

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS RURAIS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOTECNIA**

Isadora Maria Oliveira Zavaglia

**MORFOMETRIA CUTÂNEA E BRANQUIAL DE JUVENIS DE
JUNDIÁ (*Rhamdia quelen*)**

Santa Maria, RS
2021

Isadora Maria Oliveira Zavaglia

**MORFOMETRIA CUTÂNEA E BRANQUIAL DE JUVENIS DE JUNDIÁ (*Rhamdia
quelen*)**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Zootecnia, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do título de **Mestra em Zootecnia.**

Orientador Prof. Dr. Mauro Alves da Cunha

Santa Maria, RS
2021

Zavaglia, Isadora Maria Oliveira
Morfometria cutânea e branquial de juvenis de jundiá
(Rhamdia quelen) / Isadora Maria Oliveira Zavaglia.-
2021.

54 p.; 30 cm

Orientador: Mauro Alves Da Cunha
Coorientador: Silvio Teixeira Da Costa
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa
Maria, Centro de Ciências Rurais, Programa de Pós
Graduação em Zootecnia, RS, 2021

1. Histologia 2. Morfologia 3. Jundiá 4. Células
mucosas I. Da Cunha, Mauro Alves II. Da Costa, Silvio
Teixeira III. Título.

Isadora Maria Oliveira Zavaglia

MORFOMETRIA CUTÂNEA E BRANQUIAL DE JUVENIS DE JUNDIÁ
(Rhamdia quelen)

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Zootecnia, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do título de **Mestra em Zootecnia**.

Aprovado em 11 de fevereiro de 2021:

**Mauro Alves
da Cunha**

Assinado de forma digital por Mauro Alves da Cunha
DN: cn=Mauro Alves da Cunha,
o=Universidade Federal ed Santa Maria,
ou=UFSM,
email=cunha.mauroalves@gmail.com, c=BR
Dados: 2021.03.30 14:39:31 -03'00'

Mauro Alves da Cunha, Dr. (UFSM)
(Presidente/Orientador)

**Bernardo
Baldisserotto**

Assinado de forma digital por
Bernardo Baldisserotto
Dados: 2021.03.29 14:39:13 -03'00'

Bernardo Baldisserotto, Dr. (UFSM)

Lenise Vargas Flores da Silva

Lenise Vargas Flores da Silva, Dra. (UFOPA) - Videoconferência

Santa Maria, RS
2021

DEDICATÓRIA

*Aos meus pais, meus eternos incentivadores,
dedico este trabalho.*

AGRADECIMENTOS

Este estudo é fruto de um conjunto de pessoas que dedicaram tempo, e disciplina, e sem elas, nada seria possível. Nenhum caminho na vida é traçado de forma solitária. Encontramos pessoas que agregam ao que somos e fazemos, e a elas, eu agradeço.

Agradeço **a vida**, por ter me abençoado com o poder de superação e a fé incansável de enfrentar as adversidades e buscar diariamente a realização de todos meus sonhos.

A **Deus**, por me permitir trilhar mais esse caminho tão sonhado e desejado, com momentos turbulentos, mas também incríveis, os quais me ensinam diariamente a ser um ser humano melhor.

Aos **meus pais**, meu grande pilar de sustentação, mãe Rudglai e pai Bernardo. Sou eternamente grata por compartilhar mais essa conquista junto a vocês, por tê-los presente e perto de mim e principalmente, poder retribuir todo amor, atenção e dedicação de uma vida inteira, incansável, para minha educação e felicidade. Se eu sou, é porque vocês me ensinaram a ser!

À **minha irmã**, meu porto seguro, parceira de vida, Gabriela. Por todo suporte emocional, afetivo, e toda segurança de quem sempre anda de mãos dadas comigo no caminho da vida. Mesmo longe, sempre perto.

Aos **meus avós**, Nildo e Solange, por me proporcionarem o melhor presente do mundo: suas presenças. Agradeço pela preocupação e compreensão nas minhas ausências, e por serem eternamente minha inspiração.

À minha **companheira** de vida, Michele, por ter acompanhado diariamente o desafio e a intensidade de mais essa etapa, e por ser minha maior incentivadora da língua inglesa. Obrigada por nunca ter me abandonado nas tempestades. Quem tem um farol, sabe para onde ir.

A **CAPES**, pela confiança e investimento na educação nacional. Grata pelo amparo e confiança dedicados a mim, e tantos outros estudantes que almejam o universo do ensino.

À **Universidade Federal de Santa Maria**, pela exemplar e exímia atividade no âmbito educacional, onde mesmo com todas as intempéries do atual cenário, abraça seus alunos e os projeta para o mundo. Obrigada pelos 7 anos de ensino e eternos ensinamentos que fazem parte da minha trajetória.

Ao **Programa de Pós-Graduação em Zootecnia**, pelo aprimoramento do ensino e a missão de alavancar a Zootecnia para o mundo.

À colega zootecnista e também mestra Gabriela Scherer, a quem devo eterno agradecimento pelo acolhimento, incentivo, força, confiança e suporte suficiente para que esse estudo pudesse ser realizado. Ao laboratório de Morfofisiologia Animal, **Labitex**, e a todas as meninas que colocaram a mão na massa e contribuíram imensamente para que este trabalho fosse possível. Grata por esse grupo de mulheres cientistas incríveis, e pela amizade linda que construímos, Magale, Marina, Marcelle, Valéria.

Aos grandes amigos que comigo, enfrentaram uma batalha, mas não perderam a guerra. Eterna gratidão pela efêmera, mas maravilhosa companhia, e por tantos conselhos carinhosos, Márcio Pilecco e Hanna Lima.

À professora e grande inspiração no universo monogástrico, Cátia Veiverberg, que mesmo de longe disponibilizou seu tempo para abraçar meu primeiro desespero e com muita maestria me mostrou o caminho e incentivou a não desistir.

Ao Hugo Napoleão, pelas incansáveis explicações cheias de bom humor e expressões do seu amado Pará.

Ao professor Mauro Alves da Cunha, pela recepção calorosa e a responsabilidade de assumir minha orientação em uma situação tão inesperada.

À minha banca avaliadora, Prof. Dr. Bernardo Baldisserotto e Prof. Dr^a Lenise Vargas pela disponibilidade em contribuir com seus conhecimentos para este trabalho.

Não menos importante, ao professor e orientador, Sílvio Teixeira da Costa, que com muito carinho e paciência me absorveu ao seu projeto de pesquisa e acreditou no meu potencial até mesmo quando eu duvidei. Foste o professor certo, no momento certo. Gratidão eterna por este encontro, és uma inspiração profunda do que desejo me tornar futuramente.

Agradeço a todos que de alguma maneira engrandeceram este trabalho e mais uma vez acreditaram em mim e na ciência brasileira. Agradeço a todos alunos e professores que arduamente dedicam suas vidas e abdicam de alguns prazeres para enriquecer nosso país e diversas outras vidas de sabedoria e estudo.

EPÍGRAFE

*“Você nunca cruzará o oceano se tiver medo de perder a margem de vista”
(Cristovão Colombo)*

RESUMO

MORFOMETRIA CUTÂNEA E BRANQUIAL DE JUVENIS DE JUNDIÁ (*Rhamdia quelen*)

AUTORA: Isadora Maria Oliveira Zavaglia

ORIENTADOR: Mauro Alves da Cunha

O interesse em espécies de peixes nativos tem aumentado exponencialmente nos últimos anos. O jundiá (*Rhamdia quelen*) é uma espécie que tem se destacado e recebido atenção de diversos pesquisadores e piscicultores devido ao fácil cultivo, rusticidade e bons desempenhos produtivos, porém ainda há escassez de informações morfológicas e estruturais para o máximo aproveitamento do potencial da espécie. Portanto, este estudo objetivou avaliar o perfil morfológico da estrutura epitelial e branquial de juvenis de jundiá, e como cada fase do desenvolvimento pode manifestar a expressão de células mucosas, oportunizando reconhecer a área mais representativa para futuras análises. Os peixes utilizados foram adquiridos em uma piscicultura local e aclimatados em caixas com capacidade de 30L em sistema de recirculação com parâmetros de água monitorados de acordo com a faixa ótima para a espécie. Durante o período experimental, dois grupos de peixes foram alimentados com ração comercial (37% proteína) diariamente três vezes ao dia até sua saciedade. Os grupos, composto por peixes juvenis foram avaliados de acordo com seu estágio de desenvolvimento sequencial cutâneo e branquial. O grupo de juvenis I era composto por 9 peixes com peso médio de 7,65g e comprimento de 9,18cm. O grupo de animais juvenis II também composto por 9 peixes, possuía peso médio de 28,09g, e comprimento de 16,69 cm. Ao final do período experimental, todos os animais foram anestesiados e eutanasiados por secção medular. Após, foram colhidas 6 secções de pele do lado esquerdo do peixe, sendo três secções na região dorsal e três na região ventral, além do segundo arco branquial, também do lado esquerdo. As amostras foram fixadas em formaldeído 10% e submetidas a procedimentos histológicos de rotina com coloração PAS + Alcian Blue pH 2,5 e Tricômico de Masson-Goldner. Os resultados indicaram que devido ao hábito bentônico da espécie, a região ventral é o ponto mais representativo para coleta de pele em razão da maior concentração de células mucosas encontradas. Nas brânquias, a distribuição de células mucosas permite a avaliação sanitária a partir da produção excessiva ou escassa de muco que recobre as lamelas. Os jundiás (*R. quelen*) possuem maior sensibilidade quanto a proteção imunológica proveniente das propriedades viscoelásticas da camada mucosa e da barreira epitelial.

Palavras-chave: Brânquias. Células mucosas. Epitélio. Peixe. Revestimento cutâneo.

ABSTRACT

CUTANEOUS AND GILL MORPHOMETRY IN JUVENILE SILVER CATFISH (*Rhamdia quelen*)

AUTHOR: Isadora Maria Oliveira Zavaglia
ADVISOR: Mauro Alves da Cunha

The interest in native fish species has increased exponentially in recent years. The silver catfish (*Rhamdia quelen*) is a species that has stood out and received attention from several researchers and fish farmers, due to its easy cultivation, rusticity and good productive performances, however, there is still a lack of morphological and structural information for the maximum use of the potential of the species. Therefore, this study aimed to evaluate the morphological profile of the epithelial and branchial structure of juvenile silver catfish, and how each stage of development can manifest the expression of mucous cells, making it possible to recognize the most representative area for future analyzes. The fish used in the study were purchased from a local fish farm and acclimated in boxes with a capacity of 30L in a recirculation system with water parameters monitored according to the optimum range for the species. During the experimental period, two groups of fish were fed with fish food (37% protein) daily - three times a day until their satiety. The groups, composed of juvenile fish, were evaluated according to their stage of sequential cutaneous and gill development. The group of juveniles I was composed of 9 fish with an average weight of 7.65g and a length of 9.18cm. The group of juvenile animals II, also composed of 9 fish, had an average weight of 28.09g, and a length of 16.69cm. At the end of the experimental period, all the animals were anesthetized and euthanized by spinal cord sectioning. Afterwards, 6 sections of skin were collected from the left side of the fish, three sections in the dorsal region and three in the ventral region, in addition to the second branchial arch, also on the left side. The samples were fixed in 10% formaldehyde and subjected to routine histological procedures with PAS + Alcian Blue pH 2.5 staining and Masson-Goldner Trichomium. The results indicated that due to the species' benthic habit, the ventral region is the most representative point for skin collection due to the higher concentration of mucous cells found. In the gills, the distribution of mucous cells allows for health assessment based on the excessive or scarce production of mucus that covers the lamellae. Silver catfish (*R. quelen*) have greater sensitivity in terms of immunological protection arising from the viscoelastic properties of the mucous layer and the epithelial barrier.

Keywords: Gills. Mucous cells. Epithelium. Fish. Cutaneous cover.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Fotomicrografia da secção transversal da pele de jundiá (*Rhamdia quelen*) composta por multicamadas.....17

MANUSCRITO I

Figura 1 – Representação esquemática do jundiá (*Rhamdia quelen*) e as seis secções de pele e segundo arco branquial coletados para análise morfológica:33

Figura 2 – Fotomicrografia esquemática da secção transversal da pele e das quatro medidas de espessura avaliadas no epitélio e no tecido conjuntivo da derme em juvenis de jundiá (*Rhamdia quelen*):35

Figura 3 – Representação esquemática dos parâmetros morfológicos analisados na brânquia de juvenis de jundiá (*Rhamdia quelen*):36

Figura 4 - Fotomicrografia da secção transversal da pele de juvenis de jundiá (*Rhamdia quelen*) demonstrando a diferença de espessura epitelial entre duas fases do desenvolvimento:.....39

Figura 5 - Visualização da diferença de espessura (μm) da derme composta por tecido conjuntivo e fibras colágenas subjacente ao epitélio em juvenis de jundiá (*Rhamdia quelen*):.....40

Figura 6 – Fotomicrografia da secção transversal da pele de jundiá (*Rhamdia quelen*) exemplificando a quantificação de células mucosas:42

Figura 7 – Fotomicrografia da secção transversal da pele de jundiá (*Rhamdia quelen*) exibindo células mucosas de carboidratos ácidos (azul) e neutros (magenta), dispostas no epitélio ventral de juvenis II:.....43

Figura 8 - Fotomicrografia da brânquia evidenciando o tecido conjuntivo do filamento e medidas morfológicas de lamela em juvenis de jundiá (*Rhamdia quelen*):46

LISTA DE TABELAS

MANUSCRITO I

Tabela 1 – Espessura do epitélio e do tecido conjuntivo (μm) nas seis secções analisadas em juvenis I e juvenis II de jundiá (<i>Rhamdia quelen</i>) durante dois períodos de desenvolvimento:.....	38
Tabela 2 – Porcentagem calculada a partir da contagem de células mucosas presentes no epitélio e brânquia de juvenis de jundiá (<i>Rhamdia quelen</i>) em dois períodos de desenvolvimento:.....	41
Tabela 3 – Medidas morfológicas (μm) de lamela e filamento na brânquia de juvenis de jundiá (<i>Rhamdia quelen</i>) em dois períodos do desenvolvimento:	45

