

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

AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE DE DIFUSÃO DE O₂ E CO₂ NAS
BRÂNQUIAS DE TAMBQUI (*Colossoma macropomum*) SOB CONDIÇÃO
DE ESTRESSE EM SISTEMA INTENSIVO DE CULTIVO: UM ESTUDO
ESTEREOLÓGICO

BOLSISTA: Paloma Fernandes de Souza, CNPq

Manaus

2011

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

RELATÓRIO FINAL - PIB-B/0061/2010

AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE DE DIFUSÃO DE O₂ E CO₂ NAS
BRÂNQUIAS DE TAMBAQUI (*Colossoma macropomum*) SOB CONDIÇÃO
DE ESTRESSE EM SISTEMA INTENSIVO DE CULTIVO: UM ESTUDO
ESTEREOLÓGICO

Bolsista: Paloma Fernandes de Souza, CNPq

Orientador: Prof. Dr. Oscar Tadeu Ferreira da Costa

Co-orientador: Prof. Dr. Wallice Luiz Paxiúba Duncan

MANAUS

2011

Resumo

Os sistemas de piscicultura estão em crescimento no Brasil, porém, a condição de confinamento é estressante aos animais, o mau manejo dos tanques pode levar a fatores como a alta densidade de estocagem (ADE) e/ou ao acúmulo de excretas nitrogenadas como amônia, nitrito ou nitrato. O tambaqui (*Colossoma macropomum*) é uma das espécies mais cultivadas, e é bastante conhecido por sua rusticidade e fácil adaptação ao cativeiro. A brânquia é um órgão importante nessa rusticidade e é responsável pela troca gasosa e iônica, também possui alta plasticidade para se adaptar a condições diversas. Através de dados estereológicos foi possível avaliar a capacidade de difusão gasosa máxima do animal quando se encontra exposto a ADE ou ao nitrito. Animais juvenis de massa aproximada de 150g foram expostos a 0,3 mg/L de nitrito ou a alta densidade de estocagem, onde o máximo aceitável para este tipo de sistema de cultivo é de 1,5 kg/m³, portanto a densidade utilizada neste trabalho foi de 2,0 Kg/m³ pelo período de 96 horas. Um lado completo das brânquias foi coletado para análises estereológicas. Nos animais expostos ao nitrito verificou-se a redução da barreira de troca gasosa e da área de superfície. A ADE danificou os animais mais agressivamente, pois o contato físico causou estresse mecânico e maior diminuição tanto da barreira de troca quanto da superfície respiratória lamelar, favoreceu também a proliferação de parasitas e o aumento da taxa de mortalidade. A partir disso pode-se concluir que ocorreram alterações morfológicas nas brânquias para atender a maior necessidade de oxigênio, já que o animal não se encontra em condições ideais.

Palavras chave: tambaqui, brânquias, piscicultura, estereologia.

Sumário

1.INTRODUÇÃO.....	5
2.OBJETIVOS.....	8
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	8
4. RESULTADOS.....	16
5. DISCUSSÃO.....	25
6. REFERÊNCIAS.....	28
7. CRONOGRAMA DE ATIVIDADES.....	33

1. INTRODUÇÃO

A piscicultura no Estado do Amazonas tem apresentado um crescimento significativo nos últimos anos. Apesar do crescente interesse, há alguns fatores que podem afetar negativamente a produção: um sistema deficiente de recirculação de água e remoção de excretas nitrogenados, baixa oxigenação, alta densidade de estocagem (ADE), dentre outros. Todos estes fatores provocam alterações na qualidade da água, afetando o metabolismo, a fisiologia e a morfologia das brânquias dos peixes. Em última análise estes aspectos tendem a reduzir a taxa de crescimento e/ou aumentar a mortalidade dos peixes em condições de cultivo. Os estudos dos efeitos das alterações na qualidade da água e das condições de cultivo sobre os processos morfofuncionais dos animais aquáticos podem fornecer informações importantes para as boas práticas de manejo e cultivo das espécies de peixes promissoras para a região, tais como o tambaqui (*Colossoma macropomum*).

O tambaqui, *Colossoma macropomum*, é uma espécie pertencente à família Serrasalminidae (Serrasalmidae). É a primeira espécie da qual já se sabe o suficiente para manejo dos estoques naturais e criação em cativeiro (Araújo-Lima & Goulding, 1997).

Um dos principais problemas no cultivo de peixes é a densidade de estocagem (DE), inicialmente pode atrair o piscicultor, com intenção de maior produção, porém causa demasiado estresse para o animal, devido aos choques físicos, hipóxia, aumento na produção de excretas nitrogenadas e também dando oportunidade proliferação de microrganismos patógenos e o podendo resultar em um alto índice de mortalidade. Não há informação para o tambaqui, contudo a alta DE pode afetar o sistema imune de teleósteos (Lorenz, 2010)

A alta DE pode levar a produção excessiva de cortisol, hormônio associado ao nível de estresse, produzido pela glândula supra-renal (Vijayan et al. 1990) que aumenta a proliferação de CRM (células ricas em mitocôndrias) causando mudanças no epitélio branquial dos peixes (Bindon *et al.* 1994). Alterações na morfologia branquial podem afetar a capacidade de transporte de oxigênio e ionoregulação. Invariavelmente, a ADE pode resultar no aumento da concentração de excretas nitrogenados no meio (Jobling, 1993), o que pode ser letal ao peixe. A amônia é o principal produto de excreção nitrogenada dos peixes na água. Bactérias nitrificantes convertem a amônia em nitrito e a partir deste convertido em nitrato. O nitrito (NO_2^-) é o mais tóxico dentre os compostos nitrogenados, geralmente está em baixas concentrações, podendo ser elevadas quando a água recebe efluentes nitrogenados vindo de ambientes hipóxicos ou de indústrias produtoras de metal, corantes, fertilizantes (Pitter, 1999), nessas condições pode comprometer funções fisiológicas como a regulação iônica, o transporte de oxigênio no sangue, a funcionalidade da hemoglobina e a produção de metahemoglobina e alterações morfológicas nas brânquias (Kroupova et al, 2005; Svobodova et al, 2005; Jensen, 1995, 2003). Os peixes de água doce são mais sensíveis ao nitrito quando comparados aos peixes marinhos, pois estes têm a proteção do cloreto (Cl^-) presente na água do mar (Eddy et al, 1983), e a qualidade da água também influencia na acumulação de NO_2^- (Russo & Thurstston, 1991).

As brânquias dos peixes são órgãos multifuncionais (Evans et al. 2005). Possuem uma vasta área superficial em contato com o meio ambiente (lamela e filamento branquial) que representa um grande sítio para ação de estressores. Como nos demais teleósteos o tambaqui apresenta uma organização branquial formada por filamentos e lamelas. As brânquias são a porta de entrada de O_2 , CO_2 e íons sendo este o responsável por suprir o metabolismo oxidativo, rota essencial aos processos biológicos. É razoável estabelecer

que alterações morfológicas nesse órgão possam comprometer o crescimento do animal. Determinar valores dentro do sistema branquial é essencial para se estabelecer as capacidades do sistema em suportar determinado nível de estresse e através da estereologia, é possível verificar sob tais condições valores morfométricos, auxiliando na compreensão dos mecanismos do tambaqui mediante os dois estressores (ADE e nitrito) e correlacionar com a rusticidade deste animal, bem preparado para situações de hipóxia e outros estressores (Alvez, 1999).

