraná, em recipientes plásticos de 20L, sendo a água mantida oxigenada através de oxigenador portátil.



FIGURA 3. MANGUEZAL NA MARÉ BAIXA ONDE FORAM OBTIDOS EXEMPLARES DE MARIA-DA-TOCA (*Bathygobius soporator*).

3.4. ACLIMATAÇÃO E EXPERIMENTO.

Depois de coletados e transportados ao laboratório BioPX na Universidade Federal do Paraná, os peixes foram distribuídos em aquários de 40L, contendo cada um deles 8 indivíduos. Os aquários possuíam as faces laterais e posteriores revestidas com papel contact verde, de modo que não podia haver contato visual entre peixes de aquários vizinhos. A água utilizada foi a mesma da região de coleta.

Os animais foram aclimatados durante sete dias, em uma temperatura média de 26°C, pH 7, salinidade 34ppt e fotoperíodo 12h claro/12h escuro. No fundo dos aquários foram colocados

tijolos furados para proverem abrigo aos espécimes. Para a alimentação foram oferecidos, uma vez ao dia durante o período da manhã, pellets de origem industrial. O excesso não aproveitado era retirado dos aquários no dia seguinte.

Cada grupo de indivíduos foi exposto às salinidades 0ppt (água destilada), 6ppt, 17ppt e 34ppt, por 12h, 24h, 48h e 96h (Fig. 4). A diluição da água foi realizada com água filtrada e desclorada durante o período total de 1 hora. Os registros da salinidade foram feitos com salinômetro ATAGO S/Mill[®] e as outras condições abióticas foram mantidas constantes.

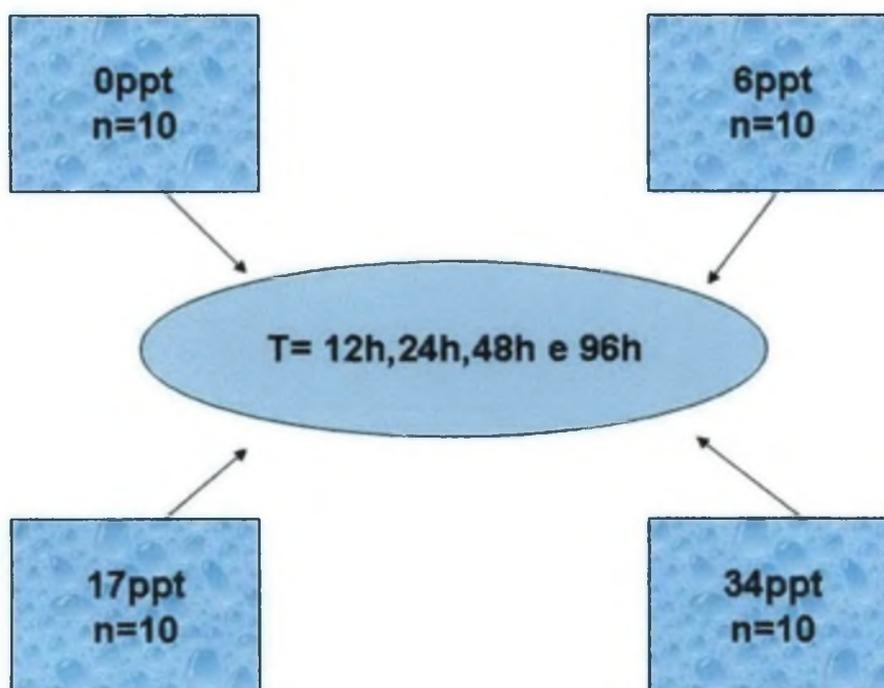


FIGURA 4. ESQUEMA REPRESENTATIVO DO DESIGN EXPERIMENTAL. Quatro concentrações de salinidades diferentes (quadrado azul), sendo coletados 8 animais a cada tempo distinto (elipse verde).

3.6. MICROSCOPIA ÓPTICA

Após a secção transversal da medula espinhal imediatamente após a região occipital do exemplar, foi efetuado uma incisão ventral expondo os órgãos da cavidade abdominal, retirando-se, em seguida, o fígado.

Para o estudo histológico, as peças foram desidratadas em séries crescentes de álcool etílico, diafanizadas com xilol e incluídas em paraplast[®], segundo as técnicas de rotina (Fig. 5).

Os cortes seriados foram obtidos com auxílio de micrótomo, com espessuras de 4 μ m. O material foi corado com Hematoxilina de Harris e Eosina (CLARKE, 1981) e fotografado com fotomicroscópio Zeiss, do Setor de Ciências Biológicas.

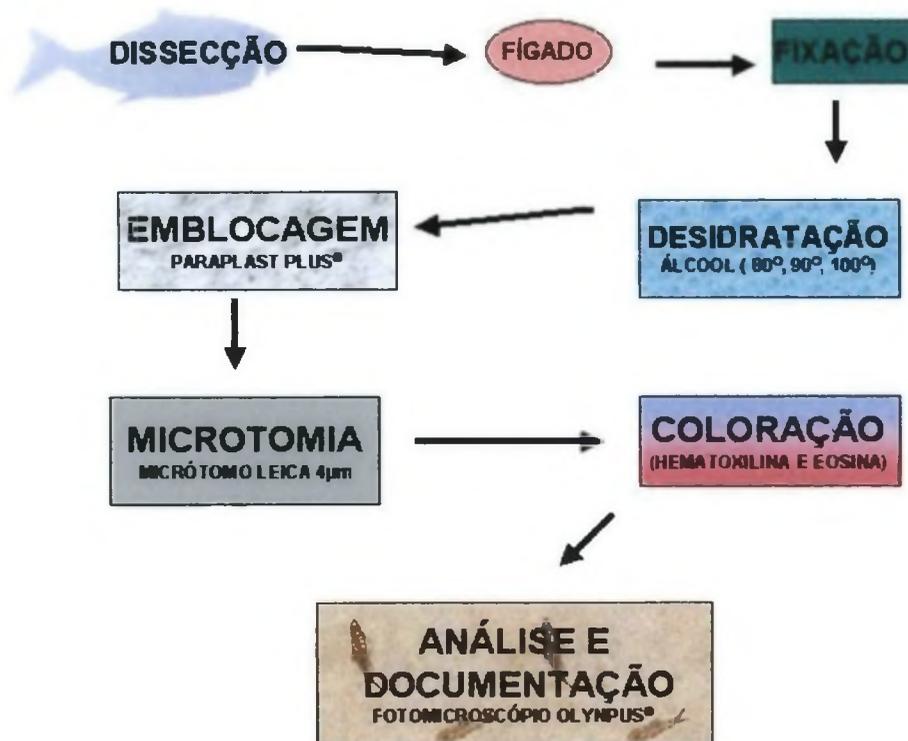


FIGURA 5. ESQUEMA EXPLICATIVO DO PROCEDIMENTO LABORATORIAL.

As análises morfométricas foram realizadas através do programa Sigmascan 3.0., no qual era possível calcular a área dos hepatócitos, assim como de seus núcleos. Para isso foram escolhidas células com limites citoplasmáticos definidos e com um núcleo aparente de um campo visual aleatoriamente escolhido com um aumento de 630 vezes. Foram analisados em torno de 10 células por campo visual, totalizando em torno de 100 células para cada grupo experimental.

As histopatologias, como necrose e infiltração leucocitária foram somente avaliadas qualitativamente.

3.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA.

Para analisar as variações nas diferentes salinidades e nos diferentes tempos entre os tamanhos da área do núcleo, da área de vacuolização e da área celular foi aplicada à análise de variância (ANOVA). Nessa, o efeito de tratamento é avaliado comparando-se a variação devida à introdução do tratamento, com a variação residual. Nos tratamentos que apresentaram diferenças significativas entre as médias ($p < 0,05$), foi utilizado o método de Tukey para o contraste entre os pares de média. Se a diferença entre os pares de médias observadas for maior que a respectiva diferença mínima significativa (Δ), os dois tratamentos diferem entre si.

4. RESULTADOS

4.1 SALINIDADE 34ppt

Nas primeiras doze horas dos animais expostos à salinidade de 34 ppt, todos os espécimes apresentaram hepatócitos com extrema vacuolização, sendo que algumas células mostraram algum inchaço (aumento do volume celular) e núcleos compactos situados perifericamente. A presença de infiltração leucocitária também foi constatada em alguns indivíduos, assim como grânulos intracelulares corados com eosina (Fig. 6A).

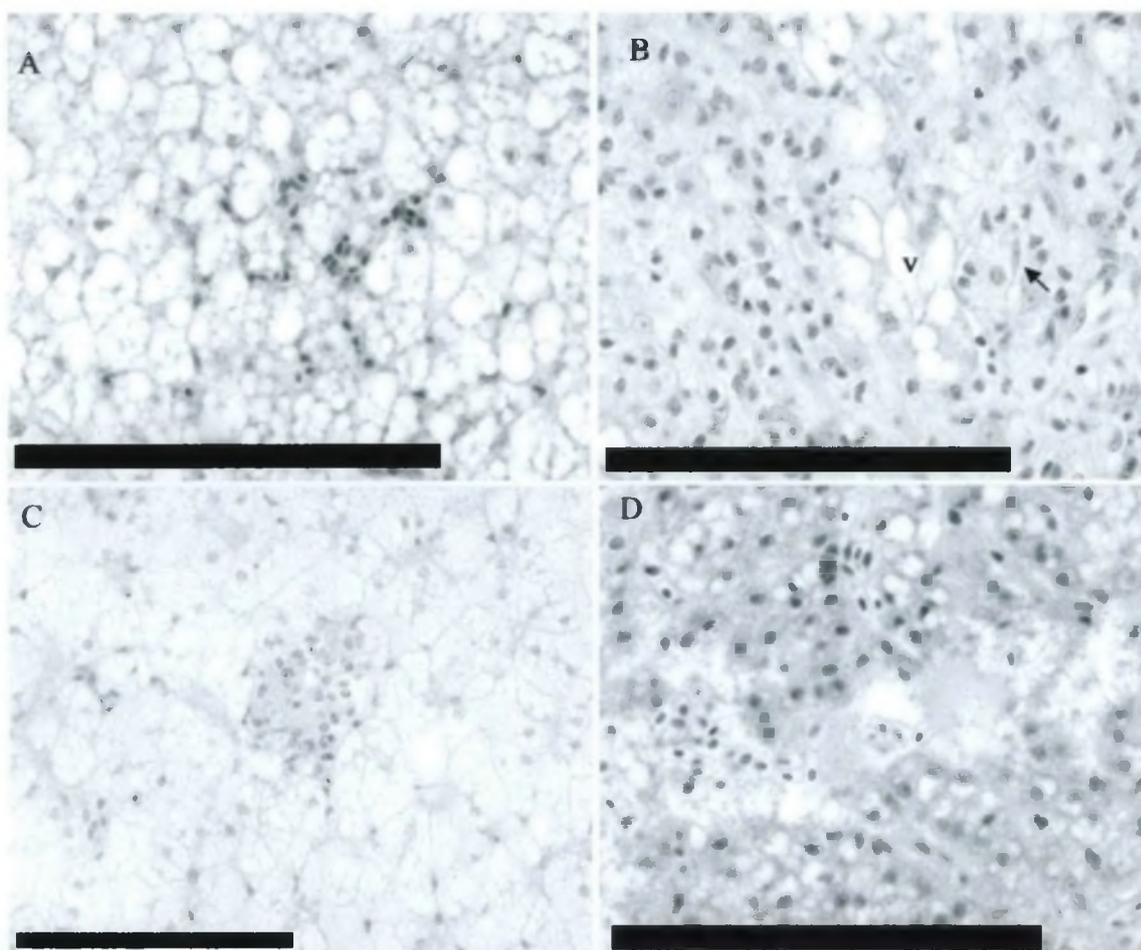


FIGURA 6. FÍGADO DE *BATHYGOBIUS SOPORATOR*. SALINIDADE 34% (A) 12 HORAS - SECÇÃO COM HEPATÓCITOS VACUOLIZADOS. No centro um foco com infiltração leucocitária . (B) 24 horas - Foco de necrose. Fibroblastos (seta), vacúolos (v). (C) 48 horas – infiltração leucocitária e hepatócitos vacuolizados. (D) 96 horas - foco de necrose e hepatócitos vacuolizados . (Escala preta = 100 μ m, H.E.)