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	11
2	OBJETIVOS	13
2.1	OBJETIVO GERAL	13
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	13
3	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	14
3.1	CARACTERÍSTICAS DO JUNDIÁ (<i>Rhamdia quelen</i>)	14
3.2	APARELHO BRANQUIAL	14
3.3	TEGUMENTO DE PEIXES	16
3.4	MUCOSA	18
3.5	SISTEMA IMUNOLÓGICO DE PEIXES	20
3.6	HISTOLOGIA COMO BIOMARCADOR NO DESENVOLVIMENTO CUTÂNEO E BRANQUIAL	22
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	23
4	MANUSCRITO I	27
	Histologia de células mucosas cutâneas e branquiais em juvenis de jundiá (<i>Rhamdia quelen</i>)	27
	INTRODUÇÃO	30
	MATERIAIS E MÉTODOS	32
	LOCAIS DE COLETA	34
	PROCEDIMENTOS HISTOLÓGICOS	33
	IDENTIFICAÇÃO DE CÉLULAS MUCOSAS	34
	MEDIDAS MORFOMÉTRICAS	34
	ANALISE ESTATÍSTICA	36
	RESULTADOS E DISCUSSÃO	36
	ESPESSURA DO EPITÉLIO E TECIDO CONJUNTIVO	37
	PORCENTAGEM DE CÉLULAS MUCOSAS NO EPITÉLIO E BRÂNQUIA	40
	MORFOMETRIA BRANQUIAL	44
	CONCLUSÃO	47
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	48

1 INTRODUÇÃO

Atualmente, o Brasil ocupa a 13ª posição entre os maiores produtores de carne de peixes do mundo, contribuindo com 2% da produção mundial. Diferença significativa quando comparado à líder China, que permanece no ranking de produção detendo 16% da produção mundial (FAO, 2020). Nos estados do Sul, as espécies nativas demonstram mais apreço e destaque. Dentre estas espécies está o jundiá (*Rhamdia quelen*), que no Rio Grande do Sul desperta grande interesse devido à boa adaptação às diferenças climáticas, facilidade no manejo e o bom desempenho zootécnico, e por isso são considerados promissores para criações intensivas (CORRÊIA et al., 2009).

A intensificação do cultivo exige maior atenção em relação a saúde dos peixes, já que desequilíbrios do ambiente aquático podem desencadear doenças e infecções que acarretam em perdas produtivas e econômicas (FIGUEREDO et al., 2014). Além disso, fases mais jovens apresentam maiores fragilidades como a adoção de estratégias alimentares com boa eficiência nutricional (NETO et al., 2013), fotoperíodo (FEIDEN et al., 2006) e a suscetibilidade a patógenos para proliferação de enfermidades (FAGUNDES, 2009).

Segundo Gomes et al. (2000), o cultivo do jundiá no sul do Brasil tem números crescentes devido aos bons resultados reprodutivos apresentados pela espécie, porém, os desconhecimentos de alguns parâmetros biológicos ainda são escassos na literatura, por isso inúmeras linhas de pesquisa tornam-se tão importantes no meio científico, objetivando o aprimoramento de um pacote tecnológico que impulse a produção da espécie.

O cultivo de espécies nativas é uma boa opção quando se considera que espécies invasoras podem acarretar danos ecológicos em ambientes tropicais, reduzindo a biodiversidade e possibilitando a introdução de novas enfermidades (VITULE et al., 2009).

Para que o jundiá (*R. quelen*) esteja em condições plenas de enfrentamentos imunológicos em fases iniciais, é preciso analisar seus principais mecanismos de defesa, como a pele, órgão responsável pelo intermédio entre o organismo animal e o ambiente aquático, que age como proteção física contra anormalidades químicas, físicas e biológicas (DAMASCENO et al., 2012). As brânquias, outra barreira física com importante função de osmoregulação e trocas gasosas (TORT et al., 2003).

Apesar de lenta, a insistência para adoção de novas tecnologias e investimentos de novas ferramentas com comprovação científica têm aumentado na piscicultura. As poucas informações sobre aspectos morfológicos da espécie *R. quelen* torna imprescindível a pesquisa a fim de elucidar as principais características morfológicas dos órgãos protetores destes peixes. Dessa forma, investigações dessa natureza para juvenis de jundiás durante fases em que há maior fragilidade imunológica são importantes, já que os mesmos são submetidos a recorrentes situações de estresse no ambiente aquático, como alterações na temperatura da água, existência de predadores, produtos tóxicos na água, competição por alimento e outros.

O objetivo deste trabalho é analisar o perfil morfológico do jundiá (*R. quelen*) e verificar como o desenvolvimento cutâneo e branquial ocorre durante dois diferentes momentos em fases juvenis. Além disso, como o período de crescimento pode manifestar a expressão de células mucosas no epitélio cutâneo e branquial, oportunizando reconhecer a área corporal mais representativa para futuras análises.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Descrever o desenvolvimento cutâneo e branquial em juvenis de *R. quelen* – jundiá.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar o ponto mais representativo para a coleta de amostras na pele de jundiás, objetivando a análise de células mucosas;
- Verificar o progresso estrutural cutâneo através da observação das células mucosas na pele em juvenis de *R. quelen* - jundiá;
- Verificar o progresso estrutural cutâneo através da observação da espessura cutânea em juvenis de *R. quelen* – jundiá;
- Verificar o progresso do desenvolvimento estrutural do aparelho branquial, através da observação das células mucosas em juvenis de *R. quelen* – jundiá.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 CARACTERÍSTICAS DO JUNDIÁ (*Rhamdia quelen*)

Desde que foi descrita, a sistemática do gênero *Rhamdia* é imprecisa e confusa, no entanto, Silfvergrip (1996), baseado nas características morfológicas internas desenvolveu uma extensa revisão taxonômica do gênero, onde concluiu que das 100 espécies anteriormente descritas, somente onze constituem o gênero *Rhamdia*, no qual o *R. quelen*, um peixe teleósteo, pertence a ordem dos Siluriformes e família Heptapteridae.

Os jundiás (*R. quelen*) apresentam uma variação na coloração de marrom-avermelhado claro à cinza e é caracterizado por ser um peixe de couro, isto é, sem escamas. É amplamente encontrado na América do Sul, como uma espécie nativa, completamente adaptada ao clima rigorosamente frio do inverno e por desenvolvimento satisfatório durante o verão (BALDISSEROTTO, 2009).

São animais onívoros, alimentando-se preferencialmente de pequenos peixes e crustáceos. Vivem em águas calmas e profundas, com presença de lama e areia, próximo de vegetação e da margem. Seus hábitos são noturnos, escondendo-se durante o dia atrás de pedras e buracos, e saindo à noite para captura do alimento (BALDISSEROTTO; GOMES, 2005). Junto à boca, encontram-se os barbilhões, os quais possuem a função de identificação do paladar, auxílio na localização dos alimentos e na interferência da qualidade da água (BALDISSEROTTO; RADÜNZ, 2004).

A criação e expansão do cultivo do jundiá demonstra importante aumento na região sul do Brasil, entretanto a espécie ainda não tem seu potencial bem explorado (GOMES et al., 2000). Há ainda, indisponibilidade de informações morfológicas suficientes para melhor entendimento e aproveitamento da espécie.

3.2 APARELHO BRANQUIAL

Diferente dos animais terrestres, animais aquáticos estão em constante e direto contato com desafios biológicos em seu meio, por isso as brânquias são descritas na literatura como um órgão-alvo de extrema importância. Além das funções vitais, respiratórias e osmóticas, as brânquias são a primeira barreira física de defesa do

peixe, e por isso distúrbios respiratórios e desequilíbrio eletrolítico são comumente associados a presença de alterações morfológicas (FLORES-LOPES; THOMAZ, 2011).

As brânquias são constituídas por um tecido mucoso multifuncional, ricamente vascularizado que possuem funcionamento semelhante aos sacos alveolares nos pulmões de mamíferos. A função básica dos filamentos, em especial das lamelas, é a troca gasosa ativa ou na forma de difusão (oxigênio e dióxido de carbono), ionoregulação ativa com o objetivo de manter o equilíbrio osmótico, controle da hemodinâmica através da vasoconstrição e vasodilatação e eliminação de resíduos nitrogenados (PETERSON, 2015).

Em peixes teleósteos, isto é, peixes com esqueleto ósseo, o aparelho branquial está distribuído em quatro arcos branquiais em ambos os lados do animal, ramificados em filamentos e lamelas. Os filamentos ficam projetados e conectados aos arcos, regularmente espaçados, sustentados internamente por tecido conjuntivo que inicia no arco e se estende por toda extensão do filamento, além de fornecer sustentação lamelar e estabelecer a osmorregulação. As lamelas estão dispostas regularmente espaçadas perpendicularmente ao filamento, permitindo que o fluxo de água seja facilitado e promovendo maior área de superfície respiratória. A estrutura celular dos filamentos e lamelas é definida por células escamosas, sendo as mais abundantes, e células secretoras de muco (WILSON; LAURENT, 2002a).

O tecido branquial possui populações linfocíticas numerosas e bem definidas, como a identificação de células B, plasmócitos e macrófagos, tornando as brânquias reconhecidas como o órgão primário envolvido na produção de anticorpos (DOS SANTOS et al., 2001). Quando os patógenos são identificados, os macrófagos podem assumir um posicionamento intraepitelial interagindo com as imunoglobulinas (Ig), especialmente com a IgM, e atuam como linha de defesa contra antígenos solúveis, obtendo resposta imunológica relativamente rápida. As imunoglobulinas envolvidas ainda não são bem caracterizadas, mas já foram identificadas em trutas e bagres a presença de IgD, IgT e IgM como principais atuantes na resposta imune imediata frente a infecções patógenas no ambiente branquial (PARRA; REYES-LOPEZ; TORT, 2015).

As brânquias servem como ótimo indicador de poluentes ou ações estressantes na água, pois formam mais da metade de toda superfície corporal e facilmente apresentam alterações em sua estrutura celular (CENGIZ, 2006).

3.3 TEGUMENTO DE PEIXES

Por viver em um ambiente oportuno a alterações biológicas, a pele é um fator chave em relação à defesa de peixes, isto é, ela participa do primeiro contato do animal com os microrganismos presentes no ambiente aquático. Além disso, a pele interage de maneira interessante com a resposta imunológica que os peixes desenvolvem frente um agente estressor, além de participarem do processo de homeostase (NIGAM et al, 2012).

A pele é o tecido que recobre todo o peixe, e possui a maior superfície de contato com o ambiente externo e microrganismos dispostos nele. Apesar de possuir ampla variação entre espécies. Peterson (2015) afirma que suas características funcionais, estruturais e celulares possuem certa similaridade, e mantêm-se conservadas durante o processo evolutivo. A organização estrutural da pele do peixe é passível de comparação com a de mamíferos, diferenciando-se somente por possuir elevado número de células calciformes e não ser queratinizado, fato predominante em animais terrestres (RAKERS et al. 2010).

A pele dos peixes é classificada como uma multicamada dividida em três partes: a camada mucosa, a epiderme e a derme. O número de células que compõem as camadas pode variar de acordo com a espécie e o local observado. A camada mais externa, a epiderme, é caracterizada por um epitélio escamoso estratificado, rico em células epiteliais escamosas, algumas células mucosas e células de cloreto, além de diversos outros tipos de células secretoras, sensoriais e de defesa, como leucócitos (HENRIKSON; GEDEON MATOLTSY, 1967a).

O epitélio pode ser subdividido em três estratos devido à disposição das células em cada região. No estrato mais superficial, encontram-se as células escamosas, as mais numerosas na composição da epiderme, enquanto no estrato intermediário estão as células calciformes, secretoras de muco juntamente com outros tipos de células com diferentes e funções. Na porção mais interna, ainda na epiderme, o estrato basal é onde há forte ligação da epiderme à derme (ESTEBAN; CEREZUELA, 2015).

Abaixo da epiderme encontra-se a derme, esta, na maioria das espécies, geralmente é subdividida em duas camadas, sendo a superior e mais externa chamada de estrato esponjoso, formada por tecido conjuntivo frouxo. A camada mais

interna e próxima ao tecido muscular é formada por tecido conjuntivo denso com predominância de fibras colágenas ricamente vascularizadas, chamada estrato compacto. A derme e a epiderme são separadas por uma membrana basal (ELLIOTT, 2011).

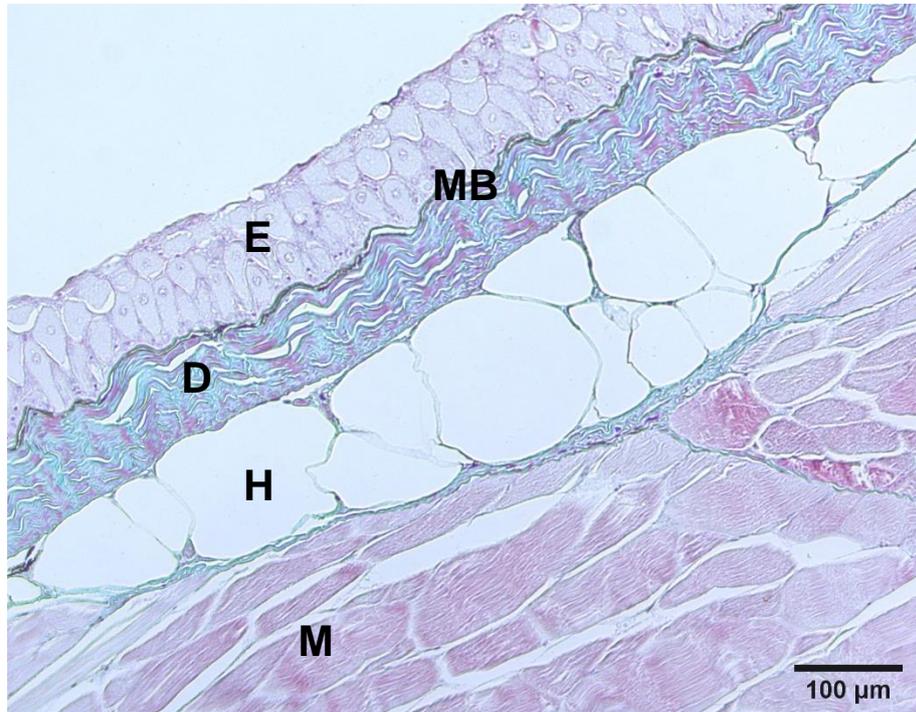


Figura 1. Fotomicrografia da secção transversal da pele de jundiá (*Rhamdia quelen*) composta por multicamadas: Epiderme (E) estratificada pavimentosa composta por três estratos celulares; membrana basal (MB) como linha divisória com a derme; derme (D) composta por tecido conjuntivo frouxo e compacto; hipoderme (H) com aparecimento de adipócitos e o tecido muscular estriado (M). Coloração histológica Tricômico de Masson-Goldner em objetiva 10x.

