

Rebeca Mamede da Silva Alves

**Análise histoquímica do epitélio de
escamas de *Prochilodus lineatus* exposto a
águas contaminadas**

Rebeca Mamede da Silva Alves

Análise histoquímica do epitélio de escamas de *Prochilodus lineatus*
exposto a águas contaminadas

Orientador: Flávio Henrique Caetano

Co-orientador: Bruno Fiorelini Pereira

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado
ao Instituto de Biociências da Universidade
Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” -
Câmpus de Rio Claro, para obtenção do grau
de Bacharel e Licenciado em Ciências
Biológicas

Rio Claro
2011

574.5263 Alves, Rebeca Mamede da Silva
A474a Análise histoquímica do epitélio de escamas de
Prochilodus lineatus exposto a águas contaminadas / Rebeca
Mamede da Silva Alves. - Rio Claro : [s.n.], 2011
48 f. : il., figs.

Trabalho de conclusão de curso (licenciatura e bacharelado
- Ciências Biológicas Integral) - Universidade Estadual
Paulista, Instituto de Biociências de Rio Claro
Orientador: Flávio Henrique Caetano
Co-Orientador: Bruno Fiorelini Pereira

1. Ecologia aquática. 2. Ecotoxicologia. 3. Peixes. 4.
Morfologia. 5. Poluição. I. Título.

Ficha Catalográfica elaborada pela STATI - Biblioteca da UNESP
Campus de Rio Claro/SP

*À dedicação
(para todos aqueles que a viram por dentro)*

AGRADECIMENTOS

Já não sou mais a mesma pessoa que começou o curso e para isto sempre faltarão agradecimentos.

Inicialmente agradeço à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo incentivo e apoio financeiro para o desenvolvimento e conclusão deste projeto (Processo número 2010/09408-4).

À Universidade Estadual Paulista, pelo apoio e infra-estrutura para a graduação e para o desenvolvimento deste projeto, por fornecer o lugar que mudou tanto meus caminhos.

Ao Instituto Chico Mendes da Conservação de Biodiversidade – ICMBio, pela doação dos espécimes e apoio prestado a mim e a todos os membros do laboratório. Agradeço especialmente a José Augusto Senhorini e Rita de Cássia Gimenez de Alcântara Rocha pela atenção e dedicação.

Ao meu orientador Prof. Dr. Flávio Henrique Caetano, pela ajuda e dedicação, uma figura sem a qual não chegaria aonde cheguei e que não mediu esforços para tanto. Minha imagem de pesquisa começa aqui e por isso sou muito grata.

Ao meu co-orientador Bruno Fiorelini Pereira, que nunca mediu esforços. Que me ensinou o que é a dedicação. Minha imagem de pesquisa também começa aqui e por isso sou muito grata.

Ao Dr. Dimitrius Leonardo Pitol, pelo apoio e parceria.

À Unesp de Rio Claro e ao Laboratório de Histologia do Departamento de Biologia da Unesp de Rio Claro, pelo apoio e infra-estrutura. Aos servidores técnicos e administrativos que me acompanharam e apoiaram a graduação toda Anderson Rodrigues, Antonio Teruyoshi Yabuki, Cristiane Marcia Mileo, Gerson Mello Souza, Lucila de Lourdes Segalla Franco e Mônica Iamonte.

A todos os professores com os quais cruzei na Universidade, que nos ensinam muito mais do que encontramos nos livros, muito mais do que nos pode ser dito.

Aos meus pais Henrique Monteiro Alves e Regina Lúcia Mamede da Silva Alves, que caminharam por mim e me ensinaram a aprender. Eu não seria o que sou se não me tivessem cedido espaço, não há como começar a agradecer. Aos meus irmãos Henrique Monteiro Alves Filho e Renata Mamede da Silva Alves, que aprenderam comigo e me apoiaram a graduação toda.

Aos amigos e companheiros de casa que ficam dessa graduação, Alexandre Hideaki Takara, Carlos Otávio Araújo Gussoni, Fellipe Chaves Nominatto, Laura Kyoko Honda,

Henrique Hespanhol Tozzi, Paulo Roberto de Moura Souza Filho, Raíssa Fonseca, Rafael Horita Sugohara e Tochinha, que fizeram da graduação mais que um curso superior, mas a vivência em um segundo lar.

Aos colegas que não moram no mesmo teto, mas que dividem a minha vida e a minha graduação, Amanda Maria Picelli, Annelise Francisco, Camila Strongren e Danilo Barêa Delgado. Construímos-nos e desconstruímos tantas vezes juntos que muito de vocês já não me escapa mais.

A todos os colegas com os quais dividi este espaço, que mostram como posso lidar com tudo que a Universidade me permite. Mais do que salas de aula, frequentei parte da minha vida.

Enfim, agradeço a todos os espíritos que cruzaram comigo durante esses quatro anos, sem sombra de dúvidas todas as palavras que escrevi aqui carregam as palavras que ouvi até agora e tudo que escreverei, carregará as palavras que escrevi aqui. Por me permitirem aprender como quero ser, nunca poderei agradecer demais.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

1. MATERIAIS E MÉTODOS

- 1.1 Amostragem e tratamentos – estrutura montada na UNESP.....8

2. DESCRIÇÃO DO EPITÉLIO

- 2.1 Figura 1 – Vista geral da porção proximal da escama submetida à HE: Acúmulo de tecido conjuntivo.....17
- 2.2 Figura 2 – Vista geral da porção mediana da escama submetida à HE: Redução abrupta do epitélio.....17
- 2.3 Figura 3 – Vista geral da porção média da escama submetida à HE: Camadas do epitélio.....18
- 2.4 Figura 4 – Vista geral da porção média da escama submetida à HE: Camadas de colágeno.....18
- 2.5 Figura 5 – Vista geral da porção mediana e distal da escama submetida à HE: Redução do epitélio.....19
- 2.6 Figura 6 – Vista geral da porção mediana e distal da escama submetida à HE: Única camada de células.....19
- 2.7 Figura 7 – Vista geral da região de inserção submetida à HE: União entre os epitélios.....20
- 2.8 Figura 8 – Vista geral da escama submetida à HE: Canais a partir do ponto de inserção.....20
- 2.9 Figura 9 – Vista geral da porção mediana da escama submetida à PAS 21
- 2.10 Figura 10 – Vista da porção média da escama submetida à Picrossirus Red.....21
- 2.11 Figura 11 – Vista da porção proximal da escama submetida à Picrossirus Red.....22
- 2.12 Figura 12 – Vista da porção distal da escama submetida à Picrossirus Red.....22
- 2.13 Figura 13 – Vista da porção mediana da escama submetida à Azul de Bromofenol.....23
- 2.14 Figura 14 – Vista da porção distal da escama submetida à Azul de Bromofenol.....23

3. RESULTADOS DA EXPOSIÇÃO A AMBIENTES CONTAMINADOS

3.1	Figura 15 – Escama do tempo 0 em HE: Vista da porção distal.....	24
3.2	Figura 16 – Escama do tempo 0 em HE: Vista da porção proximal.....	24
3.3	Figura 17 – Escama do tempo 1 grupo Controle em HE.....	25
3.4	Figura 18 – Escama do tempo 1 grupo Detergente em HE.....	25
3.5	Figura 19 – Escama do tempo 1 grupo Lago Azul em HE.....	26
3.6	Figura 20 – Escama do tempo 2 grupo Controle em HE.....	26
3.7	Figura 21 – Escama do tempo 2 grupo Detergente em HE.....	27
3.8	Figura 22 – Escama do tempo 2 grupo Lago Azul em HE.....	27
3.9	Figura 23 – Escama do tempo 2 grupo Controle em Picrossirus Red.....	28
3.10	Figura 24 – Escama do tempo 2 grupo Detergente em Picrossirus Red.....	28
3.11	Figura 25 – Escama do tempo 2 grupo Lago Azul em Picrossirus Red.....	28
3.12	Figura 26 – Escama do tempo 0 em Azul de Bromofenol.....	29
3.13	Figura 27 – Escama do tempo 1 grupo Controle em Azul de Bromofenol.....	29
3.14	Figura 28 – Escama do tempo 2 grupo Controle em Azul de Bromofenol.....	30
3.15	Figura 29 – Escama do tempo 1 grupo Detergente em Azul de Bromofenol.....	30
3.16	Figura 30 – Escama do tempo 2 grupo Lago Azul em Azul de Bromofenol.....	31
3.17	Figura 31 – Escama do tempo 0 em PAS.....	32
3.18	Figura 32 – Escama do tempo 1 grupo Controle em PAS.....	32
3.19	Figura 33 – Escama do tempo 1 grupo Detergente em PAS.....	32
3.20	Figura 34 – Escama do tempo 1 grupo Lago Azul em PAS.....	33
3.21	Figura 35 – Escama do tempo 2 grupo Controle em PAS.....	33
3.22	Figura 36 – Escama do tempo 2 grupo Detergente em PAS.....	34
3.23	Figura 37 – Escama do tempo 2 grupo Lago Azul em PAS.....	34

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA.....	1
1.1 Estudo do impacto de poluentes em peixes.....	1
1.2 <i>Prochilodus lineatus</i>	3
1.3 O Lago Azul.....	4
1.4 Detergentes biodegradáveis.....	5
1.5 Justificativa.....	5
2. OBJETIVOS.....	6
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	6
3.1 Material.....	6
3.2 Métodos.....	7
3.3 Forma de análise dos resultados.....	10
4. RESULTADOS.....	10
4.1 Descrição do epitélio.....	10
4.2 Resultados da exposição a ambientes contaminados.....	12
5. DISCUSSÃO.....	35
5.1 Discussão dos dados da descrição do epitélio.....	35
5.2 Discussão dos dados da exposição a ambientes contaminados.....	39
6. CONCLUSÕES.....	42
7. REFERÊNCIAS.....	43

RESUMO

O Lago Azul (Rio Claro – SP), oriundo da canalização do Córrego Servidão, vem sofrendo com problemas de inundação, infiltração, erosão e contaminação das águas por esgoto. Alguns dos compostos mais despejados nas águas de rios, e responsáveis por tais problemas de contaminação são os detergentes biodegradáveis, que têm sido alvo de críticas, não apenas devido aos problemas de biodegradação, mas também devido ao fato de provocarem o fenômeno conhecido como eutrofização. A preocupação com a possível contaminação das espécies do Lago Azul levou a prefeitura de Rio Claro, junto da SABESP, a iniciar estudos das águas e sedimentos do Lago Azul. Visando essa preocupação o projeto pretende analisar os efeitos da água do Lago Azul e de uma diluição de detergentes em indivíduos de *Prochilodus lineatus* (Curimatá), comparados a um controle exposto a água pura clorada do poço artesiano situado no Campus da UNESP de Rio Claro. O projeto procurou caracterizar o epitélio que recobre as escamas da espécie tratada, haja vista que se trata de uma estrutura inexplorada na literatura. A partir desses dados, análises foram realizadas através da detecção de possíveis alterações morfológicas na histologia e histoquímica das células epiteliais de escamas para avaliar os efeitos dos possíveis agentes contaminantes. Para as análises histológicas o material foi processado em resina para as técnicas de Alcian e PAS para detecção de polissacarídeos ácidos e básicos, Azul de Bromofenol para detecção de proteínas, Picrossirus Red para detecção de fibras colágenas I e III e Hematoxilina-Eosina para analisar alterações morfológicas. Os dados coletados foram analisados com auxílio de um microscópio Leica DM 2000, dotado de câmera para captura de imagens.

1 – INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA:

1.1 – Estudo do impacto de poluentes em peixes

Todos os peixes ósseos são suficientemente semelhantes na forma e estrutura gerais para serem reconhecidos como membros da Classe Osteichthyes. A maioria dos peixes é coberta por escamas, geralmente finas, imbricadas e ósseas (STORER, 2007). Ainda segundo este autor, os membros da Ordem Amiiformes, na qual se encontra a Infraclasse Teleostei, apresentam escamas geralmente ciclóides, isto é, suas escamas não possuem os muitos espinhos pequenos que recobrem a parte posterior exposta das escamas ctenóides.

A escamas ciclóides são semi-circulares, em forma de disco e pouco espessas (PANFILI *et al.*, 2002). Essas escamas aumentam de tamanho com o crescimento do peixe e como consequência, em muitas espécies esse crescimento determina o aparecimento de uma série de anéis concêntricos na margem das escamas (circulii) (ORR, 1908; STORER, 2007). Não há troca desse tegumento, embora ocasionalmente escamas possam ser perdidas e substituídas (STORER, 2007).

Segundo Sire & Akimenko (2004), o termo escama tem sido generalizado para todos os elementos de esqueleto duros, geralmente achatados, encontrados na pele de vertebrados aquáticos. O que inclui escamas placóides, ganóides e elasmóides. Apesar de estes apêndices derivarem de um ancestral comum (HUYSSSEUNE & SIRE *apud* SIRE & AKIMENKO, 2004), têm estruturas muito diferentes. Assim, segundo Sire & Akimenko (2004), ao se referir a uma escama, é necessário que o tipo seja especificado, sendo que a maioria das escamas nos teleósteos é do tipo elasmóide.

As escamas elasmóides, como outros elementos do esqueleto dérmico, se formam na derme sem a presença de início cartilaginoso (SIRE & AKIMENKO, 2004). Segundo Sire & Akimenko (2004), estas escamas são placas colagênicas ornamentadas, finas e lamelares, localizadas dentro da região da derme, próximas à epiderme.

Ainda segundo Sire & Akimenko (2004), a escama elasmóide é composta de três camadas da região mais inferior à mais superior: a placa basal, que consiste em uma camada grossa de tecido incompletamente mineralizado composto de elasmodina, organizada em uma série de fibrilas de colágeno em estrutura semelhante a madeira compensada (MEUNIER *apud* SIRE & AKIMENKO, 2004; SCHULTZE *apud* SIRE & AKIMENKO, 2004); a camada externa, que consiste em uma camada fina de tecido bem mineralizado composto de uma rede de fibrilas de colágeno entrelaçadas; e a camada limitante, que consiste em tecido hiper-

mineralizado desprovido de fibrilas de colágeno e depositado na escama na superfície da escama, na região próxima da epiderme.

O revestimento do corpo dos vertebrados é composto da epiderme externa e a derme subjacente. Nesta epiderme existem vasos sanguíneos, nervos e pigmento e a mesma é sujeita à abrasão, sendo substituída por divisões mitóticas em sua camada basal, o estrato germinativo (STORER, 2007). Assim, os tecidos epiteliais são estruturas dinâmicas cujas células são continuamente renovadas por atividade mitótica e a taxa de renovação é variável. Em tecidos epiteliais de revestimento estratificados e pseudo-estratificados as mitoses ocorrem na camada basal do epitélio, onde se encontram as células-tronco desses epitélios (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2008).

Nos peixes, o corpo é todo revestido por uma epiderme lisa, fina e glandular, intimamente aposta às escamas inseridas na derme. O muco produzido facilita a movimentação na água e é uma proteção contra a entrada de organismos causadores de doenças e também contra lesões. O tronco e a cauda apresentam escamas dérmicas, em fileiras longitudinais e diagonais, imbricadas, cada uma inserida numa bolsa dérmica e crescendo durante a vida do animal. A porção livre é coberta por uma fina camada de pele (STORER, 2007).

Diversos autores trabalharam com a organização estrutural da pele de certos peixes, em relação à sinalização de exposição a substâncias estranhas e morfologia e desenvolvimento de escamas

(DOMINGUES & HAYASHI, 1998; GRIZZLE & THIYAGARAJAH, 1987; FUJIMOTO *et al.*, 2008; KOUMANS & SIRE, 1996; LANGER, 2004; MOSS, 1972; NOLAN *et al.*, 2002; SIRE & AKIMENKO, 2004; SIRE *et al.*, 1997; SOUZA & SANTOS, 1997; SOUZA *et al.*, 2003a; SOUZA *et al.*, 2003b; SOUZA *et al.*, 2006; YUAN & CAMPANA, 1998; WATERMAN, 2005).

No entanto, ainda há muitas espécies a serem descritas, principalmente quanto ao tegumento, pois se trata de uma superfície de contato direto com o meio aquático, que recebe estímulos e responde às alterações dele (SOUZA & SANTOS, 1997).

Populações de peixes são sensíveis a impactos ambientais resultantes de diversos fatores, seja pela introdução de espécies exóticas, de detritos industriais ou residuais, derramamento de óleo, de pesticidas ou de outros agentes, que podem afetar diretamente a ecologia e a sobrevivência das espécies. Tanto que, segundo Goulart & Calisto (2003), os peixes, entre outros, são alguns dos principais organismos comumente utilizados na avaliação de impactos ambientais em ecossistemas aquáticos. Portanto, essas populações são adequadas para estudos de toxicidade. De fato, segundo Powers (1989), os peixes são modelos experimentais

excelentes para Biologia Ambiental, Embriologia, Neuroendocrinologia e outras áreas do meio, devido a inúmeras características, pois alertam possível contaminação ambiental.

1.2 – *Prochilodus lineatus*

Gêneros da família Prochilodontidae são muito importantes na pesca comercial e de subsistência (REIS *et al.*, 2003), principalmente nas bacias do sudeste do país. A espécie *Prochilodus lineatus* é muito utilizada em estudos de toxicidade

(MARTINEZ & SOUZA, 2002; MARTINEZ *AL AL.*, 2004; CAMARGO & MARTINEZ, 2007; MADUENHO *AL AL.*, 2007; LANGIANO & MARTINEZ, 2008; PEREIRA & CAETANO, 2009; SIMONATO *AL AL.*, 2008)

e trata-se de peixes prolíficos, de crescimento rápido e elevada rusticidade, o que os torna propícios para o cultivo (BRITSKI, 1972).

Segundo Reis *et al.* (2003), os membros da família Prochilodontidae podem ser facilmente distinguidos dos outros peixes, exceto quando larvas, pelos seus lábios carnosos e equipados com duas séries de dentículos relativamente pequenos, falciformes e móveis. Prochilodontídeos são peixes de tamanho moderado a grande, robustos, com escamas relativamente grandes. A nadadeira dorsal é precedida por um espinho prostrado, que no gênero *Prochilodus* é bifurcado.

Prochilodontídeos são limitados à América do Sul e a leste dos Andes, ocorrem nas bacias dos rios Orinoco, Amazonas, Tocantins e da Prata, nos rios costeiros das Guianas, no rio São Francisco e outros rios costeiros do leste do Brasil, e na porção norte da bacia da Lagoa dos Patos, no Sul do Brasil (REIS *et al.*, 2003). Os gêneros dessa família (Prochilodontidae) são muito importantes na pesca comercial e de subsistência (REIS *et al.*, 2003) e apresentam crescimento rápido e elevada rusticidade, o que os torna propícios para o cultivo (BRITSKI, 1972).

Todos os Prochilodontídeos exploram detritos em superfícies subaquáticas e como consequência desse hábito alimentar e de suas grandes populações, esses peixes possuem um papel muito significativo no fluxo de energia nos sistemas aquáticos que habitam. Assim, a família caracteriza-se pela iliofagia (alimenta-se de detritos nos fundos lamacentos), também reofilia (dependem da correnteza do ambiente natural fluvial) e capacidade migratória durante o período de piracema (REIS *et al.*, 2003).

1.3 – O Lago Azul

Segundo Tanaka (2001), o Lago Azul, localizado no Centro Cultural “Roberto Palmari”, região norte da zona urbana da cidade de Rio Claro, possui uma área de 3,56 hectares, com uma profundidade que varia de 1,80 metros (nas regiões mais profundas) a cerca de 20 centímetros (nas regiões mais rasas). Surgiu em 1972 pelo represamento do Córrego da Servidão para contribuir com a drenagem e regularização do mesmo, buscando evitar enchentes nesta região da cidade. Atualmente serve também como área de recreação e lazer, com a construção em seu entorno, de quadras poliesportivas, parques, pistas para caminhadas e o próprio centro cultural onde são realizados diversos eventos culturais e sociais.