Após vinte e quatro horas de exposição à salinidade de 34ppm os hepatócitos apresentaram um aumento celular e também a área de vacuolização (Figura 7A,B). Alguns

mostravam seus limites celulares irregulares e núcleos comprimidos na periferia. A infiltração leucocitária também se fez presente. Os grânulos estavam localizados agrupados na periferia das células, na região próxima ao endotélio dos vasos. Pela primeira vez houve a presença de uma grande área necrosada, onde era possível encontrar células de defesa, eritrócitos e fibroblastos (Fig. 6B).

Os hepatócitos dos animais coletados no tempo de quarenta e oito horas, ainda que menores que no tempo anterior (Fig.7), apresentaram inchaço com vacúolos intracelulares presentes na grande maioria de suas células. Os grânulos, quando presentes, ainda se depunham perto dos vasos. Não houve a ocorrência de necrose, mas a presença de infiltração de leucócitos foi constatada, mesmo que em menor quantidade que no tempo anterior (Fig.6C).

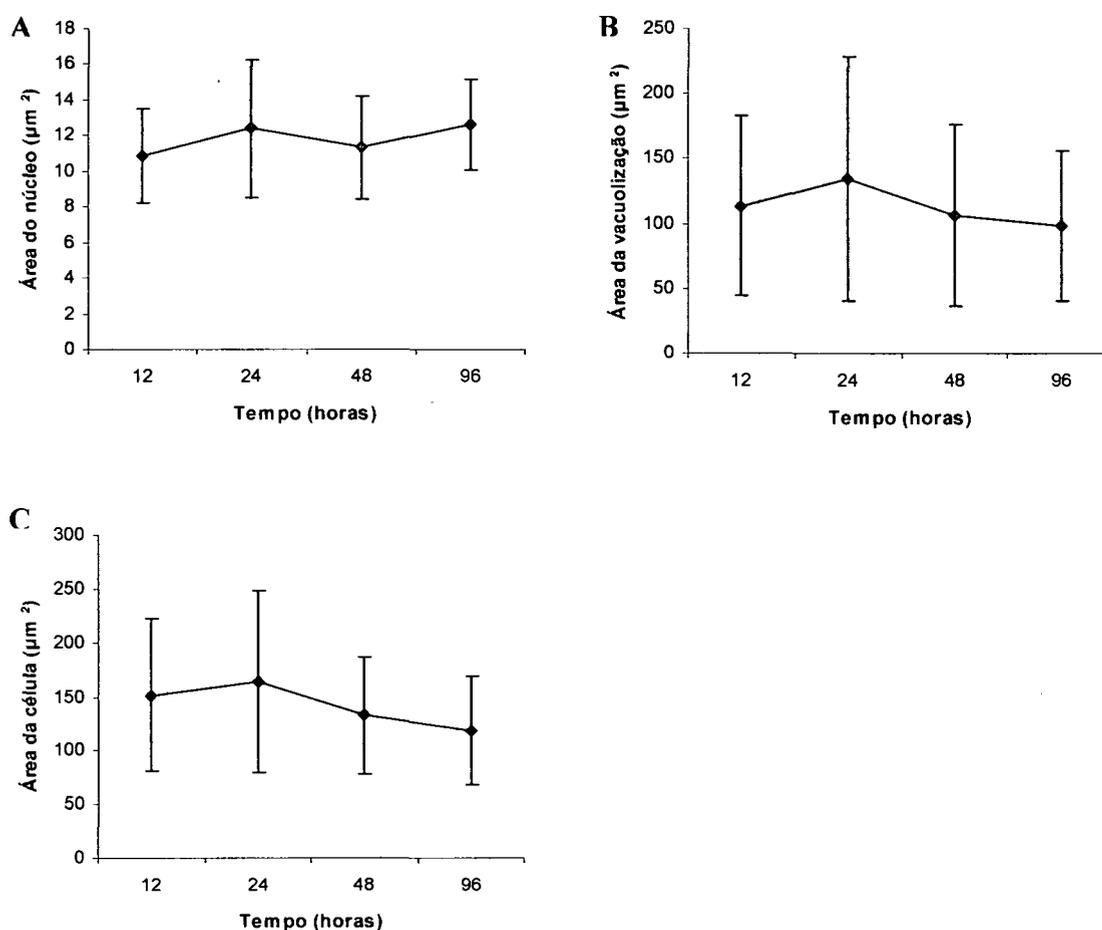


FIGURA 7. COMPARAÇÃO DA ÁREA DO NÚCLEO, ÁREA DE VACUOLIZAÇÃO E ÁREA DA CÉLULA ENTRE OS DIFERENTES TEMPOS NA CONCENTRAÇÃO DE 34 PPT.(A) Houve diferença significativa entre os quatro tempos para as áreas dos núcleos. (B) Não houve diferença significativa de vacuolização entre os diferentes tempos. (C) As células apresentaram diferença significativa de área entre os tempos. ($p \leq 0.05$).

Após as noventa e seis horas, na salinidade de 34%, foi verificado a granulação dos hepatócitos, presente em todos indivíduos e a menor vacuolização das células com o núcleo periférico entre todos os tempos anteriores (Fig 7B), mas ocorreu um aumento na frequência de necroses e de infiltração leucocitária (Fig. 6D).

4.2 SALINIDADE DE 17ppt

Quando expostos a uma concentração 17ppt, nas doze primeiras horas os hepatócitos dos espécimes apresentavam uma grande vacuolização (Fig. 9) com os núcleos compactados ou esféricos restritos a periferia celular. Algumas apresentavam certo inchaço. Os grânulos, poucos presentes, estavam localizados nas partes celulares próximas aos vasos. Em uma amostra, as células apresentavam-se fortemente coradas com hematoxilina, e com pouco ou nenhum vacúolo. Os núcleos dessas estavam esfericamente apresentadas no centro do hepatócito, que possuía um tamanho regular (Fig. 8A).

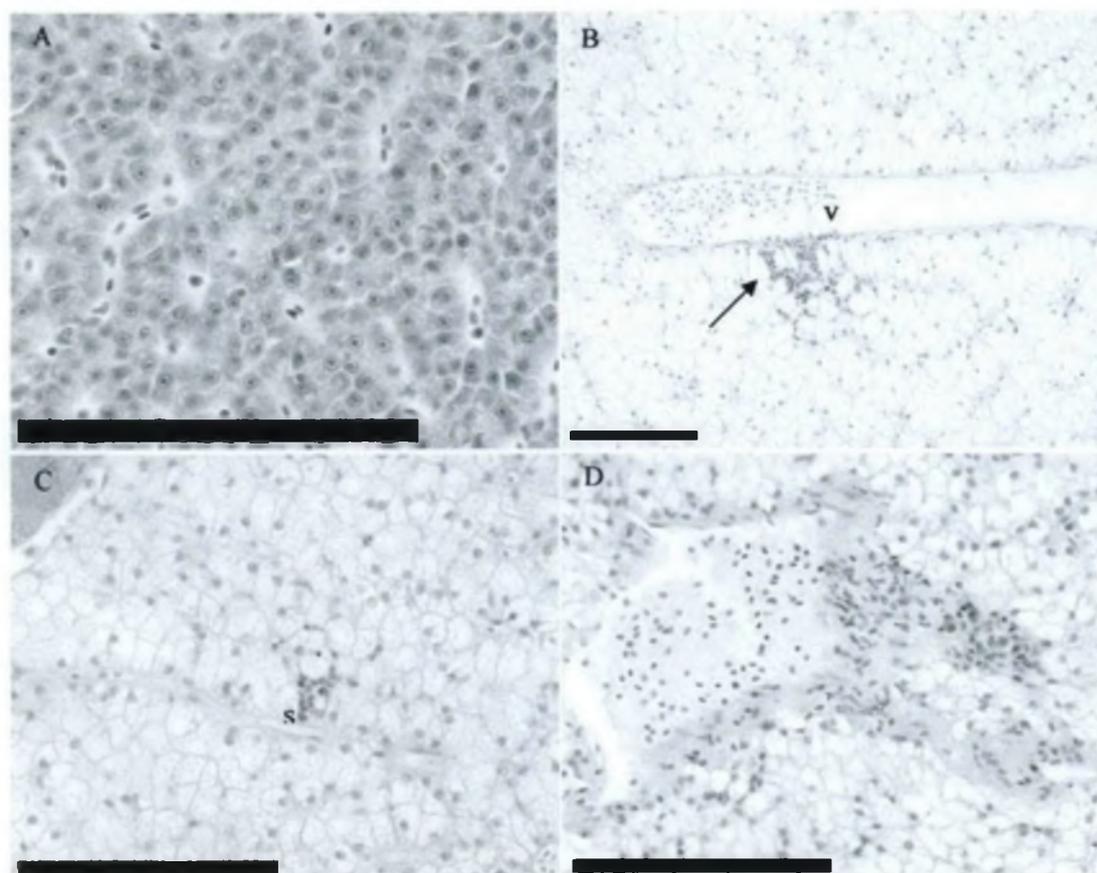


FIGURA 8. SALINIDADE 17PPT. (A) 12 horas- Hepatócito basófilo, com poucos vacúolos (seta). (B) 24 horas- infiltração de leucócitos (↑) a partir do vaso hepático (v). (C) 48horas- pequeno foco de leucócitos perto de sinusóide (s) e células totalmente vacuolizadas.(D) 96 horas- grande infiltração leucocitária entre células vacuolizadas.(Escala = 100µm, H.E.)

