



UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
DEPARTAMENTO DE APOIO À PESQUISA
PROGRAMA INSTITUCIONAL DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA



ESTRUTURA, HISTOQUÍMICA E MORFOMETRIA DO EPITÉLIO
OPERCULAR DE TAMBAQUI (*Colossoma macropomum*) SOB
CONDIÇÃO DE ESTRESSE EM SISTEMA INTENSIVO DE CULTIVO

Bolsista: Violeta Bastos de Mattos Areosa, CNPq.

MANAUS
2012



UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
DEPARTAMENTO DE APOIO À PESQUISA
PROGRAMA INSTITUCIONAL DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA



RELATÓRIO FINAL
PIBIC: PIB-B/0044/2011

ESTRUTURA, HISTOQUÍMICA E MORFOMETRIA DO EPITÉLIO
OPERCULAR DE TAMBAQUI (*Colossoma macropomum*) SOB
CONDIÇÃO DE ESTRESSE EM SISTEMA INTENSIVO DE CULTIVO

Bolsista: Violeta Bastos de Mattos Areosa, CNPq.
Orientador: Dr. Oscar Tadeu Ferreira da Costa
Co-Orientador: Prof. Dr. Wallice Luiz Paxiúba Duncan

MANAUS
2012

Todos os direitos deste relatório são reservados à Universidade Federal do Amazonas, ao Núcleo de Estudo e Pesquisa em Ciência da Informação e aos seus autores. Parte deste relatório só poderá ser reproduzida para fins acadêmicos ou científicos.

Esta pesquisa, financiada pelo Conselho Nacional de Pesquisa – CNPq, através do Programa Institucional de Bolsas de Iniciação Científica da Universidade Federal do Amazonas, foi desenvolvida pelo Núcleo de Estudo e Pesquisa em Ciência da Informação e se caracteriza como sub projeto do projeto de pesquisa Bibliotecas Digitais.

RESUMO

Os sistemas de piscicultura estão em crescimento no Brasil, porém a condição de confinamento é estressante aos animais e o mau manejo dos tanques pode acarretar no acúmulo de excretas nitrogenadas como amônia, nitrito ou nitrato. O tambaqui (*Colossoma macropomum*) é uma das espécies mais cultivadas devido a sua rusticidade e fácil adaptação ao cativeiro. Um órgão bioindicador de fácil localização e respostas rápidas às alterações no meio ambiente é uma das metas nos estudos de toxicologia em peixes. O opérculo é uma placa óssea revestida por um epitélio opercular (EO) que possui funções protetora, íon regulatório, sensora e secretora de mucosubstâncias. Dos diversos tipos celulares encontrados no EO, as células mucosas foram escolhidas como sítio de estudo devido a sua importância no mecanismo de adaptação do peixe ao meio em que vive. Animais juvenis com massa aproximada de 35g foram divididos em dois tratamentos (controle e nitrito) com seis animais cada e mantidos em caçapas, supridos com contínuo fluxo de água fresca. O tratamento nitrito foi exposto a 0,04 mg/L de nitrito de sódio (NaNO_2) por um período de 96 horas. De acordo com os dados estereológicos obtidos, houve um aumento da porcentagem total de células mucosas produtoras de muco substâncias com glicoproteínas e glicogênio, ácidas sulfatadas e não sulfatadas ao se comparar os tratamentos controle e nitrito, demonstrando uma mudança no tipo de muco produzido. Além disso, a exposição ao nitrito resultou numa diminuição da espessura das membranas interna e externa do opérculo dos animais expostos a esse agente estressor. As alterações observadas indicam uma ação direta do nitrito sobre as células mucosas.

Palavras chaves: células mucosas, opérculo, tambaqui, estereologia

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	06
2. OBJETIVOS	08
2.1 Objetivo geral	10
2.2 Objetivos específicos	10
3. PROCEDIMENTOS METODOLÓGICOS	10
3.1 Local de captura	10
3.2 Protocolo experimental	11
3.3 Coleta das amostras de tecido.....	11
3.4 Estereologia	12
3.4.1 Volume relativo das células mucosas no epitélio opercular interno e externo.....	12
3.5 Análise estatística	13
4. RESULTADOS	14
4.1 Morfologia opercular.....	13
4.2 Estereologia	17
5. DISCUSSÃO	20
6. REFERÊNCIAS	23
7. CRONOGRAMA DE ATIVIDADES.....	28

1. INTRODUÇÃO

A piscicultura vem sendo bastante disseminada não só no Estado do Amazonas mas em todo o Brasil, principalmente nas regiões de clima quente, tornando-se um dos segmentos de maior crescimento da produção alimentar em âmbito global, sendo saudada como uma resposta para os problemas resultantes da diminuição das populações selvagens de pescado devido à sobrepesca e a outras causas. Essa prática permite o cultivo intensivo de diversas espécies, onde o tambaqui (*Colossoma macropomum*) se destaca regionalmente por ser uma das espécies da qual já se sabe o suficiente para o manejo dos estoques naturais e criação em cativeiro (ARAÚJO-LIMA & GOULDING, 1998).

O Tambaqui (*Colossoma macropomum*) , é uma espécie pertencente à família Serrasalmidae (Serrasalminae), nativo das bacias dos rios Solimões, Amazonas e Orinoco e amplamente distribuído na zona tropical da América do Sul. A espécie realiza migrações reprodutivas, tróficas e de dispersão. Durante a época de cheia entra na mata inundada, onde se alimenta de frutos ou sementes. Já na época de seca, os indivíduos jovens ficam nos lagos de várzea onde se alimentam de zooplâncton e os adultos migram para os rios de águas barrentas para desovar. Durante a desova não se alimentam, vivendo da gordura que acumularam durante a época cheia. Mesmo sendo considerado um animal rústico e de fácil adaptação à vida em cativeiro, ele ainda está vulnerável aos fatores que podem se alterar no meio de cultivo intensivo e que podem resultar na elevada mortalidade dos peixes.

O nitrito (NO_2^-) está entre as principais substâncias tóxicas causadoras de danos sistêmicos aos peixes. Os níveis de NO_2^- podem ser elevados em tanques de piscicultura devido a desequilíbrios nos processos de nitrificação e desnitrificação da amônia (LEWIS & MORRIS, 1986; JENSEN, 2003; KROUPOVA et al., 2005). Muitos fatores favorecem a acumulação de NO_2^- na água, como por exemplo: o pH, a temperatura, os níveis de O_2 dissolvido, a quantidade de bactérias nitrificantes e a contaminação por excretas nitrogenados (RUSSO & THURSTON, 1991). Desse modo, o NO_2^- torna-se tóxico aos peixes e seus efeitos sobre a fisiologia desses animais já se encontra bem documentado (JENSEN, 1995; 2003; KROUPOVA et al., 2005; SVOBODOVA et al., 2005). Sendo assim, conhecer a ação responsiva do epitélio opercular em exposição ao NO_2^- é uma das metas deste estudo. Altas concentrações de NO_2^- fazem com que o ferro ligado ao grupo Heme da hemoglobina (Hb) seja oxidado de ferroso para férrico, formando assim a metahemoglobina (MetHb), incapaz de transportar oxigênio. De maneira geral, o NO_2^- presente no ambiente atravessa a barreira branquial através do transporte ativo pelas células cloreto disseminadas nas brânquias e no epitélio opercular (GAINO et al, 1984), acumulando-se no plasma (BATH & EDDY 1980), por onde entra nos tecidos. A exposição aguda a esse agente tóxico vem sendo bastante documentada, mostrando que o mesmo afeta diversos órgãos-chave do peixe (como brânquias, fígado e rins), podendo causar anemia funcional, hipóxia e anemia hemolítica. Sendo assim, conhecer a ação responsiva do epitélio opercular em exposição ao NO_2^- é uma das metas deste estudo.

