

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS



Universidade Federal de São Carlos

CARACTERIZAÇÃO MORFOFUNCIONAL DAS
BRÂNQUIAS DE *Arapaima gigas*, DURANTE A
TRANSIÇÃO DA RESPIRAÇÃO AQUÁTICA PARA
RESPIRAÇÃO AÉREA

Aluno: Cleverson Agner Ramos

Orientadora: Profa. Dra. Marisa Narciso Fernandes

São Carlos – 2008

Cleverson Agner Ramos

CARACTERIZAÇÃO MORFOFUNCIONAL DAS BRÂNQUIAS DE
Arapaima gigas, DURANTE A TRANSIÇÃO DA RESPIRAÇÃO
AQUÁTICA PARA RESPIRAÇÃO AÉREA

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas do Centro de Ciências Fisiológicas do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde da Universidade Federal de São Carlos, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências Fisiológicas

Orientadora: Profa. Dra. Marisa Narciso Fernandes

São Carlos – 2008

**Ficha catalográfica elaborada pelo DePT da
Biblioteca Comunitária da UFSCar**

R175cm

Ramos, Cleverson Agner Ramos.

Caracterização morfofuncional das brânquias de *Arapaima gigas*, durante a transição da respiração aquática para respiração aérea / Cleverson Agner Ramos. -- São Carlos : UFSCar, 2008.

79 f.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal de São Carlos, 2008.

1. Branquias – anatomia. 2. Respiração aérea. 3. Morfologia (Biologia). I. Título.

CDD: 591.49 (20^a)

Universidade Federal de São Carlos
Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas

Defesa de Dissertação de Cleverson Agner Ramos

Profa. Dra. Marisa Narciso Fernandes.....

Marisa Narciso Fernandes

Profa. Dra. Cláudia Bueno dos Reis Martinez.....

Cláudia Bueno dos Reis Martinez

Prof. Dr. Carlos Alberto Vicentini.....

Carlos Alberto Vicentini

ORIENTADORA:

Marisa Narciso Fernandes

*Aos meus pais, Irene e José
e aos meus irmãos Everton e Stephany,
por tudo que representam para mim.*

AGRADECIMENTOS

À Prof^a Dra. Marisa Narciso Fernandes pela oportunidade, confiança, orientação, apoio imprescindível e exemplo de profissional.

À Universidade Federal do Amazonas, em especial aos profs. Wallace P. Duncan e Oscar Tadeu F. da Costa pela coleta dos animais, possibilitando assim, a realização deste trabalho.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq, pela bolsa concedida.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas (PPG-CF) da Universidade Federal de São Carlos (UFSCar) e ao seu corpo docente.

Ao Centro de Microscopia eletrônica da UFPR e seus técnicos, pelo auxílio nas análises de microscopia eletrônica de varredura.

Aos amigos do Laboratório de Zoofisiologia e Bioquímica Comparativa pelos elos de amizade construídos e pela ajuda direta ou indiretamente.

Aos meus familiares por sempre me incentivarem sempre e acreditarem nos meus projetos.

O que importa é a cultura, o meio ambiente e os peixes.
Piracumã Yawalapiti

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	
1.1. A respiração aquática nos peixes	01
1.2. A estrutura branquial dos peixes teleósteos	03
1.3. A respiração aérea em peixes	07
1.4. A respiração em <i>Arapaima gigas</i> (Pirarucu)	08
1.5. As hipóteses desse estudo	10
2. OBJETIVOS	
2.1. Objetivos gerais	11
2.2. Objetivos e Metas	11
3. MATERIAIS E MÉTODOS	
3.1. Material Biológico – Considerações sobre a espécie <i>Arapaima gigas</i>	12
3.2. Local da coleta dos animais	13
3.3. Procedimento para retirada das brânquias	14
3.4. Processamento laboratorial e análise das brânquias	15
3.4.1. Processamento para microscopia de luz em historesina	15
3.4.1.1. Análise da estrutura interna dos filamentos e morfometria dos elementos branquiais	16
3.4.1.2. Análise do número de células mucosas	17
3.4.2. Processamento para microscopia de luz em parafina	17
3.4.2.1. Imunohistoquímica para marcação de células-cloreto	18
3.4.2.2. Imunohistoquímica para marcação de células em proliferação	19
3.4.2.3. Imunohistoquímica para marcação de células em apoptose	20
3.4.3. Processamento para microscopia eletrônica de transmissão	21
3.4.4. Processamento para microscopia eletrônica de varredura	22

3.4.4.1. Área fracional e densidade das células-cloreto	22
3.5. Análise estatística	23
4. RESULTADOS	
4.1. Morfologia das brânquias durante a fase de transição da respiração aquática para a respiração totalmente aérea de <i>A. gigas</i>	24
4.1.1. Aspectos gerais das brânquias	24
4.1.2. Aspectos gerais da morfologia interna das brânquias	30
4.2. Morfometria dos elementos branquiais de relevância para as trocas gasosas	40
4.3. Atividade celular nas brânquias de <i>Arapaima gigas</i>	45
4.3.1. Parâmetros pertinentes ao desenvolvimento dos filamentos (Proliferação e morte celular)	45
4.3.2. Parâmetros pertinentes à atividade osmoregulatória nas brânquias de <i>Arapaima gigas</i>	49
4.3.2.1. Células imunoreativas para o anticorpo anti-Na ⁺ /K ⁺ -ATPase	49
4.3.2.2. Área fracional de células-cloreto (AFCC) e densidade	49
4.3.3. Parâmetros pertinentes à secreção de mucopolisacarídeos (histoquímica para células mucosas - PAS e Alcian Blue)	53
5. DISCUSSÃO	
5.1. Morfologia branquial de <i>Arapaima gigas</i>	57
6. CONCLUSÕES	66
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	67
8. APÊNDICES	
8.1. Apêndice I – Licença para coleta e transporte	79

LISTA DE FIGURAS

Figura 01: Esquema geral das estruturas respiratórias nos peixes de respiração aquática. Bolsas branquiais em peixes-bruxa (A e E) e lampreias (B e F) e arcos branquiais em elasmobrânquios (C e G) e teleósteos (D e H).

(Traduzido de EVANS *et al.*, 2005).

.....02

Figura 02: Disposição dos arcos branquiais em um peixe teleósteo. Há quatro pares de arcos na cavidade faríngea, sendo quatro em cada lado (A). Perpendicularmente a cada arco partem duas fileiras de filamentos (B), sendo que em cada lado do filamento há uma fileira de lamelas perpendiculares a este (C e D). As setas azuis mostram o sentido do fluxo de água, que atravessa as lamelas em um sentido contrário ao fluxo sanguíneo e no detalhe da lamela em E podem ser observados seus principais componentes. F= Filamento; L= Lamela; Aa= Artéria aferente; Ae= Artéria eferente; M= músculo branquial adutor.

(Adaptado de BONE *et al.*, 1995; HILDEBRAND, 1995; EVANS *et al.*, 2005)

.....05

Figura 03: Modelo de transporte iônico em peixes de água doce e de ambiente marinho. Pode ser observado que os teleósteos marinhos há secreção de íons, mediada por duas células; Na membrana basolateral o transporte de Cl^- ocorre por um co-transportador $\text{Cl}^-/\text{Na}^+/\text{K}^+$, sendo que há reabsorção do Na^+ por transporte ativo, realizado por uma Na^+/K^+ -ATPase e a reabsorção do K^+ ocorre através de um canal de K^+ ; na membrana apical o Cl^- é transportado através de um canal de Cl^- enquanto que o Na^+ é transportado via paracelular, auxiliado de uma célula acessória. A absorção de íons nos peixes dulcícolas ocorre por quatro células onde pode ser observado que na membrana basolateral há grande quantidade de proteínas que realizam transporte ativo (~) sendo observados: uma Na^+/K^+ -ATPase (NKA), uma Ca^{2+} -ATPase e uma V-ATPase; o Ca^{2+} também é absorvido através de um trocador $3\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$, o Cl^- é absorvido através de canais e ainda na membrana basolateral observa-se a presença de V-ATPase; na membrana apical observa-se a absorção de Ca^{2+} e Na^+ através de canais, sendo que o Na^+ também é absorvido através de um trocador Na^+/H^+ , o Cl^- é absorvido através de um trocador $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ e na membrana apical observa-se, também, uma V-ATPase.

(Traduzido de Hirose *et al.*, 2003)

.....06

Figura 04: Exemplar de *Arapaima gigas* (Schinz, 1822). Barra de escala: 10cm.

.....12

Figura 05: Local onde os exemplares de *A. gigas* foram coletados, o sistema de lagos do Jacaré, Baixo Rio Solimões. (cedido por Wallace P. Duncan)

.....14

Figura 06: Parâmetros mensurados nas brânquias de *A. gigas*. A: Altura total da lamela; B: Altura potencialmente funcional da lamela; C: Espessura do epitélio do filamento; D: Espessura do Epitélio da lamela; E: Distância entre lamelas (interlamelar); F: Largura da lamela (região basal). (Modificado de Hughes, 1984)

.....16

Figura 07: Células mucosas com reação positiva pelo método de PAS em A; células com reação positiva ao método de Alcian blue, em pH de 2,5.

.....17

Figura 08: Face interna dos quatro arcos branquiais esquerdos de um exemplar de *A. gigas* de 5020g. Cada arco é formado pelos ossos ceratobranquial (c) e o epibrânquial (e), podem ser observados rastros longos na região externa (setas claras) e curtos na região interna (setas escuras), principalmente nos dois primeiros arcos branquiais (AbI e AbII). Os filamentos (f) estão voltados para a cavidade opercular.

.....24

Figura 09: Aspecto geral dos filamentos branquiais (F) de *Arapaima gigas* em diferentes etapas de desenvolvimento (A-105g, B-575g, C-1343g, D-5020g). Em A e B a presença de lamelas (L) são facilmente identificadas ao longo do filamento, enquanto que em C e D estas estruturas não são tão evidentes. Nestes animais é possível observar apenas a presença de dobras no epitélio do filamento (setas).

.....26

Figura 10: Detalhe do filamento branquial de animais com 105g (A), 1343g (B) e 5020g (C e D). Note células pavimentosas (setas claras) com aspecto convexo, na lamela (L) e filamento (F). As setas escuras indicam as dobras no epitélio do filamento de animais acima de 1000g. Em D observa-se que estas células não têm um limite celular definido.

.....27

Figura 11: A: Células pavimentosas no septo branquial do animal de 2g (A) apresentam limites celulares visíveis por microdobras da membrana (setas claras), enquanto que em outras regiões da brânquia (B) estes limites celulares são definidos por depressões entre as células e em animais acima desta massa corpórea as características das células pavimentosas são as mesmas. Observe em (A) microdobras curtas com distribuição aleatória na superfície apical e baixa densidade (setas pontilhadas) no septo do animal de 2g, enquanto que em outras regiões do filamento (B) são curtas e estão em alta densidade. No animal de 105g (C) e 1343g (D) as células pavimentosas têm sua superfície convexa e as microdobras exibem o mesmo padrão do animal de 2g.

.....28

Figura 12: Células-cloreto (cc) no epitélio do filamento em animais com diferentes massas corpóreas, incluindo as dobras no epitélio do filamento de animais acima de 1000g (A: 46g, B: 575g, C e D: 5020g). As células mucosas (setas claras) têm menor área de contato com o meio aquático e estão distribuídas entre células pavimentosas. Em algumas regiões observada a presença de muco (setas escuras).

.....39

Figura 13: Modificação na estrutura das brânquias ao longo do desenvolvimento de *A. gigas* (A: 2g, B: 46g, C: 105g, D: 575g, E:1343g, F:4995g). Note lamelas (L) bem evidentes no filamento das brânquias de animais com até aproximadamente 600g (D). Em animais acima de 1000g (E e F) as lamelas sofrem modificações, e o espaço interlamelar torna-se reduzido (setas transparentes). O sistema de células pilares (setas pontilhadas) fica distante do meio externo. São observadas também células-cloreto (setas escuras) e células mucosas (setas brancas).

.....33

Figura 14: Detalhe do filamento branquial (F) de animais acima de 1000g. Note o sistema de células pilares (setas pontilhadas) atrofiado e embebido no tecido do filamento (A e B). Todos seus elementos podem ser observados, o canal marginal (cm), células pilares (cp), os espaços delimitados pelas flanges das células pilares (ep) e eritrócitos (er) nestes espaços. As setas claras indicam células mucosas e as setas escuras indicam as células-cloreto.

.....34

Figura 15: Lamelas e estruturas lamelares em *A. gigas*. A e B: Animal com 105g. Note a presença de lamelas bem definidas. C: Animal com 575g. Note o aumento da espessura do epitélio lamelar e redução do sistema de células pilares. D: Animal com 1343g. Note projeções citoplasmáticas entre as células que constituem a lamela e o espaço intercelular. Eritrócitos (setas escuras). (cp) células pilares, (pv) células pavimentosas, (ei) espaço intersticial, (ep) espaços delimitados pelas flanges das células pilares.

.....35

Figura 16: Localização dos principais tipos celulares no epitélio branquial de *A. gigas*. (A) Células-cloreto no epitélio da lamela, próximas ao canal marginal (a seta escura indica a presença de eritrócitos); (B) Célula mucosa (m) ao lado de célula-cloreto (cc) em processo de necrose; (C) Células-cloreto (cc) próximas ao meio externo e em (D) células-cloreto com conteúdo citoplasmático mais electrodensito que em (C).

.....36

Figura 17: Células-cloreto (cc) no epitélio branquial de *A. gigas*. As setas mostram diferentes tipos de contato com o meio externo destas células: criptas em (A), projeções citoplasmáticas em (B e C). Em (A), célula-cloreto no espaço interlamelar e em (D) célula-cloreto em necrose. Observe mitocôndrias (mt) e um sistema tubular citoplasmático (seta pontilhada) desorganizado.

.....37

Figura 18: Células mucosas no epitélio branquial de *A. gigas*. Células mucosas electronopacas são observadas em "A" e electrondensas em "B". Observe uma célula mucosa com núcleo basal (N) liberando muco para o meio externo em "C" e detalhes dos grânulos de secreção presentes neste tipo celular em "D".

.....38

Figura 19: Células "Rodlet" em diferentes estágios de maturação; A e C: célula imatura. B: Célula madura em contato com o meio externo. D: Célula liberando o conteúdo celular e desligamento do epitélio. Note cápsula fibrosa (setas escuras), núcleo basal (N), halo de "rodlet" (setas pontilhadas) e estilete voltado para o ápice da célula (setas transparentes) em todas as células.

.....39

Figura 20: Altura total (ATL) e potencialmente funcional (APFL) em relação a massa corpórea (Mc) de *A. gigas*. As curvas são: $ATL = 32,02Mc^{0,16}$ ($n= 7, r^2= 0,91, P< 0,001$) e $APFL = 25,60Mc^{0,10}$ ($n= 7, r^2= 0,79, P< 0,01$).

.....41

Figura 21: Espessura do epitélio do filamento (EPF) e da lamela (EPL) em relação a massa corpórea (Mc) de *A. gigas*. As curvas são: $EPF = 4,70Mc^{0,40}$ ($n= 7, r^2= 0,91, P< 0,001$) e $EPL = 0,76Mc^{0,47}$ ($n= 7, r^2= 0,93, P< 0,001$).

.....42

Figura 22: Largura total da lamela (LTL) em relação a massa corpórea (Mc) de *A. gigas*. A curva é: $LTL = 5,22Mc^{0,32}$ ($n= 7, r^2= 0,91, P< 0,001$).

.....43

Figura 23: Distância interlamelar em *A. gigas*. Há um aumento até animais com aproximadamente 100g, ocorrendo uma redução na distância interlamelar até aproximadamente 5000g. * indica diferença significativa ($p<0,05$) em relação ao ponto anterior.

.....44

Figura 24: Imunohistoquímica para células em proliferação celular (setas escuras). O maior aumento do número de células PCNA + ocorre no animal de 575g, diminuindo novamente nos animais acima dessa Mc.

.....46

Figura 25: Imunohistoquímica para células em apoptose (setas escuras). Em todos os animais observados o número de células marcadas foi semelhante.

.....47

Figura 26: Proliferação celular e apoptose (morte celular programada) nos filamentos branquiais de *A. gigas*. Observe um aumento da proliferação celular até aproximadamente 500-600g, com posterior redução a partir dessa Mc. O número de células em apoptose se mantém baixo e sem variações significativas entre os animais observados. * indica diferença significativa ($P < 0,05$) em relação ao ponto anterior.

.....48

Figura 27: Imunohistoquímica atividade da enzima Na^+/K^+ -ATPase, presente em células-cloreto. As setas escuras indicam células fortemente coradas devido a uma maior atividade da enzima, enquanto que as setas pontilhadas indicam células fracamente coradas devida a uma menor atividade da enzima. Nos animais que apresentam lamelas a maior incidência destas células é nas regiões interlamelares.

.....50

Figura 28: Variações na média de células-cloreto em diferentes etapas do desenvolvimento de *A. gigas*. Nas lamelas, observa-se que ocorre um aumento no número dessas células apenas em animais acima de aproximadamente 1000g. Observe que nos filamentos ocorre um aumento no número destas células tanto para claras (CCclf) quanto para escuras (CCcef). As curvas são: $\text{CCclf} = 5,62\text{Mc}^{0,32}$ ($n = 6$, $r^2 = 0,91$, $P < 0,001$) e $\text{CCcef} = 13,20\text{Mc}^{0,27}$ ($n = 6$, $r^2 = 0,93$, $P < 0,001$).

.....51

Figura 29: Morfometria da superfície de animais em diferentes etapas de desenvolvimento. (A) Área fracional das CCs; (B) Densidade de CCs, e o aumento da densidade pode ser observado pela uma curva: $\text{CCden} = 6,60\text{Mc}^{0,1337}$ ($n = 5$, $r^2 = 0,9$, $P < 0,001$). * indica diferença significativa em relação ao animal anterior ($P < 0,05$).

.....52

Figura 30: Células PAS+ (setas escuras) são observadas nas regiões interlamelares nos animais de 46g e 105g e estão nas primeiras camadas do epitélio branquial, em todos os animais observados. Pode se observar ainda, um aumento visível no número de células PAS+ ao longo do desenvolvimento do peixe.

.....54

Figura 31: Células AB+ (setas escuras) assim como as células PAS+, estão frequentemente observadas nas regiões interlamelares nos animais de 46g e 105g e em todos os peixes analisados, estão nas primeiras camadas do epitélio branquial. Para esta técnica histoquímica, também é observado um aumento visível no número de células AB+ ao longo do desenvolvimento do peixe.

.....55

Figura 32: Análise quantitativa do número de células mucosas (PAS+ e AB+) de peixes em diferentes etapas de desenvolvimento. Observe até aproximadamente 100-200g há um aumento quantitativo em ambos os tipos de células mucosas em um animal na faixa de 500g ocorre aumento significativo apenas nas células PAS+. * Indica diferença significativa em relação ao ponto anterior. ($P < 0,05$).

.....56

LISTA DE TABELAS

TABELA I – Animais coletados no sistema de lagos do Jacaré

.....13

RESUMO

A estrutura das brânquias do peixe amazônico *Arapaima gigas*, um respirador aéreo obrigatório, foi analisada durante a transição para a respiração aérea obrigatória e os dados obtidos foram relacionados ao seu modo de respiração. Brânquias de exemplares com massa corpórea entre 2g a 5000g foram coletadas, fixadas e processadas para análises de morfometria, histoquímica, imunohistoquímica, microscopia eletrônica de transmissão e varredura (área fracional de células-cloreto - AFCC e densidade). Nas etapas iniciais de desenvolvimento da espécie a estrutura branquial é semelhante à de respiradores aquáticos obrigatórios, mas profundas alterações ocorrem à medida que o animal cresce, influenciando na respiração e nas trocas iônicas. As lamelas mantêm sua estrutura organizacional, incluindo a circulação de eritrócitos, mas tornam-se vestigiais em animais a partir de 1000g permanecendo parcialmente imersas no epitélio do filamento. Os principais tipos celulares que compõem o epitélio branquial são as células-cloreto (CCs), células mucosas (CMs) e células pavimentosas (CPs). As CPs apresentam forma irregular e microdobras dispostas aleatoriamente na superfície celular. Dois processos celulares envolvem alterações em brânquias, proliferação e morte celular programada (apoptose) predominando um intenso aumento de células em proliferação até 500-600g. Células em apoptose foram escassas em todos os animais. As CCs, pouco presentes em animais abaixo de 100-200g ocupam uma grande porção no epitélio do filamento em animais acima de aproximadamente 1000g, assim como a AFCC e densidade. Dois tipos de CMs foram observadas, PAS positivas e Alcian Blue positivas. Ocorreu aumento significativo na incidência de ambas até animais com 100-200g e PAS positivas até 500-600g. Na transição para a respiração aérea e conseqüentemente a perda da dependência da respiração aquática devem acarretar as alterações nas brânquias de *A. gigas*, dessa forma as brânquias desempenham outras funções importantes, como regulação iônica e equilíbrio ácido base, que são otimizadas pelos tipos celulares presentes nesse epitélio e sua configuração.

ABSTRACT

The gill structure of the Amazon fish *Arapaima gigas*, an obligatory air breather, was analyzed during its transition to obligatory air breathing behavior and the obtained data was related to its breathing mode. Gills of fish weighing between 2 to 5000g were collected, fixed and processed for morphometric analysis, histochemistry, immunohistochemistry, transmission (TEM) and scanning (SEM) electron microscopy (chloride cell fractional area, CCFA and density). In the first stages of development the gill filaments is as those of water-breathers, but there's intense changes while the animal grow, with influence on respiratory function and ionic exchanges. The lamellae keeps its organizational structure, including red cells passing through it, but them become to vestigial in fish since 1000g, being the interlamellar regions filled with filament cells. The most important cell types of the gill epithelia are the chloride cells (CCs), mucous cells (MCs) and the pavement cells (PCs). The PCs shows irregular shape and random microridges on the cell surface. Two cell processes are involved to gill changes, cells proliferation and programmed death cells (apoptosis); there is an intense proliferating cells until animals reach 500-600g. Apoptotics cells were low in all the animals observed. The number of CCs are low in animals under 100-200g and increased in the filament and lamellar epithelia in animals up to 1000g as well as the CCFA. Two kinds of MCs were observed, PAS positive and Alcian Blue positive. There was a significant raise in both cells until animals with 100-200g and PAS positives until 500-600g. These cells seem to play an important role relation with ion regulation. The transition to air breathing and the restriction for aquatic respiration result in gill changes in *A. gigas*, and the gills may play other important functions like ion and acid-base regulation, optimized by its epithelia cell kinds and its design.

1. INTRODUÇÃO

1.1. A respiração aquática nos peixes

A respiração consiste numa seqüência de reações de oxidação, sendo definida como um processo fisiológico através do qual o oxigênio é captado pelo sangue ao mesmo tempo em que o dióxido de carbono, produto do metabolismo celular, é liberado para o meio externo (FLOREY, 1968). Os peixes de respiração exclusivamente aquática são organismos muito mais adaptados a esse modo de respiração do que o homem para a respiração aérea. Os peixes têm uma extração de até 80% do oxigênio dissolvido na água que passa através das brânquias (FERNANDES e RANTIN, 1989), enquanto que o homem extrai apenas 25% do oxigênio contido no ar inspirado (WEST, 1996). Essa eficiência dos peixes na extração do oxigênio dissolvido na água se deve a dois fatores, o primeiro deles é pela estrutura branquial e seu sistema de circulação e o segundo é pelo fluxo contínuo de água através das brânquias, que ocorre em qualquer ciclo da respiração (GREENWOOD, 1975).

Há uma grande diversidade quanto a estrutura das brânquias em peixes (Figura 01); nos peixes bruxas (uma linhagem dos agnatas), que estão entre os mais basais, a respiração ocorre por meio de bolsas branquiais, estruturas que têm uma organização anatômica única, quando comparada a outros peixes (EVANS *et al.*, 2005). Segundo o autor, estes animais apresentam de 7 a 15 pares de bolsas branquiais (evaginações da farínge) e a comunicação com o meio externo ocorre através de ductos inalantes e exalantes (Figura 01: A e E). Diferentemente dos outros peixes não há associação de estruturas ósseas com essas bolsas e de sua parede interna partem, em direção ao centro, inúmeras dobras epiteliais que ocupam toda a dimensão da bolsa branquial. Em outra linhagem dos agnatas, as lampréias, as bolsas branquiais são diferentes daquelas dos peixes-bruxa, pois o ducto para a entrada de água é o mesmo para saída (Figura 01: B e F). Segundo o autor, essa diferença em relação ao outro grupo deve ao modo de alimentação do animal.

Os elasmobrânquios e teleósteos apresentam estruturas respiratórias muito semelhantes, entretanto deve-se ressaltar a presença de um septo interbranquial muito desenvolvido nos elasmobrânquios (Figura 01: C e G); a diferença no

comprimento do septo é um fator que interfere no fluxo de água através das brânquias (Figura 01: C, D, G, H). Nos teleósteos, a respiração ocorre nas lamelas dos filamentos dos arcos branquiais (Figura 01: D e H) cuja estrutura e organização serão descritos no próximo item. O fluxo de água que passa pelas brânquias depende da frequência de abertura da boca e dos opérculos, cuja pressão da bomba bucal e opercular é sincronizada a um gradiente de pressão buco-opercular que favorece ao ciclo respiratório (ROMER e PARSONS, 1985). O refluxo de água é evitado por uma membrana na margem ventroposterior do opérculo e desta forma a cavidade bucal e a câmara branquial atuam como um sistema de sucção e pressão para manter um fluxo contínuo de água (HUGHES, 1984).

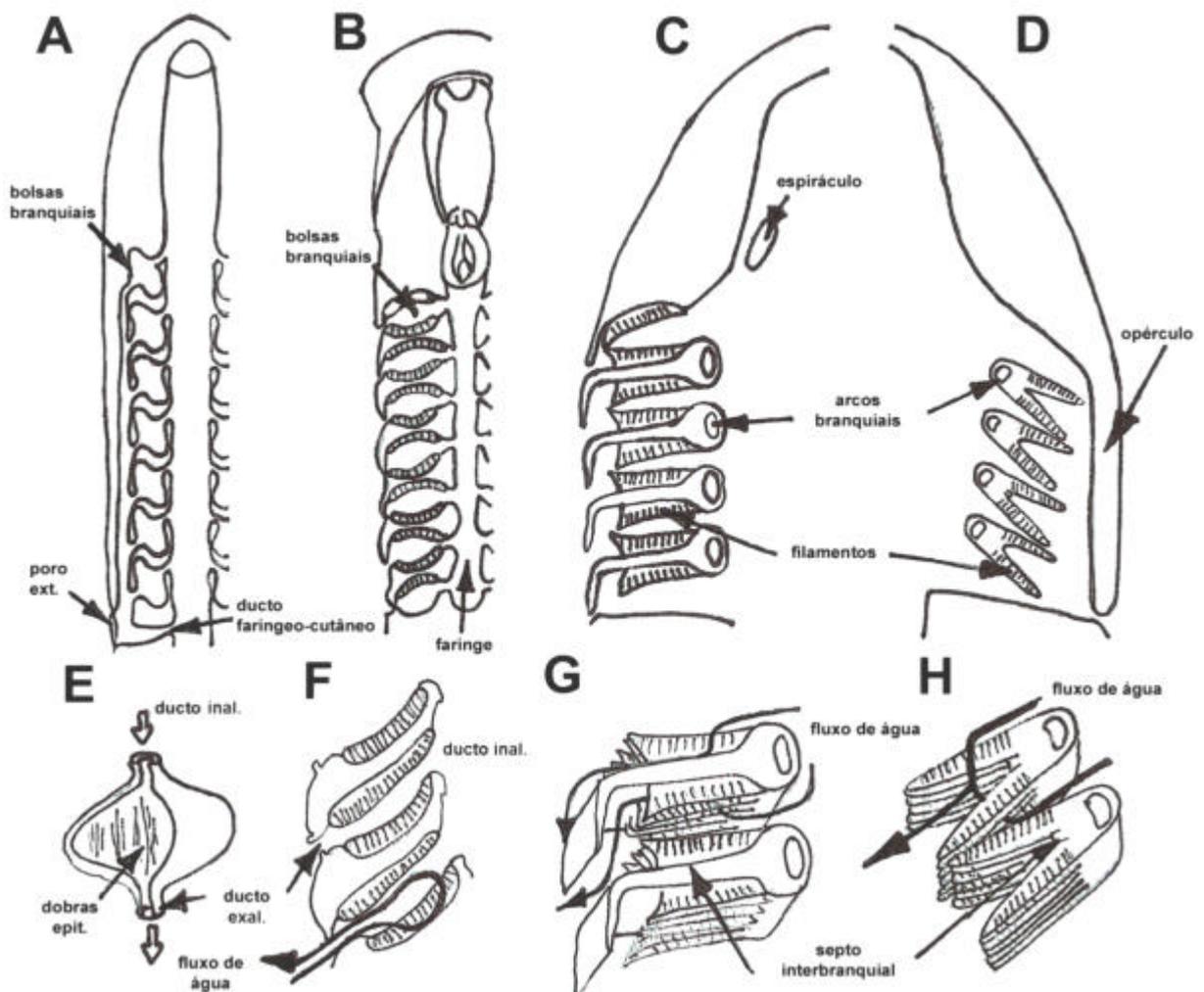


Figura 01: Esquema geral das estruturas respiratórias nos peixes de respiração aquática. Bolsas branquiais em peixes-bruxa (A e E) e lampreias (B e F) e arcos branquiais em elasmobrânquios (C e G) e teleósteos (D e H). (Traduzido de EVANS *et al.*, 2005).

1.2. A estrutura branquial dos peixes teleósteos

A figura 02 mostra a organização das brânquias e sua estrutura. A maioria dos peixes teleósteos apresenta um total de oito arcos branquiais, dispostos quatro a quatro lateralmente na cavidade orofaríngea, protegidos e separados do meio externo pelo opérculo. Na região faríngea, de cada arco branquial, formado pelos ossos epi- e ceratobranquial, partem expansões denominadas rastros, que se direcionam para a cavidade orofaríngea (Figura 02: A). Os rastros possuem células quimiorreceptoras, denominadas botões gustativos, e dependendo da espécie, a forma, tamanho e quantidade de rastros variam, evidenciando uma íntima relação com os hábitos alimentares dos peixes (EIRAS-STOFELLA, 1994).

No lado oposto aos rastros, voltados para cavidade opercular, partem duas fileiras de filamentos branquiais unidos até certa extensão por um septo (septo interbranquial) (Figura 02: B e C). Cada filamento, acima e abaixo do seu eixo longitudinal, apresenta lamelas transversais (Figura 02: C-E), que são as estruturas efetivas para as trocas gasosas. Além das trocas gasosas (O_2 e CO_2) que ocorrem nas lamelas, o epitélio branquial é responsável por várias outras funções, como os ajustes do equilíbrio ácido-base (GOSS *et al.*, 1998) e iônico (HIROSE *et al.*, 2003) e eliminação de produtos nitrogenados (EVANS *et al.*, 2005). Há, portanto uma separação das funções respiratória e íon-osmorregulatória, sendo que as estruturas celulares envolvidas na regulação iônica ocorrem principalmente no epitélio do filamento branquial. Conseqüentemente, a vasculatura das brânquias consiste em dois circuitos sanguíneos, o artério-arterial e o artério-venoso. A circulação artério-arterial esta relacionada a troca de gases nas lamelas e é constituída pela artéria branquial aferente, artéria primária aferente, arteríola lamelar aferente, lamela, arteríola lamelar eferente, artéria primária eferente, artéria branquial eferente (Figura 02: C). A circulação artério-venosa é a responsável por irrigar órgãos e tecidos e é relacionada ao transporte de O_2 e nutrientes para estes locais e pela captação de CO_2 e produtos do metabolismo. Quanto a regulação iônica, Hirose *et al.* (2003) propõem um modelo molecular para as proteínas de membrana das células-cloreto (CCs) envolvidas no transporte de íons, tanto em ambiente marinho quanto em ambiente dulcícola (Figura 03). Na proposta desses autores é possível observar o antagonismo existente entre o desafio osmótico em ambiente marinho e dulcícola.

