

Caracterização morfológica e histoquímica da brânquia do teleósteo curimatã-pacu, *Prochilodus argenteus* (Pisces, Prochilodontidae) da região da represa de Três Marias, rio São Francisco, Minas Gerais

PROCÓPIO, M. S.¹; RIBEIRO, H. J.¹; MORO, L.² (*); SATO, Y.³; RIZZO, E.¹ CORRÊA-JÚNIOR, J. D.¹

1 Departamento de Morfologia - Instituto de Ciências Biológicas - Universidade Federal de Minas Gerais -

2. Departamento de Patologia Geral – Universidade Federal de Minas Gerais

3. Estação de Hidrobiologia e Piscicultura de Três Marias/CODEVASF.

Endereço para correspondência: correajr@icb.ufmg.br

RESUMO: A brânquia dos teleósteos possui várias funções relacionadas às trocas gasosas, excreção de compostos nitrogenados, regulação iônica e equilíbrio ácido-base. Devido à sua localização anatômica e ao contato direto com o meio ambiente, as brânquias têm sido utilizadas como um bioindicador histológico de alterações ambientais. A espécie curimatã-pacu, *Prochilodus argenteus* é uma espécie de grande valor econômico no rio São Francisco representando 50 % do pescado da região. Entretanto, para que a histologia do epitélio branquial dessa espécie possa ser utilizada como bioindicador, é necessária a caracterização prévia de sua estrutura morfológica normal. Com esse objetivo, espécimes de *P. argenteus* foram coletados no rio São Francisco. Fragmentos das brânquias foram dissecados, fixados em Bouin e processados para inclusão em parafina. Secções de 5 µm foram corados com HE e submetidos às técnicas histoquímicas de *Alcian Blue* (pH 1,0), *Alcian Blue* (pH 2,5) e ÁCIDO periódico de Schiff (PAS) para a análise estrutural e caracterização química dos carboidratos. Em *P. argenteus* os arcos branquiais apresentaram em sua estrutura tecidual: cartilagem hialina, tecido ósseo e tecido muscular liso revestido por epitélio mucoso. Os filamentos têm laterais dilatadas unidas as quais se conectam com lamelas dispostas transversalmente. Seu epitélio é constituído principalmente de células pavimentosas, células cloreto e células mucosas. As características morfológicas normais e alteradas são apresentadas e relacionadas com as possíveis aplicações em estudos de impacto ambiental.

Palavras chave: brânquia, *Prochilodus argenteus*, alterações morfológicas, histoquímica, histologia.

INTRODUÇÃO: As brânquias dos teleósteos desempenham várias funções, tais como: trocas gasosas, regulação iônica, controle ácido-base e excreção de metabólitos nitrogenados (EVANS *et al*, 2005; EVANS, 1987). Essas funções são exercidas principalmente pelas células presentes no seu epitélio branquial. Essas células são fundamentais no conjunto de respostas fisiológicas necessárias à manutenção da homeostase do organismo frente às alterações ambientais, principalmente por estarem em contato direto com o meio ambiente (EVANS *et al*, 2005; ARELLANO *et al*, 2003). Como consequência, o epitélio branquial tem sido utilizado como modelo em vários estudos (realizados em laboratório ou em

ambientes naturais) para avaliar a sua potencial utilização na avaliação de xenobióticos bem como na determinação da qualidade do ambiente aquático. Alberto (2004) aplicou este conceito na análise do epitélio branquial do *Astianax fasciatus* proveniente de dois trechos do rio Camanducaia, São Paulo, observando alterações provocadas pelo esgoto doméstico. Erkmen (2000) demonstrou o efeito da salinidade em dois afluentes do rio Kizilirmak na Turquia utilizando a espécie *Capoeta tinca*. Em laboratório, ensaios com pesticidas como endossulfan (CAPKIN *et al*, 2006) e deltametrina, (CENGIZ *et al*, 2005; CENGIZ *et al*, 2006), metais como o alumínio em diferentes pHs (JAGOE *et al*, 1997) e metais pesados como cobre (MAZON *et al*, 2002) estão sendo amplamente utilizados com o objetivo de se tentar especificar a ação de cada composto nas células do epitélio branquial. Nesse são comumente encontrados três tipos celulares: as pavimentosas que aparecem em maior frequência e possuem função de trocas gasosas; as cloreto responsáveis pela regulação iônica, equilíbrio ácido-base e excreção de metabólitos nitrogenados e as mucosas, responsáveis pela produção de muco que possui função de lubrificação e bactericida (EVANS, 1997; EVANS *et al*, 2005). Contudo, para ser possível o diagnóstico de uma alteração morfológica causada por um estresse ambiental, por barramentos de hidrelétricas, herbicidas, metais pesados dentre outros, é necessária uma prévia descrição morfológica da estrutura da estrutura a ser analisada. Dessa forma, o objetivo desse trabalho é a descrição da morfologia branquial da espécie *Prochilodus argenteus* e determinar a característica dos carboidratos presentes nessa estrutura.