O opérculo é uma placa óssea dura encontrada nos peixes ósseos, cuja função é cobrir e proteger as brânquias. É composto de quatro ossos: o opércular, o preopércular, o interopércular, e o subopércular. Possui funções protetora, íon regulatória, sensora, secretora de mucosubstâncias e, em alguns casos, é um órgão acessório na respiração

(MITAL & WHITEAR, 1978). Tem uma estrutura relativamente simples, sendo revestido por uma camada de epitélio. Por ser uma estrutura sensível a alterações, o epitélio opercular (EO) têm sido usado como modelo para estudos de fluxo iônico em peixes (MARSHALL et al., 1997; ZADUNAISKY, 1997). É revestido por dois tipos diferentes de epitélio: o epitélio que reveste a superfície opercular voltada para a cavidade branquial, chamado aqui de epitélio interno; e o epitélio que reveste a superfície opercular em contato direto com o meio, que será chamado de epitélio externo. Apresentam diversos tipos celulares nessas regiões: células pavimentosas, células cloreto, células mucosas, células club, linfócitos, melanócitos e grupamentos sensoriais (botões gustativos e órgãos ampulários). Os tipos celulares que estão envolvidos diretamente na elaboração de muco de superfície serão o objeto de estudo desse projeto.

O interesse no epitélio opercular é direcionado principalmente ao comportamento das células pavimentosas e cloreto nos peixes. No entanto, as células mucosas também tem uma função no mecanismo de adaptação. Atualmente sabe-se que a camada de muco que recobre as superfícies expostas ao meio é importante não só devido à sua eficiência como barreira protetora (LAURENT, 1984; MCCAHERN et al., 1987), mas também como células ionoreguladoras (HANDY et al., 1989), aumentando assim a difusão de íons (SHEPARD, 1982). Todas as funções da camada de muco estão intimamente relacionadas com o tipo de glicoproteínas produzidas pelas células mucosas (GONA, 1979).

O muco de peixes está envolvido em muitas atividades biológicas, como na respiração, regulação iônica e osmótica, defesa contra doenças e perturbações ambientais, reprodução e até mesmo em sua locomoção (SHEPARD, 1994). É composto por ácido silílico, responsável pela redução do pH, glicoconjugados e muitos

outros compostos, sendo um dos principais componentes as glicoproteínas (GPs), que são elaboradas pelos componentes celulares do epitélio mucoso e inclui GPs neutras, ácidas sulfatadas e ácidas não sulfatadas. No caso das células mucosas presentes no epitélio opercular, as secreções possuem uma estrutura molecular heterogênea que mantém relação com as condições ecofisiológicas da espécie (MITTAL et al., 2002). Uma característica interessante é que nos peixes, as células mucosas são únicas em suas características histológicas, tamanho e número. Estudos feitos com esse muco vêm mostrando que a composição do mesmo varia em aparência e composição entre as espécies e também em resposta à mudanças de salinidade e aos diferentes estágios patológicos de alguma doença.

Encontrar modelos experimentais que funcionem como bioindicadores é fundamental em estudos toxicológicos. O epitélio opercular de tambaqui pode representar uma região repleta de informações sub-exploradas para o entendimento da fisiologia de peixes. Várias evidências tem mostrado que as alterações nas populações celulares nas brânquias são refletidas no epitélio plano do opérculo (LAURENT & HEBIBI, 1988; EVANS et al. 2005), o que torna essa região singular para se avaliar danos causados por agentes estressores.

O tambaqui, por ser um peixe muito conhecido e apreciado na culinária regional, vem sendo bastante disseminado na piscicultura, tornando-o ideal para um estudo voltado para as alterações morfológicas causadas por agentes estressores como o NO_2^- , que tem o potencial para influenciar de forma negativa a produção dessa espécie em cativeiro.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Realizar um estudo sobre a estrutura, histoquímica e morfometria do epitélio opercular em tambaqui (*Colossoma macropomum*) em condições normais de cativeiro e sob condições de estresse (exposição ao NO_2^-)

2.2 Objetivos específicos

As principais análises serão para:

- i) Descrever a estrutura do epitélio opercular;
- ii) Evidenciar os mucopolissacarídeos no epitélio opercular;
- iii) Diferenciar o conteúdo dos diferentes componentes celulares (neutros, ácidos sulfatados e ácidos não sulfatados);
- iv) Analisar por morfometria as regiões internas e externas do epitélio opercular;
- v) Comparar os resultados entre os tratamentos controle e após exposição ao NO_2^- .

3. PROCEDIMENTOS METODOLÓGICOS

3.1 Local de captura

Exemplares juvenis de tambaqui, oriundos da Estação de Piscicultura de Balbina (Presidente Figueiredo – AM) vinculada a Secretaria de Produção Rural (SEPROR) foram utilizados neste estudo (massa aprox. 45 g). Após a coleta, os peixes foram mantidos por, no mínimo, 4 semanas antes do início dos experimentos em caçapas supridos com contínuo fluxo de água fresca e aerada (tensão de oxigênio, $\text{pO}_2 > 130$ mmHg) no laboratório de Aquicultura, na Universidade Federal do Amazonas - UFAM.

Os peixes foram alimentados diariamente com ração comercial, porém, a mesma foi suspensa dois dias antes do início dos experimentos. Verificações diárias no estado de saúde dos animais foram realizadas (condição das nadadeiras, brânquias e pele quanto à presença de erosões, parasitas e sintomas de infestação por bactérias) e somente animais aparentemente saudáveis foram utilizados nos experimentos.

3.2 Protocolo experimental

Os experimentos foram conduzidos em caçapas de 80 Litros com fluxo contínuo de água aerada e com a mesma composição química utilizada na aclimatação. O seguinte protocolo experimental foi adotado:

- a. Tratamento 1: grupo controle (N=5), água isenta de NO_2^- .
- b. Tratamento 2: grupo exposto ao NO_2^- (N=5), adição de nitrito de sódio (NaNO_2 ; Merck) até a concentração de 0,04 mM NO_2^- . Essa concentração representa 31% da LC_{50} 96 h NO_2^- estimada para o tambaqui (0,13 mM) no estudo de COSTA et al., (2000). A concentração de NO_2^- foi ajustada segundo o método colorimétrico da sulfanilamida-naftalenodiamino (STRICKLAND & PARSONS, 1972).

Em cada tratamento as condições foram mantidas por 96 horas com monitoramento constante das condições físico-químicas.