O Córrego Servidão sofreu com a deposição de efluentes advindos da Empresa Química Nheel por muito tempo (MAURO, 1993) e devido a sua localização, geográfica, as águas provenientes do escoamento superficial das ruas dos bairros, situados à montante, carreavam grande carga de sedimentos, como terra, lixo e entulho, para o Lago Azul, o que resultou no assoreamento gradual do Lago, culminando na formação de um brejo.

Posteriormente canalizado sob a Avenida Visconde de Rio Claro, o Córrego Servidão agora sofre com problemas de inundação, infiltração, erosão e contaminação das águas por esgoto em diferentes pontos de seu curso. Como o Lago Azul é um represamento do Córrego Servidão, afluente direto do Rio Corumbataí (afluente direto do Rio Piracicaba que, por sua vez, é afluente do Rio Tietê no Município de Santa Maria da Serra), este importante corpo d’água fluvial, bem como sua fauna, são diretamente afetado pelos despejos e impactos impostos ao Lago e o próprio Lago é afetado pelos poluentes lançados no Córrego Servidão.

Os problemas são resultado da ineficiência do planejamento das obras, uma vez que antes do represamento e da alteração do curso do córrego fazia-se necessário um planejamento sério, que contemplasse a preservação e a recuperação da vegetação, bem como a organização da ocupação das encostas e do vale do córrego da Servidão.

Preocupada com a possível contaminação das espécies existentes no Lago, a prefeitura de Rio Claro proibiu a pesca e, juntamente com a SABESP (Companhia de Saneamento Básico do Estado São Paulo), iniciou um estudo das águas e sedimentos do Lago Azul.

1.4 – Detergentes biodegradáveis

Os sabões e detergentes são compostos de moléculas que contêm grandes grupos hidrocarbônicos, os grupos hidrofóbicos, e um ou mais grupos polares, os grupos hidrofílicos. As partes não polares de tais moléculas dissolvem-se em gorduras e óleos e as porções polares são solúveis em água (ALLINGER *et al.*, 1978).

A indústria de detergentes sintéticos se baseia nos alquil-benzenos, que neutralizados formam dodecil-benzeno-sulfonado de sódio. Os produtos a base desse composto são considerados detergentes brandos, por possuírem uma cadeia lateral linear alifática e serem biodegradáveis, ou seja, por serem metabolizados por bactérias nas estações de tratamento de esgotos. No entanto, os detergentes como usados atualmente têm sido alvo de críticas e não se trata apenas do problema da biodegradação, lembrando que alguns dos compostos mais despejados nas águas de rios são os detergentes biodegradáveis. O elevado teor de fosfato, que aumenta a eficiência na limpeza, é responsável, quando as águas são despejadas em rios e lagos, pelo aumento do conteúdo de nutrientes das águas. O excesso de nutrientes provoca, por sua vez, aumento de velocidade de crescimento e reprodução de algas e ervas daninhas, um processo conhecido como eutrofização, que faz com que diminua o teor de oxigênio disponível nas águas, com efeitos graves sobre a vida animal (ALLINGER *et al.*, 1978).

1.5 – Justificativa

O desenvolvimento do projeto envolveu estudar modificações morfológicas do epitélio que recobre as escamas de peixes devido à exposição direta e constante a contaminantes. Como este epitélio ainda não fora descrito na espécie aqui proposta, este trabalho também compreendeu a caracterização desse tecido, quanto à histologia e histoquímica. Assim, o mesmo mostra-se relevante por trazer informações importantes em face à necessidade de se identificar os efeitos de poluentes liberados em rios e lagos, nas populações de peixes, e por caracterizar o que é considerado o maior órgão dos vertebrados, e que se encontra em contato direto com o meio externo, portanto muito importante para detecção de contaminantes. Este tipo de tecido ainda não foi descrito em espécies comumente utilizadas em estudos de toxicidade.

O *Prochilodus lineatus* foi escolhido por tratar-se de uma espécie de nossa bacia hidrográfica, robusta, de fácil criação e que permite a análise dos efeitos de poluentes em indivíduos abundantes nos rios que recebem contaminantes similares aos testados.

2 – OBJETIVOS:

O presente trabalho é inserido na área de pesquisa de Histologia, desenvolvido nos Laboratório de Histologia do Departamento de Biologia da UNESP, campus de Rio Claro e no Laboratório de Reprodução de Peixes localizado no CEPTA – Instituto Chico Mendes, Pirassununga.

O projeto procurou caracterizar o epitélio que recobre as escamas na espécie proposta e testar se há alterações morfológicas na histologia desse epitélio nos peixes expostos aos contaminantes. Como objetivos do presente trabalho, pode-se citar:

- Descrição do epitélio que recobre as escamas em *Prochilodus lineatus*, atentando para a morfologia do tecido, identificação das células presentes no epitélio e suas localizações, assim como, para a organização do epitélio e de suas células;
- Identificação e comparação das possíveis alterações histoquímicas e histológicas nas células do epitélio que recobre as escamas em peixes das espécies *Prochilodus lineatus* após a exposição a contaminantes.

3 – MATERIAL E MÉTODOS:

3.1 – Material:

Para a descrição inicial do epitélio da escama foram utilizados indivíduos amostrados diretamente no rio Mogi Guaçu fornecida pela equipe do Centro Especializado do Instituto Chico Mendes da Conservação da Biodiversidade (ICMBio/CEPTA).

Para realizar o projeto proposto foram utilizados trinta e seis indivíduos da espécie *Prochilodus lineatus*, no mesmo estágio de desenvolvimento. Os espécimes se foram obtidos no CEPTA – Instituto Chico Mendes, Pirassununga, SP, sendo que foram amostrados no rio Mogi-Guaçu e mantidos na estação de piscicultura no CEPTA. Os espécimes utilizados foram utilizados em conjunto com outro projeto do mesmo laboratório.

Os peixes foram mantidos em três caixas de polietileno com capacidade de 500 litros casa, que receberam amostras de água do controle e de dois tratamentos diferentes: Tratamento 1: água contaminada com detergentes biodegradáveis; Tratamento 2: água

proveniente do Lago Azul, Rio Claro, SP, com alto nível de contaminação; Controle: água limpa do poço artesiano situado na UNESP, Rio Claro.

Sabe-se por experimentos anteriores que existe perda de cerca de 10 litros de água por semana, portanto, semanalmente a água perdida foi resposta e as concentrações são reajustadas proporcionalmente ao volume perdido.

Para o processamento do material para as análises histológicas foram utilizadas as instalações do Laboratório de Histologia da UNESP - Rio Claro e microscópios Leica CM 2000 provido de câmera para captura de imagens.

3.2 – Métodos:

a) Amostragem e Tratamentos

Para a descrição inicial escamas de espécimes de *P. lineatus* foram retiradas com auxílio de pinça da região posterior da nadadeira dorsal de indivíduos coletados nos taques de criação do ICMBio/CEPTA. As escamas foram transportadas até Rio Claro imersas em fixador Bouin aquoso.

Para os experimentos foram utilizados três casais escolhidos ao acaso para a reprodução, para que a variabilidade genética seja mantida nos indivíduos do experimento. A prole dos três cruzamentos foi exposta aos contaminantes e a primeira coleta de material necessário para o experimento foi realizada quando os espécimes se encontrarem no estágio juvenil. Depois da primeira coleta os espécimes foram colocados nas caixas de polietileno de 500 litros (Figura abaixo) e expostos aos poluentes pelo período de 28 dias.

O grupo Controle foi exposto à água pura do poço artesiano da UNESP – Rio Claro, tratado posteriormente com cloro a fim de eliminar eventuais contaminações, sendo que a água clorada é a única disponível no Campus para o experimento. Essa água foi oxigenada por uma semana antes do início do experimento para baixar o nível do cloro. O Tratamento 1 foi exposto a uma diluição de 1: 1000000 de uma mistura de dez marcas de detergentes biodegradáveis de pH neutro comumente encontradas no meio comercial que não serão identificadas nas publicações para evitar transtornos com os fabricantes, tendo em vista que no Lago Azul de fato é despejada uma mistura de diversas marcas de detergentes. O Tratamento 2 foi exposto à água do Lago Azul, Rio Claro, SP.



Estrutura montada na UNESP – Campus de Rio Claro – caixas de polietileno de 500L, nas quais parte do experimento será realizada (Foto de Bruno Fiorelini Pereira, 2009)

O estudo utilizou uma diluição de 1ppm porque pretendeu detectar alterações morfológicas já em níveis baixos do contaminante, uma vez que a diluição de detergentes em corpos d'águas não deve exceder a proporção testada.

Para as coletas as escamas foram removidas da porção posterior do corpo do peixe, próximo à nadadeira caudal, com auxílio de pinça. O local da remoção da nadadeira foi tratado com iodo para evitar infecções decorrentes da remoção das escamas.

As coletas foram realizadas em 0 dias de tratamento, 7 dias de tratamento, 14 dias de tratamento e 28 dias de tratamento, visando detectar com precisão quanto tempo de exposição causa danos ao tecido.

b) Análises histológicas e histoquímicas.

Para as análises histológicas foram sacrificados três indivíduos. As escamas foram retiradas e fixadas em Bouin aquoso, descalcificadas em EDTA 10%, desidratadas em álcool, preparadas para técnica em resina e coradas com as técnicas de Alcian Blue , para a detecção de polissacarídeos ácidos, PAS para a detecção de polissacarídeos neutros, Picrossirus Red para a detecção de fibras colágenas I e III, Azul de Bromofenol para a detecção de proteínas e Hematoxilina-Eosina para analisar possíveis alterações morfológicas nas células.

O material foi montado em bálsamo do Canadá, analisado e fotografado com auxílio de um microscópio de luz Leica CM 2000. Os protocolos das técnicas já referidas são descritos abaixo:

- Hematoxilina-Eosina: Segundo Paulete & Beçak (1976), a técnica é composta de dois reagentes principais, a Hematoxilina, que possui características basófilas e cora o núcleo da célula de azul, e a Eosina, de características acidófilas e cora o citoplasma da célula de rosa. Na realização da técnica, as lâminas foram deixadas em água destilada por 1 minuto, depois coradas com Hematoxilina por 5 minutos, reagiram com água por 4 minutos e foram lavadas em água corrente, por fim, coradas com Eosina por 5 minutos e lavadas em água corrente.

- Azul de Bromofenol: Segundo Behmer *et al.* (2003), a técnica é utilizada para identificar proteínas, corando em valores de pH que variam de 3,0 a 4,6. Os resultados são observados principalmente em azul e amarelo. Na realização da técnica, as lâminas foram coradas com Azul de Bromofenol por 1 hora em temperatura ambiente, lavadas em ácido acético 0,5% por 1 minuto, depois lavadas em água corrente por 5 minutos e lavadas em álcool butílico terciário.

- Alcian Blue: Segundo Junqueira & Junqueira (1983), esta técnica baseia-se nas ligações eletrostáticas que se estabelecem entre um corante carregado positivamente com polissacarídeos ácidos, de maneira estes coram-se em azul celeste. Na realização da técnica os cortes foram lavados em ácido acético a 3% e em seguida transferidos para a solução de Alcian durante 30 minutos.

- PAS (Ácido Periódico de Schiff): Segundo Junqueira & Junqueira (1983), a técnica baseia-se na capacidade do ácido periódico de oxidar as ligações carbono-carbono das sequências 1-2 glicol dos hidratos de carbono, produzindo aldeídos que são revelados pelo reagente de Schiff, produzindo um composto corado e insolúvel de cor vermelha. No presente projeto será utilizada uma técnica adaptada desse mesmo autor, na qual os cortes foram lavados em ácido periódico 0,4% por 10 minutos, lavados em água destilada e transferidos para o reagente de Schiff durante uma hora no escuro. Os cortes foram então banhados em água sulfurosa por 3 minutos e lavados em água corrente por 10 minutos.

- Picrossirus Red: Segundo Pearse (1985), a técnica é utilizada para diferenciar fibras colágenas do tipo I, de fibras colágenas do tipo III. O colágeno tipo I é evidenciado por coloração vermelha, ao passo que o colágeno tipo III, é marcado de verde. Na realização da técnica, as lâminas foram coradas com Picrossirus durante 1 hora em estufa a 60°C (o corante já pré-aquecido), depois lavadas em água destilada, coradas com hematoxilina por 8 minutos e lavadas em água corrente.

3.3 – Forma de análise dos resultados:

Os dados foram analisados quanto à histologia e histoquímica e utilizados em conjunto para caracterizar o epitélio que recobre as escamas e as alterações que sofreu em função do experimento realizado.

4 - RESULTADOS:

4.1 - Descrição do epitélio:

As escamas de *P. lineatus* são recobertas, tanto em sua face dorsal quanto na ventral, por um epitélio que se estende continuamente desde o ponto de inserção da escama no corpo do peixe, até sua porção mais distal. No ponto de inserção pode-se observar um resquício de conjuntivo frouxo da bolsa dérmica onde a escama é inserida, que em preparações diferentes pode não ser removido junto da escama e, portanto, não ser observada (Figura 1).

A espessura do epitélio de ambas as faces apresenta-se irregular ao longo de seu comprimento devido às ondulações na escama, mas o epitélio da face ventral (epitélio inferior) é em geral mais delgado que aquele da porção dorsal (epitélio superior). Ambos são mais espessos no trecho que se estende desde a região de inserção até a região média da escama (região de transição entre a parte que fica mergulhada no corpo do animal e a que fica exposta), onde as camadas de células sofrem redução e o epitélio passa a se constituir de uma camada delgada de células (Figuras 1 e 2).

O epitélio superior na porção proximal (anterior à redução abrupta), além de mais espesso é também mais diferenciado, ou seja constitui um epitélio estratificado até o ponto de redução abrupta. As células da porção basal são colunares e justapostas, enquanto as células da porção mediana são arredondadas, com núcleo que acompanha o formato da célula, e as células da camada superficial são pavimentosas (Figura 3).

Dentre essas células arredondadas da porção mediana, é possível observar algumas maiores, também arredondadas, mas de núcleo deslocado, que correspondem às células club (Figura 4). Alguns cromatóforos são dispostos no limite entre o epitélio superior e a matriz colagênica (Figura 4), abaixo ou entre as células da camada basal, local onde se pode observar células de núcleo elíptico, que devem ser os fibroblastos responsáveis pela manutenção da matriz de colágeno adjacente. Ainda na porção proximal desse epitélio, em alguns pontos surge uma camada indiferenciada acima das células pavimentosas que parece constituir uma região de descamação (Figura 3).

À medida que se segue para a porção distal o epitélio superior diminui de espessura, primeiramente com a redução do número de células da porção intermediária, sendo que após a redução brusca resta apenas uma camada células muito delgada que continua até a extremidade da escama, acompanhando as ondulações da mesma (Figura 5 e 6).

Já o epitélio inferior na porção proximal da escama (anterior à redução abrupta de espessura) apresenta-se como uma camada indiferenciada se comparada com o epitélio superior, além de ser mais delgado. No entanto, na base desse epitélio observa-se uma camada única de células fortemente marcadas pela hematoxilina que permanece intacta até a porção distal da escama (Figura 3).

O epitélio inferior também diminui de espessura primeiramente com a redução da porção indiferenciada, tanto que na porção distal da escama, após a redução abrupta na espessura do epitélio, resta apenas a camada de células fortemente marcada pela hematoxilina (Figuras 5 e 6).

Entre os dois epitélios interpõe-se uma matriz de colágeno formada por seis camadas distintas quando submetida a H.E., que confere a consistência e forma da escama e corresponde à placa basal e camada externa. Na face ventral da escama, adjacente a essas camadas de colágeno observa-se uma faixa de colágeno hematoxilina afim que acompanha a camada basal do epitélio inferior (Figuras 4 e 6 cabeça de seta).

Na região da inserção da escama no corpo do peixe há uma conexão entre esses dois epitélios, que interrompe as camadas colagênicas interpostas, onde as células se alongam (Figura 7). Na porção logo acima da inserção surgem canais amplos que se dirigem à outra extremidade da escama (Figura 8).

Sobre as camadas colagênicas da placa basal e camada externa, observa-se a região do que se conhece como camada limitante, uma região que aparece bastante desorganizada (Figura 5).

Poucas regiões, tanto do epitélio inferior quanto do superior, são PAS-positivas, o que indica que a produção de muco pelo epitélio é pouco expressiva. A região da camada limitante que apóia o epitélio superior foi marcada também pela técnica de PAS (Figura 9).

O colágeno é evidenciado na escama pela técnica de Picrossirus Red. É possível observar – lo marcado em vermelho na região que corresponde à placa basal e camada externa (sendo que não é possível diferenciá-las), e na região que corresponde à camada limitante e no colágeno adjacente ao epitélio inferior marcados com menor intensidade. A separação das faixas de colágeno que foram observadas em H.E estão evidenciadas menos conspicuamente devido à forte reação positiva à técnica (Figura 10).

Na região mediana da escama, no ponto onde se inicia o canal, as faixas de colágeno se desorganizam e mudam de orientação, surgindo uma porção perpendicular à orientação colagênica observada ao longo da escama (Figura 10).

Na região proximal da escama observa-se que as faixas de colágeno desaparecem e predomina apenas o colágeno do tecido conjuntivo, contínuo ao conjuntivo que ancora o epitélio superior. O mesmo ocorre na extremidade distal da escama, na qual resta apenas conjuntivo para dar suporte ao epitélio (Figura 11 e 12).

Quanto à composição protéica evidenciada pela técnica do Azul de Bromofenol, a marcação mais intensa ocorreu na região das faixas colagênicas, correspondente à placa basal e camada externa e também na região da camada limitante. Ambos os epitélios apresentaram marcação semelhante e menos intensa na região proximal (Figura 13).

A porção indiferenciada do epitélio inferior em sua grande maioria reagiu fracamente, sendo possível observar porções deste epitélio onde a marcação é mais expressiva (Figura 14).

A técnica de Alcian Blue evidencia polissacarídeos ácidos, no entanto diversos protocolos foram seguidos para o processamento do material incluído em resina e até o presente momento nenhum apresentou resultados satisfatórios, mesmo com sucessivas modificações na tentativa de adequar a técnica ao material trabalhado. As evidências até o momento são de que o epitélio é totalmente recoberto por este tipo de mucopolissacarídeo.

4.2 - Resultados da exposição a ambientes contaminados:

Quanto à histologia, os peixes do tempo 0 foram amostrados para verificar se a morfologia do epitélio é consistente com o observado durante sua descrição e para verificar se a manutenção dos mesmos em cativeiro pode ter influenciado na morfologia do epitélio da escama.

Os indivíduos deste tempo apresentaram a escama totalmente recoberta por epitélio já enquanto juvenis, entretanto a espessura do epitélio é bastante reduzida. Este apresenta o mesmo padrão de maior espessura na região que se estende da inserção da escama no corpo do peixe, até sua porção média. Nesta porção do epitélio as células são cúbicas e sua morfologia permanece constante em todas as camadas. O restante do epitélio, que se estende da porção mediana até a porção distal da escama é bastante delgado, composto de apenas uma camada de células, de maneira semelhante à observada durante a descrição da escama (Figuras 15 e 16).

O grupo controle do tempo 1 (7 dias de experimento) apresentou também o mesmo padrão de espessura e a morfologia das células na porção mais espessa do epitélio ainda permanece constante entre as camadas. Entretanto começam a aparecer as células club apenas no epitélio superior, que devido a seu grande tamanho, tomam quase que a espessura toda do epitélio na porção em que se encontram (Figura 17).

O grupo Detergente apresentou leve aumento da espessura apenas do epitélio superior, enquanto o epitélio inferior ainda possui apenas uma única camada de células. Também houve pequeno aumento no número de células club presentes do epitélio superior (Figura 18).

