UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA – UNESP

CENTRO DE AQUICULTURA DA UNESP

ESTUDOS MORFOLÓGICOS E HISTOQUÍMICOS DO TUBO DIGESTIVO DE *Hemisorubim platyrhynchos* (VALENCIENNES, 1840)

Claudemir Kuhn Faccioli

Jaboticabal, SP
2012

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA – UNESP

CENTRO DE AQUICULTURA DA UNESP

ESTUDOS MORFOLÓGICOS E HISTOQUÍMICOS DO TUBO DIGESTIVO DE *Hemisorubim platyrhynchos* (VALENCIENNES, 1840)

Claudemir Kuhn Faccioli

Orientador: Prof. Dr. Carlos Alberto Vicentini

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Aquicultura do Centro de Aquicultura da UNESP - CAUNESP, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre

Jaboticabal, SP
2012

Faccioli, Claudemir Kuhn
F138e Estudos Morfológicos e Histoquímicos do Tubo Digestivo de *Hemisorubim platyrhynchos* (Valenciennes, 1840) - - Jaboticabal, 2012
viii, 89 f. : il. ; 29 cm

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Centro de Aquicultura, 2012
Orientador: Carlos Alberto Vicentini
Banca examinadora: Lilian Cristina Makino, Elyara Maria Pereira da Silva
Bibliografia

1. Anatomia. 2. Histologia. 3. Histoquímica. 4. Ultraestrutura.5. Tubo digestivo. I. Título. II. Jaboticabal-Centro de Aquicultura.

CDU 639.31

Ficha catalográfica elaborada pela Seção Técnica de Aquisição e Tratamento da Informação – Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação - UNESP, Câmpus de Jaboticabal.
e-mail: claudemirkf@fc.unesp.br

unesp **UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA**

REITORIA

CENTRO DE AQUICULTURA DA UNESP

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO: ESTUDOS MORFOLÒGICOS E HISTOQUÍMICOS DO TUBO DIGESTIVO DE Hemisorubim platyrhynchos (Valenciennes, 1840)

AUTOR: CLAUDEMIR KUHN FACCIOLI

ORIENTADOR: Prof. Dr. CARLOS ALBERTO VICENTINI

Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de Mestre em Aqüicultura , pela Comissão Examinadora:

Prof. Dr. CARLOS ALBERTO VICENTINI
Departamento de Ciências Biológicas / Faculdade de Ciencias de Bauru

Profa. Dra. ELYARA MARIA PEREIRA DA SILVA
Departamento de Ciências Básicas / Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos de Pirassununga

Profa. Dra. LILIAN CRISTINA MAKINO
PRODOC, Centro de Aquicultura da UNESP/CAUNESP, Jaboticabal

Data da realização: 30 de janeiro de 2012.

"Quanto mais aumenta nosso conhecimento,
mais evidente fica nossa ignorância."
(John Fitzgerald Kennedy)

Pois mais ignorante é o sábio,
que ignora a simplicidade de seus semelhantes.

"A Simplicidade é o último degrau da sabedoria."
(Gibran Kahlil Gibran)

Dedicatória

*Aos meus pais, **Claudemir** e **Ida**, meus maiores mestres.*
A vocês o meu eterno amor e admiração.

Agradecimento especial

Ao meu orientador, ***Prof. Dr. Carlos Alberto Vicentini****, pelos conhecimentos compartilhados que embasaram toda minha formação acadêmico-científica, desde a Graduação, Iniciação Científica, Mestrado e agora no Doutorado. Muito obrigado pelo respeito e confiança.*

Agradecimentos

*A **Deus**, pela Vida, pelas oportunidades e por Sua presença em todos os momentos, iluminando os passos nesta caminhada.*

*Aos meus pais, **Claudemir Faccioli** e **Ida Maria Kuhn Faccioli**, por minha formação, por todo o apoio e estimulo, principalmente com uma simples frase: "Grande homem".*

*Aos meus irmãos, **Raquel** e **Carlos**, por aguentarem e me apoiarem nos momentos alegres e tristes e estarem sempre comigo.*

*À minha grande **família**, sempre presente em todos os momentos da minha vida.*

*À **Profa. Dra. Irene Bastos Franceschini Vicentini**, pela atenção e colaboração, presente em todos os momentos.*

*Ao **Centro de Aquicultura da UNESP (CAUNESP)** – Campus de Jaboticabal, pela oportunidade de dar continuidade à minha formação profissional.*

*Aos **docentes** do CAUNESP, do Dep. de Ciências Biológicas e demais Campus que participaram de minha formação científica, pelo conhecimento compartido.*

*Aos professores das bancas examinadoras, **Profa. Dra. Laura Satiko Okada Nakaghi, Profa. Dra. Lilian Cristina Makino** e **Profa. Dra. Elyara Maria Pereira da Silva**, pelas sugestões para o enriquecimento deste trabalho.*

*Ao **Laboratório de Morfologia de Organismos Aquáticos – LAMOA**, da UNESP – Campus de Bauru por todo suporte oferecido.*

*Ao **Centro de Microscopia Eletrônica do Instituto de Biociências** do Campus de Botucatu – UNESP, pelo processamento do material e disponibilidade dos equipamentos.*

*Ao **Laboratório de Microscopia Eletrônica** da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias do Campus de Jaboticabal – UNESP, pelo processamento do material e disponibilidade dos equipamentos.*

*À amiga mestra **Renata** (e familiares: Jorge, Leni, Daniela e Ricardo), pelo convívio, acompanhamento, ajuda e atenção.*

*As **meninas de Bauru**, Vila-verdeanas de hoje, de ontem e de sempre, pela amizade e ajuda.*

*Aos **companheiros** de apartamento, futebol e churrasco de Bauru.*

*Aos **amigos** de Graduação e Pós-Graduação, pelas discussões nos momentos menos prováveis.*

*Aos **companheiros e amigos do LAMOA**, auxiliando e apoiando meu trabalho.*

*Ao técnico de laboratório, **Antonio Carlos do Amaral**, por todo auxílio, apoio e amizade.*

*À **Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP**, pela concessão da bolsa de estudos (Número de Processo: 2010/02842-0).*

A todos que de contribuíram na minha formação e na realização deste trabalho.

MUITO OBRIGADO!

SUMÁRIO

Lista Geral de Abreviações.....I

Lista de Figuras.....II

Lista de Tabela.....VI

Resumo.....VII

Abstract.....VIII

1. Introdução.....1

1.1 Características morfológicas do tubo digestivo.....2

1.2 Espécie em estudo.....6

1.3 Objetivos.....8

2. Material e Métodos.....9

2.1 Material de estudo.....9

2.2 Anatomia macroscópica.....11

2.3 Histologia.....12

2.4 Histoquímica de mucossubstâncias.....13

2.5 Microscopia eletrônica de varredura.....14

2.6 Microscopia eletrônica de transmissão.....14

3. Resultados.....15

3.1 Esôfago.....16

3.1.1 Mucosa.....17

3.1.2 Lâmina própria e submucosa.....26

3.1.3 Muscular.....26

3.1.4 Serosa.....28

3.2 Transição esôfago/estômago.....29

3.3 Estômago.....32

3.3.1 Mucosa.....36

3.3.2 Submucosa.....43

3.3.3 Muscular.....43

3.3.4 Serosa.....44

3.4 Intestino.....45

3.4.1 Mucosa.....49

3.4.2 Submucosa.....55

3.4.3 Muscular.....55

3.4.4 Serosa.....56

3.5 Reto.....57

3.6 Avaliação geral dos resultados histoquímicos.....60

4. Discussão.....62

5. Conclusões.....81

6. Referências Bibliográficas.....83

Lista geral de abreviações

ab: alcian blue
at: azul de toluidina
be: borda em escova
bn: bexiga natatória
ca: região cárdica
cc: “club cells”
tc: tecido conjuntivo da túnica serosa
ce: célula epitelial
e: epitélio
ep: esfíncter pilórico
es: esôfago
et: estômago
f: fígado
fm: fibra muscular
fu: região fúndica
g: gônada
gc: célula caliciforme
gg: glândulas gástricas
gs: grânulos de secreção
he: hematoxilina e eosina
i: interdigitações de membrana
ia: intestino anterior
im: intestino médio
ip: intestino posterior
lp/s: lâmina própria/submucosa
lp: lâmina própria
lu: lúmen
m: mucosa
mc: camada muscular circular
met: microscopia eletrônica de transmissão
mev: microscopia eletrônica de varredura
mi: mitocôndria
ml: camada muscular longitudinal
mm: muscular da mucosa
n: núcleo
pas: acido periódico de schiff
pi: região pilórica
pl: pregas longitudinais
rer: retículo endoplasmático rugoso
s: serosa
sm: submucosa
vt: sistema vesículo-tubular
vb: vesícula biliar
vs: vaso sanguíneo

Lista de Figuras

Figura 1. Vista aérea das instalações da Piscicultura Pirai, município de Terenos, MS Fonte: Google Maps. Acesso em 05/04/2011.....9

Figura 2. A, B e **C**: Estrutura da piscicultura, com viveiros escavados; **D**: Reservatório onde os exemplares foram mantidos em jejum; **E**: Exemplares adultos de *Hemisorubim platyrhynchos*.....10

Figura 3. A: Vista lateral de exemplar adulto de *Hemisorubim platyrhynchos*; **B**: Vista da região ventral, com destaque para a papila urogenital (seta); **C** e **D**: Incisão ventral para verificação da sintopia entre os órgãos contidos na cavidade peritoneal. Legenda: bn-bexiga natatória; et-estômago; g-gônada; it-intestino.....11

Figura 4. A, B e **C**: Vista ventral de *H. platyrhynchos*, com exposição dos órgãos do sistema digestório. Legenda: et-estômago; ia-intestino anterior; im-intestino médio; ip-intestino posterior; f-fígado; vb-vesícula biliar. 15

Figura 5. Estereomicrografia do esôfago de *H. platythynchos*, evidenciando pregas longitudinais (seta).....16

Figura 6. Superfície da mucosa esofágica de *H. platyrhynchos*, evidenciando microssaliências digitiformes (cabeças de seta). 16

Figura 7: Vista panorâmica da estrutura histológica da região cranial do esôfago de *H. platyrhynchos* (AT). 17

Figura 8. A, B e **C**: Corte transversal do esôfago, evidenciando células epiteliais, células caliciformes e "club cells" (A-AT; B e C-HE); **D**: "Club cells", evidenciando citoplasma eosinófilo e dois núcleos (HE). Legenda: ce-células epiteliais; cc-"club cells"; gc-células caliciformes.....19

Figura 9: MET do epitélio de revestimento esofágico. **A**. Região apical do epitélio de revestimento (Barra 10μm); **B**. Célula epitelial apical, evidenciando microssaliências digitiformes (Barra 1μm); **C**. Junções de membrana entre as células epiteliais (Barra 500nm). Legenda: gc-célula caliciforme; cc-"club cells"; ce-célula epitelial; n-núcleo; microssaliências digitiformes (cabeça de seta); abertura de célula caliciforme (seta preta); mi-mitocôndria; i-interdigitações de membrana; desmossomos (*).....20

Figura 10. A: Corte transversal do esôfago, evidenciando células caliciformes AB positivas e club cells eosinófilas (AB pH 2,5 + Eosina); **B**: Células caliciformes PAS positivas, notar "club cells" PAS negativas (PAS + H); **C**: Células caliciformes AB, notar "club cells" AB negativas (AB pH 2,5 + hematoxilina); **D**: Células caliciformes PAS positivas, evidenciando abertura das células (PAS + Hematoxilina); **E** e **F**: Células caliciformes, evidenciando predominância de mucossubstâncias AB positivas (AB pH2,5 + PAS). Legenda: ce-células epiteliais; cc-"club cells"; gc-células caliciformes. 22

Figura 11: MET do epitélio de revestimento esofágico. **A**. Célula caliciforme esofágica (Barra 5μm); **B**. Região basal de célula caliciforme, evidenciando núcleo e retículo endoplasmático rugoso (Barra 2μm); **C**. Abertura de célula caliciforme (Barra 2μm); **D**: Grânulos de secreção de células caliciformes (Barra 500nm). Legenda: ce-célula epitelial; gc-célula caliciforme; cc-"club cells"; n-núcleo; rer-retículo endoplasmático rugoso; abertura de célula caliciforme (seta preta).....23

Figura 12: Microscopia eletrônica de transmissão de "club cells". **A** e **B**. "club cells" (A-Barra 10μm, B- Barra 5μm); **C**. Membrana plasmática de "club cells", evidenciando interdigitações (Barra 2μm). **D**: Célula "club", evidenciando núcleo irregular e mitocôndrias perinucleares (Barra 1μm). Legenda: cc-"club cells"; ce-célula epitelial; n-núcleo; i-interdigitações de membrana; mitocôndrias (cabeças de seta). 25

Figura 13. A: Corte transversal do esôfago, evidenciando lâmina própria/submucosa (AT); **B**: Transição da camada muscular circular-mc e longitudinal-ml (HE); **C**: Camada muscular circular-mc e longitudinal-ml (AT); **D**: Fibras musculares estriadas-fm da camada muscular circular (HE). Legenda: e-epitélio; ec-*estratum compactum*; el-*estratum laxum*; lp/s-lâmina própria/submucosa; ml-muscular longitudinal interna; mc-muscular circular externa; fm-fibra muscular; vs-vaso sanguíneo, h-hemácia.....27

Figura 14. A, B, C e **D**: Corte transversal do esôfago, evidenciando região de tecido conjuntivo-tc e mesotélio-m da camada serosa (AT). Legenda: mc-camada muscular circular externa; s-camada serosa; tc-tecido conjuntivo da camada serosa; m-mesotélio; vs-vaso sanguíneo.....28

Figura 15: Estrutura histológica da transição esôfago/estômago, indicada pela seta (HE). Legenda: es-esôfago; et-estômago; gg-glândulas gástricas; m-es--camada mucosa esofágica; m-et--camada mucosa gástrica; mc-es--camada muscular circular esofágica; mc-et--camada muscular circular gástrica; ml-es--camada muscular longitudinal esofágica; ml-et--camada muscular longitudinal gástrica.....30

Figura 16. Cortes longitudinais evidenciando a transição esôfago/estômago. **A**: Região final do esôfago, notar pequena quantidade de club cells (HE); **B**: Transição esôfago/estômago, evidenciando mucosa esofágica com células caliciformes e gástrica com região glandular espessa (HE); **C**: Epitélio esofágico estratificado e epitélio gástrico colunar simples (AT); **D** e **E**: Células caliciformes esofágicas e região apical de células epiteliais do estômago PAS positivas; **F**: Pequena quantidade de células caliciformes esofágicas AB positivas e região apical do epitélio gástrico fracamente AB positiva (AB pH 2,5). Legenda: es-esôfago; et-estômago; cc-"club cells"; gc-células caliciformes; gg-glândulas gástricas; mucossubstâncias no ápice de células epiteliais gástricas (cabeças de seta); transição esôfago/estômago (seta)..31

Figura 17. **A**: Estômago de *H. platyrhynchos* recém alimentado com ração comercial; **B** e **C**: Exemplares de *H. platyrhynchos* apresentando presa recém ingerida. Legenda: es-esôfago; et-estômago; ia-intestino anterior; f-fígado; p-presa.....32

Figura 18. A: Vista geral da estrutura interna do esôfago (es), estômago (et) e intestino anterior (ia) de *H. platyrhynchos*; **B**: Transição esôfago/estômago; **C:** Pregas longitudinais na região cárdica; **D**: Região fúndica do estômago, evidenciando pregas gástricas em diferentes orientações. Legenda: es-esôfago; et-estômago; ia-intestino anterior; ca-região cárdica; fu-região fúndica; pi-região pilórica. 33

Figura 19. MEV do estômago de *H. platyrhynchos*. **A:** Pregas gástricas em diferentes orientações; **B**: Superfície gástrica, evidenciando microssaliências arredondadas; **C**: Corte longitudinal, evidenciando região epitelial. 34

Figura 20. Organização histológica do estômago de *H. platyrhynchos*. A: Região cárdica (HE); B: Região pilórica (AT). Legenda: e-epitélio; gg-glândulas gástricas; lp-lâmina própria; mm-muscular da mucosa; sm-submucosa; mc-muscular circular; ml-muscular longitudinal; s-serosa.....35

Figura 21. Camada mucosa da região cárdica do estômago. **A**: Camada glandular espessa (HE); **B**: Grande concentração de glândulas gástricas (AT); **C**: Glândulas gástricas tubulares (HE); **D**: Epitélio gástrico interrompido por criptas gástricas (AT); **E**: Transição da camada mucosa para submucosa, evidenciando muscular da mucosa (HE); **F**: Epitélio colunar simples e região glandular com células eosinófilas (HE). Legenda: e-epitélio; lp-lâmina própria, gg-glândulas gástricas; mm-muscular da mucosa; sm-submucosa; vaso sanguíneo (seta); septos de tecido conjuntivo (cabeças de seta).....36

Figura 22. Camada mucosa da região cárdica do estômago. **A**: Glândulas gástricas na lâmina própria (PAS+H); **B**: Camada apical AB positiva (AB+H); **C**: Epitélio colunar simples, evidenciando região apical PAS positiva (PAS+H); **D**: Glândulas gástricas PAS positivas (PAS+H). Legenda: e-epitélio; gg-glândulas gástricas.....38

Figura 23: Epitélio de revestimento da região cárdica do estômago de *H. platyrhynchos* em MET. **A**. Célula epiteliais com núcleos basais e grânulos de secreção apicais (Barra 10µm); **B**. Célula epitelial, evidenciando núcleo, mitocôndrias e retículo endoplasmático rugoso (Barra 2µm); **C**. Região apical de células epiteliais (Barra 2µm). Legenda: lp-lâmina própria; n-núcleo; gs-grânulos de secreção; mitocôndrias (*).....39

Figura 24. Região pilórica do estômago de *H. platyrhynchos***. A:** Região pilórica, evidenciando ausência de região glandular (HE); **B** e **C**: Epitélio colunar simples, com núcleos basais (B-AT e C-HE); **D** e **E:** Células epiteliais com região apical e lâmina própria PAS positiva (PAS+H); **F**: Transição estômago/intestino, evidenciando mudança do epitélio gástrico com secreções apicais PAS positivas para epitélio intestinal com células absortivas e caliciformes AB positivas (AB pH 2,5 + PAS +H). Legenda: et-estômago; i-intestino; transição estômago/intestino (seta); e-epitélio; lp-lâmina própria; mm-muscular da mucosa; mucossubstâncias gástricas (cabeças de seta); células caliciformes(*).....40

Figura 25: MET das glândulas gástricas. **A**. Glândulas gástricas tubulares (Barra: 5µm); **B**. Célula oxintopéptica, evidenciando núcleo, mitocôndrias e retículo endoplasmático rugoso (Barra: 5µm); **C**. Região basal de célula oxintopéptica (Barra: 1µm); **D** e **E**. Região apical de célula oxintopéptica, com grânulos elentron-lucentes e microvilos (Barra: D-2µm e E-1µm). Legenda: lp-lâmina própria; lu-lúmen; n-núcleo; rer-retículo endoplasmático rugoso; mi-mitocôndrias; vt-sistema vesículo-tubular; grânulos elétron-lucentes (*).....42

Figura 26. A. Região cárdica, evidenciando fibras musculares lisas em orientação circular e longitudinal (HE); **B**: Região pilórica, com camada muscular circular mais espessa (AT); **C** e **D**: Região pilórica, evidenciando esfíncter pilórico (HE). Legenda: et-estômago; i-intestino; m-camada mucosa; sm-submucosa; mc-muscular circular; ml-muscular longitudinal, s-camada serosa; ep-esfíncter pilórico. 44

Figura 27. Estereoscopia da superfície interna das diferentes regiões do intestino de *H. platyrhynchos*. **A, B** e **C**: Região anterior do intestino, evidenciando pregas longitudinais em formato de "S"; **D** e **E**: Pregas longitudinais menores na região posterior do intestino.....45

Figura 28. MEV, em cortes transversais do intestino de *H. platyhrynchos*. **A**: Região anterior, evidenciando pregas longitudinais (seta) e transversais (*) espessas; **B**: Região posterior, evidenciando pregas longitudinais (seta) e transversais delgadas (*).....46

Figura 29. MEV das regiões anterior, médio e posterior do intestino de *H. platyhrynchos*. **A**: Superfície epitelial do intestino anterior, evidenciando baixa concentração de aberturas de células caliciformes (Barra: 10µm); **B**: Superfície epitelial do intestino médio (Barra: 10µm); **C**: Superfície epitelial do intestino posterior, evidenciando alta concentração de aberturas de células caliciformes (Barra: 10µm); **D**: Destaque para microvilosidades e aberturas de células caliciformes (Barra: 5µm). Legenda: abertura de células caliciformes (cabeças de seta).....47

Figura 30: Cortes transversais de regiões intestinais, evidenciando variação em espessura de suas camadas (AT). **A**. Intestino anterior; **B**. Intestino médio; **C**. Intestino posterior. Legenda: m-mucosa; sm-submucosa; mc-muscular circular; ml-muscular longitudinal.....48

Figura 31: Corte transversal do intestino de *H. platyrhynchos*. **A** e **B.** Intestino anterior (AT); **C.** Intestino anterior (HE); **D.** Intestino médio (HE); **E.** Intestino posterior (AT); **F.** Intestino posterior (HE). Legenda: e-epitélio; lp-lâmina própria; sm-submucosa; n-núcleo; células caliciformes (*); borda em escova (cabeças de seta).....50

Figura 32: Reações histoquímicas no intestino de *H. platyrhynchos*. **A.** Intestino anterior (PAS); **B.** Intestino anterior (AB pH 2,5); **C.** Intestino médio (AB pH 2,5); **D.** Intestino médio (PAS); **E.** Intestino posterior (PAS); **F.** Intestino posterior (AB pH 2,5). Legenda: e-epitélio; lp-lâmina própria; n-núcleo; células caliciformes (*); borda em escova (cabeças de seta).....51

Figura 33. Reação AB (pH 2,5) + PAS no intestino de *H. platyrhynchos*. **A** e **B:** Intestino anterior; **C** e **D:** Intestino médio; **E** e **F:** Intestino posterior. Legenda: e-epitélio; lp-lâmina própria; sm-submucosa; células caliciformes (*); borda em escova (cabeças de seta).....52

Figura 34: A: Ultraestrutura do intestino anterior, evidenciando baixa concentração de células caliciformes e de vesículas absortivas eletrondensas (Barra 60µm); **B:** Ultraestrutura do intestino posterior. Notar grande concentração de células caliciformes e de vesículas eletrondensas (Barra 5µm). Legenda: ms-microvilosidades; n-núcleo, estruturas eletrondensas (cabeças de seta branca); mitocôndrias (cabeças de seta preta); lp-lâmina própria; gs-grânulos de secreção; junções de membrana (seta).....53

Figura 35. A. Ultraestrutura da região basal do epitélio intestinal anterior (Barra 2µm); **B**. Junções de membrana no intestino médio (Barra 500nm); **C.** Célula caliciforme no intestino médio, evidenciando a presença de vesículas absortivas nos enterócitos adjacentes (Barra 5µm); **D.** Células do epitélio intestinal posterior. Notar grande concentração de vesículas absortivas e mitocôndrias (Barra 5µm); **E.** Abertura de célula caliciforme no intestino posterior (Barra 1µm); **F.** Região posterior, comparando núcleos de enterócito e de célula caliciforme (Barra 2µm). Legenda: ce-enterócito; gc-célula caliciforme; n-núcleo, mitocôndrias (cabeças de seta preta); rer-retículo endoplasmático rugoso; zo-zônula de oclusão; za-zônula de adesão; d-desmossomo; ms-microvilosidades; gs-grânulos de secreção de célula caliciforme; estruturas eletrondensas (cabeças de seta branca); abertura de célula caliciforme (seta); na-núcleo de enterócito; nc-núcleo de célula caliciforme.....54

Figura 36: Cortes transversais do intestino de *H. platyrhynchos*, comparando a camada muscular da região anterior (**A**) com a muscular da região posterior (**B**). Legenda: m-camada mucosa; sm-submucosa; mc-muscular circular; ml-muscular longitudinal; s-serosa.....56

Figura 37: Cortes transversais da região de transição do intestino posterior para reto de *H. platyrhynchos*. **A**. Pregas longitudinais diminuindo em altura e camada muscular circular espessa (HE); **B, C** e **D:** Epitélio intestinal, evidenciando células epiteliais com região apical com mucossubstâncias e com diminuição no número de células claiciformes (HE). Legenda: sm-submucosa; mc-muscular circular; e-epitélio, ma-mucossubstâncias; c-células caliciformes.....58

Figura 38. Região final do intestino. **A**: Região do reto, evidenciando camada muscular circular espessa e ausência de pregas longitudinais (AT); **B**: Camada mucosa do reto, notar diminuição no número de células caliciformes e a presença de células epiteliais com região apical PAS positiva (PAS + H); **C, D** e **E**: Pregas longitudinais próxima à transição para meio externo (C-AT, D-HE e E-PAS+H); **F**: Transição do epitélio colunar simples do intestino para o epitélio estratificado da pele (PAS+H). Legenda: pl-pregas longitudinais; lp/s-lâmina própria/submucosa; mc-camada muscular circular; e-epitélio; gc-célula caliciforme; mucosubstâncias no região apical das células epiteliais (cabeças de seta); transição epitelial simples para estratificada (*).....59

Figura 39: A: Transição esôfago/estômago (PAS+H); **B** e **C**: Células caliciformes esofágicas (B: AB pH 2,5; C: AB+PAS); **D**: Células epiteliais gástricas com secreções PAS positivas; **E**: Transição estômago/intestino (AB+PAS+H); **F** e **G**: Células caliciformes intestinais (F: PAS+H; G: AB pH 2,5); **H**: Células epiteliais do reto com mucossubstâncias apicais (PAS+H). Legenda: gc-células caliciformes; cc-“club cells”; ce-células epiteliais.....61

Lista de Tabela

Tabela 1. Análise histoquímica de mucossubstâncias nas diferentes regiões do tubo digestivo de *Hemisorubim platyrhynchos*.....61

.....Resumo

Resumo

O conhecimento das características morfológicas do tubo digestivo, associado aos processos de digestão e absorção, é essencial para a compreensão da fisiologia e nutrição de peixes, auxiliando no planejamento de dietas para a criação e manejo de animais com potencial para piscicultura. Assim sendo, este trabalho descreveu o tubo digestivo de *Hemisorubim platyrhynchos*, por meio de estudos macroscópicos, histológicos, histoquímicos de mucossubstâncias e ultraestruturais (microscopia eletrônica de varredura e de transmissão). A estrutura do tubo digestivo de *H. platyrhynchos* é típica de peixes carnívoros, composta por esôfago curto e distensível, estômago volumoso e muscular e intestino curto, com pregas longitudinais que diminuem em direção à região posterior. O esôfago apresentou a camada mucosa revestida por epitélio estratificado pavimentoso, cujas células epiteliais em MET mostraram microssaliências digitiformes, além de "club cells" com citoplasma homogêneo e poucas organelas e células caliciformes com citoplasma repleto de grânulos de secreção. O estômago foi morfologicamente dividido em região cárdica, fúndica e pilórica, com camada mucosa composta por epitélio simples colunar (com mucossubstâncias apicais protetoras) e porção glandular bem desenvolvida nas regiões cárdica e fúndica. A região pilórica aglandular apresentou camada muscular espessa (esfíncter pilórico). O intestino apresentou epitélio simples colunar e células caliciformes aumentando em número na região posterior. As células secretoras apresentaram características morfológicas e histoquímicas distintas em cada segmento do tubo digestivo: células caliciformes esofágicas (muco neutro e ácido, carboxilado e sulfatado); células epiteliais gástricas (muco neutro); células caliciformes no intestino anterior, médio, posterior e células epiteliais na região retal (muco neutro e ácido, carboxilado e sulfatado).

Palavras-chave: anatomia, histologia, histoquímica, ultraestrutura, tubo digestivo.

.....Abstract

Abstract

The knowledge of the morphological features of the digestive tract, associated with the digestion and absorption processes is essential for the understanding of fish nutrition and physiology, assisting in planning diets for the rearing and management of animals with potential for fish farming. Therefore, this paper describes the digestive tract of *Hemisorubim platyrhynchos*, by macroscopic, histological, histochemical of mucosubstances and ultrastructural studies (scanning and transmission electron microscopy). The structure of the digestive tract of *H. platyrhynchos* is typical of carnivorous fish, consisting of short and distensible esophagus, large and muscular stomach, and short intestine with longitudinal folds which decrease towards the posterior region. The esophagus presented the mucosa layer lined by stratified squamous epithelium, which epithelial cells in MET showed fingerprint-like microridges, "club cells" with homogeneous cytoplasm and few organelles and goblet cells filled with secretion granules. The stomach was morphologically divided into the region cardic, fundic and pyloric, with the mucosa layer composed of simple columnar epithelium (with protective mucosubstances apical) and well-developed glandular portion of the cardic and fundic regions. The aglandular pyloric region showed thick muscular layer (pyloric sphincter). The intestine showed simple columnar epithelium and goblet cells increasing in number in the posterior region. The secretory cells showed distinct morphological and histochemical features in each segment of the digestive tract: esophageal goblet cells (neutral and acid mucus, carboxylated and sulfated), gastric epithelial cells (mucus neutral), goblet cells in the anterior, middle and posterior intestine and epithelial cells in the rectal portion (neutral and acid mucus, carboxylated and sulfated).

Keywords: anatomy, histology, histochemical, ultrastructural, digestive tract.

.....1. Introdução

1. Introdução

O Brasil destaca-se como um dos países com maior potencial para a expansão da aquicultura, considerando a crescente demanda mundial por alimentos de origem aquática, não apenas em função da expansão populacional, mas também pela preferência por alimentos mais saudáveis (BAILEY, 1997; VALENTI et al., 2000). A piscicultura brasileira é desenvolvida majoritariamente em água doce e tem como característica uma grande diversidade de espécies, existentes em diferentes níveis de cultivo (HILSDORF e MOREIRA, 2004).

Segundo Beerli et al. (2004), o Brasil possui grande potencial hídrico e climático, o que possibilita a criação de diversas espécies de peixes. Contudo, a piscicultura ainda apresenta resultados modestos de desenvolvimento, devido aos processos de produção adotados e à falta de informações sobre as espécies nativas com potencial zootécnico.

Diante disso, estudos que atentem para o melhoramento dos processos de produção, bem como para a biologia das espécies nativas, apresentam-se como prioritários para melhorar o cenário atual da piscicultura, proporcionando subsídios para a produção de peixes em cativeiro. De acordo com Castro et al. (2002), pesquisas morfofisiológicas do tubo digestivo de espécies nativas são indispensáveis para embasar estudos direcionados para a criação de tais espécies, visando aumentar a produtividade e diminuir custos de produção e mortalidade.

De acordo com Kubitza (1999), o Brasil possui uma grande diversidade de peixes carnívoros de destacado potencial de mercado, quer seja como “peixe de mesa”, esportivos ou ornamentais. Diante dessa diversidade, estudos vêm sendo realizados com objetivo de relacionar as características estruturais do aparelho digestivo de peixes com seus hábitos e comportamentos alimentares (SEIXAS FILHO et al., 2001). Segundo Kubitza (1999), o conhecimento da preferência alimentar de uma determinada espécie é útil para o

desenvolvimento de estudos nutricionais e alimentares, preparo de rações e manejo da alimentação.

1.1 Características morfológicas do tubo digestivo

Quanto às características anatômicas do esôfago em peixes, Hernández et al. (2008) observaram, em *Rhamdia quelen*, que o esôfago é um tubo curto e musculoso composto por uma camada mucosa com dobras primárias, secundárias e algumas dobras terciárias com disposições longitudinais. Estas aparecem desde a região da faringe, sendo mais abundante na porção posterior do esôfago, o que permite uma ampla distensão para deglutir o alimento. Em *Pseudoplatystoma coruscans*, Cal (2006) observou que a mucosa esofágica apresenta pregas longitudinais, as quais possibilitam maior extensibilidade ao órgão, facilitando a condução do alimento da cavidade bucofaríngea ao estômago.

Em relação à anatomia do estômago de teleósteos, Bértin (1958), propôs três categorias anatômicas gerais: sifonal, cecal e retilíneo. Por sua vez, Nikolski (1963) observou que espécies carnívoras predadoras, como *Cichla temensis*, apresentam estômago grande e intestino curto, ao passo que espécies herbívoras, como *Tilapia heudeloti*, apresentam estômago curto e intestino longo. Em *Pseudoplatystoma coruscans*, espécie carnívora, o estômago possui formato de “J” e apresenta três porções: cárdica, localizada logo após a região de transição esôfago-gástrica; fúndica, com posição intermediária, e pilórica, sendo a região terminal (CAL, 2006). Em *Prochilodus lineatus*, Moraes et al. (1997) observaram que o estômago é do tipo fúndico em formato de "U", com as regiões cárdica e pilórica longas e a fúndica curta e arredondada. Em *Rhamdia quelen*, o estômago, em forma de “J”, é um saco muscular que apresenta dobras amplas e profundas quando em estado de repouso (HERNÁNDEZ et al., 2008).

Em relação à morfologia do intestino em peixes, existem diferentes critérios e grande discordância na literatura referente à divisão de seus segmentos. Alguns estudos estão fundamentados em características anatômicas, outros na histologia, e, ainda outros, em considerações funcionais (LOGATO, 1995). Segundo critérios histofisiológicos, o intestino pode ser dividido em: região anterior, relacionado com a absorção de gorduras (NACHI et al., 1998); região medial, responsável pela absorção de macromoléculas protéicas (STROBAND e KROON, 1981; STROBAND e van der VEEN, 1981); região posterior, relacionado com a absorção de água e eletrólitos (STROBAND et al., 1979).

Em *Pseudoplatystoma coruscans,* Cal (2006) observou que a parede intestinal é pouco espessa quando comparada à do estômago e o intestino foi dividido em: proximal, médio e distal ou reto. Em *Rhamdia quelen*, o intestino foi dividido em quatro partes: ascendente, descendente, convoluta e terminal (HERNÁNDEZ et al., 2008).

Em relação às características histológicas do tubo digestivo, Díaz et al. (2006) afirmaram que, embora existam grandes diferenças entre as espécies, a parede do tubo digestivo de peixes, assim como de outras espécies de vertebrados é composta por quatro camadas: mucosa, submucosa, muscular e serosa. Estudos têm indicado que algumas pequenas diferenças nas estruturas histológicas do trato digestivo de peixes estão relacionadas com o hábito alimentar, tipo de alimento ingerido, idade, comprimento e peso do corpo (MURRAY et al., 1994).

O esôfago apresenta a camada mucosa com epitélio de revestimento variável de acordo com a espécie estudada, podendo ser colunar simples, como em *Chelmon rostratus* (TAN e TEH, 1974), pseudoestratificado, como em *Leporinus taeniofasciatus* (ALBRECHT et al., 2001) e estratificado pavimentoso, como em *Pseudoplatystoma coruscans* (CAL, 2006). De acordo com Martin e Blaber (1984), o epitélio esofágico, em *Ambassis productus, Ambassis natalensis,* e *Ambassis gymnocephalus,* apresentou-se estratificado na porção anterior e colunar simples na porção posterior.