3.3 Coleta das amostras de tecido

Após o período de exposição, os peixes foram anestesiadas (MS-222 tamponado) e imediatamente sacrificados através de contusão na região cefálica. Após esta etapa, todos os animais foram pesados e medidos (comprimento padrão e total) antes da coleta dos tecidos. Os opérculos foram coletados e fixados *in situ* por imersão em solução de formol aldeído tamponado (pH 7,8; osmolaridade, aproximadamente 300mOsmol). Seções de

historesina foram cortadas a espessura de 6mm por meio de um micrótomo Leica (RM 2145). As seções foram coradas com hematoxilina-eosina (para o estudo da organização opercular geral), PAS (reação de Schiff com o ácido periódico para evidênciação de glicoproteínas e glicogênio), alcian blue pH 1,0 (para evidênciação de mucosubstâncias ácidas sulfatadas) e alcian blue pH 2,5 (para evidênciação de mucosubstâncias ácidas não sulfatadas). As seções foram examinadas através de um microscópio Olympus BX-41 equipado com uma câmara digital Nikon Coolpix-5400 (Japão). As medidas de espessura do epitélio foram realizadas com o uso do programa Sigma Scan (Jandel Scientific, USA).

3.4 Estereologia

Um sistema teste de contagem de pontos foi sobreposto sobre as seções histológicas segundo HOWARD & REED (2005). Os pontos foram computados ao coincidirem com: células mucosas e epitélio opercular. A densidade de volume (V_v) de cada componente foi determinado de acordo com:

$$V_v = \frac{\sum P_{\text{cél. mucosas}}}{\sum P_{\text{epitélio}}}$$

Onde: $\sum P_{\text{células mucosas}}$ equivale a soma dos pontos sobre determinada célula mucosa, que nesse trabalho são de dois tipos: células mucosas internas (encontradas no epitélio interno) e células mucosas externas (encontradas no epitélio externo) e $\sum P_{\text{epitélio}}$ equivale a soma de pontos sobre o epitélio opercular, que também é de dois tipos: interno e externo, com exceção daqueles sobre as células mucosas.

3.4.1 Volume relativo das células mucosas no epitélio opercular interno e externo

Estudou-se a densidade de volume (V_v) das células com mucosubstâncias com glicoproteínas e glicogênio, ácidas sulfatadas e ácidas não sulfatadas. Para tal, cinco campos microscópicos do opérculo de cada animal foram utilizados para a determinação da densidade de volume dos componentes estudados a serem estudados, sendo eles: as células mucosas presentes no epitélio interno e externo do opérculo em três diferentes colorações (PAS, Alcian blue pH 1,0 e Alcian blue pH 2,5). O V_v foi determinado por contagem de pontos, considerando-se os pontos que tocavam as células mucosas de acordo com a fórmula já mostrada anteriormente:

$$V_v = \frac{\sum P_{\text{cél. mucosas}}}{\sum P_{\text{epitélio}}}$$

Sendo V_v o volume de densidade dado em porcentagem de um dos componentes estudados neste projeto.

3.5 Análise estatística

O coeficiente de erro (C.E) foi usado para avaliar a variância do volume relativo dos componentes e foi baseado de acordo com GUNDERSEN et al. (1987), sendo

calculado de acordo com
$$C.E. = \frac{\sqrt{\text{Var noise} \sum (P) + \text{Var SURS} \sum (a)}}{\sum P}, \text{ onde:}$$

$\text{Var}_{\text{Noise}}(\sum P)$, a inexatidão do sistema teste é descrita por: $0,0724 \times (b/\sqrt{a}) \times \sqrt{n \times \sum P}$,

onde $(b/\sqrt{a})$ é a forma do perfil médio, n é o número de seções e $\sum P$ é a soma de todos os pontos contados; $\text{Var SURS} \sum (a)$ é a variância das somas das áreas através de uma amostragem aleatória sistemática uniforme (HOWARD & REED, 2005).

Os resultados foram apresentados como média $\pm$ erro padrão da média, E. P. M. Diferença estatisticamente significativa entre os tratamentos será detectada por meio de análise de variância one-way ANOVA seguida pelo t-teste de múltiplas comparações de Bonferroni. Diferença significativa será considerada quando $P < 0,05$.

4. RESULTADOS

4.1 Morfologia opercular

O opérculo de *Colossoma macropomum* apresenta a mesma estrutura descrita para outros teleósteos (Fig. 1).

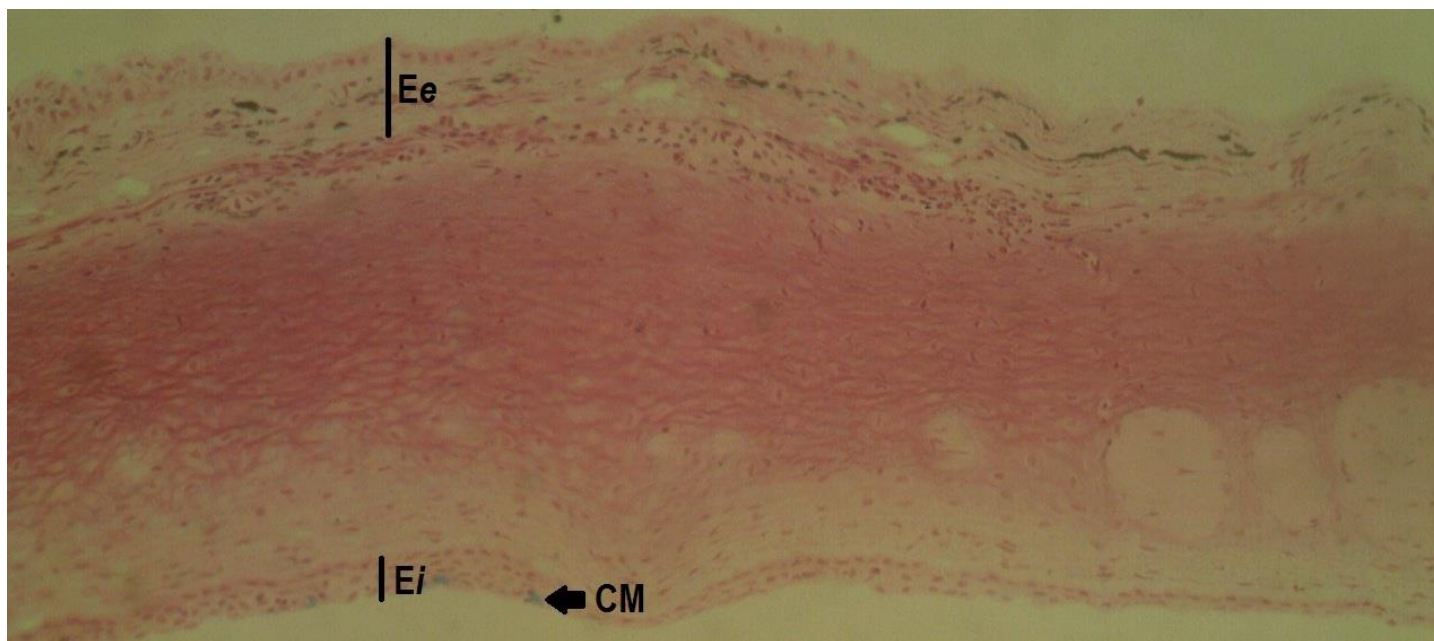
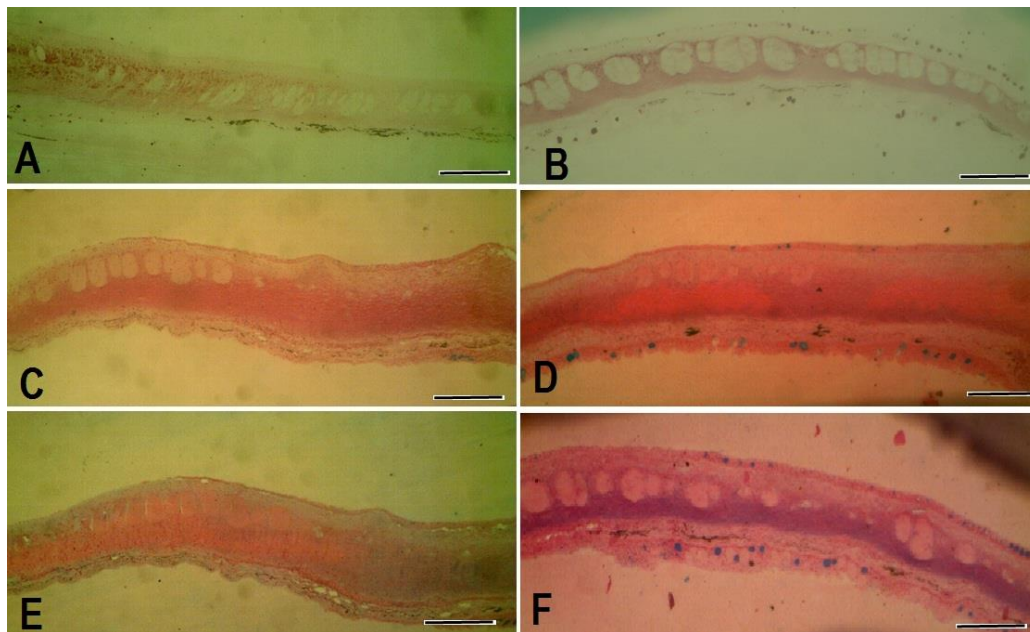