No ambiente marinho, onde a estratégia utilizada é a secreção de íons, nesta revisão observa-se transporte ativo na membrana basolateral e a presença de canais de Cl⁻ em sua membrana apical e secreção de Na⁺ por uma via paracelular, com auxílio de uma célula acessória.

Dentre os tipos celulares encontrados no epitélio branquial, os principais são as células pavimentosas (CPs) que são as mais numerosas; as células mucosas (CMs) que são responsáveis pela secreção de mucosubstâncias, e as células-cloreto (CCs), que são responsáveis pela absorção de íons Cl⁻ e Ca²⁺ nos peixes de água doce e excreção de Na⁺ e Cl⁻ nos peixes marinhos. As CMs e CCs estão distribuídas entre as CPs no epitélio que reveste o filamento branquial e, dependendo das características físicas e químicas da água, pode ocorrer proliferação das CCs no epitélio da lamela, o que aumenta a distância de difusão água-sangue. O aumento da barreira água-sangue nas lamelas reduz a absorção de O₂ da água e, conseqüentemente, sua transferência para o sangue (PERRY, 1997; SAKURAGUI *et al.*, 2003).

Esta organização anatômica altamente complexa tem sido objeto de vários estudos tanto em relação à caracterização estrutural/ultraestrutural e morfometria (OLSON e FROMM, 1973; HUGHES, 1972; HOSSLER *et al.*, 1985; MORON e FERNANDES, 1996; PERNA e FERNANDES, 1996; SAROGLIA *et al.*, 2002; KARAKATSOULI *et al.*, 2006; COSTA *et al.*, 2007) quanto à comparação morfológica e morfométrica entre as diferentes espécies com relação a eficiência da função respiratória, crescimento e taxonomia (GRAY, 1954; HUGHES, 1984; OJHA e MISHRA, 1993; FERNANDES *et al.*, 1994; SANTOS *et al.*, 1994; PERNA e FERNANDES, 1996; MATTIAS *et al.*, 1996; MAZON *et al.*, 1998; EIRAS-STOFELLA *et al.*, 2001; FERNANDES e PERNA-MARTINS, 2002; COSTA *et al.*, 2007) e às alterações que possam comprometer essa função devido aos efeitos diretos e indiretos de contaminantes no meio aquático (WOOD, 2001; MAZON *et al.*, 2002; FERNANDES *et al.*, 2007).

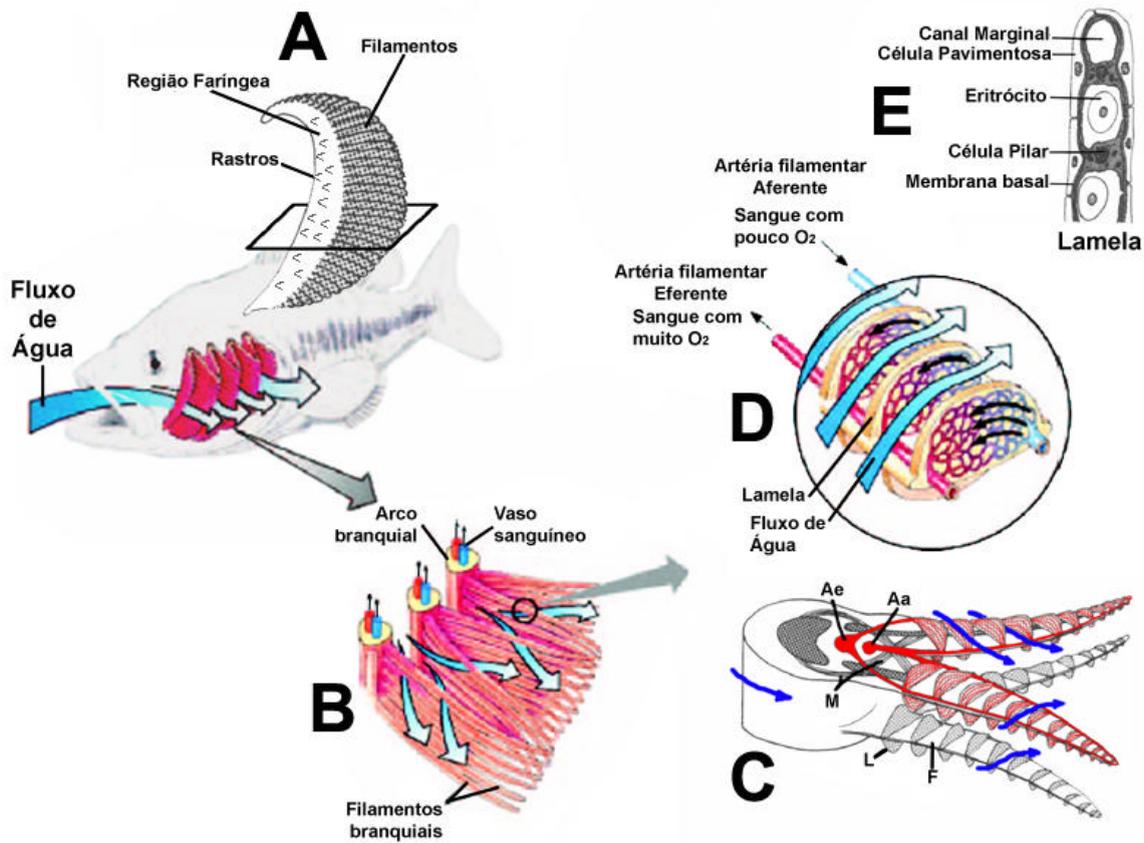


Figura 02: Disposição dos arcos branquiais em um peixe teleósteo. Há quatro pares de arcos na cavidade faríngea, sendo quatro em cada lado (A). Perpendicularmente a cada arco partem duas fileiras de filamentos (B), sendo que em cada lado do filamento há uma fileira de lamelas perpendiculares a este (C e D). As setas azuis mostram o sentido do fluxo de água, que atravessa as lamelas em um sentido contrário ao fluxo sanguíneo e no detalhe da lamela em E podem ser observados seus principais componentes. F= Filamento; L= Lamela; Aa= Artéria aferente; Ae= Artéria eferente; M= músculo branquial adutor.

(Adaptado de BONE *et al.*, 1995; HILDEBRAND e GOSLOW, 2006; EVANS *et al.*, 2005)

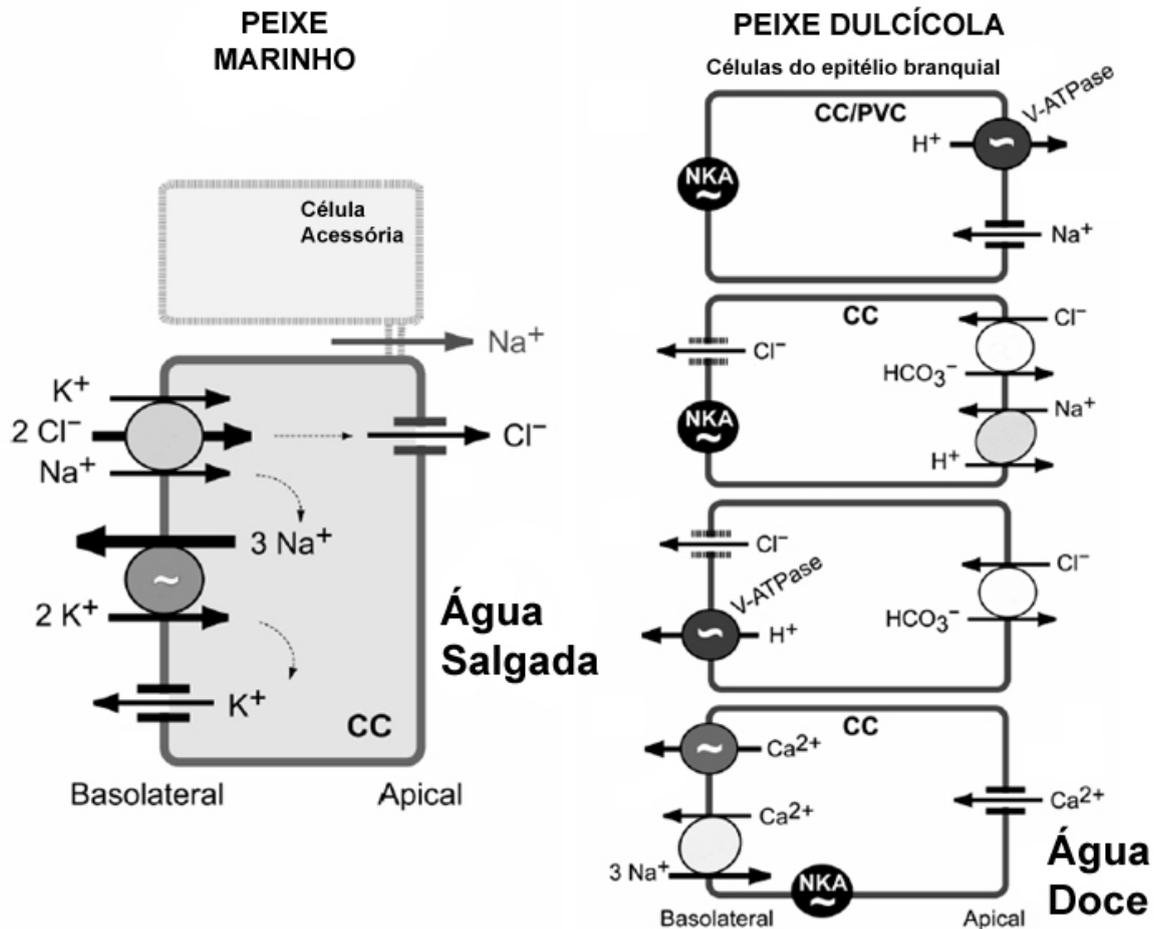


Figura 03: Modelo de transporte iônico em peixes de água doce e de ambiente marinho. Pode ser observado que os teleósteos marinhos há secreção de íons, mediada por duas células; Na membrana basolateral o transporte de Cl^- ocorre por um co-transportador $\text{Cl}^-/\text{Na}^+/\text{K}^+$, sendo que há reabsorção do Na^+ por transporte ativo, realizado por uma Na^+/K^+ -ATPase e a reabsorção do K^+ ocorre através de um canal de K^+ ; na membrana apical o Cl^- é transportado através de um canal de Cl^- enquanto que o Na^+ é transportado via paracelular, auxiliado de uma célula acessória. A absorção de íons nos peixes dulcícolas ocorre por quatro células onde pode ser observado que na membrana basolateral há grande quantidade de proteínas que realizam transporte ativo (~) sendo observados: uma Na^+/K^+ -ATPase (NKA), uma Ca^{2+} -ATPase e uma V-ATPase; o Ca^{2+} também é absorvido através de um trocador $3\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$, o Cl^- é absorvido através de canais e ainda na membrana basolateral observa-se a presença de V-ATPase; na membrana apical observa-se a absorção de Ca^{2+} e Na^+ através de canais, sendo que o Na^+ também é absorvido através de um trocador Na^+/H^+ , o Cl^- é absorvido através de um trocador $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ e na membrana apical observa-se, também, uma V-ATPase. (Traduzido de Hirose *et al.*, 2003)

1.3. A respiração aérea em peixes

A transição da respiração aquática para a respiração aérea foi de suma importância na história evolutiva dos vertebrados. O desenvolvimento do modo de respiração aérea, segundo GANS (1970) provavelmente surgiu de forma acidental em peixes que nadavam rente à superfície durante períodos de baixa disponibilidade de O_2 . Provavelmente essa transição começou no período Cambriano; pois desde esta época, hipóxia e anóxia em rios e lagos têm sido eventos comuns na história evolutiva dos peixes (RANDALL *et al.*, 1981). Até os dias atuais, períodos de hipóxia/anóxia são observados em vários sistemas aquáticos, como em algumas planícies alagadas da Amazônia (VAL e ALMEIDA-VAL, 1995). A respiração aérea, segundo GANS (1970), trouxe vantagens para os peixes, pois a utilização do ar como uma fonte de O_2 permitiu uma independência das variações de O_2 na água, permitindo a colonização de outros ambientes e uma redução de tamanho no órgão de respiração aquática. A respiração aérea apareceu independentemente e diversas vezes até o clímax na radiação dos peixes, sendo que diferentes estruturas de trocas com o ambiente aéreo são descritas em diferentes grupos (VAL e ALMEIDA-VAL, 1995).

Podemos classificar os peixes de respiração aérea em duas categorias: peixes de respiração aérea facultativa e peixes de respiração aérea obrigatória. Os peixes de respiração aérea facultativa obtêm O_2 do ar apenas quando há baixa disponibilidade de O_2 na água, enquanto que os que possuem respiração aérea obrigatória dependem exclusivamente do O_2 atmosférico para a manutenção do metabolismo aeróbico.

Os órgãos adaptados para a respiração aérea em peixes possuem intensa irrigação sanguínea e são supridos com uma rede de finos capilares (VAL e ALMEIDA-VAL, 1995). Dentre esses órgãos podem ser: o epitélio da superfície bucal, faringeal, branquial e cavidade opercular como ocorre em *Synbranchus marmoratus* (Bloch, 1795), *Hypopomus brevirostris* (Steindachner, 1868) e *Anguilla anguilla* (Linnaeus, 1758) (MUNSHI, 1976), bolsas adjacentes a faringe, ou seja, a câmara suprabranquial localizada no teto da faringe acima das brânquias como em *Clarias batrachus* (Linnaeus, 1758), *Channa striatus* (Bloch, 1793) e *Anabas*

testudineus (Bloch, 1792) (MUNSHI, 1961; HUGHES e DATTA-MUNSHI, 1973; HUGHES e MUNSHI, 1973), parte do sistema digestório como o estômago ou o intestino em *Pterygoplichthys multiradiatus* (Hancock, 1828), *Hypostomus regani* (Ihering, 1905), *Pterygoplichthys anisitsi* (Eigenmann e Kennedy, 1903) e *Corydoras aeneus* (Gill, 1858) (CARTER e BEADLE, 1931; GEE e GRAHAM, 1978; PODKOWA e GONIAKOWSKA-WITALINSKA, 2002) e modificação da bexiga natatória como em *Hoplerythrinus unitaeniatus* (Spix e Agassiz, 1829), *Piabucina festae* (Boulenger, 1899) e *Arapaima gigas* (Schinz, 1822), sendo este último um respirador aéreo obrigatório GRAHAM, 1997). Finalmente, nos dipnóicos as trocas gasosas ocorrem em um pulmão funcional, como em *Lepidosiren paradoxa* (Fitzinger, 1837). Considerando a grande diversidade de estruturas para as trocas gasosas no meio aéreo em peixes, há o interesse na morfologia dessas estruturas e alterações que ocorrem nos órgãos respiratórios durante o crescimento do animal de forma a permitir uma maior compreensão da fisiologia respiratória nesses peixes e uma possível classificação sistemática com base nestas estruturas, como a relatada em GRAHAM (1997) e PERRY e SANDER (2004).

1.4. A respiração em *Arapaima gigas* (Pirarucu)

Nos peixes que possuem respiração aérea obrigatória observam-se profundas modificações na estrutura branquial durante o desenvolvimento do animal. Por exemplo, em *L. paradoxa* os alevinos recém eclodidos apresentam brânquias externas, sendo que durante o seu desenvolvimento ocorre uma atrofia e desaparecimento deste órgão reduzindo o desenvolvimento das brânquias internas, sendo que em animais adultos as brânquias não têm participação nas trocas gasosas (MORAES *et al.*, 2005).

O peixe amazônico *Arapaima gigas*, popularmente conhecido como pirarucu, é um peixe que apresenta os dois modos de respiração, aquática e aérea, em etapas distintas do seu desenvolvimento. Até o oitavo ou nono dia após a eclosão dos ovos essa espécie apresenta exclusivamente respiração branquial e, em animais jovens, a estrutura branquial é semelhante aquela dos peixes teleósteos de respiração exclusivamente aquática e há, até certo tamanho, uma dependência das

brânquias para a respiração (GRAHAM, 1997). Em animais adultos embora possa ocorrer absorção de O_2 através do epitélio branquial, esta não é suficiente para suprir a demanda de O_2 no animal, sendo que a maior absorção de O_2 ocorre através da bexiga natatória modificada, que é muito semelhante ao pulmão dos peixes pulmonados, entretanto este órgão apresenta apenas uma câmara diferentemente dos pulmões que são, geralmente, órgãos pares (VAL e ALMEIDA-VAL, 1995). Utilizando microscopia eletrônica de varredura (MEV), BRAUNER *et al.* (2004) verificaram que a morfologia branquial de um exemplar de 10g é típica dos peixes com respiração exclusivamente aquática, entretanto um exemplar de 100g (45 dias após eclosão) começa a apresentar profundas modificações da estrutura do filamento que são bem evidentes em exemplares com 1000g (4~5 meses) nos quais não é possível observar a presença de lamelas.

Nos últimos anos *A. gigas* tem sido alvo de diversos estudos, tanto por razões ecológicas quanto por razões econômicas, uma vez que a atividade pesqueira na região amazônica tem aumentado e que esta espécie apresenta grande produtividade em sistemas de piscicultura (VAL e ALMEIDA-VAL, 1995; GOMES *et al.*, 2006), e que a espécie pode atingir 4kg em apenas 1 ano (VAL e ALMEIDA-VAL, 1995). Estudos quantitativos sobre as alterações nos elementos branquiais ao longo do desenvolvimento de *A. gigas* são escassos principalmente na fase de transição de respiração aquática para exclusivamente aérea. Considerando que a fase de transição da respiração aquática para a respiração aérea pode ser crítica para o desenvolvimento do animal e que isso ocorre nos primeiros 5-6 meses de vida este estudo descreve a configuração dos elementos branquiais e as alterações morfológicas das brânquias de *A. gigas* durante o desenvolvimento, assim como as possíveis implicações da remodelagem das brânquias na função respiratória e na regulação iônica.

1.5. As hipóteses desse estudo

- 1) Os elementos que constituem as unidades de troca de gases (lamelas) sofrem alterações morfofuncionais ao longo do desenvolvimento de *A. gigas*, de forma a reduzir drasticamente a absorção de O₂ do meio aquático?
- 2) Os processos envolvidos nas alterações das lamelas implicam em remodelamento do tecido branquial que incluem proliferação celular e morte celular programada?
- 3) A redução na superfície respiratória implica em modificações morfo-funcionais envolvendo as demais funções das brânquias, principalmente em relação a regulação iônica via proliferação de células-cloreto ou aumento da área fracional (AFCC) das CCs?

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivos gerais

Caracterizar a organização e as modificações dos elementos branquiais respiratórios e não respiratórios de *A. gigas* durante o seu desenvolvimento, relacionando estas modificações com a função respiratória das brânquias, ajustes iônicos e secreção de mucopolissacarídeos.

2.2. Objetivos e Metas

- Estimar as variações da barreira de difusão de gases nos peixes em diferentes etapas de desenvolvimento, utilizando ferramentas de análises morfométricas;
- Identificar as modificações que ocorrem na configuração e estrutura dos filamentos branquiais ao longo do desenvolvimento do animal e suas relações com a mudança do modo de respiração;
- Identificar quais os principais processos responsáveis pela modificação da estrutura branquial através de técnicas de imunohistoquímica para detecção de células em apoptose nas lamelas ou proliferação celular;
- Verificar se ocorrem alterações na produção de mucopolissacarídeos ao longo do desenvolvimento de *A. gigas*, utilizando técnicas de histoquímica para a identificação de mucopolissacarídeos;
- Verificar se há alteração nas estruturas branquiais associadas a regulação iônica através da quantificação das células de cloreto.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Material Biológico – Considerações sobre a espécie *Arapaima gigas*

A espécie *Arapaima gigas* (Figura 04), popularmente conhecida como pirarucu tem a seguinte classificação sistemática:

Phylum: Chordata

Classe: Actinopterygii

Ordem: Osteoglossiformes

Família: Arapaimidae

Subfamília: Heterotidinae

Gênero: *Arapaima*



Figura 04: Exemplar juvenil de *Arapaima gigas* com 212g. Barra de escala: 10cm.

Este peixe é considerado o maior teleósteo de água doce no mundo, podendo atingir 4,5m e pesar 200 kg (GRAHAM, 1997). A espécie é encontrada nos rios da parte setentrional da América do Sul, vivendo em lagos e rios tributários, de águas claras, brancas e pretas, com pH ligeiramente alcalino e com temperaturas variando entre 24° a 37°C. Em geral, a espécie não é encontrada em zona de fortes

correntezas e águas ricas em sedimentos. Na época da seca, *A. gigas* é capaz de atravessar grandes distâncias em terra firme procurando água, durante esse período os peixes formam casais, procurando em seguida ambientes calmos para preparar o seu ninho, reproduzindo-se durante a enchente. Após a eclosão dos ovos há cuidado parental por aproximadamente seis meses (SALVO-SOUZA e VAL, 1990). Os animais jovens nadam em grupo e, com o desenvolvimento do modo de respiração aérea, 8 a 9 dias após a eclosão dos ovos, o comportamento de emergir para a superfície e tomada de O₂ também é em grupos (GRAHAM, 1997).

A. gigas é bastante vulnerável à ação dos pescadores e o abate dos machos após as desovas expõe os filhotes à predadores. Há uma longa fase de imaturidade sexual que dura de 3 a 5 anos e a pesca dessas espécies juvenis, chamados "bodecos", variando entre 30 e 40 Kg diminui o sucesso reprodutivo.

3.2. Local da coleta dos animais

Exemplares de *A. gigas* com massa corpórea entre 1,67g e 5010g (TABELA I) foram coletados utilizando arrasto de rede e peneiras, no sistema de lagos do Jacaré (Figura 05) (S03° 31'53" W60° 40'181") que é um conjunto de pequenos lagos que têm comunicação direta com o rio Solimões, próximo a cidade de Manacapuru, aproximadamente 100 km de Manaus. A coleta foi realizada mediante licença ambiental do Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA / MMA) nº 15/2004 (Apêndice I).

TABELA I – Animais coletados no sistema de lagos do Jacaré

	Animais Coletados									
Comprimento Total (cm)	6,9	X	19,8	19,0	25,1	31,0	X	53,5	79,5	81
Massa Corpórea (g)	1,675	34	46,5	54,5	105,6	211,9	575	1343	4995	5020

As coletas foram realizadas no período de setembro/outubro de 2004/2005, na vazante do Rio Solimões por pescadores locais sob a coordenação dos Professores da Universidade Federal do Amazonas, Oscar T. F. da Costa e Wallace P. Duncan. Nos pontos de coleta o pH variou entre 6,25 e 6,7 e a temperatura (°C) entre 28,3 e 29,7. O rio Solimões é um exemplo típico de rio de água branca.

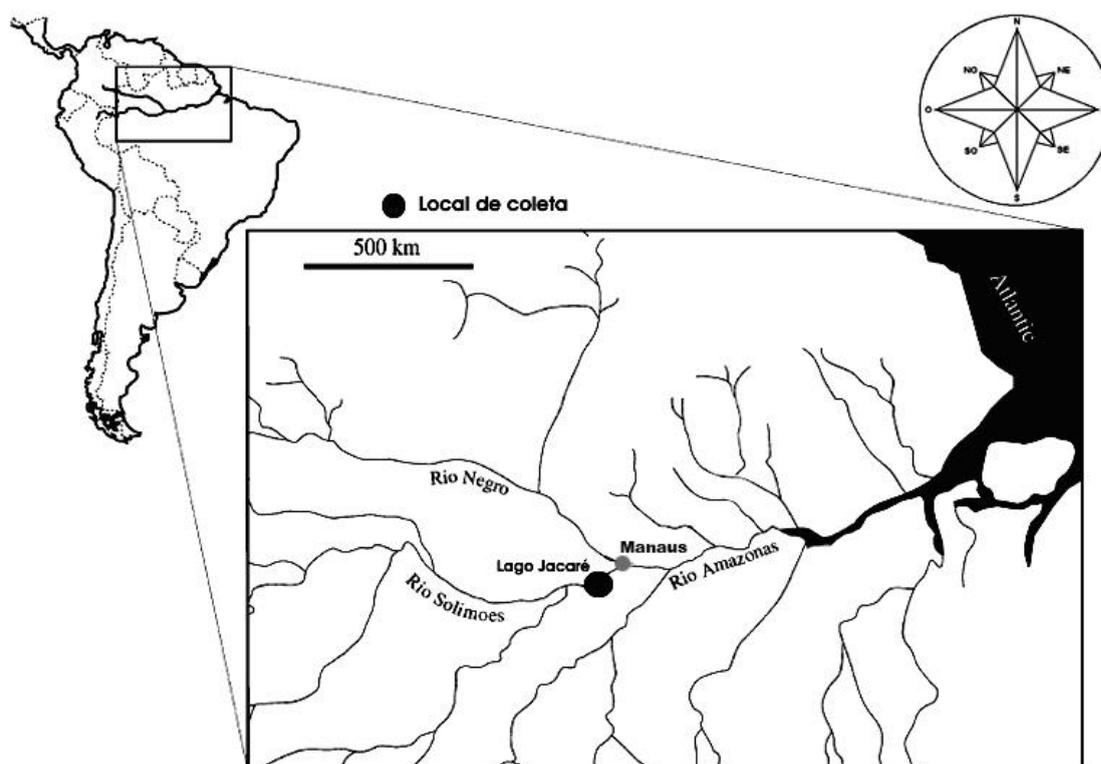


Figura 05: Local onde os exemplares de *A. gigas* foram coletados, o sistema de lagos do Jacaré, Baixo Rio Solimões. (cedido por Wallace P. Duncan)

3.3. Procedimento para retirada das brânquias

Imediatamente após a coleta, os animais foram anestesiados em (p-aminobenzoato de etila, benzocaína) 0,9mL⁻¹. Os arcos branquiais foram removidos, lavados em solução fisiológica de NaCl 0,9% e fixados em glutaraldeído (GTA) 2,5% em tampão fosfato 0,1M, pH 7,3 a 4°C. Após um período de 24h, as amostras foram transferidas para uma solução de manutenção constituída de GTA 0,5% com o mesmo tampão. O glutaraldeído é um ótimo fixador por apresentar uma ótima preservação das organelas, seu mecanismo básico de ação é a ligação em grupamentos amino (NH₂) que ocorrem nas proteínas, com alteração mínima da configuração terciária das cadeias polipeptídicas, e liga-se também nos radicais

aminados de fosfolipídios das membranas (SOUZA *et al.*, 1998). As amostras coletadas foram enviadas para o Laboratório de Zoofisiologia e Bioquímica Comparativa (DCF/UFSCar) para processamento e análise.

3.4. Processamento laboratorial e análise das brânquias

No laboratório os arcos branquiais foram divididos em três regiões: dorsal, mediana e ventral e, posteriormente cada uma destas regiões, aleatoriamente sorteadas, foram separadas para um tipo de análise. As amostras utilizadas para análise em microscopia de luz foram processadas de forma a ser posteriormente aplicada técnicas de histoquímica para a identificação de mucosubstâncias das células mucosas ou morfometria de elementos branquiais e técnicas de imunohistoquímica para detecção de células de cloreto (a-5 positivas), proliferação celular (PCNA positivas) e apoptose (TUNEL positivas). As amostras utilizadas para microscopia eletrônica de varredura e transmissão foram processadas para a observação da morfologia ultraestrutural das brânquias e mensurações de parâmetros referentes ao número e superfície das células-cloreto.

3.4.1. Processamento para microscopia de luz em historesina

O processamento em historesina permite a obtenção de cortes do tecido branquial sem distorções e menos espessos do que 5 μm , condição necessária para análises morfométricas. As amostras foram desidratadas gradualmente em álcool nas concentrações de 50% até 95%, uma hora em cada etapa da bateria de desidratação sendo posteriormente embebidas e incluídas com historesina comercial (Leica Historesin Embedding Kit), em histomoldes para a obtenção de cortes em posição sagital. Em um micrótomo (HM 360 MICROM), os cortes obtidos com espessura de 3 μm foram colocados em lâminas histológicas, sendo então aplicadas técnicas de histoquímica (azul de toluidina, azul de toluidina+fucsina básica e métodos de PAS e Alcian blue). As análises do material e o registro de imagens foi

feito em um microscópio Olympus-Micronal BX51 acoplado a uma câmera de vídeo ligada a um computador, utilizando o software C.A.S.T System (Olympus, Denmark).

3.4.1.1. Análise da estrutura interna dos filamentos e morfometria dos elementos branquiais

As lâminas histológicas com cortes sagitais das amostras de brânquias foram coradas com azul de toluidina e fucsina básica. Na figura 06 estão apresentados os parâmetros mensurados, sendo: altura total ou estrutural (A) da lamela que tem início anatomicamente no canal proximal, no interior do filamento e se estende até o canal marginal ou ápice da lamela; região potencialmente funcional (B) da lamela, que representa a região funcional da lamela responsável pelas trocas de gases e tem início no término do epitélio do filamento e se estende até o canal marginal; a espessura do epitélio do filamento (C) e epitélio da lamela (D); a largura da lamela (E) e a distância entre as lamelas (interlamelar) (F). Para calcular o valor médio de cada parâmetro mensurado, em cada animal, foram realizadas 20 mensurações em campos não contínuos e os dados foram então transferidos para uma planilha do software Excel para posterior análise estatística.