O estresse aos animais oriundo das práticas de cultivo intensivo de peixes podem resultar em elevada mortalidade por alterarem a morfologia do sistema branquial a ponto de reduzirem a capacidade de difusão gasosa. Determinar valores dentro do sistema branquial é essencial para se estabelecer as capacidades do sistema em suportar determinado nível de estresse. Tais valores somente são precisos e acurados quando obtidos através da análise estereológica (um ramo da anatomia quantitativa que emprega técnicas de análise matematicamente fundamentadas) (Howard & Reed, 2005). Estereologia é a ciência que possibilita a inferência estatística de parâmetros geométricos (3-D) a partir de informações amostradas espacialmente (2-D). Vale ressaltar que poucas informações morfométricas sobre o sistema branquial de peixes amazônicos estão disponíveis.

O presente projeto tem a finalidade de executar uma análise morfométrica das brânquias de exemplares de tambaqui submetidos a agentes estressores durante o cultivo intensivo (NO_2^- e alta densidade de estocagem) com o intuito de gerar subsídios para posteriores programas de manejo dessa espécie em cativeiro e correlacionar os dados obtidos com as informações da fisiologia da espécie disponíveis na literatura.

2. OBJETIVOS

2.1 Geral

Analisar a morfometria (estereológica) do sistema branquial de tambaqui, *Colossoma macropomum* (Cuvier, 1818) em um ambiente de cultivo intensivo, em diferentes estressores, alta densidade de estocagem ou nitrito.

2.2 Objetivos específicos

- i) Aplicar técnicas estereológicas para a determinação do volume total, área superficial, relação superfície-volume, espessura da barreira de troca gasosa, capacidade de difusão morfométrica e fator de difusão anatômico do sistema branquial;
- ii) Comparar as medidas estereológicas frente aos agentes estressores aplicados (NO_2^- e alta densidade de estocagem)
- iii) Correlacionar os dados obtidos à biologia da espécie.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 MÉTODO:

3.1.1 Local

Os experimentos foram desenvolvidos na Fazenda Agroindustrial Tambaqui LTDA., localizada no Km 143, Rodovia AM-010, ME, Itacoatiara, AM, Brasil. Os animais serão oriundos da Fazenda Santo Antônio, localizada na Rodovia AM 010, Km 113, ME, Ramal do Procópio km 1,5 ME, Rio Preto da Eva, AM.

3.1.2 EXPERIMENTAÇÃO

Foram utilizados exemplares juvenis de tambaqui (controle: $121 \pm 12,30$ g; $18 \pm 0,89$ cm; nitrito: $107 \pm 15,17$ g; $17 \pm 0,40$ cm; ADE: $91 \pm 22,09$ g; $15 \pm 1,4$ cm). Após a coleta, os peixes foram mantidos por 4 semanas antes do início dos experimentos em tanques circulares de PVC de 3.000 supridos com fluxo contínuo de água fresca e aerada (tensão de oxigênio, $pO_2 > 130$ mmHg). A composição química da água foi determinada durante este período. Os peixes foram alimentados diariamente com ração comercial, porém, a mesma foi suspensa 2 dias antes do início dos experimentos. O fotoperíodo mantido constante em 12 horas de luz: 12 horas de escuridão. Foram feitas verificações diárias no estado de saúde dos animais (condição das nadadeiras, brânquias e pele quanto a presença de erosões, parasitas e sintomas de infestação por bactérias) e somente animais aparentemente saudáveis foram utilizados nos experimentos.

3.1.3 PROTOCOLO EXPERIMENTAL

Os experimentos foram conduzidos em tanques circulares de PVC de 800 L com fluxo contínuo de água aerada e com a mesma composição química utilizada na aclimação. O seguinte protocolo experimental foi adotado:

1. Tratamento 1: grupo controle (N=10), água isenta de NO_2^- .
2. Tratamento 2: grupo exposto ao NO_2^- (N=20), 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).
3. Tratamento 3: grupo com ADE (N=60), água isenta de NO_2^- com o total de 13 animais por m^2 .

Em cada tratamento as condições físico-químicas da água foram constantes e monitoradas por 96 horas.

3.1.4 COLETA DOS TECIDOS

Após o período de exposição, os peixes foram anestesiados (Eugenol) e imediatamente sacrificados através de contusão na região cefálica. Após esta etapa, foi realizada a biometria de cada animal (comprimento total (cm) e peso (g)) antes da coleta dos tecidos. As brânquias (um lado completo) foram coletadas e fixadas *in situ* por imersão em solução de glutaraldeído 2,5% + solução tampão de fosfato de Na^+ (pH 7,8; osmolaridade, aproximadamente 300mOsmol). O conjunto completo contendo quatro arcos branquiais foi utilizado nas análises estereológicas.

3.1.5 ANÁLISE DAS CONDIÇÕES DA ÁGUA

Os níveis de nitrito foram determinados coloricamente como descrito por Boyd & Tucker 1992, que consiste na reação do nitrito com uma solução de sulfanilamida em ácido clorídrico, que ao reagir com etileno diamino N-(1-naftil) forma um composto de cor rosa proporcional à concentração de nitrogênio do nitrito (N-NO_2) de absorbância de 543 nm de comprimento de onda. As amostras foram analisadas com auxílio de um espectrofotômetro Bioespectro SP-22

3.1.6 ESTEREOLOGIA DAS BRÂNQUIAS (MICROSCOPIA ÓPTICA)

Os procedimentos de amostragem e orientação dos tecidos foram planejados para combinar o Princípio de Cavalieri para a determinação do volume de referência (Michel & Cruz-Orive, 1988) com o método de seccionamento vertical para a determinação de área

superficial (Baddeley et al., 1986; Costa et al., 2001; Costa et al., 2007). Cada arco branquial foi separado e indicado com respeito a sua posição no animal (1º ao 4º - cefálico-caudal). Cada arco foi seccionado em três porções de comprimentos aproximados (3 amostras de cada arco branquial – nenhuma porção de arco foi descartada). Continuando o procedimento, as amostras foram desidratadas em concentrações crescentes de etanol e impregnadas com hidroxietil-metacrilato (Technovit 7100, Külzer-Heraues, Alemanha). Nesta etapa as amostras ganharam consistência ao corte. Em seguida, as amostras foram ordenadas em um molde histológico de forma que a posição geométrica da 1ª amostra seja escolhida ao acaso, as amostras seguintes foram dispostas sobre a 1ª seguindo um giro de 15º no sentido esquerda-direita. Ao final do processo, teremos um bloco para microtomia contendo um arco inteiro, fragmentado em 3 porções onde cada seção é vertical em relação ao plano horizontal em que as mesmas foram dispostas (Baddeley et al., 1986; Costa et al., 2001; Costa et al., 2007). A partir da microtomia foram produzidas seis seções histológicas (3 µm) por arco por brânquia/animal. As seções foram coradas com PAS (periodic acid Schiff reaction; Kiernan, 1990) e azul de toluidina 0,5%.

3.1.7 DETERMINAÇÃO DO VOLUME DE REFERÊNCIA DE ACORDO COM O PRINCÍPIO DE CAVALIERI

A imagem do conjunto de arcos alinhados vista através do bloco de resina foi medida (comprimento total) com a ajuda de um estereomicroscópio Olympus SZ40 equipado com uma lente micrometrada e o valor aferido foi dividido por seis (número de seções pretendidas). A primeira posição de corte foi determinada ao acaso e as seguintes acrescidas do correspondente valor de espessura entre cada seção.