No tempo de vinte e quatro horas os vacúolos estiveram presentes em todas as amostras (Fig. 9B), assim como os grânulos, mas esses ainda estavam em pouca quantidade nas extremidades próximas aos vasos. A área celular diminuiu em relação ao tempo anterior (Fig. 9C). A necrose e a infiltração leucocitária foram encontradas pela primeira vez nessa concentração, sendo a última mais freqüente (Fig. 8B).

Após quarenta e oito horas de exposição foi possível observar o ápice da vacuolização (Fig. 9C), hepatócitos com núcleos esféricos ou irregulares comprimidos na periferia de células inchadas. Grânulos eram visíveis nas células perto dos vasos e a presença da infiltração leucocitária foi verificada (Fig. 8C).

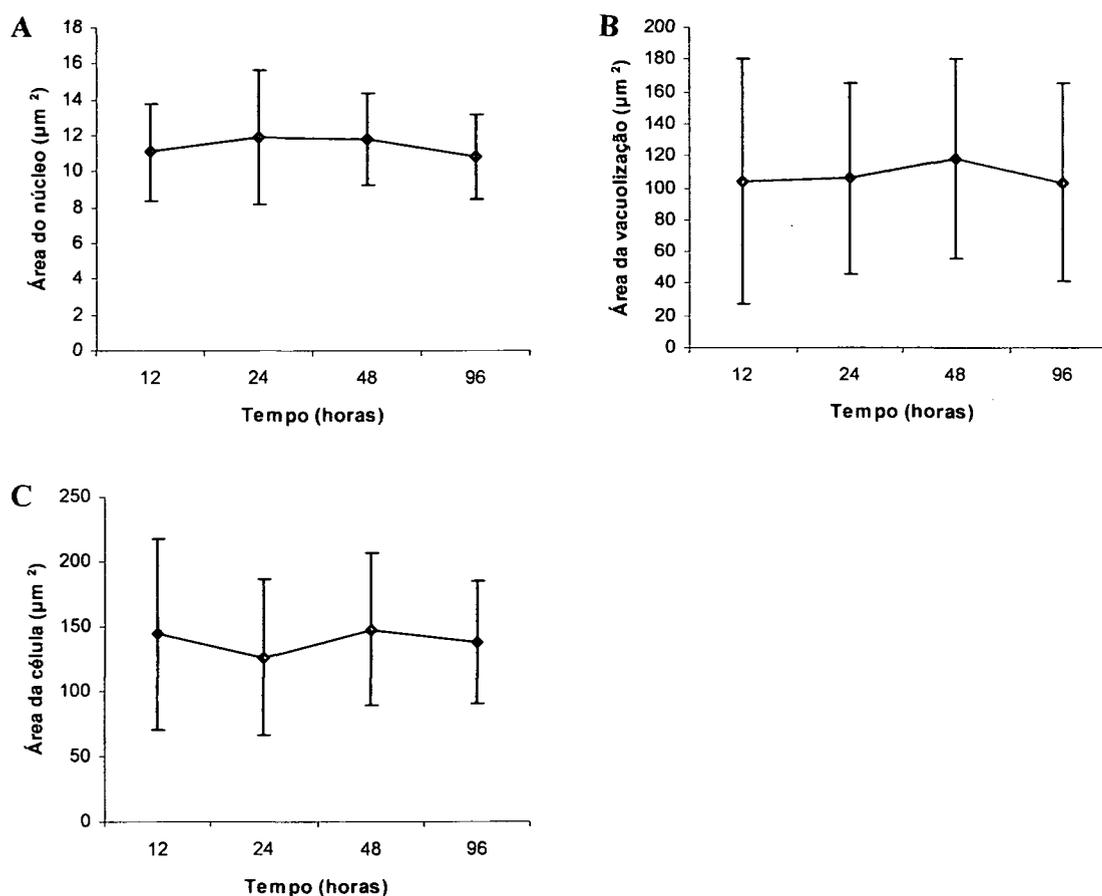


FIGURA 9. COMPARAÇÃO DA ÁREA DO NÚCLEO DOS HEPATÓCITOS DE *B. SOPORATOR*, DE VACUOLIZAÇÃO E DA CÉLULA ENTRE OS DIFERENTES TEMPOS DA SALINIDADE 17 PPT. Não houve diferença significativa entre os quatro tempos para as áreas dos núcleos (A), da área de vacuolização (B) e da área total da célula. (Considerando $p \leq 0.05$).

Nas últimas noventa e seis horas ainda era possível ver vacúolos ocupando uma grande área celular de células inchadas, núcleos esféricos ou não nas regiões laterais e grânulos, quando presente, nas extremidades próximas aos vasos. Uma grande infiltração leucocitária foi verificada (Fig. 8D)

4.3 SALINIDADE DE 6ppt.

Apesar de que na concentração de salinidade de 6ppt, no tempo de doze horas ter apresentado as amostras com a menor área de vacuolização e com núcleo esférico (Fig. 11), a maioria das células ainda apresentava vacúolos de diferentes tamanhos e núcleo periférico de diversas formas irregulares. Infiltração leucocitária esteve presente em grande parte dos espécimes e foi verificada uma pequena área necrosada (Fig. 10A).

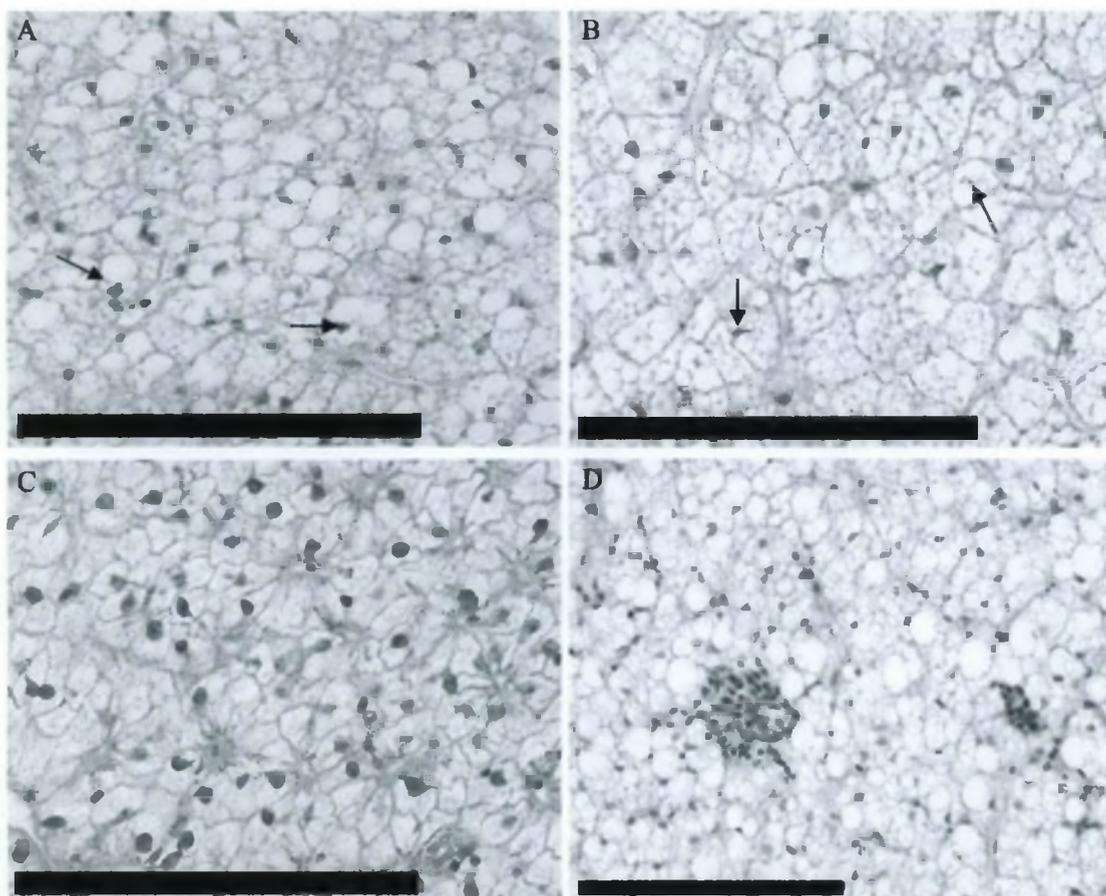


FIGURA 10. EXPERIMENTO COM CONCENTRAÇÃO DE 6 PPT. (A) 12 horas – hepatócitos altamente vacuolizados e núcleos comprimidos na periferia celular (seta). (B) 24 horas – células inchadas e completas de vacúolos. Núcleos periféricos e extremamente comprimidos (setas). (C) 48 horas – hepatócitos com limites celulares irregulares. (D) 96 horas- células com muitos vacúolos e núcleos comprimidos lateralmente. Duas áreas distintas com infiltração leucocitária. (Escala = 100µm).

Após vinte e quatro horas a amostra apresentou similaridade com o tempo anterior, mas ocorreu um acréscimo de células vacuolizadas em grande parte das amostras, assim como de células inchadas (FIG. 11). O núcleo periférico apresentou-se de duas maneiras, esférico ou irregular, e não foi constatado a presença de necrose ou de infiltração leucocitária (Fig. 8B).

Em quarenta e oito horas foi obtido um resultado de hepatócitos pouco a muito vacuolizados, mas o último foi mais freqüente (Fig. 11). As células estavam inchadas, e algumas com *delineações irregulares*. Os grânulos estavam em maior concentração naquelas que possuíam pouca vacuolização. Novamente não foi presenciado a necrose e a infiltração leucocitária (Fig. 10C).