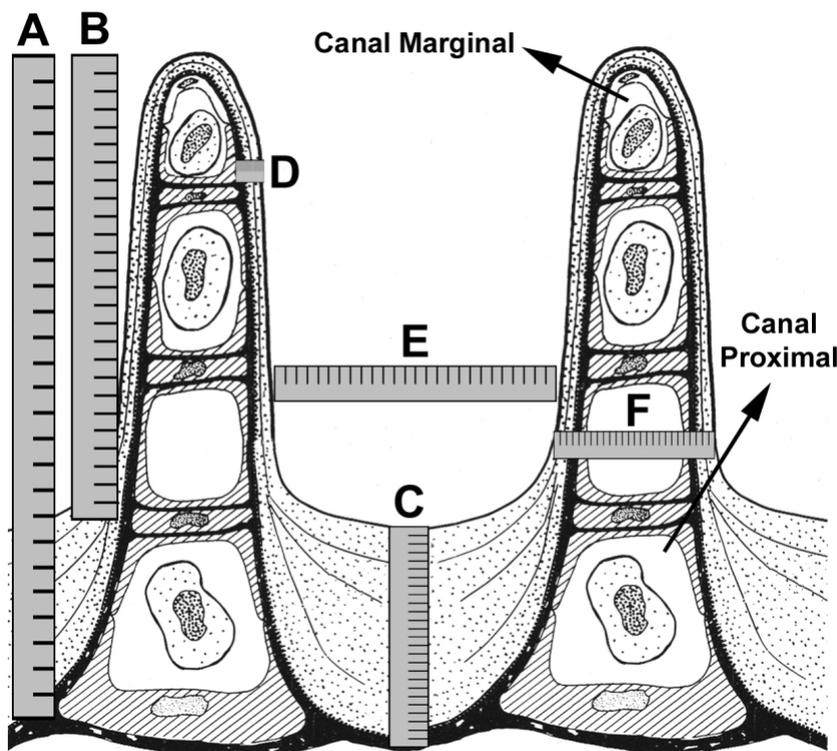


Figura 06: Parâmetros mensurados nas brânquias de *A. gigas*. A: Altura total da lamela; B: Altura potencialmente funcional da lamela; C: Espessura do epitélio do filamento; D: Espessura do Epitélio da lamela; E: Distância entre lamelas (interlamelar); F: Largura da lamela (região basal). (Modificado de Hughes, 1984)

3.4.1.2. Análise do número de células mucosas

A determinação do tipo e número de células mucosas durante o desenvolvimento de *A. gigas* foram efetuadas considerando a reação das mucosubstâncias aos corantes utilizados (Figura 07). As células que apresentaram mucosubstâncias com hexoses neutras, açúcares e/ou ácidos siálicos foram identificadas utilizando o método do ácido periódico-Schiff (PAS). As células mucosas que possuíam mucopolissacarídeos contendo grupos carboxil e éster-sulfato foram identificadas utilizando Alcian Blue (AB) em pH de 2,5. Após a reação histoquímica, as lâminas foram analisadas ao microscópio de luz. Com aumento de 200x, vinte campos aleatórios e não contínuos foram aleatoriamente selecionados e as células de cada campo foram identificadas e contadas, sendo os dados transferidos e armazenados em uma planilha no software Excel.

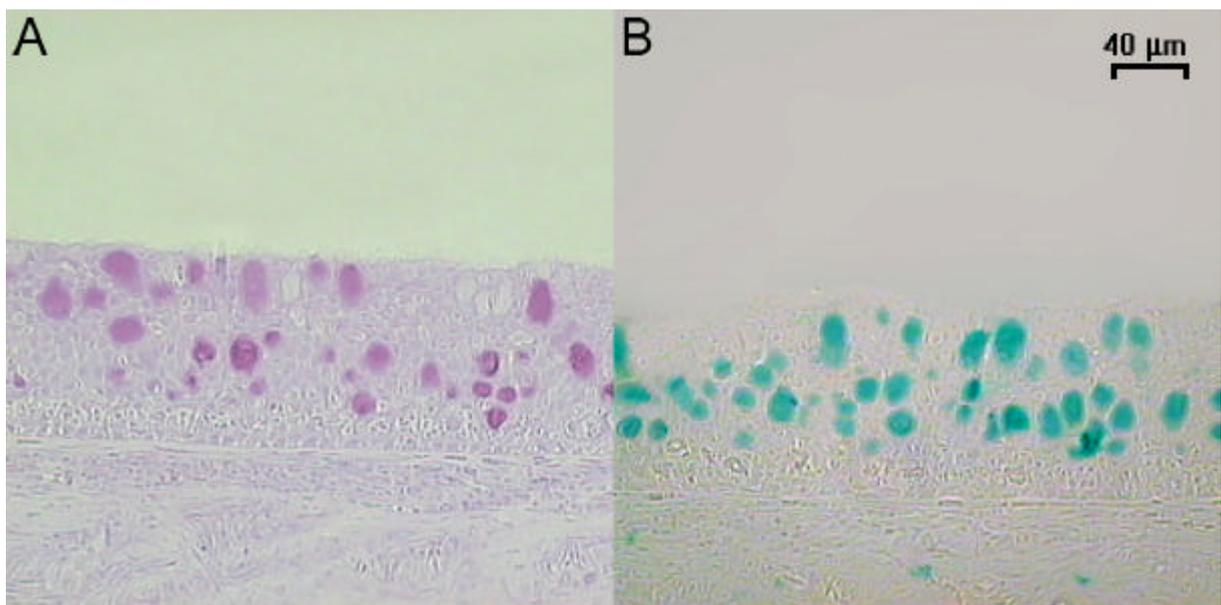


Figura 07: Células mucosas com reação positiva pelo método de PAS em A; células com reação positiva ao método de Alcian blue, (pH de 2,5) em B.

3.4.2. Processamento para microscopia de luz em parafina

Para técnicas de imunohistoquímica é necessário que o material seja incluído em parafina de forma que após a remoção da parafina durante o processamento, possa ocorrer a ligação dos anticorpos com o antígeno. No processamento de inclusão em parafina as amostras foram gradualmente desidratadas em álcool,

desde as concentrações de 70% até 100%, uma hora em cada etapa da bateria de desidratação, sendo posteriormente diafanizados em xilol 100%, embebidas e incluídas em parafina histológica (INLAB). Os blocos de parafina foram fixados em um suporte de madeira, de forma a obter cortes em posição sagital em relação aos filamentos branquiais e posteriormente foram trimados. Os cortes com espessura de aproximadamente 8µm foram efetuados em um micrótomo (HM 360 MICROM), e colocados em lâminas histológicas. Técnicas de imunohistoquímica para a marcação de células-cloreto, células em proliferação e células em apoptose foram então aplicadas.

3.4.2.1. Imunohistoquímica para marcação de células-cloreto

Para a determinação do número de CCs nas brânquias, foi empregada a técnica de DANG *et al.* (2000), com pequenas modificações. As lâminas histológicas contendo os cortes de brânquias foram desparafinadas e reidratadas em uma série decrescente de etanol e lavadas em tampão tris salino + triton (TBS-T) diluído por 10 minutos. As amostras foram pré-incubadas com soro de cabra normal 20% (NSG) para bloquear sítios de ligação não específicos; o primeiro anticorpo, a5 anti Na⁺/K⁺-ATPase IG (1:300) (Developmental Studies Hybridoma Bank, Department of Biological Sciences, the University of Iowa, USA), foi incubado “overnight” em câmara úmida e a temperatura ambiente. Este anticorpo conjuga-se à subunidade a5 da enzima Na⁺/K⁺-ATPase que esta presente em grande quantidade nas CCs. No dia seguinte as secções foram novamente lavadas em TBS-T diluído (10 min) e incubadas com o segundo anticorpo, cabra anti-camundongo (GAM, Sigma), (1:150) por 1 hora. Este anticorpo conjuga-se ao primeiro. Após lavagem em TBS-T diluído (10min) o complexo foi incubado com o anticorpo peroxidase anti-peroxidase (PAP/mouse, Sigma) (1:800) por 1 hora e lavado em tampão tris (TB) por 10 minutos. O complexo foi visualizado utilizando a coloração com DAB-Ni (3,3'-diaminobenzidina, Sigma) (menos que 1%) e H₂O₂; esta solução reage com a peroxidase formando um complexo escuro e a intensidade de cor do complexo depende das unidades de Na⁺/K⁺-ATPase nas CCs e esta relacionado a sua atividade sendo possível diferenciar células forte e fracamente coradas. Controles

negativos para o primeiro e o segundo anticorpos foram obtidos suprimindo-se a aplicação do primeiro anticorpo em uma lâmina e do segundo anticorpo em outra. Estes foram incubados e corados como as demais secções microscópicas. As lâminas foram montadas em “Kaiser’s Glicerol Gelatine” e após secagem, no microscópio Olympus-Micronal BX51 foram escolhidos aleatoriamente 20 campos não contínuos e as células-cloreto forte e fracamente coradas em cada campo foram contadas. As CCs encontradas nas lamelas e nos filamentos foram contadas separadamente. Os dados coletados foram gravados em uma planilha do software Excel para a análise estatística e determinação da porcentagem total de células forte e fracamente coradas em cada estrutura branquial.

3.4.2.2. Imunohistoquímica para marcação de células em proliferação

Para a determinação de proliferação celular no tecido branquial de *A. gigas*, foi utilizado um anticorpo monoclonal (PC10 Oncogene), específico para o antígeno de núcleos em divisão, ou seja, proliferação celular (PCNA). O antígeno nuclear para células em proliferação é uma proteína nuclear (36 Kda, não-histona), a qual é uma proteína auxiliar da DNA polimerase. O protocolo com PCNA foi o mesmo usado para identificação da Na^+/K^+ -ATPase, incluindo os controles. Após desparafinização, durante o processo de re-hidratação do tecido, a atividade de peroxidases endógenas foram inibidas através da imersão das amostras em uma solução de metanol com 1% e H_2O_2 por 30 minutos. Após a re-hidratação dos cortes histológicos, as lâminas que os continha foram imersas em uma cuba histológica contendo uma solução aquosa de ZnSO_4 1% a 45°C e mantidas nesta solução por 5 minutos, as amostras foram então colocadas em outra cuba contendo água destilada gelada (4°C) por 5 minutos. Este procedimento foi repetido para que o choque térmico rompesse a membrana nuclear, permitindo a ligação do anticorpo ao antígeno PCNA. Após lavagem das amostras em tampão TBS-T diluído por 20 minutos o material foi incubado com um primeiro anticorpo PCNA PC10 (Oncogene Research Products, Calbiochem) (1:1000) em câmara úmida “overnight”. As amostras foram novamente lavadas em tampão TBS-T diluído por 20 minutos e incubadas com o segundo anticorpo, cabra anti-camundongo (GAM, Sigma), (1:150)

por 1 hora em câmara úmida. Após lavagem em tampão TBS-T diluído (20min) o complexo foi incubado com o anticorpo peroxidase anti-peroxidase (PAP/mouse, Sigma) (1:800) por 1 hora em câmara úmida e lavado em tampão tris (TB) por 20 minutos. O complexo foi visualizado utilizando a coloração com DAB-Ni (3,3'-diaminobenzidina, Sigma) (menos que 1%) e H₂O₂; esta solução reage com a peroxidase formando um complexo escuro. As lâminas foram montadas em Kaiser's Glicerol Gelatine e após secagem foram observadas em microscópio de luz. Vinte campos não contínuos foram selecionados aleatoriamente e as células escuras de cada campo foram contadas. Os dados coletados foram transferidos e salvos em uma planilha do software Excel para a análise estatística.

3.4.2.3. Imunohistoquímica para marcação de células em apoptose

Para a imunomarcação de células apoptóticas foi utilizado o kit "ApopTag Plus Peroxidase in situ" (Chemicon). Este kit contém todos os anticorpos e tampões necessários e tem como base o ensaio de TUNEL (terminal uridine deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling), que marca extremidades livres OH' de fragmentos terminais de DNA, existente em células apoptóticas. Nesta técnica, as amostras depois de re-hidratadas foram submetidas a um pré-tratamento com proteinase K (Chemicon International), que remove nucleases e outras proteínas ligadas aos fragmentos de DNA. Após 15 minutos as amostras foram lavadas em água destilada por 4 minutos e a atividade das peroxidases endógenas foram inibidas pelo tratamento do tecido em H₂O₂ 3% em tampão salino de fosfato (PBS) por 5 minutos. As amostras foram, então, tratadas com um tampão de cacodilato de potássio (ApopTag® Equilibration Buffer) por 1 hora. As lâminas foram incubadas com a enzima deoxynucleotidil terminal transferase (ApopTag® TdT Enzyme) e α nucleotídeos trifosfato (ApopTag® Reaction Buffer) por 1 hora em câmara úmida. A TdT cataliza a adição de nucleotídeos trifosfatos na extremidade 3'OH' dos fragmentos de DNA e os nucleotídeos incorporados formam um oligômero composto de um conjugado de digoxigenina e nucleotídeos. As amostras receberam tratamento com um tampão específico do kit (ApopTag® Stop/Wash Buffer), para interromper a atividade da TdT, por 10 minutos em câmara úmida. Após lavagem em

PBS (3min) as amostras foram incubadas com um anticorpo anti-digoxigenina peroxidase (Apoptag® Anti-digoxigenin conjugate) em câmara úmida, durante 30 minutos. Após lavagem em PBS (6min), o substrato para peroxidase, fornecido pelo kit (Apoptag® DAB Dilution Buffer + DAB Substrate), foi adicionado. O conjugado formado tornou as células em apoptose escuras. Controles negativos foram obtidos suprimindo-se a aplicação da enzima TdT e aplicando proteinase K para controlar incorporações de nucleotídeos não específicas. Após montagem e secagem das lâminas em “Kaiser’s Glicerol Gelatine” as lâminas foram levadas ao microscópio de luz e vinte campos não contínuos aleatoriamente selecionados de cada lâmina foram contadas, sendo os dados, posteriormente transferidos e salvos para uma planilha do software Excel e análises estatísticas foram efetuadas.

3.4.3. Processamento para microscopia eletrônica de transmissão

Para um registro das modificações ultraestruturais das células de *A. gigas* durante o desenvolvimento, amostras foram selecionadas e processadas para microscopia eletrônica de transmissão. As amostras fixadas em GTA tamponado foram lavadas na mesma solução tampão, com a mesma osmolaridade e mesmo pH. As amostras foram pós-fixadas em OsO₄ 1%, contrastadas em bloco com acetato de uranila e sacarose 10,56% (em bloco), desidratadas em série crescente de acetona (30% a 100%) e embebidas em resina SPURR Low Viscosity-Embedding Kit (EMS) e finalmente incluídas em moldes de silicone, em posição sagital aos filamentos. Após a inclusão foi realizada a trimagem do bloco e cortes semi-finos foram obtidos e corados com azul de toluidina para selecionar uma região a ser observada em MET. Após nova trimagem, cortes ultrafinos foram obtidos com o ultramicrotomo Leica UltraCut R. e colocados em uma grade de cobre (Specimen Grid 3.05 diameter, 0.8 thickness Copper 200 mesh T200-Cu). As amostras na grade foram contrastadas em acetato de uranila saturada e solução de Reynolds (citrato de chumbo). As amostras foram observadas e fotografadas em um microscópio eletrônico de transmissão JEOL JEM1200-EXII – Transmission Electron Microscope e as imagens obtidas foram armazenadas em arquivo digital, formato “tif”.

3.4.4. Processamento para microscopia eletrônica de varredura

As análises em MEV foram realizadas para observar as alterações na morfologia externa das brânquias e superfície das células que as constituem, principalmente a das células-cloreto para cálculo de sua área fracional. As amostras fixadas em GTA tamponado foram lavadas em tampão fosfato 0,1M, pH 7,3, em seguida receberam um tratamento com glicerol 16% e etanol 20% (24h cada) para a remoção de muco. As amostras foram desidratadas em uma série crescente de trocas em álcool, de 50% a 100%, por aproximadamente 10 minutos cada troca, sendo a última repetida 2 vezes. Em seguida, o material foi quimicamente desidratado em 1,1,1,3,3,3-hexadimetildisilazano (Aldrich) e seco em temperatura ambiente. Após a secagem, as amostras foram coladas com cola adesiva de prata (Degusa) em suportes de alumínio apropriados para o microscópio eletrônico de varredura. Posteriormente, as amostras foram cobertas com uma camada de ouro (Degusa 99%), em um Sputtering FCD 004 BAUSER a vácuo. O material foi, então, observado e fotografado em um microscópio eletrônico de varredura DSM 940 ZEISS e as imagens foram armazenadas em arquivo digital, formato "tif".

3.4.4.1. Área fracional e densidade das células-cloreto

A determinação da área fracional das células-cloreto (AFCC) e a sua densidade no epitélio branquial foi determinada a partir de 20 registros fotográficos de campos aleatórios e não contínuos, obtidos em MEV, de acordo com a metodologia descrita por BINDON *et al.* (1994: a & b) e MORON *et al.* (2003). Utilizando o software SigmaScan Pro 3.0 (Jandel Scientific Inc.) o perímetro das CCs (totalmente ou parcialmente visíveis) de cada imagem foi delineado e o software calculou a área ocupada por cada célula. A análise foi comparativa entre animais em diferentes etapas de desenvolvimento, de acordo com as seguintes equações:

$$\text{AFCC} = \frac{\text{área de todas as células-cloreto}}{\text{Área da fotografia}}$$

$$\text{Densidade} = \frac{\text{AFCC}}{\bar{x} \text{ Área das células-cloreto}}$$

Apesar de que este método não apresenta uma estimativa real da área de superfície apical das CCs, pois não é considerada a área de microcriptas, microdobras ou depressões, esta metodologia nos permite observar variações na fração da área das células-cloreto por unidade de área do epitélio entre animais em diferentes etapas de desenvolvimento.

3.5. Análise estatística

Os resultados quantitativos estão apresentados como média + erro padrão da média (EPM) e a análise estatísticas dos dados foi realizada pelo software GrapPad InStat 3.0. O teste de Barlett foi utilizado para determinar a homogeneidade dos dados e definir a aplicação dos testes estatísticos e quando os dados não passaram no teste, a conversão para valores em log10 foi realizada para uma homogeneização dos dados. A análise estatística dos dados obtidos foi efetuada utilizando-se análise de variância (ANOVA) para verificar se ocorreram diferenças significativas. O pós-teste de Tukey para múltiplas comparações, com intervalo de confiança de 95%, foi aplicado para verificar onde ocorreram as diferenças sempre que foi detectada a significância entre os valores obtidos.

A relação entre os parâmetros branquiais foi analisada de acordo com a equação “ $Y=aWb$ ”, onde Y é o parâmetro a ser analisado, W é o peso corpóreo, a é a constante referente a massa unitária e b é a constante referente ao potencial do desenvolvimento do parâmetro analisado. As equações alométricas resultantes, juntamente com os gráficos, foram estimadas e confeccionadas através do software SigmaPlot 10.0.

4. RESULTADOS

4.1. Morfologia das brânquias durante a fase de transição da respiração aquática para a respiração totalmente aérea de *A. gigas*

4.1.1. Aspectos gerais das brânquias

A. gigas tem quatro arcos branquiais de cada lado da faringe. Cada arco branquial é formado pelos ossos cerato e epibrânquial sendo que o epibrânquial é muito curto em relação ao ceratobranquial. O comprimento dos arcos diminuem a medida que se localizam mais internamente na câmara opercular. Dos arcos branquiais partem duas fileiras de expansões que se direcionam para a cavidade orofaríngea, os rastros (Figura 08). Os rastros são longos na face externa e curtos na face interna do arco branquial. Os rastros mais longos estão localizados no 1º e 2º arcos branquiais (Figura 08).

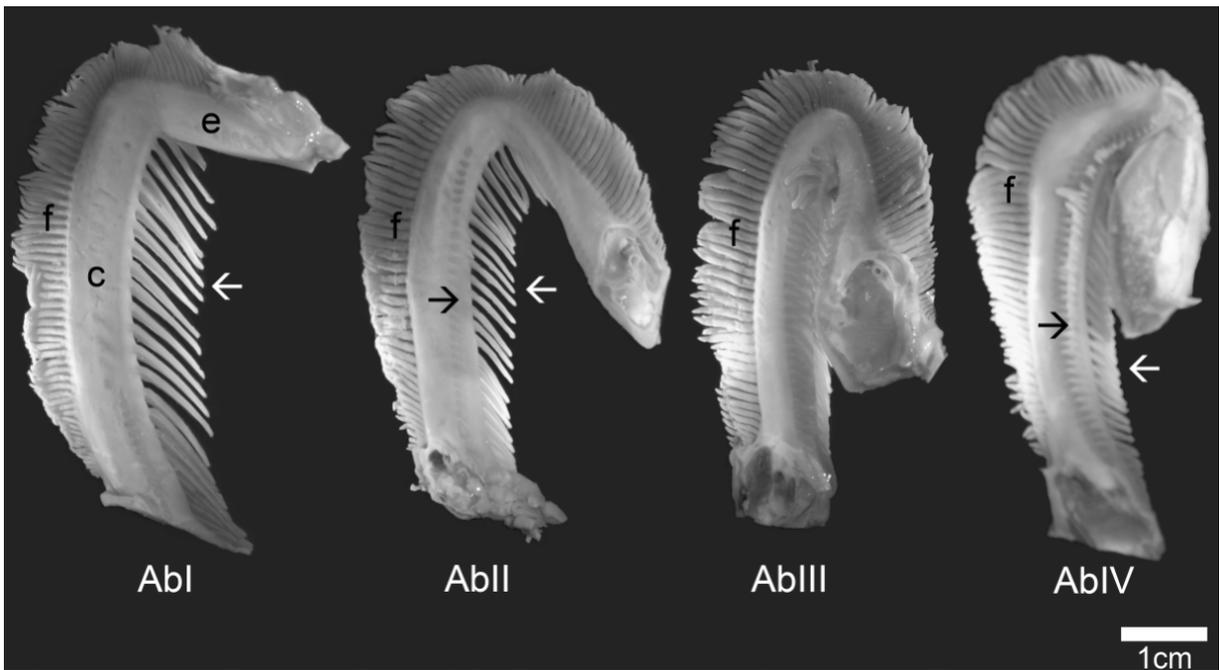


Figura 08: Face interna dos quatro arcos branquiais esquerdos de um exemplar de *A. gigas* de 5020g. Cada arco é formado pelos ossos ceratobranquial (c) e o epibrânquial (e), podem ser observados rastros longos na região externa (setas claras) e curtos na região interna (setas escuras), principalmente nos dois primeiros arcos branquiais (AbI e AbII). Os filamentos (f) estão voltados para a cavidade opercular.

Voltado para a câmara opercular, cada arco branquial possui duas fileiras filamentos ou holobrânquias, os filamentos estão unidos por um septo interbranquial

reduzido e acima e abaixo do eixo longitudinal de cada filamento são observadas lamelas bem definidas e regularmente espaçadas, apenas em animais até aproximadamente 500-600g (Figura 09: A e B). Nos animais acima desta massa corpórea há uma tendência a redução da altura das lamelas e aumento da espessura do epitélio do filamento, sendo que em aumentos pequenos (50x) apenas o filamento branquial é observado; a presença de pequenas dobras e sulcos irregulares no epitélio do filamento branquial (setas brancas) é observada apenas em aumentos acima de 100x. As dobras do epitélio do filamento correspondem a localização das lamelas e os sulcos são os espaços interlamelares que foram reduzidos devido a proliferação celular (Figura 09: C e D).

A superfície do filamento é irregular, apresentando depressões profundas do epitélio branquial e as células pavimentosas têm superfície convexa (Figura 10: A-D). Independente do tamanho do animal a morfologia das células do epitélio branquial apresenta as mesmas características. As células pavimentosas do septo branquial (Figura 11: A) apresentam limites celulares bem definidos por microdobras longas na membrana apical, enquanto que nos filamentos e lamelas as células pavimentosas têm uma superfície convexa e os limites celulares não são perfeitamente delimitados por microdobras (Figuras 10: D e 11: B-D). Em toda superfície apical das células pavimentosas as microdobras são curtas e têm uma distribuição aleatória sem formar um arranjo definido (Figuras 11: B); na região do septo branquial (Figura 11: A) as microdobras possuem as mesmas características, mas ocorre uma diminuição de sua densidade na superfície da célula.

Além das células pavimentosas, os tipos de células encontrados com maior frequência na superfície das brânquias são as células-cloreto (CC) e as células mucosas (CM) (Figura 12, 13 e 14). As CCs foram observadas na região de filamento e regiões interlamelares em animais com até aproximadamente 500-600g. As CCs são morfologicamente distintas das células pavimentosas por formar uma cripta no epitélio branquial com projeções da membrana apical conferindo a elas um aspecto esponjoso (Figura 12, A-D). Nos animais maiores (acima de 600g) que não apresentam lamelas facilmente identificáveis, as CCs foram observadas tanto nas regiões de lamela (Figura 12, C) quanto nas dobras no epitélio do filamento (Figura 12, D).

As células mucosas localizam-se abaixo das células pavimentosas (Figura 13: D e E e 14: D) e o contato com a superfície restringe-se a uma superfície, em geral, inferior à das CCs ($\cong 0,15 \mu\text{m}$ de diâmetro) e estão distribuídas entre as células pavimentosas do epitélio na região do filamento.

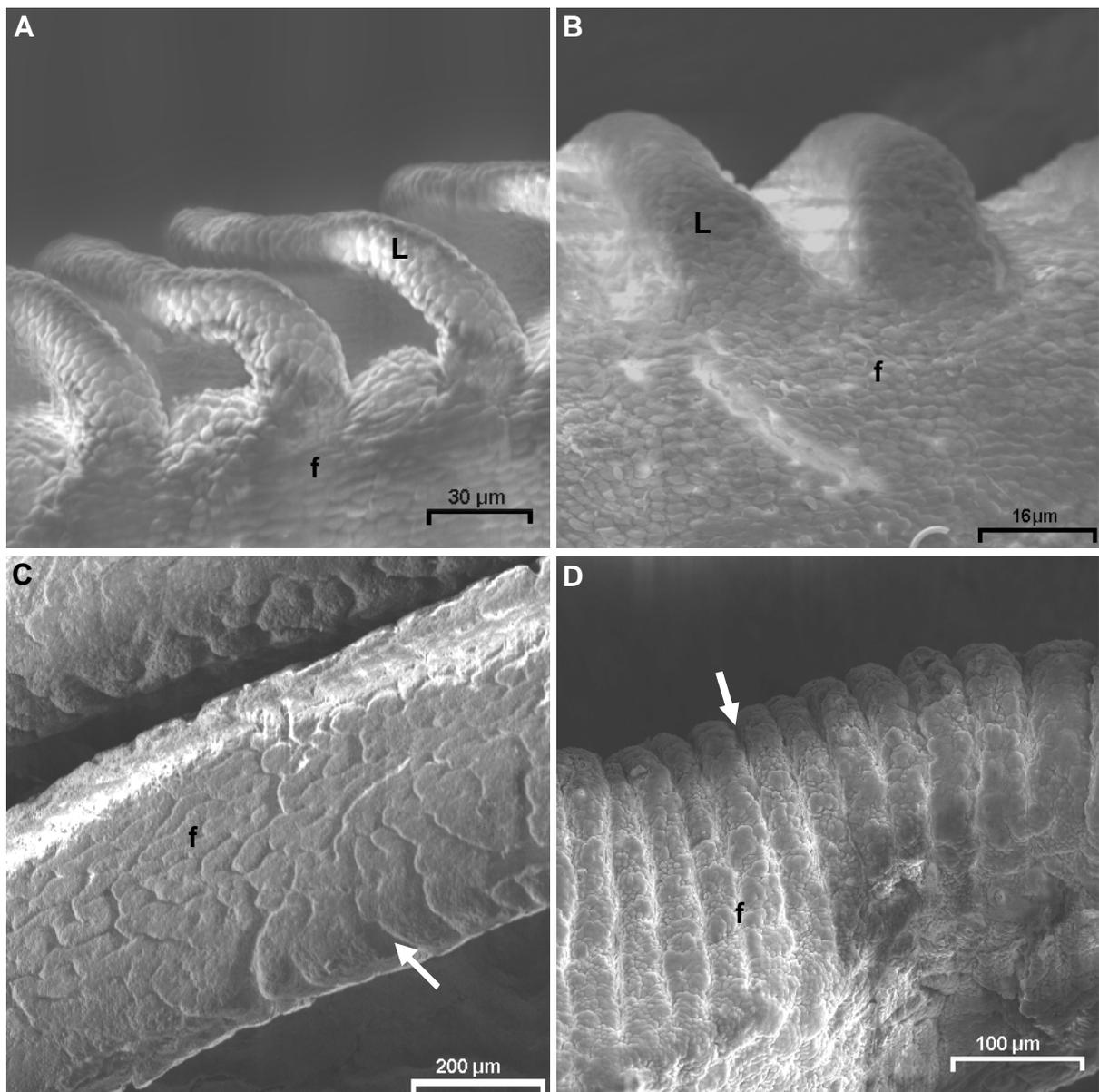


Figura 09: Aspecto geral dos filamentos branquiais (F) de *Arapaima gigas* em diferentes etapas de desenvolvimento (A-105g, B-575g, C-1343g, D-5020g). Em A e B a presença de lamelas (L) são facilmente identificadas ao longo do filamento, enquanto que em C e D estas estruturas não são tão evidentes. Nestes animais é possível observar apenas a presença de dobras no epitélio do filamento (setas).

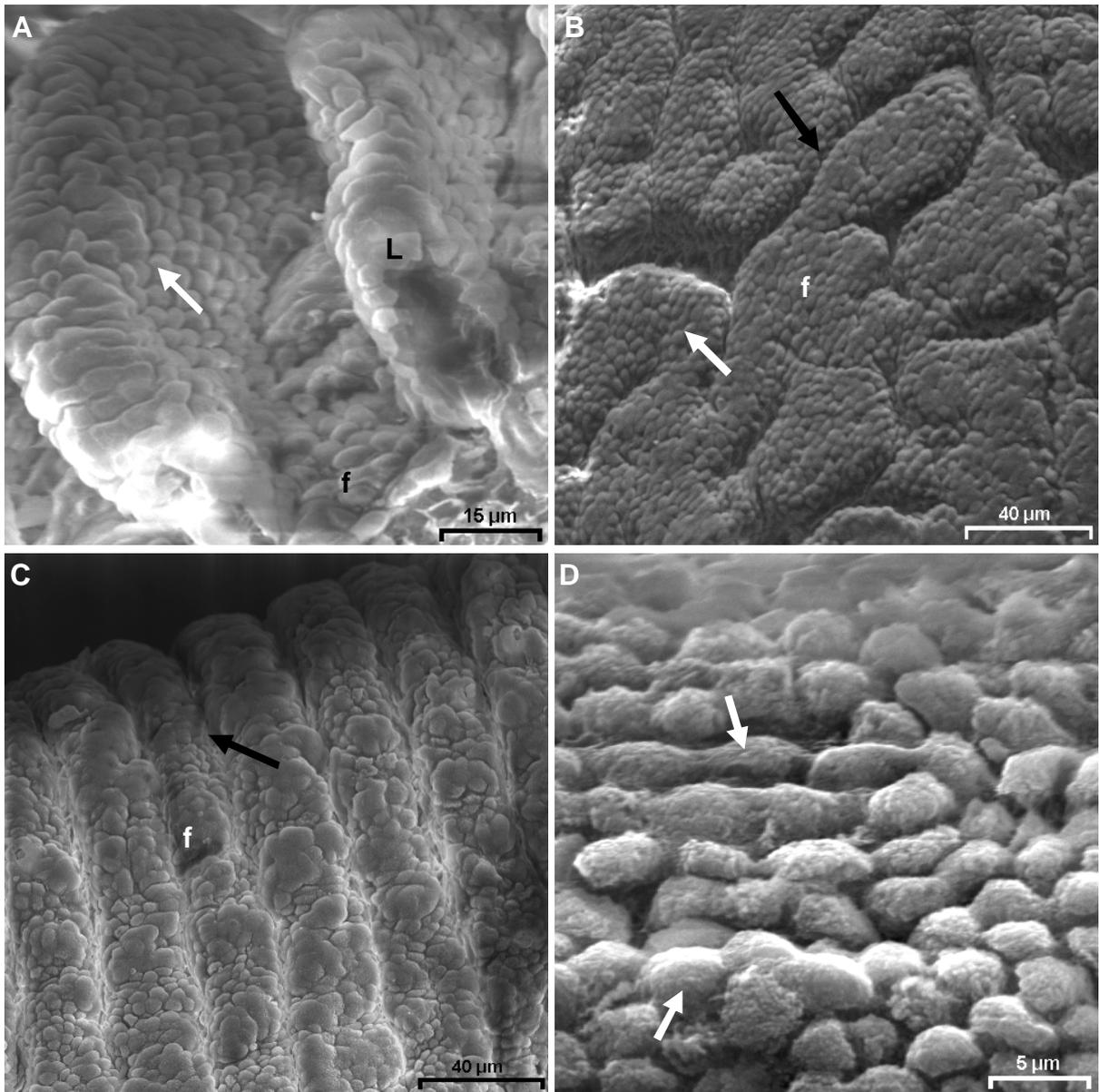


Figura 10: Detalhe do filamento branquial de animais com 105g (A), 1343g (B) e 5020g (C e D). Note células pavimentosas (setas claras) com aspecto convexo, na lamela (L) e filamento (F). As setas escuras indicam as dobras no epitélio do filamento de animais acima de 1000g. Em D observa-se que estas células não têm um limite celular definido.