Fig. 1 Imagem de seção transversal do opérculo mostrando a organização geral dos epitélios interno (Ei) e externo (Ee). CM, células mucosas. Alcian Blue pH 1,0 em aumento de 20X.

O epitélio interno (Ei) e o epitélio externo (Ee) são estratificados, podendo ser grosseiramente divididos em três camadas principais: a superficial, a medial e a basal. Em relação a sua composição, tanto o Ei quanto o Ee são formados por células epiteliais



intercaladas por células mucosas, células club e por linfócitos. No caso do Ee, encontramos também células intrusivas e estruturas sensoriais.

Fig. 2 Conjunto de imagens em microscopia eletrônica em aumento de 10X comparando os tratamento controle (A,C e E) e nitrito (B, D e F) nos três métodos histoquímicos utilizados. A e B, PAS; C e D, Alcian Blue pH 1,0; E e F, Alcian Blue pH 2,5. Barra de escala 200μm.

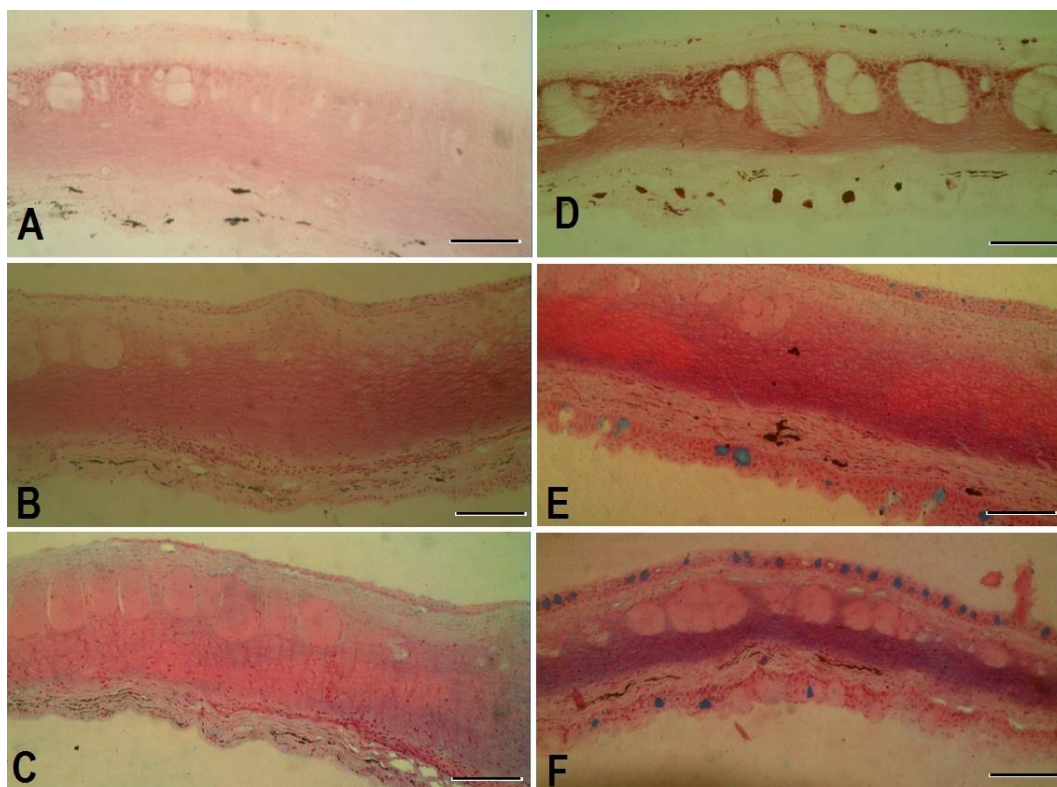


Fig. 3 Conjunto de imagens em microscopia eletrônica em aumento de 20X comparando os tratamento controle (A,B e C) e nitrito (D, E e F) nos três métodos histoquímicos utilizados. A e B, PAS; C e D, Alcian Blue pH 1,0; E e F, Alcian Blue pH 2,5. Barra de escala 100µm.

As células mucosas em ambos os epitélios do opérculo variam significativamente em densidade e dimensão de acordo com a região opercular em que se encontram. (Fig 2). Elas se abrem à superfície por poros estreitos através dos quais liberam suas secreções.