O volume do tecido branquial foi determinado usando um microscópio Olympus BX-41 (objetiva plana acromática 4x/01/aumento total 40x) conectado com uma câmara-clara (Olympus U-DA) e posicionado sobre um negatoscópio onde sistemas teste de contagem

contendo pontos e arcos ciclóides serviram como parâmetros de determinação (Perry, 1978). O volume de referência (V_t) dos filamentos e lamela secundária juntos foram calculados pela contagem de pontos (Howard & Reed, 2005) como $V_t = \sum_{i=1}^n P_i(a/p) * T_s$, onde $p \sum_{i=1}^n P_i$ é o número total de pontos sobre os tecidos do filamento e da lamela secundária, a/p é a área representada por cada ponto e T_s é a distância entre as seções seqüenciais (Howard & Reed, 2005). Um coeficiente de erro de 5% e desvio de 15% serão considerados aceitáveis (Gundersen & Jensen, 1987). A equação apresentada se deve a Bonaventura Cavalieri (Cavalieri, 1635) e representa a forma mais elegante de determinação de volume de qualquer estrutura, independente de sua forma ou complexidade a partir de seções seriais do objeto/órgão.

3.1.8 DETERMINAÇÃO DOS VOLUMES DIFERENCIAIS (RELATIVOS)

Os volumes dos diferentes componentes branquiais (filamento) e lamela (epitélio + células pilares + espaços de sangue) foram determinados por contagem de pontos empregando as mesmas seções usadas para determinação do volume segundo Cavalieri, mas em aumento maior (400 X). Um sistema teste para seções verticais com uma relação contendo arcos ciclóides e pontos foi empregado.

3.1.9 DETERMINAÇÃO DA ÁREA SUPERFICIAL DA ESPESSURA DA BARREIRA DE DIFUSÃO: SEÇÕES VERTICAIS.

A área superficial (S) foi estimada em conjunto com a determinação dos volumes diferenciais. A área superficial dos filamentos e da lamela secundária foi estimada e suas respectivas relações superfície-volume (S_v), determinadas a partir das interseções das superfícies branquiais com os arcos ciclóides de comprimento conhecido multiplicado pelo volume de cada componente (filamento e lamela secundária), de acordo com Baddeley *et al.*

(1986). O valor de S_V de filamento e lamela secundária foi calculado como $S_V = 2I/L$, onde I é o número de interseções das linhas teste com a superfície e L é o comprimento total das linhas teste.

A espessura da barreira de difusão água-sangue foi estimada no maior aumento. Um sistema de linhas paralelas foi sobreposto ao sistema teste estereológico, o ângulo de inclinação dessas linhas é variável e escolhido ao acaso usando dados de 10 lados. As distâncias (l_i) foram medidas usando-se uma régua semi-logarítmica (Perry, 1981), construída de modo que a porção mais acurada (linear) da régua correspondesse com o máximo de frequência das medidas. A média harmônica da espessura da barreira (Weibel & Knight, 1964) foi calculada para cada animal como $\pi_h = 2/3 l_h$, onde l_h é a média harmônica dos comprimentos medidos ao microscópio, corrigidos em relação ao aumento.

3.1.10 SUPERFÍCIES RESPIRATÓRIAS E NÃO RESPIRATÓRIAS

Os pontos de interseção foram classificados em três categorias: 1) aqueles coincidindo com superfícies respiratória (S_R), 2) aqueles coincidindo com superfícies não-respiratória (S_{NR}) e 3) aqueles em que a natureza respiratória e não-respiratória da superfície não pode ser determinada (S_{NA}). A porcentagem de área superficial que foi considerada respiratória (% S_R) foi calculada como:

$$\%S_R = \frac{I_R}{I_R + I_{NR}} * 100$$

Onde I_R é a soma de todas as interseções que tocam superfícies respiratórias e I_{NR} é a soma de todas as interseções que tocam superfícies não-respiratórias

Fator de difusão anatômico e capacidade de difusão morfométrica

O fator de difusão anatômico (FDA) (Perry, 1978) foi calculado como a área superficial respiratória em relação à massa corporal (S_R/M_B) dividido pela média harmônica da espessura da barreira (τ_h). A capacidade de difusão morfométrica (D) foi calculada como o produto da ADF e o coeficiente de difusão de Krogh (K) da camada tissular respectiva corrigido para 25°C (Weibel, 1979).

3.1.11 ESTIMATIVA DA CONSTANTE DE DIFUSÃO DE KROGH (K)

Os valores de K para os gases respiratórios no tecido epitelial são aproximadamente duas vezes daqueles para o tecido conjuntivo. Portanto o volume relativo das células epiteliais foi estimado separadamente daqueles das células pilares e membrana basal associada. O valor obtido por cada tecido foi multiplicado pelo valor de K apropriado. Essa relação numérica proporcional produzirá valores de K para o oxigênio (K_{O_2}) no tecido branquial. O mesmo procedimento foi realizado para o K_{CO_2} .

3.1.12 ESTATÍSTICA

Os dados estereológicos obtidos através da microscopia de luz foram avaliados para cada tratamento e o estimador da variância foi determinado usando o coeficiente de erro ($C.E.$) para cada parâmetro. A precisão da estimativa do volume de referência segundo Cavalieri foi determinada de acordo com Cruz-Orive (1993) e Howard & Reed (2005):

$$CE(\sum P) = \frac{\sqrt{\text{var } P}}{\sum P}$$

A $\text{var } P$ depende do “noise” (acurácia do sistema teste) e a variância da soma das áreas ($\text{var}_{\Sigma \text{area}}$): $\text{var } P = \text{noise} + \text{var}_{\Sigma \text{area}}$ (Gundersen & Jensen, 1987; Howard & Reed 2005). O “noise” indica o quanto a estimativa poderia mudar se o sistema teste fosse disposto de modo

diferente. A variância da área é uma função do número de seções e é calculada baseada na análise de covariograma dos dados sobre as áreas transversais (Howard & Reed, 2005).

O *CE* da relação superfície-volume (*Sv*) foi estimada de acordo com Howard & Reed

(2005) usando a equação:
$$Sv = \frac{2 \cdot \sum_{i=1}^n I_i}{l / p \cdot \sum_{i=1}^n P_i}$$

Onde *n* é o número de campos usados para a estimativa da densidade de superfície, *I_i* é o número de interseções entre as linhas teste e interfaces, *P_i* é o número de pontos que tocam o espaço de referência, *l/p* é o comprimento da linha teste por ponto.

Como o desvio padrão da média harmônica da barreira de difusão não é definido, o estimador da variância da espessura da barreira será dado como SD e CE da média aritmética do comprimento dos interceptos.

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

4. RESULTADOS

4.1 CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS DA ÁGUA

As condições físico-químicas da água foram monitoradas a cada 24 horas durante o período de exposição de 96 horas e estão apresentadas na Tabela 1. Após 72 horas de exposição todos os tanques experimentaram uma variação nos parâmetros físico-químicos devido a uma chuva torrencial ocorrida na noite anterior. As condições se mantiveram nos padrões ideais para cultivo (Kubitza, 1997).

Tabela 1: Parâmetros físico-químicos da água durante o experimento com valores máximo e mínimos, e a média de variação. Concentração de nitrito na água com desvio padrão.