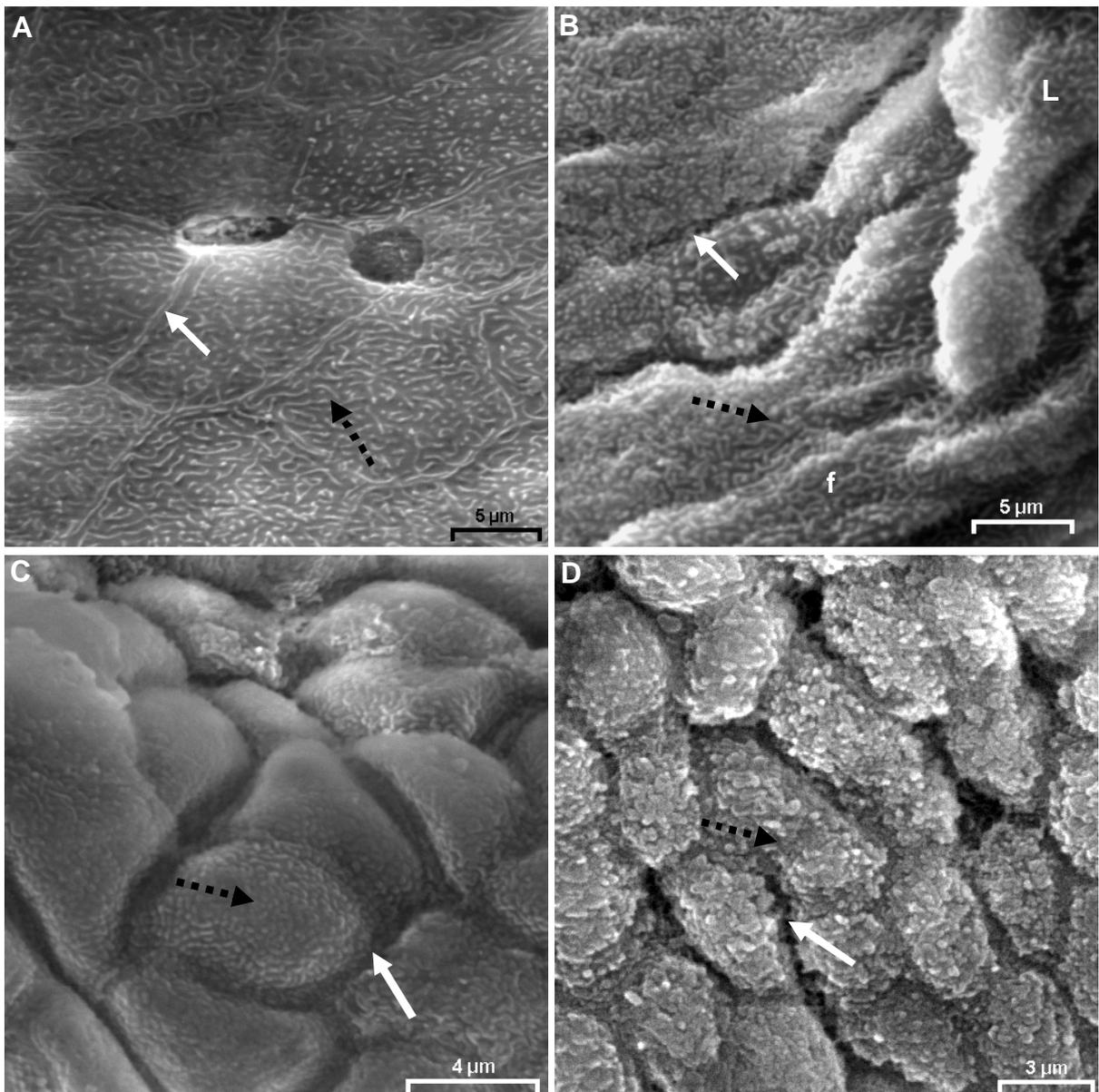


Figura 11: A: Células pavimentosas no septo branquial do animal de 2g (A) apresentam limites celulares visíveis por microdobras da membrana (setas claras), enquanto que em outras regiões da brânquia (B) estes limites celulares são definidos por depressões entre as células e em animais acima desta massa corpórea as características das células pavimentosas são as mesmas. Observe em (A) microdobras curtas com distribuição aleatória na superfície apical e baixa densidade (setas pontilhadas) no septo do animal de 2g, enquanto que em outras regiões do filamento (B) são curtas e estão em alta densidade. No animal de 105g (C) e 1343g (D) as células pavimentosas têm sua superfície convexa e as microdobras exibem o mesmo padrão do animal de 2g.

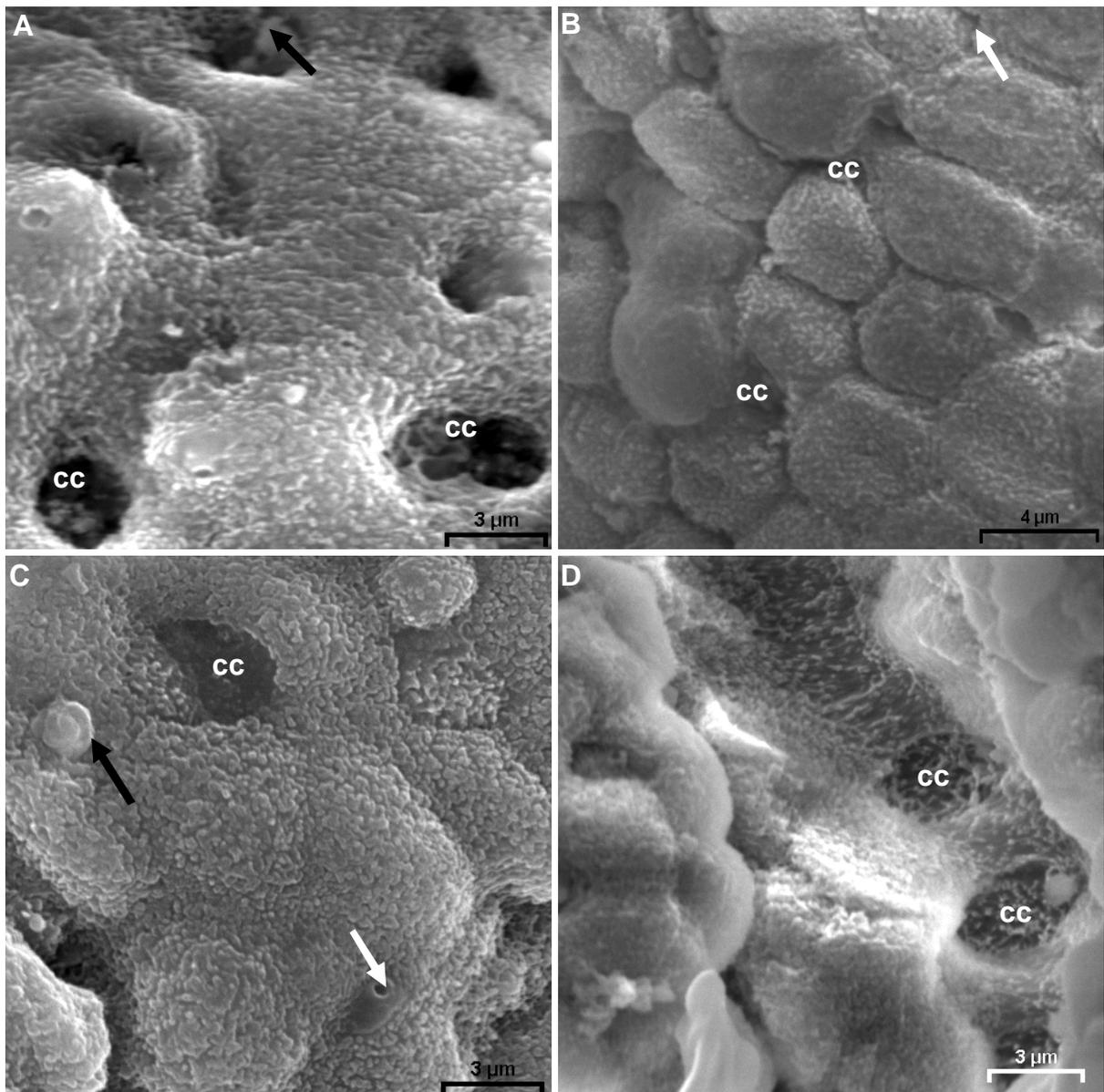


Figura 12: Células-cloreto (cc) no epitélio do filamento em animais com diferentes massas corpóreas, incluindo as dobras no epitélio do filamento de animais acima de 1000g (A: 46g, B: 575g, C e D: 5020g). As células mucosas (setas claras) têm menor área de contato com o meio aquático e estão distribuídas entre células pavimentosas. Em algumas regiões observada a presença de muco (setas escuras).

4.1.2. Aspectos gerais da morfologia interna das brânquias

O epitélio do filamento é estratificado e constituído por várias camadas de células que aumentam a medida que o animal cresce concomitantemente com o aumento do tecido e de pequenos vasos sanguíneos que constituem o próprio filamento. As células epiteliais que constituem a camada mais externa do filamento branquial são electrodensas e, embora identificadas como do tipo pavimentoso, são espessas e possuem forma irregular. Estas células têm zona de adesão extensa sendo que as células localizadas nas camadas mais internas apresentam expansões citoplasmáticas que contactam células adjacentes ocorrendo a formação de grandes espaços intercelulares (Figuras 15 e 16). Células-cloreto, mucosas e “rodlet” são encontradas distribuídas entre as células epiteliais. Em geral, estas células apresentam região apical em contato com o meio externo reduzida, sendo que a maior parte da célula localiza-se entre as células das camadas mais internas do epitélio do filamento (Figuras 13,14 e 15).

As CCs são coradas fracamente pelo azul de toluidina, seu núcleo é basal e o nucléolo evidente (Figuras 13 e 14) e ultraestruturalmente apresentam diferentes níveis de electrodensidade. Nos animais com menor massa corpórea estas células são mais escassas e presentes principalmente nas regiões interlamelares sendo que em animais com aproximadamente e acima de 600g, há uma intensa proliferação de CCs tanto nas regiões interlamelares quanto nas lamelas, confirmando as observações prévias em MEV (Figuras 11 e 12). De acordo com a orientação no plano de corte, estas células podem apresentar diferentes formatos (Figura 16: C e D). A característica mais evidente da morfologia destas células é um formato elíptico com uma grande quantidade de mitocôndrias e um sistema tubular electrodenso. Nos locais onde esta célula tem contato com o meio externo observa-se dois tipos de configuração da membrana apical: em forma de criptas ou projeções da membrana para o meio externo (Figura 17: A-C) e processos de necrose pode ser observado em algumas células-cloreto (Figura 17: D).

As células mucosas, na microscopia de luz mostram coloração pela fucsina (Figuras 13 e 14) e são menos frequentes do que as CC. Nos animais com massa corpórea acima de aproximadamente 600g, estas células podem ser observadas nas

lamelas (Figura 14: D). Essas células têm um núcleo basal e seus grânulos de secreção apresentam diferente electrondensidade e aspecto fibroso (Figura 18: A-D). Estas células são encontradas nas primeiras camadas epiteliais e não foi observada uma relação entre o contraste dos grânulos de secreção com a posição que a célula mucosa ocupa no tecido branquial.

Células “rodlet” foram outro tipo celular freqüentemente encontrando nas brânquias de *A. gigas*. Estas células podem ser encontradas nas camadas mais externas do filamento (Figura 19: A, B e D) ou em camadas mais profundas desse epitélio (Figura 19: C). As células “rodlet” apresentam contorno ovalado, sendo que a porção apical é mais afilada. A sua membrana plasmática possui uma cápsula fibrosa e espessa que é característica dessa célula. O núcleo ocupa a porção basal da célula. As estruturas “rodlet”, que dão nome a célula, são alongadas e electrondensas e apresentam um eixo central, em forma de estilete, sempre voltado ao ápice celular. A presença de células “rodlet” em contato com o meio externo, rompendo a cápsula fibrosa e liberando seu conteúdo para o meio externo juntamente com toda a célula pode ser observada no epitélio do filamento (Figura 19: D).

Quanto à morfologia geral das lamelas, em animais com até aproximadamente 600g as lamelas são semelhantes à de peixes com respiração aquática; são constituídas por duas camadas de células pavimentosas e entre elas e o sistema de células pilares há um espaço intersticial (Figura 14: A-C), com o aumento da massa corpórea há um aumento da espessura do epitélio da lamela que passa a ser constituída por várias camadas de células e principalmente por células-cloreto na camada mais externa (Figura 13) e há um aumento do espaço intersticial próximo ao sistema de células pilares e flanges (Figura 14: D). Em animais com massa corpórea até aproximadamente 200-600g o sistema de células pilares é bem desenvolvido (Figuras 13; 14: D e 15: A e B), sendo que acima dessa massa corpórea ocorre atrofia do sistema de células pilares que é caracterizado por uma redução dos espaços sanguíneos formados pelas flanges dessas células e redução da área de secção transversal do canal marginal (Figuras 14 e 15: C e D) mas ainda é possível a circulação eritrocitária (Figura 14: D). Em animais acima de 1000g estas estruturas estão parcialmente ou completamente envolvidas pelas células do epitélio

do filamento que aumenta a sua espessura a medida que o animal cresce (Figura 14: A-C). Nesses animais os espaços sanguíneos apresentam projeções filamentosas das flanges das células pilares (Figura 15: D).

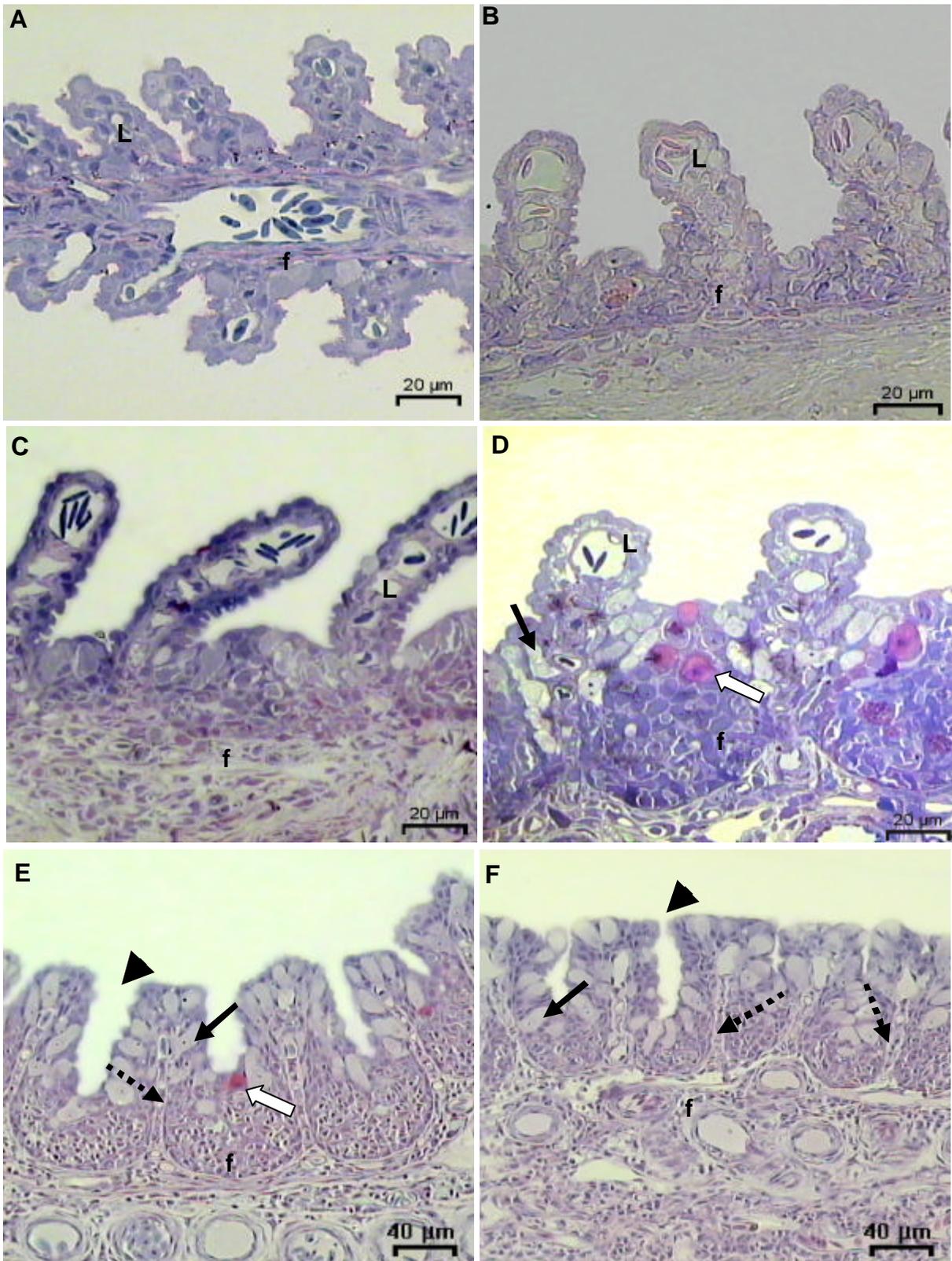


Figura 13: Amostras coradas com azul de toluidina, mostrando a modificação na estrutura das brânquias ao longo do desenvolvimento de *A. gigas* (A: 2g, B: 46g, C: 105g, D: 575g, E:1343g, F:4995g). Note lamelas (L) bem evidentes no filamento das brânquias de animais com até aproximadamente 600g (D). Em animais acima de 1000g (E e F) as lamelas sofrem modificações, e o espaço interlamelar torna-se reduzido (pontas de seta). O sistema de células pilares (setas pontilhadas) fica distante do meio externo. São observadas também células-cloreto (setas escuras) e células mucosas (setas brancas).

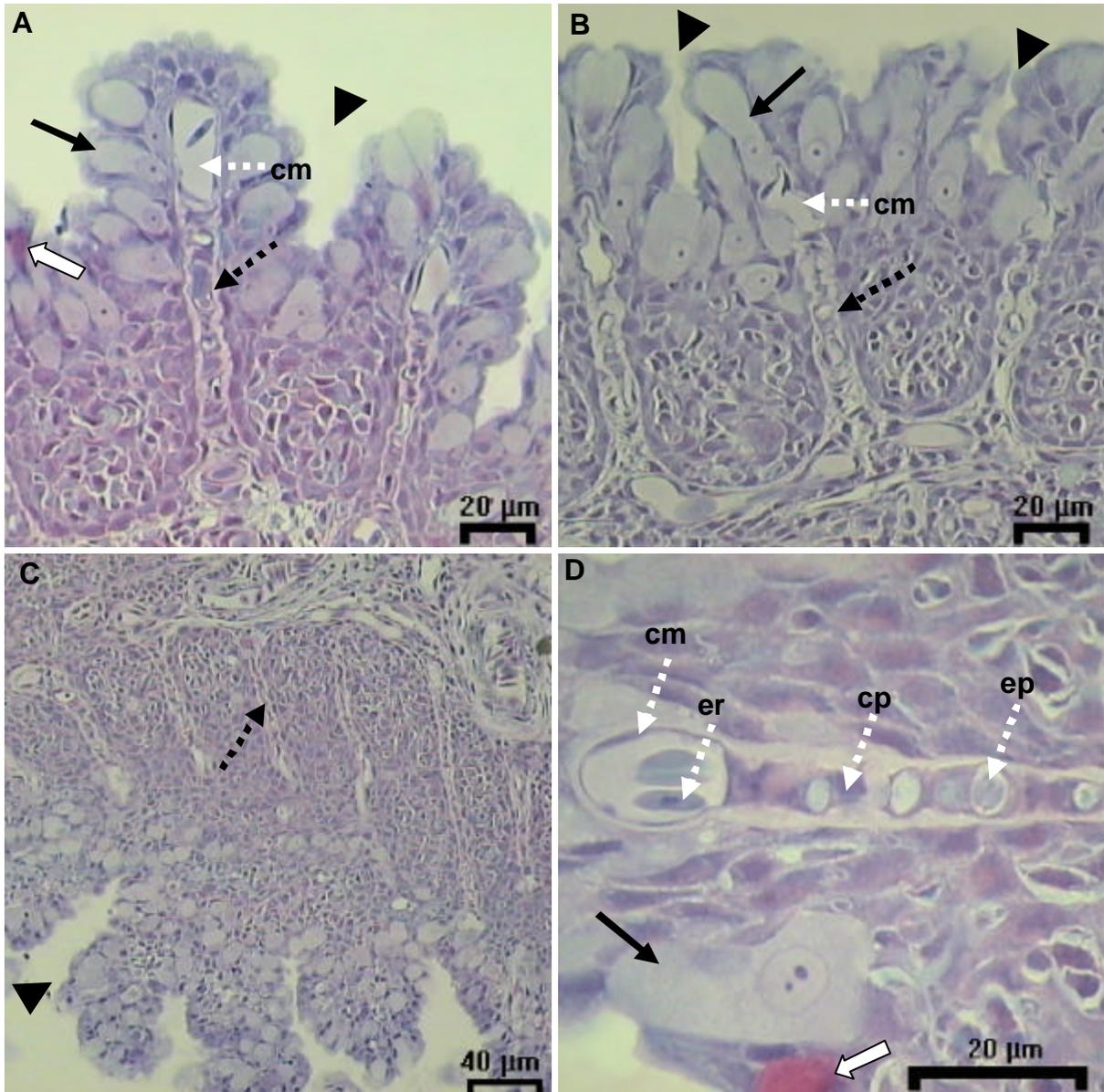


Figura 14: Detalhe do filamento branquial (F) de animais acima de 1000g. Note o sistema de células pilares (setas pontilhadas) atrofiado e envolvido no tecido do filamento (A e B). Todos seus elementos podem ser observados, o canal marginal (cm), células pilares (cp), os espaços delimitados pelas flanges das células pilares (ep) e eritrócitos (er) nestes espaços. As setas claras indicam células mucosas e as setas escuras indicam as células-cloreto.

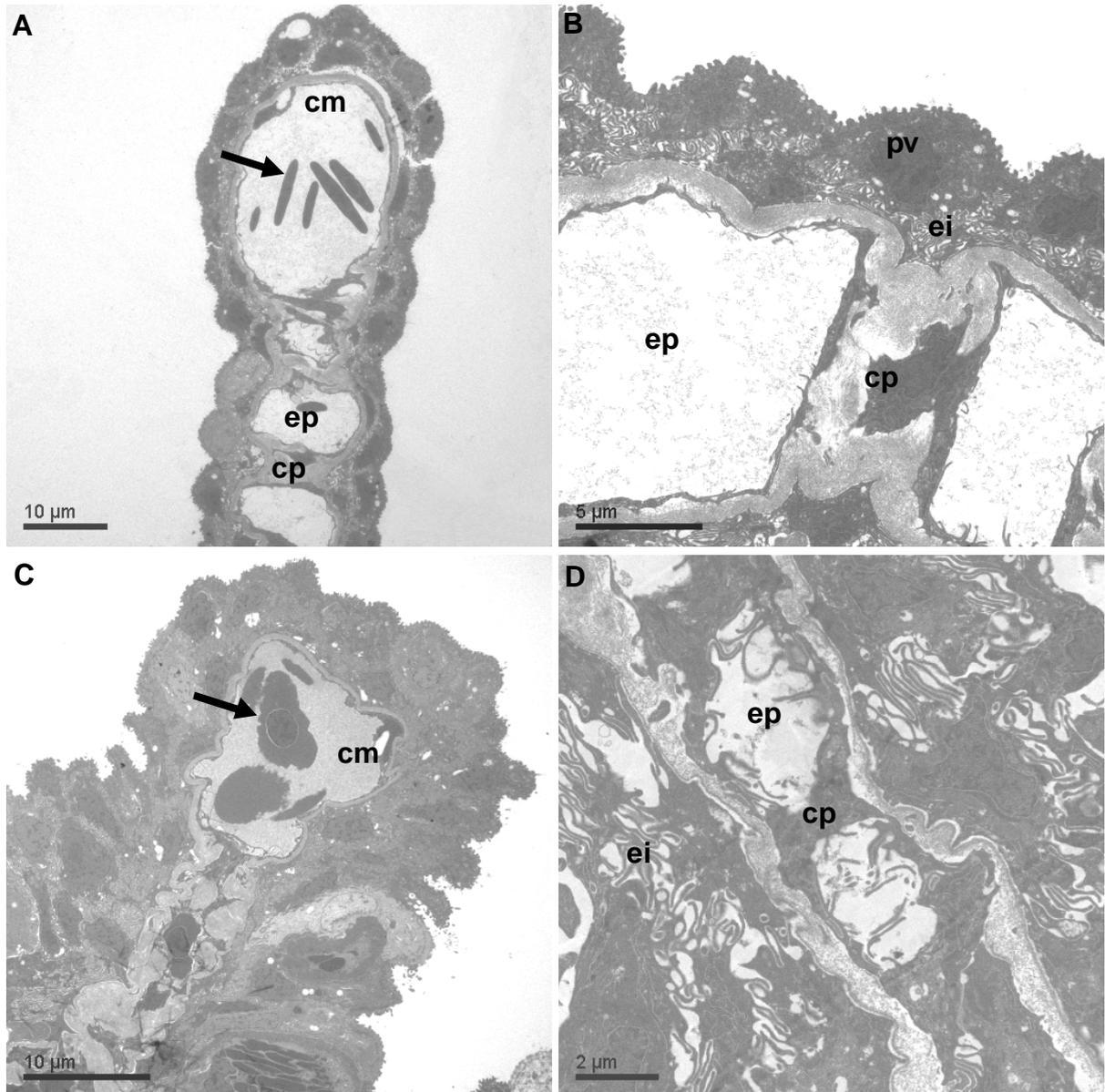


Figura 15: Lamelas e estruturas lamelares em *A. gigas*. A e B: Animal com 105g. Note a presença de lamelas bem definidas. C: Animal com 575g. Note o aumento da espessura do epitélio lamelar e redução do sistema de células pilares. D: Animal com 1343g. Note projeções citoplasmáticas entre as células que constituem a lamela e o espaço intercelular. Eritrócitos (setas escuras). (cp) células pilares, (pv) células pavimentosas, (ei) espaço intersticial, (ep) espaços delimitados pelas flanges das células pilares.

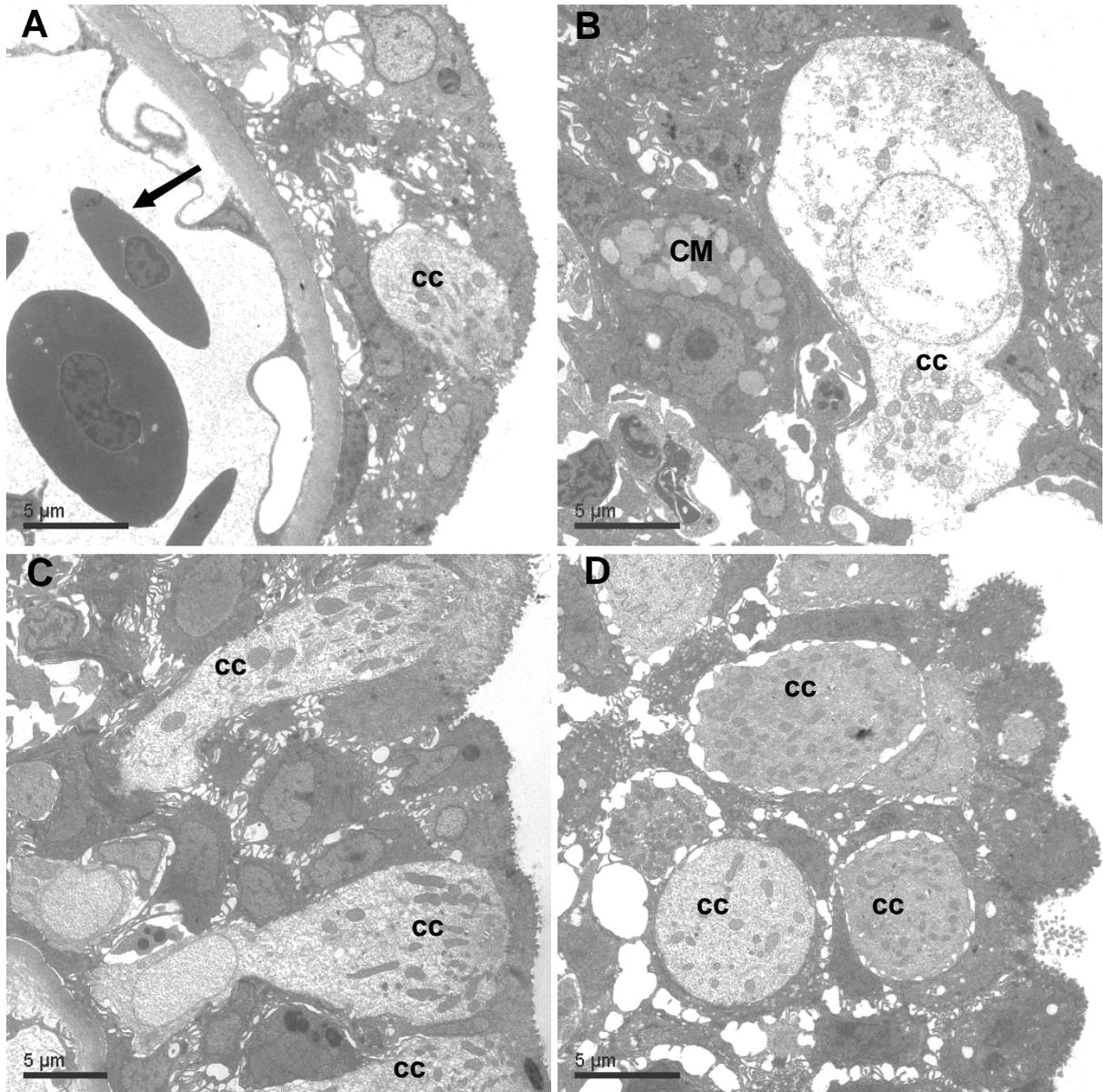


Figura 16: Localização dos principais tipos celulares no epitélio branquial de *A. gigas*. (A) Células-cloreto no epitélio da lamela, próximas ao canal marginal (a seta escura indica a presença de eritrócitos); (B) célula mucosa (CM) ao lado de célula-cloreto (cc) em processo de necrose; (C) células-cloreto (cc) próximas ao meio externo e em (D) células-cloreto com conteúdo citoplasmático mais electrodensso que em (C).