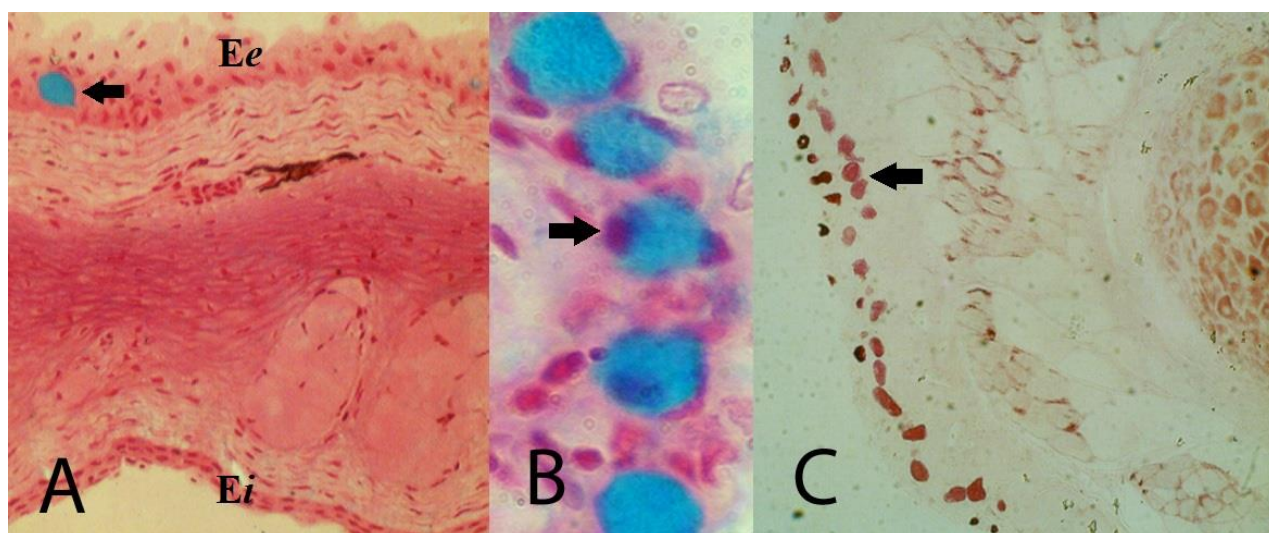


Fig. 4 Células mucosas no opérculo de *C. macropomum* sob microscopia ótica. A - Alcian Blue pH 2,5 20x; B - Alcian Blue pH 2,5 100x; C - PAS 40x.

As células club variam em quantidade, tamanho e forma, dependendo em que epitélio e região do opérculo se encontram. No Ei, elas são encontradas em pequenas quantidades, possuem forma arredondada ou comprimida verticalmente, sendo arranjadas em linha na parte inferior da camada medial do epitélio opercular. Já no Ee, elas aparecem mais frequentemente com forma arredondada, oval ou verticalmente alongadas, sendo arranjadas em linha na parte superior da camada basal do epitélio opercular.

4.2 Estereologia

Houve alteração significativa entre as densidade de volume das células mucosas presentes no epitélio interno coradas com PAS (Fig. 3).

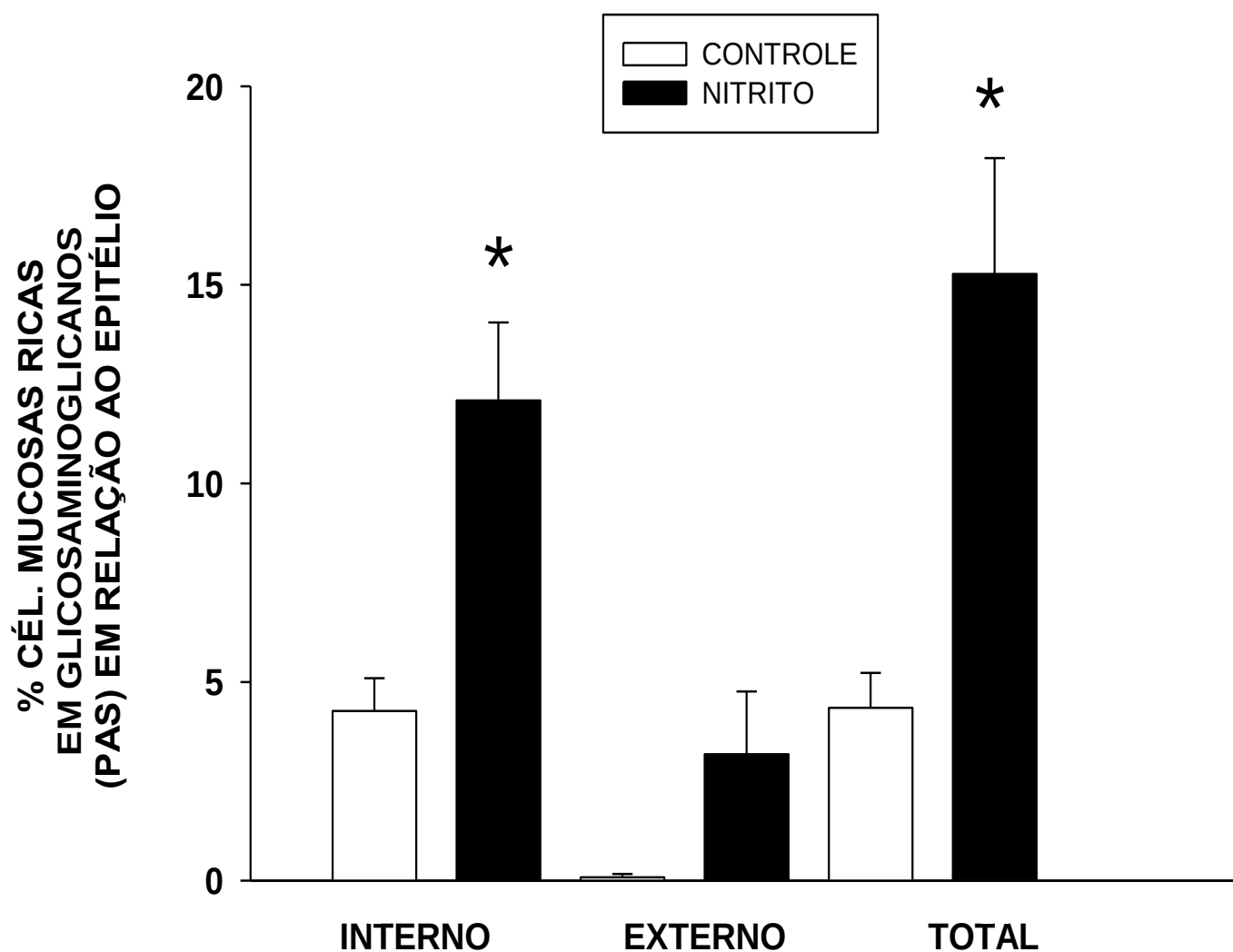


Fig. 3. Densidade de volume das células mucosas com glicoproteínas e glicogênio (PAS) no epitélio opercular interno e externo de *C. macropomum* do grupo controle e exposto ao NO_2^- (* indica diferença significativa em relação ao controle, $p < 0,05$)

Assim como no gráfico anterior, (PAS), a Fig. 4 mostra uma diferença significativa somente na população de células mucosas presentes no epitélio interno .