Parâmetros	Controle	ADE	Nitrito (NO₂⁻)
pH	7,48 Min:6,9 Máx:8,4	7,37 Min:6,9 Máx: 8,4	7,58 Min:7,1 Máx:8,2
Temperatura °C	28,65 Min: 27,1 Máx:29,7	29,05 Min: 28,8 Máx: 30,0	28,67 Min: 27,6 Máx: 30,0
TDS ppm	8,00 Min e Máx: 8,0	10,00 Min: 9,0 Máx: 13,0	9,00 Min: 8,0 Máx: 9,0
O₂ dissolvido mg/L	8,22 Min: 6,9 Máx: 8,7	7,11 Min: 6,5 Máx: 8,5	7,76 Min: 6,6 Máx: 9,0
Condutividade Ω.cm	62.750 Min: 61.200 Max: 83.000	50.850 Min: 38.300 Máx: 58.600	58.300 Min: 55.400 Máx: 64.000
NO₂⁻ na água mg/L	0,06 Min: 0,04 Max: 0,7	0,05 Min: 0,04 Max: 0,10	0,32 Min: 0,22 Max: 0,43

A Tabela 2 apresenta a biometria dos animais em cada tratamento. Os animais do controle apresentaram a maior massa, enquanto que os animais expostos a alta densidade apresentaram a menor.

Tabela 2. Biometria dos animais utilizados, com Comprimento total (cm) e massa (g)

	Controle		Nitrito		ADE	
	Comp. total -cm	Peso - g	Comp. total -cm	Peso - g	Comp. total -cm	Peso - g
Animal #1	18,0	123	17,5	133	15,5	93
Animal #2	19,0	134	17,0	105	17,5	111
Animal #3	18,0	110	17,0	103	16,5	94
Animal #4	17,0	108	17,5	107	13,5	52

4.2 MORFOLOGIA BRANQUIAL

As brânquias de *Colossoma macropomum* apresentam a mesma estrutura descrita para outros teleósteos (Fig. 1) (Laurant & Dannel, 1980).

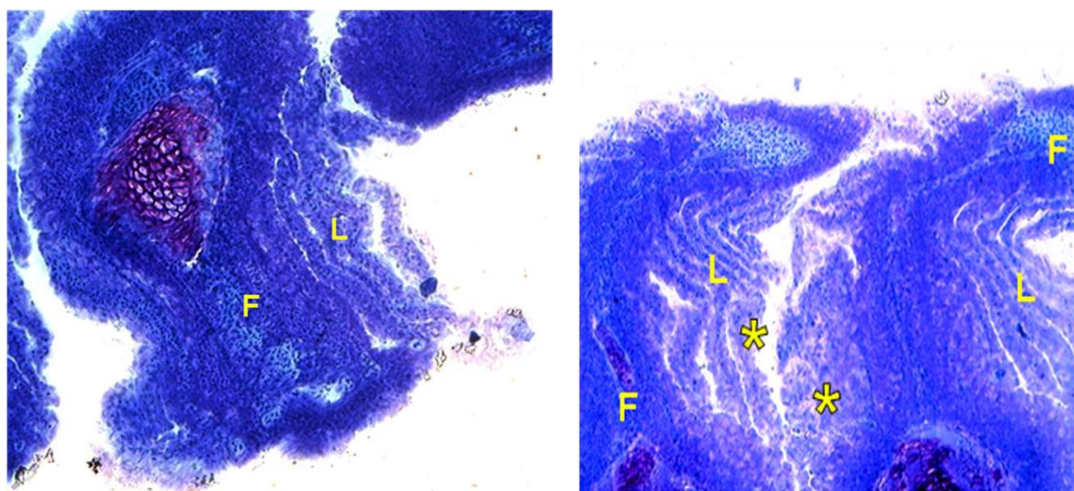


Fig.1 Brânquias de *C. macropomum* sob microscopia ótica (20x). Animais utilizados como controle. (F = filamento; L= lamela) Observar a espessura do epitélio lamelar (*)

Quatro pares de arcos branquiais podem ser facilmente identificados. A partir de cada arco irradiam duas fileiras de filamentos (holobrânquias) com exceção do primeiro arco que é composto apenas por uma fileira de filamentos e suas lamelas (hemibrânquia).

As lamelas são compostas por duas fileiras de células epiteliais e uma membrana basal que também é comum com as células pilares que mantêm a integridade mecânica dos canais vasculares. As flanges citoplasmáticas das células pilares formam o componente mais interno (endotelial) da barreira de difusão água-sangue. Um espaço intersticial que contém tecido conjuntivo e elementos celulares, assim como vasos linfáticos, ocorre entre as células endoteliais e as células epiteliais. As células-cloreto e as células mucosas são freqüentemente encontradas no filamento ou no espaço interlamelar. O filamento é revestido por um epitélio estratificado pavimentoso. Células mucosas são comumente vistas próximo a superfície do epitélio filamentar. As lamelas de *C. macropomum* (controle) (Fig.1) apresentam uma espessura incomum aos peixes de respiração aquática. São freqüentes as células-cloreto e pavimentosas (as primeiras com freqüência elevada) o que torna a lamela espessa. Nos animais expostos à ADE (Fig. 2) e nitrito (Fig.3) o inverso foi observado. Neste estudo, a espessura da lamela apresenta íntima relação com a barreira de troca gasosa (epitélio lamelar + prolongamento das células pilares).

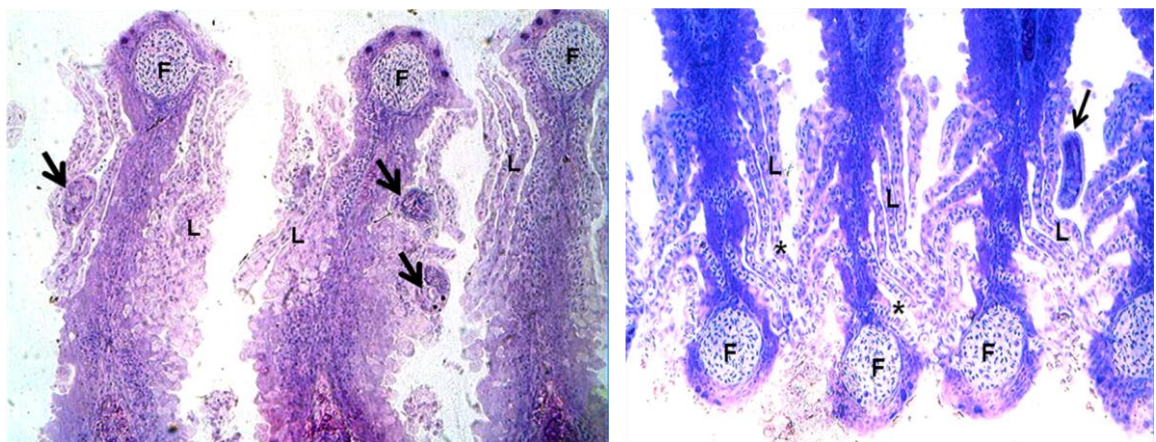


Fig. 2 Microscopia ótica das brânquias de tambaqui (ADE), mostrando também parasitas entre as lamelas (seta). Observar lamelas mais delgadas (*). F= filamento; L=lamela.