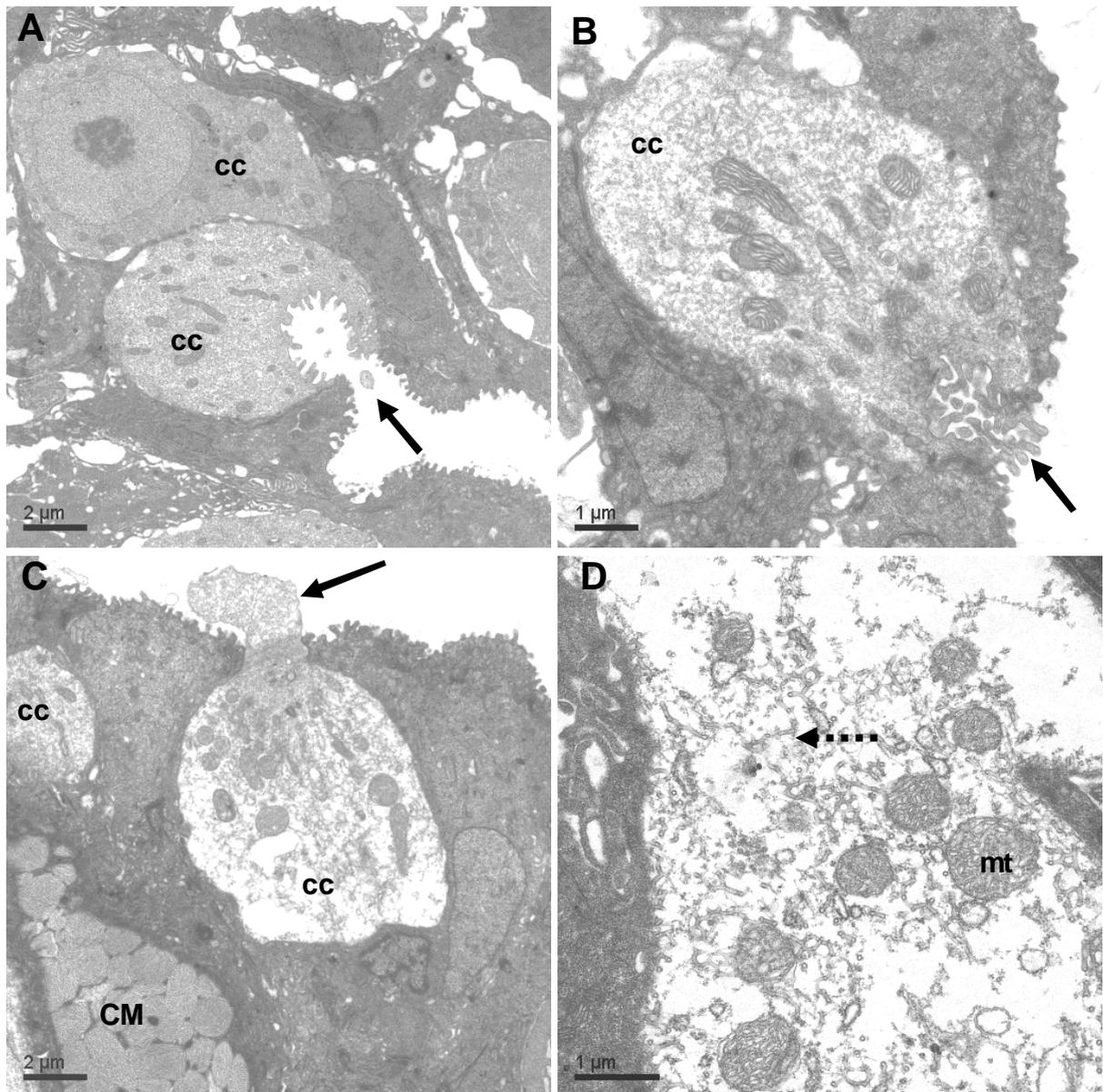


Figura 17: Células-cloreto (cc) no epitélio branquial de *A. gigas*. As setas mostram diferentes tipos de contato com o meio externo destas células: criptas em (A), projeções citoplasmáticas em (B e C). Em (A), célula-cloreto no espaço interlamelar e em (D) célula-cloreto em necrose. Observe mitocôndrias (mt) e um sistema tubular citoplasmático (seta pontilhada) desorganizado.

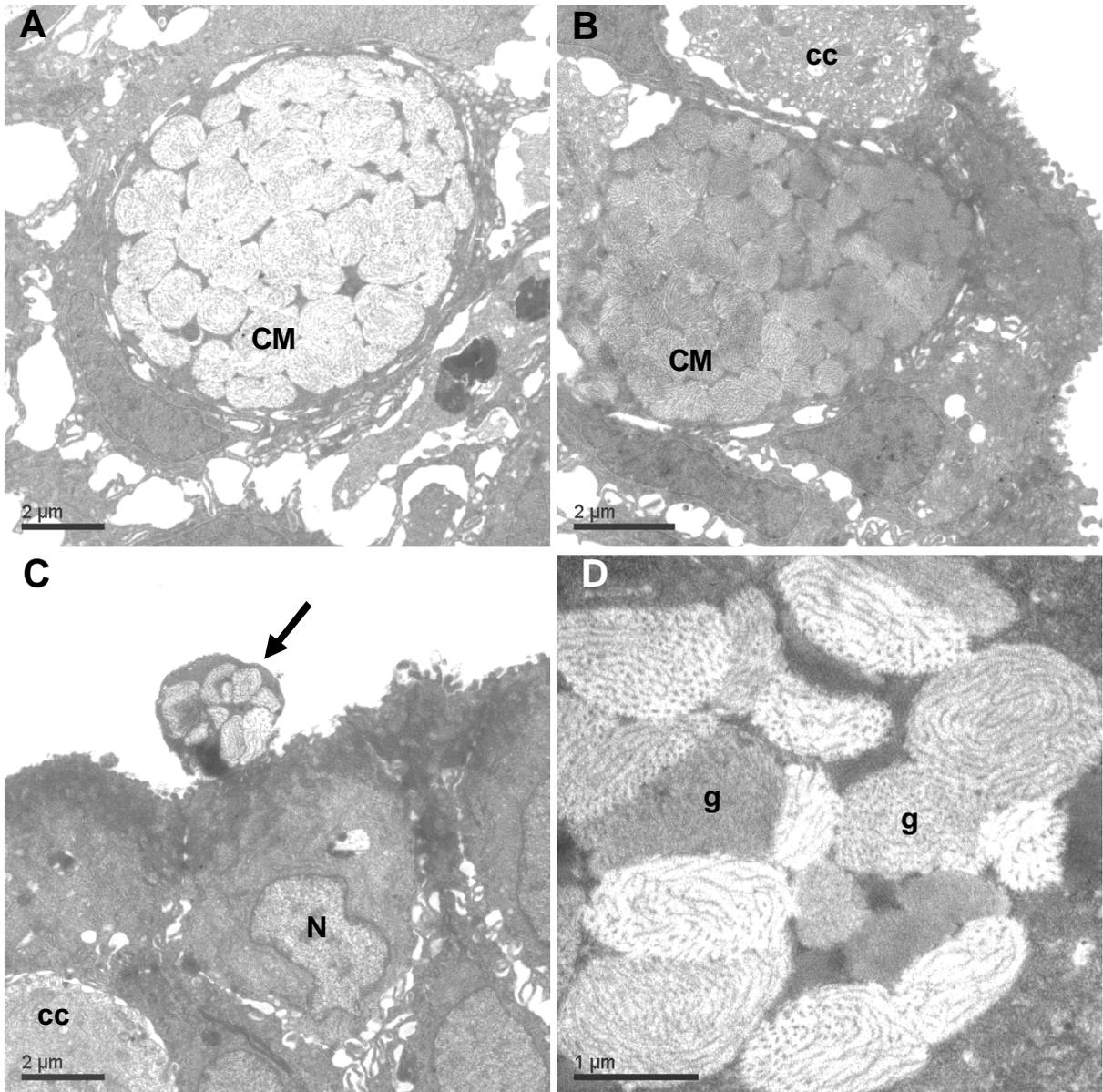


Figura 18: Células mucosas (CM) no epitélio branquial de *A. gigas*. Células mucosas electronopacas são observadas em "A" e electrondensas em "B". Observe uma célula mucosa com núcleo basal (N) liberando muco para o meio externo em "C" e detalhes dos grânulos de secreção (g) presentes neste tipo celular em "D".

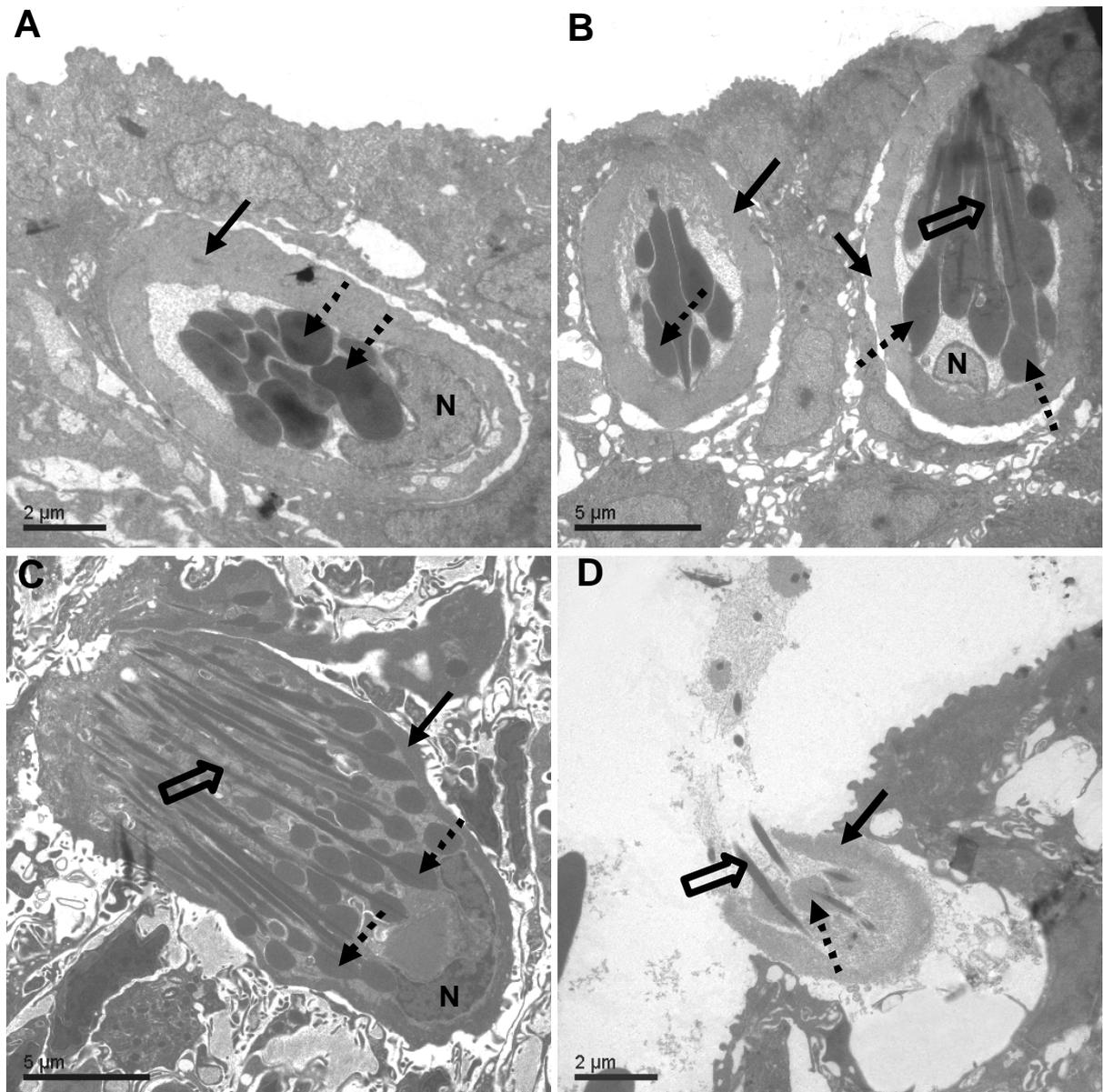


Figura 19: Células "Rodlet" em diferentes estágios de maturação; A e C: célula imatura. B: Célula madura em contato como meio externo. D: Célula liberando o conteúdo celular e desligamento do epitélio. Note cápsula fibrosa (setas escuras), núcleo basal (N), halo de "rodlet" (setas pontilhadas) e estilete voltado para o ápice da célula (setas transparentes) em todas as células.

4.2. Morfometria dos elementos branquiais de relevância para as trocas gasosas

As análises morfométricas do epitélio branquial mostraram um aumento significativo na altura total e na altura potencialmente funcional da lamela (região da lamela em contato com o meio externo) em animais até 200-300g. Acima dessa massa corpórea, a altura total da estrutura total lamelar foi significativamente maior em animais com 1000g em relação aos com 500-600g, mas não em relação aos de 5000g e a altura potencialmente respiratória da lamela permaneceu aproximadamente constante. A Figura 20 descreve a relação entre a altura total e potencialmente funcional das lamelas de *A. gigas* durante o crescimento do animal evidenciando um aumento muito reduzido na superfície funcional das lamelas à medida que o animal cresce.

A espessura do epitélio do filamento (EpF) aumenta com o crescimento do animal ($b = 0,40$) enquanto que aumento da espessura do epitélio da lamela é relativamente pequeno em animais com massa corpórea entre 200-300g, torna-se mais acentuado em animais acima dessa massa resultando em um $b = 0,46$ (Figura 21). Os maiores aumentos da espessura do epitélio da lamela e, conseqüentemente, da largura total da lamela (Figura 22) foram observados nos animais acima de 1000g. O aumento do epitélio da lamela causa um aumento na largura da lamela que, entretanto apresenta um crescimento menor do que o do epitélio lamelar devido a atrofia do sistema de células pilares. Esse padrão de alteração no epitélio lamelar e largura total da lamela em relação ao tamanho do animal resulta em um aumento da distância interlamelar (DsL) em animais até 100-300g e acima desse tamanho há uma progressiva redução na distância interlamelar (Figura 23). Esse aumento e redução resulta em duas curvas: para animais com Mc menor que 200-300g ($DSL_{(mc<200-300)} = 6,11Mc^{0,32} - n= 3, r^2= 0,90, P<0,001$) e para animais com Mc acima de 300g ($DSL_{(mc>300)} = 166,51Mc^{-0,39} - n= 5, r^2= 0,89, P<0,001$)

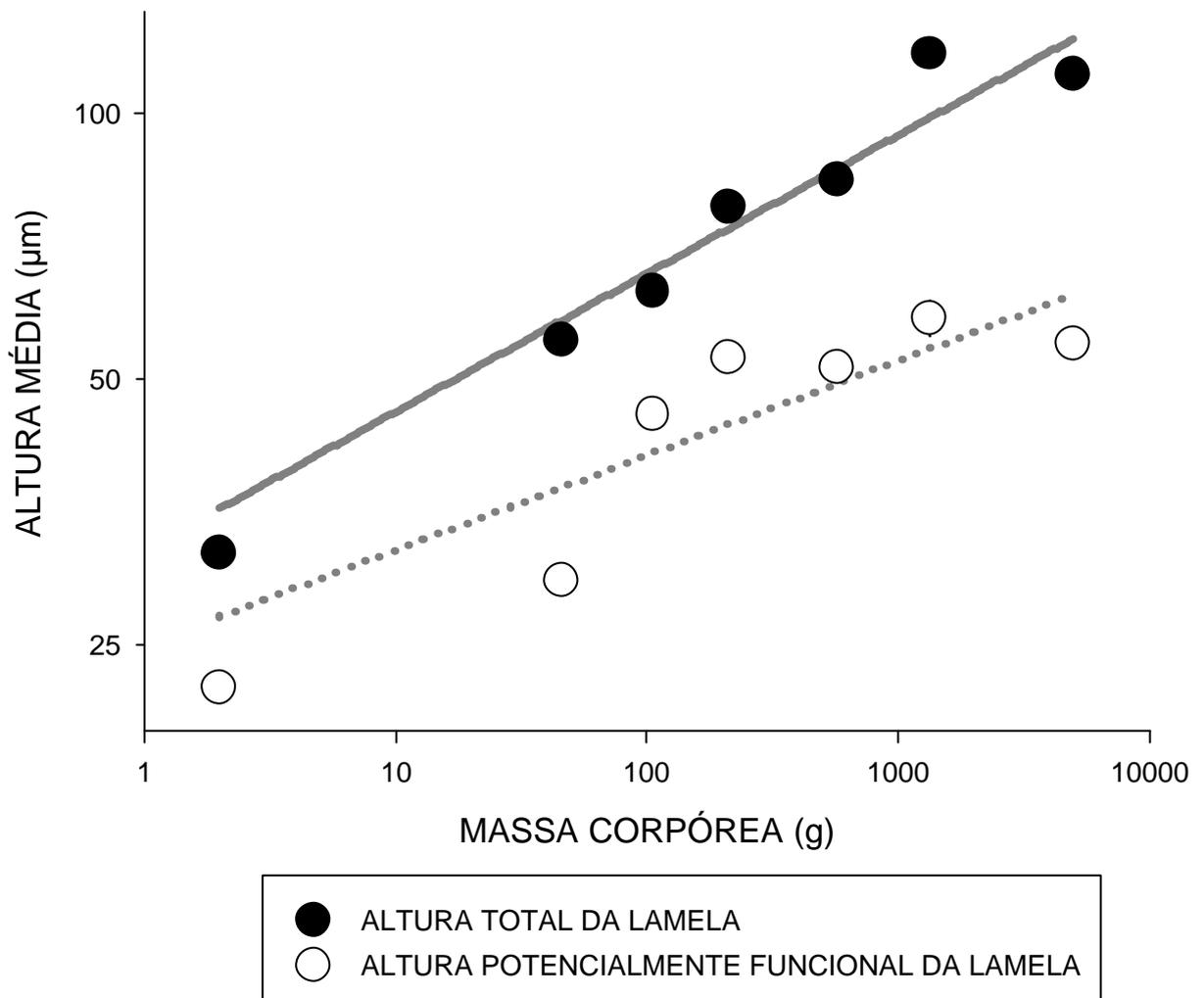


Figura 20: Altura total (ATL) e potencialmente funcional (APFL) em relação a massa corpórea (Mc) de *A. gigas*. As curvas são: $ATL = 32,02Mc^{0,16}$ ($n= 7$, $r^2= 0,91$, $P< 0,001$) e $APFL = 25,04Mc^{0,11}$ ($n= 7$, $r^2= 0,77$, $P< 0,01$).

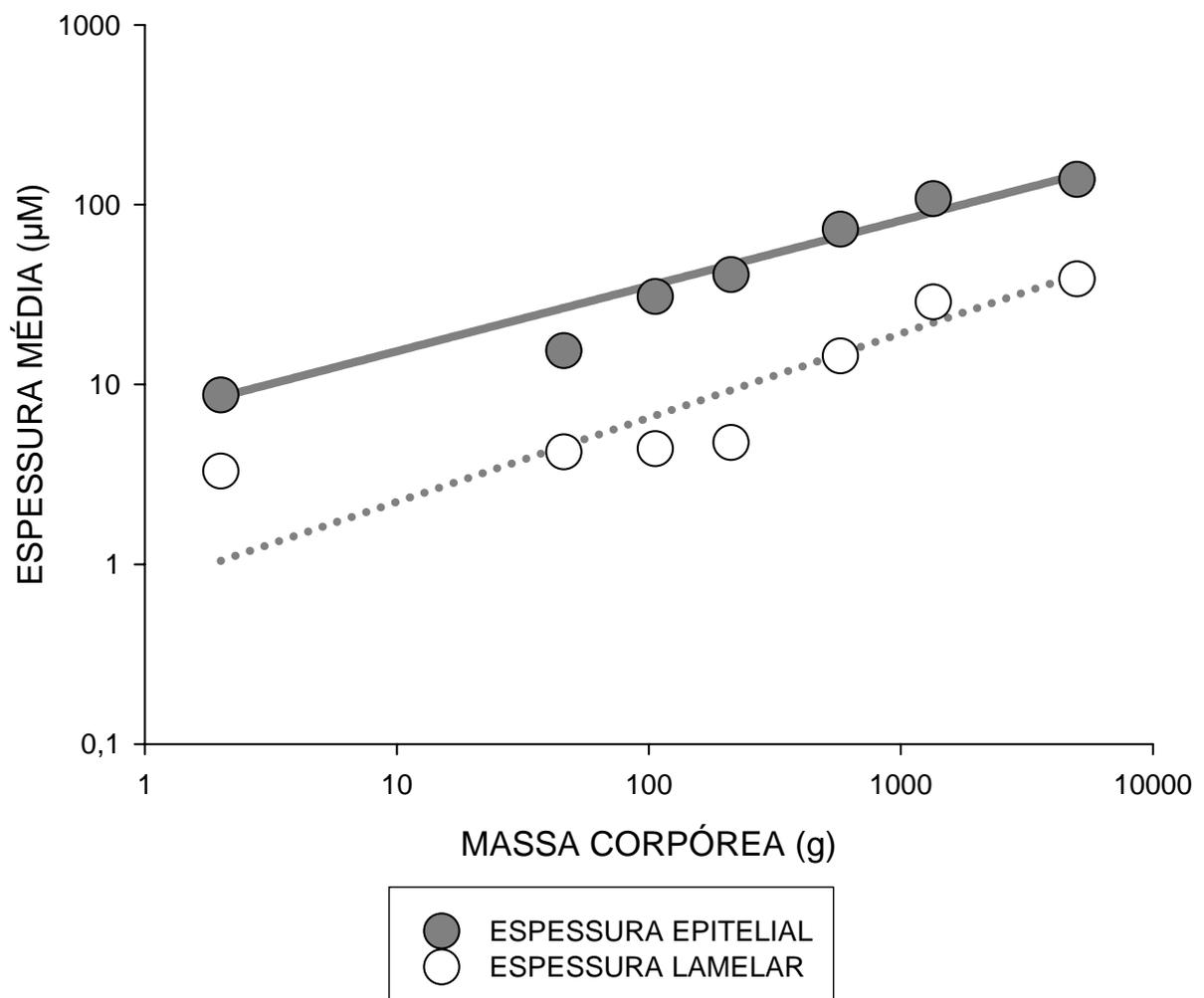


Figura 21: Espessura do epitélio do filamento (EPF) e da lamela (EPL) em relação a massa corpórea (Mc) de *A. gigas*. As curvas são: $EPF = 6,63Mc^{0,36}$ ($n= 7$, $r^2= 0,96$, $P< 0,001$) e $EPL = 0,76Mc^{0,47}$ ($n= 7$, $r^2= 0,93$, $P< 0,001$).

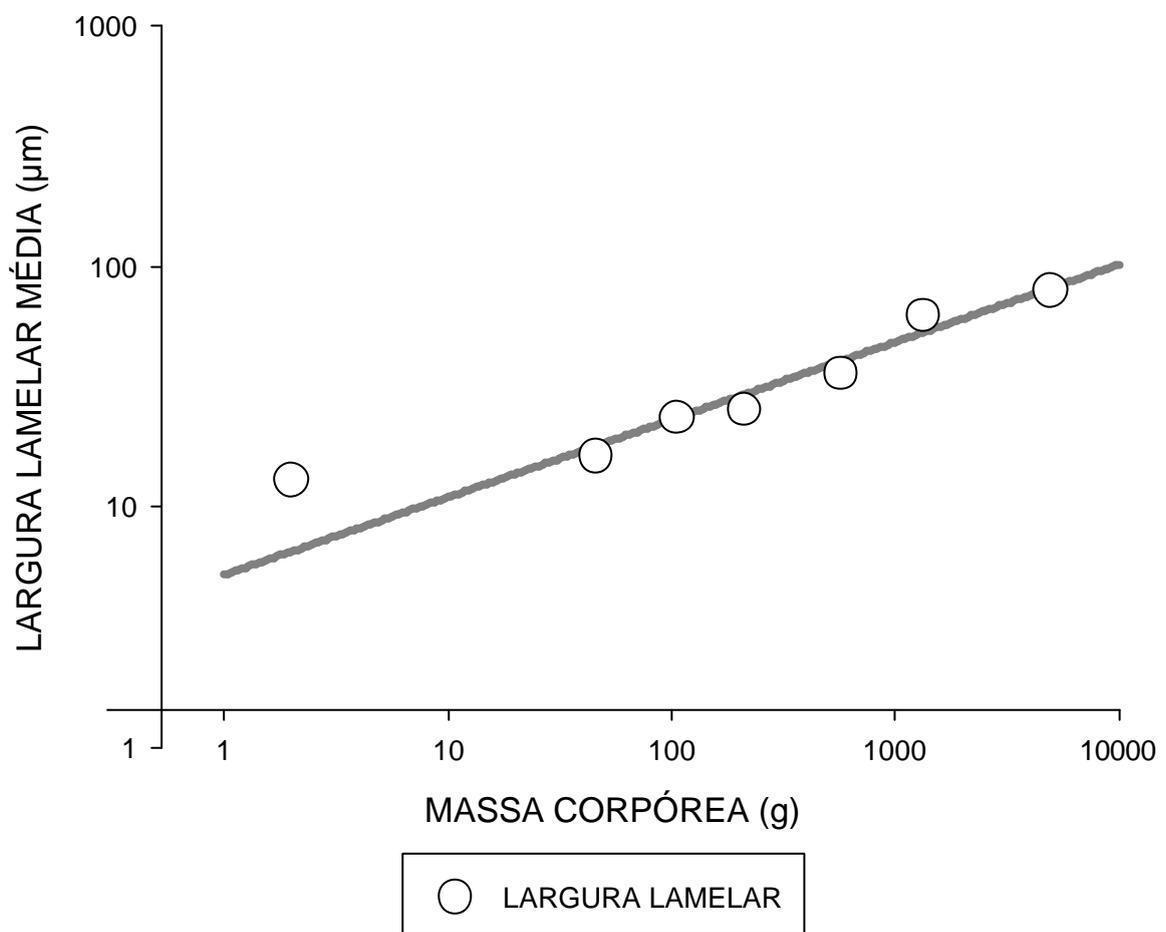


Figura 22: Largura total da lamela (LTL) em relação a massa corpórea (Mc) de *A. gigas*. A curva é: $LTL = 5,22Mc^{0,32}$ ($n = 7$, $r^2 = 0,94$, $P < 0,001$).

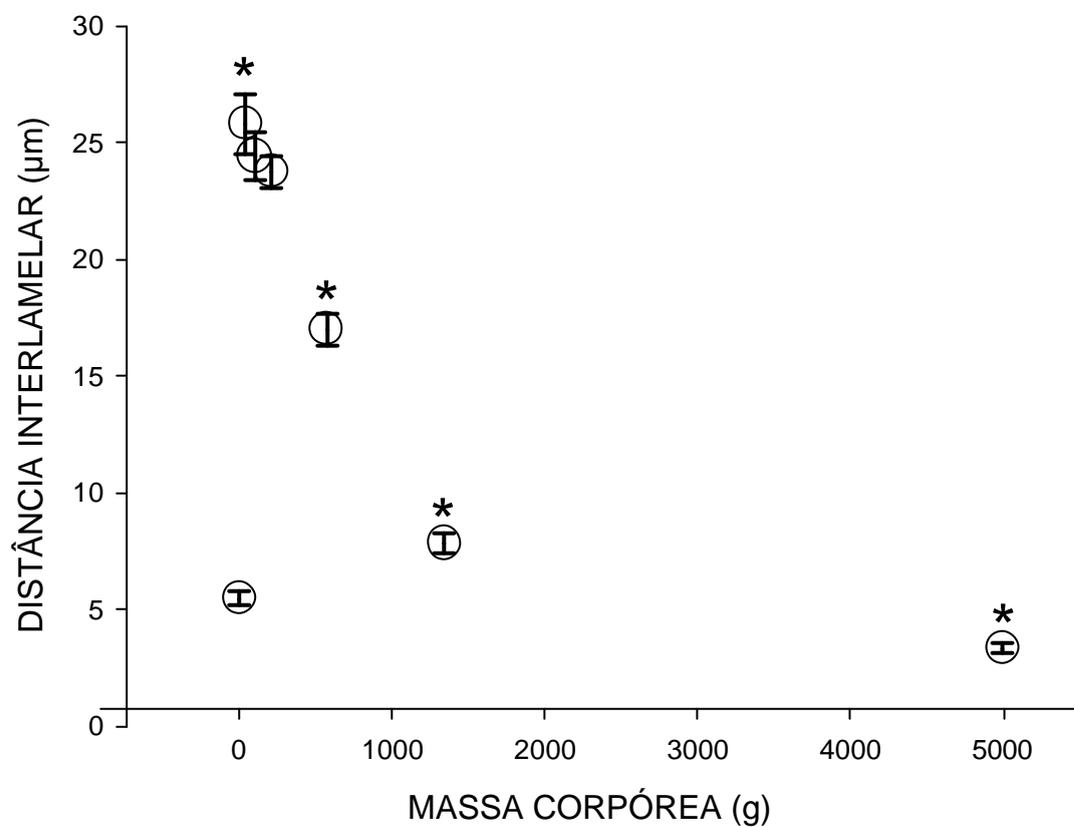


Figura 23: Distância interlamelar em *A. gigas*. Há um aumento até animais com aproximadamente 100g, ocorrendo uma redução na distância interlamelar até aproximadamente 5000g. * indica diferença significativa ($p < 0,05$) em relação ao ponto anterior.

4.3. Atividade celular nas brânquias de *Arapaima gigas*

4.3.1. Parâmetros pertinentes ao desenvolvimento dos filamentos (Proliferação e morte celular)

As células que apresentaram marcação específica para o antígeno de proliferação celular (PCNA-positiva) foram observadas no filamento branquial, sendo ausentes nas lamelas (Figura 24). Quantitativamente, o número de células PCNA-positiva (Figura 26) revelou que ocorre um ligeiro aumento destas até animais com aproximadamente 500-600g, que pode ser descrita pela equação: $C_{pcna(mC<500-600)} = 26,11Mc^{0,39}$ ($n= 3$, $r^2= 0,83$, $P<0,001$). Posteriormente, a partir dessa massa corpórea há uma diminuição da intensidade da proliferação celular, sendo descrita pela curva: $C_{pcna(mC>500-600)} = 2021,10Mc^{-0,29}$ ($n= 3$, $r^2= 1$, $P<0,001$).

As células em apoptose-positivas (TÚNEL-positivas), não apresentam diferenças significativas, independentemente do estágio de desenvolvimento de *A. gigas*, (Figuras 25 e 26) e apresenta valores médios de $15 \pm$ células por mm^2 . Estas células foram encontradas no epitélio do filamento sendo ausentes nas lamelas (Figura 25).