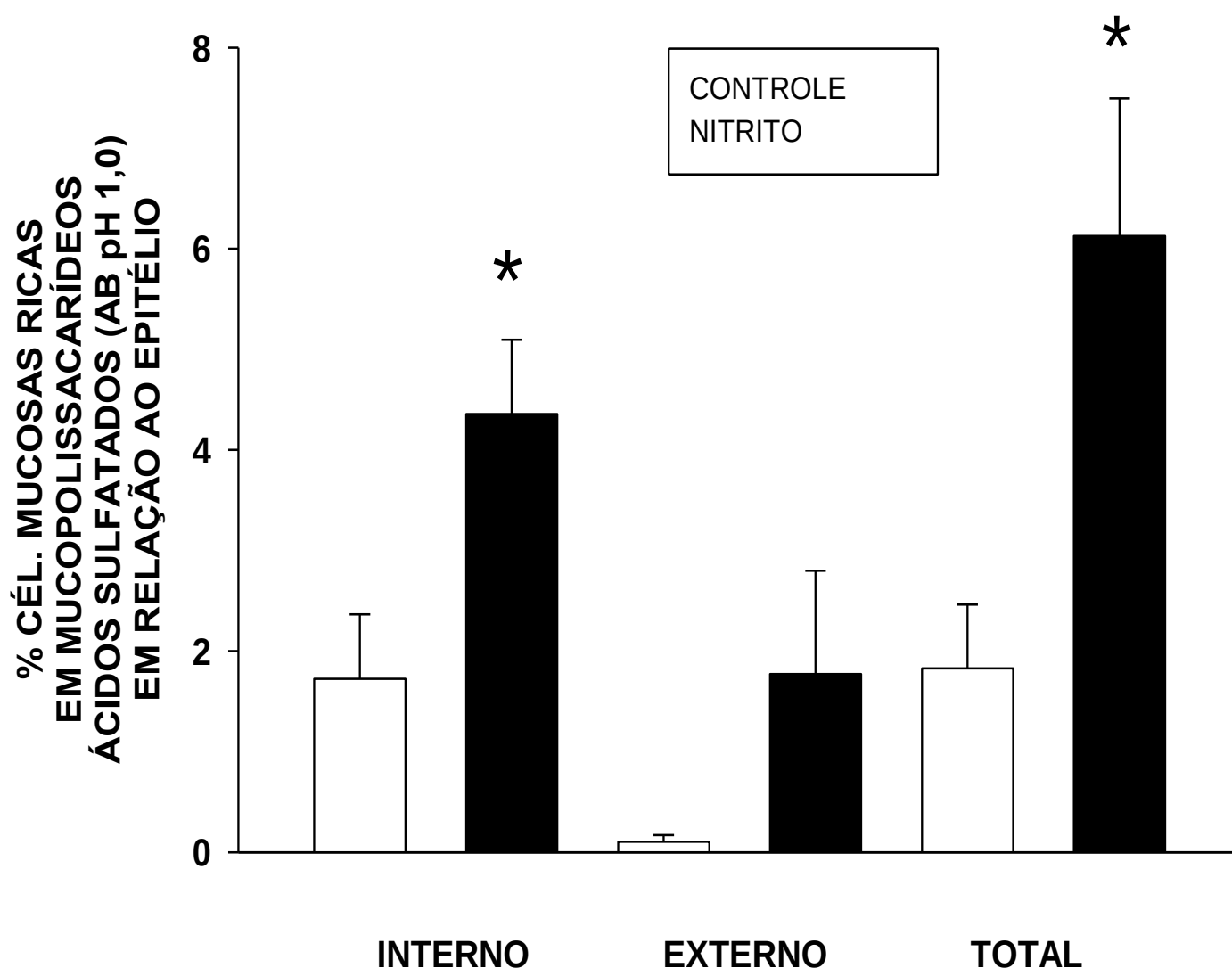


Fig. 4. Densidade de volume das células mucosas ácidas sulfatadas (alcian blue pH 1,0) no epitélio opercular interno e externo de *C. macropomum* do grupo controle e exposto ao NO_2^- (* indica diferença significativa em relação ao controle, $p < 0,05$)

E como pode-se ver no gráfico seguinte (Fig. 5), houve uma diferença significativa apenas no epitélio opercular externo, resultado contrário ao visto nos dois gráficos anteriores.

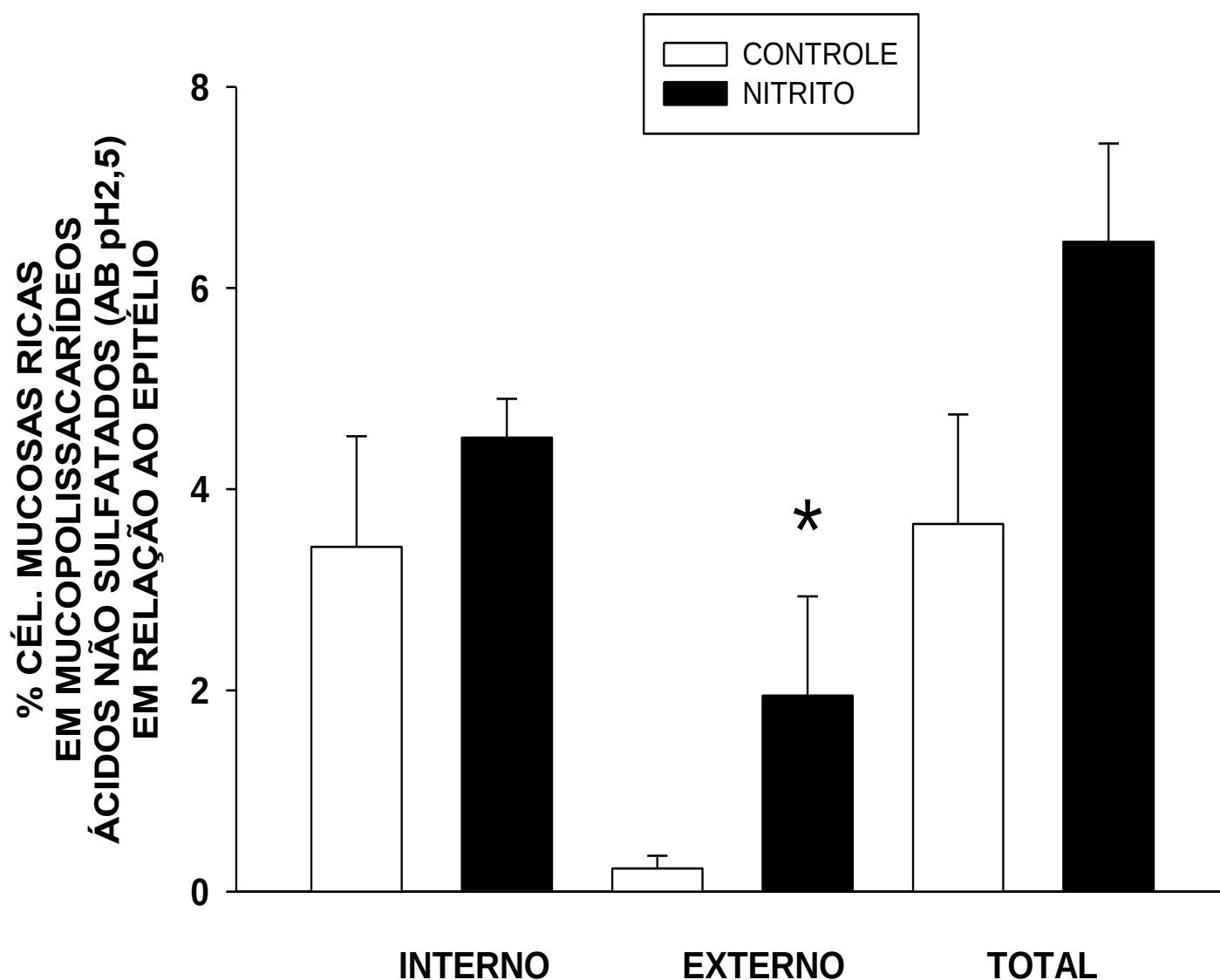


Fig. 5. Densidade de volume das células mucosas não-sulfatadas (alcian blue pH 2,5) no epitélio opercular interno e externo de *C. macropomum* do grupo controle e exposto ao NO_2^- (* indica diferença significativa em relação ao controle, $p < 0,05$)

Ao se compara a espessura das membranas operculares (Fig. 6), nota-se uma diminuição significativa das mesmas no tratamento nitrito se comparado com o tratamento controle.