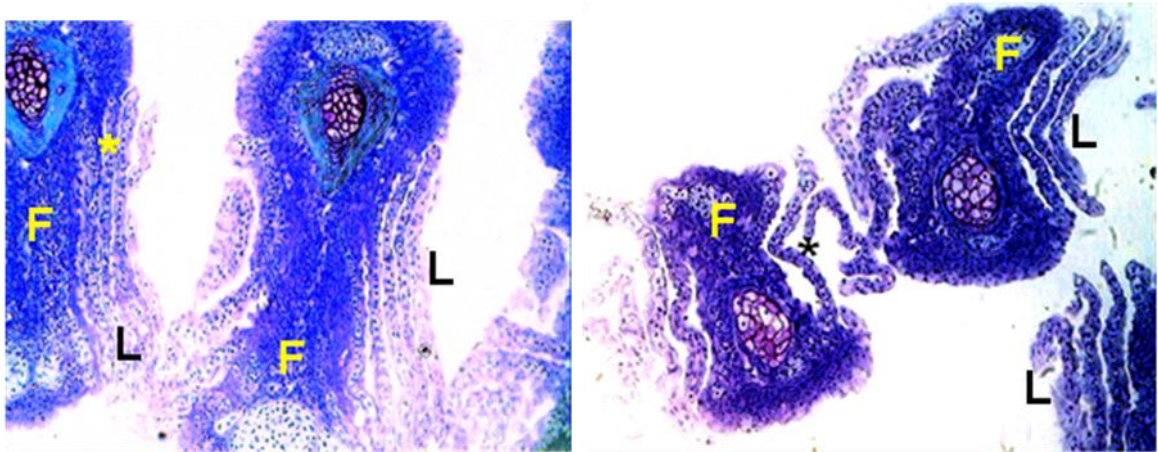


Fig. 3 Microscopia óptica das brânquias de tambaqui expostas ao nitrito. Observar as lamelas delgadas (*). F=filamento; L= lamela

4.3 ESTEREOLOGIA

Não houve alteração significativa entre os volumes de lamela e filamento entre os tratamentos e o controle (Fig. 4).

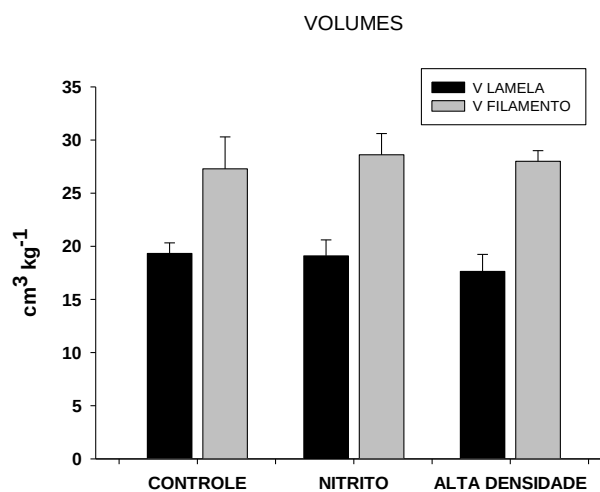


Fig. 4 Gráfico apresentando os volumes totais de lamelas e filamentos, nos três tratamentos. (* indica diferença significativa em relação ao controle, $p < 0,05$)

Na Fig.5 pode se observar a área superficial branquial (filamento e lamela) de *C. macropomum* dos animais expostos a condições estressantes e do controle. A exposição ao nitrito e ADE resultou em uma redução significativa na área superficial de filamento e lamela. A queda da área superficial é muito mais pronunciada na lamela se comparada ao filamento.

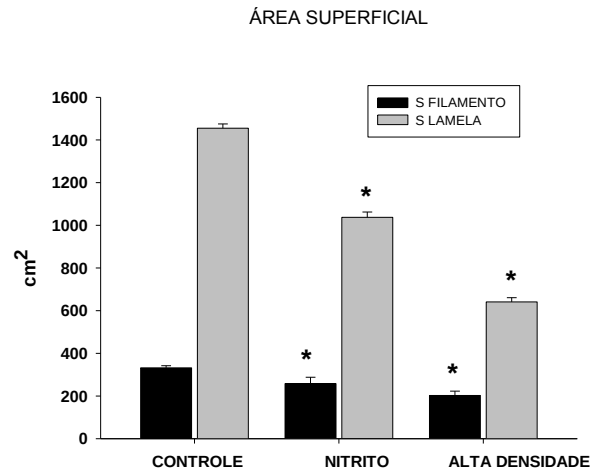


Fig. 5 Gráfico com os valores de área superficial de filamentos e lamelas (* indica diferença significativa em relação ao controle, $p < 0,05$)

A Fig. 6 apresenta a relação entre área superficial, espessura da barreira gasosa e o fator de difusão anatômico (FDA). Os animais do controle apresentaram maior área superficial, grande espessura da barreira de troca gasosa, o que resultou em um menor FDA ($8,876 \text{ cm}^2 \cdot \text{g}^{-1} \cdot \mu\text{m}^{-1}$), já nos animais em condições de alta concentração de nitrito, não houve variação significativa na área de superfície, o que não ocorreu em relação à espessura da barreira com diminuição notável, por isso seu elevado FDA ($13,017 \text{ cm}^2 \cdot \text{g}^{-1} \cdot \mu\text{m}^{-1}$). Os animais da ADE apresentaram área superficial e espessura de barreira bem menor que os animais do controle, com FDA intermediário.

GRÁFICO TRÍPLO LOGARÍTIMO

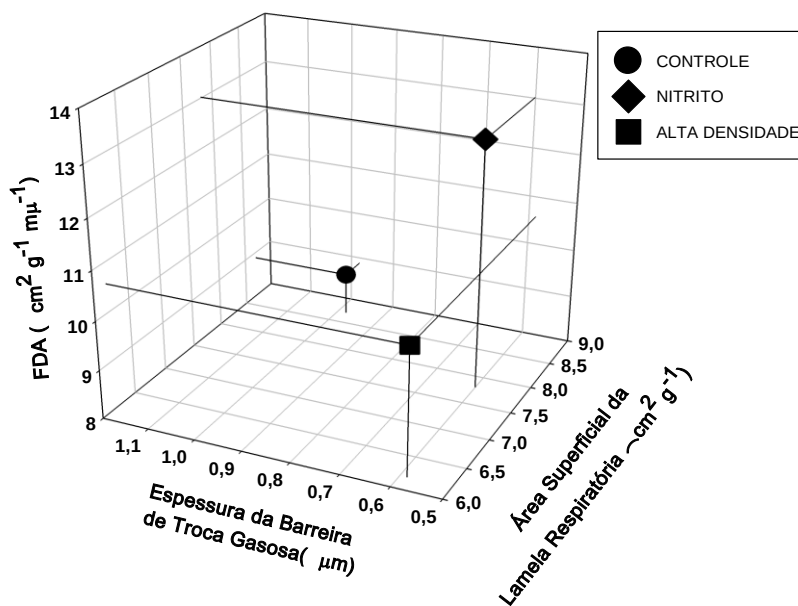


Fig. 6 – Gráfico relacionando área superficial, espessura da barreira e FDA. As linhas partindo de cada símbolo auxiliam na localização dos correspondentes valores.

A Fig. 7 apresenta a capacidade de difusão morfométrica gasosa. Os peixes expostos ao nitrito apresentam maior capacidade de difusão de CO_2 quanto e de O_2 , já os peixes em ADE não houve alteração significativa em relação ao controle.