Díaz et al. (2003) observaram que a região cranial do esôfago de *Engraulis anchoita* é revestida por algumas camadas de epitélio estratificado pavimentoso com numerosas células caliciformes na região apical. Na região caudal, este epitélio é substituído por um epitélio colunar simples, estando envolvido nos processos de secreção. Segundo Albrecht et al. (2001), a mucosa do esôfago de *Leporinus friderici* consiste em um epitélio pseudoestratificado na porção cranial e estratificado no restante do órgão. Em *Pseudoplatystoma coruscans*, Cal (2006) observou que a mucosa esofágica é constituída por epitélio e lâmina própria e não apresenta a subcamada muscular da mucosa. Também foi constatado pelo autor, a existência de três tipos celulares no epitélio esofágico: células epiteliais, caliciformes e claviformes.

As células caliciformes são secretoras de mucossubstâncias, que lubrificam a superfície do órgão, protegendo contra abrasão e lesão provocadas pela passagem de alimento (GALVÃO et al., 1997) e contra ação das glicosidases de microorganismos patogênicos (DÍAZ et al., 2008). A secreção mucosa das células secretoras, em geral, é composta por uma mistura de proteínas altamente glicosiladas, denominadas mucinas, bem como proteoglicanos e eletrólitos (GÓES e TABOGA, 2005). As mucinas estão agrupadas dentro das glicoproteínas, conjugados de carboidratos e proteínas estabelecidos por ligação covalente, conhecida como ligação O-glicosídica (O-ligação). De acordo com Ezeasor (1984), existem três tipos de células produtoras de mucosubstâncias no esôfago: de secreções neutras, ácidas ou ambas.

Sobre a histologia do estômago, Petrini (1961) observou em *Plecostomus plecostomus* que o epitélio é do tipo pavimentoso simples, tornando-se colunar simples na região pilórica. O revestimento epitelial gástrico apresenta mucossubstâncias apicais PAS positivas na maioria das espécies estudas, como *Pseudoplatystoma coruscans* (Cal, 2006), *Anguilla anguilla* (DOMENEGHINI et al., 2005), *Rhamdia quelen* (Hernández et al., 2008), *Cynoscion guatucupa* (DÍAZ et al., 2008). Em *Rhamdia quelen*, Hernández et al. (2008) observaram que

o estômago apresentou três regiões histologicamente diferenciadas: cárdica (não glandular), fúndica (glandular e mais desenvolvido) e pilórica (menos desenvolvida). Em *Prochilodus lineatus*, Moraes et al. (1997) detectaram que no estômago a região cárdica apresenta mucosa bem desenvolvida, repleta de glândulas tubulosas em sua lâmina própria; a região fúndica é aglandular, com a camada muscular muito desenvolvida; e a região pilórica também não apresenta glândulas gástricas, possuindo camada muscular espessa. Em *Pseudoplatystoma coruscans*, Cal (2006) observou que a mucosa gástrica é constituída por epitélio, membrana basal, lâmina própria e apresentou-se marcadamente espessa devido à presença de glândulas gástricas, podendo apresentar pregas gástricas largas e simples em alguns pontos do estômago. Segundo Domeneghini et al. (1998), na maioria dos teleósteos as glândulas gástricas estão localizados nas regiões cárdica e fúndica.

No que diz respeito à histologia do intestino, em *Rhamdia quelen*, a mucosa é revestida por epitélio colunar simples com dois tipos celulares: de absorção ou enterócitos, que são células colunares com núcleo oval e microvilosidades na região apical; e caliciformes, que estão arranjadas entre os enterócitos, aumentando em número para a porção final do intestino (HERNÁNDEZ et al., 2008). Segundo Grau et al. (1992), a caracterização histoquímica de mucossubstâncias do canal alimentar em peixes, varia consideravelmente de acordo com a espécie estudada e com cada região do tubo digestivo.

Quanto à função, as mucossubstâncias digestivas, que são predominantemente compostas por glicoconjugados, provavelmente estão envolvidas em diversos processos fisiológicos, entre os quais lubrificação, digestão, promoção da absorção macromolecular, tampão de fluido intestinal, prevenção de danos proteolíticos ao epitélio e defesa contra bactérias e outros agentes patogênicos. Assim, a região apical do epitélio gastrointestinal de peixes e seus glicoconjugados secretados têm um papel fundamental na mediação das relações entre o ambiente externo e o corpo (DOMENEGHINI et al., 2005).

Segundo Ferraris et al. (1987), glicoconjugados ácidos evitam danos ao epitélio intestinal, agindo como um lubrificante para o conteúdo do estômago e como um tampão para os sucos altamente ácidos. Ainda, segundo Díaz et al. (2008) glicoconjugados sulfatados revelados por reação com Alcian Blue podem ser responsáveis por um aumento da viscosidade das secreções. Segundo Gisbert et al. (2004), mucossubstâncias neutras (PAS positivas) protegem o epitélio gástrico contra a auto-digestão provocada por ácidos e enzimas digestivas produzidas pelas glândulas gástricas.

1.2 Espécie em estudo

A espécie *Hemisorubim platyrhynchos*, conhecida popularmente como jurupoca, pertence à ordem dos Siluriformes e à família Pimelodidae. Habita regiões profundas das grandes bacias hidrográficas sul-americanas (LUNDBERG e LITTMANN, 2003) e apresenta ampla distribuição, ocorrendo nas bacias dos rios Orinoco, Amazonas, Paraguai, Uruguai e Paraná, em geral nos rios de médio a grande porte (BRESSAN et al., 2009). Este animal é considerado um peixe de tamanho médio, atingindo aproximadamente 63,0cm. Vive no fundo de rios, entre rochas e troncos submersos. À noite, procura suas presas nas margens dos rios (PENHA, 2003).

A jurupoca apresenta “focinho” achatado, cor acinzentada ou cinza-rosada no dorso e parte dos flancos, cerca de oito máculas longitudinais, três pares de barbilhões (um maxilar e dois mentonianos), e nadadeira adiposa desenvolvida. Possui boca quase terminal, mandíbula levemente prognata, com placas dentígeras em ambas as maxilas. Alimenta-se em ambientes lóticos e lênticos, é um animal piscívoro noturno, sendo também predador da microfauna bentônica (LUNDBERG e LITTMANN, 2003). A jurupoca não apresenta cuidado parental, realiza grandes migrações, reproduzindo-se de novembro a janeiro. A primeira maturação gonadal ocorre com cerca de 30,0cm de comprimento (CAROLSFELD et al., 2003).

Esta espécie apresenta grande potencial de consumo com representativo valor na produção pesqueira de águas interiores, devido ao tamanho e à qualidade da carne (MACELO-SANTOS et al., 2009). De acordo com Catella (2001), mesmo sendo um peixe de couro, a jurupoca é muito apreciada no Pantanal e apresentou despesca na Bacia do Alto Paraguai de aproximadamente 50 toneladas entre 1994 e 1999.

Em geral, os membros da família Pimelodidae são importantes na pesca comercial, incluindo grandes "bagres" como pintado (*Pseudoplatystoma coruscans*), cachara (*Pseudoplatystoma fasciatum*), jau (*Zungaro jahu*), barbado (*Pirinampus pirinampu*), pirarara (*Phractocephalus hemioliopterus*) e piraiba (*Brachyplatystoma filamentosum*). Outras espécies, devido ao padrão de coloração, são apreciadas por aquariofilistas.

Contudo, a jurupoca está ameaçada de extinção no Estado de São Paulo, segundo informações apresentadas no livro "Fauna ameaçada de extinção no Estado de São Paulo: Vertebrados" (BRESSAN et al., 2009). Segundo os autores, é uma espécie rara e que sofre com a destruição do hábitat em decorrência da construção de hidrelétricas. A sequência de barragens para instalação de usinas hidrelétricas é a principal ameaça à espécie, pois interrompe o fluxo migratório necessário à sua reprodução. Atualmente, apresenta tamanho populacional reduzido e em declínio pela diminuição contínua em área, extensão ou qualidade do hábitat, além de sua distribuição geográfica estar altamente fragmentada no Estado, permanecendo como populações isoladas em diversos reservatórios.

1.3 Objetivos

Diante do exposto e considerando-se os estudos prévios realizados por Faccioli (2009), sobre o desenvolvimento do sistema digestório em eleuteroembriões e larvas de *Hemisorubim platyrhynchos*, o presente trabalho visou dar continuidade aos estudos inicialmente realizados e contribuir com novos conhecimentos em relação aos aspectos histológicos, histoquímicos e ultraestruturais do tubo digestivo de peixes carnívoros, considerando que não foram encontrados estudos dessa natureza em exemplares adultos de *Hemisorubim platyrhynchos*.

Assim, foram analisadas:

- as características anatômicas gerais do tubo digestivo, com ênfase nas características anatômicas do tubo digestivo e suas relações com os demais órgãos da cavidade peritoneal. Ainda, foram realizados estudos de microscopia eletrônica de varredura da superfície interna dos diferentes segmentos do tubo digestivo (esôfago, estômago e intestino);

- as características histológicas e histoquímicas do tubo digestivo, com ênfase para a detecção de mucopolissacarídeos (neutros e ácidos) no epitélio de revestimento;

- as características ultraestruturais do epitélio de revestimento do esôfago, estômago (regiões cárdica, fúndica, pilórica) e intestino (anterior, médio e posterior) com microscopia eletrônica de transmissão.

.....2. Material e Métodos

2. Material e Métodos

2.1 Material de estudo

No presente trabalho foram utilizados 21 exemplares adultos de *Hemisorubim platyrhynchos* provenientes da piscicultura Pirai, município de Terenos, Estado do Mato Grosso do Sul, Brasil (Figura 1). As coletas foram realizadas em abril de 2010 (para as análises anatômicas, histológicas, histoquímicas) e janeiro de 2011 (para as análises ultraestruturais). Os animais apresentavam comprimento-padrão de 32,0 a 38,0cm e foram capturados com auxílio de redes de arrasto em viveiros escavados, e a seguir, transferidos para tanques de dois mil litros (Figura 2). Três animais foram eutanasiados imediatamente após captura e 18 foram mantidos em jejum por três dias, sendo posteriormente eutanasiados. O jejum de três dias permitiu o esvaziamento do tubo digestivo desses peixes (SEIXAS-FILHO et al., 2001).

Figura 1. Vista aérea das instalações da Piscicultura Pirai, município de Terenos, MS Fonte: Google Maps. Acesso em 05/04/2011.

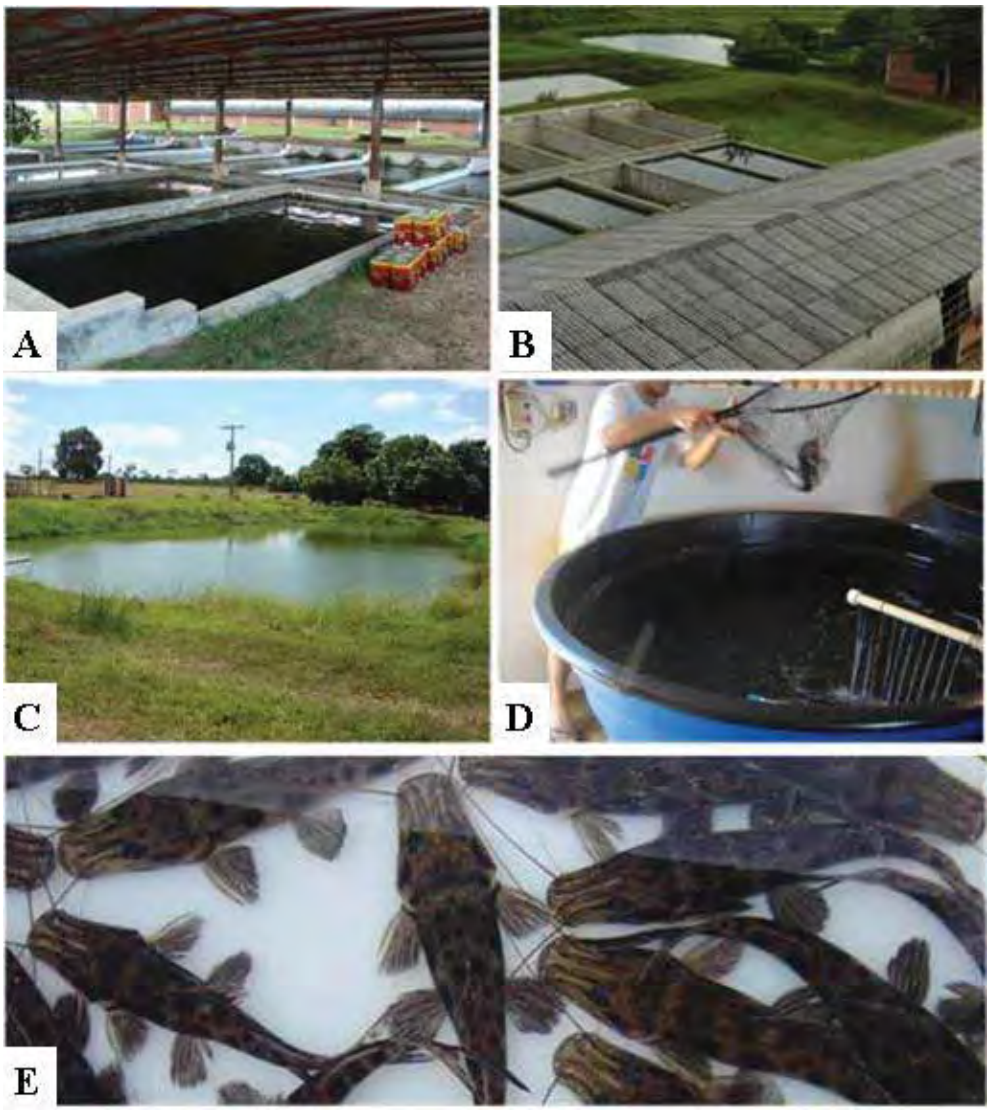

Figura 2. A, B e **C**: Estrutura da piscicultura, com viveiros escavados; **D**: Reservatório onde os exemplares foram mantidos em jejum; **E**: Exemplares adultos de *Hemisorubim platyrhynchos*.

Os animais foram anestesiados em solução de cloridrato de benzocaína 0,1% e sofreram imediata contenção fisiológica por meio de secção transversal da medula espinhal imediatamente após a região occipital (SEIXAS-FILHO et al., 2001). Em seguida, foi feita uma incisão longitudinal na região ventral dos peixes para análise e retirada dos órgãos do tubo digestivo (Figura 3). Fragmentos de esôfago, estômago (regiões de cárdica, fúndica e pilórica) e intestino (anterior, médio, posterior e reto) foram fixados em soluções apropriadas, de acordo com os diferentes grupos de estudo: anatomia macroscópica, histologia, histoquímica de mucossubstâncias e microscopia eletrônica de varredura e transmissão.

Cabe destacar que o presente estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética para Pesquisa, da Faculdade de Ciências da Universidade Estadual Paulista - UNESP, Bauru, SP, Brasil, sob o protocolo nº 1144/46/01/10.

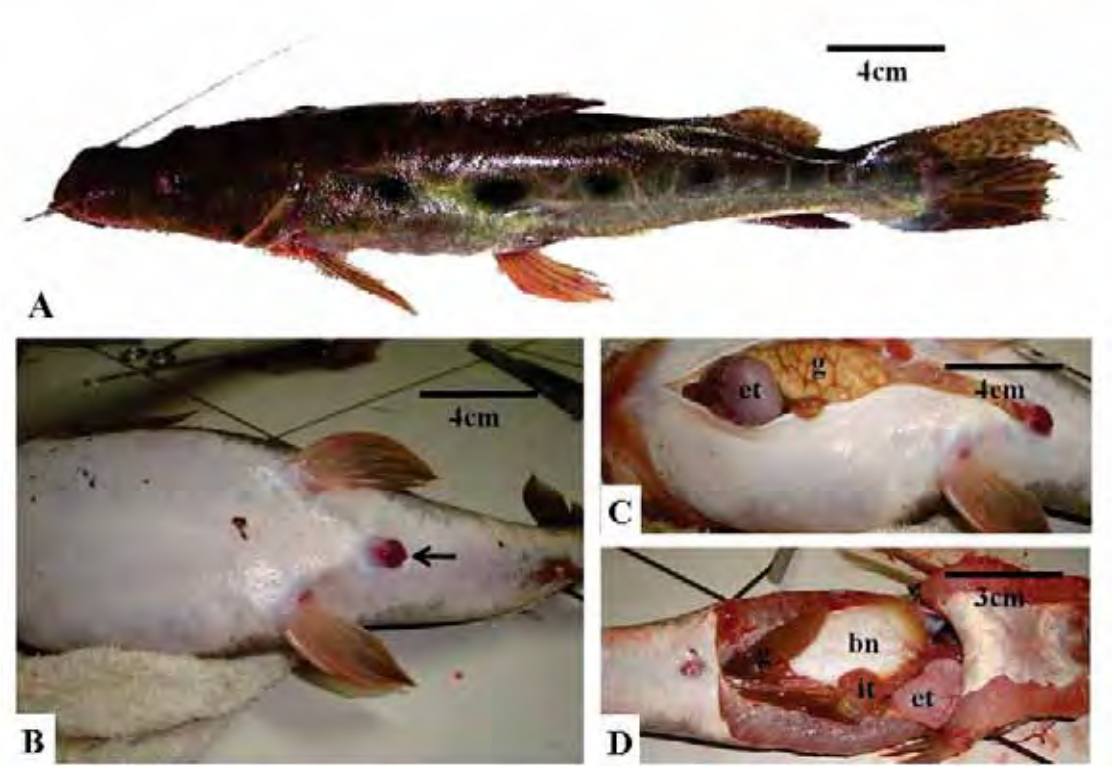

Figura 3. A: Vista lateral de exemplar adulto de *Hemisorubim platyrhynchos*; **B**: Vista da região ventral, com destaque para a papila urogenital (seta); **C** e **D**: Incisão ventral para verificação da sintopia entre os órgãos contidos na cavidade peritoneal. Legenda: BN-bexiga natatória; ET-estômago; G-gônada; IT-intestino.

2.2 Anatomia macroscópica

Para os estudos anatômicos foram utilizados dois exemplares adultos mantidos em jejum durante três dias, sendo determinado a seguir o comprimento total de cada indivíduo. Também foram utilizados dois animais adultos recém alimentados, para observação *in situ* da capacidade de distensão dos órgãos do tubo digestivo. A seguir, os animais foram dissecados para análise e fotodocumentação do sistema digestório *in situ*, sendo também realizada a biometria dos diferentes segmentos do tubo digestivo com auxílio de paquímetro. Um exemplar foi mantido inteiro em solução de formalina 10% e enviado para identificação e composição da coleção de peixes do Departamento de Zoologia e Botânica da UNESP de São

José do Rio Preto. O tubo digestivo dos outros peixes foi retirado e fixado em formalina 10% para fotodocumentação com auxílio de estereoscópio Olympus® e máquina fotográfica digital Kodak® EasyShare C743 (7.1 mega pixels).

2.3 Histologia

Os fragmentos do tubo digestivo destinados às análises histológicas foram coletados de cinco exemplares adultos de *Hemisorubim platyrhynchos* mantidos em jejum durante três dias e foram fixados em solução de Karnovsky modificado (glutaraldeído a 2,5% e paraformaldeído a 4% em solução tampão de fosfato de sódio pH 7,2 e 0,2M). Posteriormente, os segmentos foram transferidos para a solução de etanol 70% e conservados em geladeira. O material então foi destinado à rotina de inclusão em historesina (Leica®, Alemanha). Para tanto, os fragmentos foram desidratados em séries de concentrações crescentes de etanol: três banhos em etanol 80% (30 minutos cada), três banhos em etanol 90% (30 minutos cada), três banhos em etanol 95% (30 minutos cada) e três banhos em etanol absoluto (30 minutos cada). Em seguida, foram mantidos por 24 horas em solução de pré-infiltração (resina e etanol absoluto, na proporção 1:1). A seguir, as amostras permaneceram por 24 horas em solução de infiltração de resina, para posteriormente serem incluídas em histomoldes contendo resina com solução endurecedora, sendo mantidos por 48 horas em estufa, a 60 °C, para completar a polimerização da resina.

Secções histológicas (2,0 - 4,0μm de espessura) foram realizadas com navalhas de vidro, em micrótomo automático RM2265 (Leica®, Alemanha), no Laboratório de Morfologia de Organismos Aquáticos da Faculdade de Ciências da UNESP, Campus de Bauru.

Posteriormente, as secções foram submetidas à rotina de coloração com azul de toluidina a 1% - AT, hematoxilina e eosina - HE (BANCROFT e GAMBLE, 2002). De acordo com Junqueira e Junqueira (1983), o azul de toluidina forma ligações eletrostáticas com os radicais ácidos presentes nos tecidos, culminando em reações de metacromasia com

mucinas, por estas serem altamente aniônicas e o azul de toluidina ser catiônico. Segundo Góes e Taboga (2005), o conteúdo de vesículas de secreção de células epiteliais especializadas na secreção de muco é de fácil visualização após o uso de corantes catiônicos, como o alcian blue - AB, azul de toluidina ou de técnicas citoquímicas específicas para a identificação de carboidratos, tais como a reação com o ácido periódico de Schiff - PAS.

O material histológico foi fotodocumentado com auxílio de microscópio Olympus® BX40f4 com câmera Olympus® DP12 acoplada.

2.4 Histoquímica de mucossubstâncias

Os segmentos dos órgãos do tubo digestivo destinados às análises histoquímicas foram retirados de cinco exemplares adultos de *Hemisorubim platyrhynchos* mantidos em jejum por três dias. Para tanto, os fragmentos foram fixados em solução de Bouin e destinados à rotina de inclusão em paraplast (Oxford®, EUA). Secções histológicas de 5,0 – 7,0μm de espessura foram obtidas com navalhas descartáveis, em micrótomo rotativo American Optical® (EUA).

Os estudos histoquímicos foram realizados por meio de reações com ácido periódico de Schiff (PAS), Alcian Blue (AB pH 1,0 e pH 2,5) e AB (pH 2,5) + PAS, conforme preconizado por Cao e Wang (2009). As reações com PAS permitiram evidenciar a presença de polissacarídeos neutros, que possuem grupo glicol em suas estruturas. As reações com AB, em diferentes pHs, permitiram visualizar a presença de polissacarídeos ácidos e distingui-los em sulfatados e carboxilados. Segundo Junqueira e Junqueira (1983), AB pH 1,0 reage com polissacarídeos fortemente sulfatados, AB com pH 1,7 a 3,2 reage com polissacarídeos carboxilados.

As lâminas foram fotodocumentadas com o auxílio de microscópio Olympus® BX40f4 com câmera Olympus® DP12 acoplada.

2.5 Microscopia eletrônica de varredura - MEV

Para estudos de microscopia eletrônica de varredura, alguns fragmentos do tubo digestivo de dois animais foram pré-fixados em solução de Karnovsky modificado (glutaraldeído a 2,5% e paraformaldeído a 4% em solução tampão de fosfato de sódio pH 7,2 e 0,2M), para posterior análise da superfície interna por meio de MEV. As amostras foram pós-fixadas em solução tamponada de tetróxido de ósmio a 1%, durante duas horas. Após desidratação em séries graduadas de concentrações crescentes de álcool etílico, as amostras passaram pelo secador de ponto crítico - EMS 850 (Emitech®, EUA) e então foram montadas em bases metálicas e metalizadas com uma mistura coloidal de ouro-paládio em aparelho Balzers® MED-010. A análise e fotodocumentação foram realizadas em microscópio eletrônico de varredura JSM- 5410 (Jeol®, EUA), do Laboratório de Microscopia Eletrônica da Faculdade Ciências Agrárias e Veterinárias da UNESP, Campus de Jaboticabal.

2.6 Microscopia eletrônica de transmissão - MET

Para análise das características ultraestruturais do epitélio de revestimento do tubo digestivo de *Hemisorubim platyrhynchos* foram utilizados cinco exemplares adultos. Os fragmentos de tecidos foram fixados em solução de Karnovsky modificado, durante quatro horas e destinados a rotina de MET, de acordo com a rotina do Centro de Microscopia Eletrônica do Instituto de Biociências da UNESP, Campus de Botucatu. O material foi pós-fixados em tetróxido de ósmio a 1% em tampão fosfato 0,1M, pH 7,3 durante três horas, desidratado e incluído em resina araldite (Poliscience®, EUA). Em seguida, secções de 0,5µm foram obtidas em micrótomo automático RM2265 (Leica®, Alemanha) e coradas com azul de toluidina para escolha de campos. A seguir, secções de 500 a 700Å foram obtidas em ultramicrótomo Ultracut UCT (Leica®, Alemanha), equipado com navalha de diamante, montadas em telas de cobre e contrastadas com acetato de uranila e citrato de chumbo. A fotodocumentação foi realizada em microscópio eletrônico de transmissão Philips® (CM 100).

.....3. Resultados

3. Resultados

O tubo digestivo de *H. platythynchos* estendeu-se ao longo da cavidade peritoneal, sendo observado com maior destaque, nas preparações anatômicas, o estômago com formato arredondado e ricamente vascularizado, e o intestino alongado, situado ventralmente à bexiga natatória (Figuras 4A - 4C). O tubo digestivo foi dividido, para fins descritivos, nas seguintes regiões: esôfago, estômago (regiões cárdica, fúndica e pilórica) e intestino (anterior, médio, posterior e reto), apresentando 17,43 ±1,27cm de comprimento, do início do esôfago ao final do intestino.

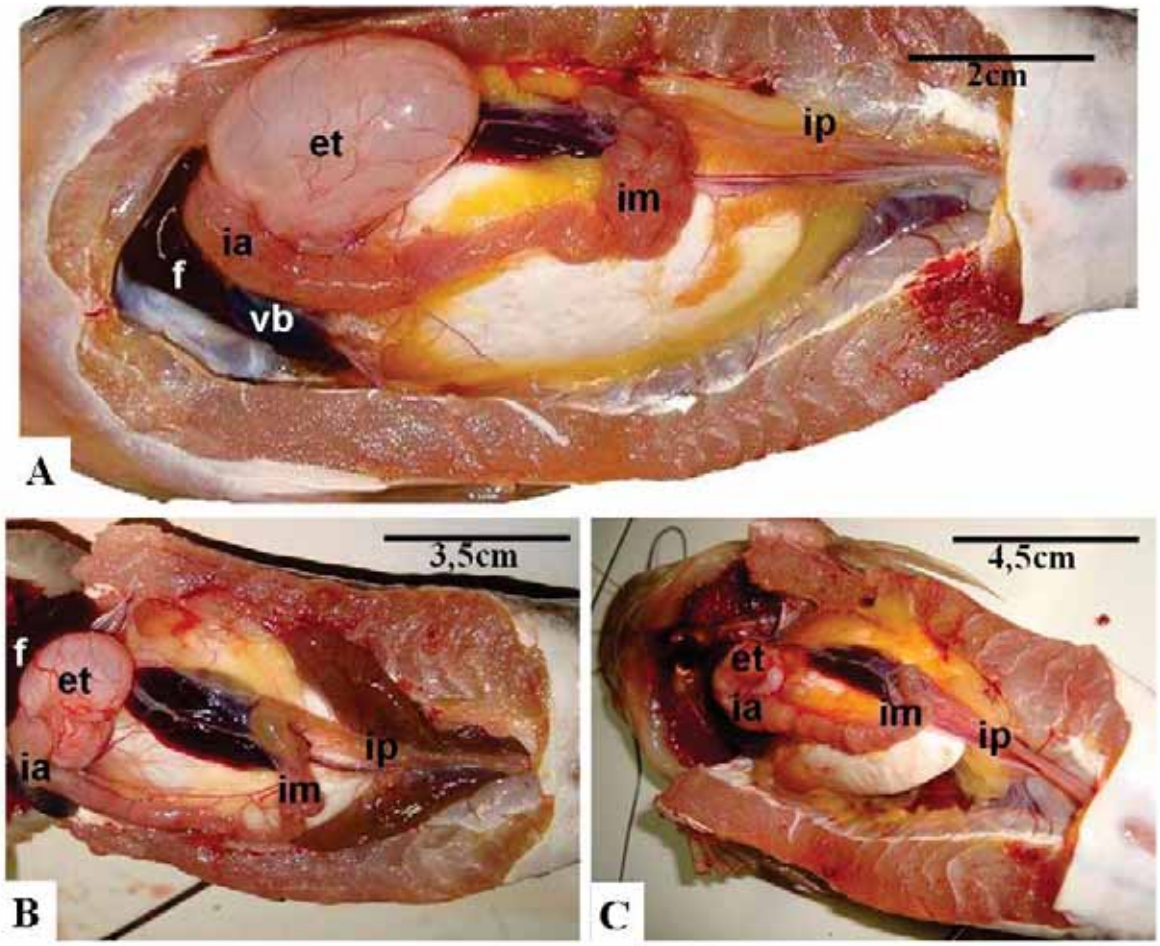

Figura 4. A, B e **C**: Vista ventral de *H. platyrhynchos*, com exposição dos órgãos do sistema digestório. Legenda: et-estômago; ia-intestino anterior; im-intestino médio; ip-intestino posterior; f-fígado; vb-vesícula biliar.

3.1 Esôfago

O esôfago na espécie estudada apresentou-se como um órgão tubular, curto, que conectava a cavidade bucofaríngea ao estômago. As extremidades do esôfago eram expandidas, enquanto que a região medial apresentou-se mais estreita. Internamente foram observadas pregas longitudinais espessas ao longo de toda sua extensão (Figura 5).

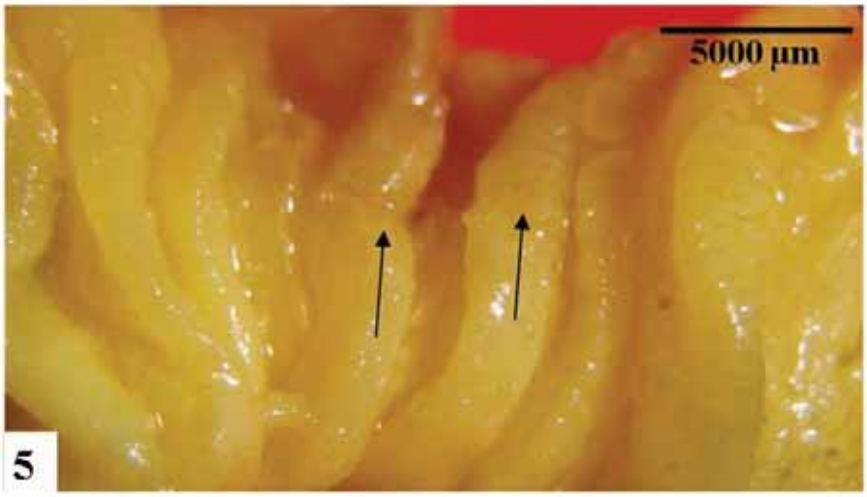

Figura 5. Estereomicrografia do esôfago de *H. platythynchos*, evidenciando pregas longitudinais (setas).

As observações complementares em MEV possibilitaram o detalhamento da arquitetura das pregas esofágicas. Na superfície da mucosa esofágica foram observadas microssaliências digitiformes (Figura 6).

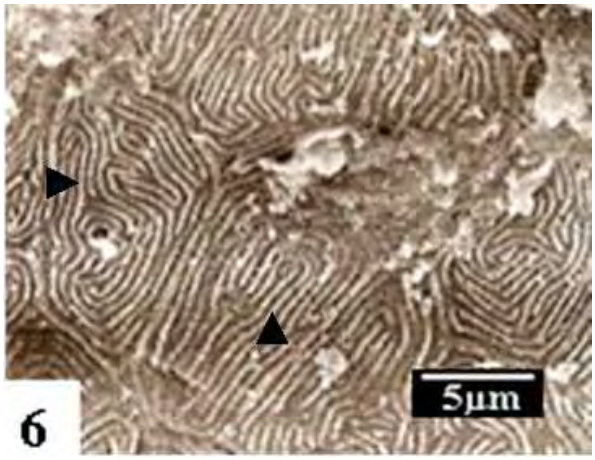

Figura 6. Superfície da mucosa esofágica de *H. platyrhynchos*, evidenciando microssaliências digitiformes (cabeças de seta).

3.1.1 Mucosa

A camada mucosa do esôfago apresentou epitélio de revestimento estratificado (Figura 7), composto por células epiteliais, células caliciformes e "club cells" (Figuras 8A – 8C).

- Células epiteliais: foram observadas em diversos estratos do epitélio de revestimento (Figuras 8A - 8C). O epitélio esofágico descrito como estratificado pavimentoso apresentou células epiteliais colunares e/ou cúbicas na região basal do epitélio, células epiteliais intermediárias delgadas entre as células caliciformes e as "club cells" e células epiteliais delgadas na região apical do epitélio.

Em MET, as células epiteliais apicais apresentaram menor eletrondensidade em relação às células epiteliais intermediárias e basais. Estas células formaram uma camada apical contínua de revestimento do epitélio esofágico, sendo interrompida pela abertura das células caliciformes (Figura 9A).

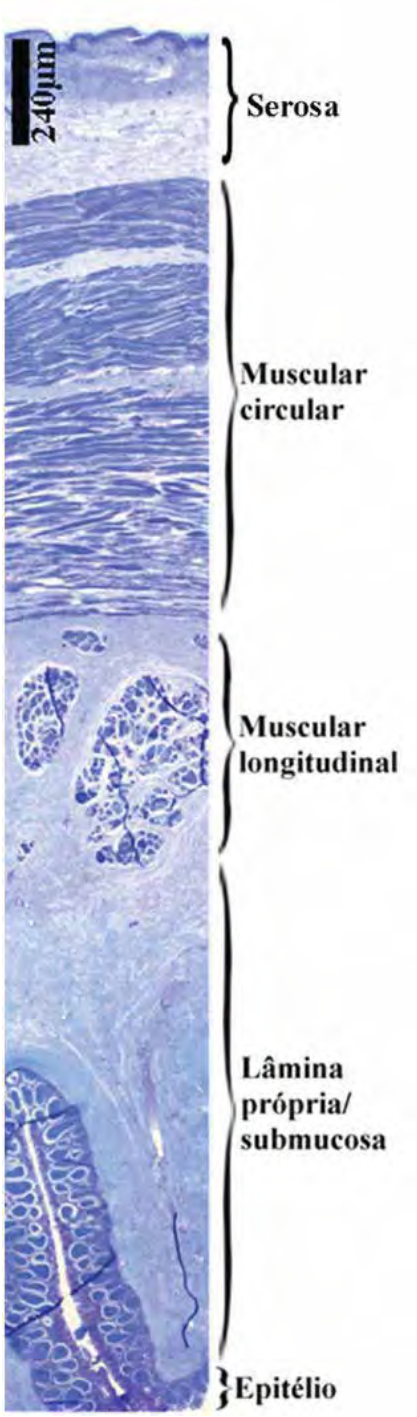

Figura 7: Vista panorâmica da estrutura histológica da região cranial do esôfago de *H. platyrhynchos* (AT).

As células epiteliais apicais apresentaram núcleo central, com cromatina descondensada, mas também com porções de heterocromatina, e nucléolo evidente (Figura 9B). Mitocôndrias e retículo endoplasmático rugoso foram observados em pequena quantidade no citoplasma (Figura 9B). A superfície apical das células

epiteliais apresentou microssaliências digitiformes (Figuras 9A – 9C). Em relação à membrana plasmática entre as células adjacentes, observou-se uma grande quantidade de junções intercelulares (Figura 9C). Essas junções eram compostas principalmente de desmossomos e interdigitações de membrana. Ainda no citoplasma das células epiteliais, observou-se grande quantidade de filamentos intermediários, partindo dos desmossomos.