As células epiteliais possuem microvilosidades com a função de adesão do muco produzido na superfície externa da epiderme e também a capacidade de fagocitar e eliminar patógenos e materiais estranhos que entram em contato com o tegumento, conseqüentemente ocorre descamação dessas células para a produção de novas (ÅSBAKK, 2001). Essas células estão dispostas numerosamente na camada mais superficial da epiderme, e geralmente possuem tamanho inferior comparado às outras células que compõem a epiderme, ainda assim, podem variar de tamanho de acordo com sua localização dentro da camada.

Células mucosas assumem um posicionamento basal no epitélio, conforme deslocam-se entre as camadas em direção à superfície, seu tamanho tende a aumentar significativamente para a excreção do muco na superfície externa do peixe (HENRIKSON; MATOLTSY, 1968). Já as células de cloreto, ricas em mitocôndrias e

amplamente distribuídas na superfície lamelar, são responsáveis pela secreção e absorção de íons (PEREIRA, B.F.; CAETANO, F. H., 2009).

Condições estressantes podem interferir diretamente na característica celular da pele. Na maioria dos estudos realizados, os danos causados são contabilizados através de metodologias baseadas em níveis de cortisol sanguíneo, porém nem sempre os agentes estressores atingem ou modificam esses níveis (BERTOTTO et al., 2010). Vatsos et al. (2010) apresentam estudos de peixes submetidos a condições de hipóxia e diferentes níveis de nitrato, isto é, ambiente estressor para os peixes, e demonstram uma direta relação com o aumento da produção de células mucosas na epiderme.

Um exemplo recente e interessante, sobre a pele de peixes, tem sido aplicado nas relações humanas em âmbito mundial, como um método inovador de tratamento intensivo para pacientes vítimas de queimaduras, utilizando pele de tilápias advinda da comercialização intensiva. Segundo pesquisas brasileiras conduzidas por Costa et al. (2019), os resultados mostram-se promissores, demonstrando que a pele, por conter grande quantidade de colágeno, permite uma melhor e mais rápida cicatrização, aderência e não causa risco eminente de contaminação.

3.4 MUCOSA

O ambiente aquático é reconhecidamente desafiador, e os peixes estão em constante contato com inúmeros patógenos que podem comprometer sua saúde. As barreiras primárias, como brânquias, pele e trato gastrintestinal são inicialmente as primeiras a entrarem em contato com o ambiente externo, exigindo mecanismos de defesa eficientes com ação fisiológica que forneçam barreiras física e química para evitar o acometimento de doenças, pois mudanças repentinas nos parâmetros da qualidade de água como temperatura, salinidade, oxigênio dissolvido, níveis de amônia, nitrito, nitrato causam maior suscetibilidade dos animais (SUNDH; SUNDELL, 2015).

Ainda, manejos inadequados podem comprometer a saúde dos peixes devido ao estresse que provocam, assim como altas densidades, transporte e alimentação não balanceada também podem contribuir para a fragilidade imunológica do animal e permitir a suscetibilidade à diversas doenças. Nesse aspecto, o muco é o responsável por cobrir a maior parte da superfície corporal do peixe e agir como a primeira e mais

eficiente forma de defesa do corpo contra o meio. É então, amplamente caracterizado como uma secreção viscosa e aderente, sintetizada por células especializadas encontradas e dispostas no epitélio, denominadas caliciformes, as quais normalmente revestem todos os órgãos em contato com o ambiente externo, como afirmam Bansil; Turner (2006), mas também por células de cloreto ou ricas em mitocôndrias localizadas no sistema respiratório (ESTEBAN; CERZUELA, 2015).

O muco é composto majoritariamente por água (90-95%), mas também contém proteínas que desempenham papel imunológico, como lisozimas e imunoglobulinas, o que atribui a característica viscosa de gel. Além disso, é continuamente produzido, tendo sua camada renovada por células caliciformes, de cloreto ou saculiforme localizadas no epitélio que permitem a eliminação de patógenos antes do contato com o tecido epitelial (CONE, 2009).

Dentre os componentes do muco, o mais importante e funcional é encontrado na concentração entre 1 a 5% da composição, as glicoproteínas, formadas por proteínas de elevada massa molecular chamadas mucinas, responsáveis pelas características físicas do muco (BANSIL; TURNER, 2018). A capacidade da mucina - de conferir ao muco uma característica de gel - é dependente da sua atividade de glicosilação (processo primordial para proteínas secretórias), isto é, a adição de uma cadeia de carboidratos a uma proteína até a obtenção de uma glicoproteína, e da capacidade de formação de estruturas poliméricas através de monômeros. (LANG et al., 2016).

Fatores endógenos e exógenos podem alterar as células mucosas especializadas e também a composição do muco em diferentes espécies (ESTEBAN 2012). Além disso, analisando níveis de cortisol, estudos pioneiros afirmam que a quantidade de muco em animais submetidos ao estresse é superior a animais não estressados (SHEPHARD, 1994).

É possível encontrar camada de muco presente em vários sistemas importantes para o funcionamento vital animal, como o sistema respiratório, digestivo, reprodutivo e até mesmo ocular, exercendo função de lubrificação, trocas seletivas de nutrientes com o meio e osmorregulação (SALINAS, 2015).

O entendimento das múltiplas funções, descrição dos componentes, atuação, interação do hospedeiro com o agente patógeno, via de funcionamento e a importância que o muco opera em teleósteos frente ao um ambiente biologicamente desafiador, permite inferir o quanto a elucidação desse conhecimento pode permitir a

prevenção de doenças frequentemente presentes na piscicultura e facilitar o monitoramento do ambiente aquático (REVERTER et al., 2018).

3.5 SISTEMA IMUNOLÓGICO DE PEIXES

As barreiras físicas podem não ser suficientemente protetivas contra patógeno, caso o animal esteja sob condições de vulnerabilidade; para isso, o sistema imunológico é rapidamente acionado com o objetivo de reconhecer o material estranho invasor, neutralizar, metabolizar e eliminar mais rapidamente, a fim de garantir a saúde do peixe. Caso o primeiro recurso de defesa seja insuficiente, e haja a invasão de um patógeno no organismo que possa colocar em risco a vida do animal, o sistema imune dispõe de uma imensa e variada organização celular sanguínea para o combate do antígeno em questão (PRESS, 1999).

A pele, as brânquias e o muco fazem parte desse conjunto de defesas físicas do organismo para evitar as doenças disponíveis no ambiente aquático. Ainda assim, é necessário um sistema imunológico eficiente para garantir resistência aos peixes. De fato, o sistema imune já foi bem elucidado por inúmeros estudos, sendo classificado em dois sistemas imunes gerais. O inato conhecido por ser inespecífico; e o adquirido por ser específico (FEARON et al., 1996). As respostas imunológicas funcionam de forma sistemática, isto é, acontecem em uma sequência de eventos e permitem ao organismo a determinação da origem infecciosa para uma posterior reação combatente aos patógenos.

O sistema inato é uma característica herdada por ser determinado a partir de uma ordem evolucionária, e está presente em vertebrados e invertebrados. É o sistema mais imediato perante uma infecção, inespecífico a respeito dos antígenos e sem desenvolvimento de memória. Por ser a primeira linha de enfrentamento contra patógenos é de extrema importância. Em peixes, a resposta inata é ainda mais importante pois comparada à resposta adquirida, é considerada rápida e independente, enquanto a adquirida é retratada como lenta, devido as características pecilotérmicas do peixe e a demora de reação no organismo (MAGNADÓTTIR, 2006).

Os principais componentes celulares do sistema sanguíneo que participam do sistema imune são trombócitos (equivalentes às plaquetas em mamíferos), eritrócitos e leucócitos, que se subdividem em linfócitos, monócitos, eosinófilos, neutrófilos e basófilos, dependendo da estrutura celular granular ou agranular.

Os linfócitos estão diretamente envolvidos na produção de anticorpos no sistema específico, assim como responsáveis pela resposta humoral e celular. Seu principal meio de combate é pela liberação de citocinas. Monócitos fazem fagocitose, também chamados de macrófagos quando deslocados do sangue para os tecidos, possuem capacidade fagocitária e resposta inflamatória superior aos monócitos. Eosinófilos são células associadas a processos inflamatórios relacionados a parasitas e patógenos. Neutrófilos agem na defesa e inflamação aguda, com rápido e imediato deslocamento ao foco da infestação com ação fagocítica (FERNÁNDEZ; BLAS, 2002). Por fim, segundo Tavares Dias e Moraes (2004), os basófilos ainda não são bem elucidados na literatura, mas acredita-se que são intimamente responsáveis em processos alérgicos.

Os linfócitos B e T, principais mecanismos da defesa específica são os responsáveis por identificar o patógeno invasor e produzir anticorpos mais adequados para o seu combate. O procedimento de reconhecimento da resposta imune adaptativa é precedido da inata, e em teleósteos, o período de duração pode durar até doze semanas (MAGNADOTTIR, 2010).

A principal função dos linfócitos B é a produção de anticorpos, também conhecidos como imunoglobulinas, constituídas por cadeias pesadas semelhantes e não variáveis, que dão similaridade e as torna isótopos. O que difere são as cadeias leves e variáveis de uma região, caracterizando especificidade de cada Ig. Em particular, peixes teleósteos são capazes de apresentar três isotipos de Ig diferentes na superfície das células B para a reação contra os antígenos e defesa do organismo, são elas: IgM, IgT e IgD (PARRA; REYES-LOPEZ; TORT, 2015).

Assim que o sistema inato reconhece e inicia a resposta imune contra os antígenos invasores, imediatamente as células apresentadoras de antígeno (APC's), em sua maioria macrófagos, células dendríticas e linfócitos B, fagocitam o microrganismo invasor em tamanho menor e expõem partes na membrana celular. Após o reconhecimento, a célula T se diferencia e multiplica-se em células de memória e células efetoras, responsáveis pela liberação de citocinas para posterior destruição do antígeno invasor (BILLER-TAKAHASHI; URBINATI, 2014).

As imunoglobulinas são secretadas pelos linfócitos B, onde são reconhecidas por possuírem diversas proteínas conectadas ao redor da membrana, chamadas anticorpos. Esses anticorpos possuem a finalidade de identificar os antígenos, ligados aos organismos invasores e rapidamente ativar o sistema. Os linfócitos B se

multiplicam e diferenciam-se em plasmócitos e células de memória com o intuito de liberar maior número possível de anticorpos da célula no organismo para a fagocitose do patógeno e para produzir novas células que permanecerão com os anticorpos aderidos à membrana para futuramente repetir o mesmo ciclo.

3.6 HISTOLOGIA COMO BIOMARCADOR NO DESENVOLVIMENTO CUTÂNEO E BRANQUIAL

Observando a literatura disponível, é possível inserir que todos os mecanismos de defesa dos peixes respondem imediatamente a qualquer tipo de anormalidade no ambiente aquático, e por isso, os estudos histológicos tornaram-se essenciais e têm sido utilizados como biomarcadores na busca pela avaliação sanitária dos animais. As análises histológicas são consideradas como uma ferramenta útil para indicar os efeitos letais ou crônicos que poluentes na água ou agentes estressores podem causar nos peixes. Bernet et al. (1999). Estudos anteriores, que testaram variações de pH e concentrações de Ca^+ e Mg^{2+} na água, demonstraram que o aparecimento de células mucosas no epitélio corporal (cabeça, tronco e cauda) em fases jovens ocorre 6h pós eclosão, enquanto nas brânquias apresenta maior aumento 48 horas após a eclosão, distribuídas na região branquial, objetivando a proteção do epitélio branquial (SILVA, 2006).

Em virtude disso, é possível notar o início de uma organização celular na fase larval, que tende a se reorganizar conforme o crescimento do peixe e alterar a distribuição das células mucosas epiteliais conforme os desafios patógenos são impostos. Durante as fases de desenvolvimento de teleósteos, o perfil estrutural de células mucosas adapta-se conforme as diferenciações e desafios ambientais exigem. A quantidade de células e sua distribuição em diferentes regiões do corpo tendem a variar de espécie para espécie de acordo com os hábitos que cada uma tem por característica (HENRIKSON; MATOLTSY, 1968).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ÅSBAKK, K. **Elimination of foreign material by epidermal malpighian cells during wound healing in fish skin.** Journal of Fish Biology. v. 58. n. 4. p. 953–966. 2001.
- BALDISSEROTTO, B.; RADÜNZ NETO, J. **Criação do jundiá.** Santa Maria: UFSM,. 232p. 2004.
- BALDISSEROTTO, B.; GOMES, L.C. **Espécies nativas para piscicultura no Brasil.** Santa Maria: UFSM. 470p. 2005.
- BALDISSEROTTO, B. **Fisiologia de Peixes Aplicada à Piscicultura.** Santa Maria: Editora UFSM, 2009. 349 p.
- BANSIL, R.; TURNER, B. S. **Mucin structure, aggregation, physiological functions and biomedical applications.** Current Opinion in Colloid and Interface Science. v. 11. n. 2–3. p. 164–170. 2006.
- BANSIL, R.; TURNER, B. S. **The biology of mucus : Composition , synthesis and organization.** Advanced Drug Delivery Reviews. v. 124. p. 3–15. 2018.
- BERNET, D. et al. **Histopathology in fish: proposal for a protocol to assess aquatic pollution.** Journal of Fish Diseases. v. 22. p. 25–34. 1999.
- BERTOTTO, D. et al. **Alternative matrices for cortisol measurement in fish.** Aquaculture Research, v. 41, n. 8, p. 1261-1267, 2010
- BILLER-TAKAHASHI, J. D.; URBINATI, E. C. **Fish immunology. The modification and manipulation of the innate immune system: Brazilian studies.** Anais da Academia Brasileira de Ciências. v. 86. n. 3. p. 1483–1495. 2014.
- CENGIZ, E. I. **Gill and kidney histopathology in the freshwater fish *Cyprinus carpio* after acute exposure to deltamethrin.** Environmental Toxicology and Pharmacology, v. 22, n. 2, p. 200-204, 2006.
- CONE, R. A. **Barrier properties of mucus.** Advanced Drug Delivery Reviews. v. 61, n. 2. p. 75–85. 2009.
- CORRÊIA, V. et al. **Crescimento de jundiá e carpa húngara criados em sistema de recirculação de água.** Ciência Rural, v. 39, n. 5, p. 1533-1539, 2009.
- COSTA, B. A. et al. **Use of Tilapia Skin as a Xenograft for Pediatric Burn Treatment: A Case Report.** Journal of Burn Care and Research. v. 40. n. 5. p. 714–717. 2019.