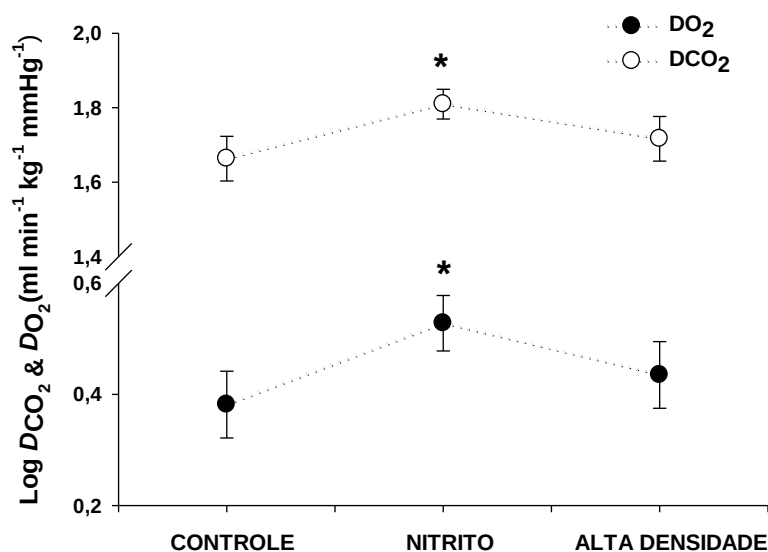
CAPACIDADE MORFOMÉTRICA DE DIFUSÃO GASOSA (DO_2 & DCO_2)

Fig. 7 – Capacidade morfométrica de difusão de O_2 e CO_2 em todos os treatments. $N=4$; (* indica diferença significativa em relação ao controle, $p < 0,05$)

4.4 IMPLICAÇÕES

Os agentes estressores empregados nesse estudo (nitrito e ADE) resultaram em consequências negativas para *C. macropomum* em cultivo. Aqui dois parâmetros foram utilizados para avaliar as implicações da ação dos estressores: proliferação de parasitas (Tavares-Dias, 2009) e mortalidade.

Na Fig. 8a é notável o alto número de parasitas nos peixes sob agentes estressores, principalmente na ADE. A Fig. 8b apresenta o perfil do único parasita (provavelmente da classe Monogenoidea, Filo Platyhelminthes) que estava infestando as brânquias de *C. macropomum*.

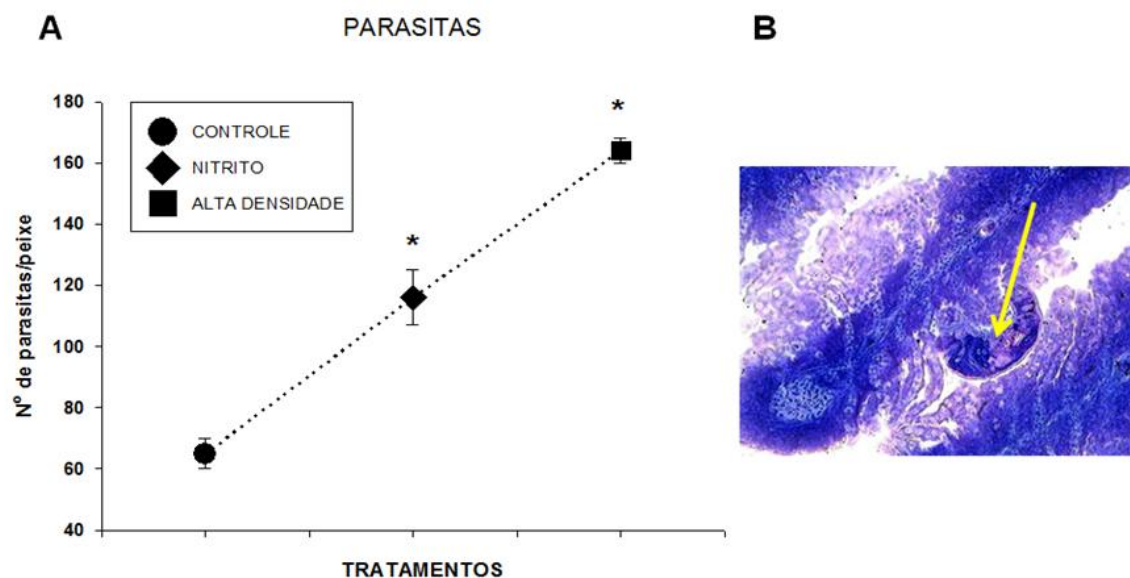


Fig. 8a Gráfico com os números de parasitas encontrados nos peixes coletados (* indica diferença significativa em relação ao controle, $p < 0,05$). Fig. 8b Parasita, Classe Monogenoidea, seta.

Na figura 9 os índices de mortalidade estão expostos, onde o maior índice também é dos peixes em ADE, seguido de animais expostos ao nitrito e nenhum óbito no controle.

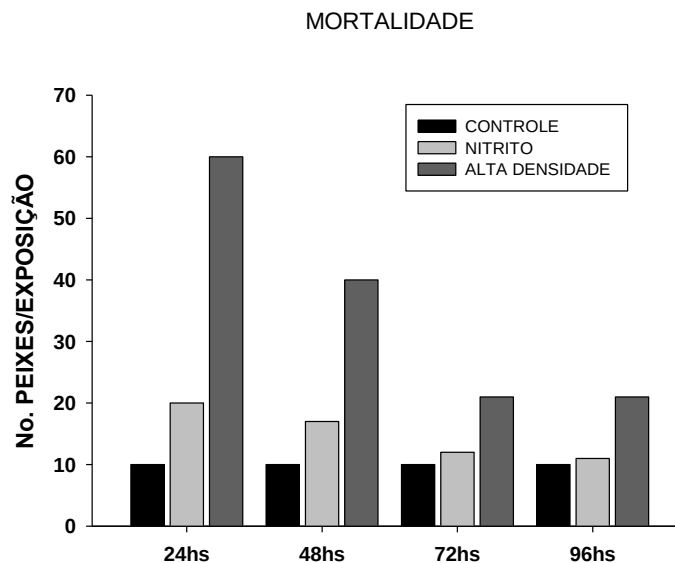


Fig. 9 Gráfico mostrando a mortalidade ao longo da exposição de *C. macropomum* à agentes estressores (nitrito e alta densidade de estocagem).

4.4.1 CONDIÇÕES DE SAÚDE DOS PEIXES

Os animais estavam em boas condições de saúde antes do experimento, como pode ser observado no controle. (Fig 10) As brânquias estavam em cor vermelho brilhantes, sem falta de escamas e aparentemente sem fungos ou parasitas. Durante o experimento ocorreram óbitos principalmente no tanque onde a densidade de peixes era alta (Fig. 11). Os peixes deste tanque após 48 horas apresentaram produção excessiva de muco, fungos sobre a pele e já nadavam na superfície da água, mesmo com quantidade normal de oxigênio na água. Nos animais expostos ao nitrito (Fig. 12) também ocorreu produção excessiva de muco e alguns peixes (tanto da ADE quanto Nitrito) tinham as nadadeiras corroídas, ausência de escamas em algumas partes do corpo, podendo ter sido causados por ataques de outros peixes.



Fig. 10a Animal usado como controle, em boas condições de saúde. Fig. 10b Opérculo e escamas em boas condições, setas.