Entre as células caliciformes e as "club cells" foram observadas células epiteliais intermediárias achatadas formando um revestimento ao redor destas. Mesmo em posição medial, as células epiteliais apresentaram constituição similar às células epiteliais apicais, com núcleo central, poucas mitocôndrias e retículo endoplasmático rugoso. As células epiteliais basais também apresentaram constituição semelhante, porém, eram mais altas em relação às outras células epiteliais. Ainda que as células epiteliais estivessem em região medial e/ou basal do epitélio, foram observadas muitos desmossomos e interdigitações de membrana e filamentos intermediários no citoplasma.

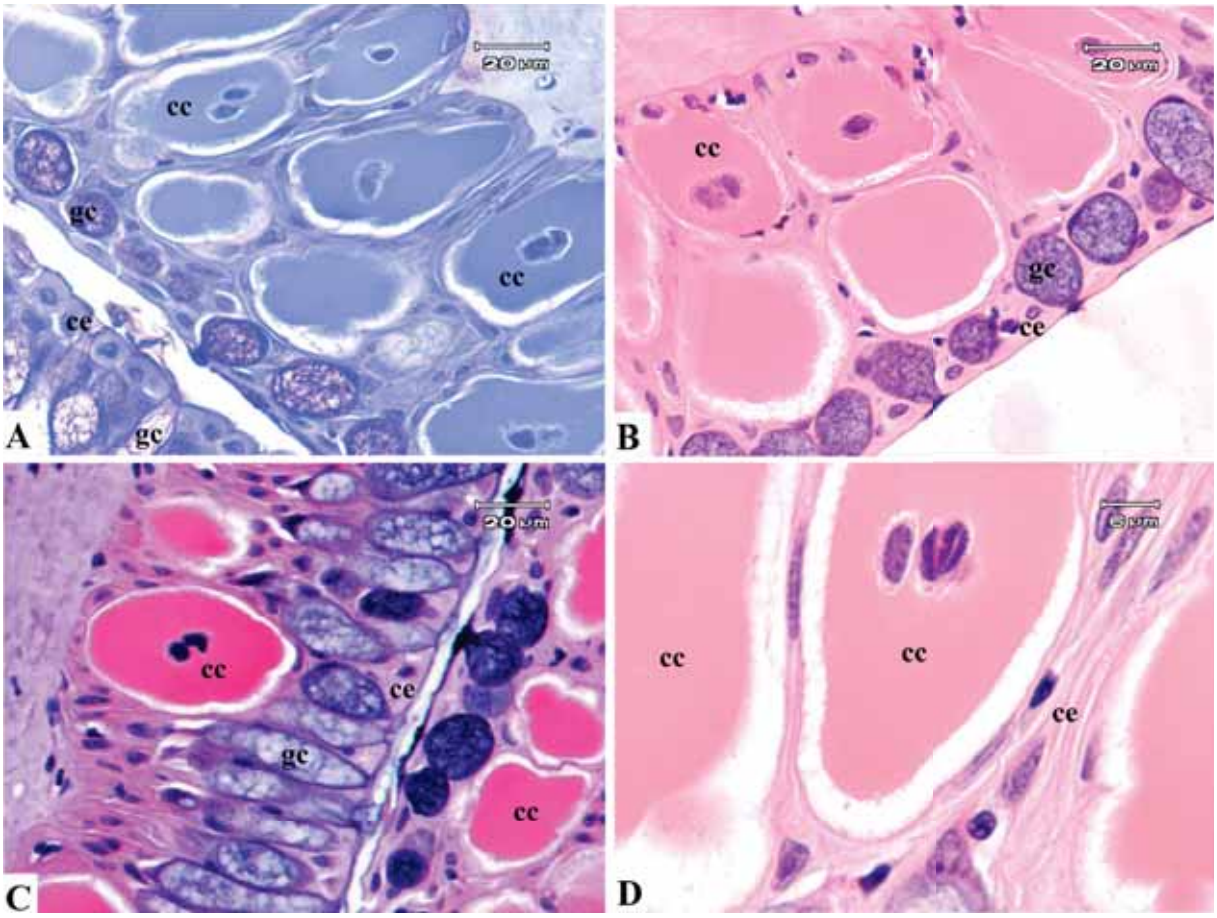

Figura 8. A, B e **C**: Corte transversal do esôfago, evidenciando células epiteliais, células caliciformes e "club cells" (A-AT; B e C-HE); **D**: "Club cells", evidenciando citoplasma eosinófilo e dois núcleos (HE). Legenda: ce-células epiteliais; cc-"club cells"; gc-células caliciformes.

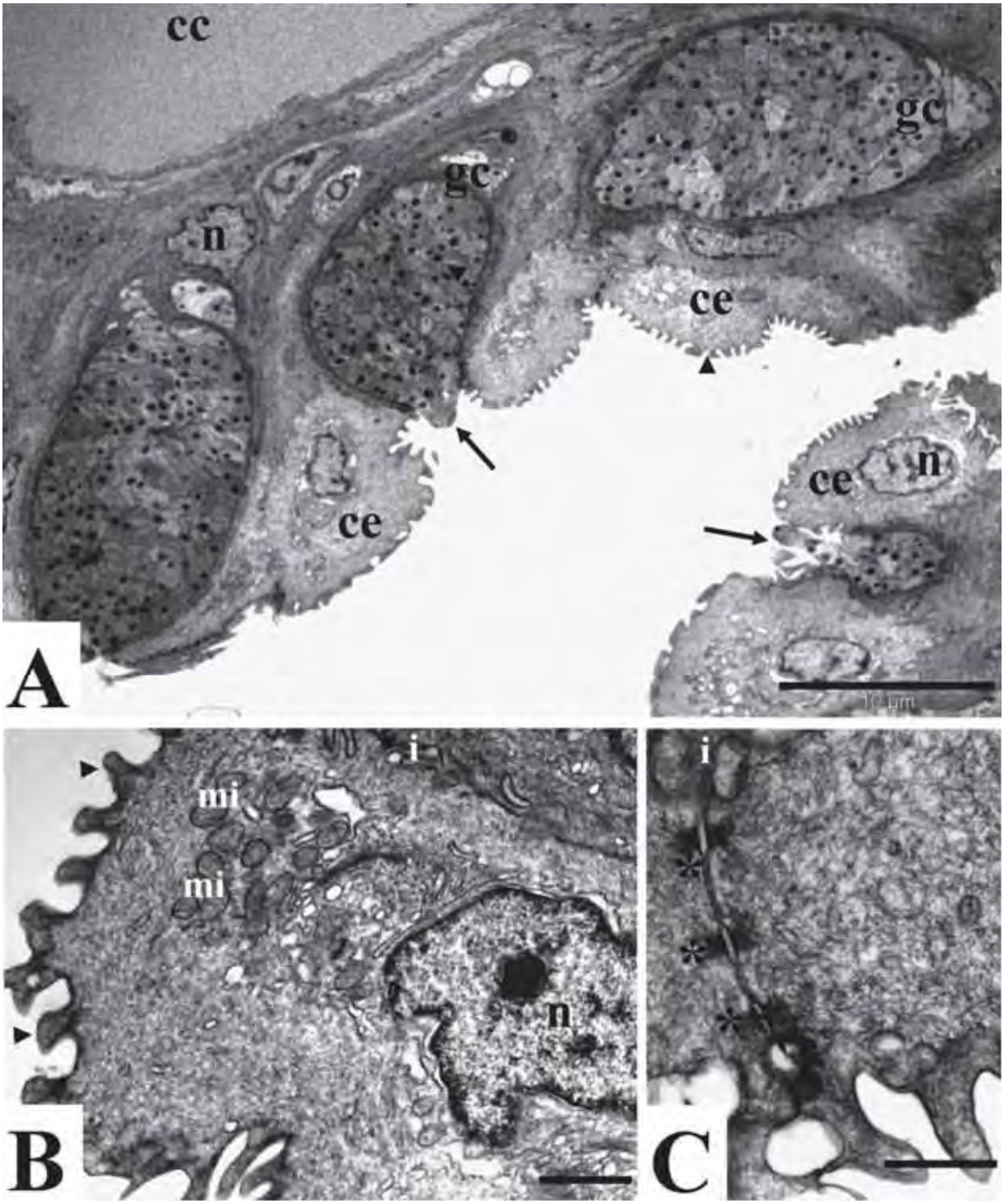

Figura 9: MET do epitélio de revestimento esofágico. **A**. Região apical do epitélio de revestimento (Barra 10μm); **B**. Célula epitelial apical, evidenciando microssaliências digitiformes (Barra 1μm); **C**. Junções de membrana entre as células epiteliais (Barra 500nm). Legenda: gc-célula caliciforme; cc-"club cells"; ce-célula epitelial; n-núcleo; microssaliências digitiformes (cabeça de seta); abertura de célula caliciforme (seta preta); mi-mitocôndria; i-interdigitações de membrana; desmossomos (*).

- Células caliciformes esofágicas: localizaram-se principalmente na região apical do epitélio de revestimento, constituindo uma única camada celular (Figuras 8A-8C). Quanto à forma, apresentaram-se ovaladas, alongadas ou em cálice. O citoplasma foi quase todo ocupado por mucossubstâncias, que foram coradas pela hematoxilina (Figuras 8B e 8C), bem como apresentaram metacromasia ao azul de toluidina (Figura 8A). Quanto às reações histoquímicas, o PAS reagiu com todas as células caliciformes, independente da região esofágica, formando uma reação de cor avermelhada (Figuras 10B e 10D). Por sua vez, o AB (pH 2,5) reagiu com as células caliciformes formando uma reação de cor azulada (Figuras 10A e 10C), mas na região posterior do esôfago, próxima à transição com o estômago, estas células apresentaram-se negativas ou com reação fraca ao AB (pH 2,5). O AB (pH 1,0) também reagiu fortemente com as células caliciformes esofágicas, exceto na região posterior. Ainda, na reação AB (pH 2,5) + PAS, as células caliciformes apresentaram coloração violeta ou parcialmente azul e/ou avermelhada (Figuras 10E e 10F). Também foi observado que a região superficial esofágica apresentou uma fina camada de mucossubstâncias AB (pH 2,5) e PAS positivas.

Nas análises em MET, o núcleo das células caliciformes localizou-se em posição basal e apresentou predomínio de cromatina descondensada (Figura 11B). Grande concentração de retículo endoplasmático rugoso foi observado em seu citoplasma, e as regiões medial e apical do mesmo apresentaram-se repletas de vesículas de secreção. Estas vesículas eram grandes e apresentaram variações de eletrondensidade, com alguns perfis de grânulos muito eletrondensos (Figuras 11A, 11C e 11D). Os grânulos de secreção eram contidos dentro de um envoltório, que os mantinha agrupados na região apical das células.

A altura das células caliciformes variou de acordo com a região esofágica. As regiões anterior e medial apresentaram células caliciformes que não atingiram a base da camada epitelial. Na região final, próxima à transição com o estômago, as células caliciformes eram

mais altas, atingindo a base do epitélio, embora o epitélio nesta região tenha se apresentado mais baixo que na região anterior.

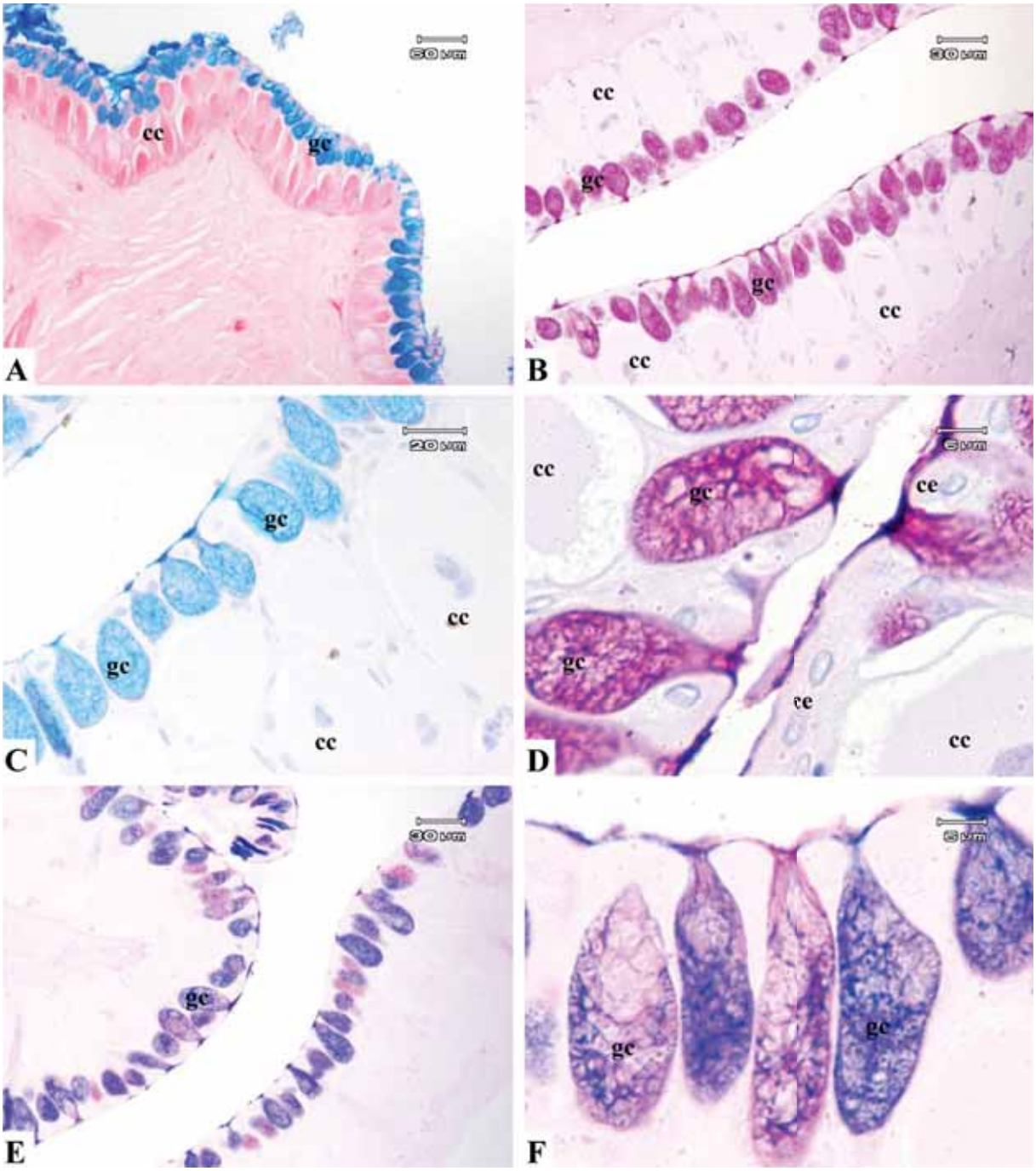

Figura 10. A: Corte transversal do esôfago, evidenciando células caliciformes AB positivas e club cells eosinófilas (AB pH 2,5 + Eosina); **B**: Células caliciformes PAS positivas, notar "club cells" PAS negativas (PAS + H); **C**: Células caliciformes AB, notar "club cells" AB negativas (AB pH 2,5 + hematoxilina); **D**: Células caliciformes PAS positivas, evidenciando abertura das células (PAS + Hematoxilina); **E** e **F**: Células caliciformes, evidenciando predominância de mucossubstâncias AB positivas (AB pH2,5 + PAS). Legenda: ce-células epiteliais; cc-"club cells"; gc-células caliciformes.

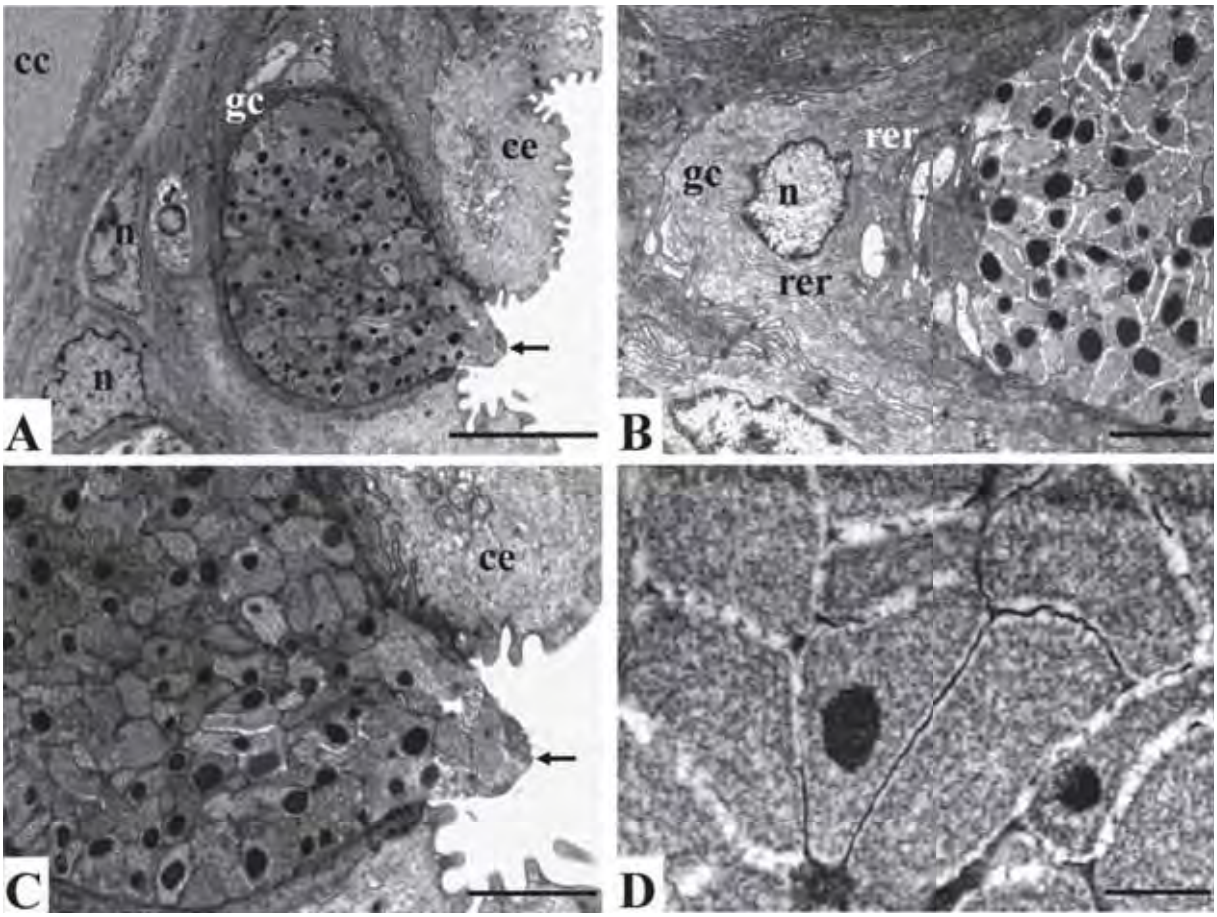

Figura 11: MET do epitélio de revestimento esofágico. **A**. Célula caliciforme esofágica (Barra 5µm); **B**. Região basal de célula caliciforme, evidenciando núcleo e retículo endoplasmático rugoso (Barra 2µm); **C**. Abertura de célula caliciforme (Barra 2µm); **D**: Grânulos de secreção de células caliciformes (Barra 500nm). Legenda: ce-célula epitelial; gc-célula caliciforme; cc-"club cells"; n-núcleo; rer-retículo endoplasmático rugoso; abertura de célula caliciforme (seta preta).

- "Club cells": localizadas nas regiões medial e basal do epitélio, apresentaram morfologia característica, com formato arredondado e com um halo que não se cora ao redor de todo perfil celular. Nos preparados histológicos, observou-se o núcleo central, algumas vezes binucleado (Figura 8B). O citoplasma apresentou-se esosinófilo (Figura 8D) e também corado pelo azul de toluidina, formando em ambos os casos uma coloração uniforme (Figura 8A). Em relação à histoquímica de mucossubstâncias, estas células foram negativas ao AB (pH 1,0 e 2,5) e às reações PAS (Figuras 10B e 10C).

Nas análises em MET, as club cells apresentaram núcleo central, com formatos irregulares e cromatina praticamente descondensada (Figuras 12A, 12B e 12D). O citoplasma apresentou-se homogêneo (Figura 12B), como observado nas preparações histológicas, com poucas mitocôndrias próximas ao núcleo (Figura 12D). Na maior parte do citoplasma observou-se uma eletrondensidade homogênea e a membrana plasmática apresentou interdigitações de membrana e desmossomos (Figura 12C). Ainda foi possível notar que estas células localizaram-se nas regiões medial e basal do epitélio, distantes da superfície esofágica. Assim, não foi visualizada comunicação com a superfície apical, como observado nas células caliciformes que secretam muco na superfície epitelial do esôfago.

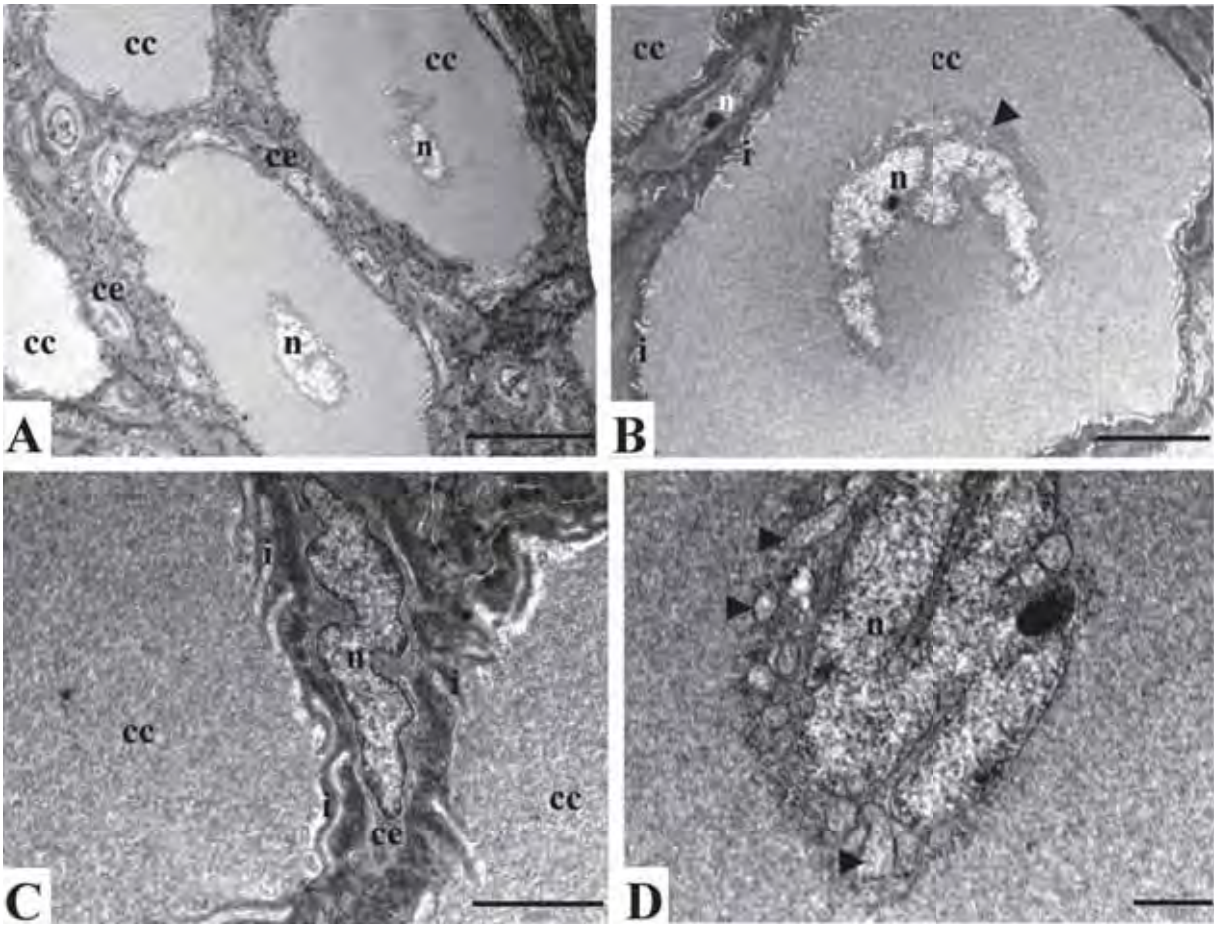

Figura 12: Microscopia eletrônica de transmissão de "club cells". **A** e **B**. "club cells" (A- Barra 10µm, B- Barra 5µm); **C**. Membrana plasmática de "club cells", evidenciando interdigitações (Barra 2µm). **D**: Célula "club", evidenciando núcleo irregular e mitocôndrias perinucleares (Barra 1µm). Legenda: cc-"club cells"; ce-célula epitelial; n-núcleo; i-interdigitações de membrana; mitocôndrias (cabeça de seta).

3.1.2 Lâmina própria e submucosa

Abaixo da região epitelial observou-se uma camada de tecido conjuntivo, denso, com grande concentração de fibras conjuntivas. Nessa região, observou-se reação positiva ao PAS. O esôfago de *H. platyrhynchos* não apresentou camada muscular da mucosa e, assim sendo, não foi possível diferenciar a lâmina própria da submucosa (Figura 7). Contudo, quanto ao grau de agrupamento (compactação) das fibras conjuntivas, foram encontradas as seguintes diferenças na constituição do tecido conjuntivo:

- *stratum compactum*: região mais próxima do epitélio, que apresentou maior nível de compactação das fibras, estando estreitamente agrupadas e acompanhando as curvaturas das pregas longitudinais (Figura 13A).

- *stratum laxum*: região próxima à camada muscular, que apresentou menor compactação, sem qualquer arranjo (Figura 13A).

3.1.3 Muscular

A camada muscular apresentou-se bastante espessa com duas regiões distintas de acordo com a orientação de suas fibras:

- **Camada muscular longitudinal interna:** foi caracterizada pela presença de feixes de fibras musculares estriadas, orientadas longitudinalmente, agrupados em conjuntos e entremeados por tecido conjuntivo (Figuras 13B e 13C). O tecido conjuntivo apresentou continuidade com o tecido conjuntivo da lâmina própria/submucosa, não apresentando distinções. Além do conjuntivo ao redor de cada conjunto de feixes musculares, também se observou a presença de tecido conjuntivo ao redor de um feixe de fibras, formando septos que constituem o perimísio, e pequena quantidade de tecido conjuntivo entre as fibras, caracterizando o endomísio.

- Camada muscular circular externa: foi caracterizada por uma camada compacta de fibras musculares estriadas, orientadas circularmente. Também foi observada uma pequena quantidade de tecido conjuntivo ao redor de um feixe de fibras, formando septos que constituem o perimísio (Figuras 13B e 13C), e pequena quantidade de tecido conjuntivo entre cada fibra, caracterizando o endomísio (Figura 13D).

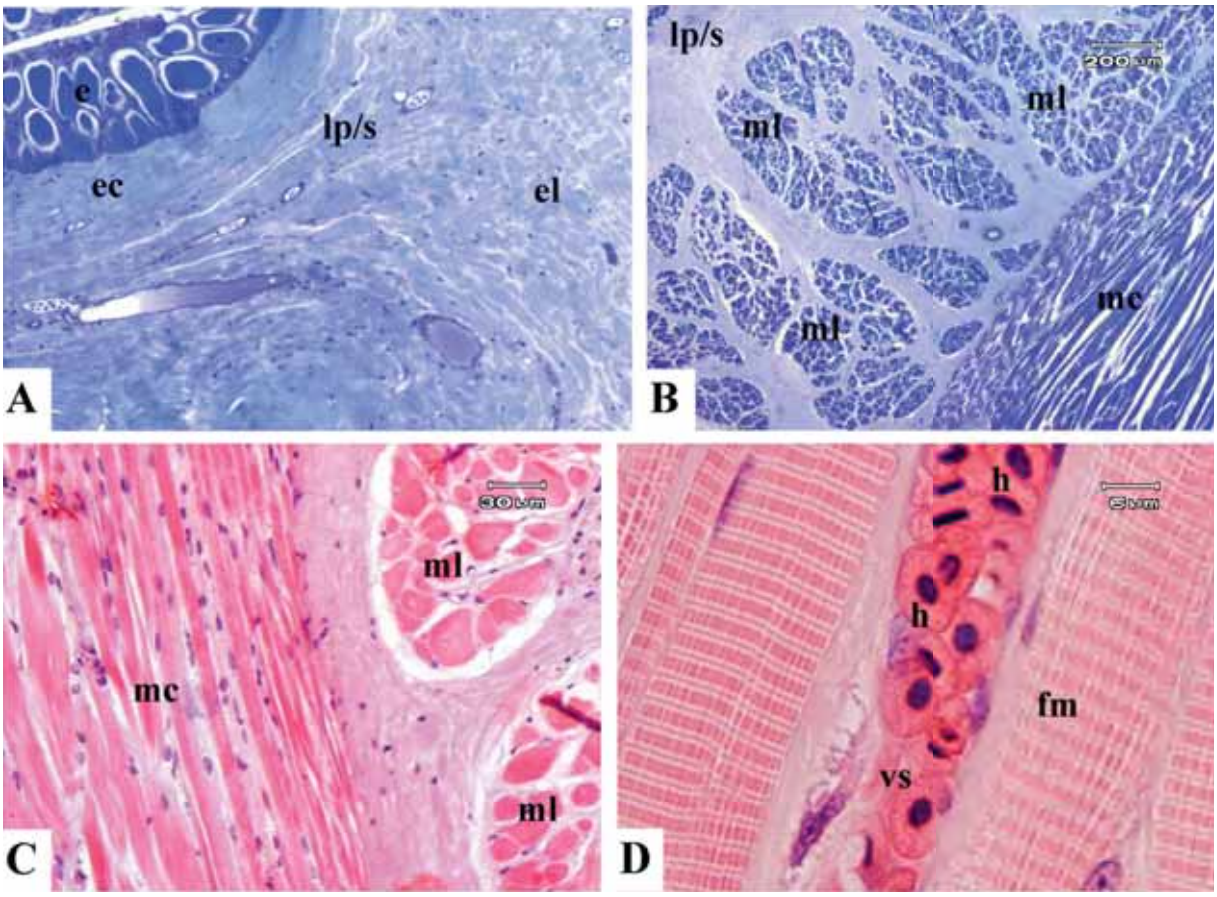

Figura 13. A: Corte transversal do esôfago, evidenciando lâmina própria/submucosa (AT); **B**: Transição da camada muscular circular-mc e longitudinal-ml (HE); **C**: Camada muscular circular-mc e longitudinal-ml (AT); **D**: Fibras musculares estriadas-fm da camada muscular circular (HE). Legenda: e-epitélio; ec-*estratum compactum*; el-*estratum laxum*; lp/s-lâmina própria/submucosa; ml-muscular longitudinal interna; mc-muscular circular externa; fm-fibra muscular; vs-vaso sanguíneo, h-hemácia.

3.1.4 Serosa

Externamente à camada muscular, observou-se a presença da camada serosa, constituída por uma região espessa de tecido conjuntivo denso, aparentemente modelado, revestida por um epitélio simples pavimentoso, denominado mesotélio (Figuras 14A e 14B). A região de tecido conjuntivo da túnica serosa apresentou-se composta por células e fibras conjuntivas e vasos sanguíneos (Figuras 14C e 14D).

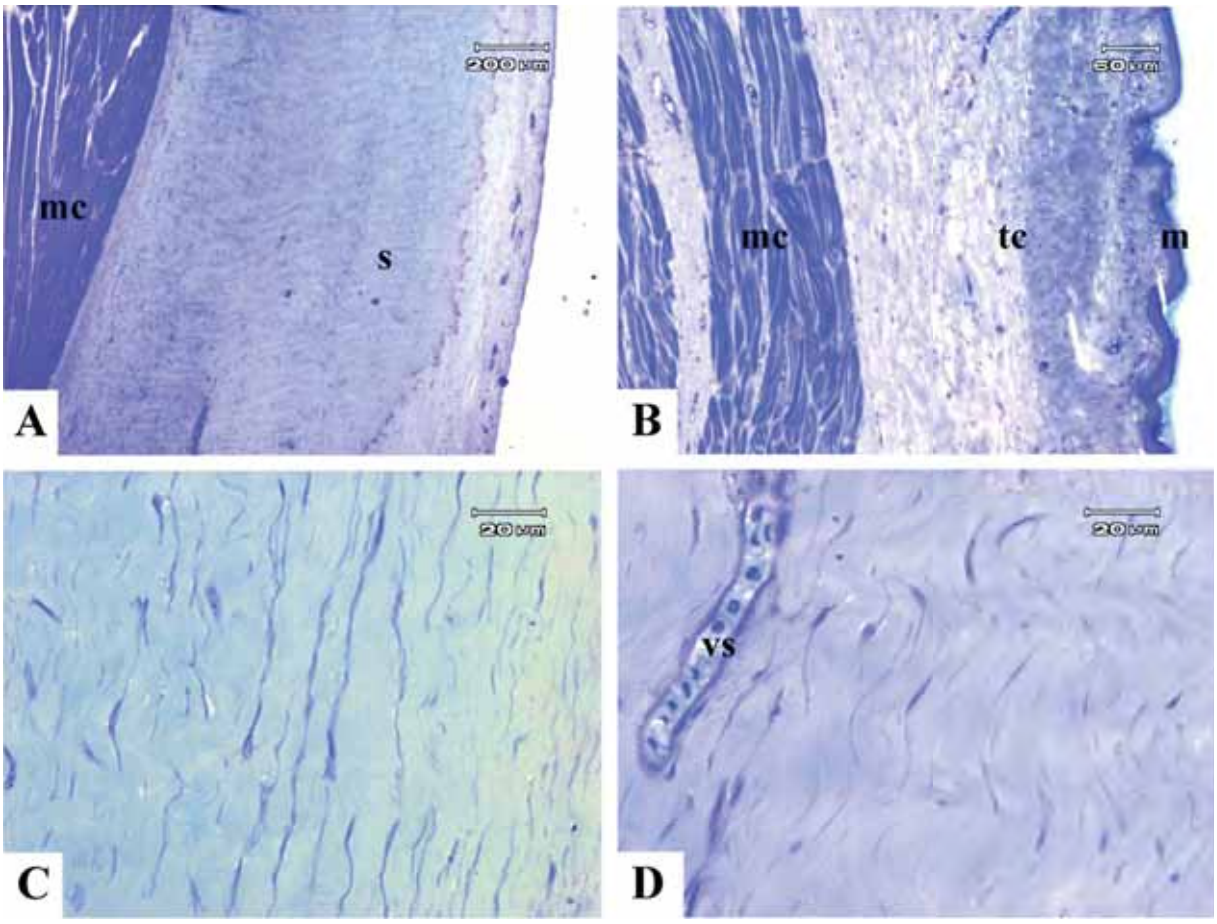

Figura 14. A, B, C e **D**: Corte transversal do esôfago, evidenciando região de tecido conjuntivo-tc e mesotélio-m da camada serosa (AT). Legenda: mc-camada muscular circular externa; s-camada serosa; tc-tecido conjuntivo da camada serosa; m-mesotélio; vs-vaso sanguíneo.

3.2 Transição esôfago-estômago

A região de transição do esôfago para o estômago apresentou características marcantes, principalmente pela substituição abrupta do epitélio esofágico estratificado com grande número de células caliciformes (Figura 16A), por um epitélio gástrico colunar simples (Figuras 16B - 16F). Nesta região final do esôfago, a altura da camada epitelial foi menor em relação às demais regiões e poucas “club cells” foram observadas.