DAMASCENO, E. M. et al. **Morphology of the epidermis of the Neotropical Catfish *Pimelodella lateristriga* (Lichtenstein, 1823) with emphasis in club cells.** PloS one, v. 7, n. 11, p. e50255, 2012.

DOS SANTOS, N. M. S. et al. **The gill is a major organ for antibody secreting cell production following direct immersion of sea bass (*Dicentrarchus labrax*, L.) in a *Photobacterium damsela* ssp. *piscicida* bacterin: An ontogenetic study.** Fish and Shellfish Immunology. v. 11. n. 1. p. 65–74. 2001.

ELLIOTT, D. G. **The skin | Functional Morphology of the Integumentary System in Fishes.** Elsevier Inc. v. 1. 2011.

ESTEBAN, M. A. **An Overview of the Immunological Defenses in Fish Skin.** ISRN Immunology. p. 1–29. 2012.

ESTEBAN, M. A.; CERZUELA, R. **Fish mucosal immunity: skin.** In: Mucosal health in aquaculture. Academic Press, 2015. p. 67-92.

FAGUNDES, M. **Estudos fisiológicos e metabólicos do estresse de manejo do pintado (*Pseudoplatystoma corruscans*).** Tese (Doutorado em Aquicultura), Centro de Aquicultura, Universidade Estadual Paulista Jaboticabal, SP. 2009, 139 p.

FAO. **The state of world fisheries and aquaculture 2020. Sustainability in action.** Food and Agriculture Organization of the United Nations, 2020

FEARON, D. T. et al. **The Instructive Role of Innate Immunity in the Acquired Immune Response.** Science. v. 272. p. 50–54. 1996.

FEIDEN, A. et al. **Desenvolvimento de larvas de *Steindachneridion* sp. em diferentes condições de refúgio e luminosidade.** Pesquisa Agropecuária Brasileira, v. 41, n. 1, p. 133-137, 2006.

FERNÁNDEZ, A. B.; BLAS, I. DE. **El sistema inmune de los teleósteos (I): Células y órganos.** AquaTIC. Revista Científica Internacional de Acuicultura en Español. v. 0. n. 16. 2002.

FIGUEREDO, A. B. et al. **Haematological and parasitological assessment of silver catfish *Rhamdia quelen* farmed in Southern Brazil.** Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária, v. 23, n. 2, p. 157-163, 2014.

FLORES-LOPES, F.; THOMAZ, A. T. **Histopathologic alterations observed in fish gills as a tool in environmental monitoring.** Brazilian Journal of Biology, v. 71, n. 1, p. 179-188, 2011.

GOMES, L. DE C. et al. **Biologia do jundiá (*Rhamdia quelen*) (Teleostei, Pimelodidae).** Ciência Rural. v. 30. n. 1. p. 179–185. mar. 2000.

HENRIKSON, R. A. Y. C.; MATOLTSY, A. G. **The Fine Structure of Teleost Epidermis II. Mucous Cells.** Journal Ultrastructure Research. v. 21. p. 213–221. 1968.

HENRIKSON, R. C.; GEDEON MATOLTSY, A. **The fine structure of teleost epidermis. I. Mucous cells.** Journal of Ultrastructure Research. v. 21. n. 3–4. p. 213–221. 1967a.

LANG, T. et al. **Searching the Evolutionary Origin of Epithelial Mucus Protein Components - Mucins and FCGBP.** Molecular Biology and Evolution. v. 33. n. 8. p. 1921–1936. 2016.

MAGNADOTTIR, B. **Immunological Control of Fish Diseases.** Marine Biotechnology. v. 12. p. 361–379. 2010.

MAGNADÓTTIR, B. **Innate immunity of fish (overview).** Fish & Shellfish Immunology. v. 20. p. 137–151. 2006.

NIGAM, A. K. et al. **Comparative analysis of innate immune parameters of the skin mucous secretions from certain freshwater teleosts, inhabiting different ecological niches.** Fish physiology and biochemistry, v. 38, n. 5, p. 1245-1256, 2012.

NETO, P. G. B. et al. **Crescimento e sobrevivência de larvas do jundiá, *Rhamdia quelen*, alimentadas com alimento vivo enriquecido e dieta artificial.** Revista Brasileira de Ciência Veterinária, v. 20, n. 4, 2013.

PARRA, D.; REYES-LOPEZ, F. E.; TORT, L. **Mucosal immunity and B cells in teleosts : effect of vaccination.** Frontiers in Immunology. v. 6. n. July, p. 1–12. 2015.

PEREIRA, B. F.; CAETANO, F. H. **Histochemical technique for the detection of chloride cells in fish.** Micron, v. 40, n. 8, p. 783-786, 2009.

PETERSON, T. S. **Overview of mucosal structure and function in teleost fishes.** In: Mucosal health in Aquaculture. Academic Press, 2015. p. 55-65

PRESS, C. M. **The morphology of the immune system in teleost fishes.** Fish & Shellfish Immunology. n. 1050. p. 309–318. 1999.

RAKERS, S. et al. **“Fish matters”: The relevance of fish skin biology to investigative dermatology.** Experimental Dermatology. v. 19. n. 4. p. 313–324. 2010.

REVERTER, M. et al. **Biological and ecological roles of external fish mucus: A review.** Fishes. v. 3. n. 4. p. 1–19. 2018.

SALINAS, I. **The mucosal immune system of teleost fish.** Biology, v. 4, n. 3, p. 525-539, 2015

SHEPHARD, K. L. **Functions for fish mucus.** Reviews in Fish Biology and Fisheries. v. 4. n. 4. p. 401–429. 1994.

SILFVERGRIP, A. **A systematic revision of the Neotropical catfish genus *Rhamdia* (Teleostei, Pimelodidae)**. 1996. Tese de Doutorado. Stockholm University.

SILVA, L. V. F. Da. **Morfologia, morfometria, distribuição de células mucosas e de cloreto em embriões e larvas de jundiá, *Rhamdia quelen* (Heptapteridae). Efeito do pH e concentrações de cálcio e magnésio na água**. 2006. Tese. Universidade Federal de São Carlos. 2006.

SUNDH, H.; SUNDELL, K. S. **Environmental impacts on fish mucosa**. In: Mucosal health in aquaculture. Academic Press, 2015. p. 171-197.

TAVARES-DIAS, M.; MORAES, F.R. 2004. **Hematology of teleosts fish**. 1. ed.: Villimpress, Ribeirão Preto. 144 p.

TORT, L.; BALASCH, J. C.; MACKENZIE, S. **Fish immune system. A crossroads between innate and adaptive responses**. *Inmunología*, v. 22, n. 3, p. 277-286, 2003.

VATSOS, I. N. et al. **Monitoring stress in fish by applying image analysis to their skin mucous cells**. *European Journal of Histochemistry*. v. 54. n. 2. p. 107–111. 2010.

VITULE, J.R.S.; FREIRE, C.A; SIMBERLOFF, D. **Introduction of non-native freshwater fish can certainly be bad**. *Fish and Fisheries*, v. 10, p. 98-108, 2009.

WILSON, J. M.; LAURENT, P. **Fish gill morphology: Inside out**. *Journal of Experimental Zoology*. v. 293. n. 3. p. 192–213. 2002a.

4 MANUSCRITO I

Histologia de células mucosas cutâneas e branquiais em juvenis de jundiá (*Rhamdia quelen*)

Isadora Maria Oliveira Zavaglia¹, Gabriela Pires Scherer¹, Bruno Bianchi Loureiro¹,
Sharine Nunes Descovi¹, Marcelo da Veiga², Silvio Teixeira da Costa², Mauro Alves
da Cunha³

¹Department of Animal Science, Federal University of Santa Maria, Santa Maria, Rio Grande do Sul. 1000 Roraima Avenue, Camobi, Santa Maria, RS, CEP: 97105-900, Brazil.

²Department of Morphology, Federal University of Santa Maria, Santa Maria, Rio Grande do Sul. 1000 Roraima Avenue Camobi, Santa Maria, RS, CEP: 97105-900, Brazil.

³Departamento de Physiology and Pharmacology, Federal University of Santa Maria, Santa Maria, Rio Grande do Sul. 1000 Roraima Avenue Camobi, Santa Maria, RS, CEP: 97105-900, Brazil.

RESUMO

O jundiá (*Rhamdia quelen*) é uma espécie nativa amplamente encontrada na América do Sul, e tem despertado grande interesse devido a sua rusticidade, boa adaptação a climas rigorosos e bons desempenhos zootécnicos. Por isso, o conhecimento morfológico desses peixes pode fornecer informações importantes, a fim de potencializar seu cultivo. O presente estudo objetivou avaliar o perfil morfológico cutâneo e branquial de juvenis de jundiá (*Rhamdia quelen*), e como cada fase do desenvolvimento juvenil pode manifestar a expressão de células mucosas, a fim de estabelecer a área mais representativa para coleta da pele. Os peixes utilizados foram adquiridos em uma piscicultura local e aclimatados em caixas com capacidade de 30L em um sistema de recirculação de água com parâmetros de água monitorados de acordo com a faixa recomendada para a espécie. Os peixes receberam ração comercial (37% proteína) diariamente três vezes ao dia. Dois grupos de peixes juvenis foram avaliados em estágio de desenvolvimento sequencial cutâneo e branquial. O grupo de juvenis I, era composto por 9 peixes com peso médio de $7.65 \pm 0,86$ g e 9.18 ± 0.24 cm de comprimento. Já os animais do grupo de juvenis II, também com 9 animais, possuíam peso médio de 28.09 ± 6.05 g e 16.69 ± 0.21 cm de comprimento. Ao final do experimento, os animais foram anestesiados e eutanasiados por secção medular e extraído 6 secções de pele, 3 dorsais e 3 ventrais, além do segundo arco branquial, também do lado esquerdo do peixe. As amostras foram fixadas em formaldeído 10% e submetidas a técnicas histológicas de rotina e posteriormente à coloração de PAS + Alcian Blue e Tricômico de Masson-Goldner para avaliação da distribuição de células mucosas, e a espessura do tecido conjuntivo da derme e filamento. Conclui-se que devido ao hábito bentônico da espécie, a região ventral é o ponto mais representativo para coleta de pele em razão da maior concentração de células mucosas encontradas. Nas brânquias, a distribuição de células mucosas permite a avaliação sanitária a partir da produção excessiva ou escassa de muco que recobre as lamelas. Os jundiás (*R. quelen*) possuem maior sensibilidade quanto a proteção imunológica proveniente das propriedades viscoelásticas da camada mucosa e da barreira epitelial.

Palavras-chave: Biomarcador. Brânquias. Derme. Epitélio. Histologia. Peixe.

ABSTRACT

The silver catfish (*Rhamdia quelen*) is a native species widely found in South America, and it has aroused great interest due to its rusticity, good adaptation to harsh climates and good zootechnical performances. Therefore, the morphological knowledge of these fish can provide important information in order to enhance their cultivation. The present study aimed to evaluate the cutaneous and gill morphological profile of juveniles of silver catfish (*Rhamdia quelen*), and how each stage of youth development can demonstrate the expression of mucous cells, in order to establish the most representative area for skin collection. The fish used in the study were purchased from a local fish farm and acclimated in boxes with a capacity of 30L in a water recirculation system with water parameters monitored according to the recommended range for the species. The fish received fish food (37% protein) daily - three times a day. Two groups of juvenile fish were evaluated at the stage of sequential cutaneous and branchial development. The group of juveniles I was composed of 9 fish with an average weight of $7.65 \pm 0.86\text{g}$ and $9.18 \pm 0.24\text{cm}$ in length. The animals from juvenile group II, also with 9 animals, had an average weight of $28.09 \pm 6.05\text{g}$ and $16.69 \pm 0.21\text{cm}$ in length. At the end of the experiment, the animals were anesthetized and euthanized by a spinal cord sectioning, and 6 skin sections, 3 dorsal and 3 ventral sections were extracted, in addition to the second branchial arch, also on the left side of the fish. The samples were fixed in 10% formaldehyde and subjected to routine histological procedures and subsequently stained with PAS + Alcian Blue and Masson-Goldner Trichomium to assess the distribution of mucous cells, and the thickness of the connective tissue of the dermis and filament. It was possible to conclude that due to the species' benthic habit, the ventral region is the most representative point for skin collection due to the higher concentration of mucous cells found. In the gills, the distribution of mucous cells allows the health assessment from the excessive or scarce production of mucus that covers the lamellae. Silver catfish (*R. quelen*) have greater sensitivity in terms of immunological protection arising from the viscoelastic properties of the mucous layer and the epithelial barrier.

Keywords: Biomarker. Gills. Dermis. Epithelium. Histology. Fish.

INTRODUÇÃO

O jundiá (*Rhamdia quelen*) é uma espécie de peixe nativo que tem despertado interesse principalmente devido à sua boa resistência a diferentes temperaturas e promissor potencial zootécnico na criação intensiva (CARDOSO et al., 2004). Apesar dos crescentes estudos e investimentos acerca da espécie, ainda é necessário o conhecimento mais aprofundado de seus parâmetros morfológicos, já que estes ainda são escassos ou dispersos na literatura (MONTANHA et al., 2011).