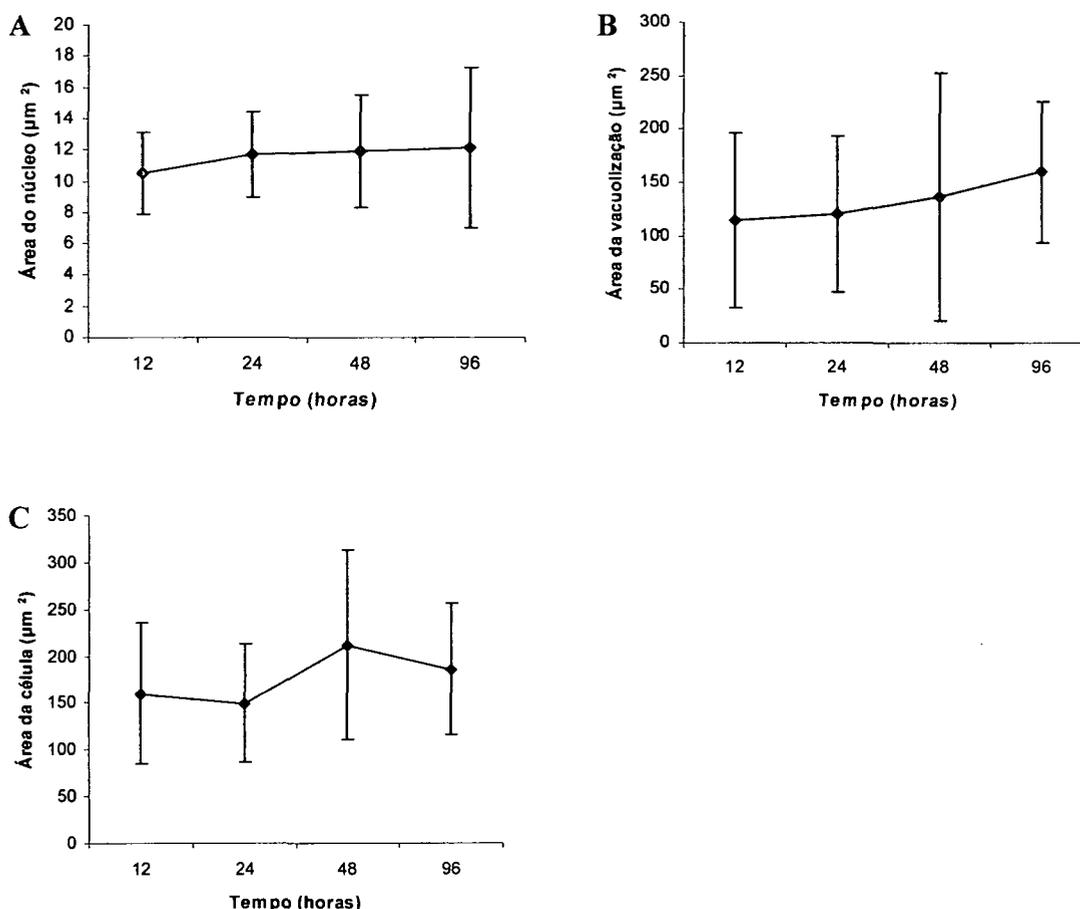


FIGURA 11. COMPARAÇÃO DA ÁREA DO NÚCLEO, DE VACUOLIZAÇÃO E DA CÉLULA ENTRE OS DIFERENTES TEMPOS DA SALINIDADE 06 PPT. Houve diferença significativa para os tempos nas áreas dos núcleos (A), da área de vacuolização (B) e da área total da célula. (Considerando $p \leq 0.05$).

Após noventa e seis horas a maioria das células, apesar da diminuição do inchaço celular, apresentava a maior área com vacúolos intracelulares (Fig. 11B). O núcleo periférico adotava formas esféricas e irregulares. Quando presente, os grânulos estavam em pequena quantidade, assim como a necrose e a infiltração leucocitária (Fig. 10D).

4.4 SALINIDADE DE ZERO ppt

Nas doze primeiras horas da concentração de 0 ppt. as células vacuolizadas e inchadas perfaziam a grande maioria das secções de fígado, apesar de terem sido verificados alguns hepatócitos virtualmente ausentes de vacúolos. Quanto mais vacuolizado era a célula mais irregular aparentava o núcleo e menor era a granulação, sendo que esse último não atingiu grandes proporções (Fig.12A).

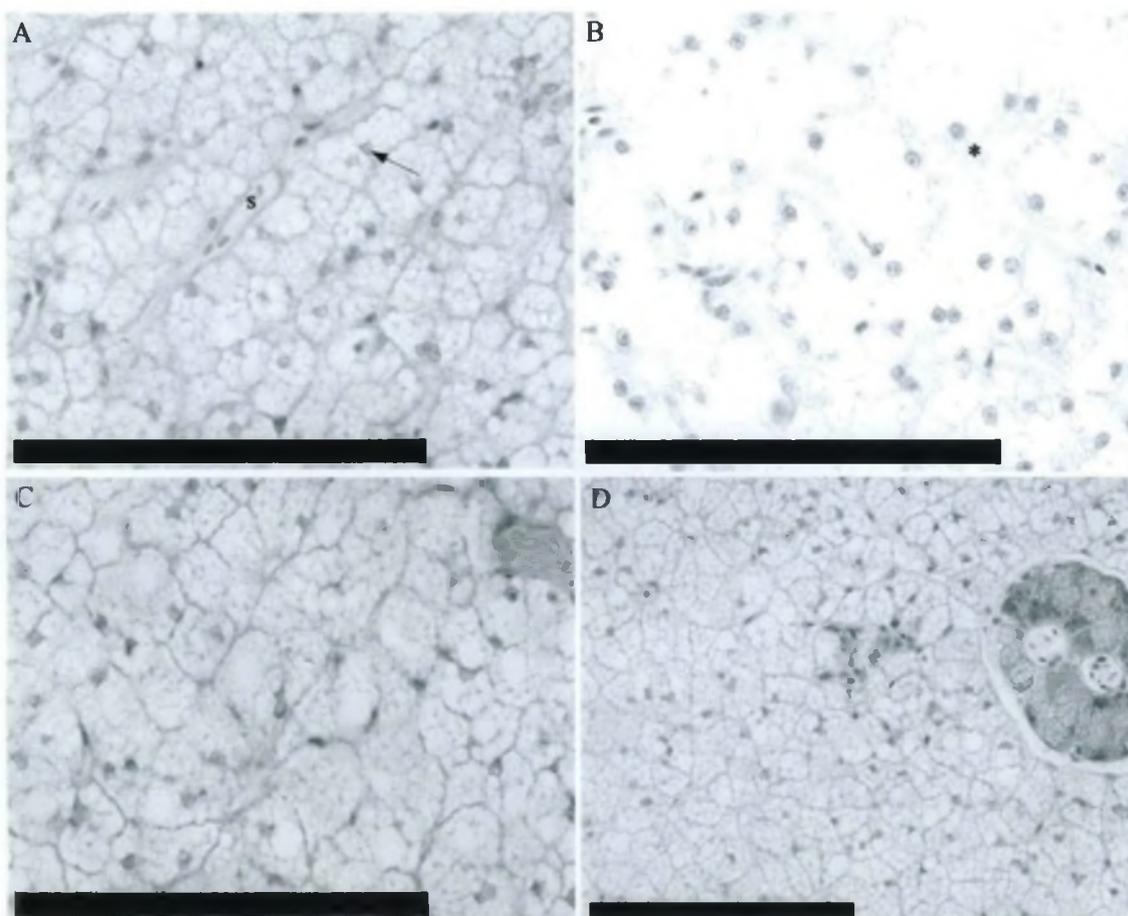


FIGURA 12. TESTE DE SALINIDADE DE CONCENTRAÇÃO 0 PPT. (A) 12 horas – células inchadas e vacuolizadas com núcleo periférico e irregular (seta), e sinusóide (s). (B) 24 horas – hepatócitos com núcleos esféricos e periféricos. Granulação nos limites celulares (*). (C) 48 horas – células inchadas com vacúolos e núcleo irregular na periferia.(D) 96 horas – hepatócitos inchados e extremamente vacuolizados com núcleo periférico. Infiltração leucocitária ao lado de um ácino pancreático (Escala = 100µm).

Passado vinte e quatro horas os hepatócitos diminuíram a área vacuolizada, ficaram menos inchados e com a maioria dos núcleos periféricos e tendendo a esfericidade (Fig. 13). Uma granulação era possível ser vista no limite intracelular próxima aos vasos (Fig. 12B).

Em quarenta e oito horas as amostras apresentavam em sua totalidade vacúolos e núcleo periférico, sendo que algumas houve a menor área celular (Fig. 13). Foi verificado em grande parte dos hepatócitos grânulos, mas perfaziam uma pequena parte do conteúdo celular (Fig. 12C).

Após as noventa e seis horas foi possível verificar células com vacúolos e grânulos. As primeiras possuíam células inchadas e núcleos periféricos, enquanto as segundas estavam em menor número e quantidade nos hepatócitos, mas ao longo dos tempos não houve uma variação significativa para as áreas do núcleo, vacúolo e da célula (Fig. 12D, 13).

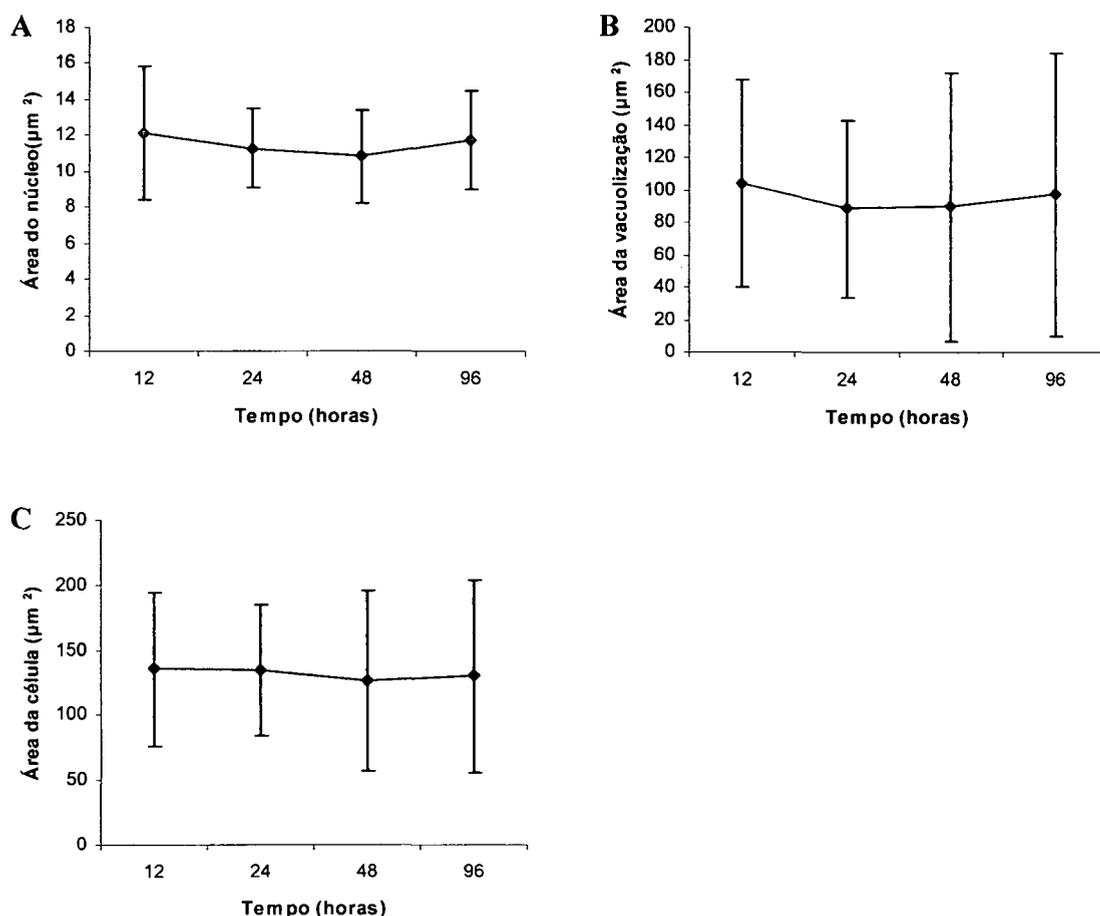


FIGURA 13. COMPARAÇÃO DA ÁREA DO NÚCLEO, DE VACUOLIZAÇÃO E DA CÉLULA ENTRE OS DIFERENTES TEMPOS DA SALINIDADE 0 PPT . Não houve diferença significativa entre os quatro tempos para a área dos núcleos (A), da área de vacuolização (B) e da área total da célula. (Considerando $p \leq 0.05$).