Também foram observadas alterações na constituição da camada muscular: mudança das fibras musculares estriadas do esôfago para fibras musculares lisas do estômago; diminuição gradativa da camada muscular longitudinal interna do esôfago até o seu desaparecimento e o surgimento da camada muscular longitudinal externa no estômago (Figura 15); interrupção da túnica muscular circular na transição esôfago/estômago, sendo que a túnica muscular circular gástrica apresentou-se mais espessa que a muscular circular esofágica (Figura 15). Ainda ocorreu diminuição gradativa da porção de tecido conjuntivo da camada serosa do esôfago, restando apenas uma fina camada serosa no estômago (Figura 15).

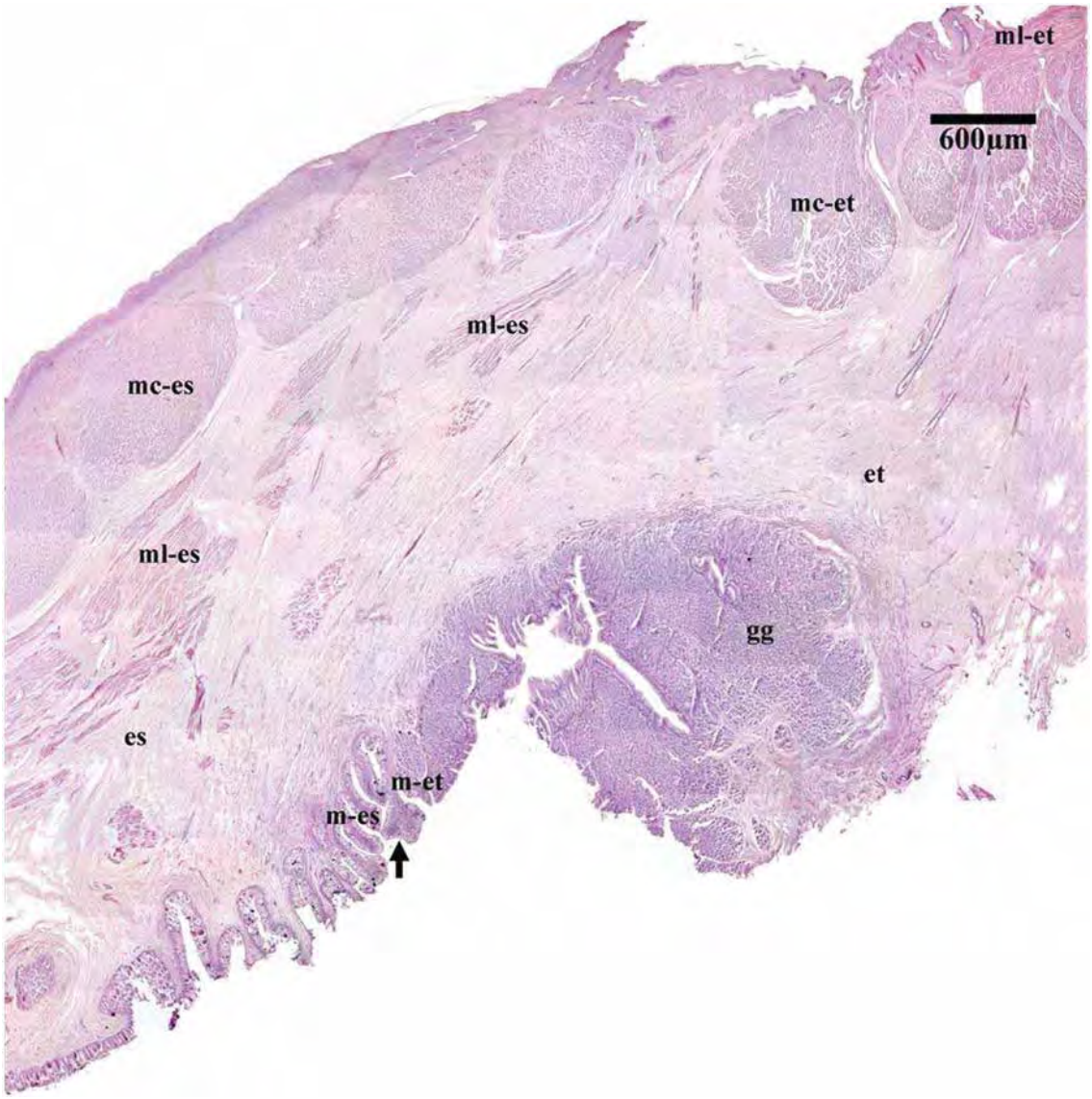

Figura 15: Estrutura histológica da transição esôfago/estômago, indicada pela seta (HE). Legenda: es-esôfago; et-estômago; gg-glândulas gástricas; m-es--camada mucosa esofágica; m-et--camada mucosa gástrica; mc-es--camada muscular circular esofágica; mc-et--camada muscular circular gástrica; ml-es--camada muscular longitudinal esofágica; ml-et--camada muscular longitudinal gástrica.

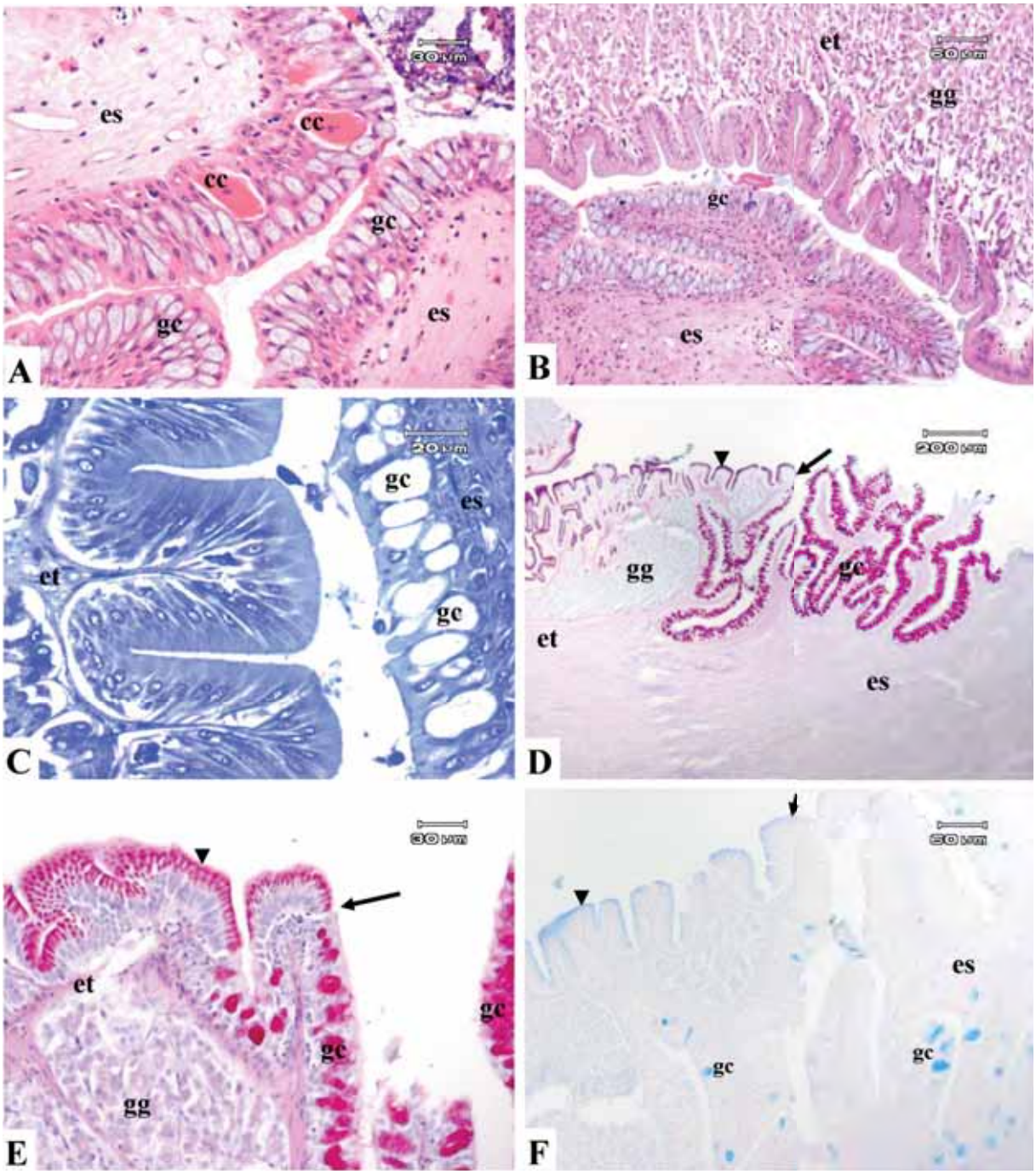

Figura 16. Cortes longitudinais evidenciando a transição esôfago/estômago. **A**: Região final do esôfago, notar pequena quantidade de club cells (HE); **B**: Transição esôfago/estômago, evidenciando mucosa esofágica com células caliciformes e gástrica com região glandular espessa (HE); **C**: Epitélio esofágico estratificado e epitélio gástrico colunar simples (AT); **D** e **E**: Células caliciformes esofágicas e região apical de células epiteliais do estômago PAS positivas; **F**: Pequena quantidade de células caliciformes esofágicas AB positivas e região apical do epitélio gástrico fracamente AB positiva (AB pH 2,5). Legenda: es-esôfago; et-estômago; cc-"club cells"; gc-células caliciformes; gg-glândulas gástricas; mucossubstâncias no ápice de células epiteliais gástricas (cabeça de seta); transição esôfago/estômago (seta).

3.3 Estômago

O estômago apresentou formato arredondado, altamente distensível quando repleto de alimento (Figura 17A). Diferenças no volume estomacal foram observadas entre os animais que haviam ingerido ração comercial e aqueles que se alimentaram de exemplares de menor tamanho da mesma espécie (Figuras 17A - 17C), podendo apresentar prática de canibalismo.

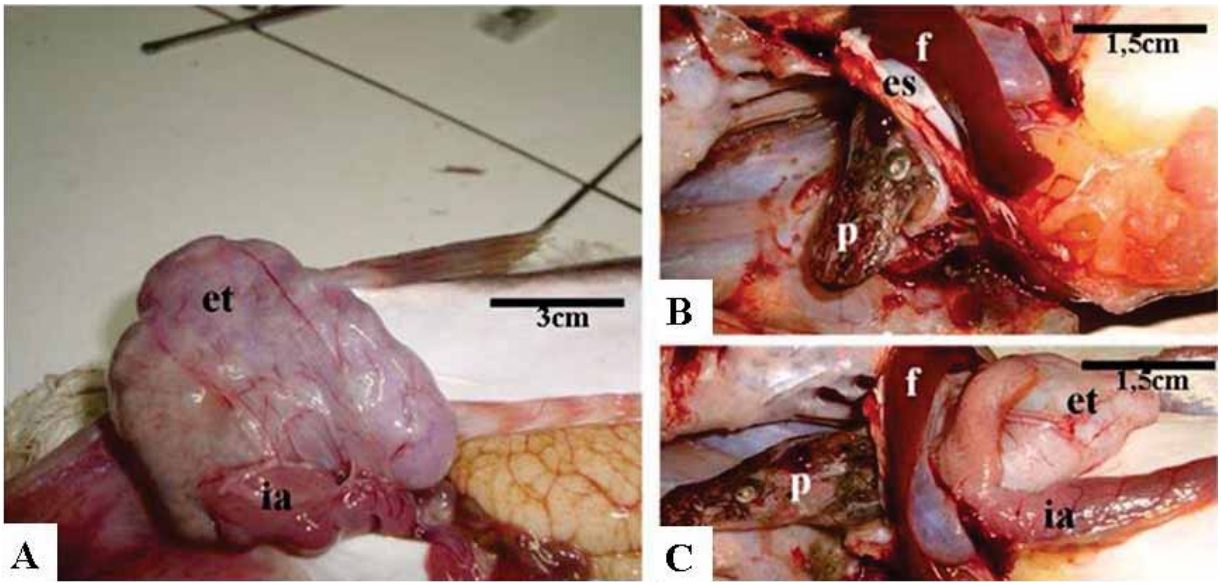

Figura 17. **A**: Estômago de *H. platyrhynchos* recém alimentado com ração comercial; **B** e **C**: Exemplares de *H. platyrhynchos* apresentando presa recém ingerida. Legenda: es-esôfago; et-estômago; ia-intestino anterior; f-fígado; p-presa.

Os animais amostrados que permaneceram em jejum por um período de três dias também apresentaram estômago amplo, porém, menor que os fotodocumentados na Figura 17. Ainda, devido ao jejum, foi possível visualizar seu formato arredondado, com parede gástrica altamente vascularizada (Figura 4A). Em todos os animais dissecados, independente do estado de alimentação, foi observado que os estômagos apresentaram retração, com diminuição de volume, logo após o início da laparotomia exploratória (Figura 18A).

Em relação à anatomia do estômago de *H. platythynchos*, foi observada a presença de três regiões:

- Região cárdica: caracterizada por apresentar luz ampla com pregas longitudinais visíveis a olho nu (Figuras 18A - 18C).

- Região fúndica: região altamente distensível com pregas em diferentes orientações (Figuras 18A e 18D).

- Região pilórica: porção final do estômago, com pregas longitudinais e parede mais espessa (Figura 18A).

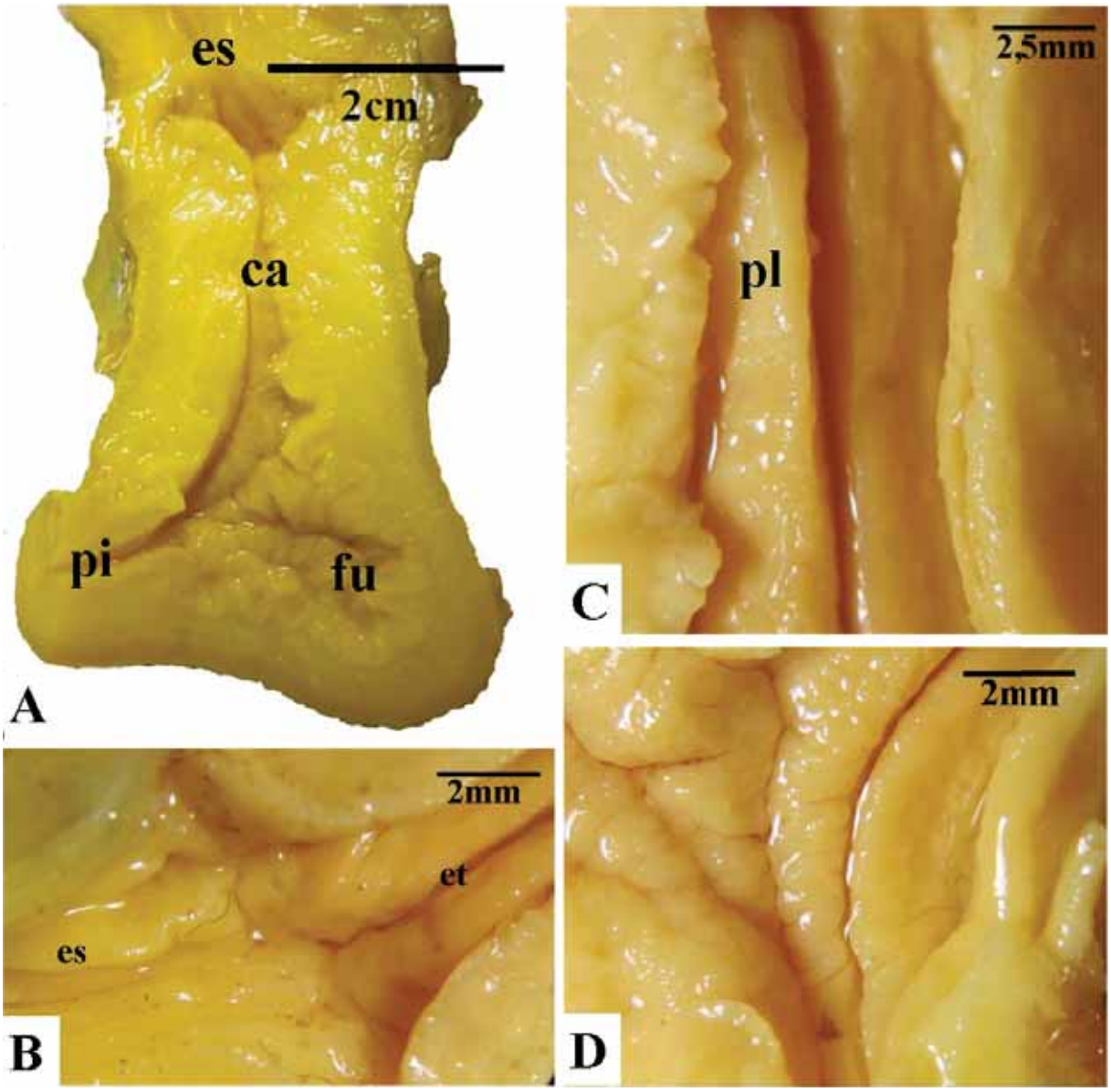

Figura 18. A: Vista geral da estrutura interna do esôfago (es), estômago (et) e intestino anterior (ia) de *H. platyrhynchos*; **B**: Transição esôfago/estômago; **C:** Pregas longitudinais na região cárdica; **D**: Região fúndica do estômago, evidenciando pregas gástricas em diferentes orientações. Legenda: es-esôfago; et-estômago; ia-intestino anterior; ca-região cárdica; fu-região fúndica; pi-região pilórica.

As observações em MEV permitiram a visualização detalhada da superfície das pregas gástricas (Figura 19A) com a presença de microssaliências arredondadas (Figura 19B). Em corte transversal, foi também observada a região do epitélio de revestimento (Figura 19C).

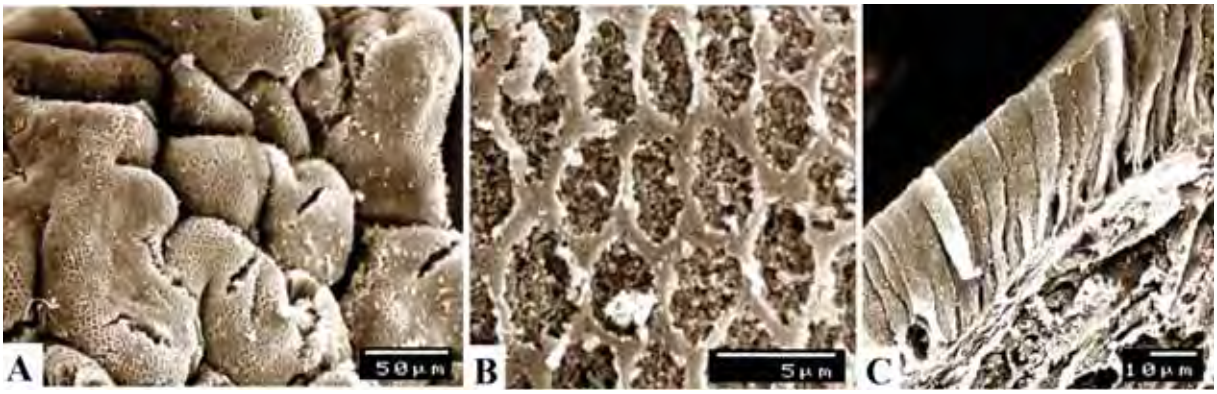

Figura 19. MEV do estômago de *H. platyrhynchos*. **A:** Pregas gástricas em diferentes orientações; **B**: Superfície gástrica, evidenciando microssaliências arredondadas; **C**: Corte longitudinal, evidenciando região epitelial.

Histologicamente o estômago apresentou-se composto por quatro camadas: mucosa, submucosa, muscular e serosa (Figura 20).

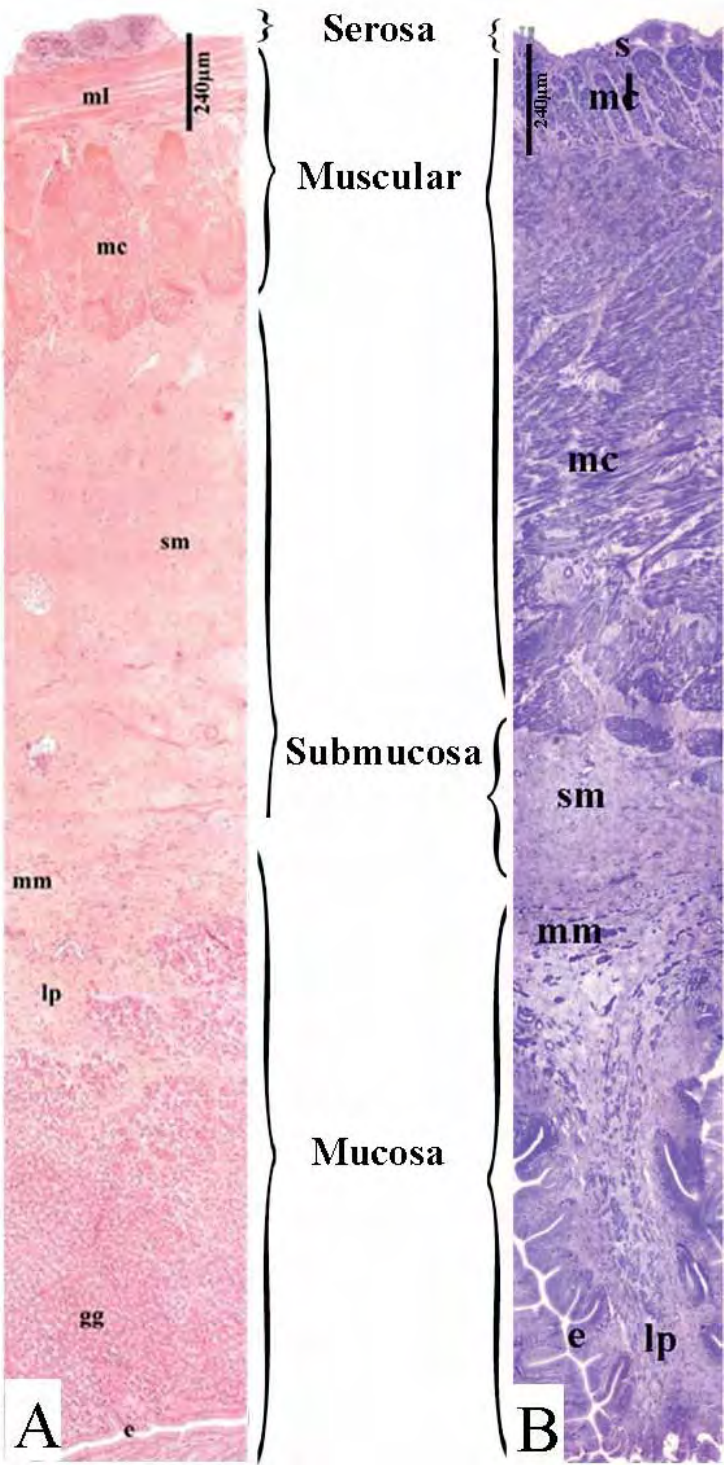

Figura 20. Organização histológica do estômago de *H. platyrhynchos*. A: Região cárdica (HE); B: Região pilórica (AT). Legenda: e-epitélio; gg-glândulas gástricas; lp-lâmina própria; mm-muscular da mucosa; sm-submucosa; mc-muscular circular; ml-muscular longitudinal; s-serosa.

3.3.1 Mucosa

A camada mucosa apresentou-se mais espessa nas regiões cárdica e fúndica, com características similares em ambas as regiões. Nestas, a mucosa constitui-se por epitélio de revestimento, lâmina própria com região glandular espessa e a muscular da mucosa (Figuras 20A, 21A e 21B). A região glandular presente nas regiões cárdica e fúndica esteve ausente na região pilórica (Figuras 20B e 24A).

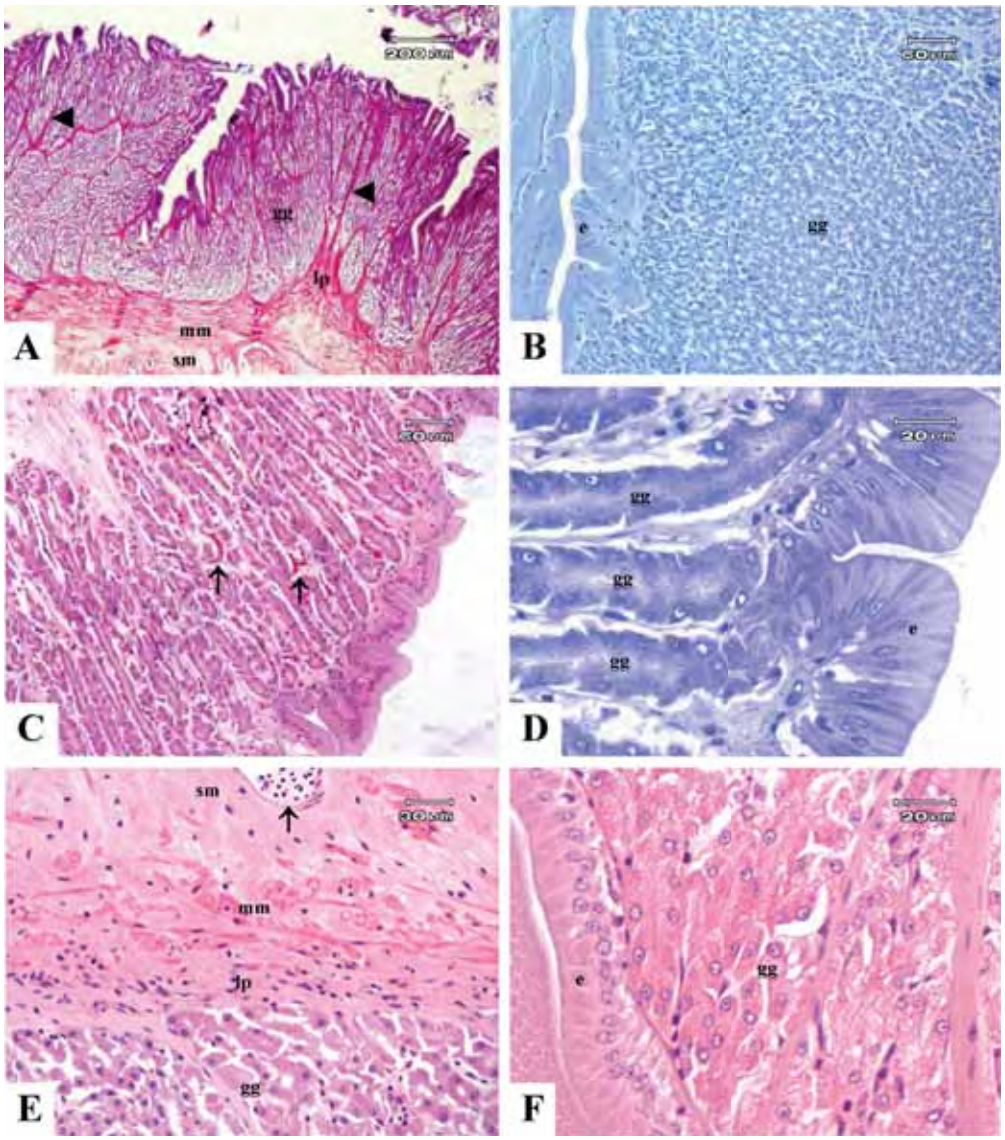

Figura 21. Camada mucosa da região cárdica do estômago. **A**: Camada glandular espessa (HE); **B**: Grande concentração de glândulas gástricas (AT); **C**: Glândulas gástricas tubulares (HE); **D**: Epitélio gástrico interrompido por criptas gástricas (AT); **E**: Transição da camada mucosa para submucosa, evidenciando muscular da mucosa (HE); **F**: Epitélio colunar simples e região glandular com células eosinófilas (HE). Legenda: e-epitélio; lp-lâmina própria, gg-glândulas gástricas; mm-muscular da mucosa; sm-submucosa; vaso sanguíneo (seta); septos de tecido conjuntivo (cabeça de seta).

- Epitélio

O epitélio de revestimento gástrico foi caracterizado como do tipo colunar simples (Figuras 21D e 24C), com núcleo basal nas células epiteliais e região citoplasmática apical com secreção fortemente PAS positiva, formando uma camada contínua de muco ao longo de todo epitélio, independentemente da região observada (Figuras 21D, 21F, 24A – 24C). As reações PAS positivas caracterizaram as secreções de mucossubstâncias neutras (Figuras 22A, 22C, 24D e 24E). Nas preparações submetidas ao alcian blue (pH 2,5), foi observada reatividade fraca somente no ápice das células epiteliais (Figura 24B), enquanto que AB (pH 1,0) não apresentou reação. Nas preparações submetidas à reação AB (pH 2,5) + PAS, foi evidenciada coloração avermelhada, indicando o domínio de mucossubstâncias neutras. Independente da região do estômago, o epitélio de revestimento apresentou características histoquímicas similares, com intensa reatividade ao PAS e fraca reatividade ao AB (pH 2,5).

Nas regiões cárdica e fúndica, o epitélio gástrico de *H. platyrhynchos* apresentou invaginações, formando criptas, nas quais desembocaram as glândulas gástricas. Nas criptas, as células epiteliais apresentaram-se mais baixas e exibiram núcleo arredondado com nucléolo evidente. Na região pilórica não foi observada a presença de criptas gástricas (Figuras 24A - 24C).

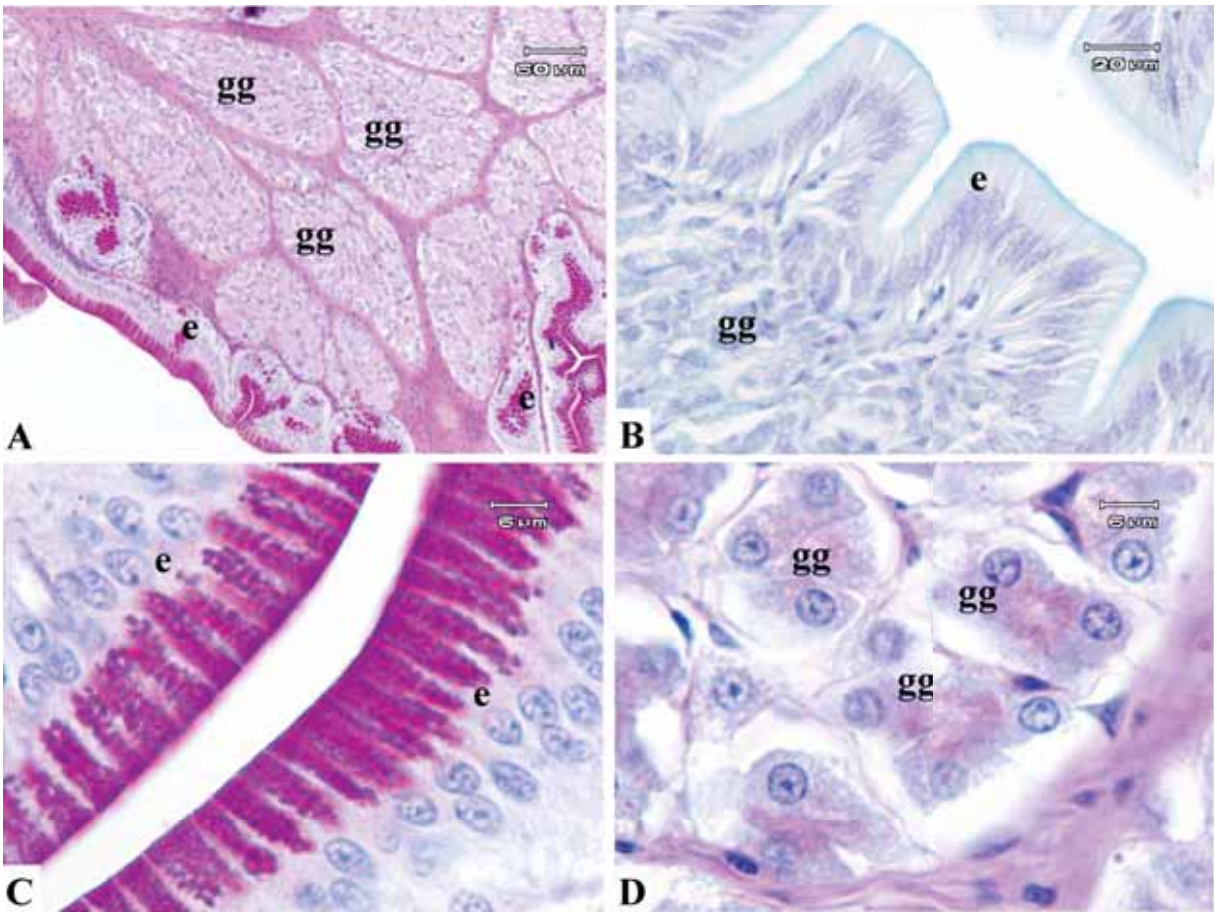

Figura 22. Camada mucosa da região cárdica do estômago. **A**: Glândulas gástricas na lâmina própria (PAS+H); **B**: Camada apical AB positiva (AB+H); **C**: Epitélio colunar simples, evidenciando região apical PAS positiva (PAS+H); **D**: Glândulas gástricas PAS positivas (PAS+H). Legenda: e-epitélio; gg-glândulas gástricas.

Em relação às observações obtidas em MET, as células epiteliais apresentaram núcleo basal (Figura 23A), com predomínio de cromatina descondensada, mas também alguns aglomerados de cromatina condensada, formando pequenos grumos que deram ao núcleo aspecto heterogêneo (Figura 23B). Ao redor do núcleo observou-se grande concentração de retículo endoplasmático rugoso (Figura 23B). A região medial do citoplasma apresentou grande concentração de mitocôndrias arredondadas ou alongadas. Na região apical das células epiteliais, grânulos de secreção foram observados (Figuras 23A e 23C) dispersos no citoplasma, diferentemente do observado nas células caliciformes, nas quais os grânulos estavam agrupados. Os grânulos de secreção eram fortemente eletrondensos e, na região

apical próxima à membrana plasmática, encontravam-se alinhados formando uma camada contínua.