O grupo Lago Azul do tempo 1 apresentou aumento expressivo na espessura dos epitélios tanto superior quanto inferior em toda sua extensão. O epitélio inferior que no grupo controle apresenta apenas uma única camada de células passa a possuir múltiplas camadas, ainda que permaneça mais delgado que o epitélio superior. O epitélio superior, além do aumento na espessura também apresentou aumento expressivo no número de células club (Figura 19).

O Controle da terceira coleta (tempo 2) ainda manteve o padrão de organização do epitélio, mas sua espessura aumentou em relação ao tempo de coleta anterior, tanto no epitélio superior, quanto no inferior. O número de células club no epitélio superior neste grupo é bastante reduzido e a espessura do mesmo é tanto maior que as células club já não mais o excedem em tamanho (Figura 20).

O epitélio da escama dos indivíduos submetidos ao detergente nessa terceira coleta não apresentou variação observável na espessura, nem no epitélio superior, nem no inferior na metade proximal. Entretanto, o epitélio superior aumentou ligeiramente em espessura na porção distal da escama. Além disso, a quantidade de células club também aumentou ligeiramente em relação ao grupo Controle (Figura 21).

No grupo Lago Azul a espessura do epitélio apresentou-se maior que aquela verificada para o grupo Controle do respectivo tempo, entretanto ainda era menor que aquela verificada

para o grupo Lago Azul do tempo anterior. Quanto à quantidade de células club, ainda encontra-se superior àquela verificada tanto para o grupo Controle, quanto para o grupo Detergente da mesma coleta (Figura 22).

Os dados da quarta coleta (tempo 3) apresentaram-se muito similares aos apresentados para a terceira coleta (tempo 2) acima descrita. A espessura do epitélio no grupo Detergente mostrou-se pouco aumentada, enquanto no grupo Lago Azul manteve-se maior que a verificada no grupo Controle, mas ainda menor que aquela observada para o grupo Lago Azul da segunda coleta (tempo 1). O número de células club, no entanto, aumentou progressivamente, sendo pequeno no epitélio das escamas dos indivíduos do grupo Controle e sucessivamente maior nos grupos Detergente e Lago Azul, respectivamente, possivelmente em resposta aos contaminantes presentes na água, tendo em vista a relação direta deste tipo celular com respostas imunes em peixes (ver Figuras 20 a 22, referentes à terceira coleta).

Quanto à histoquímica, a espessura das faixas colagênicas da placa basal e camada externa observadas sob a técnica de Picrossirud Red não se alterou durante o experimento, entre todos os tempos do grupo Controle. Entretanto, a marcação para colágeno na camada limitante observada durante a descrição da escama, não foi observada em nenhum dos peixes amostrados durante o experimento.

Assim como a espessura, também a intensidade da marcação não variou entre os indivíduos e tempos de coleta do grupo Controle. A região do conjuntivo que apóia o epitélio inferior também não apareceu nos indivíduos amostrados durante o experimento (Figura 23).

A espessura da camada de colágeno da placa basal e camada externa não variou entre todos os indivíduos de todos os tempos do grupo Detergente, bem como a intensidade de marcação. Além disto a intensidade de marcação entre o grupo Controle e grupo Detergente não pareceu diferir em nenhum dos tempos de coleta (Figura 24).

As camadas de colágeno da placa basal e camada externa no grupo Lago Azul também não diferiram em espessura ou em intensidade de marcação entre os indivíduos amostrados e tempos de amostragem. Entre o observado para os grupos Lago Azul e Controle também não houve diferença palpável em nenhum dos tempos de coleta (Figura 25).

Quanto ao conteúdo protéico analisado pela técnica de Azul de Bromofenol, a marcação para os indivíduos da primeira coleta (tempo 0) segue o padrão observado durante a descrição do epitélio, sendo mais intensa nas camadas colagênicas da placa basal e camada externa, e menos intensa no epitélio propriamente dito.

No entanto, a região correspondente à camada limitante não foi marcada e nenhum dos indivíduos do grupo Controle amostrados no tempo 0 de experimento. A porção

indiferenciada do epitélio inferior mostrou-se marcada na mesma intensidade que o restante do epitélio nesta primeira coleta (Figura 26).

Nas escamas da segunda coleta (tempo 1) a marcação permanece na mesma intensidade nas faixas colagênicas, mas intensifica-se no epitélio, a medida que este aumenta em espessura e adquire o padrão de organização observado durante a descrição do mesmo. No entanto, a marcação no epitélio ainda é mais fraca que aquela nas faixas de colágeno. E também neste tempo já é possível diferenciar a marcação mais fraca na porção indiferenciada do epitélio inferior e camada limitante sem marcação (Figura 27).

Essa marcação para proteínas no epitélio das escamas do grupo Controle da terceira coleta (tempo 2) tornou-se ainda mais intensa que no tempo de experimento anterior, mas ainda não excedeu a marcação nas faixas colagênicas. Manteve ainda o padrão de marcação mais fraco na porção indiferenciada do epitélio inferior e ausência de marcação na camada limitante anterior ao epitélio superior (Figura 28).

Nos indivíduos da última coleta do grupo Controle, o padrão permaneceu constante. A intensidade da marcação manteve-se semelhante àquela observada no epitélio das escamas dos indivíduos amostrados no tempo anterior, não aumentando e não excedendo a marcação nas faixas de colágeno (ver Figura 28 referente à terceira coleta). Entre os grupos Controle, Detergente e Lago Azul das três coletas, entretanto, não houve diferença (Figuras 29 e 30).

Em relação à presença de muco neutro, a marcação nos indivíduos da primeira coleta (tempo 0) foi muito reduzida, mesmo em função do pequeno tamanho da escama. Em nenhum dos indivíduos amostrados a região da camada limitante apresentou a marcação para polissacarídeos neutros observada durante a descrição do epitélio (Figura 31).

Nas escamas dos indivíduos do grupo Controle da segunda coleta (tempo 1), a medida que o epitélio ganhou espessura, mais marcações começaram a aparecer. Mas ainda somam poucas marcações em relação ao tamanho da escama e em sua maioria foram encontradas no epitélio superior (Figura 32).

O número de marcações para muco no epitélio da escama não aumentou nos indivíduos do grupo Detergente deste tempo 1 (Figura 33). Já nos indivíduos do grupo Lago Azul as marcações para o tempo 1 aumentaram muito em relação às observações para os indivíduos do grupo Controle, consistindo em diferenças de oito a dez marcações entre os indivíduos destes dois grupos (Figura 34).

Na terceira coleta (tempo 2) a quantidade de marcações no epitélio aumentou ligeiramente em relação àquela observada na segunda coleta (tempo 1) no grupo Controle, sendo observadas diferenças de apenas três a cinco marcações por corte/escama entre os

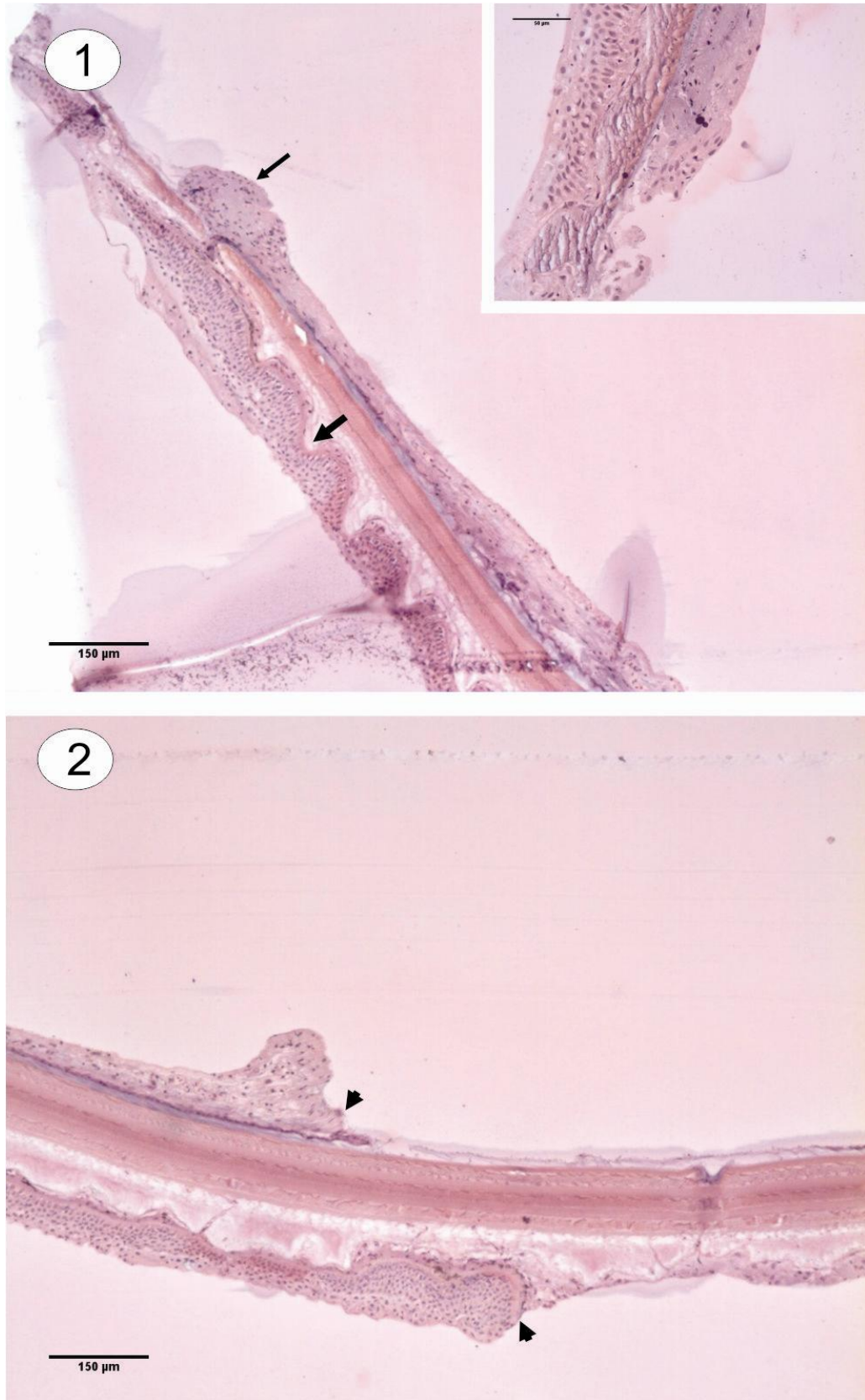
indivíduos dos dois tempos. Essas marcações parecem se acumular mais no epitélio superior (Figura 35).

O epitélio das escamas dos indivíduos do grupo Detergente no tempo 2 apresentou algum aumento em relação ao grupo Controle, mas pequeno, sendo a diferença também de cerca de três a cinco marcações entre os dois grupos (Figura 36).

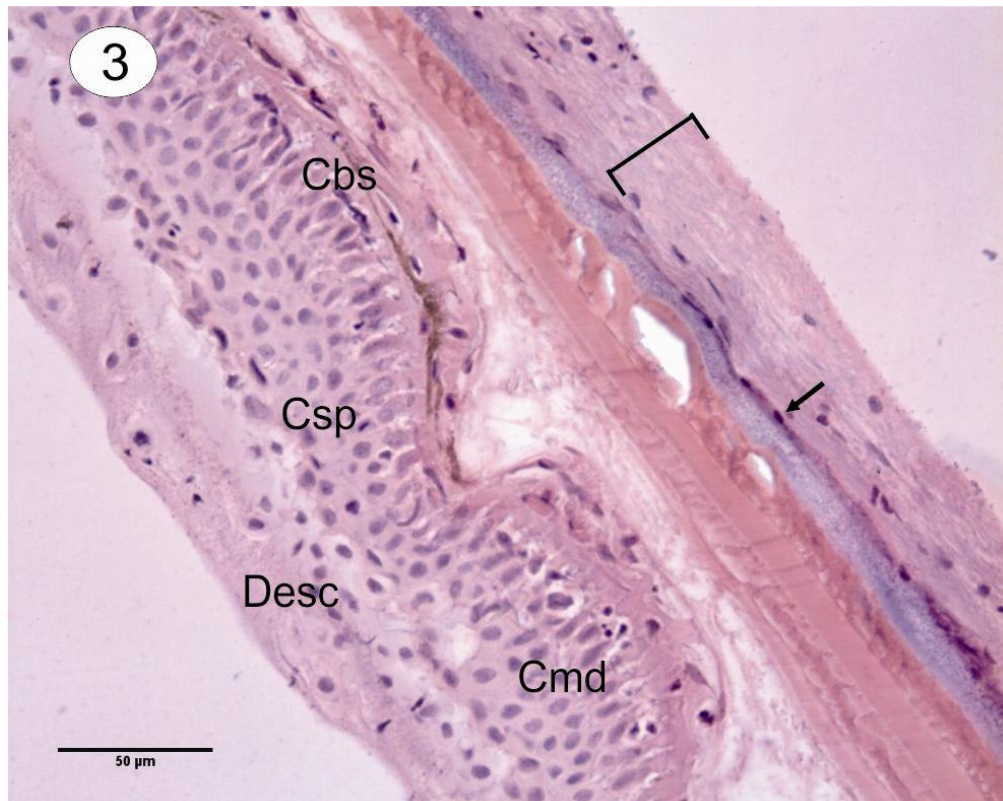
Enquanto nos indivíduos do grupo Lago Azul o número de marcações aumentou significativamente em relação ao grupo Controle e em relação ao aumento verificado para o grupo Detergente nesta terceira coleta. Os indivíduos do tempo 2 tiveram aumento expressivo de marcações que se distribuíram em ambos os epitélios e até mesmo na dobra do mesmo na porção proximal da escama, sendo a diferença de cerca de oito a dez marcações por escama entre os dois grupos (Figura 37).

Nas coletas do tempo 3 (quarta coleta) o padrão observado no epitélio das escamas dos indivíduos da coleta anterior se manteve. A quantidade de marcações para muco no grupo Controle deste último tempo de experimento permaneceu semelhante àquela observada no tempo 2, bem como sua distribuição. No grupo Detergente houve um pequeno aumento, nas mesmas dimensões daquele observado no tempo anterior, e no grupo Lago Azul este aumento foi bastante expressivo (ver Figuras 35 a 37 referentes à terceira coleta).

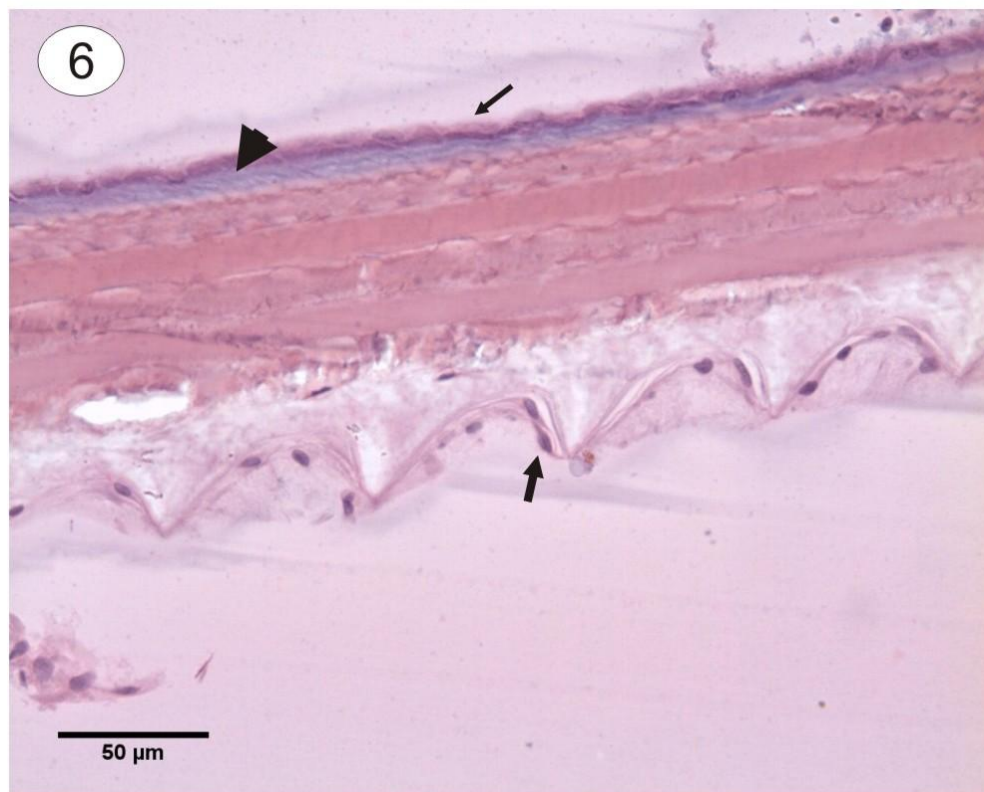
Quanto à marcação para polissacarídeos ácidos, a técnica não foi adaptada de maneira bem sucedida para o material em questão incluído em resina.



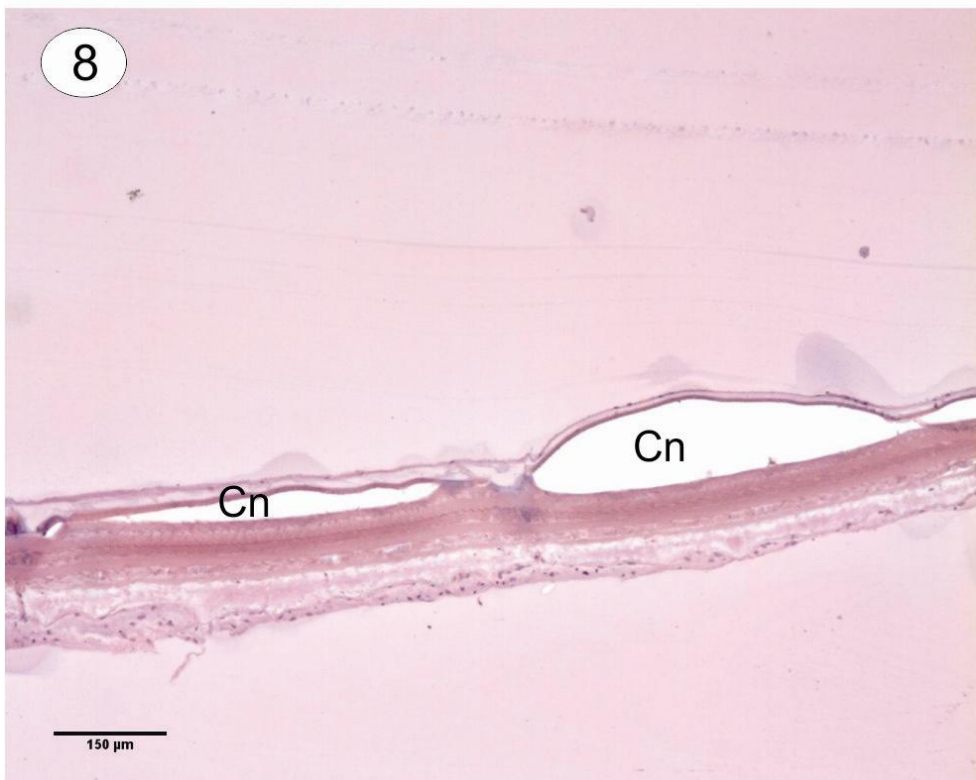
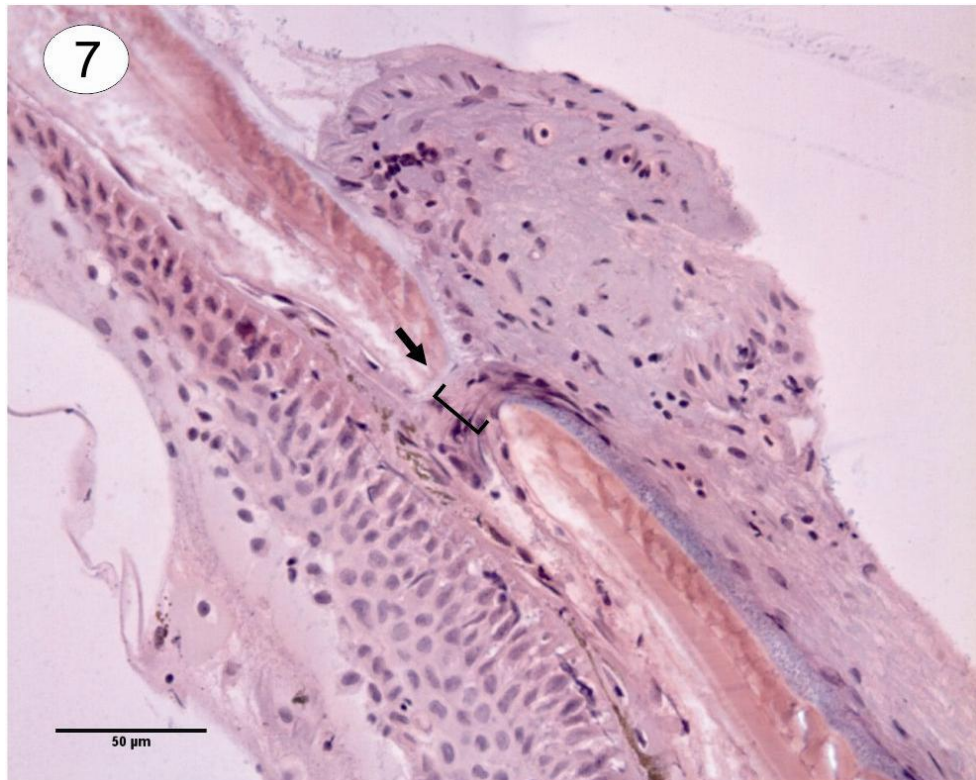
1. Vista geral da porção proximal da escama de *P. lineatus* submetida à técnica de H.E. Note o acúmulo de tecido conjuntivo (seta fina) e as ondulações ao longo da escama (seta grossa). No detalhe, região proximal de escama sem o acúmulo de tecido conjuntivo. 2. Vista geral da porção mediana da escama de *P. lineatus* submetida à técnica de H.E.. Note a espessura de ambos os epitélios antes e após o ponto indicado pela cabeça de seta.