MATERIAIS E MÉTODOS: Espécimes de *P. argenteus* foram coletados em dois trechos do rio São Francisco, próximo à represa de Três Marias. Após a dissecação, os fragmentos das brânquias foram fixados em líquido de Bouin e descalcificados em líquido de Pereny (BANCROFT *et al*, 1996). Após o processo de desidratação em concentrações crescentes de álcool e impregnação com xilol, os fragmentos foram incluídos em parafina. Com o auxílio de um micrótomo (MICRON HM335E) foram obtidos cortes de 5µm os quais foram corados em Hematoxilina/Eosina (H&E) e submetidos às técnicas histoquímicas para a identificação de carboidratos com *Alcian Blue* em pH 1,0, *Alcian Blue* em pH 2,5 e Ácido Periódico de Schiff (PAS), segundo Bancroft (1982).

RESULTADOS E DISCUSSÃO: A brânquia da espécie *Prochilodus argenteus* possui oito pares de hemibrânquias conectadas pelo septo interbranquial. Os arcos possuem suporte de cartilagem hialina e tecido ósseo associado a uma camada transversal de tecido muscular liso e revestido por epitélio mucoso (Fig. 1A). Na inserção dos filamentos há uma arteríola aferente, um feixe nervoso, tecido muscular liso e um disco de cartilagem hialina em forma de meio círculo que emite um prolongamento ao longo do filamento (Fig. 1A). Os filamentos possuem duas regiões mais dilatadas, a parte de inserção no arco e a região distal, onde se localizam vasos aferentes e eferentes (Fig. 1B). As lamelas se inserem perpendicularmente nos filamentos, sendo maiores na parte média (Fig. 1C) diminuindo de tamanho nas duas extremidades. As lamelas internamente são compartimentalizadas pelas células pilares por onde passa o sangue, sendo externamente revestidas principalmente pelas células pavimentosas e células cloreto. O epitélio do filamento é constituído principalmente de células pavimentosas, células cloreto e células mucosas (Fig. 1D). Algumas alterações

morfológicas como proliferação interlamelar de células, infiltrados inflamatórios, descolamento de epitélio e aneurismas também foram encontradas (Fig. 1E). As marcações para glicoproteínas sulfatadas ficaram restritas às brânquias apresentaram marcação para glicoproteínas sulfatadas restritas aos discos cartilagosos (Fig. 1F). Esses também foram marcados pelas técnicas de PAS (Fig. 1G) e *Alcian Blue* pH 2,5 (Fig. 1H). Adicionalmente, os carboidratos neutros e contendo ácido siálico foram encontrados em células mucosas.

Figura 1: Fotomicrografias por microscopia de luz de fragmentos branquiais de *P. argenteus*. A. Região do arco branquial onde observam-se os filamentos branquiais (F), lamelas branquiais (cabeça de seta), arteríolas aferentes (seta), tecido muscular esquelético (asterisco) e ósseo (seta branca). B. Micrografia óptica da extremidade distal de dois filamentos. Notar a ausência das lamelas na porção lateral dos filamentos contendo vasos sanguíneos (V). C. Micrografia da região mediana de um filamento branquial onde são observados os maiores espaços interlamelares (setas). D. Micrografia da porção distal de duas lamelas. Observar a presença das células pavimentosas (seta cinza), pilares (setas verdes) e mucosas (seta preta) e a presença de hemáceas nucleadas entre as células pilares.

E. Observar alterações com aspectos típicos aneurisma (setas) e proliferação interlamelar (asteriscos). F. Região de inserção do filamento no arco. Notar o disco de cartilagem marcado em azul apontado pela seta. G. Região de inserção do filamento no arco contendo marcação para carboidratos neutros nos disco de cartilagem (setas), em células mucosas sobre as lamelas e matriz extracelular do tecido conjuntivo (em menor intensidade) H. Micrografia óptica da região de inserção do filamento no arco apresentando marcação intensa nos anéis de cartilagem (setas) e várias células mucosas distribuídas ao longo das lamelas (cabeças de seta). Para figuras A, B, C e D coloração H&E e barras: 200 μ m, 50 μ m, 50 μ m e 25 μ m respectivamente. Para figuras F, G e H Histoquímicas de Alcian Blue pH 1,0; PAS; Alcian Blue pH 2,5 e barras de 100 μ m, 100 μ m e 50 μ m respectivamente.