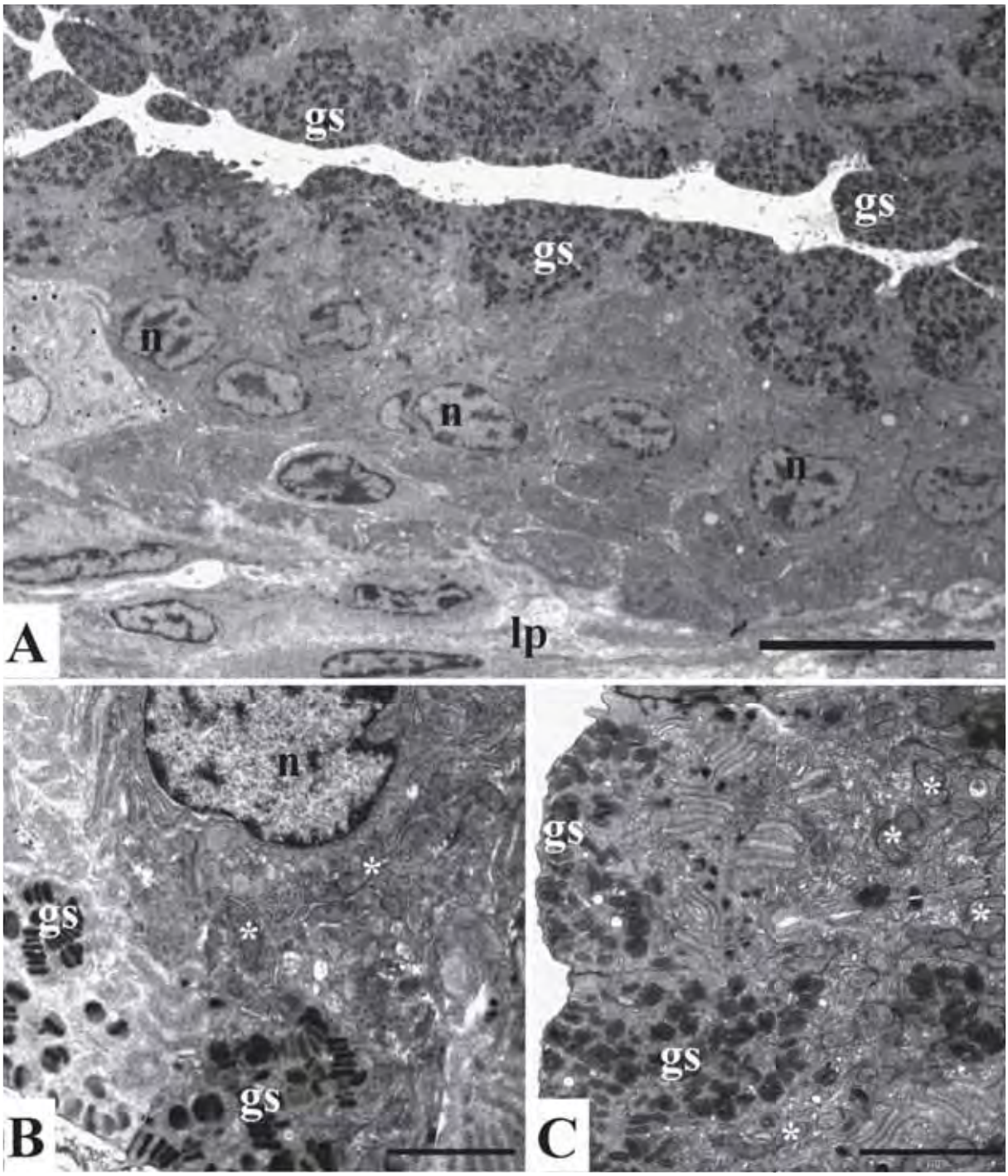

Figura 23: Epitélio de revestimento da região cárdica do estômago de *H. platyrhynchos* em MET. **A**. Célula epiteliais com núcleos basais e grânulos de secreção apicais (Barra 10µm); **B**. Célula epitelial, evidenciando núcleo, mitocôndrias e retículo endoplasmático rugoso (Barra 2µm); **C**. Região apical de células epiteliais (Barra 2µm). Legenda: lp-lâmina própria; n-núcleo; gs-grânulos de secreção; mitocôndrias (*).

Na transição estômago/intestino, além da mudança na espessura da parede dos órgãos e da presença do esfíncter pilórico, foi observada a mudança nas características do epitélio. Embora os dois epitélios sejam classificados como simples colunar, o epitélio gástrico apresentou região apical com secreções de mucossubstâncias PAS positivas em todas suas células, enquanto que o epitélio intestinal apresentou células absortivas sem mucossubstâncias e células caliciformes positivas ao PAS e ao AB (Figura 24F).

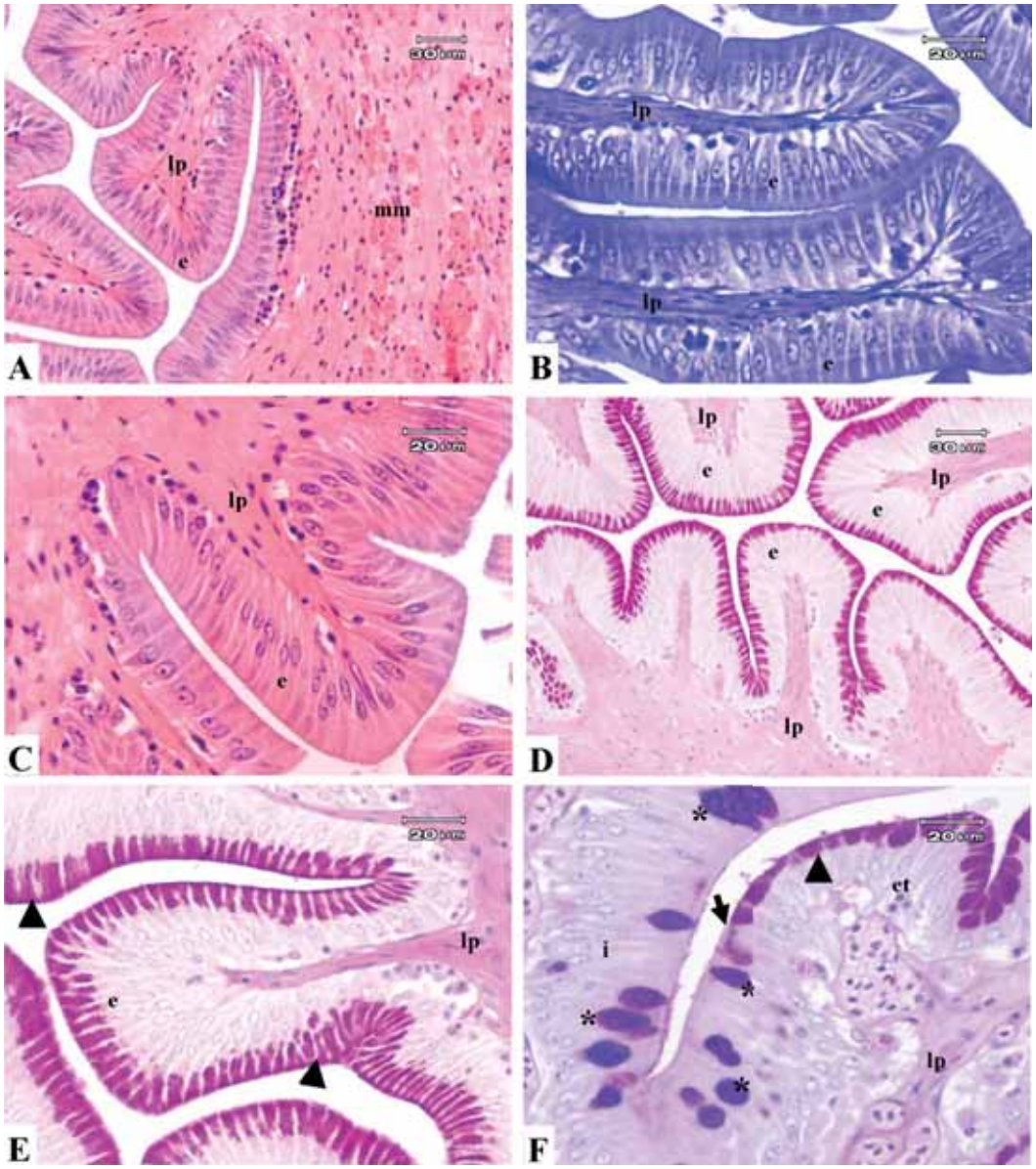

Figura 24. Região pilórica do estômago de *H. platyrhynchos*. **A:** Região pilórica, evidenciando ausência de região glandular (HE); **B** e **C**: Epitélio colunar simples, com núcleos basais (B-AT e C-HE); **D** e **E:** Células epiteliais com região apical e lâmina própria PAS positiva (PAS+H); **F**: Transição estômago/intestino, evidenciando mudança do epitélio gástrico com secreções apicais PAS positivas para epitélio intestinal com células absortivas e caliciformes AB positivas (AB pH 2,5 + PAS +H). Legenda: et-estômago; i-intestino; transição estômago/intestino (seta); e-epitélio; lp-lâmina própria; mm-muscular da mucosa; mucossubstâncias gástricas (cabeça de seta); células caliciformes(*).

- Lâmina própria

A lâmina própria apresentou-se composta por tecido conjuntivo frouxo, com grande quantidade de células e muitos vasos sanguíneos (Figuras 21A e 21E). As reações histoquímicas evidenciaram uma reatividade moderada ao PAS nas fibras conjuntivas (Figura 22A).

- Região glandular

As glândulas gástricas apresentaram-se maiores e mais numerosas nas regiões cárdica e fúndica do estômago, diminuindo em quantidade na região de transição fúndica/pilórica e, posteriormente, tornando-se ausentes na maior parte da região pilórica (Figuras 20A e 20B). Estas eram tubulares (Figuras 21B – 21D) e estavam separadas por septos delgados de tecido conjuntivo e vasos sanguíneos (Figuras 22A e 22C). As glândulas gástricas foram compostas por células oxintopépticas, com citoplasma acidófilo, corado intensamente pela eosina e núcleo basal, com nucléolo evidente (Figura 21D). Também apresentaram reação moderada ao PAS, na região apical (Figura 22D).

Em relação às observações feitas em MET, as células oxintopépticas apresentaram-se poliédricas, em formato piramidal, sendo a região basal mais ampla que a região apical (Figuras 25A e 25B). O núcleo arredondado foi localizado em posição basal, com um nucléolo evidente (Figuras 25B e 25C). Observou-se ainda pouca condensação de cromatina, formando uma heterocromatina fina na região periférica do núcleo e alguns grumos centrais.

O citoplasma das células oxintopépticas apresentou muitas mitocôndrias arredondadas e/ou alongadas, também sendo observado retículo endoplasmático bem desenvolvido (Figura 25C). No citoplasma apical observou-se grande concentração de vesículas de secreção arredondadas, com baixa eletrondensidade – “elétron-lucentes” (Figuras 25D e 25E). A região apical destas células apresentou microvilos e um sistema vesículo-tubular, aparentemente composto por reentrâncias de membrana plasmática. À medida que as vesículas foram secretadas, observou-se um aumento no sistema vesículo-tubular e o lúmen da glândula gástrica expandiu-se.

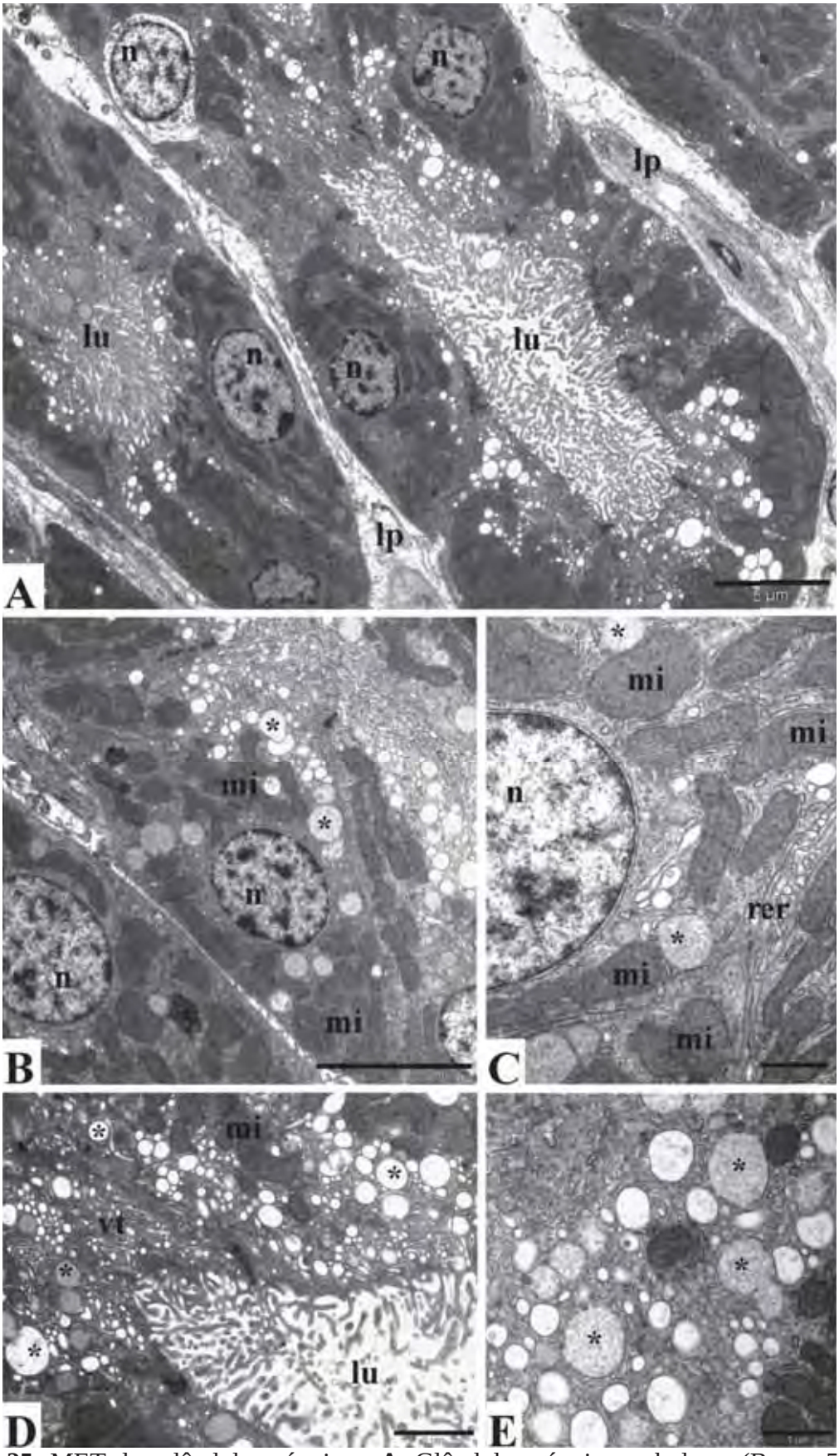

Figura 25: MET das glândulas gástricas. **A**. Glândulas gástricas tubulares (Barra: 5µm); **B**. Célula oxintopéptica, evidenciando núcleo, mitocôndrias e retículo endoplasmático rugoso (Barra: 5µm); **C**. Região basal de célula oxintopéptica (Barra: 1µm); **D** e **E**. Região apical de célula oxintopéptica, com grânulos elentron-lucentes e microvilos (Barra: D-2µm e E-1µm). Legenda: lp-lâmina própria; lu-lúmen; n-núcleo; rer-retículo endoplasmático rugoso; mi-mitocôndrias; vt-sistema vesículo-tubular; grânulos elétron-lucentes (*).

- Muscular da mucosa

Abaixo da lâmina própria observou-se a camada muscular da mucosa constituída por fibras musculares lisas descontínuas, principalmente com orientação longitudinal (Figuras 21A, 21E e 22A).

3.3.2 Submucosa

A camada submucosa apresentou-se composta por tecido conjuntivo denso, rico em fibras e vasos sanguíneos (Figuras 20A e 20B), sendo mais espessa na região pilórica em relação às outras regiões do estômago.

3.3.3 Muscular

A camada muscular do estômago apresentou-se composta por duas subcamadas de tecido muscular com diferentes orientações:

- Camada muscular circular interna: constituída por fibras musculares lisas com orientação circular, sendo mais espessa que a camada muscular longitudinal externa (Figuras 26A e 26B). Os feixes de fibras musculares foram envolvidos por tecido conjuntivo frouxo, assim como as fibras foram individualizadas por pequena quantidade de tecido conjuntivo.

- Camada muscular longitudinal externa: constituída por fibras musculares lisas com orientação longitudinal (Figuras 26A e 26B). Esta camada foi mais delgada que a circular interna e apresentou menor quantidade de tecido conjuntivo entre os feixes de fibras musculares.

Na região pilórica do estômago, observou-se um espessamento da camada muscular circular interna. Na transição do estômago com o intestino, a musculatura circular interna adentra no tecido conjuntivo da submucosa, formando o esfíncter pilórico (Figuras 26C e 26D).

3.3.4 Serosa

A camada serosa apresentou-se constituída por epitélio de revestimento pavimentoso, denominado mesotélio e por uma camada de tecido conjuntivo, com pequena quantidade de células e grande quantidade de fibras conjuntivas e vasos sanguíneos.

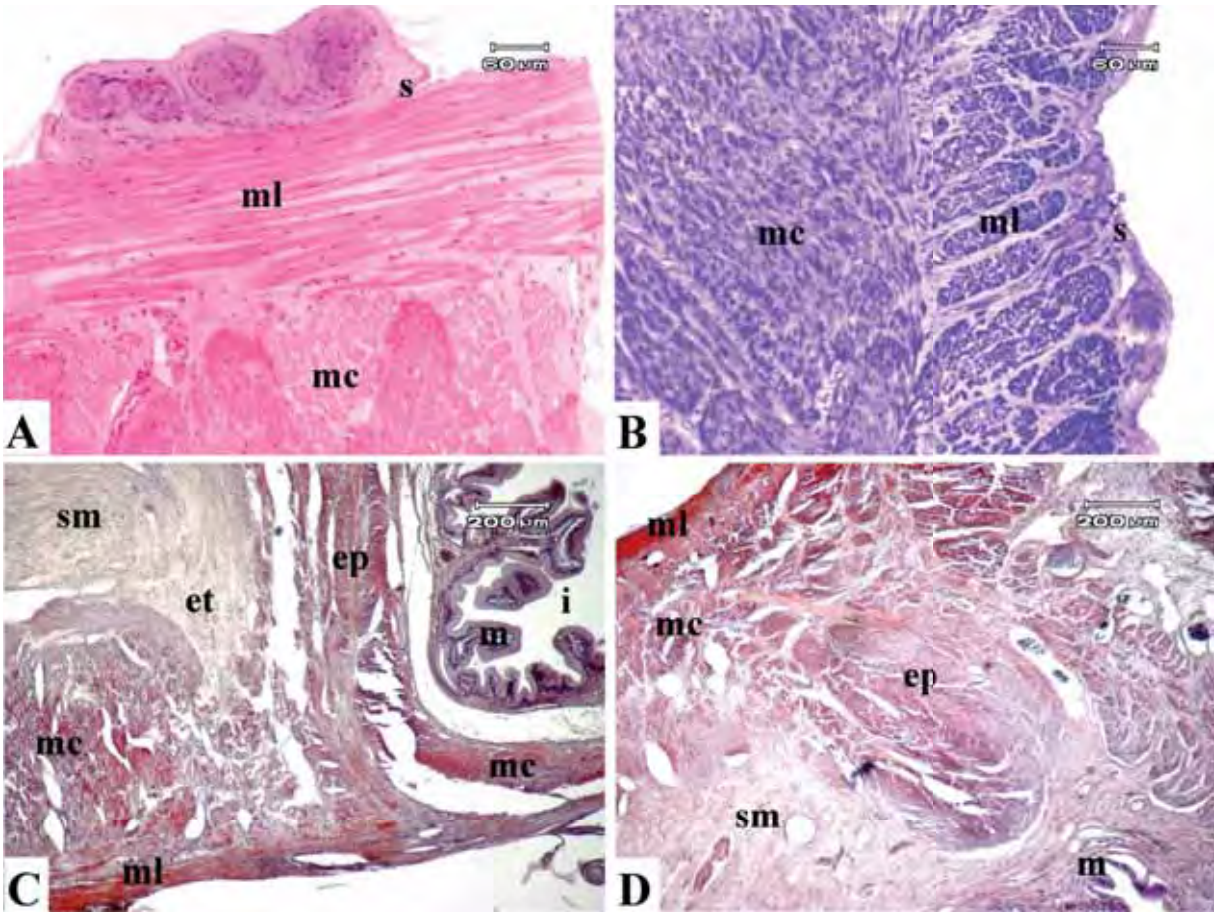

Figura 26. A. Região cárdica, evidenciando fibras musculares lisas em orientação circular e longitudinal (HE); **B**: Região pilórica, com camada muscular circular mais espessa (AT); **C** e **D**: Região pilórica, evidenciando esfíncter pilórico (HE). Legenda: et-estômago; i-intestino; m-camada mucosa; sm-submucosa; mc-muscular circular; ml-muscular longitudinal, s-camada serosa; ep-esfíncter pilórico.

3.4 Intestino

O intestino de *H. platyrhynchos* apresentou-se anatomicamente dividido em regiões com características distintas:

- anterior: composto inicialmente por uma curvatura na transição com estômago e que posteriormente tornou-se retilínea, com pregas espessas;

- **médio:** constituído por inúmeras alças;

- **posterior:** retilíneo, com pregas delgadas;

- **reto:** retilíneo, sem pregas.

Internamente, a parede intestinal apresentou pregas longitudinais em formato "S", diminuindo em altura e espessura em direção ao intestino posterior (Figuras 27A – 27E).

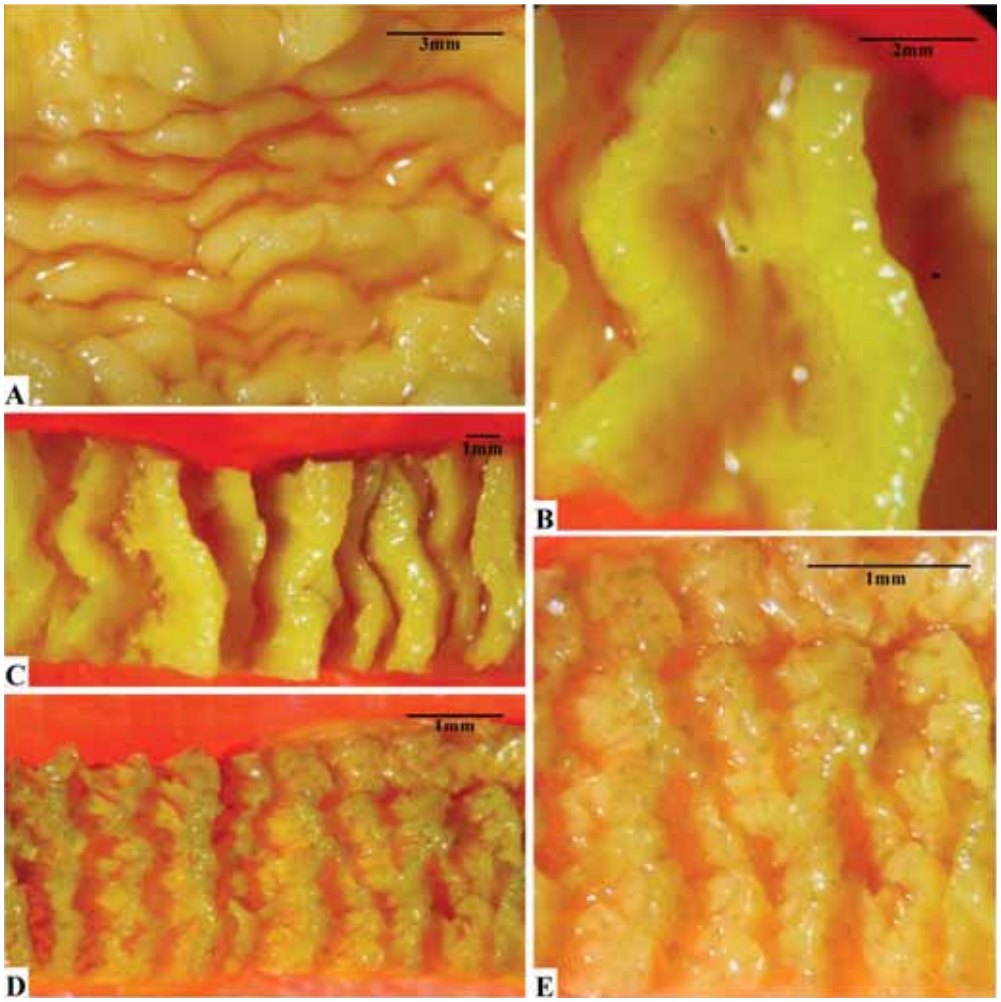

Figura 27. Estereoscopia da superfície interna das diferentes regiões do intestino de *H. platyrhynchos*. **A, B** e **C**: Região anterior do intestino, evidenciando pregas longitudinais em formato de "S"; **D** e **E**: Pregas longitudinais menores na região posterior do intestino.

O intestino apresentou pregas longitudinais espessas na região anterior (Figuras 28A e 30A). Em direção ao intestino posterior, as pregas longitudinais tornaram-se menores, assim como, apresentaram um eixo principal e pregas secundárias mais delgadas (Figuras 28B, 30B e 30C). Na região retal não foram observadas pregas, apenas na região de transição com o meio externo, com pregas longitudinais delgadas. Nas observações em MEV, a superfície epitelial apresentou microvilosidades, compondo a borda em escova dos enterócitos (Figura 29D). A superfície intestinal ainda apresentou as aberturas de células caliciformes (Figuras 29A - 29D), que aumentaram em número em direção ao intestino posterior.

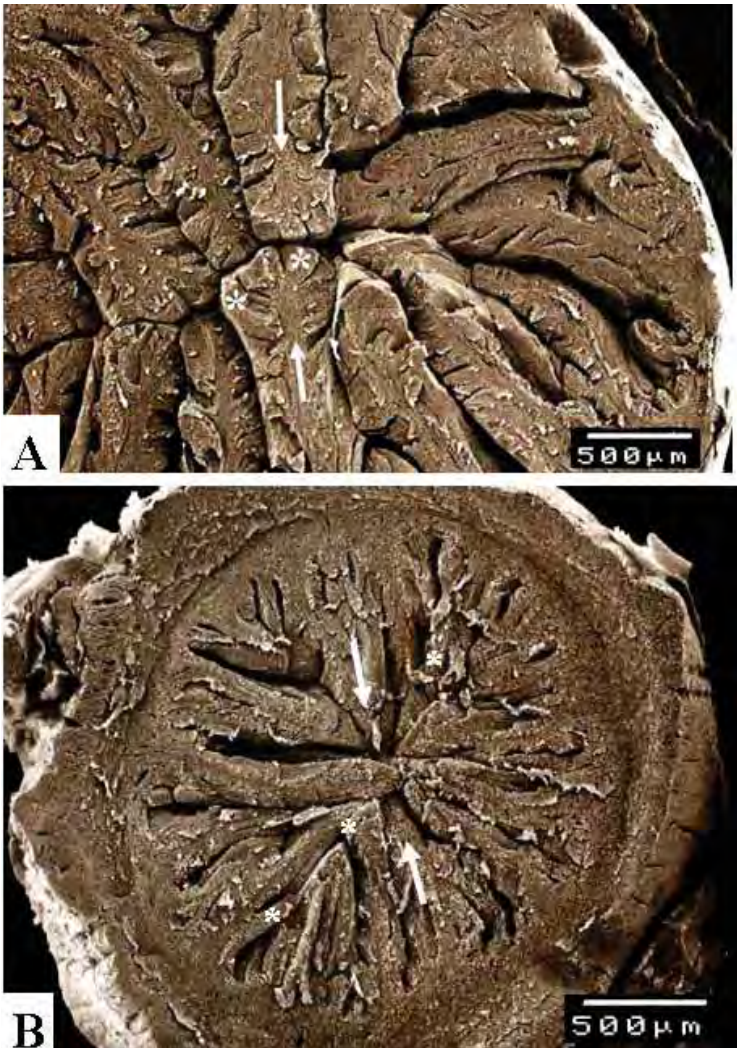

Figura 28. MEV, em cortes transversais do intestino de *H. platyhrynchos*. **A**: Região anterior, evidenciando pregas longitudinais (seta) e transversais (*) espessas; **B**: Região posterior, evidenciando pregas longitudinais (seta) e transversais delgadas (*).

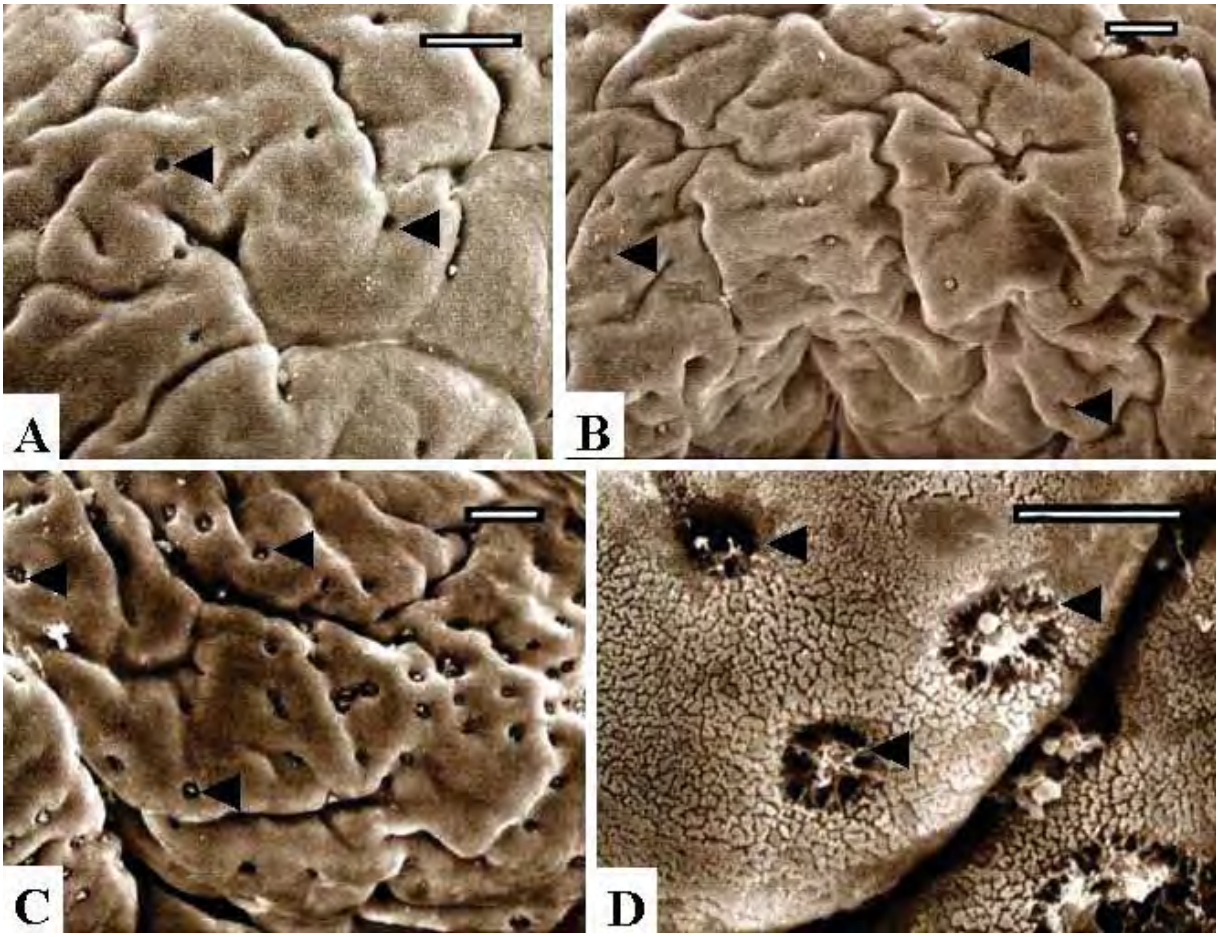

Figura 29. MEV das regiões anterior, médio e posterior do intestino de *H. platyhrynchos*. **A**: Superfície epitelial do intestino anterior, evidenciando baixa concentração de aberturas de células caliciformes (Barra: 10µm); **B**: Superfície epitelial do intestino médio (Barra: 10µm); **C**: Superfície epitelial do intestino posterior, evidenciando alta concentração de aberturas de células caliciformes (Barra: 10µm); **D**: Destaque para microvilosidades e aberturas de células caliciformes (Barra: 5µm). Legenda: abertura de células caliciformes (cabeças de seta).

Histologicamente, as diferentes regiões intestinais apresentaram-se similares, não sendo observadas regiões de transição nos preparados histológicos. Ainda em relação às pregas longitudinais, foram constituídas principalmente pela camada mucosa. Na região anterior observou-se que parte da submucosa também participa da constituição da prega (Figuras 30A e 31A), enquanto que a região posterior apresentou eixo constituído apenas pela lâmina própria (Figura 30C). Em contrapartida, a camada submucosa e a camada muscular foram mais delgadas na região anterior (Figura 30A), aumentando em espessura em direção ao intestino posterior (Figuras 30B e 30C).

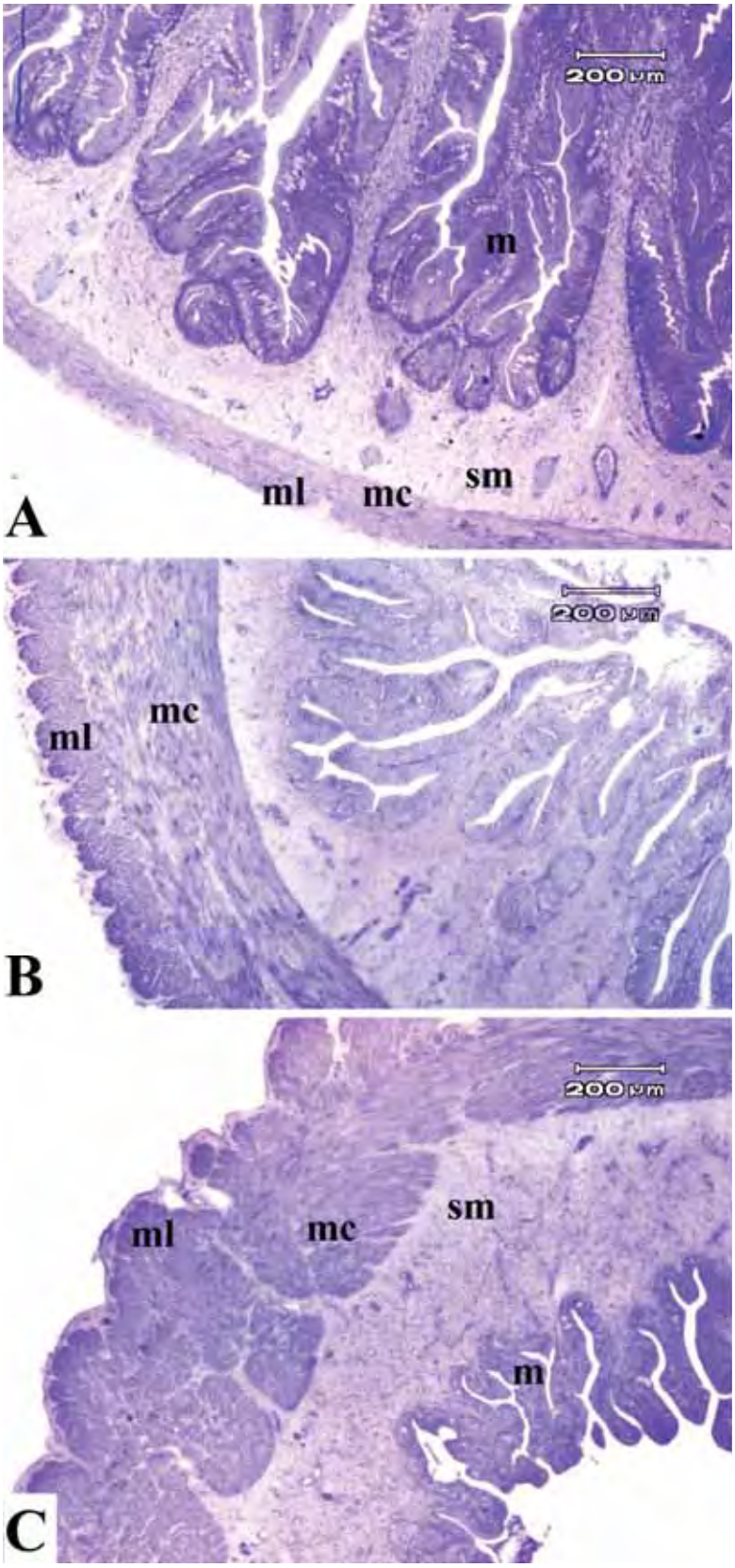

Figura 30: Cortes transversais de regiões intestinais, evidenciando variação em espessura de suas camadas (AT). **A**. Intestino anterior; **B**. Intestino médio; **C**. Intestino posterior. Legenda: m-mucosa; sm-submucosa; mc-muscular circular; ml-muscular longitudinal.