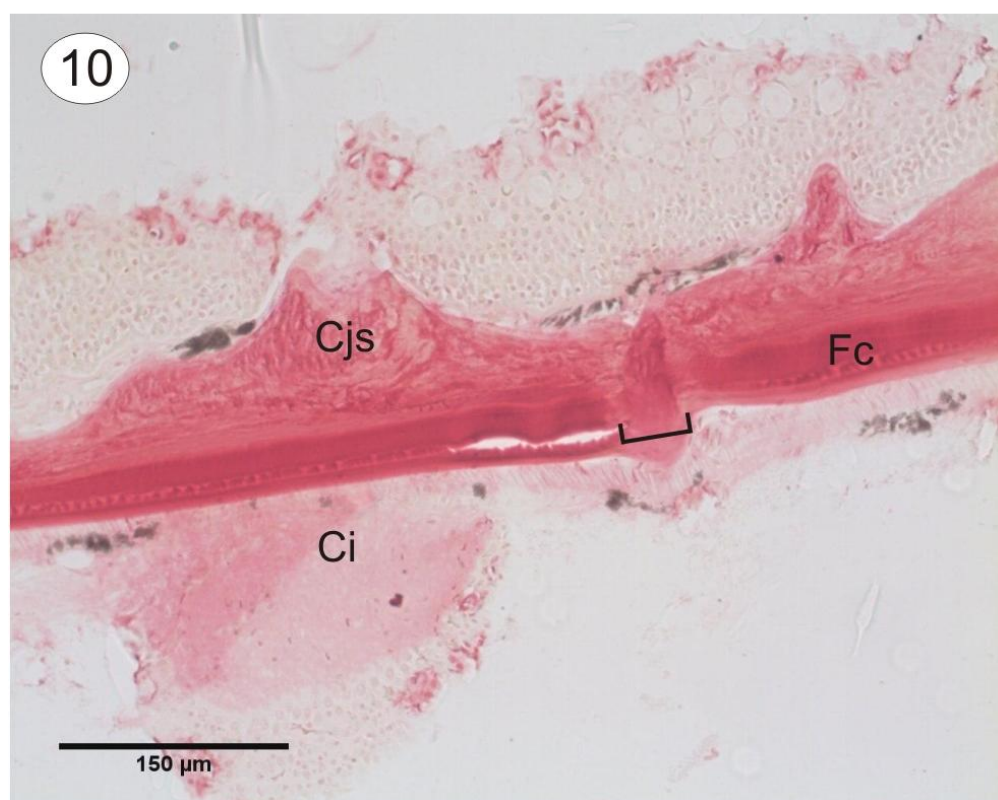
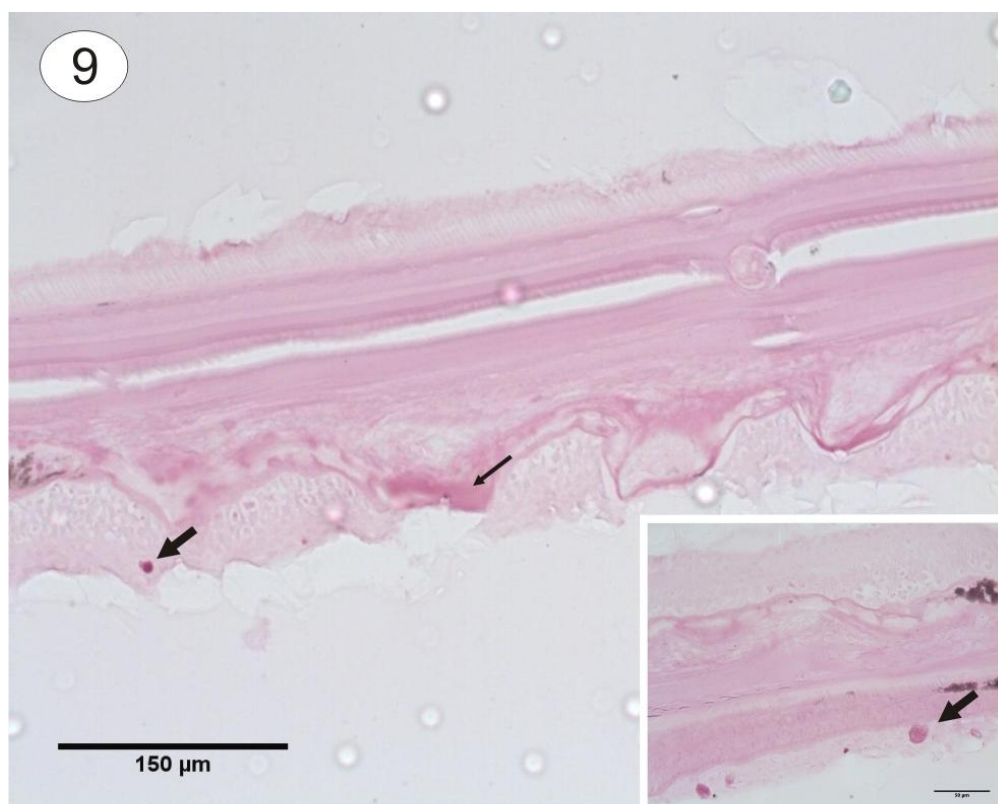
3. Vista geral da porção média da escama submetida à técnica de H.E. Observe as células da camada basal (Cbs) colunares, as células medianas (Cmd) arredondadas, as células da camada superficial (Csp) pavimentosas, e a região de descamação (Desc) no epitélio superior. No epitélio inferior, a camada indiferenciada (chave) e camada basal (seta). **4.** Vista geral da porção média da escama submetida à técnica de H.E. Observe o cromatóforo (Cr) na base do epitélio superior e as células club (Cc) na porção superficial do mesmo epitélio. As seis camadas da porção colagênica (1 a 6) e a camada hematoxilina afim (cabeça de seta).



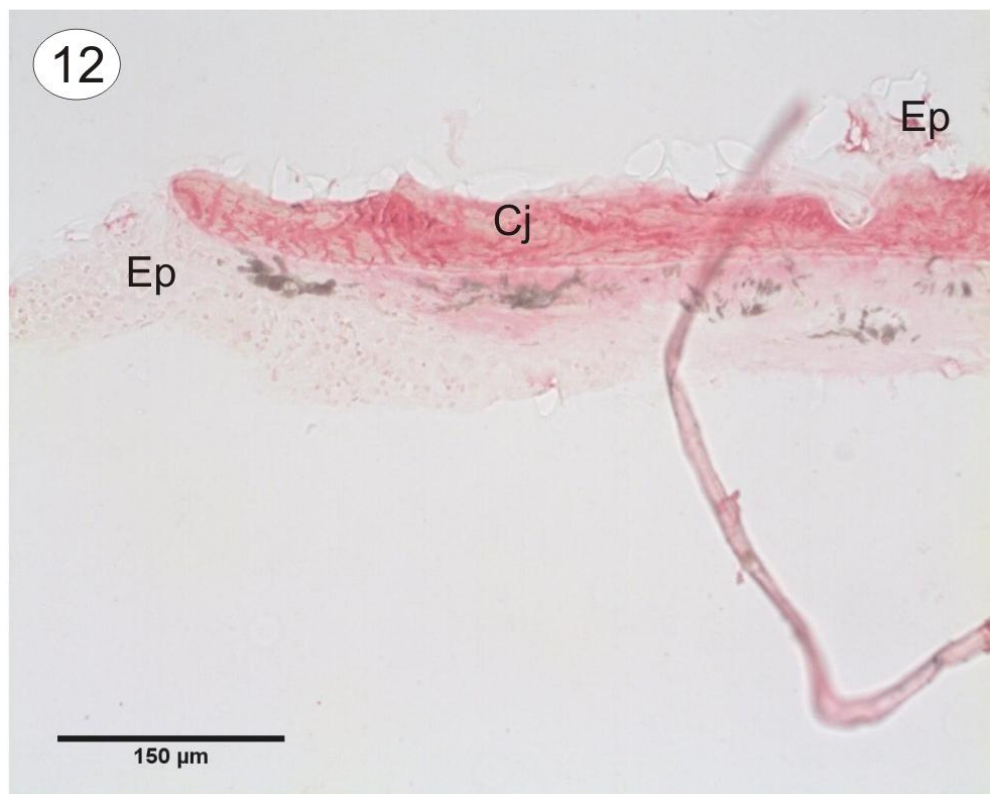
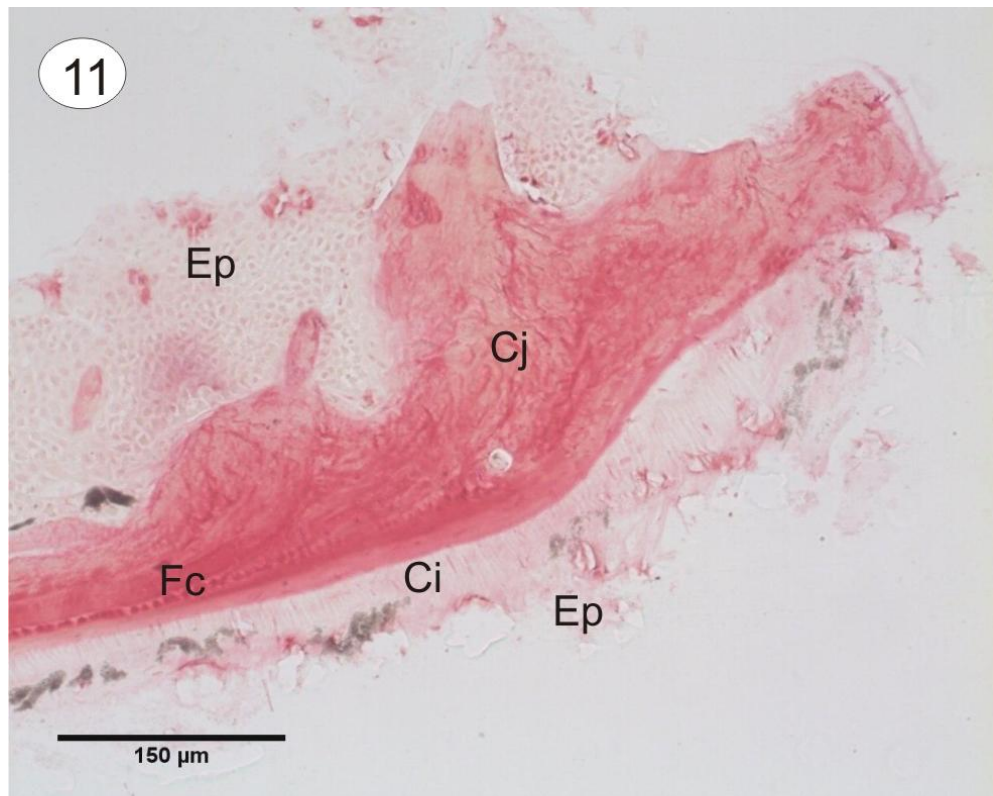
5. Vista geral da porção mediana e distal (após a redução brusca de espessura do epitélio) da escama submetida à técnica de H.E. Note a camada mediana do epitélio superior (chave 1) diminuindo de espessura em direção à extremidade distal da escama inferior e a camada única de células muito marcadas pelas hematoxilina (seta fina) e a camada limitante (chave 2). 6. Vista geral da porção mediana e distal (após a redução brusca de espessura do epitélio) da escama submetida à técnica de H.E. Note que resta apenas uma camada de células (seta grossa) no epitélio superior da região distal. No epitélio inferior, a camada de colágeno hematoxilina afim (cabeça de seta) que acompanha a camada única de células.



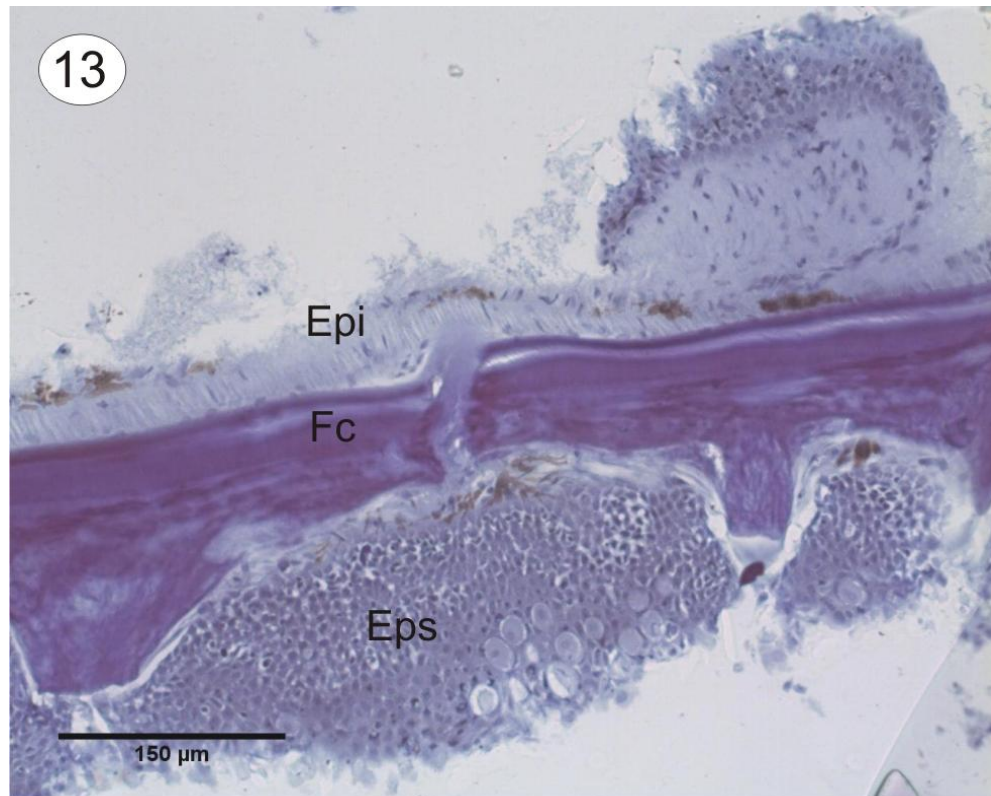
7. Vista da região de inserção da escama submetida à técnica de H.E. Note a união entre os epitélios (chave) no ponto que interrompe as camadas colagênicas (seta) na região de inserção. Observe ainda que as células formam uma camada contínua que passa pelo canal de ligação (seta). 8. Vista geral da escama submetida à técnica de H.E. Note os canais (Cn) que surgem a partir da região de inserção.



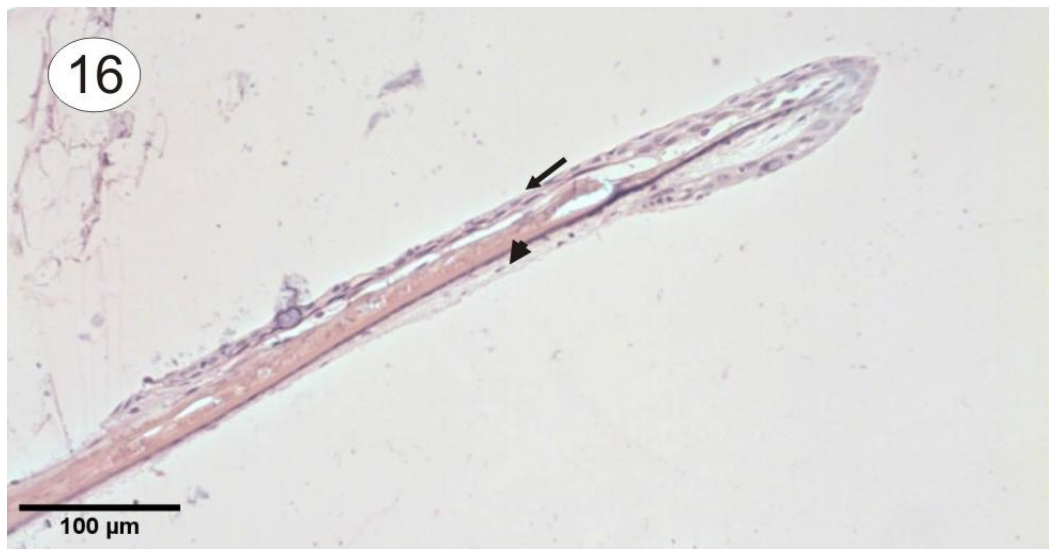
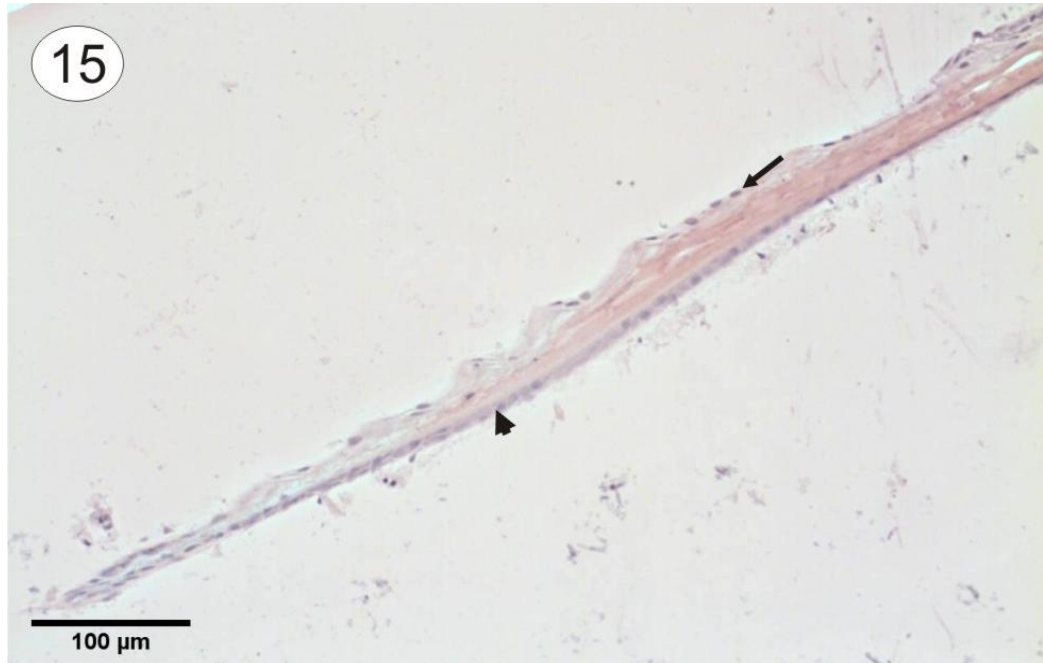
9. Vista geral da porção mediana da escama submetida à técnica de PAS. Note a marcação de poucas células no epitélio superior (seta grossa) e na região da chamada camada limitante, que apóia epitélio superior (seta fina). No detalhe, poucas células marcadas no epitélio inferior (seta grossa). **10.** Vista da porção média da escama submetida à técnica de Picrossirus Red. Note a faixa de colágeno (Fc) muito marcada, na camada limitante que apóia epitélio superior (Cjs) e o conjuntivo no epitélio inferior (Ci) também marcados. Na chave, região da mudança de orientação das faixas de colágeno.