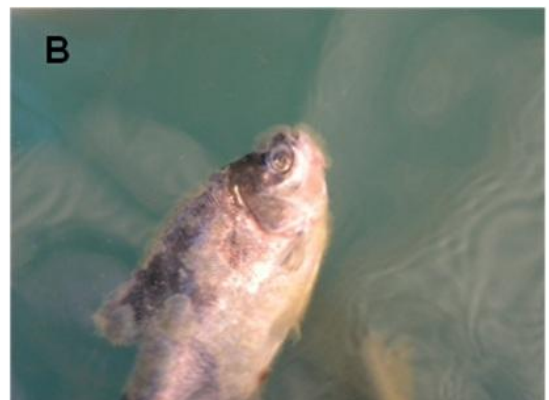
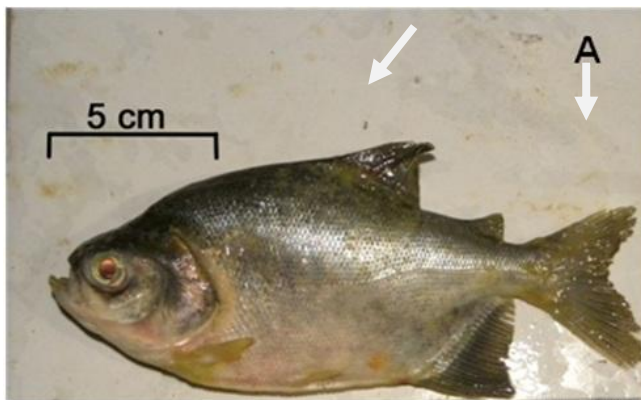


Fig. 11a excesso de muco e fungos sobre a pele, setas. Fig. 11b Animal da ADE onde é possível observar o peixe nadando na superfície da água.

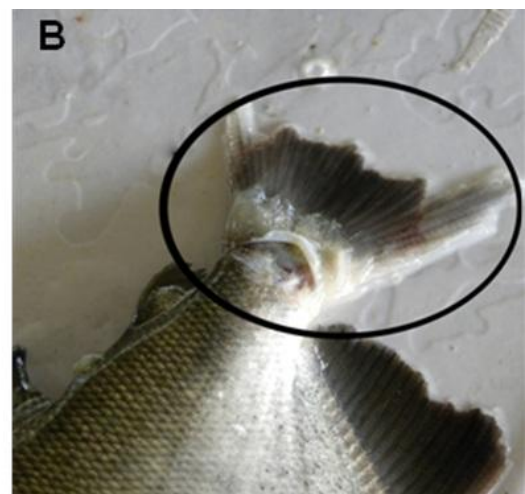


Fig. 12a Animal expostos ao nitrito, com ausência de escamas, seta. Fig. 12b Peixe com nadadeiras danificadas, em evidência.

5. DISCUSSÃO

Durante a época de cheia, o tambaqui pode adentrar os lagos de várzea a procura de comida. Em terras alagadas pode ocorrer a redução no níveis de oxigênio, abaixo de 5mg/L (Junk, 1973; Saint-Paul,1984). Na natureza, o tambaqui tem bastante resitência a ambientes hipóxicos, e isso tem sido um dos fatores para sua utilização 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 e ADE foram avaliados como potenciais estressores do tambaqui, ambos agentes se desenvolvem facilmente em cultivo (Svobodova *et al*, 2005, Kroupova *et al*, 2005). A ADE mostrou-se mais danosa ao tambaqui que a exposição ao nitrito. Em nosso estudo, é provável que a alta densidade de estocagem tenha contribuído para queda da imunidade dos peixes levando ao aparecimento de fungos e parasitas oportunistas, e por sua vez aumentando a taxa de mortalidade.

A tabela 3 resume as informações obtidas a partir dos dados estereológicos das lamelas respiratórias de *C. macropomum*. Os animais do controle se caracterizaram por uma espessa barreira de troca gasosa associada a uma maior área superficial respiratória, juntos esses fatores indicaram uma baixa FDA (área superficial dividida pela espessura da barreira de troca). O Fator de Difusão Anatomico é uma medida da eficiência de um epitélio para troca gasosa (Perry, 1978). À primeira vista esses dados indicam que as brânquias de *C. macropomum* não são eficientes para tomar O₂ da água e excretar CO₂ para o meio. Contudo, o tambaqui é conhecido por sua alta resistência à hipoxia no meio aquático (Val *et al*, 2005). Quando os níveis de oxigênio baixam a valores inferiores a 5 mg/L esses animais desenvolvem uma extensão labial e adotam uma mudança comportamental deslizando sobre a superfície da coluna de água conduzindo a camada de água superficial, rica em oxigênio , para as brânquias. Esta mudança comportamental não foi observada em nenhum dos tratamentos. As características morfológicas das brânquias de *C. macropomum* enquanto, aparentemente,

limitam a tomada de O₂ do meio garantem ao animal impermeabilidade à entrada de água, resistência a distúrbios iônicos e osmóticos e distúrbios ácido-base. Vale a pena ressaltar que a morfologia é apenas um dos elos para o entendimento da adaptação dos peixes a seu ambiente, sendo necessário a complementação com dados fisiológicos e bioquímicos. Por exemplo, é de conhecimento que as hemoglobinas de *C. macropomum* apresentam uma elevada afinidade pelo oxigênio e juntamente com as nossas informações morfológicas explicam a grande rusticidade deste animal ao cultivo.

Tabela 3. Aspectos positivos (+) e negativos (-) de acordo com a espessura da barreira de troca gasosa.

TRATAMENTO	BARREIRA DE TROCA GASOSA	ÁREA SUPERFICIAL	FATOR DE DIFUSÃO ANATÔMICO	IMPLICAÇÕES
CONTROLE	ESPESSA	ALTA	BAIXO	(+) Proteção contra distúrbios osmóticos (+) Redução na perda de íons (-) Redução na capacidade de troca gasosa
NITRITO	DELGADA	ALTA	ALTO	(+) Ameniza a hipoxemia tissular causada pelo aumento na produção de metahemoglobina (-) Aumenta a perda iônica (-) Aumenta a tomada de nitrito da água (-) Queda na imunidade devido ao estresse (-) Proliferação de parasitas (-) Aumento de mortalidade
ALTA DENSIDADE	DELGADA	BAIXA	BAIXO	(-) Redução na capacidade de troca gasosa (-) Queda na imunidade devido ao estresse (-) Proliferação de parasitas (-) Aumento de mortalidade

Já existem muitos trabalhos acerca do efeito tóxico do nitrito aos peixes (Piedras *et al*, 2005; Kroupova *et al*, 2005; Svobodova *et al*, 2005). No presente estudo, a exposição ao

nitrito resultou em diminuição da barreira de troca gasosa. No tambaqui essa barreira é basicamente representada pela aglomeração de células cloreto na lamela respiratória (algo incomum em peixes de respiração aquática exceto quando estes são expostos a um meio extremamente diluído em íons). Após a exposição ao nitrito várias células cloreto desaparecem da lamela respiratória de *C. macropomum*. Essas células representam o principal sítio de tomada de nitrito a partir do meio aquático e seu desaparecimento é devido a sua elevada atividade metabólica na presença do nitrito (Margiocco et al, 1983; Lewis & Morris, 1986). Assim os resultados obtidos estão de acordo com a literatura. O FDA elevado contribuiu efetivamente para o aumento da capacidade de difusão gasosa nas brânquias de *C. macropomum*. Contudo, o dano mais proeminente provocado pela intoxicação com nitrito é a formação de metahemoglobina, que impede o fornecimento de oxigênio aos tecidos (Jesen 2003). A redução da barreira de troca gasosa após exposição ao nitrito ameniza a hipoxemia tissular. Por outro lado favorece a perda de íons, o que torna a exposição ao NO_2^- tóxica ao tambaqui.