3.4.1 Mucosa

A camada mucosa do intestino constituiu-se por epitélio de revestimento simples colunar, com dois tipos celulares predominantes: células absortivas e células caliciformes.

- Células absortivas ou enterócitos: são células colunares, com núcleo alongado localizado na região basal da célula (Figuras 31B – 31F). Na região apical observou-se a borda em escova, que reagiu ao PAS devido à presença de mucossubstâncias neutras (Figuras 32A, 32D, 33B, 33D). Estas mucossubstâncias secretadas pelos enterócitos formaram o glicocálice. Além da presença de mucossubstâncias neutras, foram observadas mucossubstâncias ácidas, AB (pH 2,5) positivas, em intensidade menor na superfície apical das células absortivas.

Em relação aos estudos em MET, observou-se a presença de células absortivas, com núcleos basais e nucléolo evidente (Figuras 34A e 35A). O núcleo apresentou-se alongado, com predominância de cromatina descondensada, delgada heterocromatina na periferia do núcleo e poucos grumos condensados (Figura 35A e 35C). Mitocôndrias arredondadas e/ou alongadas e retículo endoplasmático bem desenvolvido foram observados no citoplasma ao redor do núcleo. Na região medial e apical das células absortivas observaram-se estruturas arredondadas fortemente eletrondensas (Figuras 34B e 35C). As células absortivas da região anterior apresentam menor quantidade dessas estruturas eletrondensas no citoplasma, em relação à região posterior (Figuras 34A e 34B). Na superfície apical das células absortivas, foram observadas microvilosidades (Figuras 35C – 35E).

Estabelecendo a unidade epitelial, foi possível visualizar o complexo juncional nas membranas plasmáticas laterais das células epiteliais, composto pela zônula de oclusão, zônula de adesão, desmossomos e interdigitações de membrana (Figura 35B). Ainda foi possível notar que as células absortivas são menos eletrondensas que as caliciformes (Figuras 35A, 35D e 35F).

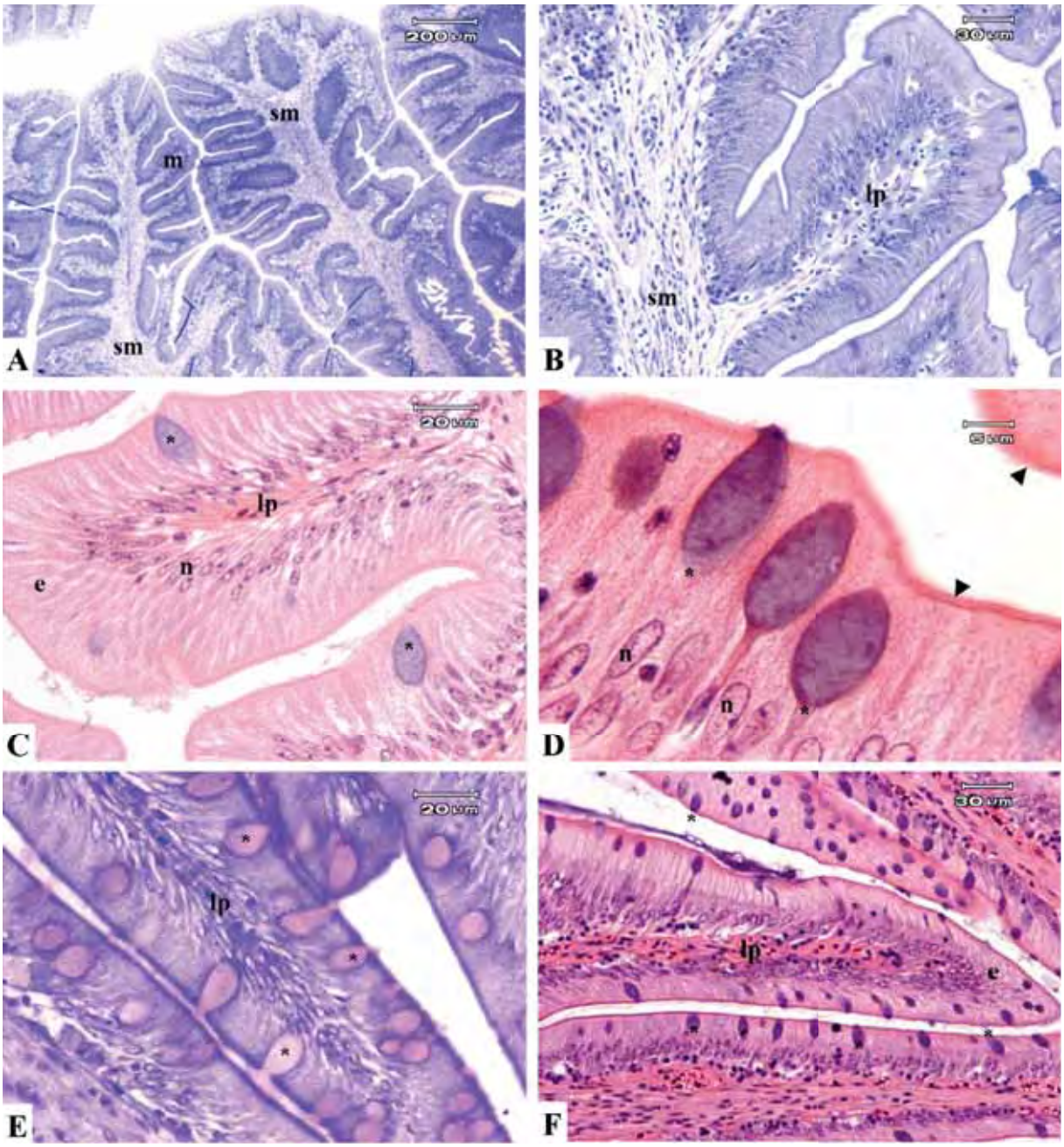

Figura 31: Corte transversal do intestino de *H. platyrhynchos*. **A** e **B.** Intestino anterior (AT); **C.** Intestino anterior (HE); **D.** Intestino médio (HE); **E.** Intestino posterior (AT); **F.** Intestino posterior (HE). Legenda: e-epitélio; lp-lâmina própria; sm-submucosa; n-núcleo; células caliciformes (*); borda em escova (cabeças de seta).

- Células caliciformes intestinais: apresentaram núcleo basal e citoplasma repleto de mucossubstâncias do tipo mucinas (Figuras 32A – 32F e 33A – 33F). Essas células foram pouco numerosas na região anterior do intestino (Figura 31C), aumentando em número em direção ao intestino posterior (Figuras 31D – 31F). As células caliciformes apresentaram secreções PAS e AB (pH 2,5 e 1,0) positivas (Figuras 32A - 32F). Quando submetidas à reação de PAS + AB (pH 2,5), foram observadas secreções de coloração azulada, indicativo de predominância de mucossubstâncias ácidas (Figuras 33A – 33F), e também secreções de coloração violeta, indicando possíveis associações entre as mucossubstâncias neutras e ácidas.

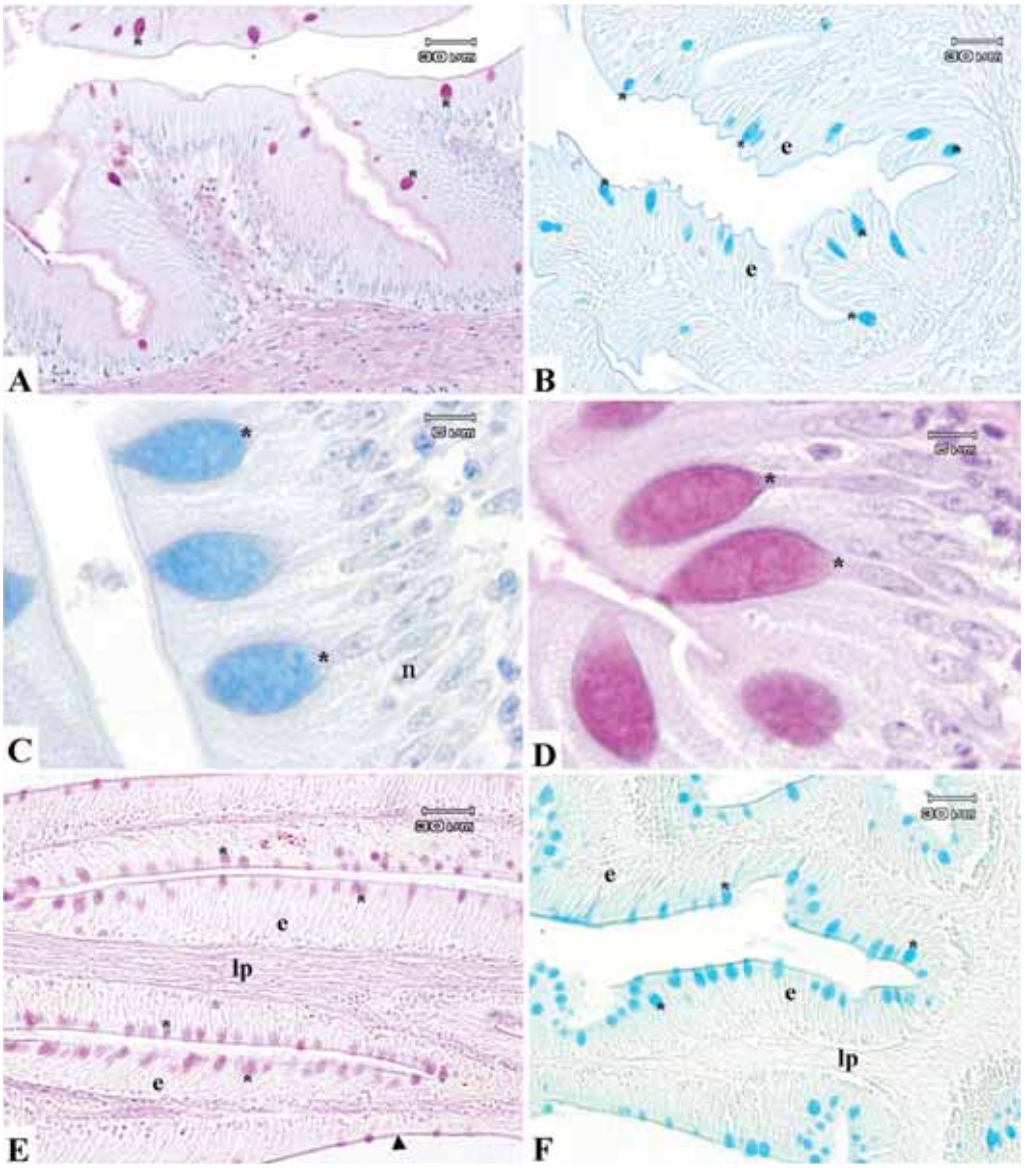

Figura 32: Reações histoquímicas no intestino de *H. platyrhynchos*. **A.** Intestino anterior (PAS); **B.** Intestino anterior (AB pH 2,5); **C.** Intestino médio (AB pH 2,5); **D.** Intestino médio (PAS); **E.** Intestino posterior (PAS); **F.** Intestino posterior (AB pH 2,5). Legenda: e-epitélio; lp-lâmina própria; n-núcleo; células caliciformes (*); borda em escova (cabeças de seta).

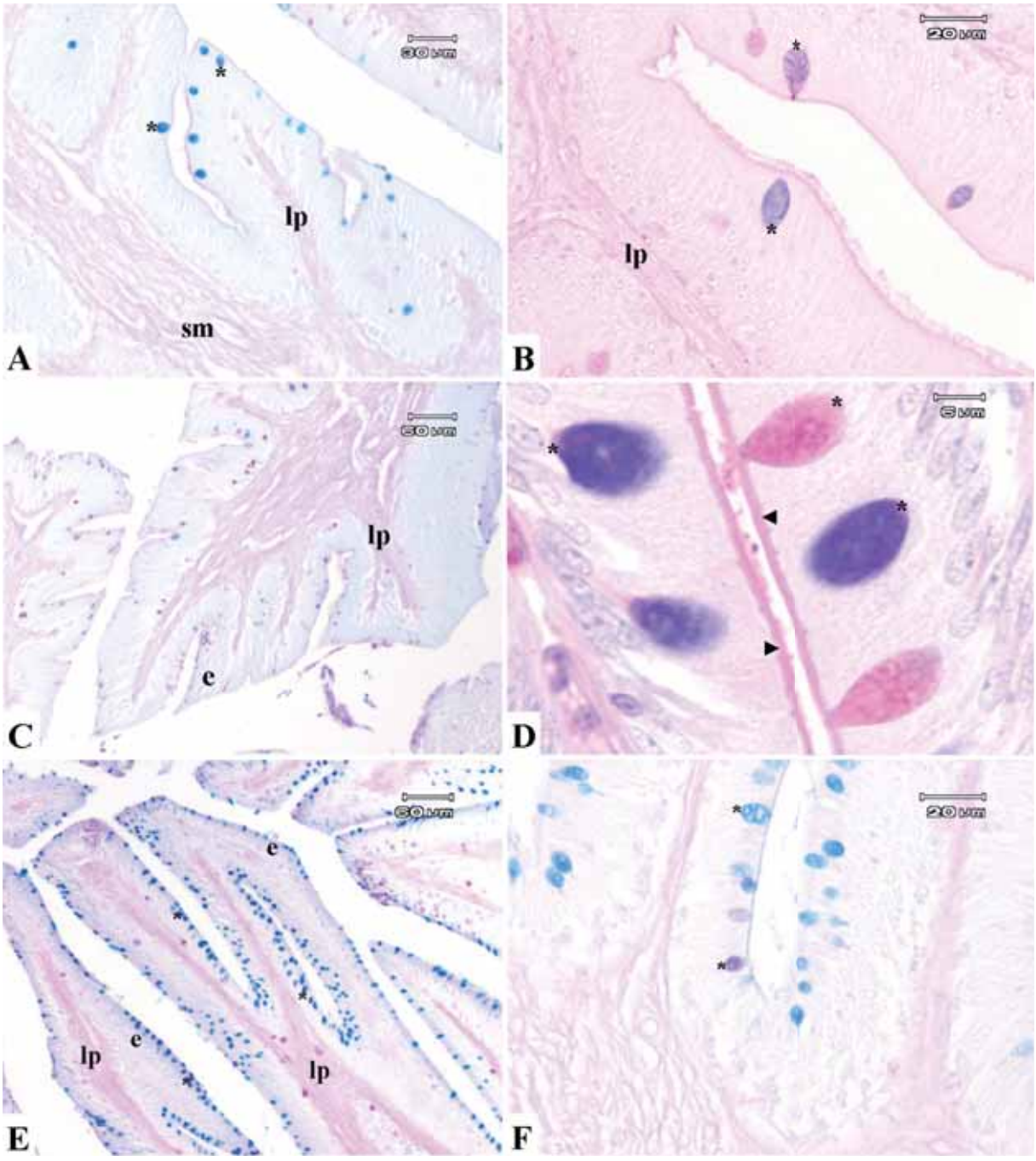

Figura 33. Reação AB (pH 2,5) + PAS no intestino de *H. platyrhynchos*. **A** e **B:** Intestino anterior; **C** e **D:** Intestino médio; **E** e **F:** Intestino posterior. Legenda: e-epitélio; lp-lâmina própria; sm-submucosa; células caliciformes (*); borda em escova (cabeças de seta).

Nos estudos em MET, as células caliciformes foram observadas entre as células absortivas, com formato característico: base delgada e ápice amplo, com núcleo basal e citoplasma apical repleto de vesículas de secreção (Figuras 35D e 35F). As vesículas de secreção apresentaram formato arredondado, com diferentes eletrondensidades (Figuras 34B, 35C – 35E). Diferentemente das células epiteliais do estômago, que apresentaram vesículas de secreção dispersas, as vesículas de secreção das células caliciformes estavam agrupadas, por meio de uma membrana. O citoplasma perinuclear apresentou mitocôndrias e retículo endoplasmático bem desenvolvido.

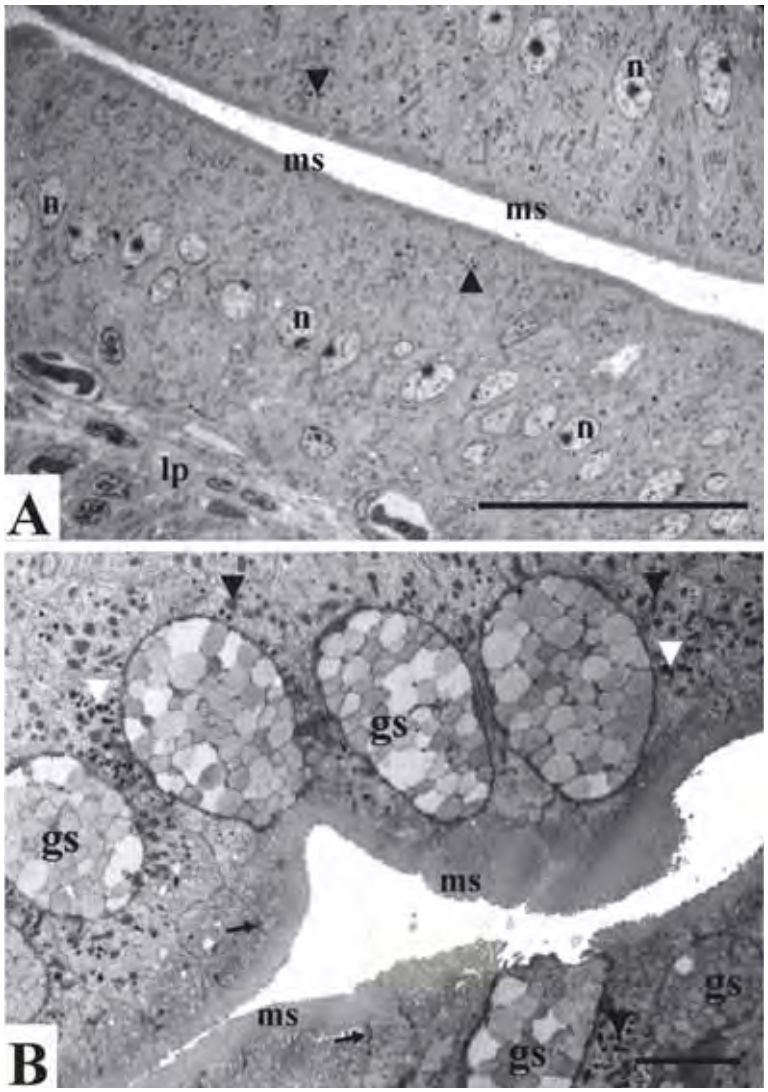

Figura 34: A: Ultraestrutura do intestino anterior, evidenciando baixa concentração de células caliciformes e de vesículas absortivas eletrondensas (Barra 60µm); **B:** Ultraestrutura do intestino posterior. Notar grande concentração de células caliciformes e de vesículas eletrondensas (Barra 5µm). Legenda: ms-microvilosidades; n-núcleo, estruturas eletrondensas (cabeças de seta branca); mitocôndrias (cabeças de seta preta); lp-lâmina própria; gs-grânulos de secreção; junções de membrana (seta).

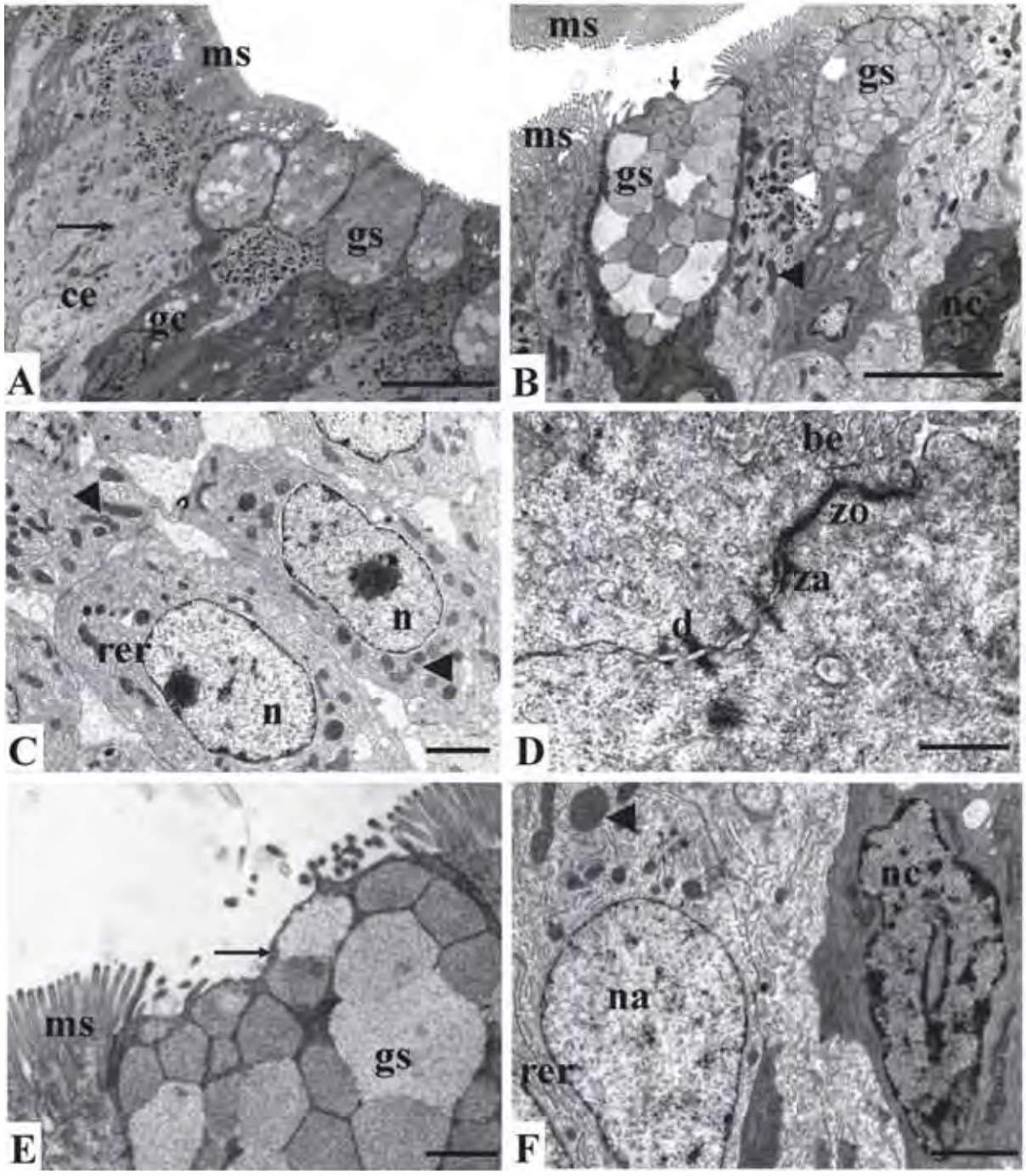

Figura 35. A. Ultraestrutura da região basal do epitélio intestinal anterior (Barra 2µm); **B**. Junções de membrana no intestino médio (Barra 500nm); **C.** Célula caliciforme no intestino médio, evidenciando a presença de vesículas absortivas nos enterócitos adjacentes (Barra 5µm); **D.** Células do epitélio intestinal posterior. Notar grande concentração de vesículas absortivas e mitocôndrias (Barra 5µm); **E.** Abertura de célula caliciforme no intestino posterior (Barra 1µm); **F.** Região posterior, comparando núcleos de enterócito e de célula caliciforme (Barra 2µm). Legenda: ce-enterócito; gc-célula caliciforme; n-núcleo, mitocôndrias (cabeças de seta preta); rer-retículo endoplasmático rugoso; zo-zônula de oclusão; za-zônula de adesão; d-desmossomo; ms-microvilosidades; gs-grânulos de secreção de célula caliciforme; estruturas eletrondensas (cabeças de seta branca); abertura de célula caliciforme (seta); na-núcleo de enterócito; nc-núcleo de célula caliciforme.

Entre as células epiteliais, observou-se a presença de linfócitos. Estas células apresentaram núcleos arredondados, bem corados à hematoxilina e ao azul de toluidina. Ainda foi observada a presença de outras células na base do epitélio, possivelmente células indiferenciadas.

Abaixo da região epitelial, a lâmina própria apresentou-se constituída por tecido conjuntivo frouxo, com maior número de células comparado à camada submucosa, e menor quantidade de fibras conjuntivas (Figuras 31B e 31C). Porém, não foi observada a camada muscular da mucosa, estando a lâmina própria contínua à submucosa.

3.4.2 Submucosa

A camada submucosa foi composta por tecido conjuntivo denso, caracterizado por baixa concentração de células e maior quantidade de fibras conjuntivas (Figuras 30A – 30C e 31A e 31B). A camada submucosa apresentou-se mais delgada na região anterior quando comparada às regiões subsequentes do intestino.

3.4.3 Muscular

A camada muscular apresentou-se dividida em duas regiões, quanto à orientação de suas fibras. Esta camada também aumentou em espessura em direção ao intestino posterior (Figuras 30A – 30C).

- Camada muscular circular interna: constituída por fibras musculares lisas, sendo esta camada mais espessa que a muscular longitudinal externa (Figuras 36A e 36B).

- Camada muscular longitudinal externa: constituída por fibras muscular lisa com orientação longitudinal (Figuras 36A e 36B).

3.4.4 Serosa

A camada serosa apresentou-se composta por um epitélio de revestimento simples pavimentoso e por uma camada de tecido conjuntivo, com pequena quantidade de células, e grande quantidade de fibras conjuntivas (Figuras 36A e 36B).

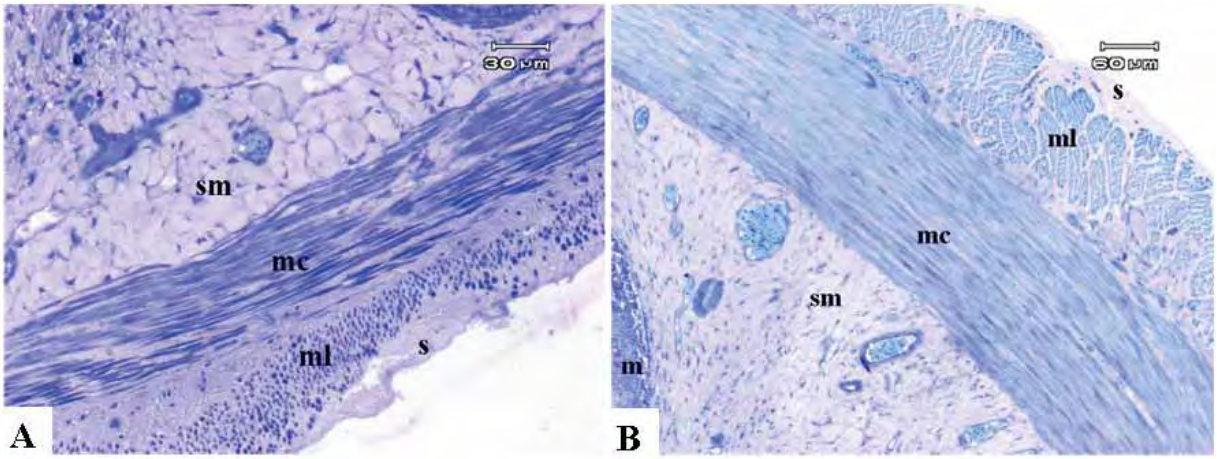

Figura 36: Cortes transversais do intestino de *H. platyrhynchos*, comparando a camada muscular da região anterior (**A**) com a muscular da região posterior (**B**). Legenda: m-camada mucosa; sm-submucosa; mc-muscular circular; ml-muscular longitudinal; s-serosa.

3.5 Reto

Na porção final do intestino posterior, foi observada uma diminuição na altura das pregas intestinais (Figuras 37A e 37B) e, consequentemente, o aparecimento de uma região sem pregas, composta por epitélio simples colunar. Este epitélio de revestimento apresentou menor quantidade de células caliciformes em comparação com as demais regiões do intestino. Posteriormente não foram observadas células caliciformes na porção final do tubo digestivo (Figuras 37C e 37D). Porém, a ausência de células caliciformes foi compensada pelo aparecimento de mucossubstâncias na região apical deste epitélio, semelhante ao observado no estômago. Esta região de mucossubstâncias apresentou-se contínua, sendo observada em todas as células desta região. O muco apical observado nesta camada reage fortemente ao AB (pH 1,0 e 2,5) e ao PAS (Figuras 38B, 38E e 38F).

Ainda foi observado um espessamento da camada muscular circular na região do reto (Figuras 37A e 38A). Por outro lado, ocorreu uma diminuição gradativa da camada muscular longitudinal externa. A região posterior do reto, na transição com meio externo, apresentou grande número de pregas longitudinais (Figuras 38C - 38F), com epitélio simples colunar e região apical com mucossubstâncias. Ao final do tubo digestivo, observou-se a substituição abrupta do epitélio intestinal colunar simples por epitélio estratificado pavimentoso (Figura 38F), com grande concentração de “club cells” e algumas células caliciformes.

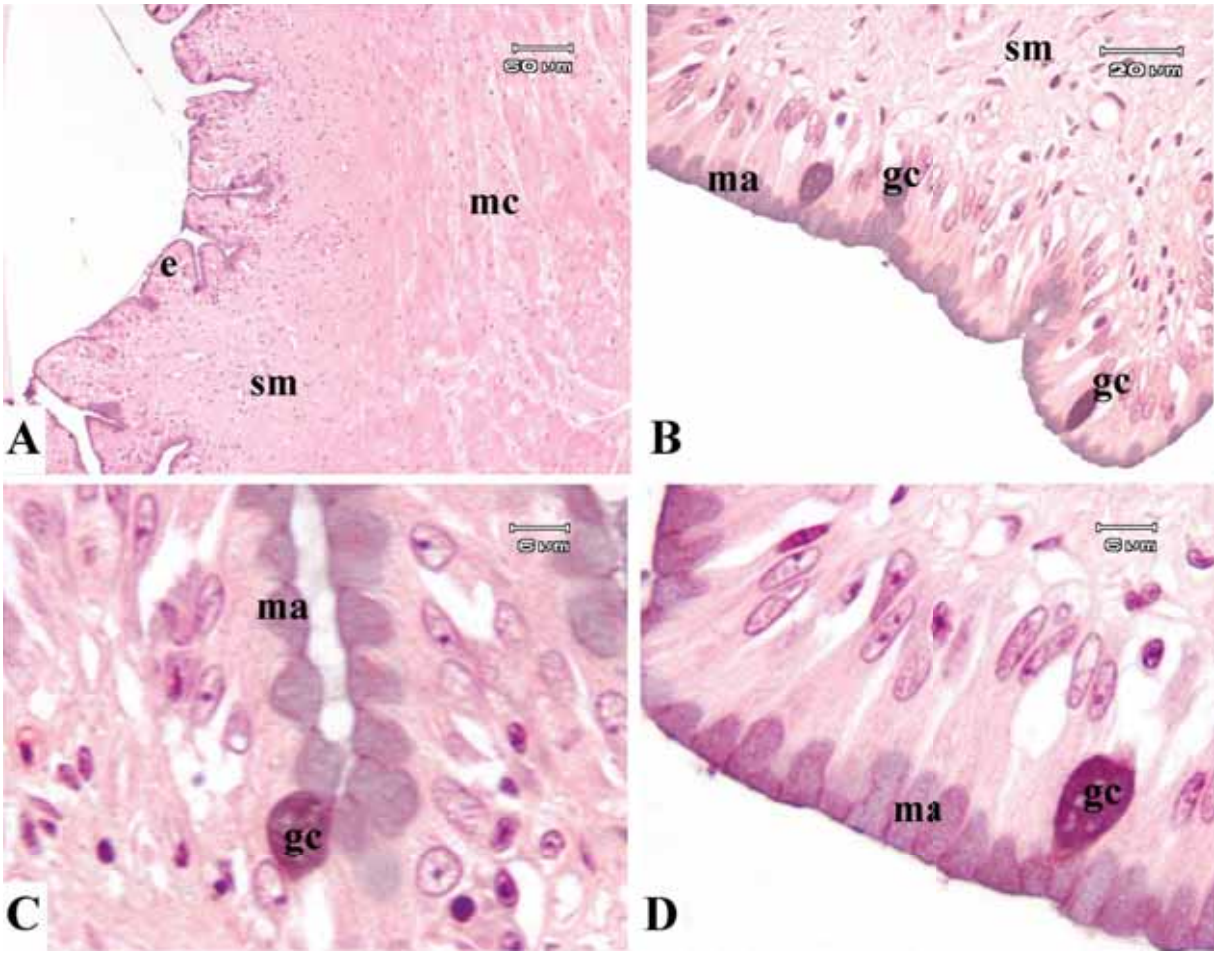

Figura 37: Cortes transversais da região de transição do intestino posterior para reto de *H. platyrhynchos*. **A**. Pregas longitudinais diminuindo em altura e camada muscular circular espessa (HE); **B, C** e **D:** Epitélio intestinal, evidenciando células epiteliais com região apical com mucossubstâncias e com diminuição no número de células claiciformes (HE). Legenda: sm-submucosa; mc-muscular circular; e-epitélio, ma-mucossubstâncias; c-células caliciformes.

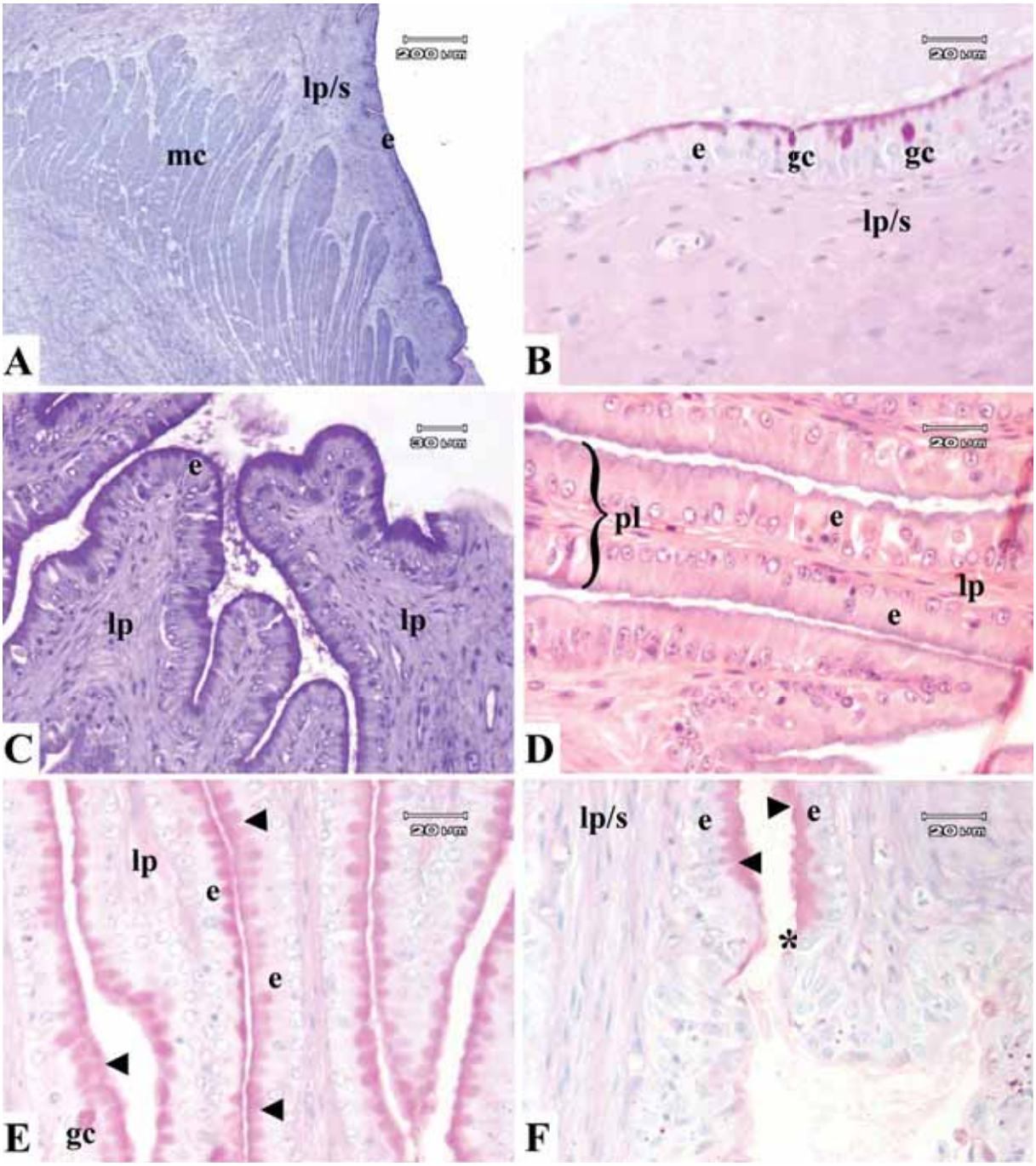

Figura 38. Região final do intestino. **A**: Região do reto, evidenciando camada muscular circular espessa e ausência de pregas longitudinais (AT); **B**: Camada mucosa do reto, notar diminuição no número de células caliciformes e a presença de células epiteliais com região apical PAS positiva (PAS + H); **C, D** e **E**: Pregas longitudinais próxima à transição para meio externo (C-AT, D-HE e E-PAS+H); **F**: Transição do epitélio colunar simples do intestino para o epitélio estratificado da pele (PAS+H). Legenda: pl-pregas longitudinais; lp/s-lâmina própria/submucosa; mc-camada muscular circular; e-epitélio; gc-célula caliciforme; mucosubstâncias no região apical das células epiteliais (cabeças de seta); transição epitelial simples para estratificada (*).