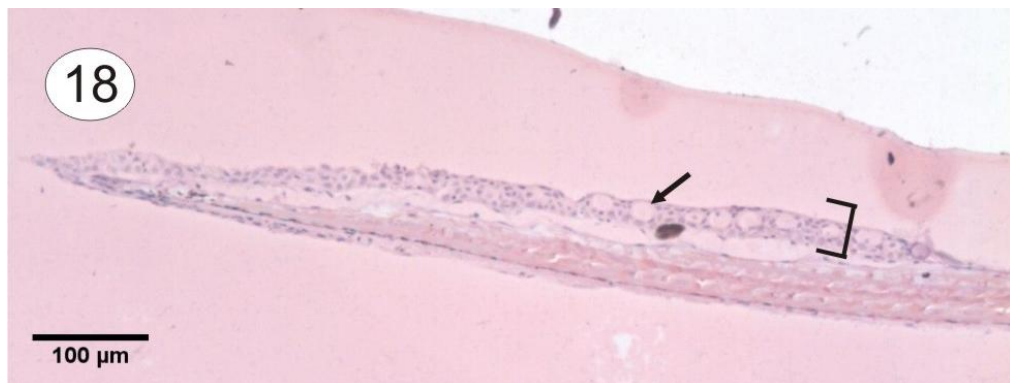
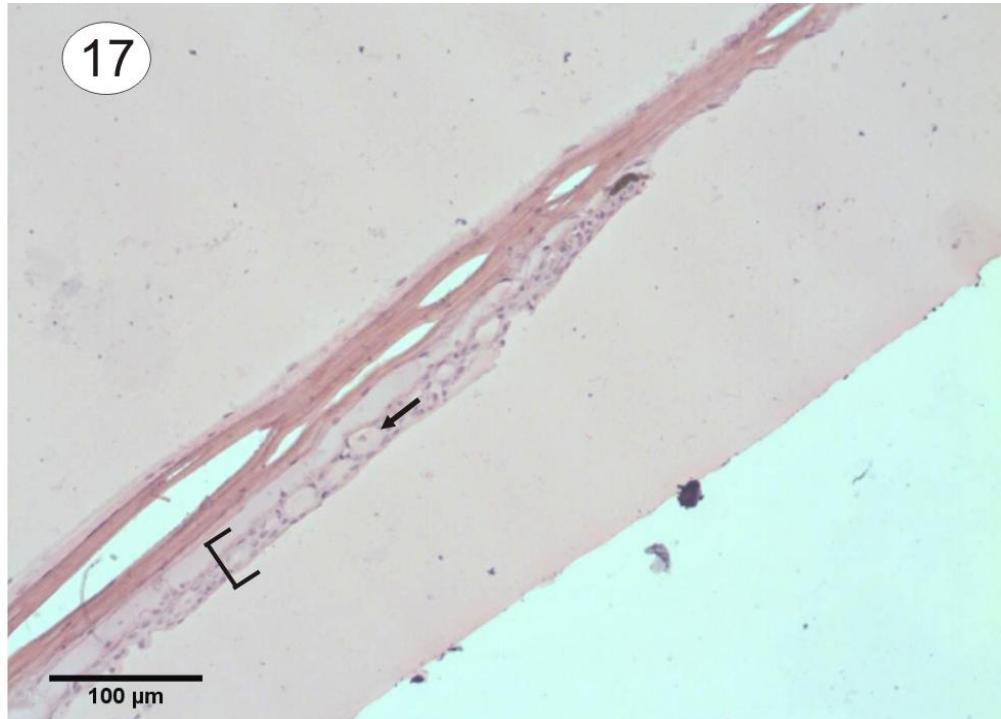
11. Vista da região proximal da escama submetida à técnica de Picrossirus Red. Note a predominância do tecido conjuntivo (Cj) contínuo à faixa colagênica (Fc). Acima e abaixo estão os epitélios (Ep). **12.** Vista da região distal da escama submetida à técnica de Picrossirus Red. Note que resta apenas o conjuntivo (Cj) para dar suporte ao epitélio (Ep).



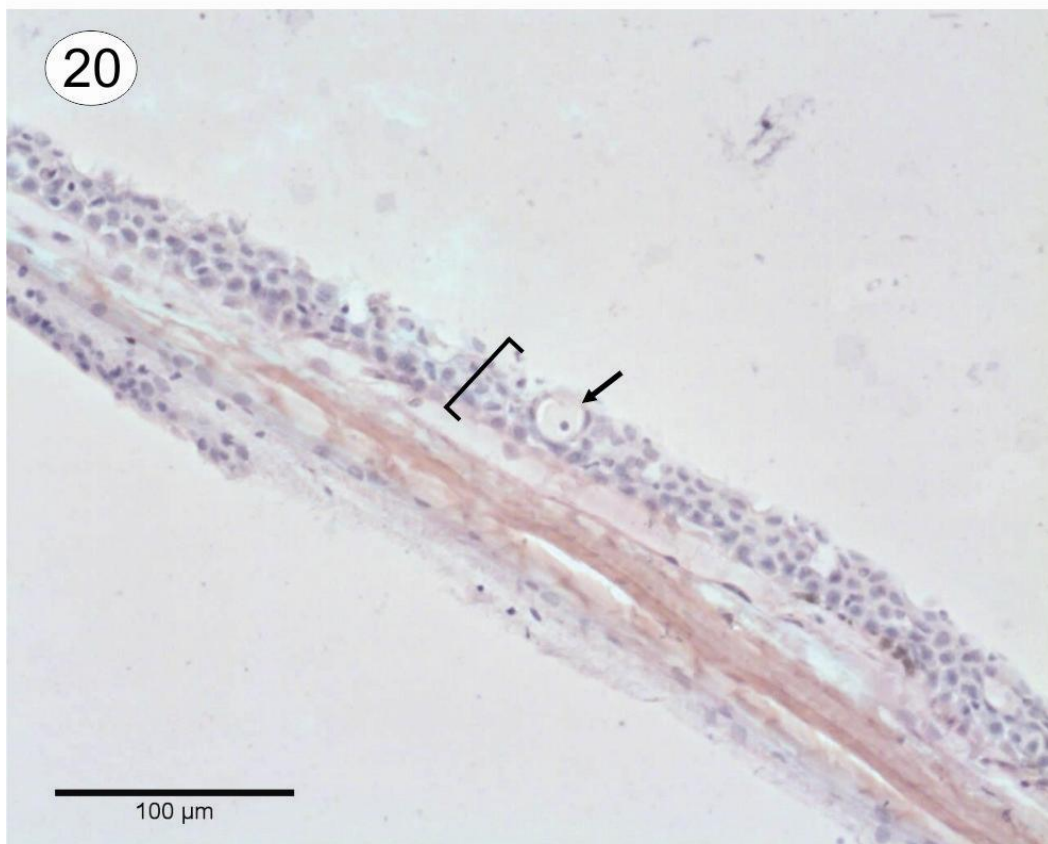
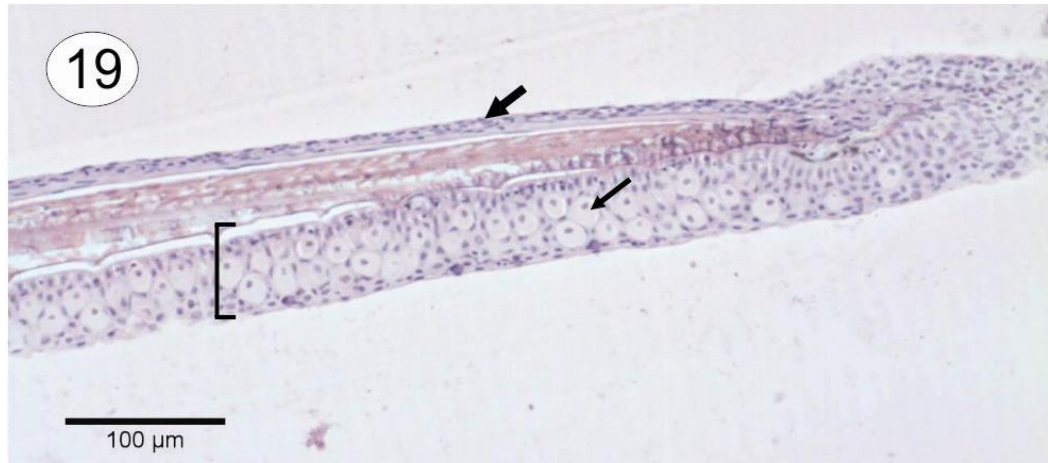
13. Vista da porção mediana da escama submetida à técnica de Azul de Bromofenol, note a faixas colagênicas (Fc) fortemente marcadas e o epitélio superior (Eps) e inferior (Epi) com menor intensidade de reação. **14.** Vista da porção distal da escama submetida à técnica de Azul de Bromofenol. Note o maior número de camadas de epitélio inferior (chave) (Epi).



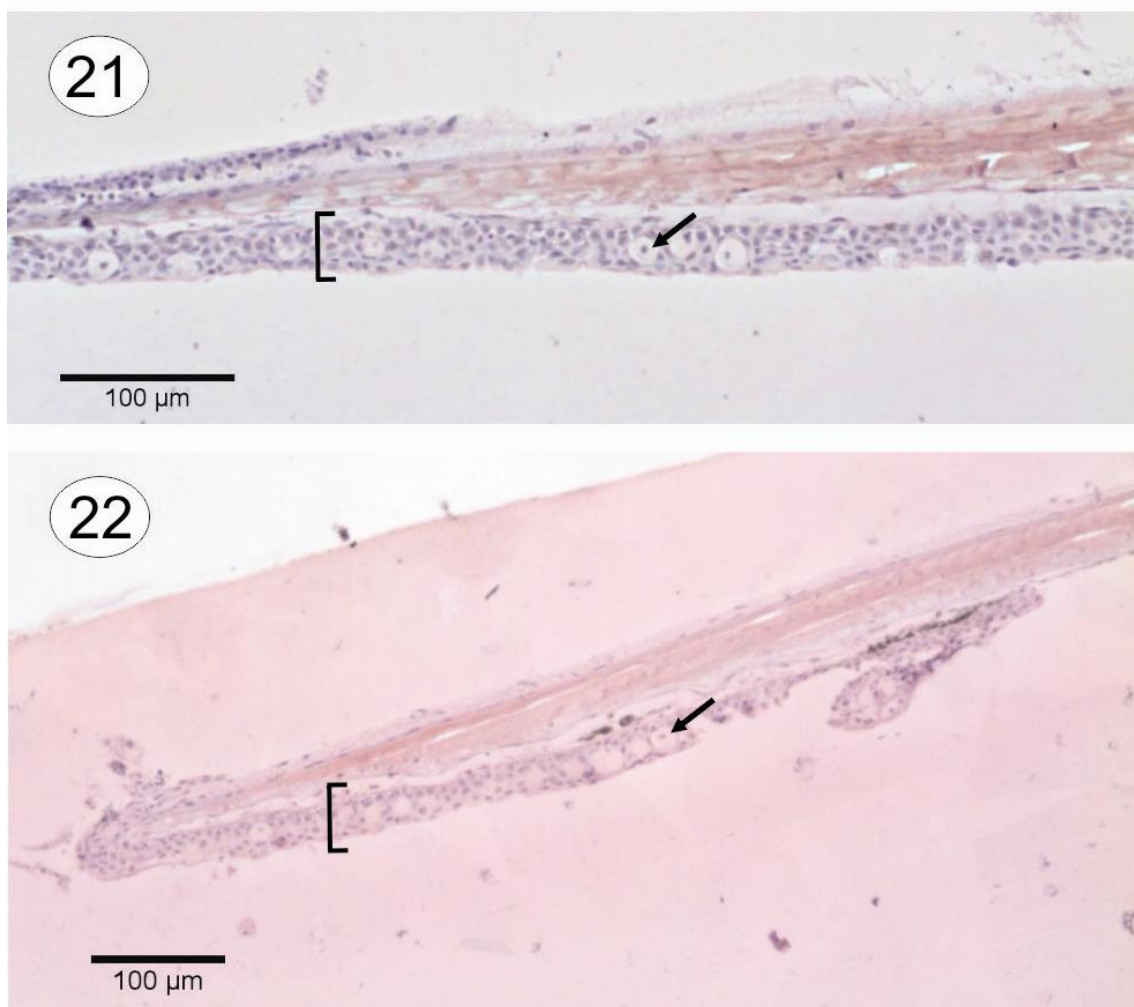
15. Escama do tempo 0 submetida à técnica de H.E., vista da porção distal. Note o epitélio bastante delgado desta porção tanto na face superior (seta), quanto na face inferior (cabeça de seta). **16.** Escama do tempo 0 submetida à técnica de H.E., vista da porção proximal. Note o epitélio mais espesso, de células cúbicas na face superior (seta) e o epitélio mais delgado na face inferior (cabeça de seta).



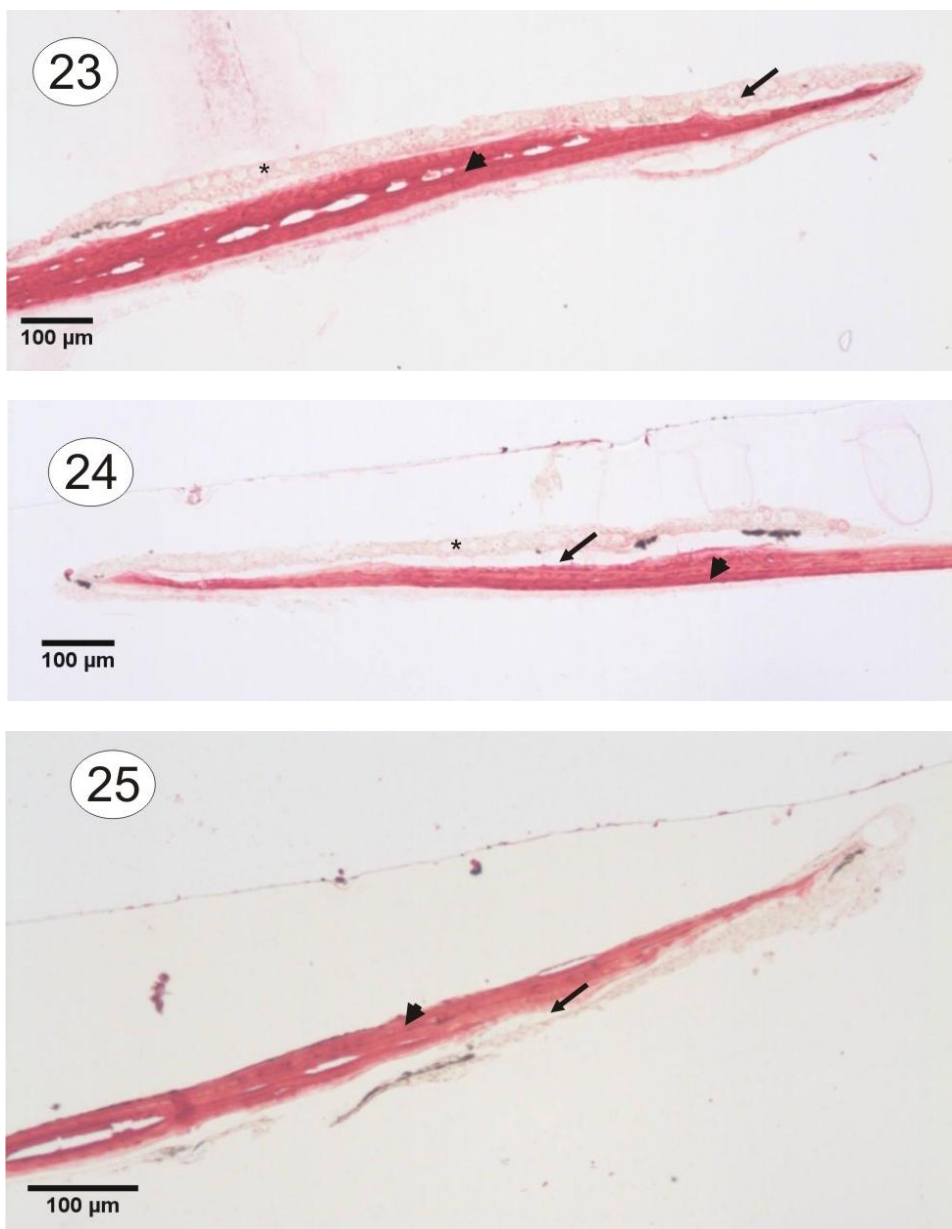
17. Escama do grupo Controle e tempo de exposição 1, submetida à técnica de H.E. Note a espessura maior do epitélio inferior (chave) e a presença de células club (seta). **18.** Escama do grupo detergente do tempo de exposição 1 submetidas à técnica de H.E. Note a espessura pouco maior do epitélio superior (chave) e a presença de mais células club (seta).



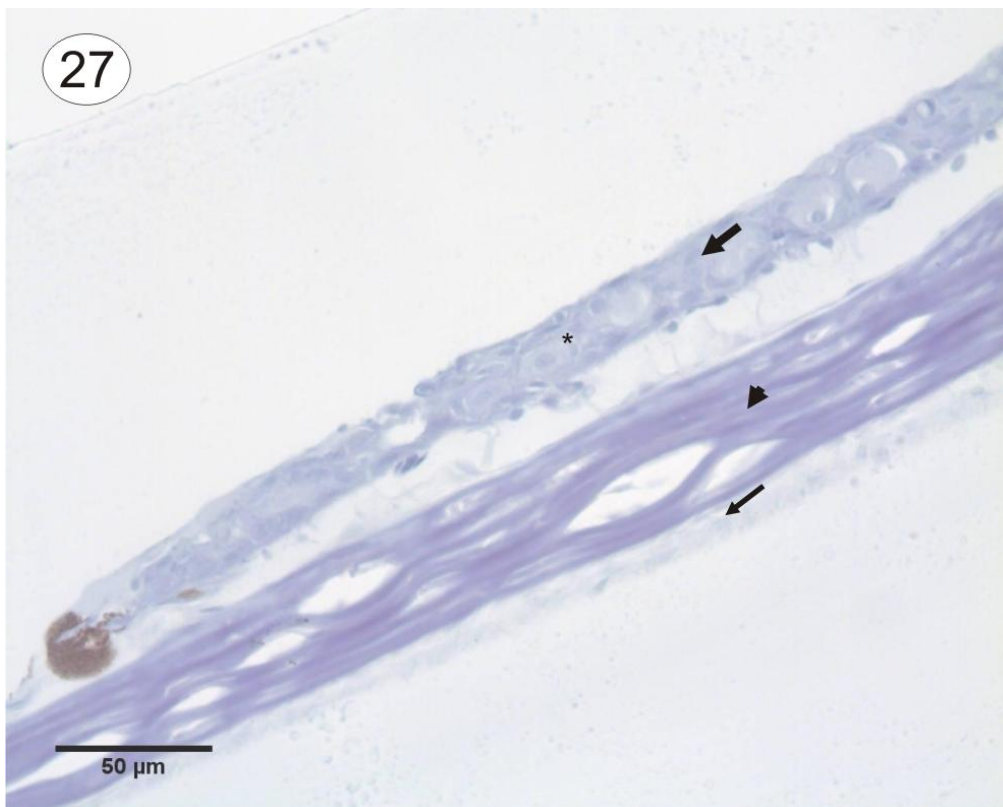
19. Escamas do grupo Lago Azul do tempo de exposição 1 submetidas à técnica de H.E. Note a grande espessura do epitélio superior (chave) e maior espessura do epitélio inferior (seta grossa), bem como o grande número de células club (seta fina). **20.** Escama do tempo de exposição 2 do grupo Controle, submetida à técnica de H.E. Note a espessura ligeiramente maior do epitélio superior (chave) e a presença de poucas células club (seta).