ESPESSURA DOS EPITÉLIOS OPERCULARES

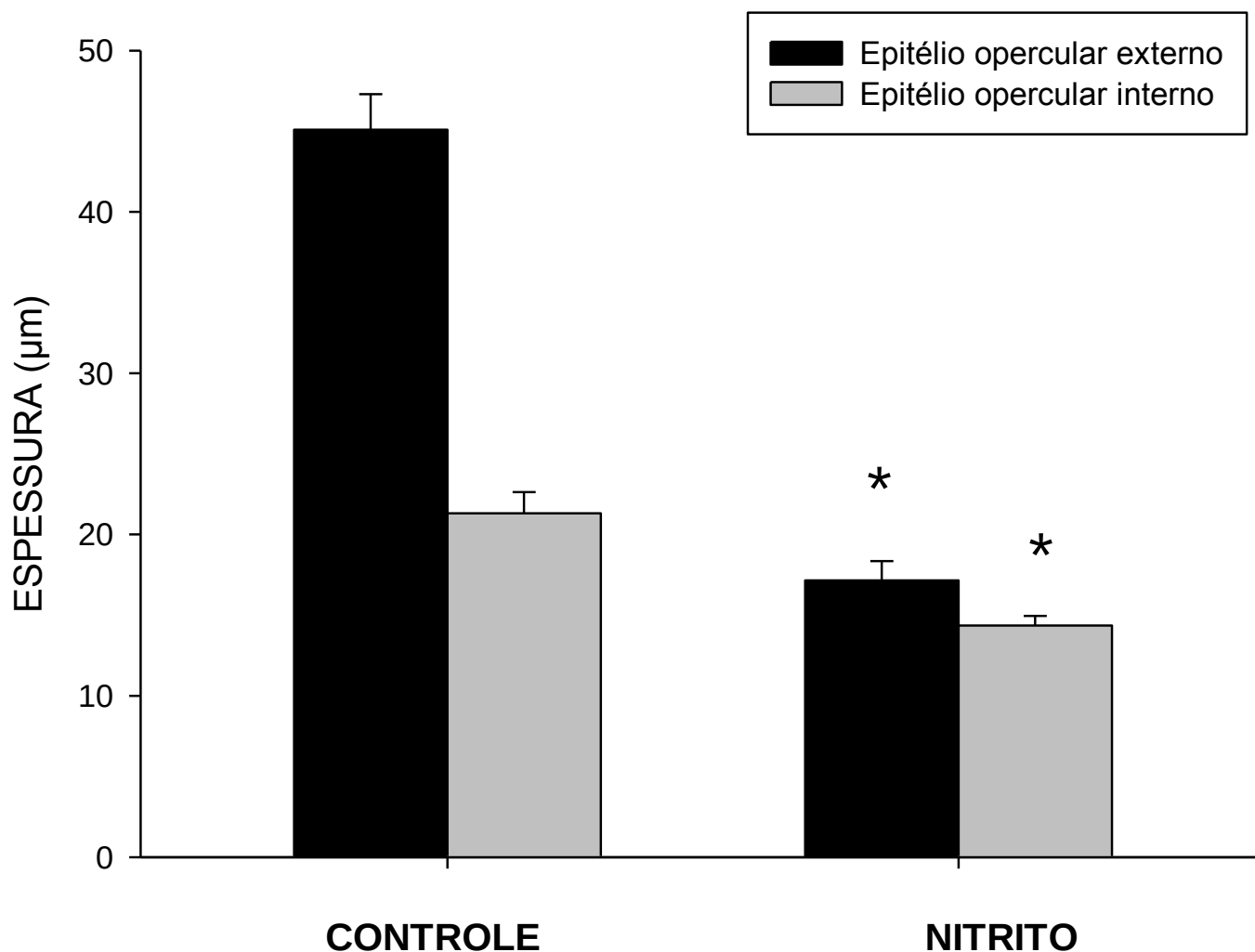


Fig. 6. Gráfico apresentando a comparação entre as espessuras das membranas operculares internas e externas entre os tratamentos nitrato e controle. (* indica diferença significativa em relação ao controle, $p < 0,05$)

5. DISCUSSÃO

Devido à rusticidade do tambaqui (*Colossoma macropomum*) e sua grande capacidade de adaptação às condições do meio, como alimentação e concentração de O_2 na água, fez com que o mesmo venha sendo bastante utilizado nas criações em cativeiro.

Vários estudos tem mostrado o efeito de agentes estressores sob os peixes em cultivo intensivo (ALMENDRAS, 1987; TRZEBIATOWSKI, 1981). No presente estudo o nitrito foi avaliado como potencial estressor do tambaqui por ser um agente que pode se desenvolver facilmente nos tanques de cultivo (SVOBODOVA et al, 2005, KROUPOVA et al, 2005).

Os componentes dos mucos diferem entre as espécies de teleosteos de acordo com o ambiente em que vivem. Além disso, sabe-se que os mucos produzidos pelas células mucosas tem um papel importante como barreira protetora e ionoreguladora, o que os tornam possíveis bioindicadores em peixes para o estudo dos mecanismos de adaptação a determinada alteração no meio.

De acordo com os dados estereológicos obtidos, houve uma alteração significativa na porcentagem total de células mucosas produtoras de mucosubstâncias com glicoproteínas e glicogênio e também aquelas produtoras de mucosubstâncias ácidas sulfatadas ao se comparar os tratamentos controle e nitrito (Fig 5 e 6). Dos três métodos histoquímicos utilizados para a determinação do tipo de muco produzido, constatou-se um aumento (hiperplasia) em da produção de muco com glicoproteínas e ácidas sulfatada no epitélio interno (Ei), enquanto que houve uma aumento de muco do tipo ácido não sulfatado apenas no epitélio externo (Ee) nos animais expostos ao nitrito, demonstrando assim uma mudança no tipo de muco produzido.

Além disso, a exposição ao nitrito resultou numa diminuição da espessura das membrana interna e externa do opérculo dos animais expostos a esse agente estressor. Essa diminuição pode ser relacionada com as células cloreto que representam o principal sítio de tomada de nitrito a partir do meio aquático. Embora esse projeto não tenha quantificado o número de células cloreto, mas levando em consideração que o

epitélio opercular reflete as alterações ocorridas nas brânquias, e que evidências prévias (COSTA et al, 2000), tem mostrado que a exposição ao nitrito resulta em desaparecimento das células cloreto do epitélio branquial, podemos especular que o mesmo fenômeno tenha ocorrido no epitélio opercular. a remoção prematura de células cloreto após exposição ao nitrito se dá, provavelmente, pelo encurtamento do tempo de vida dessas células resultante do aumento em seu metabolismo provocado pela presença do nitrito na água (MARGIOCCO et al, 1983; LEWIS & MORRIS, 1986).

Outros trabalhos sobre alterações nas células mucosas em peixes (PAUL & BANERJEE, 1997) sugerem que há um aumento da porcentagem dessas células por dois motivos. O primeiro está relacionado à sua função como barreira protetora física contra agentes estressores encontrados no meio (que neste trabalho é o nitrito), onde alguns dos componentes da mucosubstância podem vir a ter uma função desintoxicante, contendo a entrada das toxinas presentes no ambiente, retardando assim seus possíveis efeitos. Um outro motivo desse aumento na produção de mucosubstâncias com glicoproteínas, ácidas sulfatadas e ácidas não sulfatadas se deve à tentativa de se manter o equilíbrio iônico.