A espécie é conhecida por ser um peixe de couro, isto é, desprovido de escamas, e devido a essa característica, sua pele possui maior superfície de contato com o ambiente externo e com microrganismos dispersos nele. O ambiente aquático apresenta diversos riscos imunológicos, e por estar em contato direto, a pele é, juntamente com as brânquias, a principal porta de entrada para patógenos e contaminantes (LAZADO; CAIPANG, 2014). Apesar de possuir ampla variação entre as espécies, Peterson (2015) afirma que a pele mantém certa similaridade de suas características funcionais, estruturais e celulares durante o processo evolutivo. Para a proteção física e imunológica é necessária uma expressiva produção de células mucosas, responsáveis por impedir a invasão e penetração de agentes patógenos no organismo (CORFIELD, 2015).

A pele dos peixes é classificada como uma multicamada dividida em três partes: a camada mucosa, a epiderme e a derme. O número de células que compõe as camadas pode variar de acordo com a espécie e o local observado (HENRIKSON; GEDEON MATOLTSY, 1967a). Abaixo da epiderme encontra-se a derme, esta, na maioria das espécies, geralmente é subdividida em duas camadas, a mais externa de estrato esponjoso, formada por tecido conjuntivo frouxo e a camada mais interna, próxima ao tecido muscular, formada por tecido conjuntivo denso com predominância de fibras colágenas ricamente vascularizadas, chamada estrato compacto (ELLIOTT, 2011).

O aparelho branquial está distribuído em quatro arcos branquiais em ambos os lados da cabeça do animal, ramificados em filamentos e lamelas, e possuem contato direto com o ambiente externo (WILSON; LAURENT, 2002a). A função básica dos filamentos, em especial das lamelas, é a troca gasosa ativa ou na forma de difusão (oxigênio e dióxido de carbono), ionoregulação ativa com o objetivo de manter o equilíbrio osmótico, controle da hemodinâmica através da vasoconstrição e

vasodilatação e eliminação de resíduos nitrogenados (PETERSON, 2015).

O muco produzido pelas células mucosas e aderido ao corpo e brânquias é responsável por agir como a primeira e mais eficiente forma de defesa do corpo contra o meio. É então, amplamente caracterizado como uma secreção viscosa e aderente, sintetizada por células especializadas encontradas e dispostas no epitélio, denominadas caliciformes, as quais normalmente revestem todos órgãos em contato com o ambiente externo (BANSIL; TURNER, 2006).

Estruturalmente o muco é constituído por dois tipos de carboidratos, com açúcares ácidos e neutros, que são altamente reagentes com coloração Alcian Blue e PAS (*Periodic acid-reactive Schiff*), respectivamente (ROBERTS; POWELL, 2005). As células mucosas compostas por glicoproteínas ácidas possuem alta viscosidade e previnem a proliferação de patógenos e infecções, enquanto as glicoproteínas neutras, produzem o muco epitelial com baixa viscosidade e função de proteção mecânica, lubrificação epitelial e proteção osmótica (MITTAL, 1994).

Estudos previamente realizados indicam que a estrutura epitelial de animais jovens é fina, composta por poucas camadas celulares, com produção crescente de células mucosas conforme o desenvolvimento do animal (ESTEBAN, 2012). O peixe é considerado juvenil quando apresenta suas estruturas morfológicas semelhantes aos adultos, ou seja, contempla desde o surgimento das nadadeiras até a primeira maturação sexual (NAKATANI et al., 2001).

As avaliações histológicas são uma ótima ferramenta que permitem contribuir com mais estudos através da visualização, monitoramento e informação gerada a partir das análises. Estudos recentes têm utilizado essa ferramenta como biomarcador de verificação animal e ambiental, utilizando-se dos benefícios de poder direcionar estudos para um órgão ou sistema específico, observando suas respostas frente aos desafios impostos (REDDY, P. B.; RAWAT, S. S., 2013)

O objetivo deste trabalho é analisar o perfil morfológico cutâneo e branquial de juvenis de jundiá (*R. quelen*), a fim de verificar a distribuição e expressão de células mucosas na pele e brânquia em diferentes períodos do desenvolvimento juvenil. Além disso, estabelecer a área mais representativa para coleta da pele.

MATERIAIS E MÉTODOS

Os jundiás foram adquiridos de uma piscicultura local, aclimatados no Laboratório de Piscicultura da Universidade Federal de Santa Maria, RS e alimentados com ração comercial (37% proteína). A alimentação foi fornecida três vezes ao dia (8h; 13h; 17h), conforme Canton et al. (2007), que recomendam a frequência mínima de alimentação duas vezes ao dia para juvenis de jundiá, devido aos bons resultados produtivos apresentados. Durante o período experimental os animais foram mantidos em sistema de recirculação de água que consiste em dois filtros biológicos com temperatura controlada. Em ambos os grupos, os animais foram uniformemente distribuídos em três caixas d'água com capacidade para 30L, contendo três peixes cada.

As caixas eram limpas diariamente, duas vezes ao dia, para remoção dos resíduos. Durante o período experimental, os parâmetros de qualidade de água foram monitorados e indicaram os valores de: temperatura $24.97 \pm 1.72^{\circ}\text{C}$; oxigênio dissolvido 6.44 ± 0.58 ; pH 7.37 ± 0.22 ; amônia total 0.18 ± 0.08 mg/L; nitrito 0.01 ± 0.01 mg/L; alcalinidade 43.330 ± 6.83 mg CaCO_3 L^{-1} e dureza 42.50 ± 7.58 mg CaCO_3 L^{-1} .

Os grupos foram separados conforme nomenclatura sugerida que estabelece as diferenças entre fases de desenvolvimento de acordo com o comprimento dos peixes (cm), devido a maior facilidade e praticidade de definição. Portanto, os peixes foram separados em dois grupos experimentais em fase de desenvolvimento sequencial, denominando os animais da primeira fase como juvenis I, enquanto os animais da fase seguinte, juvenis II (GOMES; ARAUJO-LIMA; ROUBACH, 2003).

No grupo de juvenis I foram utilizados um total de 9 animais ($n=9$) com peso médio de $7.65 \pm 0,86$ g e 9.18 ± 0.24 cm de comprimento, bem como, o grupo de juvenis II, utilizou mais 9 animais ($n=9$) com peso médio de 28.09 ± 6.05 g e 16.69 ± 0.21 cm de comprimento.

LOCAIS DE COLETA

Ao final do período experimental, os nove peixes de cada grupo foram anestesiados e posteriormente eutanasiados por secção medular para a coleta de seis diferentes secções de pele do lado esquerdo do peixe, com cerca de 5 mm^2 cada

(MISTRI et al., 2018), além do segundo arco branquial esquerdo, que também foi extraído para análise (VAN HEERDEN; VOSLOO; NIKINMAA, 2004).

As secções coletadas foram previamente estabelecidas objetivando facilitar a identificação do local que represente a maior área de expressão de células mucosas do jundiá (*R. quelen*). As secções foram realizadas em seis diferentes locais, sendo três acima da linha lateral (região dorsal) do lado esquerdo do peixe, e três abaixo (região ventral) também no lado esquerdo, além da brânquia, conforme mostra a Figura 1.

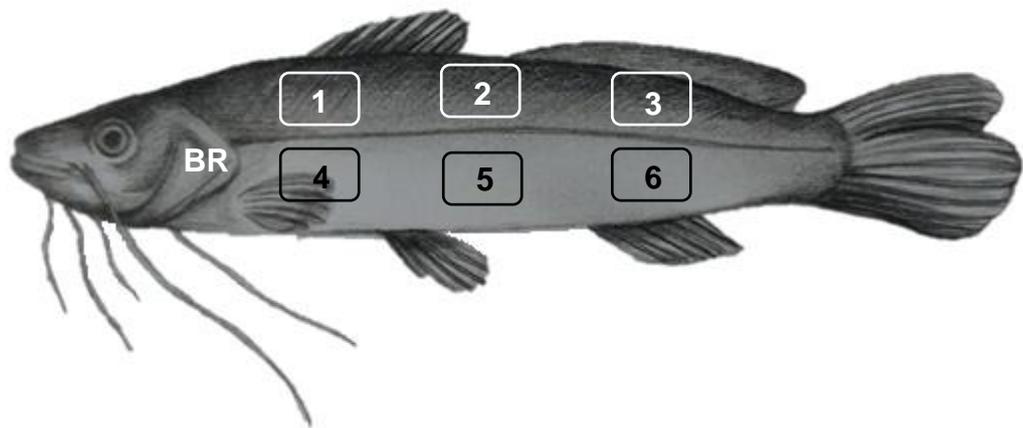


Figura 1. Representação esquemática do jundiá (*Rhamdia quelen*) e as seis secções de pele e segundo arco branquial coletados para análise morfológica. 1-DFND: Dorso frontal a nadadeira dorsal; 2-DLEFL: Dorso lateral esquerdo a faixa lateral; 3-DCND: Dorso caudal a nadadeira dorsal; 4-VFNV: Vento frontal a nadadeira ventral; 5-VLEFL: Vento lateral esquerdo a faixa lateral; 6-VCNV: Vento caudal a nadadeira ventral; BR: Brânquia. Fonte: Autora

PROCEDIMENTOS HISTOLÓGICOS

Os órgãos coletados foram imediatamente armazenados em tubos Falcon de 50ml e fixados em formol 10% (solução de Bouin), isto é, procedimentos químicos ou físicos responsáveis pela imobilização celular para que resista as etapas seguintes do processamento histológico, mantendo sua histoarquitetura e retardando efeitos *post mortem* do tecido (TIMM, 2005). Posteriormente as amostras foram desidratadas em concentrações graduais de álcoois e armazenadas em cassetes histológicos, onde passaram por processamento de xilol e foram emblocadas com parafina.

As secções foram cortadas duas vezes através de um micrótomo rotativo *Thermo Scientific*™ HM 325 com espessura de 5 µm, de acordo com Fast et al. (2002), a fim de viabilizar a produção de duas lâminas por secção, que posteriormente foram

coradas por diferentes técnicas histológicas. Os cortes foram transferidos para o banho histológico em temperatura média de 50°C com o objetivo de nivelar e fixar o material à lâmina.

IDENTIFICAÇÃO DE CÉLULAS MUCOSAS

As lâminas contendo amostras de pele e brânquia foram submetidas à coloração de Ácido Periódico de Schiff (PAS), método de coloração histológico que permite identificar mucinas neutras na cor magenta, enquanto o Alcian Blue (pH 2,5) tem grande especificidade para corar mucinas ácidas na cor azul (AL-BANAW *et al.*, 2010).

Para as medidas do tecido conjuntivo da pele e das brânquias, a coloração adotada foi a coloração de Tricômico de Masson-Goldner, a fim de caracterizar e diferenciar tecidos e componentes celulares. As fibras colágenas adquirem coloração azul ou verde, enquanto os componentes celulares, vasos sanguíneos e linfáticos e terminações nervosas coram em tom vermelho.

As lâminas foram fotografadas pelo microscópio Axio Scope A1 acoplado a uma câmera AxioCam 105 color (ZEISS®, Germany) e diretamente ligado a um software, que permite registrar fotos de alta qualidade. Por toda extensão de cada amostra, cinco fotos foram registradas em sequência no epitélio e brânquia, através do programa ZEN 3.1 previamente definido com objetiva de 10x e 40x. Foram registradas fotomicrografias de células secretoras de muco, identificadas na cor azul ou magenta no epitélio e brânquias. O mesmo procedimento foi adotado para as lâminas coradas com Tricômico de Masson-Goldner, enfatizando a derme e o tecido conjuntivo das amostras para posterior medidas de espessuras.

MEDIDAS MORFOMÉTRICAS

Cinco fotomicrografias de cada secção do epitélio e do segundo arco branquial foram registradas, e a partir delas, as medidas foram realizadas através do programa ImageJ. Para a espessura do epitélio, foram estabelecidas quatro medidas aleatórias no decorrer de toda a amostra. A medida iniciava na parte mais externa do epitélio (em contato com o ambiente), e decorria até a linha limítrofe com a derme, próximo a membrana basal. O mesmo procedimento foi realizado com o tecido conjuntivo da

derme, iniciando a medida de espessura no tecido conjuntivo compacto, subjacente ao epitélio e finalizando no início do tecido muscular.

A Figura 2 representa as medidas de espessura avaliadas no epitélio (setas), e as medidas avaliadas no tecido conjuntivo (linhas pontilhadas).

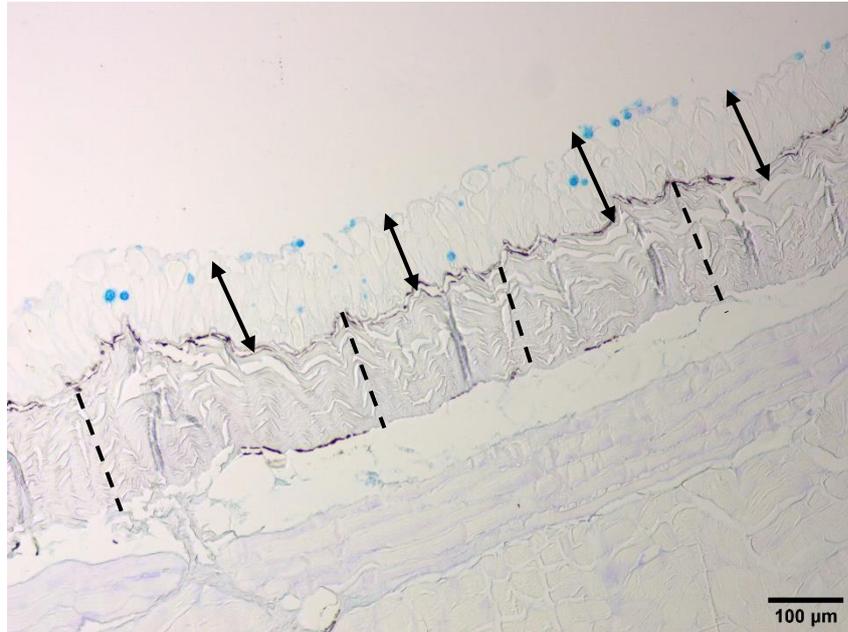


Figura 2. Fotomicrografia esquemática da secção transversal da pele e das quatro medidas de espessura avaliadas no epitélio e no tecido conjuntivo da derme em juvenis de jundiá (*Rhamdia quelen*). Setas indicam as medidas de espessura do epitélio. A linha pontilhada indica as medidas da espessura do tecido conjuntivo da derme. Técnica histológica de coloração PAS+Alcian Blue pH 2,5 em objetiva 10x.