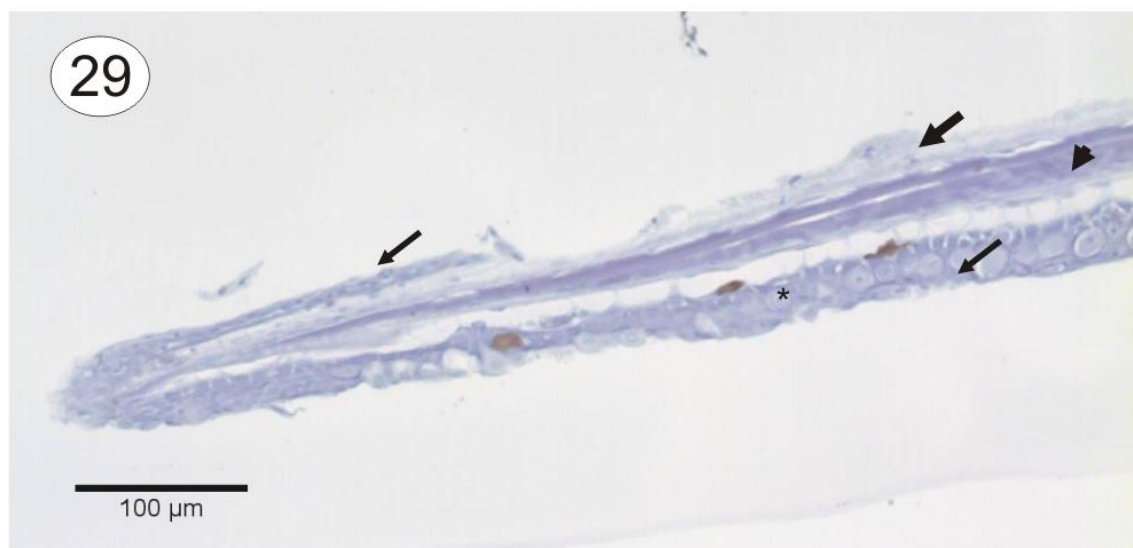
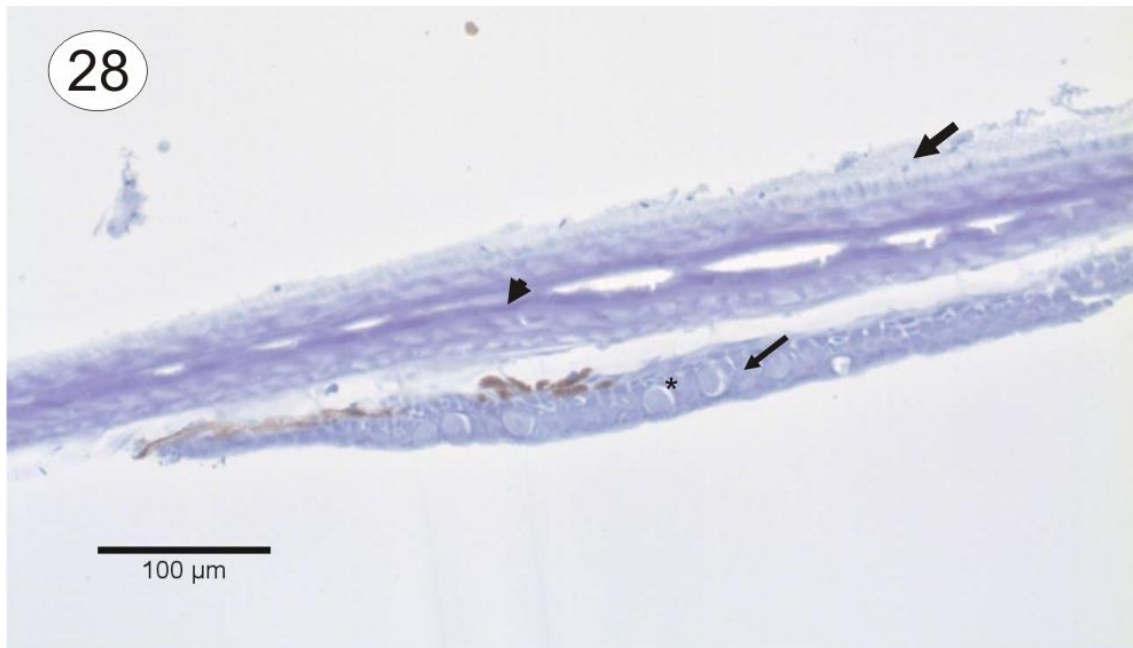
21. Escamas do tempo de exposição 2 do grupo Detergente submetidas à técnica de H.E. **22.** Escamas do tempo de exposição 2 do grupo Lago Azul submetidas à técnica de H.E. Em ambas as fotos, note a maior espessura do epitélio superior (chave) e maior número de células club (seta).



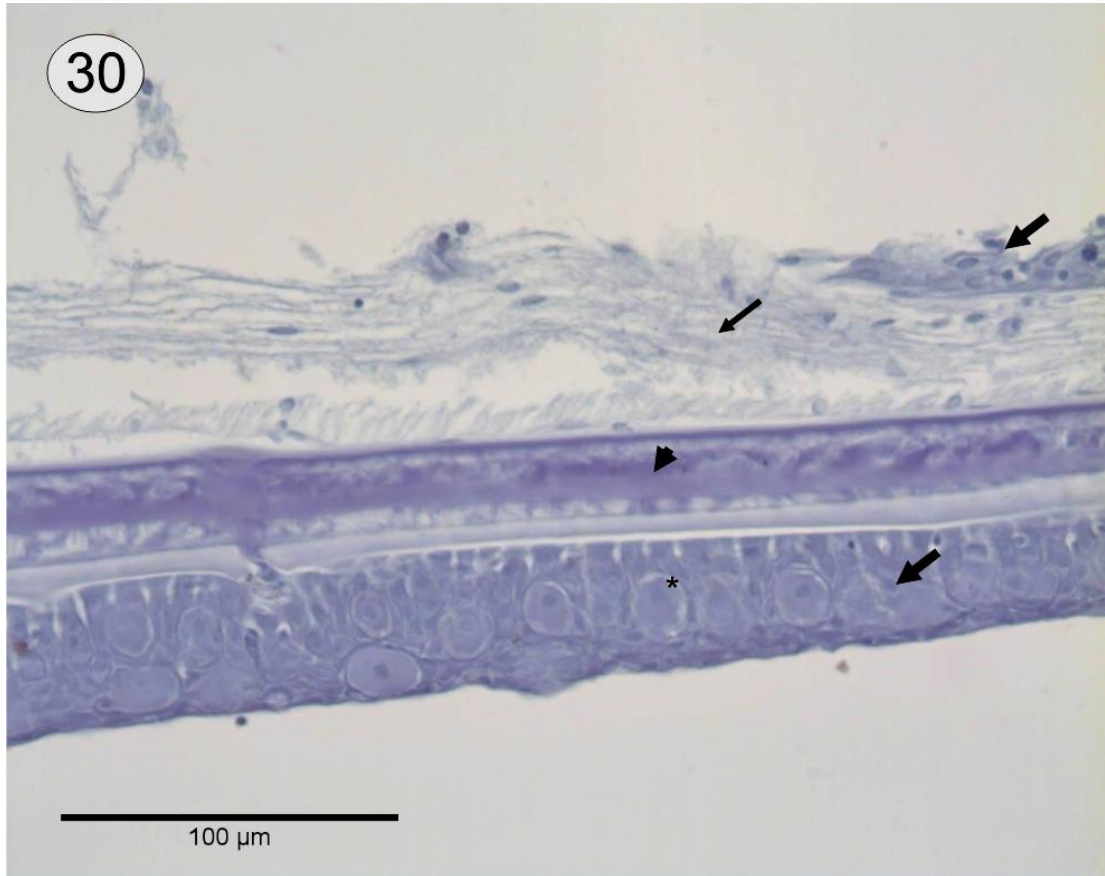
23. Escama do tempo de exposição 2 do grupo Controle submetidas à técnica de Picrossirus Red. Note a marcação forte na região da placa basal e camada externa (cabeça de seta), e a ausência de marcação na região da camada limitante (seta). **24.** Escama do tempo de exposição 2 do grupo Detergente submetidas à técnica de Picrossirus Red. **25.** Escama do tempo de exposição 2 do grupo Lago Azul submetidas à técnica de Picrossirus Red. Nas duas últimas fotos, note a mesma intensidade de marcação na região da placa basal e camada externa (cabeça de seta) e ausência de marcação na camada limitante (seta). Célula club (*).



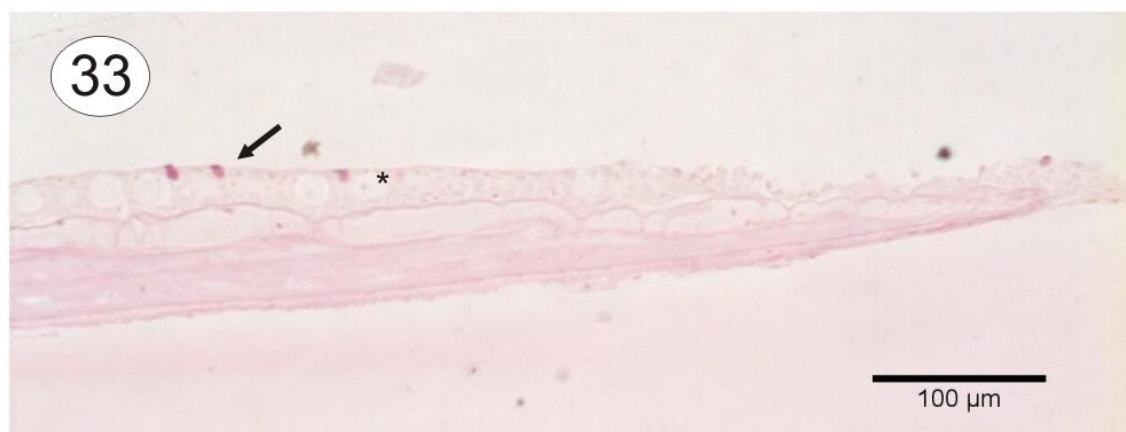
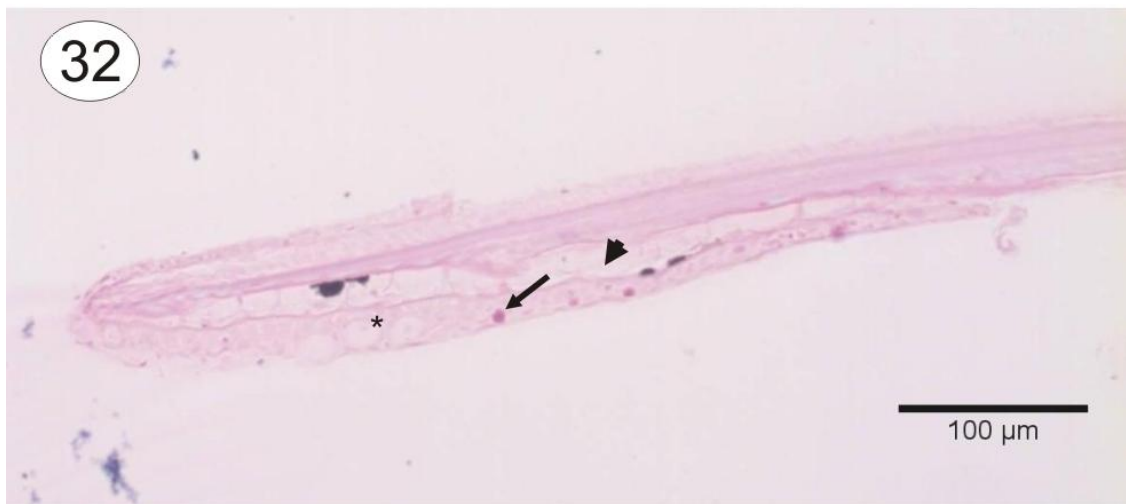
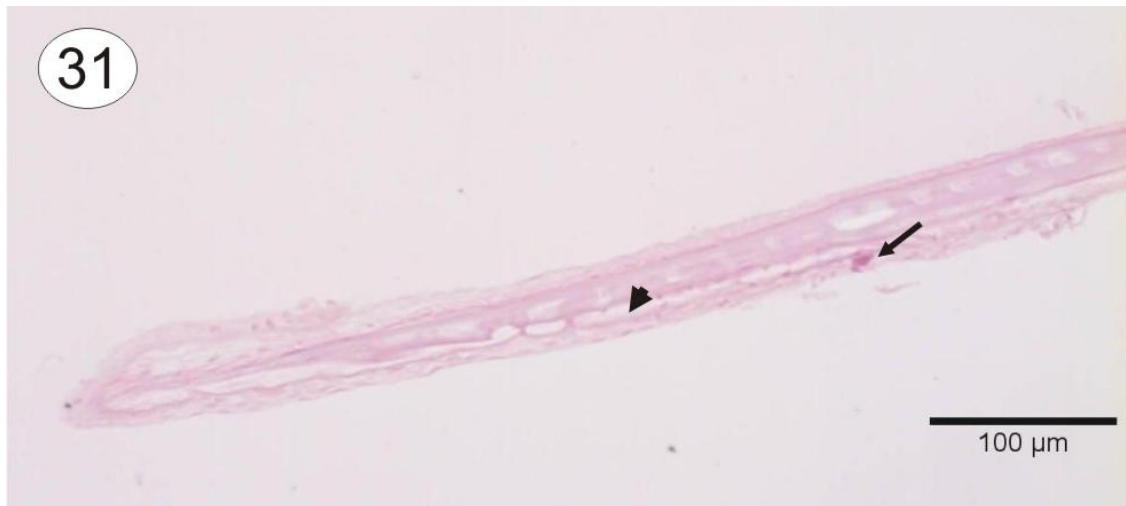
26. Escama do tempo de exposição 0 submetida à técnica de Azul de Bromofenol. Note a intensidade de marcação mais forte nas faixas colagênicas (cabeça de seta) e a intensidade de marcação mais fraca e equivalente na porção diferenciada do epitélio inferior (seta grossa) e em sua porção indiferenciada (seta fina). **27.** Escamas do grupo Controle e tempo de exposição 1 submetidas à técnica de Azul de Bromofenol. Note a marcação sempre mais intensa nas faixas de colágeno (cabeça de seta), a marcação progressivamente mais intensa no epitélio superior entre os tempos de experimento (seta grossa) e a marcação sempre menos intensa na porção indiferenciada do epitélio inferior (seta fina). Célula club (*).



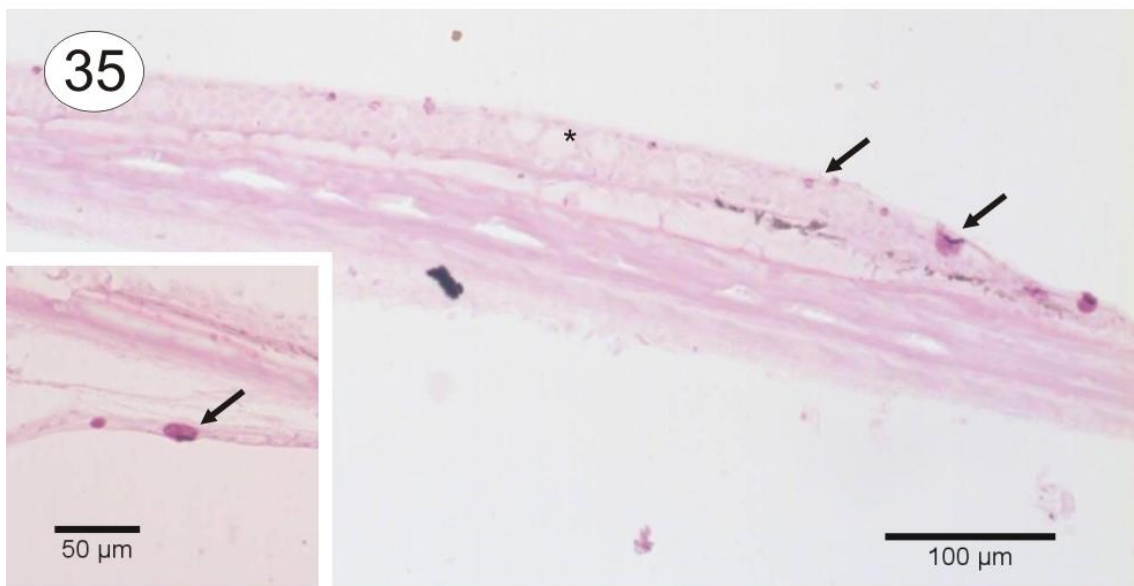
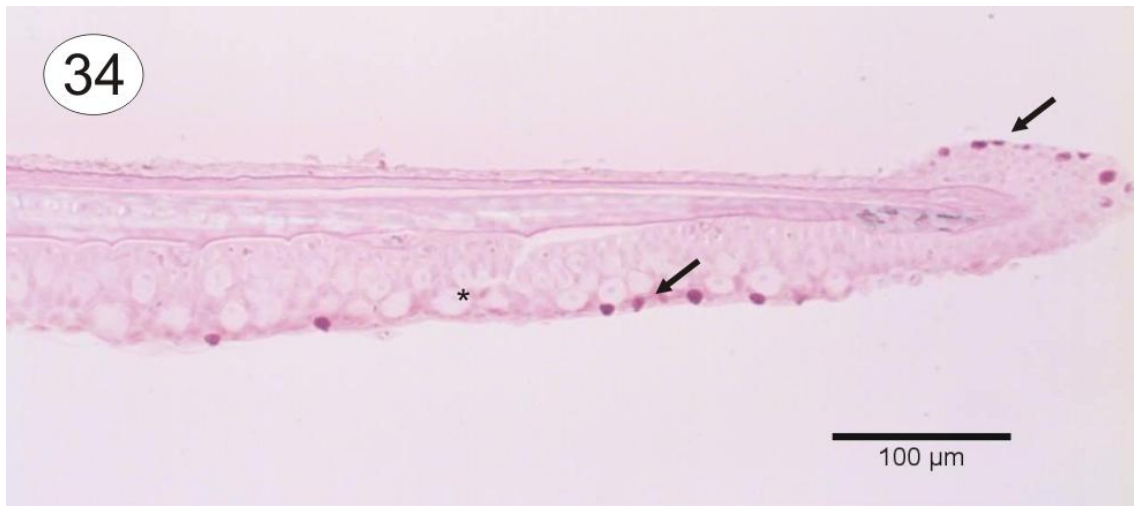
28. Escamas do grupo Controle e tempo de exposição 2 submetidas à técnica de Azul de Bromofenol. Note que o padrão do tempo de exposição 1 permanece, com a marcação sempre mais intensa nas faixas de colágeno (cabeça de seta), a marcação progressivamente mais intensa no epitélio superior entre os tempos de experimento (seta grossa) e a marcação sempre menos intensa na porção indiferenciada do epitélio inferior (seta fina). **29.** Escamas do tempo de exposição 1 e grupo Detergente submetidas à técnica de Azul de Bromofenol. Note a marcação sempre mais intensa na região das faixas de colágeno (cabeça de seta), a marcação menos intensa e equivalente nos epitélios superior e inferior (seta grossa) e a marcação mais fraca da escama na porção indiferenciada do epitélio inferior (seta fina). Célula club (*).