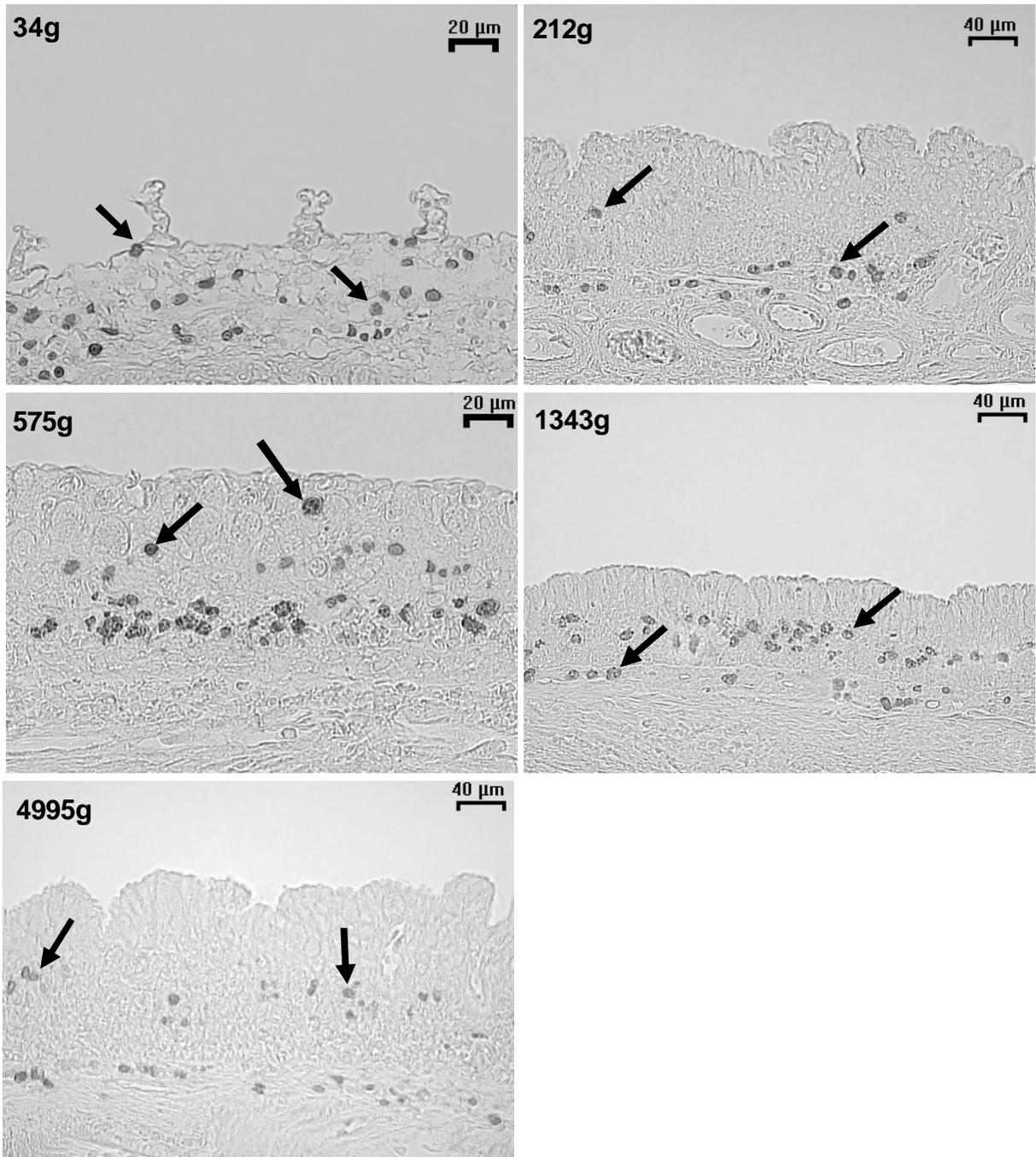


Figura 24: Imunohistoquímica para células em proliferação celular (setas escuras). O maior aumento do número de células PCNA + ocorre no animal de 575g, diminuindo novamente nos animais acima dessa Mc.

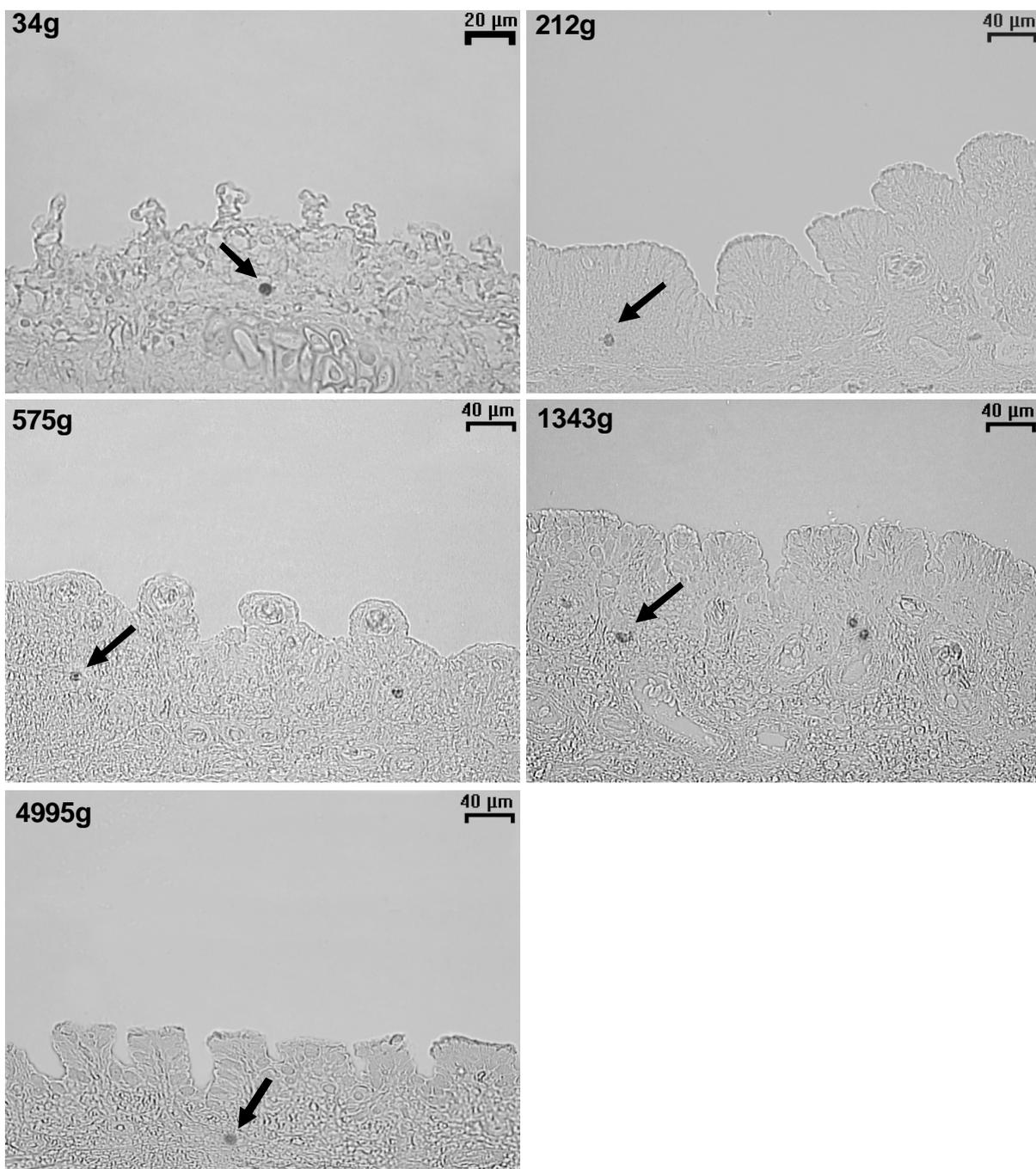


Figura 25: Imunohistoquímica para células em apoptose (setas escuras). Em todos os animais observados o número de células marcadas foi semelhante.

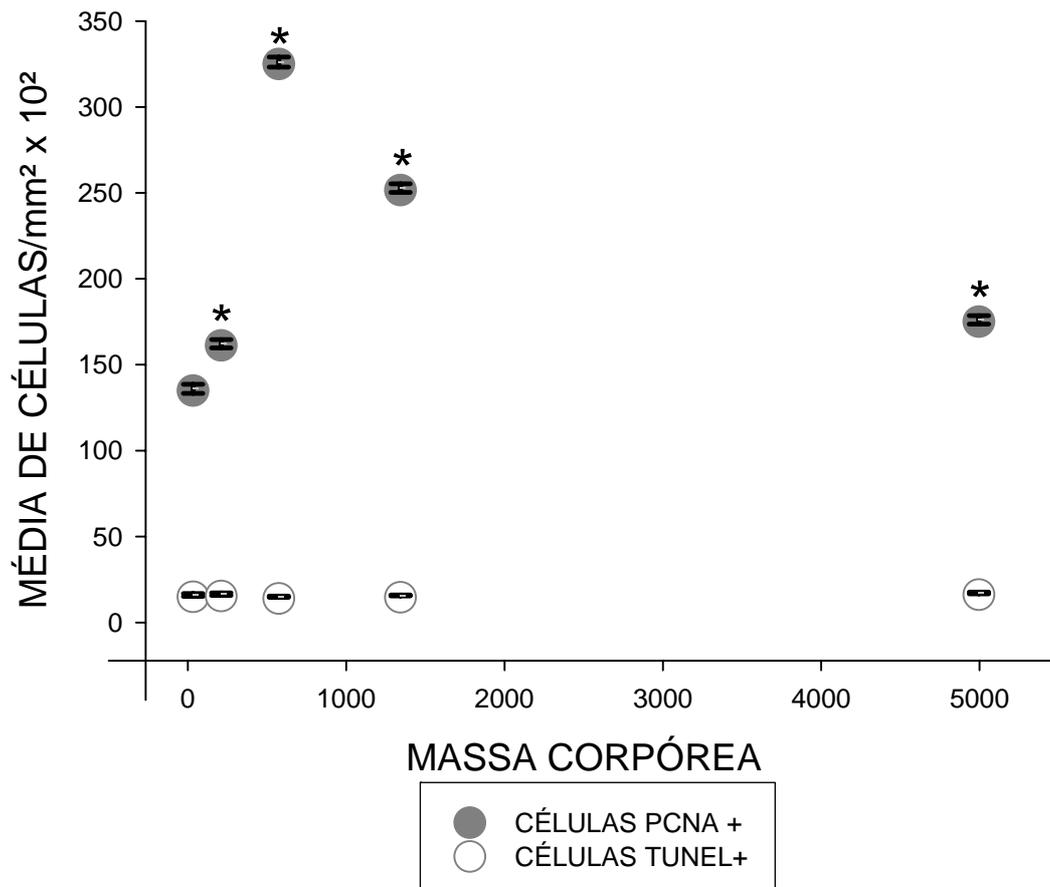


Figura 26: Proliferação celular e apoptose (morte celular programada) nos filamentos branquiais de *A. gigas*. Observe um aumento da proliferação celular até aproximadamente 500-600g, com posterior redução a partir dessa Mc. O número de células em apoptose se mantém baixo e sem variações significativas entre os animais observados. * indica diferença significativa ($P < 0,05$) em relação ao ponto anterior.

4.3.2. Parâmetros pertinentes à atividade osmoregulatória nas brânquias de *A. gigas*

4.3.2.1. Células imunoreativas para o anticorpo anti-Na⁺/K⁺-ATPase

As células-cloreto estão particularmente distribuídas nos filamentos em animais com massa corpórea até 500-600g, enquanto que em animais acima de aproximadamente 1000g as CCs são freqüentes nas lamelas (Figuras 27 e 28). Dois tipos de células positivas para a Na⁺/K⁺-ATPase, foram identificadas no tecido branquial de *A. gigas*: CCs fracamente e fortemente coradas. A intensidade da coloração das CCs esta diretamente relacionada à densidade de unidades α da enzima Na⁺/K⁺-ATPase e, indiretamente reflete a atividade das CCs. Em animais com até 600g, aproximadamente, o filamento branquial exhibe células fortemente coradas e nos animais acima de 1000g tanto o filamento quanto as lamelas apresentam essas células, sendo que nas lamelas o número de CCs intensamente coradas é maior que nos filamentos. Ao longo do desenvolvimento do animal, observa-se que há um aumento no número de células-cloreto tanto claras ($b= 0,31$) quanto escuras ($b= 27$) no filamento branquial (Figura 28). A área individual das células-cloreto também é maior em animais de menores, aproximadamente 2g ($5,32\mu\text{m}^2$), diminuindo até 500-600g ($p<0,001$), atingindo em média $3,4\mu\text{m}^2$.

4.3.2.2. Área fracional de células-cloreto (AFCC) e densidade

Após a mensuração e cálculos para determinar a AFCC e a densidade (Figura 29), os resultados obtidos de AFCC revelam que o animal de 105g apresenta um valor significativamente menor que o animal de 2g e a partir do animal de 575g ocorre um aumento progressivo da AFCC, sendo que o animal de 5020g é observado o maior valor para a AFCC. Nos resultados de densidade observa-se que há um aumento ao longo do desenvolvimento de *A. gigas* ($b= 0,13$), sendo que em 1000g, aproximadamente, os valores encontrados são próximos de um animal de 500-600g e finalmente, um animal de aproximadamente 5000g é registrado o maior valor de densidade, acima do encontrado no animal de 1000g ($p<0,001$).

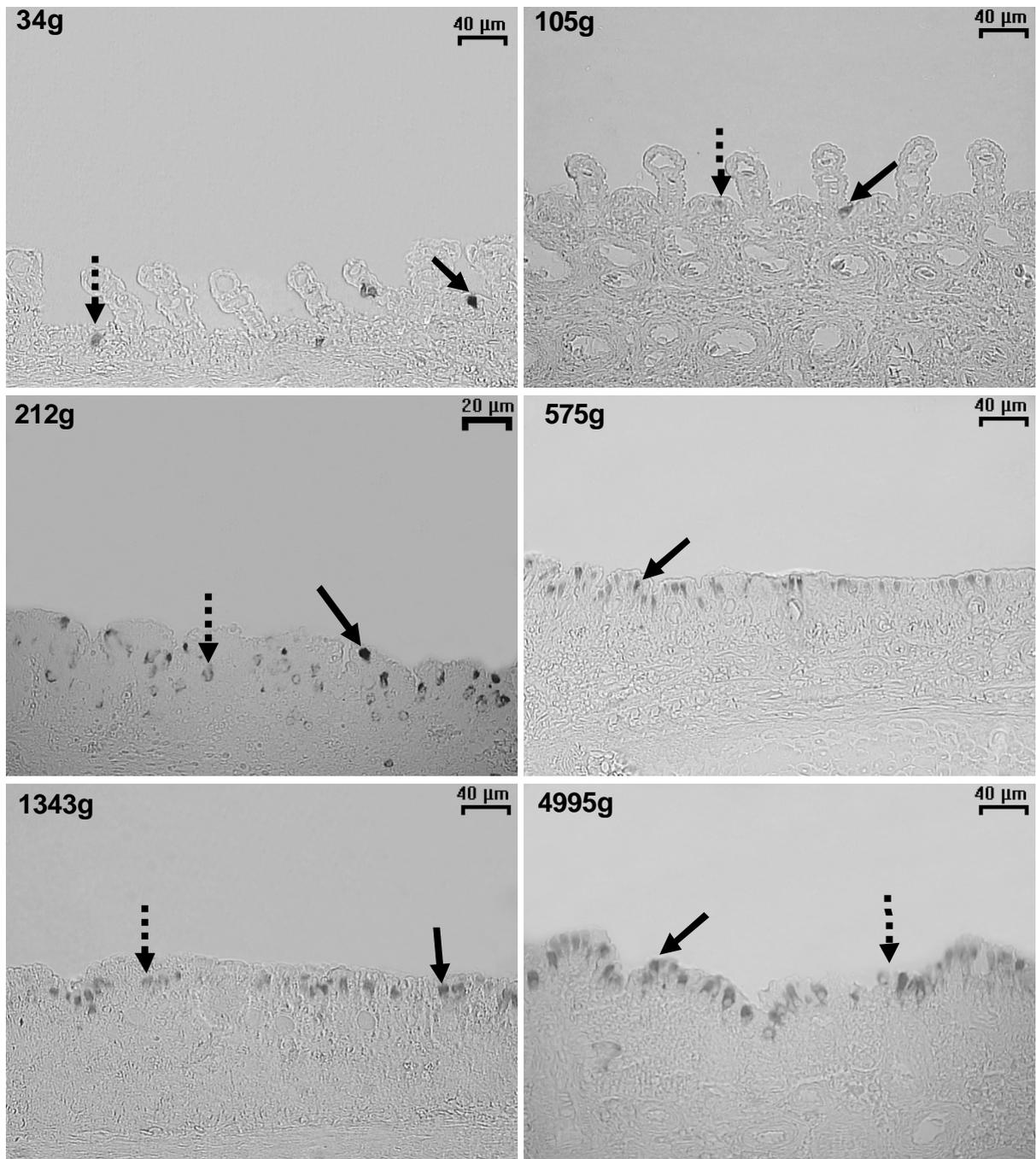


Figura 27: Imunohistoquímica atividade da enzima Na⁺/K⁺-ATPase, presente em células-cloreto. As setas escuras indicam células fortemente coradas devido a uma maior atividade da enzima, enquanto que as setas pontilhadas indicam células fracamente coradas devida a uma menor atividade da enzima. Nos animais que apresentam lamelas a maior incidência destas células é nas regiões interlamelares.

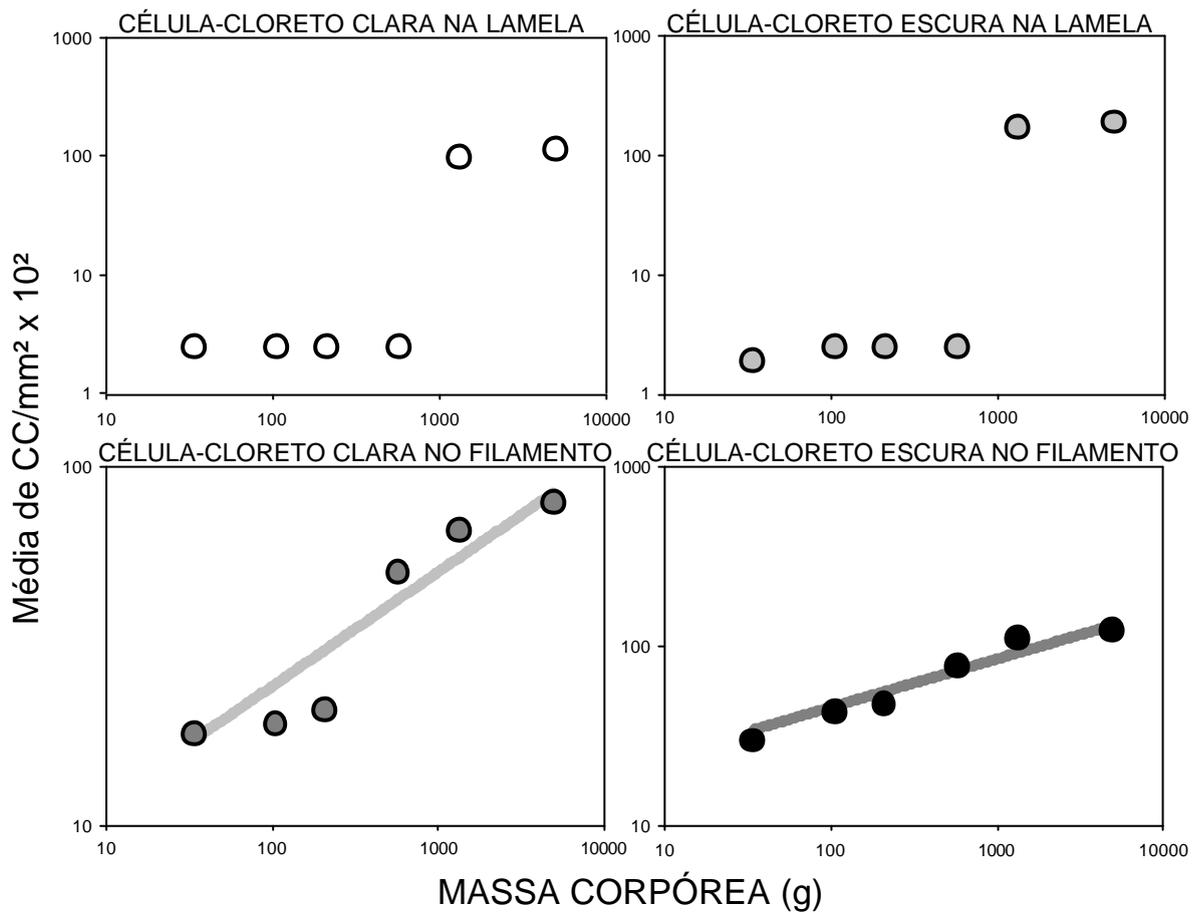


Figura 28: Variações na média de células-cloreto em diferentes etapas do desenvolvimento de *A. gigas*. Nas lamelas, observa-se que ocorre um aumento no número dessas células apenas em animais acima de aproximadamente 1000g. Observe que nos filamentos ocorre um aumento no número destas células tanto para claras (CCclf) quanto para escuras (CCcef). As curvas são: $CCclf = 5,62Mc^{0,32}$ ($n = 6$, $r^2 = 0,91$, $P < 0,001$) e $CCcef = 13,20Mc^{0,27}$ ($n = 6$, $r^2 = 0,93$, $P < 0,001$).

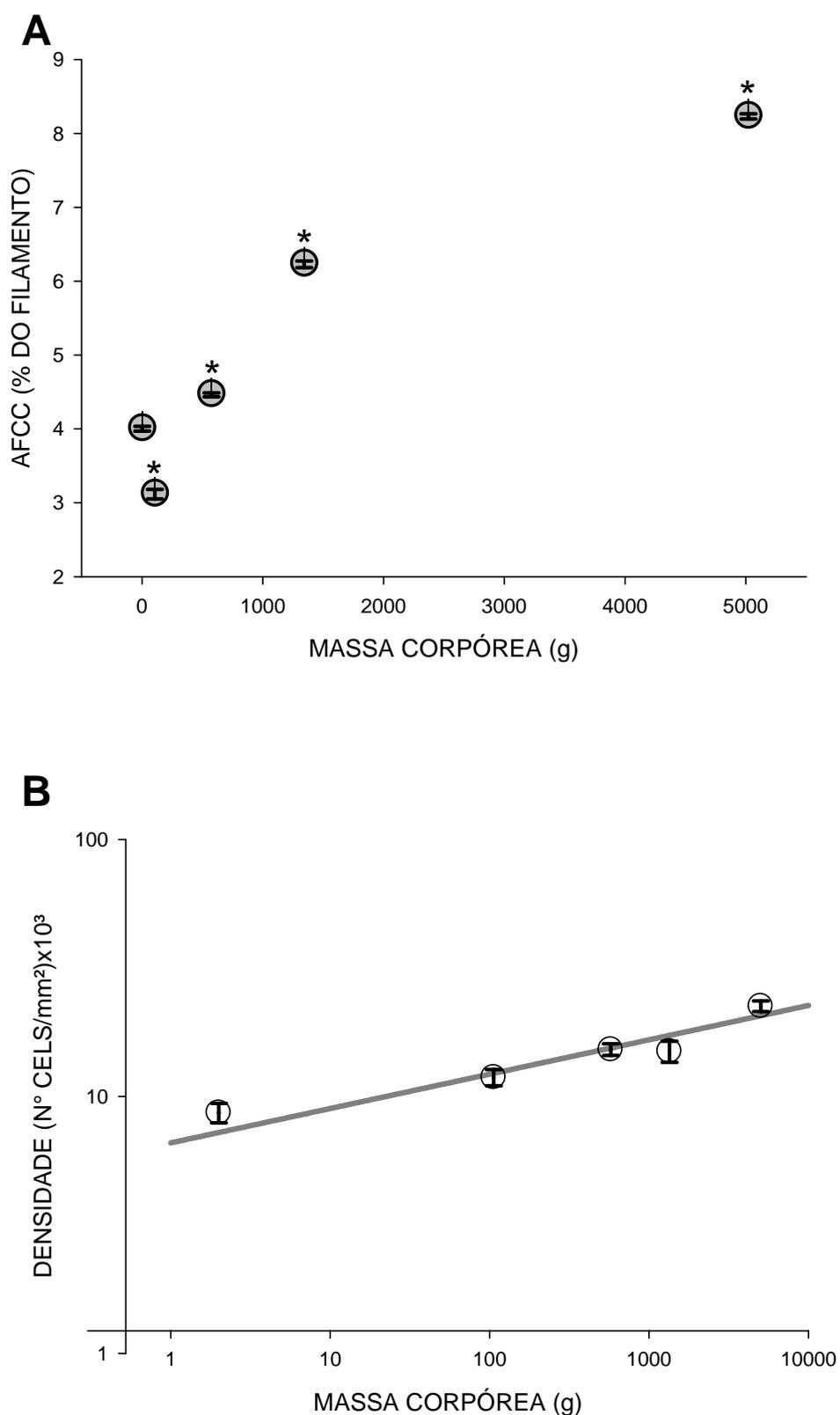


Figura 29: Morfometria da superfície de animais em diferentes etapas de desenvolvimento. (A) Área fracional das CCs; (B) Densidade de CCs, e o aumento da densidade pode ser observado pela uma curva: $CCden = 6,60Mc^{0,1337}$ ($n= 5$, $r^2= 0,9$, $P<0,001$). * indica diferença significativa em relação ao animal anterior ($P<0,05$).

4.3.3. Parâmetros pertinentes à secreção de mucopolisacarídeos (histoquímica para células mucosas - PAS e Alcian Blue)

Nas observações em microscopia de luz, a reação histoquímica da fucsina básica revelou a presença de células mucosas nas brânquias de *A. gigas* (Figuras 13 e 14, setas claras) e os métodos histoquímicos mais específicos revelam que tanto as células PAS positivas (PAS+) quanto as células Alcian Blue positivas (AB+) são encontradas nas brânquias de *A. gigas*, revelando nos animais que apresentam lamelas bem definidas que estas células são observadas na região interlamelar, enquanto que nos animais onde as lamelas estão atrofiadas e o filamento é observado como uma estrutura uniforme, com as dobras no epitélio branquial, as células mucosas são observadas nas primeiras camadas do epitélio (Figuras 30 e 31). Os resultados da análise quantitativa do número de células mucosas (Figura 32) revelaram que essas células têm uma menor incidência nos animais com aproximadamente 50g (Figuras 30, 31 e 32), com aumento até animais com 100-200g. Para animais com massa corpórea de aproximadamente 500g ocorre apenas aumento significativo ($P < 0,05$) no número de células PAS+, enquanto que o número médio de células AB+ por mm^2 se mantém próximo ao observado em animais com 100-200g. A partir de 1000g, aproximadamente, não foram observadas diferenças significativas tanto para células PAS+ quanto para células AB+.

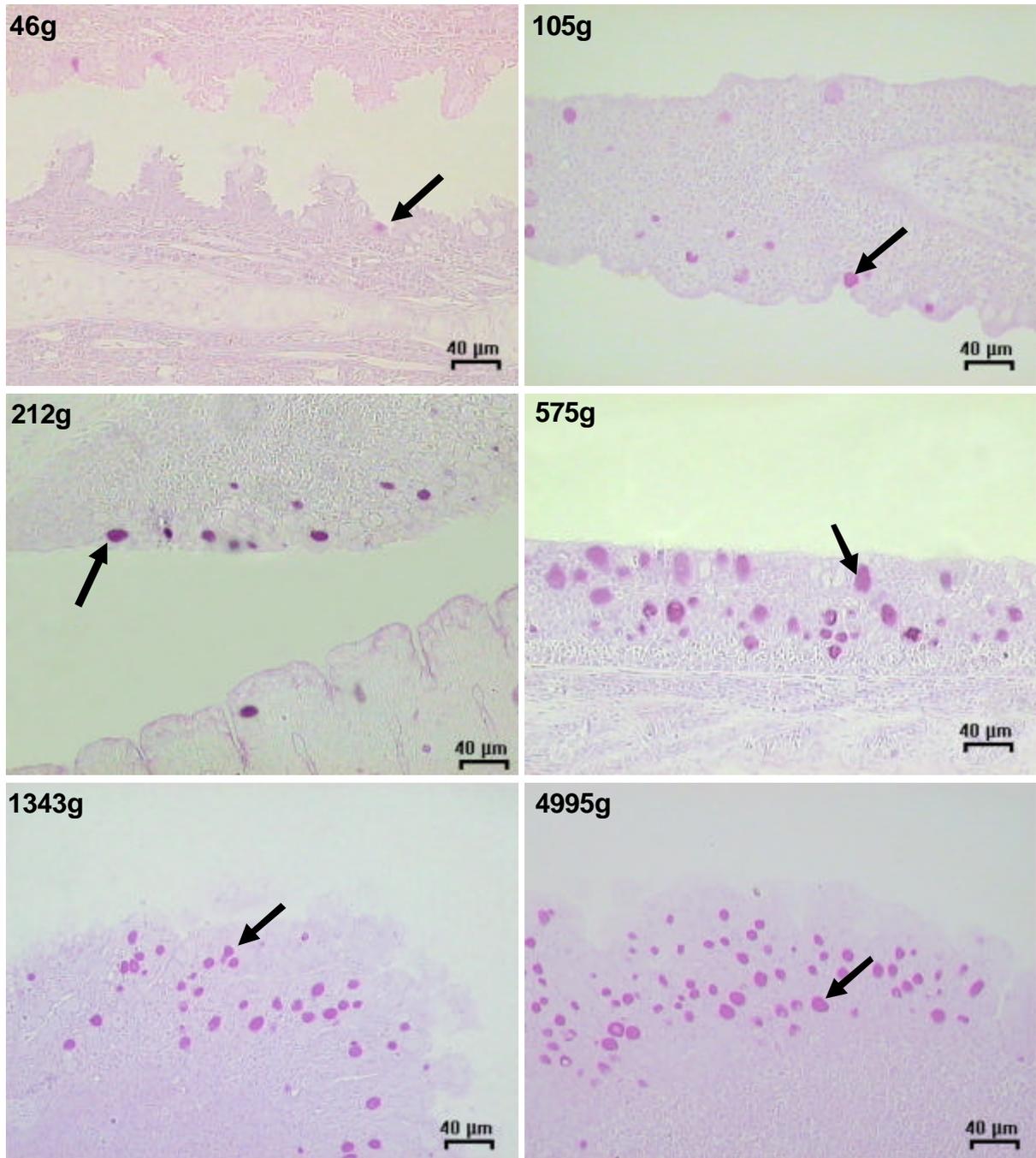


Figura 30: Células com grânulos de secreção reativos ao método de PAS+ (setas escuras) são observadas nas regiões interlamelares nos animais de 46g e 105g e estão nas primeiras camadas do epitélio branquial, em todos os animais observados. Pode se observar ainda, um aumento visível no número de células com grânulos reativos PAS+ ao longo do desenvolvimento do peixe.