Em relação à comparação entre as salinidades de 0ppt., 6ppt., 17ppt. e 34ppt, nos diferentes tempos de doze horas, vinte e quatro horas, quarenta e oito horas e noventa e seis horas, foram retirados dados ímpares sobre as áreas dos núcleos, vacúolos e celular.

No tempo de doze horas não houve uma variação significativa entre as áreas medidas, exceto a área do núcleo, que na salinidade de 0ppt obteve uma grande diferença em relação às outras salinidades (Fig. 14).

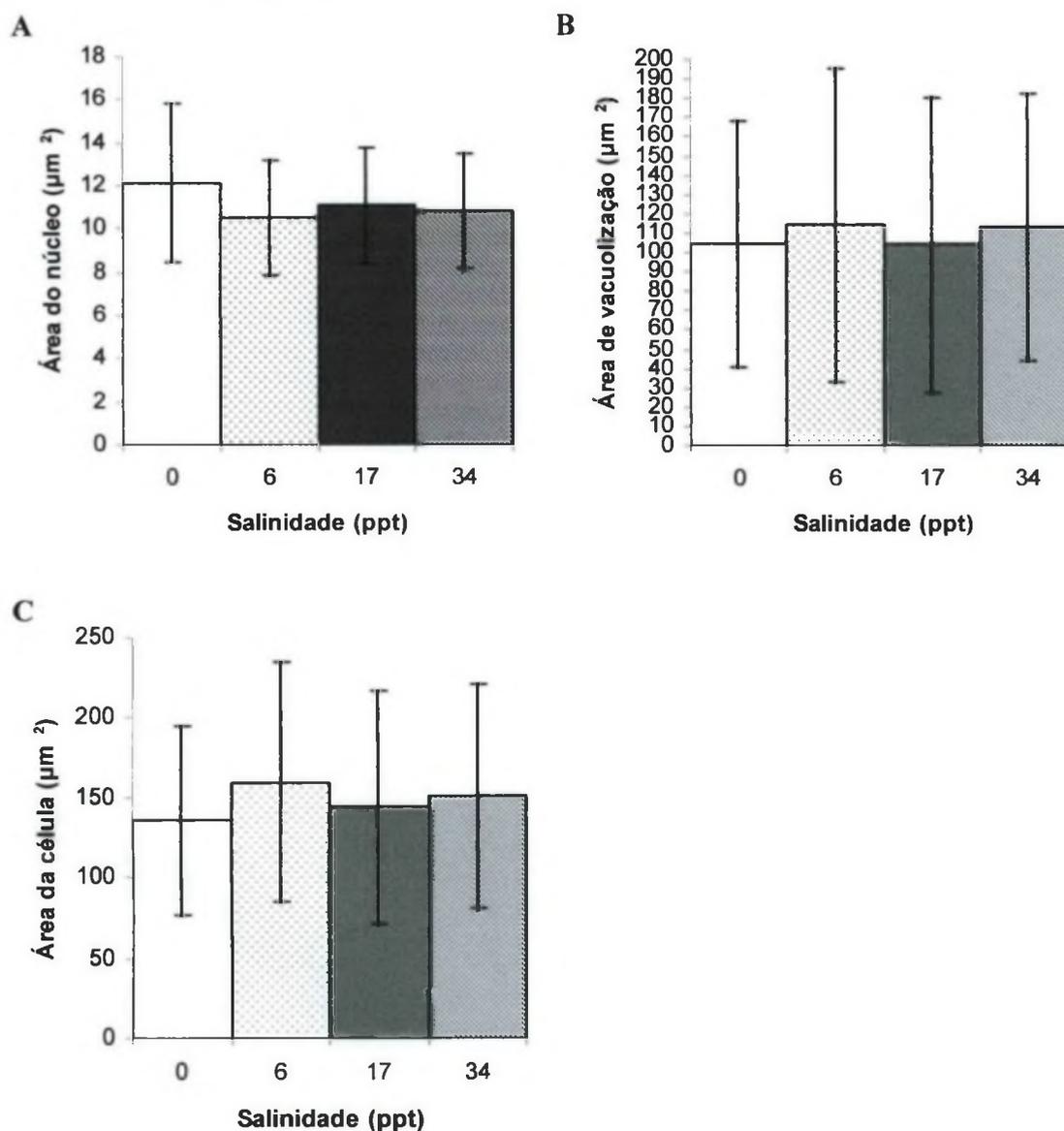


FIGURA 14. COMPARAÇÃO DA ÁREA DO NÚCLEO, DE VACUOLIZAÇÃO E DA CÉLULA ENTRE AS DIFERENTES SALINIDADES NO TEMPO DE DOZE HORAS. (A) Área do núcleo - variação significativa entre as diferentes salinidades. (B) Área de vacuolização - não houve uma variação significativa. (C) Área celular - não ocorreu uma diferença significativa entre as diferentes salinidades (Considerando $p \leq 0.05$).

No tempo de vinte e quatro horas, a variação foi oposta a do tempo anterior, isto é, o núcleo foi o único a não conter diferenças significativas entre as distintas salinidades. A salinidade de 34 % alcançou as maiores médias para as 3 medidas e as concentrações de 0ppt, e 17ppt obtiveram as menores médias (Fig. 15).

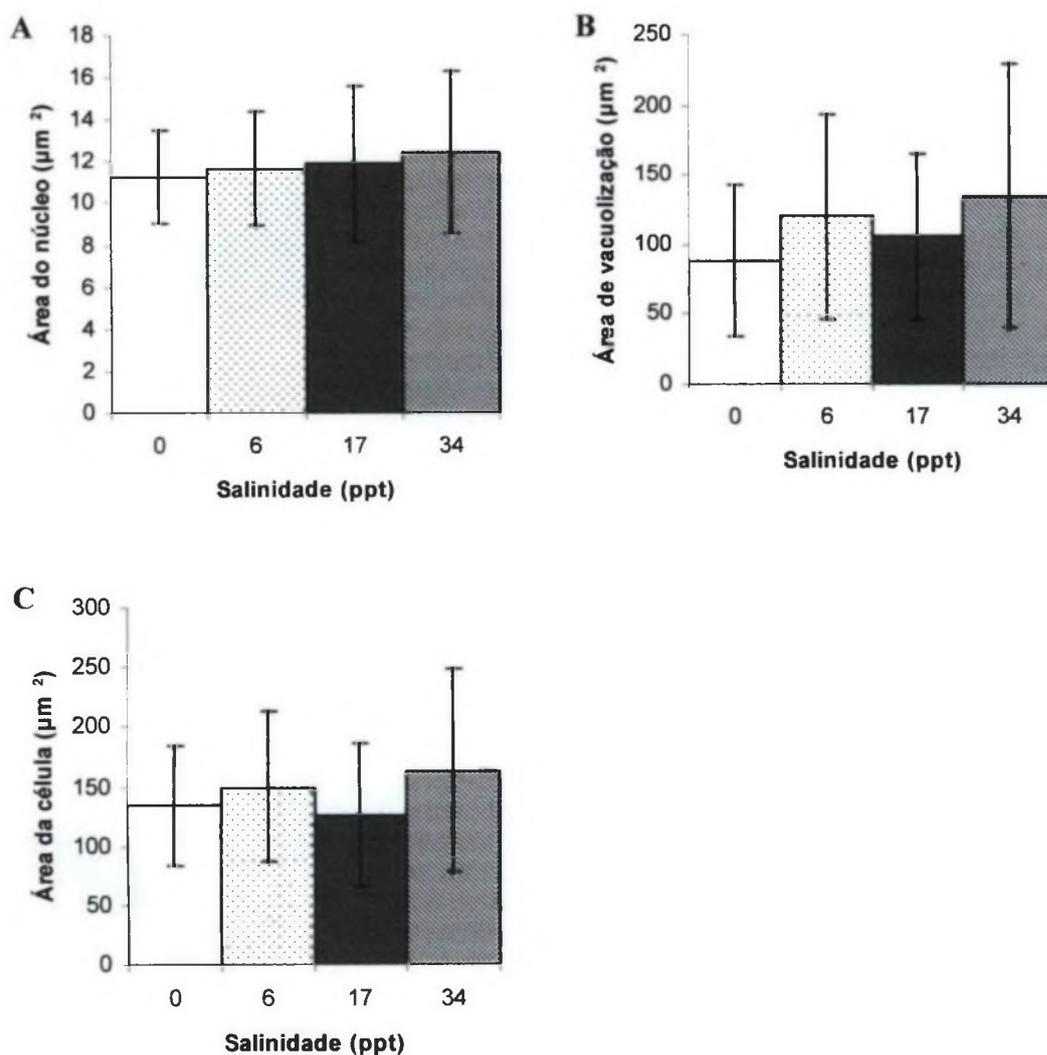


FIGURA 15. COMPARAÇÃO DA ÁREA DO NÚCLEO, DE VACUOLIZAÇÃO E DA CÉLULA ENTRE AS DIFERENTES SALINIDADES NO TEMPO DE VINTE E QUATRO HORAS. (A) O núcleo não apresentou diferença significativa entre as quatro salinidades. (B) Houve diferença significativa de vacuolização entre as diferentes salinidades. (C) A área das células apresentaram uma variação significativa entre as salinidades (Considerando $p \leq 0.05$).

Novamente entre as quatro concentrações diferentes de sal, o núcleo não apresentou alguma diferença significativa e as áreas de vacuolização e da célula mostraram alguma diferença significativa.

Neste momento a salinidade de 6ppt apontava as maiores médias, sendo seguidas pelas salinidades de 17ppt e 34ppt. A salinidade de 0ppt obteve as menores áreas em todas as médias (Fig. 15).