As células mucosas encontradas no epitélio foram contabilizadas em toda extensão de cada fotomicrografia e após essa etapa, a quantidade de células mucosas foi transformada em porcentagem pela fórmula: $\text{área comparativa} \times \text{área} / \text{área total da fotomicrografia}$. Onde, a área comparativa corresponde a uma média geral da espessura dos epitélios anteriormente analisados, multiplicado pelos valores da área de ocupação das células mucosas neste epitélio, dividido pela área total da fotomicrografia.

Na brânquia, a contagem de células mucosas foi avaliada dentro de seis quadrantes inseridos aleatoriamente em cada fotomicrografia através do programa ImageJ. A contagem era determinada de acordo com a localização das células, distribuídas dentro de cada quadrante. Além disso, como demonstra a Figura 3, parâmetros morfológicos das brânquias foram realizados a partir do comprimento total da lamela, de sua base ao seu ápice, no espaçamento entre duas lamelas bem

organizadas a partir da região de inserção da lamela ao filamento e a largura, de uma extremidade lateral à outra de uma lamela, individualmente em todas que apresentavam integridade estrutural, conforme Hughes (1984).

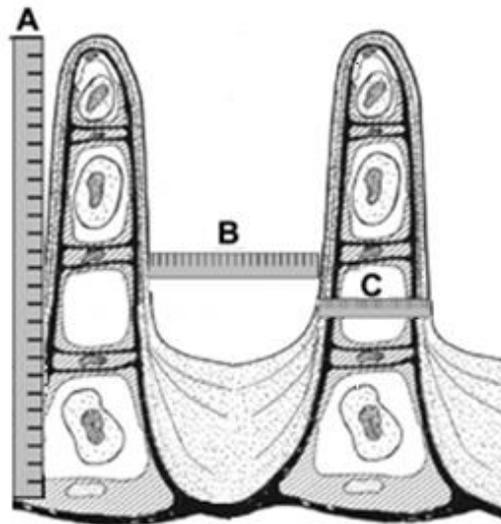


Figura 3. Representação esquemática dos parâmetros morfológicos analisados na brânquia de jundiá (*Rhamdia quelen*). A: altura da lamela potencialmente funcional; B: espaçamento entre lamelas; C: largura lamelar (adaptado de Hughes, 1984).

ANÁLISE ESTATÍSTICA

As análises estatísticas foram realizadas no programa GraphPad Prism 7.00. Foi testada a normalidade dos dados pelo teste D'Agostino e Pearson, seguido pelo teste T Mann-Whitney para comparações entre os grupos, considerando significativos os valores de $P < 0,05$. Para as comparações entre seções do mesmo grupo foi utilizado o teste de Kruskal-Wallis com Dunn's múltiplas comparações ($P < 0,05$). Os resultados estão representados em tabelas de acordo com os valores encontrados na epiderme e nas brânquias, separadamente.

O experimento foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa Animal da UFSM, processo nº 6361090518 e 9387290319.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os animais dos grupos juvenis I e juvenis II foram selecionados em dois estágios de desenvolvimento, e as análises morfológicas foram padronizadas para ambos os grupos com o objetivo de compará-los em uma sucessão de eventos

durante o crescimento e desenvolvimento cutâneo e branquial.

ESPESSURA DO EPITÉLIO E TECIDO CONJUNTIVO

A Tabela 1 apresenta os valores médios encontrados para espessura do epitélio e do tecido conjuntivo presente na derme. A espessura do epitélio apresentou diferenças significativas ($P < 0,05$) entre os grupos em todas as secções avaliadas, e em ambos, o epitélio apresentou maior espessura na região dorsal, mais direcionada à região cranial do corpo. As regiões ventrais, mais próximas à cauda, como a secção VCNV apresentaram espessura inferior nos dois grupos.

Observando juvenis machos e fêmeas de *Salmo trutta* durante ciclos anuais, Pickering (1977) supõe que a espessura do epitélio de teleósteos tende a mudar conforme a sazonalidade, sexo e peso dos peixes. Os resultados do presente estudo contrariam as análises de Cordero et al. (2017), que encontraram maior espessura de epitélio na região ventral em *Sparus aurata*, supondo que a diferença de espessura em diferentes regiões pode estar associada com a maior suscetibilidade das algumas regiões corporais.

A maioria dos peixes bentônicos, assim como o jundiá, apresentaram maior espessura de epitélio na região ventral do corpo, discordando com os resultados deste estudo. O epitélio mais espesso presente na região dorsal foi observado em peixes pelágicos, entretanto o epitélio pode variar sua espessura devido a fatores como idade, espécie e região do corpo analisada, assim como desequilíbrio do meio aquático e manejo incorreto que possa desencadear processos estressantes (ELLIOTT, 2000).

Tabela 1 – Espessura do epitélio e do tecido conjuntivo (μm) nas seis secções analisadas em juvenis I e juvenis II de jundiá (*R. quelen*) durante dois períodos do desenvolvimento

Espessura	EPITÉLIO		CONJUNTIVO	
	JUVENIS I	JUVENIS II	JUVENIS I	JUVENIS II
DFND	37,23 \pm 1,948 ^{Aa} (0-109,7)	83,45 \pm 1,73 ^{Ba} (33-159,8)	114,3 \pm 2,836 ^{Ab} (57,02-229,2)	123,5 \pm 3,286 ^{Aa} (58,82-260,4)
DLEFL	34,75 \pm 1,537 ^{Aa} (7,909-108,5)	94,21 \pm 2,32 ^{Bb} (43,04-311,9)	87,6 \pm 2,12 ^{Aa} (41,63-188,6)	140 \pm 4,952 ^{Bab} (47,47-328,8)
DCND	16,81 \pm 0,9238 ^{Ab} (0-61,74)	79,37 \pm 1,561 ^{Ba} (23,56-172,2)	68,34 \pm 1,241 ^{Ac} (28,2-110,2)	134,6 \pm 3,49 ^{Bab} (70,28-244)
VFNV	23,88 \pm 1,786 ^{Abc} (0-105,1)	90,65 \pm 2,822 ^{Bab} (33,95-254,4)	147,8 \pm 4,312 ^{Ad} (65-478,2)	205,1 \pm 6,175 ^{Bc} (88,82-512,4)
VLEFL	22,96 \pm 1,145 ^{Ac} (0-71,06)	66,12 \pm 1,935 ^{Bc} (15,34-140,1)	92,11 \pm 1,39 ^{Aa} (48,51-156,4)	123,7 \pm 2,708 ^{Bab} (61,83-257,8)
VCNV	16,31 \pm 0,9354 ^{Ab} (0-52,49)	64,34 \pm 1,749 ^{Bc} (17,7-119,6)	96,38 \pm 1,798 ^{Aa} (53,53-166)	137,5 \pm 2,272 ^{Bb} (56,46-300)
TOTAL	25,32 \pm 0,6348 (0-109,7)	79,69 \pm 0,9086 (15,34-311,9)	101,1 \pm 1,273 (28,2-478,2)	144,1 \pm 1,872 (47,47-512,4)

*Os valores estão apresentados em Mean \pm SEM (mín – máx). O teste estatístico empregado foi Teste T Mann-Whitney seguido de Kruskal-Wallis com Dunn's múltiplas comparações. As letras maiúsculas indicam diferenças significativas das secções entre os grupos ($P < 0,05$). As letras minúsculas indicam diferenças significativas entre as secções do mesmo grupo ($P < 0,05$).

Na Figura 4, observa-se a diferença de espessura (μm) epitelial, com o menor valor médio encontrado em juvenis I na secção VCNV (16,31 \pm 0,9354) quando comparado com o maior valor encontrado em juvenis II, na secção DLEFL (94,21 \pm 2,32). As fotomicrografias evidenciam células mucosas associadas a imunoglicoproteínas na cor azul, reativas a Alcian Blue, dispostas nos estratos que compõem o epitélio.

Sarasquete et al. (1998) observou a pele de larvas e adultos de *Solea senegalensis*, e concluiu que as poucas camadas celulares se desenvolviam conforme o crescimento dos peixes, e conseqüentemente mais camadas de células epiteliais surgiam no decorrer do desenvolvimento dos peixes.

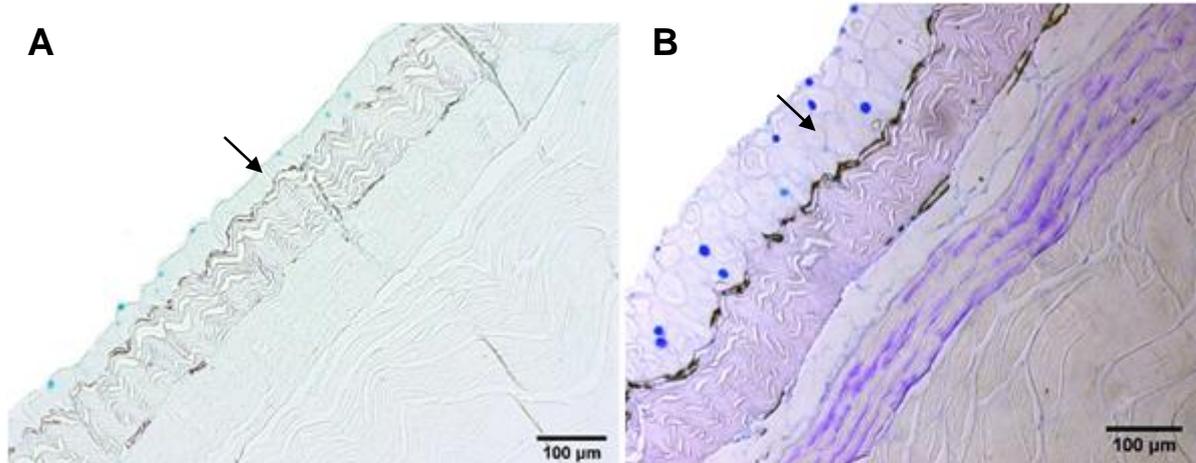


Figura 4. Fotomicrografia da secção transversal da pele de juvenis de jundiá (*Rhamdia quelen*) demonstrando a diferença de espessura epitelial entre as duas fases do desenvolvimento. A: Epitélio (seta) de animais juvenis I; B: epitélio (seta) de animais juvenis II. Técnica histológica de coloração PAS+Alcian Blue pH 2,5 em objetiva 10x.

Na derme, formada por uma região superficial de tecido conjuntivo frouxo e uma região profunda de tecido conjuntivo denso, mostra diferenças significativas ($P < 0,05$) em todas as regiões, exceto em DFND. A secção VFNV apresentou maior espessura do tecido conjuntivo em ambos os grupos.

Além da vascularização e produção imunológica proposta pelo tecido conjuntivo, as fibras colágenas possuem função primordial em promover vigor à pele do peixe, evitando lesões oriundas de colisões (LE GUELLEC; MORVAN-DUBOIS; SIRE, 2004), predadores e hábitos bentônicos, fornecendo proteção mecânica e maior resistência física ao peixe. Em espaços intercalados no estrato compacto, é possível observar colunas verticais nas fibras colágenas, as quais possuem a função de transferir vascularização e componentes nervosos até o estrato esponjoso (ELLIOTT, 2000)

Na Figura 5, a coloração em Tricômico de Masson-Goldner permite a identificação da organização das fibras colágenas (em tom esverdeado) e da diferença do tecido conjuntivo menos espesso em juvenis I (A) comparado ao mais espesso em juvenis II (B), com camada adiposa subjacente, ambos na secção VFNV.

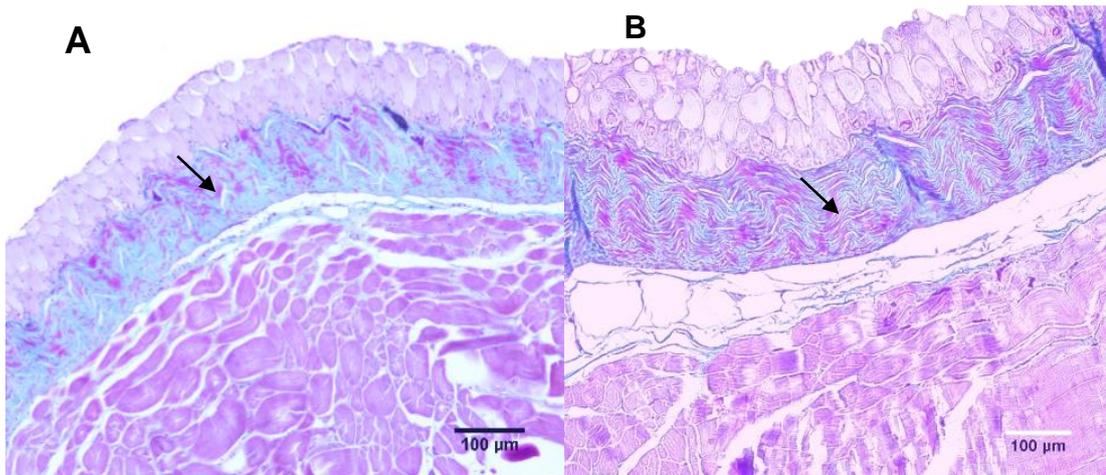


Figura 5. Visualização da diferença de espessura (μm) da derme composta por tecido conjuntivo e fibras colágenas subjacente ao epitélio em juvenis de jundiá (*Rhamdia quelen*). A: Espessura da derme (seta) de juvenis I. B: Espessura da derme (seta) dos animais juvenis II. Técnica histológica de coloração Tricômico de Masson-Goldner. Objetiva 10x.