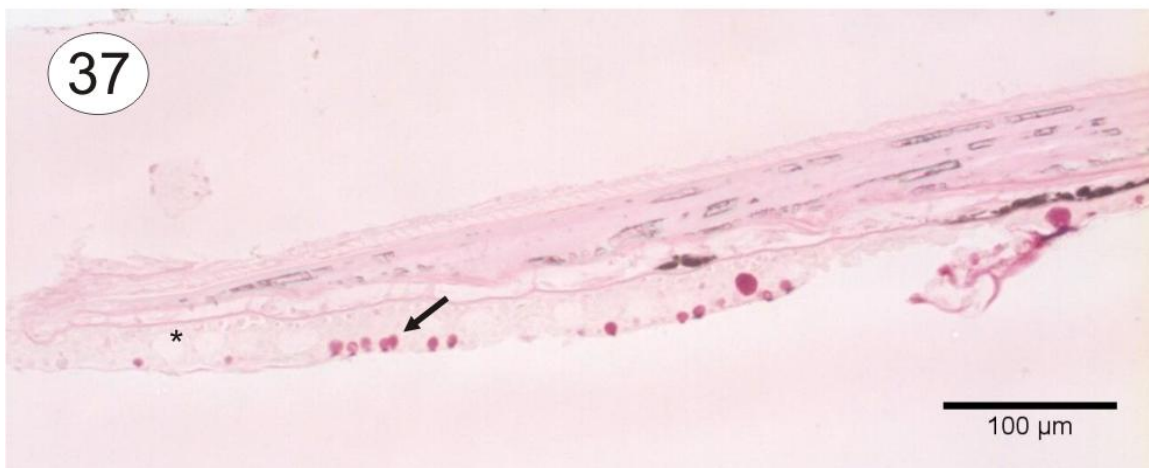
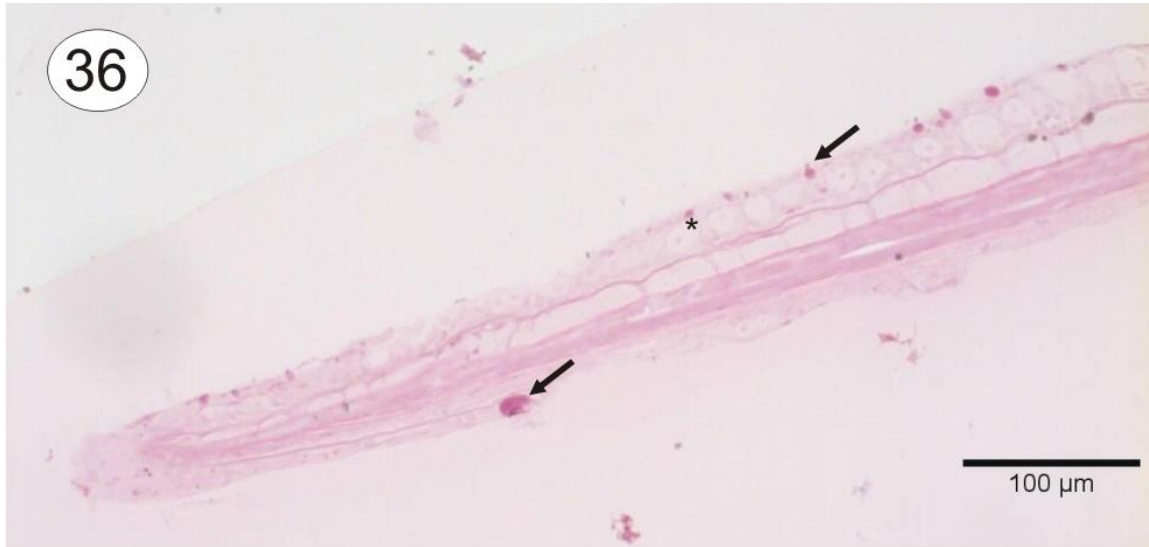
30. Escamas do tempo de exposição 2 e grupo Lago Azul submetidas à técnica de Azul de Bromofenol. Note que o padrão permanece igual ao do grupo Detergente, com a marcação sempre mais intensa na região das faixas de colágeno (cabeça de seta), a marcação menos intensa e equivalente nos epitélios superior e inferior (seta grossa) e a marcação mais fraca da escama na porção indiferenciada do epitélio inferior (seta fina). Célula club (*).



31. Escama do tempo de exposição 0 submetida à técnica de PAS. Note a camada limitante sem marcação (cabeça de seta) e a quantidade muito reduzida de marcações no epitélio (seta fina). **32.** Escama do tempo de exposição 1 d do grupo Controle submetida à técnica de PAS. Note a ausência de marcação na camada limitante (cabeça de seta) e o ligeiro aumento na quantidade de marcações no epitélio (seta). **33.** Escamas do tempo de exposição 1 do grupo Detergente submetidas à técnica de PAS. Note o aumento progressivo na quantidade de marcações no epitélio, seu acúmulo no epitélio superior, mas presença também no epitélio inferior e na dobra do epitélio (seta). Célula club (*).



34. Escamas do tempo de exposição 1 do grupo Lago Azul submetidas à técnica de PAS. Note que o aumento progressivo na quantidade de marcações continua neste tempo de exposição no epitélio, seu acúmulo no epitélio superior, mas presença também no epitélio inferior e na dobra do epitélio (seta). **35.** Escama do tempo de exposição 2 do grupo Controle, submetida à técnica de PAS. Note o pequeno número de marcações no epitélio superior (seta) e também no epitélio inferior (detalhe – seta). Célula club (*).



36. Escamas do tempo de exposição 2 do grupo Detergente submetidas à técnica de PAS. **37.** Escamas do tempo de exposição 2 do grupo Lago Azul submetidas à técnica de PAS. Nestas fotos, note o aumento progressivo das marcações no epitélio superior, que eventualmente aparecem no epitélio inferior (seta). Célula club (*).

5 – DISCUSSÃO:

Alguns autores (ABRAHAM *et al.*, 2001; FUJIMOTO *et al.*, 2008; KOUMANS & SIRE, 1996; LANGER *et al.*, 2004; LYNG *et al.*, 2004; MOSS, 1972; NOLAN *et al.*, 2002; SIRE *et al.*, 1997; SOUZA & SANTOS, 1997; WATERMAN, 2005) descrevem a organização da epiderme ou mesmo do epitélio de escamas de outras espécies, sendo o padrão entre estas bastante regular.

Alguns autores trabalharam com os efeitos de agentes poluentes sobre a epiderme de diversas espécies de peixes (ABRAHAM *et al.*, 2001; IGER *et al.*, 1994; FUJIMOTO *et al.*, 2008; LANGER *et al.*, 2004; LYNG *et al.*, 2004), entretanto não se verifica atenção voltada ao epitélio da escama na literatura revisada.

5.1 – Discussão dos dados da descrição do epitélio:

De acordo com Waterman (2005), as células que rodeiam a periferia da escama de *Brachydanio rerio* são contínuas com duas camadas de células abaixo da superfície ventral e duas camadas que se estendem a uma distância variável na superfície dorsal. Essas duas camadas de células parecem correspondentes ao epitélio aqui observado, contudo o autor não faz referência ao epitélio até a porção final da escama recobrando-a totalmente. Segundo o mesmo autor, o papel dessas células na formação das escamas ainda é discutido e necessita de mais investigação. Faz diferença é que na espécie aqui estudada o epitélio recobre toda a escama.

Segundo Fujimoto *et al.* (2008), a epiderme de pacus jovens (*Piaractus mesopotamicus*) é composta por epitélio estratificado pavimentoso com três camadas de células. Isto concorda com o que se pode observar no epitélio superior da escama de *P. lineatus*. Ainda segundo esses autores, as três camadas são: camada basal, camada intermediária com células arredondadas e a camada externa.

Apesar de o epitélio da pele de pacu se assemelhar ao epitélio da escama de curimatá por ser estratificado e com três camadas, a morfologia celular da camada basal é diferente entre as duas espécies. Enquanto as células da camada basal em curimatá são de apenas um tipo, todas de citoplasma escuro e núcleo central, as células da camada basal da pele de pacu são de dois tipos: uma com citoplasma claro e núcleo central denominada célula clava e outra com citoplasma róseo e núcleo apical (FUJIMOTO *et al.*, 2008).

Já em relação à composição da camada intermediária, a mesma é similar entre as duas espécies, pois são formadas de célula arredondadas e de núcleo central tanto no pacu (FUJIMOTO *et al.*, 2008), quanto no curimatá. A porção superficial do epitélio também é semelhante entre as duas espécies, sendo composta de células pavimentosas. Essa camada superficial do epitélio em pacu apresenta também células caliciformes. Foram encontradas células produtoras de muco na camada superficial do epitélio de escama em curimatá, que devem corresponder às células caliciformes observadas em pacu. No entanto, a presença dessas foi pouco expressiva e não podemos afirmar que sejam do tipo caliciforme, devido às variações de forma e tamanho encontradas em *P. lineatus*, que não condizem com o padrão de uma célula caliciforme.

Segundo Koumans & Sire (1996), escamas ainda em desenvolvimento (3 dias de desenvolvimento) do ciclídeo *Hemichromis bimaculatus* apresentam epitélio apenas na superfície externa, no entanto, após 10 dias de desenvolvimento as mesmas apresentam crescimento devido ao surgimento de uma dobra epitelial na extremidade posterior que se configura como um epitélio bem diferenciado com múltiplas camadas na face externa e como um epitélio indiferenciado de duas camadas na superfície interna.

Tal configuração é semelhante ao observado nas escamas em *P. lineatus*, nas quais o epitélio superior é claramente diferenciado e estratificado e o epitélio inferior é dividido em duas camadas, sendo a mais superior, indiferenciada. Entretanto, é importante lembrar que este epitélio inferior, bastante delgado, é voltado para a face interna da escama, o que pode explicar sua constituição fina.

Segundo Langer *et al.* (2004), a epiderme de *Mugil platanus* é formada por um pequeno número de células, de duas a cinco camadas, como o observado no epitélio superior em *P. lineatus*. Ainda segundo este autor, junto à porção da escama inserida na epiderme observa-se um pouco de conjuntivo frouxo e tecido muscular, o que explica o acúmulo de conjuntivo frouxo que pode ser observado na região de inserção da escama em *P. lineatus*.

Nolan *et al.* (2002), descreveu o crescimento de uma cultura de pele de truta (*Oncorhynchus mykiss*), que passa de células epiteliais achatadas e células mucosas migratórias para uma estrutura de múltiplas camadas de células grandes pavimentosas, de núcleo pequeno, permeadas por células diferenciadas, tais como células mucosas. Esse tipo de configuração é consistente com o observado no epitélio superior da escama de curimatá, onde a camada superficial era composta por células pavimentosas.

Na camada superficial do epitélio da escama também foi observado um padrão de descamação, que na verdade deve corresponder a um processo de renovação celular do epitélio.

Segundo Souza & Santos (1997), a epiderme de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) é formada por tecido epitelial pavimentoso estratificado pouco espesso, com células da camada basal de forma cilíndrica e células mucosas, semelhante ao epitélio observado em *P. lineatus*. As células epiteliais são deslocadas da camada basal e gradualmente passam para pavimentosa à medida que se aproximam da superfície, como também ocorre em *P. lineatus*.

Ainda segundo este autor, o número de células mucosas observado foi reduzido, o que concorda com diversos outros autores, bem como com o verificado para a espécie aqui estudada. Segundo Storer (2007), o muco produzido na epiderme facilita a movimentação na água e é uma proteção contra a entrada de organismos causadores de doenças e também contra lesões, o que pode explicar a presença do muco sobre a superfície da escama.

De fato, a função secretora é predominante dentre as funções que a epiderme pode exercer, e as secreções mucosas são produzidas por diferentes tipos de células epiteliais, particularmente aquelas situadas na camada superficial (ZACCONE *et al.*, 2001).

Segundo Moss (1972), cromatóforos podem ser encontrados subjacentes à epiderme em peixes. Os cromatóforos em *Mugil platanus* são observados abaixo das escamas, após uma camada de conjuntivo denso junto à melanina (LANGER *et al.*, 2004), enquanto em *P. lineatus* foi possível encontrar cromatóforos no próprio epitélio da escama na sua porção mais profunda. Segundo este mesmo autor, os cromatóforos na pele da tainha dão a cor escura aos indivíduos jovens, assim o mesmo deve acontecer para conferir a coloração clara das escamas de *P. lineatus*.

Segundo Zaccone *et al.* (2001), a epiderme é um tecido com múltiplas funções, apesar de a função secretora ser dominante e glândulas unicelulares específicas são as células club, consideradas células epidérmicas secretórias características de diversas ordens de peixe e provavelmente multifuncionais. Dentre as funções que lhe foram atribuídas na literatura, verifica-se a produção de ferormônios liberados em resposta a agentes tóxicos (PFEIFFER, 1977; SMITH *apud* ZACCONE *et al.*, 2001) e agentes antipatogênicos (AL-HASSAN *et al. apud* ZACCONE *et al.*, 2001).

A presença das células club no epitélio da escama de curimatá assemelha-se ao observado para outras espécies de teleósteos, pois a mesma é arredondada, de núcleo central e não apresenta reação aos reagentes de rotina

(BART & PAGE, 1991; BERRA *et al.*, 1989; FLAXMAN, 1972; HALBGEWACHS *et al.*, 2009; KOUMANS & SIRE, 1995; MCCORMICK & LARSON, 2007; STABELL & VEGUSDAL, 2010; STRUSSMAN *et al.*, 1994; ZACCONE *et al.*, 2001)

e também concorda com o exposto anteriormente, pois foram encontradas em resposta à exposição à contaminantes, sendo que de fato, como o epitélio da escama encontra-se em constante contato com o ambiente externo (SOUZA & SANTOS, 1997), a presença de células produtoras de substâncias de alarme se faz entender.

Quanto ao colágeno, segundo Moss (1972), um padrão de feixes de colágeno é visto na epiderme de elasmobrânquios, com intersecções diagonais formando um padrão regular, como o observado em *P. lineatus*.

Segundo Sire & Akimenko (2004), a estrutura da escama elasmóide foi descrita em diversas espécies pertencentes à linha dos actinoptergianos e sarcoptergianos. Em todas essas espécies as escamas eram compostas de três camadas da região mais inferior à mais superior: a placa basal - uma camada grossa de tecido incompletamente mineralizado composto de elasmodina, que consiste em uma série de fibrilas de colágeno organizadas em uma estrutura semelhante a madeira compensada (MEUNIER *apud* SIRE & AKIMENKO, 2004; SCHULTZE *apud* SIRE & AKIMENKO, 2004); a camada externa – uma camada fina de tecido bem mineralizado composto de uma rede de fibrilas de colágeno entrelaçadas; e a camada limitante – que consiste em tecido hiper-mineralizado desprovido de fibrilas de colágeno e depositado na escama na superfície da escama, na região próxima da epiderme.

Na escama de *P. lineatus* a placa basal e camada externa não puderam ser diferenciadas uma da outra claramente, entretanto, a estrutura semelhante a madeira compensada descrita em outras espécies (MEUNIER *apud* SIRE & AKIMENKO, 2004; SCHULTZE *apud* SIRE & AKIMENKO, 2004) também foi observada. Já a camada limitante pôde ser diferenciada entremeando o epitélio superior e as faixas de colágeno, entretanto a reação para colágeno verificada nesta área foi atípica.

Segundo Sire *et al.* (1997) e Sire & Akimenko (2004), a estrutura e organização da camada limitante é a mais variável entre as espécies. Como a estrutura e organização desta camada variam, talvez a composição da mesma também varie na espécie estudada.

Em relação ao conteúdo protéico, a marcação para proteínas foi mais evidente nas faixas colagênicas da escama do que no epitélio que a recobre, o que pode ser explicado pela presença do colágeno, que segundo Nagai *et al.* (2002), é a proteína predominante em corpos vivos.

Resumidamente, o que se observa é que a escama é totalmente recoberta por epitélio, estratificado na face superior e mais simples na face inferior. Sempre mais espesso na porção proximal da escama. O epitélio superior se apóia na camada limitante e o interior da escama é formado por uma matriz colagênica correspondente às placas basal e camada externa (MEUNIER *apud* SIRE & AKIMENKO, 2004; SCHULTZE *apud* SIRE & AKIMENKO, 2004). Percebe-se a presença de uma camada indiferenciada de descamação e tipos celulares diferenciados, como cromatóforos que conferem cor à pele dos peixes (LANGER *et al.*, 2004), e *células club*, supostamente responsáveis pela liberação de substâncias de resposta (PFEIFFER, 1977; SMITH *apud* ZACCONE *et al.*, 2001). O padrão é semelhante ao pouco que se apresenta na literatura, mas é importante ressaltar que devido à redução na espessura do epitélio na porção distal da escama, seja a razão de alguns autores definam que as escamas são apenas parcialmente recobertas por epitélio (SIRE & AKIMENKO, 2004).

5.2 - Discussão dos dados da exposição a ambientes contaminados:

Apenas alguns autores trabalharam com o efeito de contaminantes na pele de espécies de peixes a nível histológico (FUJIMOTO *et al.*, 2008; LANGER *et al.*, 2004; LYNG *et al.*, 2004), sendo a maioria de estudos ultraestruturais.

As duas principais alterações verificadas na organização e composição do epitélio quanto à histologia das escamas em função da exposição aos contaminantes no presente estudo foram o aumento na espessura do epitélio e o aumento do número das células club.

O aumento na espessura do epitélio foi verificado de maneira crescente entre os grupos Controle, provavelmente devido ao próprio desenvolvimento da escama. Entretanto, o aumento na espessura do epitélio verificado entre os grupos Controle e Detergente e Controle e Lago Azul para todos os tempos de exposição e crescentemente, pode ser compreendido de outra forma.

Segundo Mallat (1985), a fusão lamelar e hiperplasia em brânquias são exemplos de alterações que resultam no aumento da distância entre o meio externo e a corrente sanguínea, servindo de barreira para a entrada de contaminantes e consequentemente reduzindo a ação destes contaminantes. Assim, a hiperplasia no epitélio das escamas, entendida no aumento de sua espessura, pode ser um mecanismo de defesa contra contaminantes.

De fato, Lyng *et al.* (2004) verificaram aumento na proliferação de células epiteliais de truta em cultura submetida a radiação ionizante, entretanto alto número de células

necróticas (alta taxa de necrose) fez com que o crescimento da cultura permanecesse perto do normal.

Por outro lado, Langer *et al.*, 2004 observou que o tecido epitelial na epiderme de tainha praticamente desapareceu ao invés de sofrer engrossamento como observado no presente estudo, sendo possível observar-se apenas um tecido amorfo como resultado da ação de bactérias gram negativas.

Em relação ao tempo de exposição aos contaminantes no presente estudo, o aumento na espessura do epitélio foi maior não quanto maior foi o tempo de exposição, mas em um tempo intermediário (segunda coleta – 7 dias), entretanto não são encontrados estudos sobre epitélio na literatura que corroborem estes resultados. Adaptação para resistência a contaminantes em peixes é comum e estudada por outros autores (WIRGIN & WALDMAN, 2004), e é uma possibilidade que a diminuição na espessura do epitélio após a segunda coleta seja o reflexo da adaptação dos peixes e resistência aos contaminantes presentes na água. Isto tanto para os indivíduos do grupo Detergente, quanto para os indivíduos do Lago Azul.