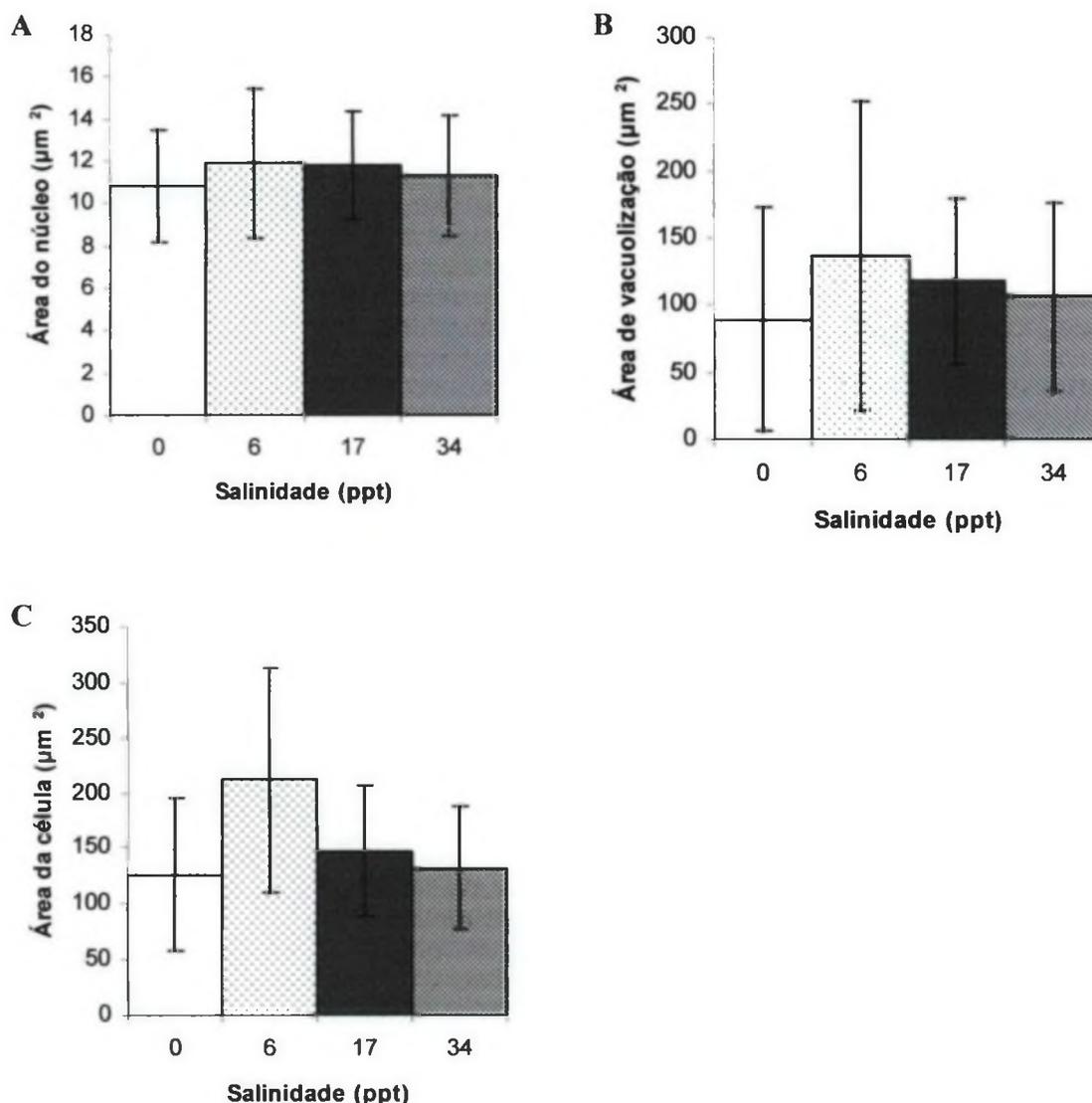


FIGURA 16. COMPARAÇÃO DA ÁREA DO NÚCLEO, DE VACUOLIZAÇÃO E DA CÉLULA ENTRE AS DIFERENTES SALINIDADES NO TEMPO DE QUARENTA E OITO HORAS. (A) O núcleo não mostrou diferença significativa entre as quatro salinidades. (B) Houve diferença significativa de vacuolização entre as diferentes salinidades. (C) A área das células apresentaram uma variação significativa entre as salinidades (Considerando $p \leq 0.05$).

Após as noventa e seis horas, todas as salinidades apresentaram alguma variação significativa em pelo menos em uma de suas salinidades. Nesse momento a concentração de 6ppt mostrou-se uma acentuada média nas áreas de vacuolização e celular (Fig. 17).

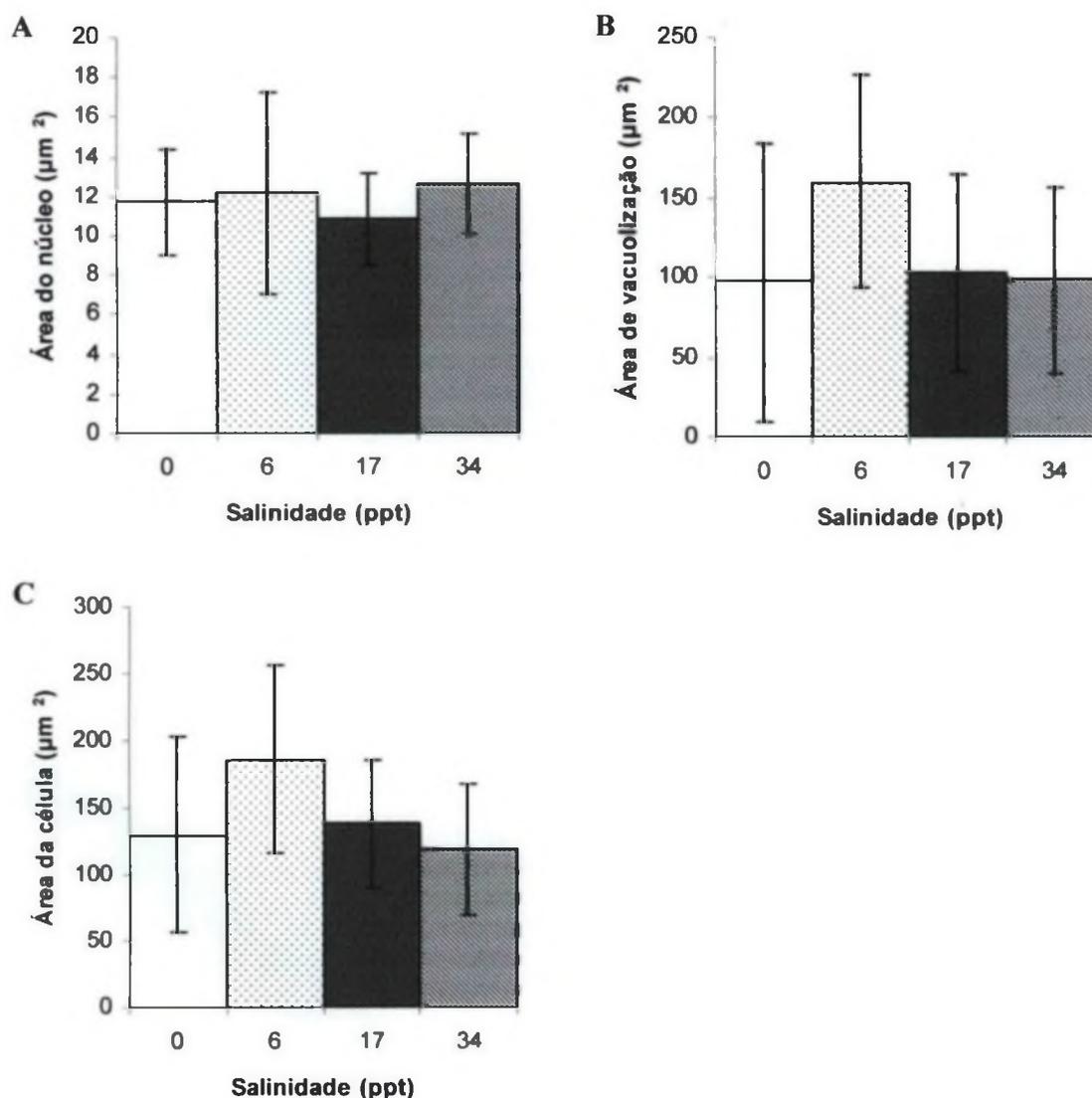


FIGURA 17. COMPARAÇÃO DA ÁREA DO NÚCLEO, DE VACUOLIZAÇÃO E DA CÉLULA ENTRE AS DIFERENTES SALINIDADES NO TEMPO DE NOVENTA E SEIS HORAS. (A) Houve diferença significativa entre as quatro salinidades para a área dos núcleos. (B) Houve diferença significativa de vacuolização entre as diferentes salinidades. (C) A área das células apresentaram uma diferença significativa entre as salinidades (Considerando $p \leq 0.05$).

5. DISCUSSÃO

Quando o equilíbrio homeostático das células é rompido pelo efeito de uma agressão, as células podem sofrer um processo regressivo, tendo o seu metabolismo reduzido e, portanto sua função diminuída. As alterações regressivas constituem em patologia geral, as degenerações ou lesão reversível (MONTENEGRO, 1995).

Existindo uma diminuição da função celular é compreensível que se acumule dentro da célula uma série de substâncias como: água (degeneração hidrópica), proteínas (degeneração hialina), muco (degeneração mucóide), carboidratos (degeneração glicogênica) e lipídeos (degeneração lipídica). As três últimas, quando processadas histologicamente e coradas por hematoxilina e eosina, podem ser vistas na forma de vacúolos (MONTENEGRO, 1995).

Foi constatado na maioria dos hepatócitos de todas as salinidades, no tempo inicial de 12 horas, uma grande vacuolização, mostrando que as amostras já possuíam essa característica, antes mesmo do início do experimento.

Em um trabalho morfológico realizado em São Francisco do Sul, SC, mostrou uma alta concentração de lipídeos no fígado da espécie *Bathygobius soporator* (CAVALERI, 2004). Possivelmente as vacuolizações existentes no material do presente trabalho são devidas às gotas lipídicas, que foram dissolvidas durante a preparação histológica. Eletromicrografias estão sendo realizadas para confirmar a natureza do material.

Degeneração lipídica é classicamente descrita como relativamente uma média alteração devido a uma excessiva ou não balanceada dieta ingerida de lipídeos, na qual satura a capacidade fisiológica do fígado de mobilizá-los, tendo como consequência a deposição de gotas de lipídeos, principalmente triglicerídeos, que são fortemente influenciados pela composição de ácidos graxos de sua alimentação (RANDALL, 1969; SPISNI, 1998; SANTOS, 1993 *apud* NANTON, 2001).

Alimentos de origem artificial, produzidos industrialmente, costumam provocar degeneração lipídica, diferentemente dos alimentos naturais, que não possuem efeitos degenerativos no fígado (SPISNI, 1998). A falta de vitamina E (BELL, 2000) e diferentes dietas (CRAIG, 1995; SPISNI, 1998) também podem provocar um acúmulo lipídico no fígado.