Células adiposas podem ser observadas entre a derme compacta e o tecido muscular em juvenis II. A derme participa diretamente do processo de recuperação, e em conjunto com o epitélio desempenha um processo de cicatrização a partir da derme, onde inicia com o rompimento de capilares, coagulação e migração das células inflamatórias até o local lesionado (SILVEIRA; LAGATO; PONTES, 2009).

PORCENTAGEM DE CÉLULAS MUCOSAS NO EPITÉLIO E BRÂNQUIA

A quantidade de células mucosas contabilizada no epitélio do grupo de animais juvenis I foi inferior em todos os cortes quando comparada aos juvenis II, salientando que a região dorso caudal em ambos tratamentos também foi o local com menos células encontradas, como mostra a Tabela 2.

Além disso, nos dois grupos o local com maior porcentagem de células observado é ventral, próximo à região cranial, especificamente a secção VFNV, que apresentou quantidade superior às demais secções. Este fato indica que essa região propôs maior demanda de produção de células mucosas para proteção do peixe, uma vez que peixes com hábitos bentônicos tendem a desenvolver lesões na região do ventre devido ao impacto em ambientes profundos e pedregosos, podendo provocar danos físicos que facilitam a invasão de patógenos ao sistema imune.

Pode-se inferir que a secção com maior quantidade celular é a mesma com maior espessura de tecido conjuntivo, responsável pelo processo de cicatrização e produção de componentes imunológicos em uma área que demonstra suscetibilidade

física.

Tabela 2 – Porcentagem calculada a partir da contagem de células mucosas presentes no epitélio e brânquia de jundiá (*R. quelen*) em dois períodos de desenvolvimento juvenil

Local	% CM	JUVENIS I	JUVENIS II
PELE	DFND	0,0030±0,01 ^{Aa} (0-0,0030)	0,0222±0,002 ^{Ba} (0,0035-0,0590)
	DLEFL	0,0035±0,006 ^{Aa} (0-0,0192)	0,0262±0,0016 ^{Bab} (0,0119-0,0568)
	DCND	0,0002±0,001 ^{Ab} (0-0,0035)	0,0085±0,0008 ^{Bc} (0,0015-0,0268)
	VFNV	0,0043±0,003 ^{Aa} (0-0,0505)	0,0584±0,0075 ^{Bb} (0,0052-0,02299)
	VLEFL	0,0023±0,003 ^{Aa} (0-0,0095)	0,0141±0,0016 ^{Bcd} (0,0013-0,0673)
	VCNV	0,0018±0,004 ^{Aa} (0-0,0134)	0,0329±0,0052 ^{Bad} (0,0046-0,1221)
BRÂNQUIAS		0,0615±0,008 ^A (0,00105-0,1967)	0,1686±0,0082 ^B (0,06494-0,3218)
	TOTAL	0,01096±0,001689 (0-0,1967)	0,04731±0,003428 (0,001371-0,3218)

*Os valores estão apresentados em Mean ± SEM (mín – máx). O teste estatístico empregado foi Teste T Mann-Whitney seguido de Kruskal-Wallis com Dunn's múltiplas comparações. As letras maiúsculas indicam diferenças significativas das secções entre os grupos (P<0,05). As letras minúsculas indicam diferenças significativas entre as secções do mesmo grupo (P<0,05).

Em estudo anterior que identifica a distribuição de células mucosas no corpo de jundiás (*R. quelen*) na fase larval, sob influência de diferentes níveis de pH e concentrações de cálcio e magnésio na água, Silva (2006) observou que 48 horas logo após a eclosão, células mucosas já estavam distribuídas no aparelho branquial, enquanto na pele, 6 horas após a eclosão, evidenciando seu rápido desenvolvimento.

A maior presença de células mucosas presentes na região ventral encontradas neste estudo, pode ser associada a trabalhos que descreveram maior e mais rápida cicatrização no ventre de teleósteo quando comparados à cicatrização da parte dorsal (CORDERO et al., 2017).

O direcionamento de células mucosas para a superfície epitelial em determinado local, indica que a maior concentração de células geralmente encontra-se no local que exige maior produção de muco para a proteção da epiderme, uma vez

que há a ausência de células queratinizadas na superfície corporal (KAWEEWAT; HOFER, 1997).

Em salmões do Atlântico (*Salmo salar*), animais sem hábitos bentônicos Pittman et al., (2013) concluíram que a maior densidade de células mucosas encontradas estavam situadas na região dorso-lateral, enquanto em menor concentração estava na cabeça, contrariando o presente estudo. Este fato intensifica a proposição de que as características morfológicas, como espessura de epitélio e produção de células mucosas está diretamente relacionada com a particularidade de cada espécie.

A identificação dessas células foi caracterizada por Mittal et al. (1994), classificadas em células mucosas do tipo A e B, sendo as primeiras mais numerosas, maiores, localizadas no estrato superficial do epitélio e fortemente reativas para Alcian Blue, enquanto a segunda é menos numerosa, com células menores e geralmente alocadas no estrato germinativo e intermediário, fortemente reativas com PAS.

Durante a avaliação das imagens obtidas em cada secção, foi possível notar que melanócitos (células de pigmentação) presentes na derme estavam em menor extensão nas secções ventrais, possivelmente pela característica do jundiá (*R. quelen*) que possui coloração mais clara no ventre, enquanto o resto do corpo adquire coloração cinza ou escurecida.

A Figura 6 ilustra o aparecimento e distribuição das células mucosas associadas e imunoglicoproteínas nos estratos do epitélio, que foram posteriormente quantificadas em cada grupo.

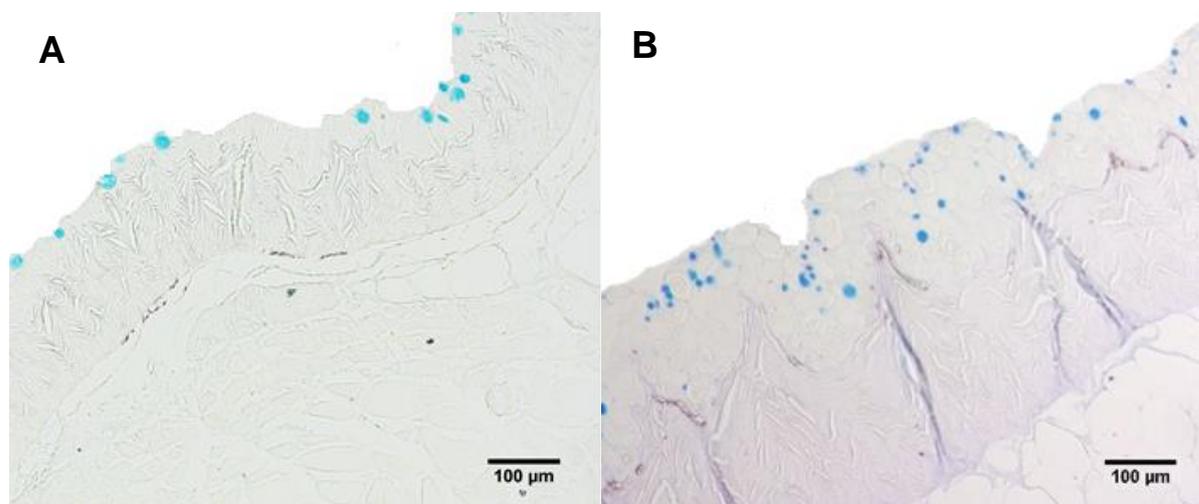


Figura 6. Fotomicrografia da secção transversal da pele de jundiá (*Rhamdia quelen*) exemplificando a quantificação de células mucosas (em azul). A: Células mucosas dispostas do epitélio de juvenis I; B:

Células mucosas dispostas no epitélio de juvenis II. Técnica histológica de coloração Alcian Blue e PAS em objetiva 10x.

Na mesma secção de maior porcentagem celular (VFNV), foi possível notar a presença de células mucosas reativas PAS (seta), compostas por carboidratos neutros, responsáveis pela produção do muco característico da espécie, o qual confere viscosidade em toda superfície corporal a fim de evitar atritos, lesões e manter a proteção física do peixe. As mesmas células não foram notadas em nenhuma região dos juvenis I.

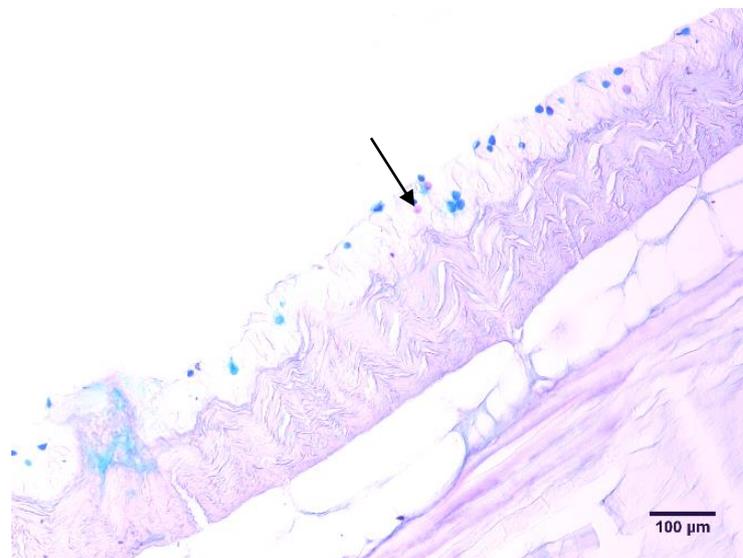


Figura 7. Fotomicrografia da secção transversal da pele de jundiá (*Rhamdia quelen*) exibindo células mucosas de carboidratos ácidos (azul) e neutros (magenta), dispostas no epitélio ventral de juvenis II (seta). Técnica histológica de coloração Alcian Blue e PAS. Objetiva 10x.

Já nas brânquias, conforme Wilson; Laurent (2002b), a organização celular de filamentos e lamelas é composta por células escamosas, comumente chamadas de células respiratórias, sendo as mais abundantes e células secretoras de muco. Além disso, o filamento é uma subdivisão da brânquia e serve de sustentação para o posicionamento das lamelas, considerada uma unidade respiratória essencial. A organização estrutural de filamentos e lamelas permite e facilita a entrada do fluxo da água contra o fluxo sanguíneo.

A porcentagem de células nas brânquias também obteve diferenças significativas ($P < 0,05$) entre os grupos e através da contagem individual de células foi possível notar que a quantidade de células dispostas no filamento era superior às distribuídas nas lamelas. Essa característica das células mucosas nas brânquias

indica que os animais não estão estressados ou perdendo íons, pois as células mucosas não avançam a área respiratória, caso isso aconteça, infere-se que os animais estão em situação de estresse. Dang et al. (2020) sugerem que este tipo de comportamento celular representa uma alternância nas funções branquiais, fazendo com que as lamelas participem da superfície respiratória enquanto o filamento representa uma saúde mais sistêmica.

Uma das características de peixes infectados por ictio é entrar em atrito nas superfícies do viveiro, possibilitando a formação de diversas lesões na pele e o início de uma produção excessiva de muco para proteção, o que pode dificultar as trocas gasosas nas brânquias (EIRAS, 1994).

Em um estudo realizado com juvenis de *Colossoma macropomum* expostos a Trichlorfon®, um organofosforado amplamente utilizado para o controle parasitas, observou-se uma decrescente concentração na densidade de células mucosas nas brânquias em comparação com os animais do grupo controle, fato que sugere uma adaptação morfológica branquial a fim de promover maior facilidade nas trocas gasosas, mas pode afetar negativamente a barreira física branquial, já que a produção de muco é reduzida (MORON et al., 2018).

MORFOMETRIA BRANQUIAL

As medidas morfológicas avaliadas nas brânquias, as quais são compostas por filamentos e lamelas, estão demonstradas na Tabela 3. Houve diferenças estatísticas ($P < 0,05$) entre os dois grupos experimentais em todas as medidas, onde é possível observar que exceto a largura das lamelas, as outras medidas de juvenis I são inferiores comparadas com juvenis II.

É possível considerar que nos juvenis I, as lamelas são mais baixas e largas, conseqüentemente o espaço interlamelar é reduzido na base das lamelas, enquanto nos juvenis II, as lamelas são mais altas e finas, permitindo que o espaçamento entre elas seja maior.

O tecido conjuntivo do filamento tem a função de vascularização, transporte de oxigênio, assim como a produção e direcionamento de componentes celulares imunológicos, visto que as brânquias são a primeira porta de entrada de patógenos. Observa-se também que o grupo de juvenis I apresentou menor espessura de tecido conjuntivo do filamento quando comparado ao grupo de animais juvenis II.

Tabela 3 – Medidas morfológicas (μm) da lamela e filamento na brânquia de jundiás (*Rhamdia quelen*) em dois períodos do desenvolvimento juvenil.

Medidas de brânquias	JUVENIS I	JUVENIS II
ALTURA DA LAMELA	52,23 \pm 0,3629 ^{Aa} (10,7-120,5)	53,24 \pm 0,4364 ^{Ba} (10,85-103,8)
ESPAÇAMENTO ENTRE LAMELAS	18,37 \pm 0,1114 ^{Ab} (0-64,61)	21,09 \pm 0,1064 ^{Bb} (2,779-50,3)
LARGURA DA LAMELA	13,41 \pm 0,0846 ^{Ac} (2,522-36,82)	10,88 \pm 0,0562 ^{Bc} (3,314-28,73)
TECIDO CONJUNTIVO DO FILAMENTO	6,172 \pm 0,1506 ^A (2,367-14,09)	8,586 \pm 0,2276 ^B (3,544-20,05)
TOTAL	23,8 \pm 0,1793 (0-120,5)	21,62 \pm 0,1809 (2,779-103,8)

*Os valores estão apresentados em Mean \pm SEM (mín – máx). O teste estatístico empregado foi Teste T Mann-Whitney seguido de Kruskal-Wallis com Dunn's múltiplas comparações. As letras maiúsculas indicam diferenças significativas das secções entre os grupos ($P < 0,05$). As letras minúsculas indicam diferenças significativas entre as secções do mesmo grupo ($P < 0,05$).

Diferenças nos parâmetros da água ou produtos contaminantes podem influenciar em reações adaptativas e ou danosas nas brânquias, como fusão lamelar, hiperplasia entre outros fatores que interferem diretamente na eficiência da troca gasosa e ionoregulação (DOS SANTOS et al., 2012). Tais características não foram observadas neste estudo.