3.6 Avaliação geral dos resultados histoquímicos

De acordo com os resultados obtidos, foi possível diferenciar dois tipos de células secretoras com reatividades histoquímicas distintas no epitélio de revestimento do tubo digestivo de *H. platyrhynchos* (Tabela 1). No esôfago foram observadas células caliciformes fortemente PAS positivas principalmente na região caudal (Figura 39A). No estômago, todas as células do epitélio de revestimento apresentaram reação PAS positiva com forte intensidade na região apical (Figuras 39A, 39D e 39E). Posteriormente, no intestino foram diferenciadas as células caliciformes (Figuras 39E – 39G) e, no reto, todas as células epiteliais apresentaram citoplasma apical com forte reatividade ao PAS (Figura 39H). Estes resultados são indicativos da presença de mucossubstâncias neutras. Por outro lado, após a reação com AB (pH 2,5), foi observada forte reatividade nas células caliciformes da região cranial do esôfago (Figura 39B), nas células caliciformes do intestino (Figura 39G) e na região apical das células epiteliais do reto, indicativo da presença de mucossubstâncias ácidas. A reação ao AB (pH 1,0) foi observada apenas na região cranial do esôfago e em todo o intestino. Contudo, a presença de associação de muco ácido e neutro (reação AB pH 2,5 + PAS) foi observada na região cranial do esôfago (Figura 39C), no intestino médio e posterior em intensidade moderada e no intestino anterior e reto em intensidade fraca.

Tabela 1. Análise histoquímica de mucossubstâncias nas diferentes regiões do tubo digestivo de *Hemisorubim platyrhynchos*.

	Esôfago	Esôfago	Esôfago porção final	Estômago epitélio	Estômago região glandular	Intestino anterior	Intestino médio	Intestino posterior	Reto
AB pH 2,5	-	+++	+	+	-	+++	+++	+++	+++
AB pH 1,0	-	+++	-	-	-	+	++	+++	+++
PAS	-	+++	+++	+++	+	+++	+++	+++	+++
AB (pH 2,5) + PAS	-	++	-	-	-	+	++	++	++
	Células club	Células caliciformes	Células caliciformes	Células epiteliais	Células oxintopépticas	Células caliciformes	Células caliciformes	Células caliciformes	Células epiteliais

Intensidade de reação: forte (+++); moderada (++), fraca (+); negativa (-).

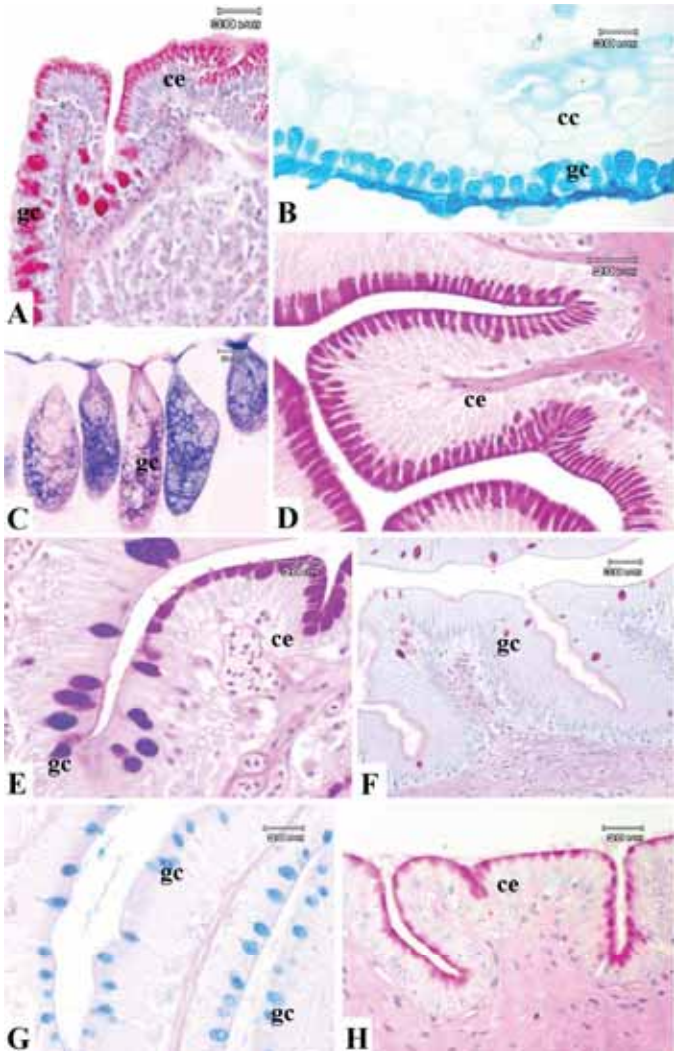

Figura 39: A: Transição esôfago/estômago (PAS+H); **B** e **C**: Células caliciformes esofágicas (B: AB pH 2,5; C: AB+PAS); **D**: Células epiteliais gástricas com secreções PAS positivas; **E**: Transição estômago/intestino (AB+PAS+H); **F** e **G**: Células caliciformes intestinais (F: PAS+H; G: AB pH 2,5); **H**: Células epiteliais do reto com mucossubstâncias apicais (PAS+H). Legenda: gc-células caliciformes; cc-"club cells"; ce-células epiteliais.

.....4. Discussão

4. Discussão

Os animais utilizados neste estudo apresentaram entre 32,0 e 38,0cm de comprimento padrão, indicando que já atingiram maturidade sexual, pois, em geral, a primeira maturação gonadal nesta espécie ocorre com cerca de 30,0cm de comprimento padrão (CAROLSFELD et al., 2003).

O tubo digestivo de *H. platyrhynchos* apresentou-se dividido em: cavidade bucofaríngea, esôfago, estômago (regiões cárdica, fúndica e pilórica) e intestino (anterior, médio, posterior e reto). O comprimento médio do início do esôfago ao final do intestino foi 17,43 ±1,27cm, abrangendo cerca de 50% do comprimento corporal padrão. O esôfago apresentou-se curto e pregueado, o estômago volumoso e distensível e o intestino curto. Assim, como descrito por Nikolski (1963), o tubo digestivo desta espécie é típico de peixes carnívoros.

O hábito alimentar carnívoro de *H. platyrhynchos*, preferencialmente piscívoro noturno, assim como o canibalismo observado, requerem atenção quanto aos manejos dos animais em pisciculturas. Em um estudo com *Hoplias lacerdae*, Luz et al. (2000) observaram que a heterogeneidade de tamanhos é um dos fatores que levam ao canibalismo. Assim, faz-se necessária a utilização de tanques distintos para a criação de *H. platyrhynchos*, evitando assim as perdas por canibalismo ou predação de outras espécies de tamanho inferior.

Esôfago

A espécie estudada apresentou esôfago curto, com extremidades cranial e caudal expandidas, fazendo ligação entre cavidade bucofaríngea e o estômago. Pregas longitudinais permitem a ampliação da luz para facilitar a passagem de alimento, visto que esta espécie é piscívora e ingere presas grandes e inteiras, conforme apresentado nos resultados macroscópicos. Em *Pseudoplatystoma coruscans*, CAL (2006) observou que no esôfago as

pregas primárias são elevadas e longitudinais. Em *Claris batrachus*, o esôfago apresentou numerosas pregas longitudinais profundas (RAJI e NOROUZI, 2010). De acordo com Cao e Wang (2009), as pregas da mucosa esofágica de *Pelteobagrus fulvidraco* apresentaram formato de folha, e em *Pimelodus maculatus*, Santos et al. (2007) também observaram a presença de pregas longitudinais na região esofágica. Com isso, pode-se inferir que as pregas longitudinais, assim como a elasticidade da parede esofágica, são importantes para a deglutição das presas.

Histologicamente, *H. platyrhynchos* apresentou, como a maioria dos vertebrados, parede esofágica constituída pelas seguintes camadas: mucosa, submucosa, muscular e serosa. A mucosa de *H. platyrhynchos* apresentou epitélio de revestimento estratificado, classificado como pavimentoso, embora as células epiteliais superficiais não sejam muito achatadas, mas foram mais delgadas quando comparadas às células epiteliais basais. Em *Pseudoplatystoma coruscans* (CAL, 2006), *Claris batrachus* (RAJI e NOROUZI, 2010) e *Pimelodus maculatus* (SANTOS et al., 2007) foi constatado que o epitélio de revestimento esofágico foi estratificado pavimentoso. Porém, Cao e Wang, (2009) observaram que o epitélio de revestimento esofágico foi estratificado colunar no bagre *Pelteobagrus fulvidraco*.

De acordo com a literatura especializada, o epitélio esofágico apresenta renovação constante de células superficiais que sofrem abrasão devido ao atrito provocado pela passagem de alimento. As células epiteliais são mais alongadas na região basal do epitélio e mais delgadas na região superficial e, à medida que o epitélio esofágico sofre abrasão, as células superficiais vão se desprendendo. Mesmo com a existência de grande quantidade de células caliciformes, que estão relacionadas com lubrificação epitelial e defesa contra bactérias e outros patógenos (HUMBERT et al., 1984, DOMENEGHINI et al., 2005), a existência de um epitélio estratificado em constante renovação é importante para manutenção da camada mucosa, contra lesões mecânicas e invasão bacteriana (HUMBERT et al. 1984).

Em relação às observações ultraestuturais, o epitélio esofágico apresentou células com

muitas especializações de membrana, principalmente desmossomos, interdigitações e microssaliências digitiformes. Devido à ingestão de presas grandes e vivas, este epitélio passa por constante processo de abrasão e forte tensão. Assim, a observação de grande quantidade de junções de membrana é fundamental para a manutenção do epitélio esofágico. De acordo com Junqueira e Carneiro (2008), os filamentos intermediários de queratina do citoesqueleto que se inserem na placa de ancoragem dos desmossomos promovem uma forte adesão às células.

O núcleo das células epiteliais apresentou cromatina descondensada, mas também grumos de heterocromatina. Assim, estas células apresentam pouca síntese protéica. Esta informação também foi confirmada pelas características do citoplasma, que apresenta poucas organelas. Em contraposição, Carrassón et al. (2006) observaram a existência de grânulos associados ao complexo de Golgi elétron-lucentes nas células epiteliais do esôfago de *Dentex dentex*, sugerindo que estes grânulos podem combinar-se com mucossubstâncias secretadas pelas células caliciformes, para fornecer uma função digestiva ao esôfago.

A membrana apical das células epiteliais superficiais do esôfago de *H. platyrhynchos* apresentou microssaliências digitiformes, relacionadas com a facilitação da passagem de alimento. Estas estruturas conferem proteção à mucosa contra traumas mecânicos e permitem o acúmulo de mucossubstâncias secretadas pelas células caliciformes, formando uma superfície lubrificada para a passagem dos alimentos (HUMBERT et al., 1984; GRAU et al., 1992).

A maioria dos estudos que descreveram células secretoras em peixes, classificou-as como células caliciformes ou células mucossecretoras, independentemente de sua localização. Embora alguns estudos, como de Leknes (2011) em *Hyphessobrycon anisitsi*, façam distinção entre as células secretoras, chamando-as de células em formato de saco (sac-like cells) no esôfago, de células caliciformes no intestino e cecos pilóricos, neste estudo, optou-se por chamar as células secretoras de caliciformes, mesmo que estas apresentem características

morfológicas e histoquímicas distintas em relação ao órgão observado. Segundo Góes e Taboga (2005), o termo células caliciformes é aplicado à grande variedade de tipos celulares que, mesmo apresentando algumas variações fenotípicas durante sua diferenciação, estabelecem como principal atividade metabólica a produção de secreção mucinogênica.

As células caliciformes esofágicas de *H. platyrhynchos* apareceram em grande quantidade ao longo de todo epitélio esofágico, formando uma camada contínua de células. A grande quantidade de células caliciformes observadas em *H. platyrhynchos* é justificada, segundo Scocco et al. (1998), pela ausência de glândulas salivares na cavidade bucofaríngea, sendo este muco responsável pela formação do quimo e lubrificação do epitélio ao longo de todo o tubo digestivo.

Em relação às reações histoquímicas, as células caliciformes apresentaram mucossubstâncias neutras, PAS positivas, ao longo de todo epitélio de revestimento. Segundo Díaz et al. (2008), a observação de mucossubstâncias positivas ao PAS, indica a presença de hexoses neutras, enquanto que as mucosubstâncias que não reagem ao PAS apresentam apenas proteínas.

Mucossubstâncias ácidas carboxiladas, positivas ao AB (pH 2,5), foram observadas na maior parte do epitélio esofágico, exceto na região posterior do esôfago, próxima a transição com o estômago, onde foi observada uma reação muito fraca ao AB. Mucossubstâncias ácidas sulfatadas, positivas ao AB (pH 1,0) também seguiram o mesmo padrão das carboxiladas, positivas ao AB (pH 2,5), exceto na região posterior, que não apresentou reação ao AB (pH 1,0)

As reações AB+PAS, na maioria das células caliciformes de *H. platyrhynchos*, revelaram mucossubstâncias de coloração azulada (ácidas) e/ou violeta (associação de mucossubstâncias neutras e ácidas), com exceção na região posterior do esôfago que apresentou mucossubstâncias de coloração avermelhada (neutras). Sarasquete et al. (2001) obtiveram resultados similares em larvas de *Sparus aurata*, *Solea senegalensis* e *Acipenser*

baeri. Segundo estes autores, as células secretoras da região distal do esôfago, próximas ao estômago não desenvolvido, secretam grandes quantidades de glicoconjugados neutros e as células da região proximal faringe-esôfago produzem menor quantidade de glicoconjugados neutros e grande quantidade de glicoconjugados ácidos, sulfatados e carboxilados. A dominância de mucossubstâncias ácidas na maior parte do epitélio esofágico, assim como a presença de mucossubstâncias neutras na região posterior, pode ser explicada pelas funções atribuídas a cada tipo de secreção. De acordo com Humbert et al. (1984), diferenças nas mucossubstâncias esofágicas estão relacionadas com a atividade de cada região, tendo anteriormente função protetora e, posteriormente, função absortiva.

As mucossubstâncias ácidas, carboxiladas e sulfatadas, aumentam a viscosidade das secreções (TIBBETTS, 1997; DÍAZ et al., 2008), bem como protegem o epitélio contra agentes infecciosos (HUMBERT et al., 1984). Assim, sua localização na região anterior do esôfago é importante, considerando que faz o primeiro contato do alimento com o epitélio de revestimento. De acordo com Ferraris et al. (1987), o muco ácido, além de aumentar a viscosidade, proteger contra microorganismos e agir como lubrificante do epitélio, pode agir como tampão para os sucos gástricos altamente ácidos. Contudo, no estômago, mucossubstâncias neutras protegem o epitélio contra a auto-digestão e, nesse sentido, as células caliciformes da região posterior do esôfago, fortemente PAS positivas, também podem estar relacionadas à função protetora da parede gástrica. Ainda segundo Murray et al. (1996), essas mucossubstâncias auxiliam na digestão enzimática e transformação do alimento em quimo. Cao e Wang (2009) concluíram que a grande quantidade de muco neutro no esôfago indica digestão pré-gástrica.

Em relação aos tipos de células caliciformes esofágicas, a presença de muco PAS positivo, AB positivo, e associação de ambos, podem indicar a existência de três tipos celulares distintos, como evidenciaram Cao e Wang (2009). Contudo, a presença de células com diferentes reatividades de muco pode também indicar a ocorrência de células

caliciformes em diferentes graus de diferenciação (ELBAL e AGULLEIRO, 1986). Segundo Sarasquete et al. (2001), células caliciformes PAS positivas podem representar um estágio inicial de desenvolvimento celular, quando as células estão produzindo principalmente glicoproteínas. Posteriormente, seriam adicionados às glicoproteínas os grupamentos carboxilados e sulfatados, o que produz as reações AB positivas. Spicer e Schulte (1992) concluíram que a presença de dois tipos de muco nas células caliciformes esofágicas pode representar dois estágios de maturação, mas não exclui a possibilidade de existência de duas populações celulares. Sinha e Chakravorky (1982) relataram que células caliciformes indiferenciadas podem conter apenas mucossubstâncias neutras, enquanto células caliciformes diferenciadas contêm mucinas carboxiladas e sulfatadas, detectáveis com reações de PAS e AB utilizadas em conjunto e separadamente.

Assim, as observações em *H. platyrhynchos* permitiram distinguir diferentes tipos celulares. Os tipos celulares diferem em relação à região do esôfago, sendo um tipo celular na região anterior e intermediária, com mucossubstâncias fortemente PAS e AB positivas, e outro tipo na região posterior do esôfago, PAS positivo e fracamente AB positivo. Ainda células caliciformes exclusivamente PAS positivas não foram detectadas na região anterior e intermediária do esôfago pela reação AB (pH 2,5) + PAS, o que contraria a existência de mucossubstâncias PAS positivas em células indiferenciadas, descritas por Sinha e Chakravorky (1982).

As células caliciformes apresentaram núcleo basal, típico de células secretoras, que apresentam grande atividade sintética, com cromatina descondensada. Ainda na região basal próximo ao núcleo, foram observadas muitas organelas citoplasmáticas, principalmente mitocôndrias e retículo endoplasmático rugoso. A região medial e apical do citoplasma apresentou-se repleta de vesículas de secreção. As vesículas produzidas pelas células caliciformes acumularam-se na região apical e, posteriormente, foram secretadas. Estas vesículas apresentaram diferentes graus de eletrondensidades, o que pode estar relacionado

com os resultados histoquímicos: as mucossubstâncias neutras e ácidas coexistem nas células caliciformes e podem apresentar diferentes eletrondensidades.

O epitélio esofágico apresentou também as “club cells” ou claviformes. Algumas “club cells” apresentaram-se binucleadas no esôfago de *H. platyrhynchos*, assim como Park et al. (2003) relataram para a epiderme de *Liobagrus mediadiposalis*. De acordo com Nakamura et al. (2001), as “club cells” apareceram na epiderme e na mucosa epitelial da cavidade oral e do esôfago de *Conger myriaster*. As “club cells” de *H. platyrhynchos* apresentam núcleo central e irregular, com predomínio de cromatina descondensada, característico de células secretoras. O citoplasma apresentou-se volumoso, com poucas organelas, principalmente mitocôndrias próximas ao núcleo. A maior parte do citoplasma foi ocupada por substância de eletrondensidade homogênea.

As “club cells” localizaram-se em posição basal no epitélio esofágico de *H. platyrhynchos*. Segundo Nakamura et al. (2001), ainda não foi totalmente elucidada a maneira como as “club cells” promovem a liberação de suas secreções. De acordo com Whitera e Mittal (1983), as “club cells” são glândulas unicelulares de secreção serosa, classificadas como holócrina. Segundo esses autores, a liberação de suas secreções ocorre por ruptura das “club cells”, quando ocorre um ferimento na pele. No entanto, Nakamura et al. (2001) observaram a existência de secreções de “club cells” na superfície cutânea em peixes não lesionados. Os mesmos autores observaram que, quando a cavidade bucal foi repetidamente lavada com tampão fosfato salino (PBS), sem ferir a superfície da mucosa, a solução recuperada apresentou atividade aglutinadora, indicando a presença de “congerins”, uma secreção das “club cells”.

As análises histoquímicas revelaram que as “club cells” não apresentaram glicoproteínas, sendo negativas às reações de PAS e AB (pH 2,5 e 1,0). Al-Banaw et al. (2010) também fizeram análises histoquímicas de glicoproteínas das “club cells” de *Arius tenuinspinis* e concluíram que suas secreções não contêm ou contêm poucos carboidratos.

Segundo Ralphs e Benjamin (1992), as “club cells” observadas na epiderme de *Corydoras aeneus*, *Acanthophthalmus semicinctus* e *Botia horae* contém sulfato de queratan e de condroitina, demonstrados por imunocitoquímica. Em Anguilliformes, as “club cells” do esôfago apresentaram produção e secreção de galectinas, como o “congerin” (NAKAMURA et al., 2001). As galectinas são lectinas solúveis que se ligam a galactoses contendo glicoconjugados (ROSA et al., 2005).

As secreções das “club cells” têm sido associadas a diversos processos de defesa. Segundo Godinho et al. (1970), essas células promovem proteção ao epitélio, caso haja alguma lesão esofágica. De acordo com Ralphs e Benjamin (1992), essas células podem contribuir para o suporte físico do epitélio e ajudar na recuperação do tecido lesado. O “congerins” participa da defesa contra microorganismos patogênicos e parasitas (NAKAMURA et al., 2001), da modulação da resposta imune (OFFNER et al., 1990), da regulação do crescimento celular (YAMAOKA et al., 1991) e da apoptose (PERILLO et al., 1995). Além disso, as “club cells” da epiderme de *Rita rita* também têm sido associadas com a secreção de feromônios (AGRAWAL e MITTAL, 1992). Estas células apareceram em grande quantidade no esôfago de *H. platyrhynchos*. A mucosa esofágica sofre lesões constantes, devido ao hábito alimentar carnívoro desta espécie. Assim, a secreção das “club cells” agiriam na recuperação da região lesada.

Ainda em relação à camada mucosa de *H. platyrhynchos*, abaixo do epitélio de revestimento encontrou-se uma camada de tecido conjuntivo, com baixa concentração de células e vasos sanguíneos, mas com grande concentração de fibras conjuntivas. Esta camada, conhecida como lâmina própria, apresentou continuidade com a submucosa devido à ausência da camada muscular da mucosa. As características da lâmina própria/submucosa, espessa e com alta concentração de fibras conjuntivas, confirmaram as características do esôfago desta espécie, altamente distensível e com grande resistência a lesões provocadas pela ingestão de presas grandes. A mucosa esofágica de *H. platyrhynchos* não apresentou glândulas

propriamente ditas, nem botões gustativos, assim como observado em *Pseudoplatystoma coruscans* (CAL, 2006) e *Claris batrachus* (RAJI e NOROUZI, 2010).

A camada submucosa, além de ser espessa, adentrou a camada muscular, formando um conjunto de fibras musculares entremeado por grandes quantidades de células e fibras conjuntivas. A camada muscular do esôfago foi dividida em duas subcamadas de acordo com a orientação de suas fibras: longitudinal interna e circular externa. A composição das fibras mostrou-se unicamente estriada. A formação dos conjuntos de fibras musculares revestidos por tecido conjuntivo principalmente na camada interna foi relacionada ao hábito alimentar desta espécie, permitindo maior distensibilidade ao esôfago. Ainda, de acordo com Junqueira e Carneiro (2008), as fibras musculares estriadas possibilitam uma contração rápida e vigorosa, o que permite ao esôfago de espécies carnívoras prenderem suas presas, evitando movimentação intensa e possíveis fugas, já que tais presas são ingeridas vivas.

A camada serosa do esôfago de *H. platyrhynchos* apresentou uma espessa porção de tecido conjuntivo, localizada externamente à camada muscular circular. Esta porção apresentou pequena quantidade de células conjuntivas, mas grande quantidade de fibras, esboçando um tecido conjuntivo denso modelado. Esta característica permite ao esôfago grande distensão sem sofrer lesões.

Estômago

O estômago de *H. platyrhynchos* apresentou-se sacular e com a região glandular bem desenvolvida. Também foi observada uma grande capacidade de expansão, devido à presença de pregas longitudinais e pregas secundárias, assim como pela ocorrência de camada submucosa espessa, com grande quantidade de fibras conjuntivas. As pregas gástricas facilitam a distensão do órgão, de modo que presas inteiras de tamanho relativamente grande sejam contidas dentro do estômago para posteriormente serem digeridas.

Em relação à histologia do estômago de *H. platyrhynchos*, observou-se uma composição similar em todas as regiões, diferindo quanto a presença da porção glandular nas regiões cárdica e fúndica e espessamento muscular na região pilórica. A parede gástrica constituiu-se por mucosa, submucosa, muscular e serosa, como observado na maioria dos vertebrados.

A camada mucosa apresentou-se espessa, sendo constituída por epitélio colunar simples, lâmina própria com região glandular espessa nas regiões cárdica e fúndica e muscular da mucosa. O epitélio colunar simples apresentou, em todas as regiões gástricas, células com núcleos basais e secreções apicais, fortemente PAS positivas e fracamente reativas ao AB (pH 2,5), assim como observado em *Anguilla anguilla* por Domeneghini et al. (2005). A presença de região apical fortemente PAS positiva indicou a ocorrência de grande quantidade de muco neutro, necessário à manutenção da parede gástrica, para impedir a autodigestão pelos ácidos e enzimas secretados pelas glândulas gástricas (DOMENEGHINI et al., 2005). De acordo com Pedini et al. (2005), além da função protetora, a presença de muco neutro pode ser evidência de absorção e transporte de macromoléculas através de membranas. A pequena quantidade de muco ácido no epitélio, provavelmente aje como lubrificante para os conteúdos gástricos, bem como tampão para os sucos gástricos altamente ácidos (FERRARIS et al., 1987).

Em relação às análises ultraestruturais, o núcleo das células epiteliais do estômago de *H. platyrhynchos* apresentou-se basal, com alguns grumos de heterocromatina, mas predomínio de cromatina descondensada. O citoplasma mostrou grande quantidade de mitocôndrias e retículo endoplasmático. De acordo com Elbal e Agulleiro (1986), a presença de um retículo endoplasmático bem desenvolvido e complexo de Golgi no citoplasma das células epiteliais apicais sugere que ambas as organelas participam da síntese e empacotamento de grânulos. Nas membranas plasmáticas laterais das células epiteliais de *H. platyrhynchos* foi observada a presença de junções de membrana apical, com destaque para o

grande número de interdigitações. De acordo com Naguib et al. (2011), células epiteliais gástricas de *Schilbe mystus* possuem numerosos complexos de interdigitações e a coesão destas células é assegurada por complexos juncionais nas membranas celulares apicais adjacentes.

As células epiteliais gástricas de *H. platyrhynchos* apresentaram vesículas (grânulos) de secreção circulares e achatadas, fortemente eletrondensas e localizadas na região apical. Segundo Osman e Caceci, (1991) as células caliciformes do estômago de *Tilapia nilotica* caracterizaram-se pela presença de numerosos grânulos elétron-transparentes que contêm carboidratos ácidos sulfatados. Em *H. platyrhynchos*, algumas vesículas de secreção apresentaram-se dispostas lado a lado formando uma linha paralela na região apical, para proteger o epitélio contra autodigestão, sendo também secretada para a superfície epitelial. De acordo com Naguib et al. (2011), os grânulos de secreção das células epiteliais do estômago de *Schilbe mystus* apresentaram formas e tamanhos variáveis e foram vistos frequentemente em contato com as membranas celulares apicais, para esvaziar seu conteúdo para o lúmen gástrico via exocitose. Ostos-Garrido et al. (1993) também destacaram que o conteúdo dos grânulos é lançado no lúmen gástrico por exocitose.

Abaixo do epitélio foi observada em *H. platyrhynchos* a lâmina própria composta por de tecido conjuntivo, seguido por um aglomerado de glândulas gástricas. Este tecido conjuntivo apresentou muitas fibras e grande quantidade de vasos sanguíneos, sendo responsável pela sustentação e nutrição do epitélio assim como das glândulas gástricas. A presença do tecido conjuntivo entre as glândulas gástricas, organizando-as em blocos, pode permitir maior distensão ao estômago.

As glândulas gástricas apareceram em grande quantidade na região cárdica e fúndica, mas estavam ausentes na região pilórica, assim como observado em *Pelteobagrus fulvidraco* (CAO e WANG, 2009). As glândulas são compostas por células oxintopépticas e secretam ácido clorídrico e enzimas gástricas (GARCÍA-HERNÁNDEZ et al., 2001). Assim como

observado por Domeneghini et al. (2005), as células oxintopépticas também apresentaram citoplasma apical moderadamente PAS positivo, porém em *Silurus glanis* as células glandulares não apresentaram mucossubstâncias (PETRINEC et al., 2005). A grande quantidade de glândulas tubulares é característica marcante de espécies carnívoras, como observado em *Pseudoplatystoma coruscans* (CAL, 2006), necessárias à digestão de presas que são ingeridas inteiras.

Por meio de observações em microscopia eletrônica de transmissão, as glândulas gástricas apresentaram-se tubulares, com lúmen estreito. Conforme ocorria o acúmulo de vesículas de secreção no citoplasma de suas células, observou-se um aumento no lúmen glandular. As glândulas gástricas foram constituídas por células oxintopépticas, que apresentaram formato piramidal com núcleo basal, predomínio de cromatina descondensada, indicando uma função secretora. O citoplasma ao redor do núcleo estava repleto de mitocôndrias e retículo endoplasmático, enquanto que a região apical do mesmo apresentava muitas vesículas de secreção de baixa eletrondensidade (elétron-lucentes).

De acordo com Naguib et al. (2011), as células oxintopépticas de *Schilbe mystus* possuíam retículo endoplasmático rugoso bem desenvolvido e numerosos grânulos de secreção, estando envolvidos na secreção de pepsinogênio (OSTOS-GARRIDO et al., 1993; NAGUIB et al., 2011). A membrana plasmática apical das células oxintopépticas de *H. platyrhynchos* apresentou muitos microvilos e muitas junções nas membranas laterais. No citoplasma apical observou-se ainda um sistema vesículo-tubular de membranas. De acordo com Ostos-Garrido et al. (1996), a morfologia das células oxintopépticas de *Anguilla anguilla* é semelhante às parietais de glândulas gástricas de mamíferos, exceto pela ausência de canalículos intracelulares.

Em *H. platyrhynchos*, o sistema vesículo-tubular apresentou-se mais desenvolvido quando as células oxintopépticas possuíam grande concentração de vesículas elétron-lucentes. Alguns autores descreveram essa mesma estrutura e sugeriram que o sistema vesículo-tubular

apresenta constituição similar à membrana plasmática (NOAILLAC-DEPEYRE e GAS, 1978; OSTOS-GARRIDO et al., 1993; OSTOS-GARRIDO et al., 1996; GARGIULO et al., 1997). Em *Schilbe mystus*, a região apical do citoplasma das células oxintopépticas continham muitas mitocôndrias espalhadas e um sistema vesículo-tubular bem desenvolvido, que pode estar envolvido na secreção de ácido clorídrico (NAGUIB et al., 2011). Este sistema apresentou-se bastante desenvolvido, principalmente quando foi observada a secreção de vesículas elétron-lucentes. De acordo com Ostos-Garrido et al. (1996), a rede vesículo-tubular participa da produção de ácido clorídrico e, em *Anguilla anguilla*, muitas mitocôndrias estão associadas a esta rede, visto que sua síntese apresenta alta exigência de energia.

Abaixo da região glandular, observou-se em *H. platyrhynchos* a continuação da lâmina própria presente entre as glândulas. A camada mucosa era limitada pela muscular da mucosa e em seguida observou-se a camada submucosa, composta por muitas células e fibras conjuntivas. A presença destas camadas, lâmina própria, muscular da mucosa e submucosa, constituiu um conjunto muito espesso, que fornece grande elasticidade e capacidade expansiva ao estômago.

Em relação à camada muscular, visualizaram-se duas túnicas distintas, interna circular e externa longitudinal, compostas por fibras musculares lisas. A camada muscular apresentou espessamento em direção à região pilórica e, ao longo de todo estômago, a musculatura circular mostrou-se mais desenvolvida, devido à grande expansão que sofre o estômago. A região pilórica apresentou um esfíncter pilórico com musculatura mais desenvolvida, responsável pela manutenção do trânsito de alimento para o intestino.

Intestino

O intestino de *H. platyrhynchos*, dividido anatomicamente em anterior, médio, posterior e reto, apresentou pregas longitudinais que diminuíram em altura e espessura em direção ao intestino posterior, e estiveram ausentes na região retal. Histologicamente

apresentou epitélio composto por células absortivas (enterócitos) e células caliciformes. As células caliciformes aumentaram em densidade em direção à região posterior.

No intestino anterior, pregas longitudinais muito espessas foram observadas, bem como grandes quantidades de pregas secundárias. Segundo Murray et al. (1996), a elevação da mucosa em pregas aumenta a superfície absortiva do intestino. Além disso, as pregas longitudinais foram maiores no intestino anterior, comparado à região posterior. Gargiulo et al. (1998) também observaram pregas espessas na região anterior do intestino em híbridos de tilápia (*Tilapia* spp.). Esta característica possibilita a expansão da região anterior para receber alimento pré-digerido do estômago e completar o processo de digestão, por meio de enzimas pancreáticas e sais biliares do fígado. A diminuição em tamanho das pregas longitudinais no intestino posterior e a ausência destas no reto podem ser relacionadas com processos de armazenamento e concentração do bolo alimentar, por meio de absorção de água e íons e, consequentemente, eliminação do bolo fecal.

Os enterócitos ou células absortivas compunham a maior parte do epitélio de revestimento intestinal, tendo como principal função a absorção de nutrientes, bem como de secreção enzimática. Em *H. platyrhynchos* apresentaram-se como células colunares altas, com características absortivas: microvilosidades na membrana apical, citoplasma amplo e núcleos basais. Sob microscopia eletrônica de transmissão, foi observado o núcleo em posição basal, com predomínio de cromatina descondensada e nucléolo evidente. O citoplasma perinuclear apresentou retículo endoplasmático bem desenvolvido e também grande quantidade de mitocôndrias arredondadas e/ou alongadas. Ostos-Garrido et al. (1996) observaram dois tipos de enterócitos morfologicamente distintos: um mais numeroso, com citoplasma pouco eletrondenso, e outro com citoplasma mais elétron-denso. A região intermediária e apical dos enterócitos de *H. platyrhynchos* apresentou muitas mitocôndrias, bem como algumas estruturas fortemente eletrondensas, possivelmente lisossomos, já que os animais destinados a microscopia eletrônica de transmissão estavam em jejum.