Para alimentação dos animais foi utilizada uma alimentação industrializada. Essa dieta pode ter provocado um excesso de calorías ou então ter provido ácidos graxos que impedem uma ótima oxidação pelas mitocôndrias ou pelos peroxissomos, resultando em um acúmulo.

Segundo SPISNI (1998), peixes teleósteos marinhos parecem não ter resposta proliferativa de peroxissomos, e essa é provavelmente uma das contribuições para o acúmulo

de lipídeo e da subsequente degeneração lipídica. Em um estudo com *Melanogrammus aegle*, o autor sugere que o acúmulo de lipídeo no fígado é devido à incapacidade do fígado oxidar longas cadeias mono-insaturadas advindas da dieta (NANTON, 2001).

Sabe-se que contaminantes, como os pesticidas organoclorados, organofosfatados (BRAUNBEVK, 1990 apud SPINI, 1998; RODRIGUES, 1998) e outros poluentes (PIERCE, 1980; SOLANGI, 1982; KRANZ, 1985) produzem a degeneração lipídica, mas não se sabe como a patologia liga-se com a dieta do peixe.

A região de coleta é uma área que possivelmente recebe afluentes antropogênicos devido a sua localização próxima as cidades de Guaratuba e Caiobá (Fig. 2). Uma análise química da água seria necessária para verificar a existência de possíveis poluentes.

Em todos os tempos da salinidade de 34 ppt ocorreram a vacuolização dos hepatócitos, em maior ou menor grau. Nas primeiras 24 horas as células, assim como os vacúolos apresentaram um aumento de área em média, mas em seguida houve uma queda até o período de 96 horas (Fig. 7).

Em algumas espécies, o hormônio da tireóide suporta a ação do hormônio de crescimento e do cortisol, na promoção da aclimação à água salgada (MACCORMICK, 2001). Os receptores do hormônio da tireóide têm sido achados no fígado de diversos peixes (EALES, 1988 apud WOOD, 1995). Existem evidências do envolvimento desses hormônios com o metabolismo de lipídeo nos peixes.

Em alguns estudos com a tireóide foi encontrado um aumento no depósito de lipídeos no fígado de algumas espécies de peixes (RANDALL, 1979). O hormônio do crescimento e os corticosteróides também aumentam a mobilização de gordura dos depósitos, produzindo fígado gorduroso (MONTENEGRO, 1995).

Em uma aclimação a uma alta salinidade, assim como o hormônio da tireóide, o GH e o cortisol podem ter influenciado na osmorregulação e, por conseguinte, no aumento do depósito de lipídeos no tecido hepático durante as primeiras 24 horas. Após esse tempo pode ter havido uma diminuição na secreção desses hormônios e assim conseqüentemente a redução do tamanho celular e da vacuolização. Assim se faz necessário uma verificação desses hormônios no plasma, para uma possível variação de suas concentrações.

Com a diminuição da área vacuolizada, e conseqüentemente da área celular, em 48 horas os hepatócitos dos animais expostos à salinidade 34 ppt possuíam essas medidas acima somente dos animais da concentração 0ppt (Fig.16), mas em 96 horas as células já possuíam as menores medidas dentre todas as salinidades (Fig. 17).

Os animais do experimento de 17ppt., assim como os de 0 ppt, não mostraram uma variação significativa ao longo dos tempos, sendo que o primeiro apresentou valores mais alto do que o segundo. Além da menor vacuolização, essas concentrações também apresentaram uma menor incidência de outras alterações, como infiltração leucocitária e necrose (Fig. 18).

Essa variação não significativa e o baixo número de alterações indicam que nessas condições os espécimes apresentam uma condição mais estável durante esse experimento agudo, na qual foi possível controlar e estabilizar os processos fisiológicos a essas condições, sem aumentar ou diminuir substancialmente os depósitos materiais.

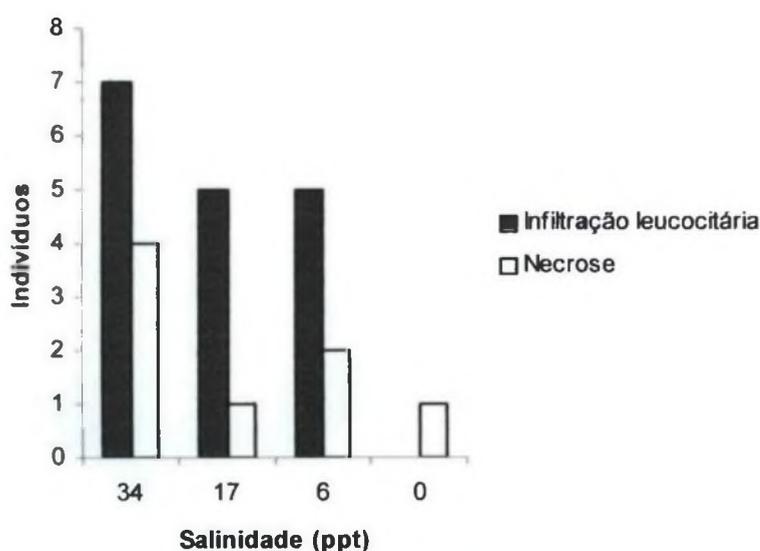


FIGURA 18. NÚMERO TOTAL DE INDIVÍDUOS QUE APRESENTARAM ALTERAÇÕES NAS DIFERENTES SALINIDADES DE UM TOTAL DE 27 DE INDIVÍDUOS PARA CADA CONCENTRAÇÃO.

Os animais da concentração de 6ppt obtiveram uma resposta inversa aos animais na salinidade 34 ppt, isto é, aumentaram as medidas celulares e de vacuolização com o passar do experimento.

O metabolismo lipídico é principalmente regulado pelo fígado, incluindo a síntese ou a degradação dos ácidos graxos (HENDERSON 1996 *apud* CABALLERO, 2004). Em algumas espécies de peixes o fígado apresenta o maior órgão que reserva lipídeos, e dependendo da época do ano, extensas infiltrações de lipídeos no parênquima hepático ocorrem, as quais não são consideradas patológicas (RANDALL, 1969; KALOGEROPOULOS, 1992 *apud* SPISNI, 1998).

As degenerações lipídicas são reações reversíveis dos hepatócitos para um novo estado metabólico, correspondendo a adaptações em curto tempo. Mas quando a infiltração hepática excede o limite da capacidade típica da espécie considerada, uma síndrome severa ocorre, podendo levar a necrose caso o agente responsável não seja interrompido. (KAUSHIK, 1997 *apud* CABALLERO, 2004; KALOGEROPOULOS, 1992 *apud* SPISNI, 1998; MOSCONIBAC, 1990 *apud* FIGUEIREDO-SILVA, 2005).

O aumento significativo dos hepatócitos e de sua vacuolização na salinidade de 6ppt pode, com o passar do tempo provocar diversas patologias irreversíveis. Além do aumento de suas medidas, os espécimes submetidos a concentração de 6ppt mostraram a segunda maior incidência de alterações (Fig. 18), podendo ser essas, resultado da grande degeneração lipídica ocorrida.

O desvio padrão apresentou-se grande em todos os tempos e salinidades. Esse fato foi devido à metodologia adotada. Os hepatócitos medidos eram unicamente aqueles que possuíam núcleo visível, já que as células com núcleo aparente, teoricamente, seriam aquelas que possuíssem as suas maiores medidas. Mas como os núcleos estavam, geralmente, marginalizados devido à alta vacuolização, algumas células dimensionadas possivelmente não possuíam a sua maior área, mas apenas um pedaço do seu real tamanho. Como não havia como estipular e capturar somente medidas com as suas reais magnitudes foram escolhidos aleatoriamente os hepatócitos grandes e pequenos.

Assim as secções hepáticas que tivessem os hepatócitos mais heterogêneos, ou seja, com células que variavam muito de tamanho, por causa de um tecido com maior degeneração lipídica em suas células, resultariam em um alto desvio padrão. As secções do fígado que possuíssem uma maior homogeneidade, isto é, com células de tamanho semelhantes devido a uma baixa degeneração lipídica, resultariam em um menor desvio padrão.

A concentração 6ppt foi a que mais apresentou desvios de padrões altos, concordando assim com as altas médias obtidas de suas áreas de vacuolização e da célula ao longo dos tempos.

Como o hepatócito inchou devido a grande quantidade de vacúolos, o núcleo muitas vezes apresentava-se comprimido e irregular, o que proporcionou variações significativas e muitas vezes um grande desvio padrão. A concentração de 6 ppt mais uma vez apresentou dentre todas as salinidades, a maior taxa de variação. Todas essas características mostram que há uma menor adequação a essa concentração em relação às salinidades de 0ppt., 17ppt.

e 34 ppt., sendo que as duas primeiras melhor apresentaram os resultados nesse experimento agudo.

6. CONCLUSÃO

Através da microscopia óptica, o fígado do peixe *Bathygobius soporator*, nas diferentes concentrações e tempos, apresentou alterações morfológicas como grande degeneração lipídica, infiltração leucocitária e necrose, sendo que a primeira permaneceu constante na grande maioria dos espécimes.

Os animais mantidos em salinidade 34 ppt obtiveram a maior frequência de alterações nas células hepáticas, sendo que nas primeiras 24 horas os hepatócitos possuíam as maiores áreas de vacuolização e celular. Essa salinidade possivelmente não foi a mais adequada para essa espécie.

As salinidades 0ppt e 17ppt não mostraram uma significativa variação e as menores alterações morfológicas, parecendo ser aquelas de melhor adaptação da espécie.

Os hepatócitos da concentração 6ppt mostraram um aumento contínuo, assim como a área de vacuolização. Essa significativa mudança mostra a instabilidade dos peixes para com essa concentração em um experimento agudo e possivelmente, em longo prazo, poderá constituir uma patologia severa.

REFERÊNCIAS

BELL, J. G.; MCEVOY, J.; TOCHER, D.R. Depletion of α -tocopherol and astaxanthin in Atlantic salmon (*Salmo salar*) affects autoxidative defense and fatty acid metabolism. *The Journal of Nutrition*, v. 130, n. 7, 2000.

BERNET, D.; SCHMIDT, H.; MEIER, W.; BURKHARDT-HOLM, P.; WAHLI, T. **Histopathology in fish: proposal for a protocol to assess aquatic pollution.** [S.l.]: Journal of Fish Diseases, n. 22, p. 25 – 34, 1999.

BIGARELLA, J.J. **Contribuição ao estudo da planície costeira do Estado do Paraná.** Arquivos de Biologia e Tecnologia, v.1, p.75-11, 1946.

BJÖRNSSON, B.T. The biology of salmon growth hormone: from daylight to dominance. *Fish Physiology and Biochemistry*, v.17, p. 9–24, 1997.

BJÖRNSSON, B.T.; STEFANSSON, G.V.; BERGE, A.I.; HANSEN, T. STEFANSSON, G.V. Circulating growth hormone levels in Atlantic salmon smolts following seawater transfer: effects of photoperiod regime, salinity, duration of exposure and season. *Aquaculture*, v.168, p.121-137, 1998.