Em um estudo realizado em pós-larvas de *Hyphessobrycon eques* submetidas em diferentes concentrações de Dimilin® (um tipo de inseticida), foi avaliado a altura e largura da lamela, e o diâmetro dos vasos sanguíneos localizados no tecido conjuntivo de sustentação do filamento. Os resultados indicaram que quanto mais altas eram as concentrações do inseticida, maiores eram as medidas da largura da lamela e o diâmetro dos vasos sanguíneos, enquanto a altura tendia a diminuir (MARCON et al., 2016).

As medidas apresentadas representam a situação morfológica de animais em situação de conforto imunológico, mas morfoadaptações podem ocorrer nas brânquias com o intuito de permitir melhor funcionamento da área respiratória funcional do órgão. O perfil celular das brânquias, constituídos por um epitélio estratificado composto por células pavimentosas, mucosas e ionócitos foi semelhante como já mencionado por Da Costa (2017).

As setas inseridas na Figura 8 representam as medidas avaliadas nas

brânquias, que contemplam o comprimento da lamela, escolhidas pela sua estrutura bem orientada, o espaçamento entre lamelas, medido entre lamelas bem orientadas e íntegras, iniciando na inserção de uma lamela até a próxima na região basal do filamento e a largura da lamela. Além da medida realizada no tecido conjuntivo filamentar.

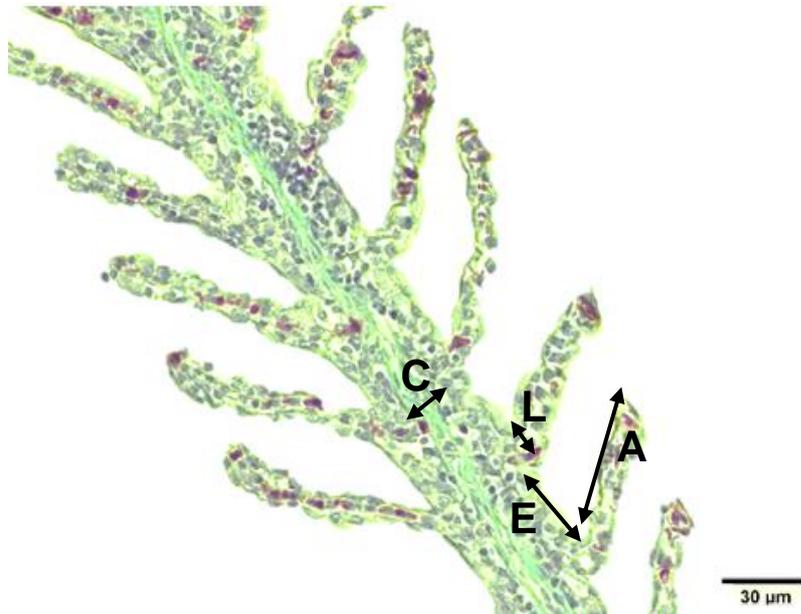


Figura 8. Fotomicrografia da brânquia evidenciando o tecido conjuntivo do filamento e medidas morfológicas de lamela em juvenis de jundiá (*Rhamdia quelen*). A: Altura de lamela; E: Espaçamento entre lamelas; L: Largura; C: Espessura do tecido conjuntivo filamentar. Técnica histológica de coloração Tricômico Masson-Golder. Objetiva 40x.

Estudos tem utilizado o biomonitoramento através de órgãos-alvo, como as brânquias, para determinação de poluentes e outras anormalidades no ecossistema aquático. Por estarem em constante contato e expostos ao ambiente aquático, as anormalidades morfológicas encontradas nas brânquias indicam a exposição a contaminantes e indícios de fragilidade imunológica (RIBEIRO et al., 2005).

CONCLUSÃO

A partir deste estudo foi possível observar as características morfológicas e de células mucosas distribuídas na pele e brânquia de jundiás (*R. quelen*) durante dois períodos do desenvolvimento juvenil. Conclui-se que as estruturas morfológicas celulares cutânea e branquial acompanham o padrão de outras espécies de teleósteos.

Além disso, o hábito bentônico característico da espécie sugere que a região ventral é mais afetada por possíveis injúrias físicas e necessita de maior proteção mecânica e imunológica, levando a uma maior expressão de células mucosas nesta região. Para uma melhor avaliação da capacidade secretória cutâneas do jundiá, a região ventral próxima a cabeça é o ponto mais representativo para coleta de amostras.

Em condições normais de sobrevivência, a produção de muco é essencial para proteção do peixe. É possível notar que a quantidade de células aumenta de acordo com o desenvolvimento dos peixes e os desafios imunológicos a quais são submetidos. A brânquia é uma ferramenta tem sido utilizada como biomarcador determinante para avaliação da condição imunológica dos peixes, podendo indicar quando a produção excessiva ou escassa de células mucosas pode ser prejudicial ao organismo.

O aparecimento e distribuição de células mucosas está intimamente relacionado com as fases de desenvolvimento do peixe, assim como nos locais com maior demanda da produção de muco. Os jundiás (*R. quelen*) possuem maior sensibilidade quanto a proteção imunológica proveniente das propriedades viscoelásticas da camada mucosa e da barreira epitelial.

O conhecimento dos aspectos morfológicos cutâneo e branquial permite análises mais aprofundadas sobre a situação imunológica e como as adversidades no mundo aquático podem interferir na morfoadaptação desses peixes.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao CNPq (processo 302076 / 2017-4) pelo apoio financeiro de Mauro Alves da Cunha. Isadora Maria Oliveira Zavaglia, Gabriela Pires Scherer, Bruno Bianchi Loureiro, Sharine Nunes Descovi receberam apoio da CAPES). Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Este estudo foi financiado em parte pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) - Código Financeiro 001.

REFERÊNCIAS

- AL-BANAW, A. et al. **Histochemical analysis of glycoconjugates in the skin of a catfish (*Arius Tenuispinis*, Day)**. Journal of Veterinary Medicine Series C: Anatomia Histologia Embryologia. v. 39. n. 1. p. 42–50. 2010.
- BANSIL, R.; TURNER, B. S. **Mucin structure, aggregation, physiological functions and biomedical applications**. Current Opinion in Colloid and Interface Science. v. 11. n. 2–3. p. 164–170. 2006.
- CANTON, Régis et al. **Influência da frequência alimentar no desempenho de juvenis de jundiá**. Revista Brasileira de Zootecnia, v. 36, n. 4, p. 749-753, 2007.
- CARDOSO, A. P. et al. **Criação de larvas de jundiá (*Rhamdia quelen*) alimentadas com rações granuladas contendo fígados ou hidrolisados**. Acta Scientiarum. Animal Sciences. v. 26. n. 4. p. 476–462. 2004.
- CORDERO, H. et al. **Dorso-ventral skin characterization of the farmed fish gilthead seabream (*Sparus aurata*)**. PLoS ONE. v. 12. n. 6. p. 1–14. 2017.
- CORFIELD, A. P. **Mucins: a biologically relevant glycan barrier in mucosal protection**. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects, v. 1850, n. 1, p. 236-252, 2015.
- DA COSTA, S. T. et al. **Humic acid of commercial origin causes changes in gill morphology of silver catfish *Rhamdia quelen* exposed to acidic water: Response of silver catfish gills to low pH and humic acid**. Journal of Experimental Zoology Part A: Ecological and Integrative Physiology. v. 327. n. 8. p. 504–512. 2017.
- DANG, M. et al. **Histological mucous cell quantification and mucosal mapping reveal different aspects of mucous cell responses in gills and skin of shorthorn sculpins (*Myoxocephalus scorpius*)**. Fish & shellfish immunology, v. 100, p. 334-344, 2020.
- SANTOS, D. M. S. et al. **Microbiological water quality and gill histopathology of**

fish from fish farming in Itapecuru-Mirim County, Maranhão State. Acta Scientiarum. Biological Sciences, v. 34, n. 2, p. 199-205, 2012

EIRAS, J.C. **Elementos de ictioparasitologia.** Fundação Antonio de Almeida, Porto, 1994. 339 p.

ELLIOTT, D. G. **Integumentary System.** The Laboratory Fish, p. 271–306, 2000.

ELLIOTT, D. G. **The skin | Functional Morphology of the Integumentary System in Fishes.** Elsevier Inc. v. 1. 2011.

ESTEBAN, M. A. An **Overview of the Immunological Defenses in Fish Skin.** ISRN Immunology. p. 1–29. 2012.

FAST, M. D. et al. **Skin morphology and humoral non-specific defence parameters of mucus and plasma in rainbow trout, coho and Atlantic salmon.** Comparative Biochemistry and Physiology. v. 132. p. 645–657. 2002.

GOMES, L.C.; ARAUJO-LIMA, C.A.R.M; ROUBACH, R. **Alevino - um termo equivocado na piscicultura brasileira com consequências no setor produtivo.** Cadernos de Ciência e Tecnologia. Brasília, v. 20, n.2, p. 353-359, 2003.

HENRIKSON, R. C.; GEDEON MATOLTSY, A. **The fine structure of teleost epidermis. I. Mucous cells.** Journal of Ultrastructure Research. v. 21. n. 3–4. p. 213–221. 1967a.

HUGHES, G.M. **Measurement of gill area in fishes: Practice and problems.** Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom, 64, 637–655. 1984.

KAWEEWAT, K.; HOFER, R. **Effect of UV-B radiation on goblet cells in the skin of different fish species.** Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology. v. 41. n. 3. p. 222–226. 1997.

LAZADO, C. C.; CAIPANG, C. M. A. **Mucosal immunity and probiotics in fish.** Fish and Shellfish Immunology. v. 39. n. 1. p. 78–89. 2014.

LE GUELLEC, D.; MORVAN-DUBOIS, G.; SIRE, J. Y. **Skin development in bony fish with particular emphasis on collagen deposition in the dermis of the zebrafish (*Danio rerio*).** International Journal of Developmental Biology. v. 48. n. 2–3. p. 217–231. 2004.

MARCON, L. et al. **Pathological and histometric analysis of the gills of female *Hypheosobrycon eques* (Teleostei:Characidae) exposed to different concentrations of the insecticide Dimilin®.** Ecotoxicology and Environmental Safety. v. 131. p. 135–142. 2016.

MISTRI, A. et al. **Morphological specializations of the epidermis of an angler catfish *Chaca chaca* (Siluriformes, Chacidae) in relation to its ecological niche: A scanning electron microscopic investigation.** Microscopy research and technique,

v. 81, n. 5, p. 439-448, 2018.

MITTAL, A. et al. **Histochemical analysis of glicoproteins in the epidermal mucous cells and sacciform cells of an indian swamp eel *monopterus cochia* (Hamilton) (Synbranchiformes, pisces).** Acta Histochemica et Cytochemica. v. 27. n. 3. p. 193–204. 1994.

MONTANHA, F. P. et al. **Características fisiológicas e reprodutivas do *Rhamdia quelen*.** Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária. n. 17. p. 8. 2011.

MORON, S. et al. **Identification of glycoproteins in mucous cells of the gill epithelium of *Colossoma macropomum* after exposure to organophosphate.** Arquivos Brasileiros de Medicina Veterinária e Zootecnia. v. 70. n. 3. p. 837–842. 2018.

NAKATANI, K. A. et al. 2001. **Ovos e larvas de peixes de água doce: desenvolvimento e manual de identificação.** Maringá: EDUEM: p. 378.

REDDY, P. B.; RAWAT, S. S. **Assessment of aquatic pollution using histopathology in fish as a protocol.** International Research Journal of Environment Sciences. v. 2. n. 8. p. 79-82. 2013.

RIBEIRO, C.A O. et al. **Bioaccumulation and the effects of organochlorine pesticides, PAH and heavy metals in the Eel (*Anguilla anguilla*) at the Camargue Nature Reserve, France.** Aquatic Toxicology, v. 74, n. 1, p. 53-69, 2005.

ROBERTS, S. D.; POWELL, M. D. **The viscosity and glycoprotein biochemistry of salmonid mucus varies with species, salinity and the presence of amoebic gill disease.** Journal of Comparative Physiology B, v. 175, n. 1, p. 1-11, 2005.

PETERSON, T. S. **Overview of mucosal structure and function in teleost fishes.** Elsevier Inc.. 2015.

PICKERING, A. D. **Seasonal changes in the epidermis of the brown trout *Salmo trutta* (L.).** Journal of Fish Biology. v. 10. n. 6. p. 561–566. 1977.

PITTMAN, K. et al. **Body site matters: An evaluation and application of a novel histological methodology on the quantification of mucous cells in the skin of Atlantic salmon, *Salmo salar* L.** Journal of Fish Diseases. v. 36. n. 2. p. 115–127. 2013.

SARASQUETE, C. et al. **Histochemical study of skin and gills of Senegal sole, *Solea senegalensis* larvae and adults.** Histology and Histopathology. v. 13. n. 3. p. 727–735. 1998.

SILVA, L. V. F. DA. **Morfologia, morfometria, distribuição de células mucosas e de cloreto em embriões e larvas de jundiá, *Rhamdia quelen* (Heptapteridae). Efeito do pH e concentrações de cálcio e magnésio na água.** 2006. Tese. Universidade Federal de São Carlos. 2006.

SILVEIRA, U. S. DA; LAGATO, P. V. R.; PONTES, E. DA C. **Fatores estressantes em peixes.** Revista Eletrônica Nutrime. v. 6. p. 1001–1017. 2009.

TIMM, L. de L. **Técnicas rotineiras de preparação e análise de lâminas histológicas.** Caderno La Salle XI, v. 2, n. 1, p. 231-239, 2005.

VAN HEERDEN, D.; VOSLOO, A.; NIKINMAA, M. **Effects of short-term copper exposure on gill structure, metallothionein and hypoxia-inducible factor-1 α (HIF-1 α) levels in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*).** Aquatic toxicology, v. 69, n. 3, p. 271-280, 2004.

WILSON, J. M.; LAURENT, P. **Fish gill morphology: Inside out.** Journal of Experimental Zoology. v. 293. n. 3. p. 192–213. 2002b.