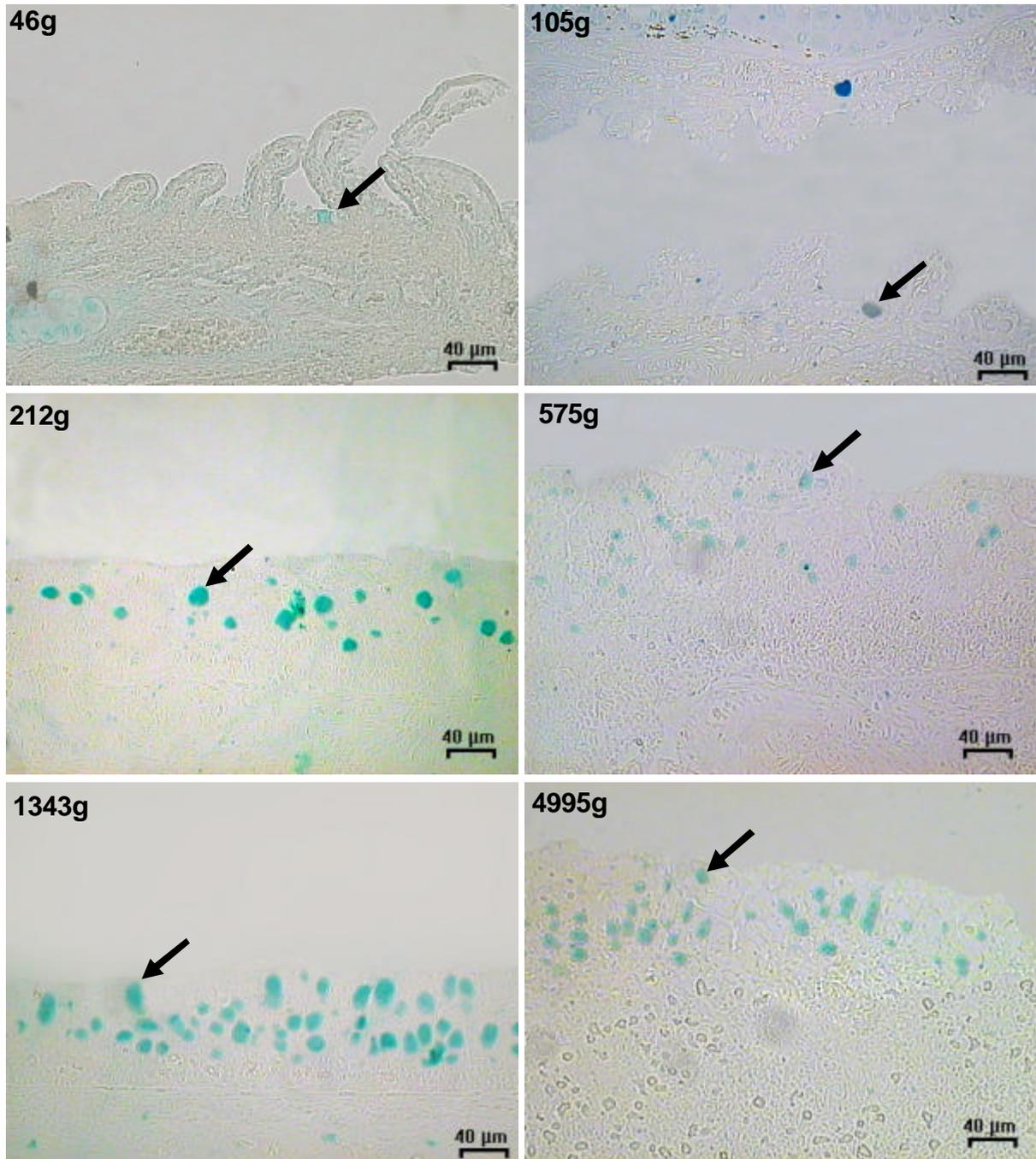


Figura 31: Células com grânulos reativos ao corante Alcian Blue, AB+, (setas escuras). Assim como as células PAS+, estão frequentemente observadas nas regiões interlamelares nos animais de 46g e 105g e em todos os peixes analisados, estão nas primeiras camadas do epitélio branquial. Para esta técnica histoquímica, também é observado um aumento visível no número de células com grânulos de secreção AB+ ao longo do desenvolvimento do peixe.

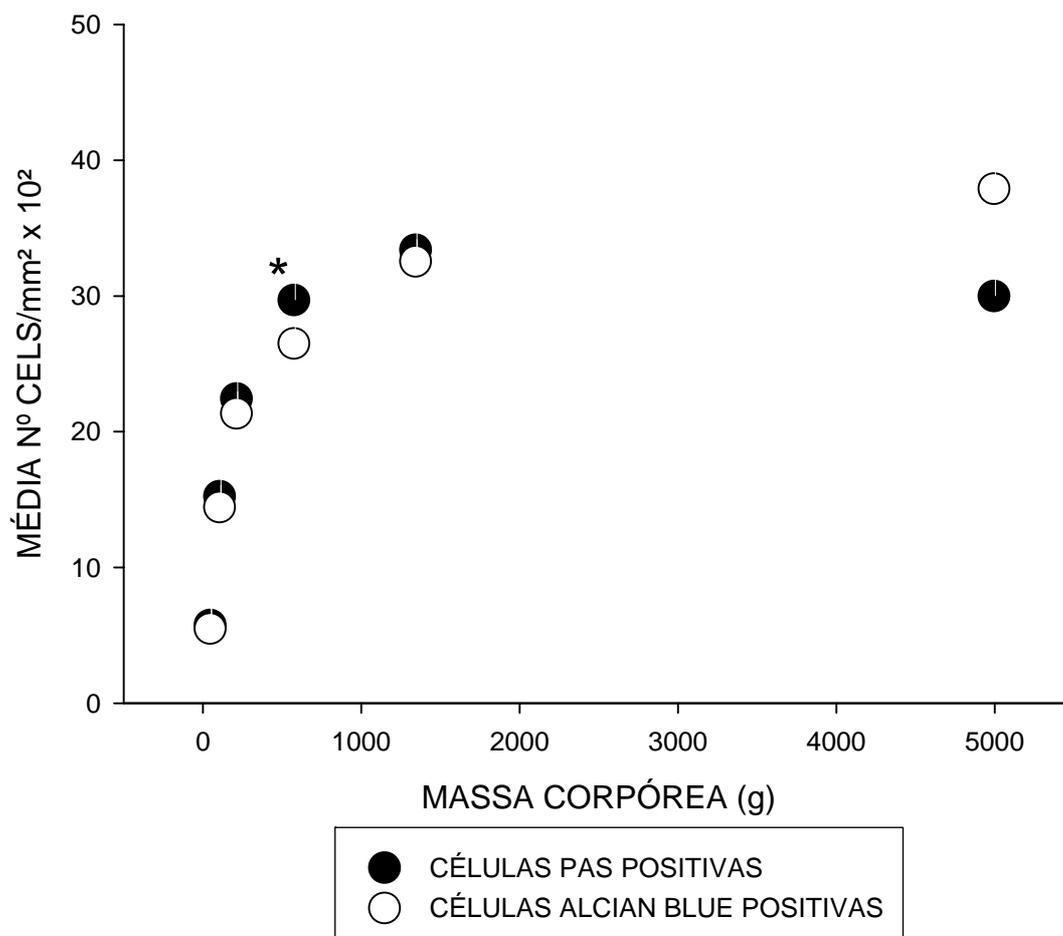


Figura 32: Análise quantitativa do número de células mucosas (PAS+ e AB+) de peixes em diferentes etapas de desenvolvimento. Observe até aproximadamente 100-200g há um aumento quantitativo em ambos os tipos de células mucosas em um animal na faixa de 500g ocorre aumento significativo apenas nas células PAS+. * Indica diferença significativa em relação ao ponto anterior. ($P < 0,05$).

5. DISCUSSÃO

5.1. Morfologia branquial de *Arapaima gigas*

A organização do tecido branquial requer não apenas uma arquitetura eficiente para a troca de gases, mas também que atenda aos requerimentos básicos que permitam a regulação iônica, ácido-base e a excreção de produtos nitrogenados. Em geral, as brânquias de diferentes espécies apresentam um padrão estrutural básico, mas a forma, distribuição e principalmente as dimensões dos elementos branquiais variam consideravelmente de espécie para espécie (HUGHES e MORGAN, 1973). A forma e dimensões dos arcos branquiais e dos filamentos mostram uma relação com a forma da cabeça, espaço da cavidade opercular e hábito alimentar do animal (MAZON *et al.*, 1998).

Estudos com diferentes espécies de ciclídeos mostraram que o número e comprimento de filamentos nas diferentes espécies são características morfológicas adaptadas à forma do músculo esternohióideo relacionado à expansão das cavidades bucal e operculares, ao comprimento do ceratobranquial, cavidade bucal e forma externa da cabeça (GALIS e BAREL, 1980). Os filamentos branquiais apresentam variações quanto ao número e ao comprimento ao longo do arco branquial sendo mais longos na região do ceratobranquial e mais curtos nas extremidades dos arcos branquiais e na região de articulação dos ossos epi- e ceratobranquial. A forma das lamelas varia na região basal, mediana e apical do filamento; as lamelas proximais ao arco branquial apresentam formato retangular, com comprimento maior e largura menor que aquelas localizadas na região distal do filamento, que apresentam formato triangular (HUGHES, 1984; HUGHES e MORGAN, 1973). Tanto o número quanto o tamanho das lamelas variam dependendo do modo de vida e habitat do animal (PERNA e FERNANDES, 1986, LAURENT e PERRY, 1991).

Em peixes que possuem respiração aérea acessória, as alterações são mais acentuadas e se manifestam em todos os níveis de organização branquial, dos arcos brânquiais às lamelas. Essas modificações corroboram a hipótese de que peixes que possuem respiração aérea apresentam uma redução da superfície respiratória que, por sua vez podem refletir o grau de dependência da respiração aérea (GRAHAM, 1997; GRAHAM *et al.*, 2007). Por exemplo, em *C. batrachus*, *C. striatus* e em peixes pulmonados, alguns arcos brânquiais funcionam como desvios

da circulação branquial por possuírem filamentos muito curtos e não possuírem lamelas (GRAHAM, 1997; MORAES *et al.*, 2005); nesses animais o comprimento dos filamentos pode ser muito reduzido quando comparados ao de espécies com respiração aérea facultativa, como em jeju (*Hoplerythrinus unitaeniatus*, Spix & Agassiz, 1829) e espécies que apresentam respiração exclusivamente aquática, como a traíra (*Hoplias malabaricus*, Bloch, 1794) (CAMERON e WOOD, 1978; FERNANDES *et al.*, 1994); além de alterações morfométricas nos filamentos, a morfometria das lamelas pode ser alterada de forma a reduzir a superfície branquial, como no peixe asiático *Monopterus albus* (Hamilton, 1822), que apresenta lamelas menos numerosas, menores e mais espessas (HUGHES e DATTA-MUNSHI, 1979; MUNSHI *et al.*, 1989). Essas características conduzem a uma superfície respiratória branquial reduzida e uma maior distância de difusão entre a água e o sangue, enquanto que os órgãos modificados para a respiração aérea, que complementam as necessidades de O₂ dos peixes que possuem respiração aérea acessória tendem a ter extensa superfície e distância ar-sangue é muito reduzida semelhante aos pulmões dos anfíbios e outros vertebrados (BURGGREN, 1989; FERNANDES *et al.*, 1994; MORAES *et al.*, 2005; COSTA *et al.*, 2007).

A. gigas, espécie que possui respiração aérea obrigatória, possui 4 arcos branquiais e filamentos em todos os arcos branquiais como nos demais teleósteos. Indivíduos jovens, até 200-300g possuem brânquias com características similares aos peixes com respiração aquática, ou seja, duas fileiras de filamentos em cada arco branquial e lamelas acima e abaixo do filamento. Durante o período de desenvolvimento que compreende a transição entre a respiração aquática e a respiração exclusivamente aérea (200-300g a 1000-2000g), as brânquias de *A. gigas* sofrem drástica modificação. O volume dos filamentos e lamelas em um animal com 100g é aproximadamente 70% do volume total das brânquias enquanto que em um animal com 1kg corresponde a aproximadamente 40% das brânquias o que evidencia um crescimento acentuado do volume dos ossos epi e ceratobranquial e rastros em detrimento dos filamentos nos quais se encontram as lamelas, estruturas em que ocorrem as trocas gasosas. Como nos demais teleósteos, os filamentos de *A. gigas* apresentam variações no comprimento ao longo do arco branquial sendo também mais curtos na região de articulação dos ossos epi- e ceratobranquial. O comprimento médio do filamento de *A. gigas* apresenta aumento muito baixo ($b = 0,17$) à medida que o animal cresce de forma que a diferença no comprimento médio

do filamento entre um animal de 500g e um com 5000g é de apenas 2 mm (SADAUSKAS-HENRIQUE, 2005) e a equação que descreve o aumento do comprimento total do filamento (CTF) é $484,6Mc^{0,364}$, que representa o aumento do número e do comprimento médio do filamento em relação ao aumento da massa corpórea.

Durante o período de transição respiração aquática para respiração aérea obrigatória, o epitélio do filamento apresenta intensa proliferação celular enquanto que processos de apoptose são relativamente baixos o que contribui para um aumento de camadas de células nesse epitélio com o crescimento do animal de forma a reduzir drasticamente a altura potencialmente respiratória da lamela, as quais ficam envolvidas no epitélio do filamento. Em geral, uma intensa proliferação celular acompanhada por células em processo de apoptose pode ser o reflexo de alterações no meio aquático, sendo o aumento destas células são consideradas como uma resposta ao estresse ambiental via ação do cortisol (WENDELAR-BONGA, 1997). No caso de *A. gigas*, as alterações no filamento das brânquias não são um reflexo direto de alterações ambientais imediatas, mas o resultado de uma seqüência de eventos que tiveram início durante o processo evolutivo e conduziu a uma redução da função respiratória das brânquias.

O aumento da espessura do epitélio lamelar deve-se a alteração da morfologia das células desse epitélio que passam de uma forma cúbica para colunar e provavelmente por migração de células a partir do epitélio do filamento, uma vez que não foi observada proliferação celular nas lamelas. A presença de extensos espaços intersticiais entre as células do epitélio do filamento e lamelas sugere possível movimento de fluido linfático, semelhante ao descrito por WRIGHT (1974), MORGAN e WRIGHT (1989) e MORAES *et al.* (2005) para o peixe pulmonado, *Lepidosiren paradoxa*, e indica, segundo WRIGHT (1974), participação nos processos de transporte iônico.

Os estudos preliminares efetuados por BRAUNER *et al.* (2004) mostraram a ausência de lamelas no filamento de *A. gigas* em animais com massa corpórea igual a 1kg. Este dado, entretanto se deve ao reduzido aumento (aproximadamente 100x) utilizado por esses autores nas observações em MEV. De fato há uma acentuada redução na altura potencialmente respiratória das lamelas à medida que o animal cresce, mas os dados do presente estudo evidenciaram a presença de lamelas em animais com massa corpórea de aproximadamente 5kg. As estruturas básicas que

constituem as lamelas tais como o sistema de células pilares, canal marginal e a presença de eritrócitos no interior dos espaços sanguíneos formados pelas flanges das células pilares, permanecem durante o desenvolvimento de *A. gigas* sendo porém envolvidas pelas células do epitélio do filamento que aumenta a sua espessura. Considerando que em animais acima de 1kg, as lamelas são muito pequenas, quase vestigiais, e a distância água-sangue é maior (até aproximadamente 40 μm) do que aquela encontrada nos animais menores (100g, distância água-sangue = 7,7 μm , COSTA *et al.*, 2007), essas estruturas devem ter pouca participação na troca de gases o que foi confirmado por BRAUNER e VAL (1996) que mostraram que em animais com 1,7kg, apenas 22% da absorção de O_2 é efetuada pelas brânquias e o animal tem completa dependência da respiração aérea para suprir suas necessidades. Nesse caso, o papel da estrutura das lamelas pode ser principalmente um veículo de transporte de nutrientes e O_2 pelo sangue às células do tecido branquial, pois as células mucosas e CCs têm alta demanda de energia.

Estudos recentes demonstraram que carpa (*Carassius carassius*, Linnaeus 1758) e o peixe dourado (*Carassius auratus*, Linnaeus 1758), peixes com respiração exclusivamente aquática, tem as lamelas inseridas no filamento branquial quando em normoxia e baixa temperatura (SOLLID *et al.*, 2003; SOLLID e NILSON, 2006; SARDELLA e BRAUNER, 2007), semelhante ao que foi encontrado em *A. gigas* na fase em que há completa dependência da respiração aérea. No caso de *C. carassius* e *C. auratus* a ausência de lamelas projetadas para fora do epitélio do filamento durante normoxia pode ser explicada pela alta afinidade hemoglobina- O_2 dessas espécies que poderia não necessitar de extensa área respiratória para saturar a hemoglobina com O_2 . Quando em hipóxia as lamelas ficam expostas aumentando a superfície respiratória em até 7,5 vezes. Estas alterações morfológicas mostraram ser reversível e causada por um aumento de apoptose combinada com reduzida proliferação celular. SAROGLIA *et al.* (2000, 2007) avaliou as alterações na distância de difusão água-sangue em *Dicentrarchus labrax* (Linnaeus, 1758) exposto em condições de normoxia e hiperóxia durante o verão e outono e verificou que a distância de difusão aumentou com o aumento do oxigênio dissolvido. De acordo com estes autores, a lamelas embebidas no filamento branquial ou o aumento da distância de difusão parecem ser benéficas para a manutenção da regulação iônica nestas espécies maximizando o compromisso entre

difusão de O₂ nas lamelas e a perda ou ganho de íons e água, uma vez que quando as lamelas estão projetadas para fora do epitélio ou a distância de difusão é muito pequena não ocorre completa compensação ao influxo de água e/ou perda de íons (SOLLID *et al.*, 2003; SAROGLIA *et al.*, 2007).

A. gigas com aproximadamente 100g possuem lamelas bem desenvolvidas e área de superfície respiratória igual a 77mm²/g (COSTA *et al.*, 2007) semelhante a outros peixes que possuem respiração aérea como *Channa punctata* (Bloch) (HUGHES e MUNSHI, 1973), *Anabas testudineus* (HUGHES e DATTA-MUNSHI, 1973) e *Hypostomus plecostomus* (Linnaeus, 1758) (PERNA e FERNANDES, 1996) e diminui acentuadamente à medida que o animal cresce sendo aproximadamente 1 mm²/g em exemplares com 1kg (SADAUSKAS-HENRIQUE *et al.*, 2005). A superfície branquial em peixes de respiração exclusivamente aquática é, em geral, maior do que a superfície corporal e a distância água-sangue varia de 2-5 µm (HUGHES, 1990). Em geral, peixes ativos e de natação rápida tem maior superfície branquial que está associada a um maior número de lamelas/mm de filamento do que peixes bentônicos e hábitos lentos os quais possui poucas lamelas/mm de filamento e maior espaço interlamelar (GRAY, 1954; HUGHES, 1972). Estas características devem-se a uma maior demanda energética em animais ativos, embora, conforme enfatizado por FERNANDES *et al.* (1994) e FERNANDES (1996) as características físicas e químicas ambientais como baixo nível de O₂ podem influenciar na freqüência de lamelas no filamento e, mesmo animais pouco ativos como *H. malabaricus*, podem ter extensa área de superfície respiratória. O aumento do comprimento total de filamentos, número total de lamelas e altura das lamelas são os elementos que mais contribuem para o aumento da área branquial à medida que o animal cresce (MATTIAS *et al.*, 1996). Em peixes de respiração aquática, um reduzido desenvolvimento da superfície branquial respiratória sugere uma dependência maior de mecanismos compensatórios bioquímicos e fisiológicos quando em condição de hipóxia (MATTIAS *et al.*, 1996). Em peixes de respiração aérea o reduzido desenvolvimento da superfície respiratória (filamentos curtos, baixa freqüência e lamelas curtas e longas) pode indicar o grau de dependência do ar atmosférico.

Em *A. gigas* a superfície respiratória muito reduzida das brânquias esta relacionada à existência de um órgão acessório, a bexiga natatória altamente vascularizada, para a respiração no meio aéreo, menos denso do que a água e com

maior disponibilidade de O₂. As brânquias podem ter, possivelmente, maior importância na regulação iônica e equilíbrio ácido-base, principalmente quando o animal passa a ter respiração aérea obrigatória. O aumento da espessura do epitélio do filamento e das lamelas e, conseqüentemente o aumento da largura da lamela, pode ser uma resposta morfológica, como já discutido anteriormente, contra a perda de íons e O₂ para o meio por espessamento da barreira água-sangue nas lamelas vestigiais.

Nos animais acima de 500g, o aumento da espessura do epitélio lamelar e do filamento ocorre concomitantemente com o aumento da densidade das CCs e aumento da AFCC. Em peixes de água doce, as CCs, em geral, localizadas no epitélio do filamento, na base aferente das lamelas ou na região interlamelar são as principais responsáveis pela absorção de Na⁺, Cl⁻ e Ca²⁺ enquanto que as células pavimentosas têm pouca participação na regulação iônica (absorção de Na⁺) e equilíbrio ácido-base (excreção de H⁺) (HIROSE *et al.*, 2003). O número de CCs varia entre espécies e depende, principalmente, do meio em que o animal vive (PERRY, 1998). MORON *et al.* (2003), comparando dois eritrinídeos, *H. malabaricus* e *H. unitaeniatus*, mostrou que *H. unitaeniatus* apresenta maior número de CCs quando comparado com *H. malabaricus* do mesmo ambiente e sugeriu que essa diferença pode estar relacionada à eficiência destas espécies em manter o equilíbrio iônico.

Estudos efetuados por LAURENT e HEBIBI (1989); GRECO *et al.*, (1995) mostraram que peixes que vivem em águas pobres em íons apresentam proliferação de CCs e aumento da AFCC. Assumindo que a superfície apical das CC em contato com o meio é o sítio de absorção de íons em peixes de água doce os estudos de fluxo iônico (Na⁺ e Cl⁻) efetuados por PERRY *et al.* (1992) mostraram que há uma relação direta entre a AFCC e a absorção de íons, ou seja, maior AFCC maior a absorção de Na⁺ e Cl⁻.

As profundas modificações morfológicas que ocorrem nas brânquias de *A. gigas* durante o desenvolvimento, parecem favorecer a regulação iônica, uma vez que em animais acima de 1 kg há intensa proliferação de CCs no epitélio do filamento e inclusive no epitélio da lamela. As águas da bacia Amazônicas têm baixa quantidade de osmólitos e pH baixo (VAL e ALMEIDA-VAL, 1995) de forma que a

proliferação de CCs com concomitante aumento da AFCC pode favorecer a absorção de íons. De acordo com BRAUNER *et al.* (2004), um exemplar com 1000g apresenta forte marcação fluorescente da enzima Na^+/K^+ -ATPase, principal proteína das CCs e responsável pelo transporte de íons. No presente estudo, as observações em MEV e microscopia de luz, via imunomarcção da enzima Na^+/K^+ -ATPase, de animais acima de 1000g também revelaram a presença de CCs distribuídas por todo o epitélio branquial o que sugere um aumento na capacidade de absorção ativa de Na^+ , Cl^- e Ca^{2+} . Entretanto, a atividade total da Na^+/K^+ -ATPase nas brânquias de *A. gigas* é 12 menor que em *Osteoglossum bicirrhosum* (Cuvier, 1829) e o fluxo unidirecional de Na^+ em exemplares de 1 kg, em repouso, é baixo ($70 \text{ nmol g}^{-1} \text{ h}^{-1}$) em relação a outros peixes de água doce (BRAUNER *et al.*, 2004). Comparando o fluxo de íons de *A. gigas* com o peixe de respiração aérea facultativa tamoata, *Hoplosternum littorale* (Hancock, 1828), BALDISSEROTTO *et al.* (2008) observaram que as espécies apresentam diferenças em seus mecanismos de osmorregulação, entretanto a resposta à exposição em água preta acidificada leva a perdas iônica em ambas as espécies, sendo que os autores consideraram a alta permeabilidade branquial pode explicar as perdas iônicas de animais submetidos à águas pretas.

O remodelamento do epitélio do filamento e lamelar, via aumento do número de camadas de células (espessura do epitélio do filamento e lamela), a medida que reduz a absorção de O_2 possivelmente reduz também a perda de íons de forma que o aumento das CC, embora com baixa atividade da Na^+/K^+ -ATPase como descrito por BRAUNER *et al.* (2004) pode manter a regulação iônica e/ou ácido-base.

A análise morfológica do epitélio branquial de *A. gigas* mostrou que as células pavimentosas possuem microdobras curtas. De acordo com KENDALL e DALE (1979), as microdobras podem representar uma expansão da área de superfície no epitélio de trocas e criar um fluxo de água sobre as células mais lento de forma a otimizar as trocas gasosas. Em relação às trocas gasosas, essa hipótese tem sido questionada pelo fato de que essas células são cobertas por glicocalix e que uma fina camada de muco fica retida entre as microdobras. OJHA *et al.* (1987) corroborando com SPERRY & WASSERSUG (1974) consideram que as microcriptas formam microcanais que auxiliam na retenção do muco liberado pelas células mucosas. O filme de muco que recobre o epitélio branquial, segundo HUGHES e WRIGHT (1970), tem uma função de proteção do epitélio contra atrito ou choques mecânicos de partículas, prevenção contra infecções causadas por bactérias e

fungos, prevenção contra ataques de parasitas e atração de íons que favoreceriam as trocas iônicas. Pode-se especular que este é talvez o mais importante papel do muco nas brânquias de *A. gigas*, pois tanto células PAS+ quanto AB+ aumentam durante o desenvolvimento do animal, se mantendo em um nível aproximadamente semelhante, nos animais a partir de 500-600g. Considerando o tipo de água em que o animal é encontrado, o espessamento do epitélio e o aumento da atividade de CCs nestes animais, a hipótese de que o muco produzido pelas células mucosas tem papel na atração de íons para o favorecimento das trocas iônicas é aceitável; além disso, diversos estudos (WOOD et al., 2003; GONZALES et al., 2005; STEINBERG et al., 2006; MATSUO e VAL, 2007) relatam que as substâncias húmicas dissolvidas na água contribuem para a prevenção de perdas iônicas.

O padrão das microdobras geralmente é diferente de uma espécie para outra (HUGHES e WRIGHT, 1970; OJHA et al., 1987; MORON et al., 2003). Em *A. gigas* as microdobras são morfologicamente semelhantes às encontradas em *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum, 1792) (OLSON e FROMM, 1973), *Mugil platanus* (Günther, 1880) e *M. curema* (Valenciennes, 1836) (EIRAS-STOFELLA et al., 2001) e não apresentam diferenças entre as células pavimentosas da lamela e filamento como descrito por MORON e FERNANDES (1996) para *H. malabaricus*. Modificações no padrão das microdobras do filamento e/ou lamelas em uma mesma espécie podem ser causadas por mudanças na temperatura ou salinidade (FERRI 1982, 1983; AVELLA et al., 1993) e exposição a poluentes (MAZON et al., 2002).

Sobre as células de “Rodlet”, encontradas nas brânquias de *A. gigas*, nas análises em MET, estas podem ser localizadas no epitélio de diversos órgãos de teleósteos (MORRISON e ODENSE, 1978). RICHARDS et al. (1994) consideraram que esta célula se trata de um organismo invasor em *Cyprinus carpio* (Linnaeus, 1758), entretanto a hipótese mais aceita é que esta estrutura se trata de uma célula diferenciada (CHAICHARN e BULLOCK, 1967; REITE, 1997; KRAMER e POTTER, 2003). Sua origem e função no epitélio branquial não são claras, mas diversos estudos têm revelado uma relação entre estas células e parasitismo (REIDE, 1997; PALENZUELA et al., 1999; DEZFULI et al., 2000; DEZFULI et al., 2004) e também a sua relação com alterações no meio, pela presença de xenobiontes (MANERA et al., 2001; DEZFULI et al., 2003) e KOPONEN e MYERS (2000) descrevem uma relação

entre sazonalidade e o número de células de rodlet de *Abramis brama* (Linnaeus, 1758) coletados em um lago poluído.

Outros dois aspectos relacionados às transformações que ocorrem nas brânquias de *A. gigas* referem-se à eliminação de CO₂ e a excreção de produtos nitrogenados. Devido à alta solubilidade do CO₂ em água, a maior parte do CO₂ em peixes de respiração aérea é excretado na água, via brânquias. Em *A. gigas* 79% da excreção do CO₂ é em água, via brânquias, e isso se deve à alta pressão parcial de CO₂ (P_{CO2}) no sangue que reduz a dependência da desidratação do HCO₃⁻ durante a excreção de CO₂ (BRAUNER e VAL, 1996). Considerando que a excreção de nitrogênio em peixes de água doce ocorre através das brânquias, principalmente por difusão passiva de NH₃ (WOOD, 1993; WILKIE, 1997) e que, portanto é facilitada com a presença de lamelas não embebidas no filamento, a ausência dessas lamelas em *A. gigas* implica em um desvio desta função das brânquias para os rins. Essa hipótese é corroborada pela presença do trocador Na⁺/NH₄⁺ nos rins de *A. gigas*, mas não em *O. bicirrhosum*, espécie de respiração aquática próxima de *A. gigas*, o que sugere um possível papel dos rins na excreção de nitrogênio nesta espécie (BRAUNER *et al.*, 2004).

6. CONCLUSÕES

A morfologia das brânquias de *A. gigas* nos estágios juvenis é semelhante à da maioria dos teleósteos de respiração aquática e em exemplares adultos, acima de aproximadamente 200g profundas alterações são observadas no filamento branquial. Essas alterações devem ser uma consequência da perda da dependência da respiração aquática branquial para a respiração aérea através da bexiga natatória, que passa a ser o principal órgão para a troca de gases.

Entretanto, apesar de uma perda na capacidade de trocas gasosas pelas brânquias, essas alterações podem permitir uma eficiente regulação iônica e ácido-base através das brânquias pelo aumento da atividade das células cloreto, aumento de sua exposição ao meio e aumento na sua proliferação a medida em que o animal cresce. O muco secretado pelas células mucosas provavelmente têm relação com o papel de ajuste iônico, pois este muco secretado deve permitir que todo o epitélio receba um delgado revestimento que provavelmente atua na atração de íons, otimizando assim a regulação iônica.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AVELLA, M.; BERHAUT, J.; BORNACIN, M. Salinity tolerance of two tropical fishes, *Oreochromis aureus* and *O. niloticus*. †Biochemical and morphological changes in the gill epithelium. *Journal of Fish Biology*, v.42, p.243-254, 1993.
- BALDISSEROTTO, B.; COPATTI, C. E.; GOMES, L. C.; CHAGAS, E. C.; BRINN, R. P.; ROUBACH, R. Net ion fluxes in the facultative air-breather *Hoplosternum littorale* (tamoata) and the obligate air-breather *Arapaima gigas* (pirarucu) exposed to different Amazonian waters. *Fish Physiology and Biochemistry*, 2008.
- BINDON, S. D.; FENWICK, J. C.; PERRY, S. F. Branchial chloride cell proliferation in the rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*: Implications for gas transfer. *Can. J. Zool.*, v.72, p.1395-1412, 1994a.
- BINDON, S. D.; GILMOUR, K. M.; FENWICK, J. C.; PERRY, S. F. The effect of branchial chloride cell proliferation on gas transfer in the rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. *J. Exp. Biol.*, v.197, p.47-63, 1994b.
- BONE, Q.; MARSHALL, N. B.; BLAXTER, J. H. S. *Biology of fishes*. Tertiary Level Biology. 2^o edition, 332pp, 1995.
- BRAUNER, C. J. e VAL, A. L. 9-The interaction between O₂ and CO₂ exchange in the obligate air breather, *Arapaima gigas*, and the facultative air breather, *Lipossarcus pardalis*. In: *Physiology and Biochemistry of the fishes of the Amazon* (Val, A. L.; Almeida-Val, V. M. F.; Randall, D.J.), p.101-109, 1996.
- BRAUNER, C. J.; MATEY, V.; WILSON, J. M.; BERNIER, N. J.; VAL, A. L. Transition in organ function during the evolution of air-breathing; insights from *Arapaimas gigas*, an obligate air-breathing teleost from the Amazon. *The Journal of Experimental Biology*, v.207, p.1433-1438, 2004.
- BURGGREN, W. W. Lung Structure and Function: amphibians. In *Comparative Pulmonary physiology*. Current concepts. (Wood, S.C., ed.). Marcel Dekker, New York, p.153-192, 1989.