Entretanto, houve diferença entre os dois grupos supracitados, de devem ser ocasionadas pela natureza do contaminante a que os peixes foram expostos, sendo que o Lago Azul deve conter mais contaminantes que a diluição de detergente.

A existência das células club já foi relacionada à presença de substâncias de alarme em espécies de ostariofisianos, nas quais se observa tais células e também é verificada a presença de reação comportamental de alarme (PFEIFFER, 1977). Já outros autores associam a presença dessas células à liberação de substâncias de alarme de tal maneira que servem como indicadores da presença de predadores (BROWN *apud* HALBGEWACHS, 2001) e há aqueles que a associaram ao sistema imune de peixes (HALBGEWACHS, 2001). Portanto o aumento na quantidade de células club observado no presente estudo pode ser uma reação aos poluentes presentes, o que configura um indicador de contaminação ambiental.

Tanto isso que a densidade de células club na epiderme de peixes é estudada quanto à possibilidade de seu uso como indicador de populações de predadores (STABELL & VEGUSDAL, 2010). Desta maneira, é reforçado que o aumento de células club observado no epitélio da escama de curimatá seja uma reação aos contaminantes presentes, tanto na diluição de detergentes quanto na exposição à água do Lago Azul.

O aumento das células club foi progressivo durante o experimento, de maneira que este tipo de resposta ao contaminante parece ser condicional em relação ao tempo de exposição. Também a quantidade de células club encontradas no epitélio de indivíduos do grupo Detergente e Lago Azul diferiu, o que reforça a idéia de que a água do Lago Azul deva

conter contaminantes mais agressivos que a diluição de detergentes e que as células club realmente possuem função de combate a contaminantes e/ou antígenos.

Quanto às alterações histoquímicas verificadas, a principal consistiu no aumento do muco sobre o epitélio da escama, gradativamente entre os tempos de exposição e entre os grupos Detergente e Lago Azul, respectivamente.

Segundo Zaccone *et al.* (2001), a exposição a detergentes, pesticidas, cádmio, chumbo, cobre e água ácida ou água do mar causa aumento na produção de muco com mudanças na composição química do muco ou alterações na capacidade deste muco em se ligar à superfície da pele. Desta maneira, o aumento na quantidade de muco verificado no epitélio das escamas também pode ser compreendido como resposta à presença de contaminantes, no caso os detergentes como Zaccone *et al.* (2001) postula, e também no caso daqueles que devem ser presentes na água do Lago Azul.

De maneira semelhante, Fujimoto *et al.* (2008) verificou que o número de células caliciformes marcadas pela técnica de PAS aumentou na pele de pacus tratados com cromo. Ou seja, corrobora que o aumento de muco produzido no epitélio das escamas de curimatá no presente estudo também pode ser uma reação aos poluentes presentes, o que configura outro indicador de contaminação ambiental.

Quanto ao colágeno na escama, o mesmo está disposto em dois dos três principais tecidos que a compõem segundo Sire & Akimenko (2004), sendo estes a placa basal e a camada externa. O terceiro tecido - a camada limitante - segundo o mesmo autor é desprovido de colágeno. No estudo aqui presente, os indivíduos amostrados durante o experimento também não apresentaram marcação para colágeno na camada limitante, diferente do observado durante sua descrição neste mesmo trabalho e consistente com a literatura.

Segundo Sire & Akimenko (2004), durante o desenvolvimento da escama, esses três tecidos são depositados em uma sequência invariável: primeiro a camada externa, que permite extensão em diâmetro; seguida da placa basal, que permite extensão em espessura; e finalmente a camada limitante, que melhora a proteção da escama e sua ancoragem à epiderme.

Em vista do exposto, aumento na camada limitante poderia ser observado quando da exposição a poluentes, entretanto o mesmo não foi verificado no presente estudo. Mas é importante lembrar que este colágeno presente na escama é aí depositado antes do desenvolvimento e mineralização da mesma (SIRE & AKIMENKO, 2004), de forma que o espessamento é de fato, improvável.

Quanto à composição protéica, o aumento observado no conteúdo protéico entre os tempos de coleta parece ser explicado apenas pelo próprio desenvolvimento da escama, uma vez que à medida que o epitélio cresce, o nível de expressão gênica deve aumentar e, consequentemente, a quantidade de proteínas resultantes deste padrão de expressão.

6 – CONCLUSÕES:

O epitélio da escama de curimbatá, apesar de algumas diferenças em relação a outras espécies, segue o mesmo padrão verificado na literatura. A partir do obtido no presente estudo percebe-se que a análise do epitélio da escama de *Prochilodus lineatus* pode constituir um método confiável para detectar os efeitos tóxicos de agentes contaminantes. As variações nos resultados da histologia e histoquímica, que no geral apontam respostas mais severas nos espécimes expostos à água do Lago Azul apontam que apenas a concentração testada do detergente provavelmente não atua como contaminante no Lago, indicando que a concentração do mesmo no Lago deve ser maior ou que existam outros contaminantes diluídos nestas águas.

7 - REFERÊNCIAS:

ABRAHAM, M. Y.; IGER, Y. ZHANG, L. Fine structure of the skin cells of a stenohaline freshwater fish *Cyprinus carpio* exposed to diluted seawater. **Tissue & Cell**, vol. 33, nº 1, p. 46-54, 2001.

ALBERTS, B; JOHNSON, A.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WALTER, P. (2002). **Biologia molecular da célula**. 5ª Edição. Porto Alegre: Artmed, 2010. 1268 p.

ALLINGER, N. L.; CAVA, M. P.; JONGH, D. C. de; JOHNSON, C.R.; LEBEL, N. A.; STEVENS, C. L. (1978). **Química orgânica**. 2ª Edição. Rio de Janeiro: LTC, 1978. 961 p.

BART, H. L.; PAGE, L. M. Morphology and adaptive significance of fin knobs in egg-clustering darters. **Copeia**, vol. 1991, nº 1, p. 80-86, 1991.

BEHMER. O.A.; RODRIGUES, C.J.; TOLOSA, E.M.C. de; NETO, A. G. de F. **Manual de técnicas para histologia normal e patológica**. 2ª Edição. Barueri, SP: Manole, 2003. 331p.

BERRA, T. M.; SEVER, D. M.; ALLEN, G. R. Gross and histological morphology of the swimbladder and lack of accessory respiratory structures in *Lepidogalaxias salamandroides*, an aestivating fish from western Australia. **Copeia**, vol. 1989, nº 4, p. 850-856, 1989.

BRITSKI, H.S. Peixes de água doce do Estado de São Paulo - Sistemática. In: **Poluição e piscicultura**. São Paulo: Faculdade de Saúde Pública e Instituto de Pesca, CPRN - Secretaria de Agricultura, p.79-108, 1972.

BRITSKI, H. A.; SATO, Y.; ROSA, A. B. S. **Manual de identificação de peixes da região de Três Marias: (com chaves de identificação para os peixes da bacia do São Francisco)**. Brasília: CODEVASF, 1988.

CAMARGO, M. M. P.; MARTINEZ, C. B. R.. Histopathology of gills, kidney and liver of a Neotropical fish caged in an urban stream. **Neotropical Ichthyology**, vol. 3, nº 5, p. 327-336, 2007.

CASTRO, R. M. C.; CASATTI, L.; SANTOS, H. F.; MELO, A. L. A.; MARTINS, L. S. F.; FERREIRA, K. M.; GIBRAN, F. Z.; BENINE, R. C.; CARVALHO, M.; RIBEIRO, A. C.; ABREU, T. X.; BOCKMANN, F. A.; PELIÇÃO, G. Z.; STOPIGLIA, R.; LANGEANI, F. Estrutura e composição da ictiofauna de riachos da bacia do Rio Grande no Estado de São Paulo, sudeste do Brasil. **Biota Neotropica**, vol. 4, nº 1, p 1- 39, 2004.

DOMINGUES, W. M.; HAYASHI, C. Estudo experimental sobre anéis diários em escamas nas fases iniciais do desenvolvimento do curimba, *Prochilodus lineatus* (VALENCIENES, 1836) (Characiformes, Prochilodontidae). **Revista Brasileira de Biologia**, vol. 58, nº 5, p. 609-617, 1998.

FLAXMAN, B. A. Cell differentiation and its control in the vertebrate epidermis. **American Zoologist**, vol. 12, nº 1, p. 13-25, 1972.

FUJIMOTO, R. Y.; CRUZ, C.; MORAES, F. R. Análise de efluente e histologia da pele, fígado e rim de pacus (*Piaractus mesopotamicus*) suplementados com cromo trivalente. **Boletim do Instituto de Pesca**, vol. 34, nº 1, p.117- 124, 2008.

GODOY, M.P. **Peixes do Brasil. Subordem Characidae**. São Paulo: Editora Franciscana, vol. 4, p. 847, 1975.

GOULART, M.; CALISTO, M. Bioindicadores de qualidade de água como ferramenta em estudos de impacto ambiental. **Revista da FAPAM**, ano 2, nº 1.

GRIZZLE, J. M.; THIYAGARAJAH, A. Skin histology of *Rivulus ocellatus marmoratuai*: Apparent adaptation for aerial respiration. **Copeia**, vol. 1987, nº 1, p. 237-240, 1987.

HALBGEWACHS, C. F.; MARCHANT, T. A.; KUSCH, R. C.; CHIVERS, D. P. Epidermal club cells and the innate immune system of minnows. **Biological Journal of the Linnean Society**, vol. 98, p. 891-897, 2009.

IGER, Y.; LOCK, R. A. C.; JENNER, H. A.; WENDELAAR BONGA, S. E. Cellular responses in the skin of carp (*Cyprinus carpio*) exposed to copper. **Aquatic Toxicology**, v. 29, p. 49 – 64, 1994.

JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. **Histologia Básica**. 11ª edição. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S.A., 2008. 524 p.

KOUMANS, J. T. M; SIRE, J. Y. An in vitro, serum-free organ culture technique for the study of development and growth of the dermal skeleton in fish. **In Vitro Cellular & Developmental Biology – Animal**, vol. 32, p. 612-626, 1996.

LANGER, S. L.; VARGAS, V. M. F.; FLORES-LOPES, F.; MALABARBA, L. R. Alterações histopatológicas na epiderme de *Mugil platanus* (Perciformes: Mugilidae) como resultado da ação de bactérias encontradas no rio Tramandaí, Tramandaí, RS. In: I CONGRESSO INTERAMERICANO DE SAÚDE AMBIENTAL, 1, 2004, Porto Alegre. *Resumos...* Porto Alegre: Associação Brasileira de Engenharia Sanitária – Sessão Rio Grande do Sul, 2004, p. 20.

LANGIANO, V. C; MARTINEZ, C. B. R. Toxicity and effects of a glyphosate-based herbicide on the Neotropical fish *Prochilodus lineatus*. **Comparative Biochemistry and Physiology**, part C 147, p. 222-231, 2008.

LYNG, F. M.; LYONS-ALCANTARA, M. OLWELL, P.; NÍ SHUILLEABHÁIN, S.; SEYMOUR, C.; COTTEL, D. C.; MOTHERSILL, C. Ionizing radiation induces a stress response in primary cultures of rainbow trout skin. **Radiation Research**, vol. 162, nº 2, p. 226-232, 2004).

MADUENHO, L. P.; MENDES, J. P.; MARTINEZ, C. B. R. Efeitos agudos do inseticida dimilin em parâmetros histológicos do peixe *Prochilodus lineatus*. In: CONGRESSO DE ECOLOGIA DO BRASIL, 8, 2007. Caxambu. *Anais...* Caxambu, 2007, p. 1-2.

MALLAT, J. **Fish gill structural changes induced by toxicants and others irritants: A statistical review**. Canadian Journal of Fish and Aquatic Sciences, vol. 42, p. 630-648, 1985.

MARTINEZ, C. B. R.; SOUZA, M. M. Acute effects of nitrite on ion regulation in two neotropical fish species. **Comparative Biochemistry and Physiology**, vol. 113A, nº 1, p. 151- 160, 2002.

MARTINEZ, C. B. R.; NAGAE, M. Y.; ZAIA, D. A. M. Acute morphological and physiological effects of lead in the neotropical fish *Prochilodus lineatus*. **Brazilian Journal of Biology**, vol. 64, p. 797-807, 2004.

MAURO, C. A. de. **Rio Claro – O lançamento “in natura” de esgotos em corpos d’água. In: Curso de extensão universitária: vamos conhecer Rio Claro**. Laboratório de Planejamento Municipal – LPM, DEPLAN – IGCE/UNESP, Rio Claro, p. 67- 86, 1993.

MCCORMICK, M. I.; LARSON, J. K. Effect of hunger on the response to, and the production of, chemical alarm cues in a coral reef fish. **Animal Behaviour**, vol. 75, p. 1973-1980, 2008.

MOSS, M. L. The vertebrate dermis and the integumental skeleton. **American Zoologist**, v. 12, nº 1 p. 27 – 34, 1972.

NAGAI, T.; ARAKI, Y.; SUZUKI, N. Collagen of the skin of ocellate puffer fish (*Takifugu rubripes*). **Food Chemistry**, v. 78, p. 173 – 177, 2002.

NOLAN, D. T.; NABBEN, I.; LI, J.; WNDLAAR BONGA, S. E. Characterization of primary culture of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) skin explants: Growth, cell composition, proliferation, and apoptosis. **In Vitro Cellular & Developmental Biology – Animal**, vol. 38, nº 1, p. 14-24, 2002.

ORR, R. T. (1908). **Biologia dos Vertebrados**. 5ª Edição. São Paulo: Livraria Roca Ltda., 1986. 508p.

PANFILI, J.; DE PONTUAL, H.; TROADEC, H.; WRIGHT, P. J. **Manual of fish sclerochronology**. Brest, France. Ifremer-IRD coedition, 464 p.

PAULETE, J.; BEÇAK, W. **Técnicas de Citologia e Histologia**. 2 Vols. São Paulo: Livros Técnicos e Científicos, 1976. 469p.

PEARSE, A. G. E. **Histochemistry: Theoretical and Applied**. 4ª Edição. Edinburgh, London, Melbourne and New York: Churchill Livingstone, 1985. 1055p.

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

PFEIFFER, W. Distribution of fright reaction and alarm substance cells in fishes. **Copeia**, v. 1977, n. 4, p. 653 – 665, 1977.

POWERS, D. A. Fish as model systems. **Science**, Washington, v. 246, n. 4928, p. 352-358, 1989.

REYNOLDS, E. S. The use of lead citrate as high Ph electron-opaque stain in electron microscopy. **Journal of cell Biology**, vol. 17 p.208-212. 1963.

REIS, R. E.; KULLANDER, S. O.; FERRARIS, C. J. **Check list of the freshwater fishes of South and Central America**. Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul. Museu de Ciências e Tecnologia. Porto Alegre: EDIPUCRS, 2003.

SANTANA, L. M. B. M. **Biomarcadores histopatológicos para o monitoramento ambiental da bacia do ribeirão Jacutinga (Londrina, PR)**. 2004. 67 F. Monografia (Bacharel em Ciências Biológicas) – Instituto de Biociências, Universidade Estadual de Londrina, Paraná. 2004.

SIRE, J. Y.; AKIMENKO, M. A. Scale development in fish: a review, with description of sonic hedgehog (shh) expression in the zebrafish (*Danio rerio*). **International Journal of Developmental Biology**, v. 48, p. 233 – 247, 2004.

SIRE, J. Y.; ALLIZARD, F.; BABIAR, O.; BOURGUIGNON, J.; QUILHAC, A. Scale development in zebrafish (*Danio rerio*). **Journal of Anatomy**, vol. 190, p. 545-561, 1997.

SILVA, A. G.; MARTINEZ, C. B. R. Morphological changes in the kidney of a fish living in an urban stream. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, vol. 23, nº 2, p. 185- 192, 2007.

SIMONATO, J. D.; GUEDES, C. L. B.; MARTINEZ, C. B. R. Biochemical, physiological, and histological changes in the neotropical fish *Prochilodus lineatus* exposed to diesel oil. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, vol. 69, Janeiro 2008, p.112-120.

SOUZA, M. L. R.; DOURADO, D. M.; MACHADO, S. D.; BUCCINI, D. F.; JARDIM, M. I. A.; MATIAS, R.; CORREIA, C.; FERREIRA, I. C. Análise da Pele de Três Espécies de Peixes: Histologia, Morfometria e Testes de Resistência. **Revista Brasileira de Zootecnia**, vol. 32, nº 6, p. 1551- 1559, 2003a.

SOUZA, M. L. R.; GANECO, L. N.; NAKAGHI, L. S. O.; FARIA, R. H. S.; WAGNER, P. M.; POVH, J. A.; FERREIRA, I. C. Histologia da pele de pacu (*Piaractus mesopotamicus*) e testes de resistência de couro. **Acta Scientiarum. Animal Sciences**, vol. 25, nº 1, p. 37- 44, 2003b.

SOUZA, M. L. R.; GODOY, L. C.; KOZUKI, H. T.; CASACA J. M.; DOURADO, D. M.; JACINTO, M. A. C. Histologia da pele da carpa prateada (*Hypophthalmichthys molitrix*) e testes de resistência do couro. **Revista Brasileira de Zootecnia**, vol. 35, nº 4, p. 1265- 1272, 2006.

SOUZA, M. L. R.; SANTOS, H. S. L. Análise morfológica da pele da tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) através da microscopia de luz. **Revista UNIMAR**, vol. 31, nº 3, p. 881- 888, 1997.

STABELL, O. B.; VEGUSDAL, A. Socializing makes thick-skinned individuals: on the density of epidermal alarm substance cells in cyprinid fish, the crucian carp (*Carassius carassius*). **Journal of Comparative Physiology**, vol. 196, p. 639-647, 2010.

STORER, T. I.; USINGER, R. L.; STEBBINS, R. C.; NYBAKKEN, J. W. (1979). **Zoologia Geral**. 6ª Edição. São Paulo: Companhia Editora Nacional, 2007. 816 p.

STRUSSMANN, C. A.; NIN, F.; TAKASHIMA, F. Microscale variation in epidermal thickness, distribution and size of mucus and alarm substance cells in the skin of juvenile fancy carp (*Cyprinus carpio*). **Copeia**, vol. 1994, nº 4, p. 956-961.

TANAKA, P. R. **O papel das tilápias (*Oreochromis niloticus*) no ciclo do fósforo no Lago Azul (Rio Claro – SP)**. 2001. 40 f. Monografia (Bacharel em Ecologia) - Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, campus de Rio Claro. São Paulo. 2001.

WATERMAN, R. E. Fine structure of scale development in the teleost, *Brachydanio rerio*. **The anatomical record**, vol. 168, nº 3, 1970, p. 361-379.

WIRGIN, I. WALDMAN, J. R. Resistance to contaminants in north American fish populations. **Mutation Research/ Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, v. 552, n. 1-2, p. 73 – 100, 2004.

WINKALER, E. U.; SILVA, A. G. S.; GALINDO, H. C.; MARTINEZ, C. B. R. Biomarcadores histológicos e fisiológicos para o monitoramento da saúde de peixes de ribeirões de Londrina, Estado do Paraná. **Acta Scientiarum**, vol. 23, nº 2, p. 507- 514, 2001.

YUAN, E. C.; CAMPANA, M. Scale development of *Prochilodus lineatus* (Val.) (Pisces, Curimatidae) juveniles from the Paraná River. **Revue d'Hydrobiologie Tropicale**, vol. 26, nº 4, p. 327-332, 1998.

ZACCONE, G.; KAPOOR, B. G.; FASULO, S.; AINIS, L. Structural, histochemical and functional aspects of the epidermis of fishes. **Advances in marine biology**, vol. 40, p. 255-348, 2001.