Essas características observadas nos enterócitos podem favorecer a absorção de moléculas, principalmente lipídeos, no intestino anterior, que são facilmente digeridos, assim como descrito por muitos autores (SIRE et al., 1981; ABAURREA-EQUISOAIN et al., 1996; NACHI et al., 1998; HERNANDEZ-BLAZQUEZ e SILVA, 1998; HERNANDEZ-BLAZQUEZ et al., 2006; BORGES et al., 2010; NAGUIB et al., 2011). Em *Dentex dentex* (CARRASON et al., 2006) e *Spaurus aurata* (ELBAL e AGULLEIRO, 1986), foi observada a presença de pinocitose principalmente nas células da região retal. Porém, Gargiulo et al. (1998) observaram em híbrido de tilápia (*Tilapia* spp.) a presença de pinocitose, seguida de digestão intracelular no intestino anterior, enquanto que o intestino posterior apresentou numerosos vacúolos claros que estão presentes no citoplasma supranuclear, provavelmente indicando absorção de lipídios.

Em relação aos enterócitos do intestino médio e posterior de *H. platyrhynchos*, observou-se um aumento em número das estruturas arredondadas fortemente eletrondensas, possivelmente lisossomos. Como relatado por muitos autores (HERNANDEZ-BLAZQUEZ et al., 2006; BORGES et al., 2010; NAGUIB et al., 2011), as regiões médio e posterior do intestino estão relacionadas com absorção de macromoléculas protéicas e possivelmente digestão final intracelular. Assim, a presença de maior quantidade de lisossomos seria necessária para completar a digestão intracelular. Também foi observada a presença de muitas mitocôndrias, necessárias para suprir o gasto de energia para a absorção dessas macromoléculas. Essas macromoléculas seriam principalmente proteínas (ABAURREA-EQUISOAIN et al., 1996; NACHI et al., 1998), mas outros autores tem sugerido que os intestinos médio e posterior também reabsorvem macromoléculas provenientes do pâncreas e do fígado, enzimas e sais biliares, respectivamente (HERNANDEZ-BLAZQUEZ e SILVA, 1998).

Ainda em relação aos enterócitos de *H. platyrhynchos*, visualizou-se a presença de microvilosidades formando a borda em escova na região apical. A altura das microvilosidades

não variou em relação à região intestinal analisada. Nas análises histoquímicas, a borda em escova apresentou reação positiva ao PAS devido à presença do glicocálice, que é composto por uma camada de açúcares na face externa da membrana plasmática, formada por proteínas integrais, incluindo resíduos glicídicos das glicoproteínas, que vão se adicionar aos glicídios complexos dos glicolípídios e a outras moléculas (JUNQUEIRA e CARNEIRO, 2008). De acordo com Murray et al. (1996), o glicocálice dos enterócitos reage apenas com PAS, indicando a presença de glicoconjugados neutros, fato que explica uma função emulsificante do alimento em quimo e indica função absortiva. O mesmo foi observado por Stroband et al. (1979), que correlacionaram a presença de mucinas neutras e a atividade da enzima fosfatase alcalina na borda em escova, com absorção e transporte de macromoléculas através da membrana.

Outro tipo celular identificado no epitélio intestinal de *H. platyrhynchos* foram as células caliciformes. Estas células apresentaram núcleo basal, com predomínio de cromatina descondensada, embora alguns grumos de heterocromatina tenham sido evidenciados. O citoplasma perinuclear apresentou retículo endoplasmático rugoso e complexo de Golgi desenvolvidos. A região medial e apical do citoplasma esteve quase sempre repleta de grânulos de secreção. Estes grânulos foram agrupados no citoplasma das células caliciformes, sendo mantidos por uma membrana. Outra característica interessante do citoplasma das células caliciformes foi a eletrondensidade. Comparativamente, observou-se que são mais eletrondensas que as células absortivas (enterócitos).

Quanto às características histoquímicas, as mucossubstâncias das células caliciformes apresentaram-se reagentes ao PAS e ao AB. De acordo com Tibbets (1997), as células caliciformes estão espalhadas no epitélio intestinal de *Arrhamphus sclerolepis krefftii*, presentes na razão de uma célula PAS positiva para uma célula AB positiva. Ainda, segundo o autor, as glicoproteínas neutras produzidas pelas células caliciformes são menos viscosas que o muco AB positivo produzido em outras partes do canal alimentar. Em *H. platyrhynchos*, foi

observada a presença de células caliciformes PAS positivas. Ao submeter as secções à reação AB (pH2,5) + PAS, visualizou-se um pequeno número de células com secreção de coloração avermelhada e/ou violeta e um predomínio marcante de células com secreção azulada. Isto indica que as mesmas células apresentam secreções tanto PAS como AB (pH 2,5) positivas. Assim como discutido nas células caliciformes esofágicas, a reação PAS positiva pode indicar um estágio celular indiferenciado (ELBAL e AGULLEIRO, 1986; MURRAY et al., 1996.; SARASQUETE et al., 2001).

Quanto à função das secreções observadas nas células caliciformes, Carrassón et al. (2006) propuseram que as mucossubstâncias ácidas protegem o epitélio intestinal contra degradação pela ação das glicosidases. Ainda segundo Petrinec et al. (2005), a presença de mucossubstâncias, especialmente as sulfatadas no intestino, possivelmente regula a transferência de proteínas ou de fragmentos, bem como de íons e fluídos. Spicer e Schulte (1992) sugeriram que mucinas sulfatadas (positivas ao AB pH 1,0) podem formar um complexo com a pepsina, estabilizando ou formando um tampão da enzima, devido à sua atividade anti-péptica. Além disso, a adição de radicais sulfatados nas glicoproteínas pode ser importante para aumentar a resistência do muco contra degradação bacteriana (RHODES et al., 1985). Mucossubstâncias neutras (positivas ao PAS) podem fornecer co-fatores requeridos para a quebra enzimática do alimento (ANDERSON, 1986). De acordo com Clarke e Witcomb (1980), mucossubstâncias neutras combinadas com fosfatase alcalina estão envolvidas na digestão e emulsificação do alimento ao quimo. Os estudos de Ribelles et al. (1995) concluíram que a qualidade das mucossubstâncias do tubo digestivo está diretamente relacionada às condições ambientais, que podem afetar a funcionalidade do sistema digestório.

Em relação à região retal de *H. platyrhynchos*, observou-se a ausência de pregas longitudinais e de células caliciformes, embora todas as células epiteliais apresentem região apical com mucossubstâncias. A presença de mucossubstâncias na região posterior do

intestino está relacionada à proteção epitelial e lubrificação para facilitar os processos de defecação (FERRARIS et al., 1987; CARRASSÓN et al., 2006).

Em relação aos linfócitos intraepiteliais observados na mucosa intestinal de *H. platyrhynchos*, provavelmente estes apresentam função regulatória, suprimindo a resposta do sistema imune para antígenos intestinais e induzindo simultaneamente uma resposta imune na lâmina própria (PABST, 1987). A mucosa intestinal de *Labeo nilotieus* contém linfócitos numerosos, que podem desempenhar um papel na proteção epitelial contra organismos patogênicos (NAGUIB et al., 2011). Assim, o grande número de linfócitos na mucosa intestinal de peixes sugere a existência de um sistema imune mucoso (ROMBOUT et al., 1989).

De modo geral, o intestino dos teleósteos pode ser dividido histofisiologicamente em: região anterior relacionada com a absorção de gorduras (NACHI et al., 1998); região medial responsável pela absorção de macromoléculas protéicas (STROBAND e KROON, 1981; STROBAND e van der VEEN, 1981); região posterior relacionada com a absorção de água e eletrólitos (STROBAND et al., 1979); e região retal relacionada aos processos de defecação. Assim, cada região do intestino de *H. platyrhynchos* apresentou características distintas, relacionadas à função intestinal: **região anterior** com pregas longitudinais espessas, parede altamente elástica e poucas células caliciformes, responsável por completar a digestão extracelular, principalmente por meio de enzimas pancreáticas e sais biliares e absorção de moléculas facilmente digeridas, como lipídeos; **região medial** com pregas longitudinais menos espessas, maior número de células caliciformes, sendo uma região de transição, relacionada com a absorção de lipídeos e proteínas; **região posterior** com parede intestinal espessa, grande concentração de células caliciformes, relacionada à absorção de proteínas e proteção epitelial; e finalmente a **região retal** com luz ampla, ausência de pregas longitudinais e de células caliciformes, cuja região apical das células epiteliais com

mucossubstâncias é responsável pela proteção epitelial, armazenamento do bolo fecal, absorção de água e íons e defecação.

A morfologia do canal alimentar está intimamente relacionada com as características do alimento ingerido, bem como com os hábitos alimentares (SCOCCO et al., 1997). Assim, *Hemisorubim platyrhynchos* apresentou as principais características do trato digestivo de peixes carnívoros, com estômago bem desenvolvido e um intestino relativamente curto (KAPOOR et al., 1975). Os resultados apresentados revelaram a presença de mucossubstâncias no epitélio de revestimento do tubo digestivo de *H. platyrhynchos*. Estas características podem fornecer subsídios sobre doenças em peixes provocadas por parasitas, visto que, quando infectado, o tubo digestivo altera suas secreções, promovendo a defesa contra os microorganismos (STRUGALA et al., 2003).

.....5. Conclusões

5. Conclusões

Os resultados obtidos a partir dos estudos morfológicos e histoquímicos, juntamente com a análise da literatura especializada, permitiram as seguintes conclusões:

1. O esôfago apresenta características marcantes relacionadas ao hábito alimentar carnívoro de *Hemisorubim platyrhynchos*, dentre as quais se destacaram: pregas longitudinais espessas e lâmina própria/submucosa, camada muscular e camada serosa bem desenvolvidas, tornando o esôfago altamente distensível.

2. As células epiteliais esofágicas apresentam microssaliências digitiformes, que permitem ao órgão acumular mucossubstâncias na superfície epitelial, para lubrificar o epitélio e protegê-lo contra patógenos.

3. A células caliciformes esofágicas AB (pH 1,0 e 2,5) e PAS positivas, em grande concentração, secretam mucossubstâncias que facilitam a passagem de alimento e protegem a mucosa.

4. As “club cells” apresentam-se grandes, com presença secreções proteicas, negativas às reações histoquímicas, podendo estar relacionadas à defesa epitelial.

5. A espessura e grande extensibilidade do estômago observada nos estudos macroscópicos condizem com a capacidade do órgão para receber grandes quantidades de alimento, sejam peixes de menor tamanho ou ração comercial.

6. O estômago apresenta região apical do epitélio fortemente PAS positiva e fracamente AB (pH 2,5) positiva, indicativo de mucossubstâncias neutras para impedir a auto-digestão e mucossubstâncias ácidas com função de tampão, respectivamente.

7. As glândulas gástricas concentram-se nas regiões cárdica e fúndica, sendo compostas por células oxintopépticas, que secretam ácido clorídrico e enzimas, necessários à digestão proteica.

8. O intestino anterior apresenta pregas longitudinais espessas, para garantir maior elasticidade, enquanto que o intestino posterior apresentou pregas delgadas. Entretanto, a região posterior apresenta uma maior concentração de células caliciformes PAS e AB positivas, provavelmente para proteção epitelial e facilitação do trânsito intestinal.

9. O reto apresenta células epiteliais com mucossubstâncias na região apical, que facilitam a passagem do bolo fecal para o meio externo.

10. As células secretoras de mucossubstâncias apresentam características distintas em cada segmento do tubo digestivo: células caliciformes esofágicas; células epiteliais gástricas e na região retal; células caliciformes no intestino anterior, médio e posterior.

.....6. Referencias Bibliográficas

6. Referencias Bibliográficas

ABAURREA-EQUISOAÍN, M.A.; OSTOS-GARRIDO, M.V. **Enterocytes in the anterior intestine of *Oncorhynchus mykiss:* Cytological characteristics related to osmoregulation.** Aquaculture, v. 139, p.109-116, 1996.

AGRAWAL, N.; MITTTAL, A.K. **Structure and histochemistry of the epithelia of lips and associated structures of a catfish *Rita rita*.** Japanese Journal of Ichthyology, v.39, p.93-102, 1992.

ALBRECHT, M.P.; FERREIRA, M.F.N.; CARAMASCHI, E.P. **Anatomical features and histology of the digestive tract of two related neotropical omnivorous fishes (Caraciformes; Anostomidae).** Journal of Fish Biology, v.58, p.419-430, 2001.

AL-BANAW, A.; KENNGOTT, R.; AL-HASSAN, J.M.; MEHANA, N.; SINOWATZ, F. **Histochemical analysis of glycoconjugates in the skin of a catfish (*Arius Tenuispinis*, Day).** Anatomia Histologia Embryologia, v.39, p.42–50, 2010.

ANDERSON, T.A. **Histological and cytological structure of the gastrointestinal tract of the luderick, *Girella tricuspidata* (Pisces, Kyphosidae), in relation to diet.** Journal of Morphology, v.190, p.109-119, 1986.

BAILEY, C. **Aquaculture and basic human needs.** World Aquaculture Society, v.28, p.28-31, 1997.

BANCROFT, J.D.; GAMBLE, M. **Theory and practice of histological techniques.** 796p. 5ª ed. Churchill Livingstone. New York, 2002.

BEERLI, E.L.; LOGATO, P.V.R.; FREITAS, R.T.F. **Alimentação e comportamento de larvas de pacu, *Piaractus mesopotamicus* (Holmberg, 1887).** Ciências Agrotécnicas, Lavras, v.28, p.149-155, 2004.

BÉRTIN, L. Appareil digestif. In: GRASSÉ, P.P. **Traité de zoologie.** Paris: Masson, v.13, p.1248-1302, 1958.

BRESSAN, P.M.; KIERULFF, M.C.M.; SUGIEDA, A.M. **Fauna ameaçada de extinção no estado de São Paulo: Vertebrados.** São Paulo: Fundação Parque Zoológico de São Paulo: Secretaria do Meio Ambiente, 646p, 2009.

BORGES, J.C.S.; PRESSIONOTTI, L.N. **Lipidic and proteic absorption in digestive tract of tropical fat snook (Centropomus parallelus, POEY 1860).** Journal of Experimental Marine Biology and Ecology, v.386, p.39-44, 2010.

CAL, J.A. **Histologia do trato digestório de Surubim-Pintado (*Pseudoplatystoma coruscans* – Agassiz, 1829).** 87f. Dissertação (Mestrado em Ciências). Universidade de São Paulo, São Paulo, 2006.

CAO, X.J.; WANG, W.M. **Histology and mucin histochemistry of the digestive tract of yellow catfish, *Pelteobagrus fulvidraco*.** Anatomia Histologia Embryologia, v.38, p.254-261, 2009.

CAROLSFELD, J.; HARVEY, B.; ROSS, C.; BAER, A. **Migratory fishes of South America.** Biology, Fisheries and Conservation Status. 226p. Danvers, USA, 2003.

CARRASSÓN, M. GRAU, A.; DOPAZO, L.R.; CRESPO, S. **A histological, histochemical and ultrastructural study of the digestive tract of *Dentex dentex* (Pisces, Sparidae).** Histology and Histopathology, v.21, p.579-593, 2006.

CASTRO, E.F.; FONSECA, C.C.; MENIN, E. **Identificação de células endócrinas no aparelho digestório de *Prochilodus marggravii* Walbaum, 1792 (Pisces, Teleostei, Characiformes, Prochilodontidae).** Arquivos de Ciências Veterinárias e Zoologia, v.5, n.1, p.71-78, 2002.

CATELLA, A.C. A **pesca no pantanal de Mato Grosso do Sul, Brasil: descrição, nível de exploração e manejo.** 351p. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas, área de concentração em Biologia de Água Doce e Pesca Interior). Universidade do Amazonas, Manaus, 2001.

CLARKE, A.J.; WITCOMB, D.M. **A study of the histology and morphology of the digestive tract of the common eel (*Anguilla anguilla*).** Journal of Fish Biology, v.16, p.159-170, 1980.

DÍAZ, A.O.; GARCÍA, A.M.; DEVINCENTI, C.V.; GOLDEMBERG, A.L. **Morphological and histochemical characterization of the mucosa of the digestive tract in *Engraulis anchoita* (Hubbs and Marini, 1935).** Anatomia Histologia Embryologia, v.32, p.341-346, 2003.

DÍAZ, A.O.; ESCALANTE, A.H.; GARCÍA, A.M.; GOLDEMBERG, A.L. **Histology and histochemistry of the pharyngeal cavity and oesophagus of the silverside *Odontesthes bonariensis* (Cuvier and Valenciennes).** Anatomia Histologia Embryologia, v.35, p.42-46, 2006.

DÍAZ, A.O.; GARCÍA, A.M.; GOLDEMBERG, A.L. **Glycoconjugates in the mucosa of the digestive tract of *Cynoscion guatucupa*: A histochemical study.** Acta Histochemica, v.110, p.76-85, 2008.

DOMENEGHINI, C.; STRAINI PANNELLI, R.; VEGGETTI, A. **Gut glycoconjugates in *Sparus aurata* L. (Pisces, Teleostei). A comparative histochemical study in larval and adult ages.** Histology and Histopathology**,** v.13, p.359-372, 1998.

DOMENEGHINI, C.; ARRIGHI, S.; RADAELLI, G.; BOSI, G.; VEGGETTI, A. **Histochemical analysis of glycoconjugates secretion in the alimentary canal of *Anguilla anguilla* L.** Acta Histochemica, v.106, p.477–487, 2005.

ELBAL, M.T.; AGULLEIRO, B. **A histochemical and ultrastructural study of the gut of Sparus auratus (Teleostei).** Journal of Submicroscopic Cytology, v.18, p.335-347, 1986.

EZEASOR, D.N. **Light and electron microscopic studies on the oesophageal epithelium of the rainbow trout, *Salmo gairdneri*.** Anatomischer Anzeiger, v.155, p.71-83, 1984.

FACCIOLI, C.K. **Estudo morfológico e histoquímico do tubo digestório de larvas de *Hemisorubim platyrhynchos* (Valenciennes, 1840).** 47p. Relatório de Iniciação Científica da FAPESP (bolsa de Iniciação Cientifica, proc: 08/55573-7, FAPESP), 2009.

FERRARIS, R.P.; TAN, J.D.; de la CRUZ, M.C. **Development of the digestive tract of milkfish, *Channos chanos*.** Aquaculture, v.61, p.241-257, 1987.

GALVÃO, M.N.S.; FENERICH-VERANI, N.; YAMANAKA, N.; OLIVEIRA, I.R. **Histologia do sistema digestivo da tainha *Mugil platunus* Gunther, 1880 (Osteithes, Mugilidae) durante as fases larval e juvenil.** Boletim do Instituto de Pesca, v.24, p.91-100, 1997.

GARCÍA-HERNÁNDEZ, M.P.; LOZANO, M.T.; ELBAL, M.T.; AGULLEIRO, B. **Development of the digestive tract of sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.). Light and electron microscopic studies.** Anatomia Histologia Embryologia, v.204, p.39–57, 2001.

GARGIULO, A.M. CECCARELLI, P.; DALL'AGLIO, C.; PEDINI, V. **Ultrastructural study on the stomach of *Tilapia* spp (Teleostei).** Anatomia Histologia Ernbryology, v.26, p.331-336, 1997.

GARGIULO, A.M. CECCARELLI, P.; DALL'AGLIO, C.; PEDINI, V. **Histology and ultrastructure of the gut of the tilapia (*Tilapia* spp.), a hybrid teleost.** Anatomia Histologia Embryology, v.27, p.89-94, 1998.

GISBERT, E.; PIEDRAHITA, R.H.; CONKLIN, D.E. **Ontogenic development of the digestive system in California halibut (*Paralichthys californicus*) with notes on feeding practices.** Aquaculture, v.232, p.455–470, 2004.

GÓES, R.M.; TABOGA, S.R. **Células Caliciformes.** Cap. 14. In: CARVALHO, H.F.; COLLARES-BUZATO, C.B. (Org.). A célula. Uma abordagem multidisciplinar. São Paulo: Manole, v.1, p.163-173, 2005.

GODINHO, H.; TOKUMARU, M.; FERRI, A.G. **Histologia do trato digestivo de *Pimelodus maculatus*, Lacépède.** Revista Brasileira de Biologia, v.30, p.583-593, 1970.

GRAU, A.; CRESPO, S.; SARASQUETE, M.C.; GONZALES DE CANALES, M.L. **The digestive tract of the amberjack *Seriola dumerili* Risso: a light and scanning electron microscope study.** Journal of Fish Biology, v.41, p.287–303, 1992.

HERNANDEZ-BLAZQUEZ, F. J.; SILVA, J.R.M.C. **Absorption of macromolecular proteins by the rectal epithelium of the Antarctic fish *Notothenia neglecta*.** Canadian Journal of Zoology, v.76, p.1247–1253, 1998.

HERNANDEZ-BLAZQUEZ, F.J.; GUERRA, R.R.; KFOURY JR, J.R.; BOMBONATO, P.P.; COGLIATI, B.; SILVA, J.R.M.C. **Fat absorptive processes in the intestine of the Antarctic fish (Richardson, 1844).** Polar Biology, v.29, p.831–836, 2006.

HERNÁNDEZ, D.R.; PÉREZ GIANESELLI, M.; DOMITROVIC, H.A. **Morphology, histology and histochemistry of the digestive system of south american catfish *(Rhamdia quelen)*.** International Journal of Morphology, v.27, p.105-111, 2008.

HILSDORF, A.W.S.; MOREIRA, R.G. **Aquicultura retoma desafios da revolução verde**. Scientific American Brasil, São Paulo, p.24-29, 2004.

HUMBERT, W.; KIRSCH, R.; MEISTER, M.F. **Scanning electron microscopic study of the oesophageal mucous layer in the eel *Anguilla anguilla* L.** Journal of Fish Biology, v.25, p.117–122, 1984.

JUNQUEIRA, L.C.U.; JUNQUEIRA, L.M.M.S. **Técnicas básicas de citologia e histologia.** Livraria Editora Santos, 122p, São Paulo, 1983.

JUNQUEIRA, L.C.U.; CARNEIRO, J. **Histologia básica.** Guanabara Koogan S/A, 11ª ed, 542p, Rio de Janeiro, 2008.

KAPOOR, B.G.; SMIT, H.; VERIGHINA, I.A. **The alimentary canal and digestion in Teleosts.** In: Russell FS, Young M, editors. Advances in marine biology. London: Academic Press; p.109–239, 1975.

KUBITZA, F. **Nutrição e alimentação dos peixes cultivados.** 123p. 3ª ed. Jundiaí, 1999.

LEKNES, I.L. **Histochemical studies on mucin-rich cells in the digestive tract of the Buenos Aires tetra (*Hyphessobrycon anisitsi*).** Acta Histochemica, v.113, p.353-357, 2011.

LOGATO, P.V.R. **Anátomo-histologia do aparelho digestivo do pacu, *Piaracatus mesopotamicus* Holmberg, 1887 (Characiforme, Characidae, Myelinae).** 119f. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) – Universidade Federal de Viçosa, Viçoca, Minas Gerais, 1995.

LUNDBERG, J.G.; LITTMANN, M.W. **Pimelodidae (Long-whiskered catfishes).** p.432-446. In R.E. Reis, S.O. Kullander and C.J. Ferraris, Jr. (eds.) Checklist of the Freshwater Fishes of South and Central America. Porto Alegre: EDIPUCRS, Brasil, 2003.

LUZ, R.K.; SALARO, A.L.; SOUTO, E.F.; ZANIBONI-FILHO, E. **Avaliação de canibalismo e comportamento territorial de alevinos de trairão (*Hoplias lacerdae*).** Acta Scientiarum, v.22, p.465-469, 2000.

MACELO-SANTOS, S.; FRAGA, E.C.; BARROS, M.C. **Caracterização molecular da espécie *Hemisorubim platyrhynchos* (Pimelodidae) das bacias dos rios Itapecuru e Pindaré, Maranhão.** Resumos do 55º Congresso Brasileiro de Genética, Águas de Lindóia, SP, Brasil, 2009.

MARTIN, T.J.; BLABER, S.J.M. **Morphology and histology of the alimentary tract of *Ambassidae* (Cuvier) (Teleostei) in relation to feeding.** Journal Morphological, v.182, p.295-305, 1984.

MORAES, M.F.P.G.; BARBOLA, I.F.; GUEDES, E.A.C. **Alimentação e relações morfológicas com o aparelho digestivo do "curimbatá", *Prochilodus lineatus* (Valenciennes) (Osteichthyes, Prochilodontidae), de uma lagoa do sul do Brasil.** Revista Brasileira de Zoologia, v.14, p.169-180, 1997.

MURRAY, H.M.; WRIGHT, G.M.; GOFF, G.P. **A comparative histological and histochemical study of the stomach from three species of *Pleuronectid*, the Atlantic halibut, *Hippoglossus hippoglossus*, the yellowtail flounder, *Pleuronectes ferruginea*, and the winter flounder, *Pleuronectes americanus*.** Canadian Journal of Zoology, v.72, p.1199-1210, 1994.

MURRAY, H.M.; WRIGHT, G.M.; GOFF, G.P. **A comparative histological and histochemical study of the post-gastric alimentary canal from three species of Pleuronectid, the Atlantic halibut, the yellowtail flounder and the winter flounder.** Journal of Fish Biology, v.48, p.187–206, 1996.

NACHI, A.M.; HERNANDEZ-BLAZQUEZ, F.J.; BARBIERI, R.L.; LEITE, R.G.; FERRI S.; PHAN, M.T. **Intestinal histology of a detritivorous (Iliophagous) fish *Prochilodus scrofa* Characiformes, Prochilodontidae.** Annales des Sciences Naturelles, v.19, p.81–88, 1998.

NAGUIB, S.A.A.; EI-SHABAKA, H.A.; ASHOUR, F. **Comparative histological and ultrastructural studies on the stomach of *Schilbe mystus* and the intestinal swelling of *Labeo niloticus*.** Journal of American Science, v.7, p.251-263, 2011.

NAKAMURA, O.; WATANABE, T.; KAMIYA, H.; MURAMOTO, K. **Galectin containing cells in the skin and mucosal tissues in Japanese conger eel, *Conger myriaster*: an immunohistochemical study.** Developmental and Comparative Immunology, v.25, p.431-437, 2001.

NIKOLSKY, G.V. **The ecology of fishes**. 352p. Academic Press. London, 1963.

NOAILLAC-DEPEYRE, J.; GAS, N. **Ultrastructural and cytochemical study of the gastric epithelium in a fresh water teleostean fish *Perea fluviatilis.*** Tissue and Cell. v.10, p.23-37, 1978.

OFFNER, H.; CELNIK, B.; BRINGMAN, T.S.; CASENTINI-BOROCZ, D.; NEDWIN, G.E.; VANDENBARK, A.A. **Recombinant human b-galactoside binding lectin suppresses clinical and histological signs of experimental autoimmune encephalomyelitis.** Journal of Neuroimmunology, v.28, p.177- 184, 1990.

OSMAN, A.H.K.; CACECI, T. **Histology of the stomach of *Tilapia nilotica* Linnaeus, 1758 from the River Nile.** Journal of Fish Biology, v.38, p.211–223, 1991.

OSTOS-GARRIDO, M.V.; NUIIEZ TORRES, M.I.; ABAURREA EQUISOAIN, M.A. **Histological, histochemical and ultrastructural analysis of the gastric mucosa in *Oncorhynchus mykiss.*** Aquaculture, v.115, p.121-132, 1993.

OSTOS-GARRIDO, M.V.; GONZALEZ-OLLER, C.; ABAURREA EQUISOAIN, M.A. **Effect of diet on gastric mucosa cells in the european eel (*Anguilla anguilla* L.). Histochemical and ultrastructural study.** Micron, v.27, p.25-34, 1996.

PABST, R. **The anatomical basis for the immune function of the gut.** Anatomia Histologia Embryologia, v.176, p.135-144, 1987.

PARK, J.Y.; KIM, I.S.; KIM, S.Y. **Structure and histochemistry of the skin of a torrent catfish, *Liobagrus mediadiposalis***. Environmental Biology of Fishes, v.66, p.3–8, 2003.

PEDINI, V.; DALL'AGLIO, C.; PARILLO, F.; SCOCCO, P. **Glycoconjugate distribution in gastric fundic mucosa of *Umbrina cirrosa* L. revealed by lectin histochemistry.** Journal of Fish Biology, v. 66, p.222–229, 2005.

PENHA, J.M.F. **Estrutura e estado de explotação dos estoques do jurupoca, *Hemisorubim platyrhynchos*, e do jurupensém, *Sorubim* cf. *lima*, na bacia do rio Cuiabá, Pantanal Marogrossense.** 131f. Tese (Doutorado em Ecologia e Recursos Naturais) – Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2003.

PERILLO, N.L.; PACE, K.E.; SEILHAMER, J.J.; BAUM, L.G. **Apoptosis of T cells mediated by galectin-1.** Nature, v.378, p.736-739, 1995.

PETRINEC, Z.; NEJEDLI, S.; KUZIR, S.; OPACAK, A. **Mucosubstances of the digestive tract mucosa in northern pike (*Esox lucius* L.) and european catfish (*Silurus glanis* L.).** Veterinary Archives, v.75, p.317-327, 2005.

PETRINI, L.M. **Sobre a presença de capilares intra-epiteliais na mucosa do estômago do cascudo (*Plecostomus plecostomus* Linneu).** Ciências e Cultura, v.13, p.175, 1961.

RALPHS, J.R.; BENJAMIN, M. **Chondroitin and keratin sulphate in the epidermal club cells of teleosts.** Journal of Fish Biology, v.40, p.473-475, 1992.

RAJI, A.R.; NOROUZI, E. **Histological and histochemical study on the alimentary canal in Walking catfish (*Claris batrachus*) and piranha (*Serrasalmus nattereri*).** Iranian Journal of Veterinary Research, v.11, n.3, 2010.

RHODES, J.M.; BLACK, R.R.; GALLIMORE, R.; SAVAGE, A. **Histochemical demonstration of desialitation and desulphation of normal and inflammatory bowel disease rectal mucus by faecal extracts.** Gut, v.26, p.1312-1318, 1985.

RIBELLES, A.; CARRASCO, M.C.; ROSETY, M.; ALDANA, M. **A histochemical study of the biological effests of sodium dodecyl sulfate on the intestine of the gilthead seabream, *Sparus aurata* L.** Ecotoxicology and Environmental Safety, v.32, p.131-138, 1995.

ROMBOUT, J.H.W.M.; van den BERG, A.A. **Immunological importance of the second segment of the carp (*Cyprinus carpio* L.).** Journal of Fish Biology, v.35, p.13–22, 1989.

ROSA, M.P.; KANAMURA, C.T.; CARVALHO, M.B. **Expressão de galectina-3 e citoqueratina 19 nas neoplasias epiteliais da glândula tireóidea e correlação histopatológica.** Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial, v.41, p.61-70, 2005.

SANTOS, C.M.; DUARTE, S.; SOUZA, T.L.G.; RIBEIRO, T.P.; SALES, A.; ARAÚJO, F.G. **Histologia e caracterização histoquímica do tubo gastrintestinal de *Pimelodus maculatus* (Pimelodidae, Siluriformes) no reservatório de Funil, Rio de Janeiro, Brasil.** Iheringia, Série Zoologia, v.97, p.411-417, 2007.

SARASQUETE, M. C.; GISBERT, E.; RIBEIRO, L.; VIEIRA, L.; DINIS, M.T. **Glyconjugates in epidermal, branchial and digestive mucous cells and gastric glands of gilthead sea bream, *Sparus aurata*, Senegal sole, *Solea senegalensis* and Siberian sturgeon, *Acipenser baeri* development.** European Journal of Histochemistry, v.45, p.267–278, 2001.

SCOCCO, P.; MENGHI, G.; CECCARELLI, P. **Histochemical diferentiation of glycoconjugates occurring in the tilapine intestine.** Journal of Fish Biology, v.51, p.848-857, 1997.

SCOCCO, P; ACCILI, D.; MENGHI, G.; CECCARELLI, P. **Unusual glycoconjugates in the esophagus of a tilapine polyhybrid.** Journal of Fish Biology, v53, p.39–48, 1998.

SEIXAS FILHO, J.T; BRÁS, J.M.; GOMIDE, A.T.M.; OLIVEIRA, M.G.A.; DONZELE, J.L.; MENIN, E. **Anatomia funcional e morfométrica do intestino no Teleostei (Pisces), de água doce surubim (*Pseudoplatystoma coruscans* – Agassiz, 1829).** Revista Brasileira de Zootecnia, v.30, p.1670-1680, 2001.

SINHA, G.M.; CHAKRAVORTY, P. **Characterization and distribution of neutral and acidic mucins in the alimentary canal of an Indian freshwater major carp, *Catla catla* (Hamilton) by histochemical methods.** Gegenbaurs Morphologisches Jahrbuch, v.128, p.188–200, 1982.

SIRE, M.F.; LUTTON, C.; VERNIER, J.M. **New views on intestinal absorption of lipids in teleostean fishes: an ultrastructural and biochemical study in the rainbow trout.** Journal of Lipid Research, v.27, p.81–94, 1981.

SPICER, S.S.; SCHULTE, B.A. **Diversity of cell glycoconjugates shown histochemically: a perspective.** Journal of Histochemistry & Cytochemistry v.40, p.1-38, 1992.

STROBAND, H.W.J.; MEER, H.V.D.; TIMMERMANS, L.P.M. **Regional functional differentiation in the gut of the grass carp *Ctenopharyngodon idella*.** Histochemical Journal, v.64, p.235-249, 1979.

STROBAND, H.W.J.; KROON, A.G. **The development of stomach in *Clarias lazera* and the intestinal absorption of protein macromolecules.** Cell and Tissue Research, v.215, p.397-415, 1981.

STROBAND, H.W.J.; van der VEEN, F.H. **Localization of protein absorption during transport of food in the intestine of grass carp *Ctenopharyngodon idella.*** Journal of Experimental Zoology, v.218, p.149-156, 1981.

STRUGALA, V.; ALLEN, A.; DETTMAR, P.W.; PEARSON, J.P. **Colonic mucin: method of measuring mucus thickness.** Proceedings of the Nutrition Society, v.62, p.237–243, 2003.

TAN, C.K.; TEH, Y.F. **The structure of the gut of a coral fish *Chelmon rostratus* Cuvier.** Okajimas Folia Anatomica Japonica, v.51, p.63-79, 1974.

TIBBETTS, I.R. **The distribution and function of mucous cells and their secretions in the alimentary tract of *Arrhamphus sclerolepis krefftii*.** Journal of Fish Biology, v.50, p.809–20, 1997.

VALENTI, W.C.; POLI, C.R.; PEREIRA, J.A.; BORGHETTI, J.R. **Aquicultura no Brasil: bases para um desenvolvimento sustentável.** 399p. 1ªed. Brasília, 2000.

WHITERA, M.; MITTAL, A.K. **Fine structure of club cells in the skin of ostariophysan fish.** Z Mikrosk-Anat Forsch, v.97, p.141-157, 1983.

YAMAOKA, K.; OHNO, S.; KAWASAKI, H.; SUZUKI, K. **Overexpression of a b-galactoside binding protein causes transformation of BALB3T3 fibroblast cells.** Biochemical and Biophysical Research Communications, v.179, p.272-279, 1991.