Os resultados obtidos nesse projeto estão de acordo não só com a literatura referente à alteração causadas ao opérculo em exposição a agentes estressores, mas também a estudos voltados para a ação dos mesmo agentes nas brânquias, onde também constatou-se um aumento no número de células mucosas e uma diminuição na camada epitelial, corroborando que as alterações nas populações celulares nas brânquias são refletidas no epitélio opercular (LAURENT & HEBIBI, 1988; EVANS et al. 2005), tornando-o um ótimo bioindicador para estudos toxicológicos.

Sendo assim, as alterações notadas no opérculo (hiperplasia das células mucosas), além do diminuição da espessura dos epitélios internos e externos demonstraram que a presença do nitrito em altas concentrações nos tanques de piscicultura não é vantajoso para o piscicultor pois vem associado a mudanças morfológicas no animal, o que diminui a qualidade do pescado e desfavorece a produção nos tanques de piscicultura.

6. REFERÊNCIAS

ALMENDRAS, J.M.E. Acute nitrite toxicity and methemoglobinemia in juvenile milkfish (*Chanos chanos* Forsskal). *Aquaculture* Volume 61, Issue 1, Pages 33-40,1 March 1987.

ARAÚJO-LIMA, C.A.R.M.; GOULDING, M. Os frutos do tambaqui: ecologia, conservação e cultivo na Amazônia. Tefé: Sociedade Civil Mamirauá; Brasília: CNPq, 186p, 1998.

BATH, R. N., EDDY, F. B.. Transport of nitrite across fish gills. *J. exp. Zool.* 214: 119-12. 1980.

COSTA, O. T. F., FERREIRA, D. J. S., MENDONÇA, F. L. P., AND FERNANDES, M. N. Acute toxicity of nitrite to freshwater teleost tambaqui, *Colossoma macropomum* (Teleostei, Serrasalminidae). *Comp. Biochem. Physiol. Supplement* 126B, 26, 2000.

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. **Physiological Review.** n. 85, p. 97–177, 2005.

GAINO E, ARILLO A, MENSI P. Involvement of the gill chloride cells of trout under acute nitrite intoxication. *Comp Biochem Physiol* 77 A: 611-617. 1984.

GONA, O. Mucous glycoproteins of teleostean fish: a comparative histochemical study. *Histochemical journal*, 11, pages 709-718. 1979.

GUNDERSEN, H.J.G. & JENSEN, E.B. The efficiency of systematic sampling in stereology and its prediction. **Journal of Microscopy.** n. 147, p. 229-263, 1987.

HANDY, R.D. and EDDY, F.B. Surface adsorption of aluminium by gill tissue and body mucus of rainbow trout, *Salmo gairdneri*, at the onset of episodic exposure. *J. Fish Biol* 34, 865-74. 1989.

HOWARD, C.V. & REED, M.G. **Unbiased stereology. Advanced Methods.** Oxford: BIOS Scientific Publishers. 2005

JENSEN F.B. Uptake and effects of nitrite and nitrate in animals. In: Walsh P.J., Wright P. (eds.): Nitrogen Metabolism and Excretion. CRC Press, Boca Raton. 289–303, 1995.

JENSEN F.B. Nitrite disrupts multiple physiological functions in aquatic animals. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part A*, 135, 9–24, 2003.

KROUPOVA, H., MACHOVA, J., SVOBODOVA. Z. Nitrite influence on fish: a review. *Vet. Med. – Czech*, 50, (11): 461–471 Review Article, 2005.

LAURENT, P. Gill internal morphology. In Hoar, W.S. and Randall, D.J., eds. *Fish Physiology*, Vol. XA. Orlando FL: Academic Press, pp. 73-183. 1984.

LAURENT, P., and HEBIBI, N. Gill morphology and osmoregulation. *Can. J. Zool.* 67: 3055–3063. 1988.

LEWIS, W. M. AND MORRIS, D. P. Toxicity of nitrite to fish: A review. *Trans. Am. Fish. Soc.* 115, 183-195, 1986.

MCCAHERN, C., "Fuzzy set theory applied to production and inventory control", Ph.D. Dissertation, Kansas State University, Manhattan, KS. 1987

MARSHALL, W.S., BRYSON, S.E., DARLING, P., WHITTEN, C., PATRICK, M., WILKIE, M., WOOD, K., and BUCKLAND-NICKS, J. 1997. NaCl transport and ultrastructure of opercular epithelium from a freshwateradapted euryhaline teleost, *Fundulus heteroclitus*. J. Exp. Zool. **277**: 23-37.

MARGIOCCO, C., ARRILO, A., MENSI, P., AND SCHENONE, G. Nitrite bioaccumulation in *Salmo gairdneri* Rich. and hematological consequences. Aquatic Toxicol. 3, 261-270, 1983.

MITTAL, A.K. AND WHITEAR, M. 1978. A note on cold anaesthesia of poikilotherms. J. Fish. Biol. 13: 519–520.

PAUL, I., and BANERJEE, T. K. Histopathological changes induced by ambient ammonia (ammonium sulphate) on the opercular linings of the catfish *Heteropneustes fossilis*. DISEASES OF AQUATIC ORGANISMS. Vol 28, 151-161. 1997.

RUSSO R.C., THURSTON R.V. Toxicity of ammonia, nitrite and nitrate to fishes. In: Brune D.E., Tomasso J.R. (eds.): Aquaculture and Water Quality. World Aquaculture society, Baton Rouge, Louisiana. 58–89, 1991.

SHEPHARD, K.L. (1982) The influence of mucus on the diffusion of ions across the esophagus of fish. *Physiol. Zoot* 55, 23-34.

SHEPHARD, M.S.; BOTTASSO, C.L.; H. L. DE COUGNY, M. DINDAR, J. E. FLAHERTY, C. ÖZTURAN, Z. RUSAK. Compressible aerodynamics using a parallel adaptive time-discontinuous Galerkin least-squares finite element method. No. 94-1888, Colorado Springs, 1994.

STRICKLAND, J. D. H. AND PARSONS, T. R. A Practical Handbook of Seawater Analysis. Fish. Res. Bd. Canada Bulletin 167, 1972.

SVOBODOVA Z., MACHOVA J., POLESZCZUK G., HUDA J., HAMACKOVA J., KROUPOVA H. Nitrite poisoning of fish in aquaculture facilities with water-recirculating systems: three case studies. *Acta Veterinaria Brno*, 74, 129–137, 2005.

TRZEBIATOWSKI, R.; FILIPIAK, J.; JAKUBOWSKI, R. Effect of stocking density on growth and survival of rainbow trout (*Salmo gairdneri* Rich). *Aquaculture*, Amsterdam, v. 22, p. 289-295, 1981.

7. CRONOGRAMA DE ATIVIDADES

Nº	Descrição	Ago 2010	Set	Out	Nov	Dez	Jan 2011	Fev	Mar	Abr	Mai	Jun	Jul
	Coleta			R	R								
	Experimentos			R	R	R							
	Análise química da água			R	R								
	Processamento de amostras				R	R	R	R					
	Análise estereológica (volumes relativos)						R	R					
	Análise dos resultados					R	R	R	R	R			
	Revisão bibliográfica	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	
	- Elaboração do Resumo e Relatório Final (atividade obrigatória) - Preparação da Apresentação Final para o Congresso (atividade obrigatória)												R

R: Realizados

X: Por realizar