De todos os tratamentos a ADE é o mais agressivo para *C. macropomum*. Os animais nesta condição compartilharam duas condições extremamente danosas aos peixes em estresse: redução na espessura da barreira e na área superficial. Tais condições são letais pois resultam em perda difusiva de íons e excessivo gasto energérgico para manutenção da osmoregulação. Isso ficou evidente com a elevada mortalidade observada e a proliferação de parasitas. Este último, provavelmente, devido à queda na imunidade.

O aumento na densidade de estocagem de peixes, não é vantajoso para o piscicultor pois, vem associado a elevada mortalidade. A ferramenta utilizada neste estudo foi sensível para detectar tais alterações.

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.

ALVES, M.I.M., SOUZA, P.C.G., SILVA, P.R.R., MESQUITA, P.E.C. **Estratégia Respiratória do Tambaqui, *Colossoma macropomum* (Cuvier, 1818), em Condições de Hipoxia**. Rev.Cient.Prod.Anim., v.1, n.2, p.995-103, 1999.

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.

BADDELEY, A.J., GUNDERSEN, H.J.G. & CRUZ-ORIVE, L.M. **Estimation of surface area from vertical sections**. Journal of Microscopy. n. 142, v. 3, p. 259-276, 1986.

BINDON, S.D.; GILMOUR, K.M.; FENWICK, J.C. & PERRY, S.F.; **The effects of branchial chloride cell proliferation on respiratory function in the rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* shawn**. J. exp. Biol. 197, 47–63 (1994)

BOYD, C.E. & TUCKER, C.S. **Water quality and pond soil analyses for aquaculture**. Auburn University, Opelika. 183 p. 1992.

CAVALIERI, B. **Geometria Indivisibilibus Continuorum**. Bononi: Typis Clemetis Feronij. Reprinted as Geometria Degli Indivisibili. Torino: Unione Tipografico-Editorice Torinese, 1635.

COSTA, O.T.F.; PERRY, S.F.; SCHMITZ, A. & FERNANDES, M.N. **Stereological Analysis of Fish Gills: Method**. In: VI International Congress of Vertebrate Morphology, 2001, Jena. Journal of Morphology. New York: John Wiley & Sons, Inc., n. 248, p. 219. 2001.

COSTA, O.T.F.; PEDRETTI, A. C. E.; SCHMITZ, A.; PERRY, S.F.; & FERNANDES, M.N. **Stereological estimation of surface area and barrier thickness of fish gills in vertical sections**. Journal of Microscopy, Vol. 225, Pt 1 January 2007, pp. 1–9. 2007.

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.

CRUZ-ORIVE, L.M. **Systematic sampling in stereology.** Bull. Intern. Statis. Inst., Proceedings 49th Session, Florence. n. 52, v. 2, p. 451-468, 1993.

EDDY, F. B.; KUNZLIK, P. A. ; BATH, R. N.; **Uptake and loss of nitrite from the blood of rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson, and Atlantic salmon, *Salmo salar* L. in fresh water and in dilute sea water.** Journal of Fish Biology Volume 23, Issue 1, pages 105–116 (1983)

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.

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.

HAYLOR, G.S.; **Controlled hatchery production of *Clarias gariepinus* (Burchell 1822) : growth and survival of fry at high stocking density.** Aquaculture & Fisheries, 405-422, 1991.

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.

JUNK, W.J. **Investigations on the ecology and production biology of the 'floating meadows' (Paspalo-Echinochloetum) on the Middle Amazon. Part 11: The aquatic fauna in the root zone of the floating vegetation.** Amazoniana 4: 9-102, 1973.

JOBLING, M. **Bioenergetics: feed intake and energy partitioning.** In: Fish Ecophysiology (eds RANKIN, J.C.; JENSEN, F.B.). Chapman & Hall, London, p.1-44, 1993.

KIERNAN, J.A. **Histological and histochemical methods: theory and practice.** London: Pergamon Press. 1990.

KUBITZA, F. **Qualidade do alimento, qualidade da água e manejo alimentar na produção de peixes.** In: SIMPÓSIO SOBRE MANEJO E NUTRIÇÃO DE PEIXES, 1997, Piracicaba. Anais... Piracicaba: CBNA, p. 64-87, 1997.

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

LAURENT, P. AND DUNNEL, S., **Morphology of gill in fish.** Amer.J. Physiol. 238, 1980.

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

LORENZ, E.K., **Densidade de estocagem de piracanjuba (*Brycon orbigniannus*) em tanques-rede de pequeno volume.** Dissertação de mestrado, UNIOESTE 2010.

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

MICHEL, R.P. & CRUZ-ORIVE, L.M. **Application of the Cavalieri principle and vertical sections method to lung: estimation of volume and pleural surface area.** Journal of Microscopy. n. 150, p. 117-136, 1988.

PERRY, S.F. **Quantitative anatomy of the lungs of the red-eared turtle, *Pseudemys scripta elegans*.** Respiration Physiology. n. 35, p. 245-262, 1978.

PERRY, S.F. **Morphometric analysis of pulmonary structure: methods for evaluation and comparison of unicameral lungs.** Mikroskopie n. 38, p. 278-293, 1981.

PIEDRAS, S.R.N., OLIVEIRA, J.L.R., MORAES, P.R.R., BAGER, A. **Acute toxicity of un ionized ammonia and nitrite in *Cichlasoma facetum*(Jenyns, 1842) fingerlings.** Ciênc. agrotec., Lavras, v. 30, n. 5, p. 1008-1012, set./out., 2006.

PITTER, P., **Hydrochemistry (in Czech).** Editor VSCHT, Prague. 568 pp, 1999

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.

SAINT-PAUL, U. **Physiological adaptation to hypoxia of a neotropical characoid fish *Colossoma macropomum*, Serrasalminidae.** Environmental Biology of Fishes Vol. 11, No. 1, pp. 53-62, 1984

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.

TAVARES-DIAS, M. **Manejo e sanidade de peixes em cultivo.** EMBRAPA Amapá, 2009.

TRZEBIATOWSKIA, R., FILIPIAKA, J. AND JAKUBOWSKIA, R. **Effect of stock density on growth and survival of rainbow trout (*Salmo gairdneri* Rich.)**. Aquaculture, Volume 22, Pages 289-295, 1981.

VAL, A.L., ALMEIDA-VAL, V.M.F., RANDALL, D.J. **The physiology of tropical fishes**. Volume 21, Fish physiology series, 2005.

VIJAYAN, M.M. & LEATHERLAND, J.F.; **High stocking density affects cortisol secretion and tissue distribution in brook charr, *salvelinus fontinalis***. Journal of Endocrinology (1990) 124, 311–318

WEIBEL, E.R. **Stereological Methods. Practical methods for biological morphometry**, Vol. 1. London: Academic Press, 1979.

WEIBEL, E.R. & KNIGHT, B.W. **A morphometric study on the thickness of the pulmonary air-blood barrier**. Journal of Cell Biology. n. 21, p. 367-384, 1964.