CONCLUSÃO: Ainda que a morfologia branquial da espécie *Prochilodus argenteus* seja semelhante à de várias espécies de teleosteos as técnicas histológicas utilizadas permitiram a caracterização histológica bem como a definição dos tipos celulares e as características dos polissacarídeos sintetizados pelas células mucosas presentes na estrutura branquial do espécime estudado. As

distribuições dos polissacarídeos obtidas através das marcações citoquímicas mostraram que estes ocorrem em quatro regiões principais nas brânquias de *P. argenteus* (no ápice lamelares, extremidades distais das lamelas, espaços interlamelares e nas estruturas cartilaginosas). Estas marcações indicam a ocorrência principal de polissacarídeos neutros e ácidos com distribuições espaciais específicas. A marcação para polissacarídeos sulfatados foi observada apenas em porções contendo cartilagem. Esse estudo demonstra a possibilidade de se utilizar a estrutura tecidual, composição celular e seus respectivos produtos de secreção das brânquias de *P. argenteus* como potencial bioindicador histológico de impactos ambientais.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALBERTO, A; CAMARGOS, A. F. M; VERANI, J. R; COSTA, O. F. T; FERNANDES, M. N. Health variables and gill morphology in the tropical fish *Astyanax fasciatus* from a sewage-contaminated river. *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, v. 61, p. 247–255, 2005.

ARELLANO, J. M; STORCH, V; SARASQUETE, C. Ultrastructural and histochemical study on gills and skin of the Senegal sole, *Solea senegalensis*. *J. Appl. Ichthyol.*, v. 20, p. 452–460, 2004.

BANCROFT, J.D; S. A.TURNER, D.R. Theory and Practice of Histological Techniques. 4th Ed. Churchill Livingstone: New York. 1996. p 315.

BANCROFT, J. D., STEVENS, A. Theory and practice of histological Techniques. 2nd Ed. Churchill Livingstone: New York.1982.

CAPKIN, E; ALTINOK, I; KARAHAN, S. Water quality and fish size affect toxicity of endosulfan, an organochlorine pesticide, to rainbow trout. *Chemosphere*, v. 64, p. 1793–1800, 2006.

CENGIZ, E. I. Gill and kidney histopathology in the freshwater fish *Cyprinus carpio* after acute exposure to deltamethrin. *Environ. Toxicol. Pharmacol.*, v. 22, p.200–204, 2006.

CENGIZ, E. I; UNLU, E. Sublethal effects of commercial deltamethrin on the structure of the gill, liver and gut tissues of mosquitofish, *Gambusia affinis*: A microscopic study. *Environ. Toxicol. Pharmacol.*,v. 21, p. 246–253, 2006.

ERKMEN, B; KOLANKAYA, D. Effects of Water Quality on Epithelial Morphology in the Gill of *Capoeta tinca* Living in Two Tributaries of Kizilirmak River, Turkey. Bulletin of. *Environ. Contam. Toxicol.*, v. 64, p. 418-425, 2000.

EVANS, D. H. The Fish Gill: Site of Action and Model for Toxic Effects of Environmental Pollutants. *Environ. Health Perspec.* Vol. 71, pp. 47-58, 1987.

Evans, D. H; Piermarini, P. M; Choe, K. P. The Multifunctional Fish Gill: Dominant Site of Gas Exchange, Osmoregulation, Acid-Base Regulation, and Excretion of Nitrogenous Waste. *Physiology Review* 85: 97–177. 2005.

Jago, C. H; Haines, T. A. Changes in Gill Morphology of Atlantic Salmon (*Salmo salar*) Smolts Due to Addition of Acid and Aluminum to Stream Water. *Environmental Pollution*, Vol. 97, No. 1 2, pp. 137- 146, 1997.

Mazon A. F; Cerqueira C. C. C; Fernandes M. N. Gill Cellular Changes Induced by Copper Exposure in the South American Tropical Freshwater Fish *Prochilodus scrofa*. *Environmental Research Section A* 88, 52- 63 (2002).