- CAMERON, J. N. e WOOD, C. M. Renal function and acid-base regulation in two Amazonian erythrinid fishes: *Hoplias malabaricus*, a water breather, and *Hoplerythrinus unitaeniatus*, a facultative air breather. *Canadian Journal of Zoology*, v.56, p.917-930, 1978.
- CARTER, G. S. e BEADLE, L. C. 1931. The fauna of the swamps of the Paraguayan Chaco in relation to its environment. II. Respiratory adaptations in the fishes. *J. Linn. Soc. Lond.*, v.37, p.327-366, 1931.
- CHAICHARN, A. e BULLOCK, W. L. The histopathology of acanthocephalan infections in suckers with observations on the intestinal histology of two species of catostomid fishes. *Acta Zoologica*, v.48, p.19-42, 1967.
- COSTA, O. T. F.; PEDRETTI, A. C. E.; SCHMITZ, A.; PERRY, S. F.; FERNANDES, M. N. Stereological estimation of the surface area and barrier thickness of the fish gills in vertical sections. *Journal of Microscopy*, v. 255, pt.1, p.1-9, 2007.
- DANG, Z.; LOCK, R. A.; FLIK, G.; WENDELAAR-BONGA, S. E. Na⁺K⁺ATPase immunoreactivity in branchial chloride cells of *Oreochromis mosambicus* exposed to copper. *Journal of Experimental Biology*, v.203, p.379-387, 2000.
- DEZFULI, B. S.; SIMONI, E.; ROSSI, R.; MANERA, M. Rodlet cells and other inflammatory cells of *Phoxinus phoxinus* infected with *Raphidascaris acus* (Nematoda). *Diseases of Aquatic Organisms*, v.43, n.1, p.61-69, 2000.
- DEZFULI, B. S.; GIARI, L.; SIMONI, E.; PALAZZI, D.; MANERA, M. Alteration of rodlet cells in chub caused by the herbicide Stam(R) M4 (Propanil). *Journal of Fish Biology*, v.63, n.1, p.232-239, 2003.
- DEZFULI, B. S.; GIARI, L.; SIMONI, E.; SHINN, A. P.; BOSI, G. Immunohistochemistry, histopathology and ultrastructure of *Gasterosteus aculeatus* tissues infected with *Glugea anomala*. *Diseases of Aquatic Organisms*, v.58, n.2-3, p.193-202, 2004.
- EIRAS-STOFELLA, D. R. Variabilidade morfológica da região faríngea dos arcos branquiais de algumas espécies de peixes (Teleostei), estudada através da

- microscopia eletrônica de varredura. Tese de Doutorado. Departamento de Zoologia, Universidade Federal do Paraná, 1994.
- EIRAS-STOFELLA, D. R.; CHARVET-ALMEIDA, P.; FANTA, E.; Vianna, A. C. C. Surface Ultrastructure of the gills of the Mulletts *Mugil curema*, *M. liza* and *M. platanus* (Mugilidae, Pisces). *Journal of Morphology*, v.247, p.122-133, 2001.
- EVANS, D. H.; PIERMARINI, M.; CHOE, K. P. The Multifunctional Fish Gill: Dominant site of Gas Exchange, Osmoregulation, Acid-base Regulation and Excretion of Nitrogenous Waste. *Physiology Review*, n.85, p.97-177, 2005.
- FERNANDES, M. N. 15-Morpho-funcional adaptations of gills in tropical fish. In: *Physiology and Biochemistry of the fishes of the Amazon* (Val, A. L.; Almeida-Val, V. M. F.; Randall, D.J.), p.181-190, 1996.
- FERNANDES, M. N. e PERNA-MARTINS, S. A. Chloride cell responses to long-term exposure to distilled and hard water in the gill of the armored catfish, *Hypostomus tietensis* (Loricariidae). *Acta Zoológica*, v. 83, n. 4, p. 321-328, 2002.
- FERNANDES, M. N. e RANTIN, F. T. Respiratory responses of *Oreochromis niloticus* (Pisces, Cichlidae) o environmental hypoxia under different thermal conditions. *Journal of Fish Biology*, v.35, p.509-519, 1989.
- FERNANDES, M. N.; RANTIN, F. T.; KALININ, A. L.; MORON, S. E. Comparative study of gill dimensions of three erythrinid species in relation to their respiratory function. *Canadian Journal of Zoology*, v.72, p.160-165, 1994.
- FERNANDES, M. N.; MORON, S. E.; SAKURAGUI, M. M. 6-Gill morphological adjustments to environment and the gas exchange function. In: *Fish Respiration and Environment* (Fernandes, M. N.; Gloss, M. L.; Rantin, F. T.; Kapoor, B. G.), p.293-120, 2007.
- FERRI, S. Temperature induced transformation of teleost (*Pimelodus maculatus*) epidermal cells. *Gegenbaurs Morphology Jahrb.*, Leipzig, v.128, p.712-731, 1982.

- FERRI, S. Modification of microridge pattern in teleost (*Pimelodus maculatus*) epidermal cells induced by NaCl. *Gegenbaurs Morphology Jahrb.*, Leipzig, v.129, p.325-329, 1983.
- FLOREY, E. An introduction to general and comparative animal physiology. 3^ªed. Philadelphia, London: W.S. Saunders, 1968.
- GALIS, F. e BAREL, C. D. N. Comparative functional morphology of the gills of african lacustrine Cichlidae (Pisces, Teleostei): Na ecomorphological approach. *Netherlands Journal of Zoology*, v. 30, p.392-430, 1980
- GANS, C. Strategy and sequence in the evolution of the external gas exchange of ectothermal vertebrates. *Forma Functio*, v.3, p.61-104, 1970.
- GEE, J. H. e GRAHAM, J. B. Respiratory and hydrostatic functions of the intestine of the catfishes *Hoplosternum thoracatum* and *Brochis splendens* (Callichthyidae). *J. Exp. Biol.*, v.74, p.1-16, 1978.
- GOMES, L. C; CHAGAS, E. C.; BRINN, R. P.; ROUBACH, R.; COPPATI, C. E.; BALDISSEROTTO, B. (2006). Use of salt during transportation of air breathing pirarucu juveniles (*Arapaima gigas*) in plastic bags. *Aquaculture*, v.256, p.521–528, 2006.
- GRAHAM, J. B. Air-Breathing Fishes: Evolution, Diversity and Adaptation. 1^ªed. Academic Press, 299pp, 1997.
- GRAHAM, J. B.; LEE, H. J.; WEGNER, N. C. 14-Transition from water to land in a extant group of fishes: Air breathing and the acquisition sequence of adaptations for amphibious life in oxudercine gobies In: *Fish Respiration and Environment* (Fernandes, M. N.; Gloss, M. L.; Rantin, F. T.; Kapoor, B. G.), p.255-288, 2007.
- GRAY, I. E. Comparative Study of the gill Area of Marine Fishes. *The Biological Bulletin*, v.107, p.219-225, 1954.
- GREENWOOD, P. H. A history of fishes. 3^ªed. London: Ernest Benn Ltda., 1975.

- GRECO, A. M.; GILMOUR, K. M.; FENWICK, J. C.; PERRY, S. F. The effects of softwater acclimation on respiratory gas transfer in the rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. *J. Exp. Biol.*, v. 198, p.2557-2567, 1995.
- GONZALEZ, R. J.; WILSON, R. W.; WOOD, C. M. Ionoregulation in tropical fishes from ion-poor, acidic blackwaters. In: VAL, A. L.; VAL, V. M. F. A.; RANDALL, D. J. *The Physiology of Tropical Fishes*, Fish Physiology Series, v. 16, p.397-442, 2005.
- HILDEBRAND, M. e GOSLOW, G. *Análise da estrutura dos vertebrados*. 2ª ed. Editora Atheneu, pp642, 2006.
- HIROSE, S.; KANEKO, T.; NAITO, N.; TAKEI, Y. Molecular biology of major components of chloride cells. *Comparative Biochemistry and Physiology B*, v.136, p.593-620, 2003.
- HOSSLER, F. E.; MUSIL, G.; KARNAKY Jr., K. J.; EPSTEIN, F. H. Surface ultrastructure of the gill arch of the killifish, *Fundulus heteroclitus*, from seawater and freshwater, with special reference to the morphology of apical crypts of chloride cells. *Journal of Morphology*, v.185, n.3, p.377-386, 1985.
- HUGHES, G. M. Morphometrics of fish gills. *Respiratory Physiology*, v.14, p.1-25, 1972.
- HUGHES, G. M. General Anatomy of the Gills. In: HOAR, W. S. e RANDALL, D. J. *Fish Physiology*. Orlando: Academic Press, v. XA, 1984.
- HUGHES, G. M. Morphometry of fish gas exchange in relation to their respiratory function. In *Environmental Physiology of fishes*, (Ali, M.A., ed.). Plenum Press, New York, p. 33-56, 1990.
- HUGHES, G. M. e WRIGHT, D. E. A Comparative Study of the Ultrastructure of the Water-Blood Pathway in the Secondary Lamellae of Teleost and Elasmobranch Fishes – Benthic Forms. *Zeitschrift für Zellforschung und mikroskopische Anatomie*, v.104, p.478-493, 1970.

- HUGHES, G. M. e DATTA-MUNSHI, J. S. Fine structure of the respiratory organs of the Climbing perch, *Anabas testudineus* (Pisces: Anabantidae). J. Zool. Lond., v.170, p.201-225, 1973.
- HUGHES, G. M. e MORGAN, M. The structure of fish gills in relation to their respiratory function. Biological Reviews, v.48, n.3, p419–475, 1973.
- HUGHES, G. M. e MUNSHI, J. D. S. Nature of the air-breathing organs on the Indian fishes, Channa, Amphipnous, Clarias and Saccobranchus as shown by electron microscopy. Journal of Zoology (London), v.170, p.245–270, 1973.
- HUGHES, G. M. e DATTA-MUNSHI, J. S. Fine structure of the gills of some Indian air-breathing fishes. Journal of Morphology, v.160, p.169-193, 1979.
- KARAKATSOULI, N.; TARNARIS, K.; BALASKAS, PAPOUTSOGLOU, S. E. Gill area and dimensions of gilthead sea bream *Sparus aurata* L. Journal of Fish Biology, v. 69, n.1, P.291-299, 2006.
- KENDALL, M. W. e DALE, J. E. Scanning and transmission Electron Microscopic Observations of Rainbow Trout (*Salmo gairdneri*) Gill. Journal of the Fisheries Research Board of Canada, v.36, n.9, p1072-1079, 1979.
- KOPONEN, K. e MYERS, M. S. Seasonal changes in intra- and interorgan occurrence of rodlet cells in freshwater bream. Journal of Fish Biology, v.56, n.2, p.250-263, 2000.
- KRAMER, C. R. e POTTER, H. Rodlet cells in the posterior intestine of embryos and neonates of two poeciliid species. Journal of fish biology, v.62, n.5, p.1211-1216, 2003.
- LAURENT, P. e HEBIBI, N. Gill morphometry and fish osmoregulation. Can. J. Zool., v.67, p.3055-3063, 1989.
- LAURENT, P e PERRY S. F.. Environmental effects on fish gill morphology. Physiol. Zool., v.64, P.4-25, 1991.

- MANERA, M.; SIMONI, E.; DEZFULI, B. S. The effect of dexamethasone on the occurrence and ultrastructure of rodlet cells in goldfish. *Journal of Fish Biology*, v.59, n.5, p.1239-1248, 2001.
- MATSUO, A. Y. O. e VAL, A. L. Acclimation to humic substances prevents whole body sodium loss and stimulates branchial calcium uptake capacity in cardinal tetras *Paracheirodon axelrodi* (Schultz) subjected to extremely low pH. *Journal of Fish Biology*, v.70, p.989–1000, 2007.
- MATTIAS, A. T.; PERNA, S. A.; MORON, S. E.; RODRIGUES, J. A. O.; FERNANDES, M. N. Comparação entre a estrutura morfológica e a morfometria das brânquias de cascudo, *Hypostomus regani* e *Hypostomus plecostomus* (LORICARIIDAE). *Anais do VII Seminário Regional de Ecologia*. VII, p.223,-236, 1996.
- MAZON, A. F.; FERNANDES, M. N.; NOLASCO, M. A.; SEVERI, W. Functional morphology of gills and respiration area of two active rheophilic fish species, *Plagioscion squamosissimus* and *Prochilodus scrofa*. *Journal of Fish Biology*, v.52, p.50-61, 1998.
- MAZON, A. F. CERQUEIRA, C. C. C.; FERNANDES, M. N. Gill cellular changes induced by cooper exposure in the South American tropical freshwater fish *Prochilodus scrofa*. *Environmental Research*, v.A, n.88, p.52-63, 2002.
- MORAES, M. F. P. G.; HÖLLER, H; COSTA, O. T. F.; GLAS, M. L.; FERNANDES, M. N.; PERRY, S. F. Morphometric Comparison of the Respiratory Organs in the South American Lungfish *Lepidosiren paradoxa* (Dipnoi). *Physiological and Biochemical Zoology*, v.78, n.4, p.546-559, 2005.
- MORGAN, M e WRIGHT, D. E. Morphology of central compartment and vasculature of the gills of *Lepidosiren paradoxa* (Fitzinger). *Journal of Fish Biology*, v.34, n.6, p.875-888, 1989.
- MORRISON, D. M. e ODENSE, P. H. Distribution and morphology of the rodlet cell in fish. *Journal of Fisheries Research Board Canada*. v.35, p.101–116, 1978.

-
- MORON, S. E.; FERNANDES, M. N. Pavement cell ultrastructural differences on *Hoplias malabaricus* gill epithelia. *Journal of Fish Biology* v.49, p.357-362, 1996
- MORON, S. E.; OBA, E. T.; ANDRADE, C. A.; FERNANDES, M. N. Chloride cell responses to ion challenge in two tropical freshwater fish, the Erythrinids *Hoplias malabaricus* e *Hoplerythrinus unitaeniatus*. *Journal of Experimental Zoology*, v.298, pt.A, p.93-104, 2003.
- MUNSHI, J. S. D. The accessory respiratory organs of *Clarias batrachus* (Linn.). *Journal of Morphology*, v.109, p.115-139, 1961.
- MUNSHI, J. S. D. Gross and fine structure of the respiratory organs of air-breathing fishes. In: Hughes, G. M. *Respiration of Amphibious Vertebrates*, Academic Press, pp. 73–104, 1976.
- MUNSHI, J. S. D.; HUGHES, G. M.; GEHR, P.; ANDWEIBEL, E. R. Structure of the air-breathing organs of a swamp mud eel, *Monopterus albus*. *Jap. J. Ichthyol.*, v.35, p.453–465, 1989.
- OJHA, J. e MISHRA, A. K. Interspecific variations in the functional organization, dimensions and scaling of gills in relation to body weight of the Gangetic Mulletts, *Rhinomugil corsula* (Ham.) and *Sicamugil cascasia* (Ham.) (Mugilidae, Mugiliformes). *Proceedings of the Indian National Science Academy*, v.B59, n.6, p. 567-580, 1993.
- OJHA, J.; MISHRA, A. K.; MUNSHI, J. S. D. Interspecific Variations in the Surface Ultrastructure of the Gills of Freshwater Mulletts. *Japanese Journal of Ichthyology*, v.33, n.4, p.388-393, 1987.
- OLSON, K. R. e FROMM, P.O. A Scanning Electron Microscopic Study of the Secondary Lamellae and Chloride Cells of Rainbow Trout (*Salmo gairdneri*). *Cell and Tissue Research*, v.143, n.4, p.439-449, 1973.
- PALENZUELA, O., ALVAREZ-PELLITERO, P.; SITJA-BOBADILLA, A. Glomerular disease associated with *Polysporoplasma sparisi* (Myxozoa) infections in cultured

- gilthead sea bream, *Sparus aurata* L. (Pisces: Teleostei). *Parasitology*, v.118, p.245-256, 1999.
- PERNA, S. A. e FERNANDES, M. N. Gill Morphometry of the facultative air-breathing loriciid fish, *Hypostomus plecostomus* (Walbaum) with a special emphasis on aquatic respiration. *Fish Physiology and Biochemistry*, v.15, n.3, p.213-220, 1996.
- PERRY, S. F. The chloride cell: Structure and function in the gills of freshwater fishes. *Annu. Rev. Physiol.*, v.59, p.325-347, 1997.
- PERRY, S. F. Relationships between branchial chloride cells and gas transfer in freshwater. *Comp. Biochem. Physiol.*, v.119A, p.9-16, 1998.
- PERRY, S. F. e SANDER, M. Reconstructing the evolution of the respiratory apparatus in tetrapods. *Respiratory Physiology e Neurobiology*, v.144, p.125-139, 2004.
- PERRY, S. F.; GOSS, G. G.; LAURENT, P. The interrelationships between gill chloride cell morphology and ionic uptake in four freshwater teleosts. *Can. J. Zool.*, v.70, p.1775-1786, 1992.
- PODKOWA, D. e GONIAKOWSKA-WITALINSKA, L. Adaptations to the air breathing in the posterior intestine of the catfish (*Corydoras aeneus*, Callichthyidae). A histological and ultrastructural study. *Folia Biol (Krakow)*. v.50(1-2), p.69-82, 2002
- RANDALL, D. J.; BURGGREN, W. W.; FARRELL, A. P.; HASWELL, M. N. The evolution of air-breathing vertebrates. Cambridge Univ. Press, 133pp, 1981.
- REITE, O. B. Mast cells/eosinophilic granule cells of salmonids: staining properties and responses to noxious agents. *Fish e Shellfish Immunology*, v.7, p.567-584, 1997.
- RICHARDS, D. T.; HOOLE, D.; ARME, C.; LEWIS, J. W.; EWENS, E. Phagocytosis of rodlet cells (*Rhabdospora thelohani* Laguesse, 1895) by carp (*Cyprinus carpio* L.) macrophages and neutrophils. *Helminthologica*, v.31, p.29-33, 1994.

-
- ROMER, A. S. e PARSONS, T. S. Anatomia Comparada dos Vertebrados. São Paulo: Atheneu, 1985.
- SADAUSKAS-HENRIQUE, H. e FERNANDES, M. N. Desenvolvimento das brânquias de pirarucu, *Arapaima gigas*, com ênfase na função respiratória In: XIII Congresso de Iniciação Científica – UFSCar. v.1, p.C03-034, 2005.
- SADAUSKAS-HENRIQUE, H; RAMOS, C.; COSTA, O. T. F.; FERNANDES, M. N. Gill Respiratory Structure of Pirarucu, *Arapaima gigas*, with emphasis on the structural modifications during the transition from water-breathing to air breathing. XXI Congresso da Sociedade Brasileira de Microscopia e Microanálise. XXI SBMM – Anais eletrônicos, 2007.
- SAKURAGUI, M. M.; J. R. SANCHES, J. R.; FERNANDES, M. N. Gill chloride cell proliferation and respiratory responses to hypoxia of the neotropical erythrinid fish *Hoplias malabaricus*. Journal of Comparative Physiology B: Biochemical, Systemic, and Environmental Physiology, v.173, N.4, 2003.
- SALVO-SOUZA, R. e VAL, A. L. O gigante das águas amazônicas. Ciência Hoje, n.11, p.9-12, 1990.
- SANTOS, C. T. C.; FERNANDES, M. N.; SEVERI, W. Respiratory gill surface area of a facultative air-breathing loriciid fish, *Rhinelepis strigosa*. Canadian Journal of Physiology, v.72, p.2009-2013, 1994.
- SARDELLA, B. A. e BRAUNER, C. J. 8-The osmo-respiratory compromise in fish: The effects of physiological state and the environment. In: Fernandes, M. N.; Rantin, F. T.; Glass, M. L.; Kapoor, B. G. Fish Respiration and Environment. Sciences Publishers, p.147-165, 2007.
- SAROGLIA, M.; CECCHINI, S.; TEROVA, G; CAPUTO, A.; De STRADIS, A. Influence of environmental temperature and water oxygen concentration on gas diffusion distance in Sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.). Fish Physiology and Biochemistry, v.23, p.55-58, 2000.

- SAROGLIA, M.; TEROVA, G.; DE STRADIS, A.; CAPUTO, A. Morphometric adaptations of sea bass gills to different dissolved oxygen partial pressures. *Journal of Fish Biology*, v. 60, p.1423–1430, 2002
- SAROGLIA, M.; TEROVA, G.; PRATI, M. 9-Dissolved oxygen and Gill morphology. In: Fernandes, M. N.; Rantin, F. T.; Glass, M. L.; Kapoor, B. G. *Fish Respiration and Environment*. Sciences Publishers, p.167-190, 2007.
- SOLLID, J. e NILSON, G. E. Plasticity of respiratory structures - Adaptive remodeling of fish gills induced by ambient oxygen and temperature. *Respiratory Physiology e Neurobiology*. *Respiratory Physiology e Neurobiology*, v.154, p.241–251, 2006.
- SOLLID J; DE ANGELIS P; GUNDERSEN K; NILSSON GE. Hypoxia induces adaptive and reversible gross morphological changes in crucian carp gills. *J. Exp. Biol.*, n.206, p.3667-3673, 2003.
- SOUZA, W.; HADDAD, A.; SESSO, A.; ATTIAS, M.; FARINA, M.; MEIRELLES, M. N.; SILVEIRA, M.; BENCHIMAL, M.; SOARES, M. J.; BARTH, O. M.; MACHADO, R. D.; SOUTO-PADRÓN, T. *Técnicas Básicas de Microscopia Eletrônica Aplicadas às Ciências Biológicas*. Sociedade Brasileira de Microscopia Eletrônica. 179pp. 1998.
- SPERRY, D. G. e WASSERSUG, R. J. A Proposed Function for Microridges on Epithelial Cells. *The Anatomical Record*, v.185, p.253-258, 1974.
- STEINBERG, C. E. W.; KAMARA, S.; PROKHOTSKAYA, V. Y.; MANUSADZIANAS, L.; KARASYOVA, T. A.; TIMOFEYEV, M. A.; JIE, Z.; PAUL, A.; MEINELT, T. FARJALLA, V. F. MATSUO, A. Y. O.; BURNISON, B. K.; MENZEL, R. Special review-Dissolved humic substances – ecological driving forces from the individual to the ecosystem level? *Freshwater Biology*, v.51, p.1189–1210, 2006.
- VAL, A. L. e ALMEIDA-VAL, V. M. F. *Zoophysiology: Vol32-Fishes of the Amazon and Their Environment - Physiological and Biochemical Aspects*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 2226pp, 1995.

- WENDELAR-BONGA, S. E. The Stress Response in Fish. *Physiology Review*, v.77, p.591-625, 1997.
- WEST, J. B. *Fisiologia Respiratória Moderna*, 5ª ed - Ed. Manole, São Paulo, 5ª Ed., 178pp, 1996.
- WILKIE, M. P. Mechanisms of ammonia excretion across fish gills. *Comparative Biochemistry Physiology A*, v.118, p.39-50, 1997.
- WRIGHT, D. E. Morphology of the gill epithelium of the Lungfish, *Lepidosiren paradoxa*. *Cell and Tissue Research*, v.153, n.3, 1974.
- WOOD, C. M. Ammonia and urea metabolism and excretion. In *The Physiology of Fishes* (ed. D. H. Evans), pp. 379-425. Boca Raton: CRC Press. 1993.
- WOOD, C. M. Toxic responses of the gill. In *Target Organ Toxicity in Marine and Freshwater Teleosts*. Edited by D. Schlenck e W.H. Benson. v. 1, pp. 1-89, 2001.
- WOOD, C. M.; MATSUO, A. Y. O.; WILSON, R. W.; GONZALEZ, R. J.; PATRICK, M. L.; PLAYLE, R. C.; VAL, A. L. Protection by natural blackwater against disturbances in ion fluxes caused by low pH exposure in freshwater stingrays endemic to the Rio Negro. *Physiological and Biochemical Zoology*, v.76, p.12-27, 2003.

8. APÊNDICES

8.1. Apêndice I – Licença para coleta e transporte

	INSTITUTO BRAS. DO MEIO AMB. E DOS REC NATURAIS RENOVAVEIS - IBAMA/ MMA GERÊNCIA EXECUTIVA DO IBAMA NO ESTADO DO AMAZONAS NÚCLEO DE RECURSOS PESQUEIROS - NRP FAX Nº (092)613-3095 - Tel.: (092) 613-3277/3094/3096/3080/3261 Rua Ministro João Gonçalves de Souza, s/n°. BR-319. Km 01 Distrito Industrial - Manaus/AM - CEP: 69.075-830

Nº DA LICENÇA	Nº REGISTRO NO IBAMA	PERÍODO DE VALIDADE	PROCESSO/DOC IBAMA Nº
15/2004	-----	22.07.2004 a 22.02.2005	02005.000449/04-14

OBJETO:		FAVORECIDO	
X	CAPTURA E/OU COLETA DE ANIMAIS SILVESTRE / MATERIAL ZOOLOGICO	--	ZOOLOGICO
X	TRANSPORTE DE ANIMAIS SILVESTRES / MATERIAL ZOOLOGICO	X	INSTITUIÇÃO CIENTIFICA
--	COLETA E TRANSPORTE DE MATERIAL BOTANICO (PESQUISA CIENTIFICA)	X	PESQUISADOR
--	TRANSPORTE DE PRODUTOS E SUB-PRODUTOS DA FAUNA	--	EXPOSITOR / CONCURSO
--	EXPOSIÇÃO E / OU CONCURSO DE ANIMAIS SILVESTRES	--	CRIDOURO COMERCIAL
--	COLETA E TRANSPORTE DE SOLO (PESQUISA DE MICROORGANISMOS)	--	CRIDOURO CIENTIFICO
--	AMOSTRAS DE MADEIRA		OUTROS (especificar): EMPRESA

FAVORECIDO – ESPECIFICAÇÃO: Universidade Federal do Amazonas (UFAM) – Projeto “Avaliação multidisciplinar para a implementação de um sistema de manejo de lagos visando à conservação do pirarucu (*Arapaima gigas*) em ambientes naturais do Estado do Amazonas”.

NOME: Izeni Pires Farias

ENDEREÇO: Universidade Federal do Amazonas - UFAM, Instituto de Ciências Biológicas, Departamento de Biologia, Av. Gen. Rodrigo Otávio Jordão Ramos, 3000 CEP 69.077-000, Manaus - AM.

RESPONSÁVEIS PELA EXPEDIÇÃO NO CASO DE COLETA: Izeni Pires Farias

TRANSPORTADOR: Izeni Pires Farias

MEIO DE TRANSPORTE: Fluvial.

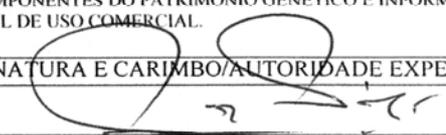
PROCEDÊNCIA/LOCAL COLETA/LOCAL PESQUISA: Lagos Jacaré e Cururu (Manacapuru), Lagos Arumã, Paricatuba, Aiapuá (Purus), Juruá (Carauari).

DESTINO: Laboratório de Citologia/UFAM (Escamas e Brânquias), Laboratório de Tecnologia do Pescado/UFAM (Exemplares Inteiros) e Laboratório de Genética Animal/UFAM (Tecido Muscular).

QUANT. (TIPO)	NOME CIENTIFICO	NOME COMUM
30 exemplares para cada localidade.*	<i>Arapaima gigas</i>	Pirarucu

* Escamas (30), tecido muscular (30), brânquias (6) e 5 indivíduos inteiros.

OBS. ESTA LICENÇA NÃO AUTORIZA O USO DO MATERIAL BIOLÓGICO PARA ACESSAR INFORMAÇÕES DE ORIGEM GENÉTICA, CONTIDA NO TODO OU PARTES DE ESPÉCIME VEGETAL, FÚNGICO, MICROBIANO OU ANIMAL; SUBSTÂNCIAS PROVENIENTES DO METABOLISMO DESSES SERES VIVOS E DE EXTRATOS OBTIDOS DESSES ORGANISMOS VIVOS OU MORTOS, ENCONTRADOS EM CONDIÇÕES *IN SITU*, INCLUSIVE DOMESTICADA, OU MANTIDOS EM COLEÇÕES *EX SITU*, DESDE QUE COLETADOS EM CONDIÇÕES *IN SITU*, NO TERRITÓRIO NACIONAL, NA PLATAFORMA CONTINENTAL OU NA ZONA ECONÔMICA EXCLUSIVA, VISANDO ATIVIDADE EXPLORATÓRIA PARA IDENTIFICAR COMPONENTES DO PATRIMÔNIO GENÉTICO E INFORMAÇÃO SOBRE O CONHECIMENTO TRADICIONAL ASSOCIADO COM POTENCIAL DE USO COMERCIAL.

LOCAL E DATA DA EMISSÃO	ASSINATURA E CARIMBO/AUTORIDADE EXPEDIDOR
Manaus, 22.07.04.	 HENRIQUE DOS SANTOS PEREIRA Gerente Executivo do IBAMA/AM

- ESTA LICENÇA NÃO AUTORIZA:
- 1. CAPTURA/COLETA/TRANSPORTE DE ESPÉCIES AMEAÇADAS DE EXTINÇÃO, SALVO QUANDO CONSTANTE DE PROJETO ESPECÍFICO APROVADO;
- 2. CAPTURA/COLETA/TRANSPORTE DE MATERIAL BIOLÓGICO NAS ÁREAS DE INFLUÊNCIA DE EMPREENDIMENTOS SUJEITOS AO LICENCIAMENTO AMBIENTAL, CONFORME RESOLUÇÃO DO CONAMA DE Nº 237 DE 19/12/97, SALVO QUANDO ESPECIFICADO;
- 3. CAPTURA/COLETA/TRANSPORTE DE FAUNA E FLORA EM ÁREA DE DOMÍNIO PRIVADO, SEM O CONSENTIMENTO EXPRESSO OU TÁCITO DO PROPRIETÁRIO NOS TERMOS DOS ARTIGOS 594, 596, 597 E 598 DO CÓDIGO CIVIL;
- 4. CAPTURA/COLETA/TRANSPORTE DE FAUNA E FLORA EM UNIDADES DE CONSERVAÇÃO FEDERAIS, ESTADUAIS, DISTRITAIS OU MUNICIPAIS, SALVO QUANDO ACOMPANHADO DO CONSENTIMENTO DO ÓRGÃO ADMINISTRADOR COMPETENTE;
- 5. CAPTURA/COLETA/TRANSPORTE DE FAUNA E FLORA EM TERRAS INDÍGENAS;
- 6. EXPORTAÇÃO DE ANIMAIS VIVOS OU MATERIAIS ZOOLOGICOS.
- SÃO ISENTAS DE COBRANÇA DE TAXA (RECOLHIMENTO DE DUA), INSTITUIÇÕES CIENTÍFICAS, (PESQUISADORES E ZOOLOGICOS PÚBLICOS).
- VÁLIDA SOMENTE SEM EMENDAS OU RASURAS.