CAVALERI, L.; CELOLA, J.; DONATTI, L.; MARCHESI, R. Dados sobre a biologia reprodutiva e alterações morfológicas de *Bathygobius soporator* na foz do rio Acarai, São Francisco do sul, SC. **Resumos**, Curitiba, Coordenadoria de Editoração Científica – PROPPE, 16-19 nov. , 2004.

CABALLERO, M.J.; IZQUIERDO, M S, KJORSVIK, E.; FERNANDEZ, A. J.; ROSENLUND, G. Histological alterations in the liver of sea bream, *Sparus aurata* L., caused by short- or long-term feeding with vegetable oils. Recovery of normal morphology after feeding fish oil as the sole lipid source. *Journal of Fish Diseases*, v. 27, p. 531–541, 2004.

CALRK, G. **Staining producer.** Baltimore the Willians Wikins Co., 512p., 1981.

CRAIG, S.R.; GATLIN, D.M. Coconut oil and beef tallow, but not tricaprilyn, can replace menhaden oil in the diet of red drum (*Sciaenops ocellatus*) without adversely affecting growth or fatty acid composition. *The Journal of Nutrition*, v.125, p. 3041-3048, 1995.

CRAVEDI, J. P.; PARIS, A; PERDU-DURAND, E.; PRUNET, P. Influence of growth hormone on the hepatic mixed function oxidase and transferase systems of rainbow trout *Fish Physiology and Biochemistry*. v.4, n. 4, p. 259-266 , 1995.

CARVALHO FILHO, A. **Peixes da costa brasileira.** 3ed. São Paulo: Ed. Melru, p. 320, 1999.

EVANS, D.H. ; PIERMARINI, P. M; CHOE, K.P. The Multifunctional Fish Gill: Dominant Site of gas exchange, osmoregulation, acid-base regulation, and excretion of nitrogenous waste. *Physiol. Rev.* v. 85, p. 97–177, 2005.

FANTA, E. Behaviour and circadian rhythm of the fish *Bathygobius soporator* Valenciennes (Gobiidae) under the influence of environmental salinity and temperature. *Revta bras. Zool.* V. 14(1), p.221-224, 1997.

FIGUEIREDO-SILVA, A.; ROCHA, E.; DIAS, J.; SILVA, P.; REMA, P.; GOMES, E.; VALENTE, L.M.P. Partial replacement of fish oil by soybean oil on lipid distribution and liver histology in European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) and rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) juveniles. **Aquaculture Nutrition**, v.11, p. 147–155, 2005.

FROESE, R. & PAULY, D. Editors. 2006. **FishBase**. World Wide Web electronic publication. www.fishbase.org, version (01/2006).

HAENSLY, W.E.; NEFF, J.M. SHARP, J.R.; MORRISM, A.C.; BEDGOOD, M.F.; BOEM, P. D. Histopathology of *Pleuronectes platessa* L. from Aber Wrach and Aber Benoit, Brittany, France: long-term effects of the Amoco Cadiz crude oil spill. **Journal of Fish Diseases** v 5, p. 365, 1982.

HYBIA, T. **An atlas of fish histology: normal and pathological features**. Japão: Ed. Kodansha, 147 p., 1982.

JAKOBI, H. & SOUZA, E.A. **Contribuição ao conhecimento da pesca no Paraná**. Boletim da Universidade do Paraná- Zoologia, Curitiba, 2 (14): 329-358, 1968.

JOBLING, M. **Environmental biology of fishes**. Chapman & Hall: London, 1995.

KRANZ, H.; PETER, N. Pathological conditions in the liver of ruffe, *Gymnocephalus cernua* (L.), from the Elbe estuary. **Journal of Fish Diseases** v.8, p.13, 1985.

LAIZ-CARRIÓN, R.; SANGIAO-ALVARELLOS, S.; GUZMÁN, J.M.; RIO, M.P.M.; MÍGUEZ, J.M.; SOENGAS, J.L.; MANCERA, J.M. Energy metabolism in fish tissues related to osmoregulation and cortisol action. **Fish Physiology and Biochemistry**. v. 27, p.179–188, 2004.

LAIZ-CARRIÓN, R.; SANGIAO-ALVARELLOS, S.; GUZMÁN, J.M.; RÍO, M.P.M.; SOENGAS, J.L.; MANCERA, J.M. **Growth performance of gilthead sea bream *Sparus aurata* in different osmotic conditions: implications for osmoregulation and energy metabolism**. Espanha: Aquaculture, n.250, p. 849– 861, 2005.

LIMA, D.; FREITAS, J.E.P.; ARAUJO, M.E.; SOLE-CAVA, A.M. Genetic detection of cryptic species in the frillfin goby *Bathygobius soporator*. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**. v. 320, p. 211– 223, 2005.

LOVE, R.M. **The chemical biology of fishes**. London: Academic Press, v.2, 1980.

LOWE-MCCONNELL, R.H. **Ecological studies in tropical fish communities**. New York: P 03-05, 1987.

MANCERA, J.M.; MCCORMICK, S.D. Osmoregulatory actions of the GH:IGF axis in non-salmonid teleosts. **Comparative Biochemistry and Physiology: Part B**, v. 121, p. 43–48, 1998.

MCCORMICK, S.D. Ontogeny and evolution of salinity tolerance in anadromous Salmonids: hormones and heterochrony. **Estuaries**, v.17, p.26-33, 1994.

MCCORMICK, S. D. Endocrine control of osmoregulation in Teleost fish. **Amer. Zool. Massachusetts**, v. 41, p.781–794, 2001.

NANTON, D.A.; LALL, S.P.; MCNIVEN, M.A. Effects of dietary lipid level on liver and muscle lipid deposition in juvenile haddock, *Melanogrammus aeglefinus* L. **Aquaculture Research**, v.32 , p.225-234,2001.

MONTENEGRO, M.R.; FRANCO, M. **Patologia: processos gerais**. 3 ed. São Paulo: Atheneu, p.263, 1995.

ODUM, E.P. **Ecologia**. Rio de Janeiro: Guanabara, 1988.

PEDROSO, F.L.; JESUS-AYSON, E.G.T; CORTADO H.H.; HYODO S; AYSON, F.G. Changes in mRNA expression of grouper (*Epinephelus coioides*) growth hormone and insulin-like growth factor I in response to nutritional status. **General and Comparative Endocrinology**, v. 145, p. 237–246, 2006.

PIERCE, K.V., MCCAIN, B.B.; WELLINGS, S.R. Histopathology of abnormal livers and other organs of starry flounder *Platichthys stellatus* (Pallas) from the estuary of the Duwamish River, Seattle, Washington, U.S.A. **Journal of Fish Diseases**, v.3, p. 81-91, 1980.

POUGH, F.H.; JANIS, C.M. & HEISER, J.B. **A vida do vertebrados**. São Paulo: Atheneu, 1993.

RANDALL, D.J.; BURGGREN, W.; FRENCH, K. **Fisiologia animal: Mecanismos e adaptações**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000.

_____, D.J.; HOAR, H.S. ; BRETT, J.R. **Fish physiology**. New York: Academic Press, 1979.

RANKIN, J.C. & JENSEN F.B. **Fish ecophysiology**. London: Chapman & hall, 1993.

RICKLEFS, R.E. **A economia da natureza**. 3 ed. Guanabara Koogan, 470p, 1996.

RODRIGUES, E.L.; FANTA, E. Liver histopathology of the fish *Brachydanio rerio* Hamilton-Buchman after acute exposure to sublethal levels of the organophosphate Dimethoate 500. **Revta. Bras. Zool.**, v 15, p 441-450, 1998.

RUBIO, V.C. SA'NCHEZ-VA'ZQUEZ, F.J. MADRID, J.A. Effects of salinity on food intake and macronutrient selection in European sea bass. **Physiology & Behaviour**, v.85, p. 333-339, 2005.

SAKAMOTO, T.; HIRANO, T.. Expression of insulin-like growth factor I gene in osmoregulatory organs during seawater adaptation of the salmonid fish: possible mode of osmoregulatory action of growth hormone. **Proc. Natl. Acad. Sci.** v. 90, p. 1912–1916. 1993.

SAKAMOTO, T.; MCCORMICK, S.D. Prolactin and growth hormone in fish osmoregulation. **General and Comparative Endocrinology**, 2006.

SAUNDERS, R. L., FLETCHER, G. L.; HEW C. L. Smolt development in growth hormone transgenic Atlantic salmon. **Aquaculture**. v 168, p.177–193, 1998.

SCHMIDT-NIELSEN, K. **Fisiologia animal: Adaptação e meio ambiente**. São Paulo: Ed. Livraria Santos, 600 p, 1996.

SEIDELIN, M.; MADSEN, S.S.; BYRIALSEN, A.; KRISTIANSEN, K. Effects of Insulin-like Growth Factor-I and Cortisol on Na⁺, K⁺-ATPase expression in osmoregulatory tissues of Brown Trout (*Salmo trutta*). **General and Comparative Endocrinology**, v. 113, p. 331–342, 1999.

SOLANGI, M. A.; OVERSTREET, R. M. Histopathological changes in two estuarine fishes, *Menidia beryllina* (Cope) and *Trinectes maculatus* (Bloch and Schneider), exposed to crude oil and its water-soluble fractions. **Journal of Fish Diseases**, v.5, p.13-35, 1982.

SPISNI, E.; TUGNOLI, M.; PONTICELLI, A.; MORDENTINI, T.; TOMASI, V. Hepatic Steatosis in artificially fed marine teleosts. **Journal of fish diseases**, v.21, p. 177-184, 1998.

STRYER, L. **Bioquímica**. 3ed. Rio de Janeiro: GuanabaraKoogan, 1992.

TASSELL, J.V. Gobiidae Research institute. **Gobiidae.com**
Disponível em: http://gobiidae.com/FL_goby_project/FL_list.htm Acesso em: 26 de jun. 2006.

VENDEL, A.L. **Áreas rasas abertas e semi-fechadas em ambientes estuarinos: uma análise ictiofaunística**. Curitiba, 2004. Tese (Doutorado em Zoologia)- Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná

VIJAYAN, M.M.; RAPTIS, S.; SATHIYAA, R. Cortisol treatment affects glucocorticoid receptor and glucocorticoid-responsive genes in the liver of rainbow trout. **General-and-Comparative-Endocrinology**. v.132, p.256-263, 2003.

WANG, W.B.; LI, A.H.; CAI, T.Z.; WANG, J.G. Effects of intraperitoneal injection of cortisol on nonspecific immune functions of *Ctenopharyngodon idella*. **Journal of Fish Biology**., v.67, p. 779-793, 2005.

WOOD, C.M.; SHUTTLEWORTH, T.J. **Fish physiology: cellular and molecular approaches to fish ionic regulation**. San Diego: Academic Press, v. 14, 1995.