

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
PRÓ REITORIA DE PESQUISA E PÓS- GRADUAÇÃO
DEPARTAMENTO DE APOIO À PESQUISA
PROGRAMA INSTITUCIONAL DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA

MORFOLOGIA BRANQUIAL DO TUCUNARÉ (*CICHLA* spp.)
SOB INFLUÊNCIA DA UHE DE BALBINA (AMAZONAS): UMA
AVALIAÇÃO ESTEREOLÓGICA

BOLSISTA: Paloma Fernandes de Souza, CNPq

Manaus

2012

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
PRÓ REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
DEPARTAMENTO DE APOIO À PESQUISA
PROGRAMA INSTITUCIONAL DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA

MORFOLOGIA BRANQUIAL DO TUCUNARÉ (*CICHLA* spp.)
SOB INFLUÊNCIA DA UHE DE BALBINA (AMAZONAS): UMA
AVALIAÇÃO ESTEREOLÓGICA

RELATÓRIO FINAL - PIB-B/0043/2011

Bolsista: Paloma Fernandes de Souza, CNPq

Orientador: Prof. Dr. Oscar Tadeu Ferreira da Costa

Co-orientador: Prof. Dr. Wallice Luiz Paxiúba Duncan

MANAUS

2012

Resumo

O impacto ambiental consequente da construção de uma barragem fluvial pode atingir todos os níveis biológicos. A hidrelétrica de Balbina é um dos exemplos de projetos que acabam por afetar profundamente a ictiofauna local, logo após sua construção ocorreu uma incrível mortandade de peixes, o que aconteceu provavelmente por causa da água anóxica, e envenenada com gás sulfídrico proveniente da decomposição da matéria orgânica da floresta alagada. A qualidade da água mudou entre os dois ambientes: à jusante da barragem, a água é mais rica em cálcio e sólidos totais em suspensão do que no reservatório (à montante) da UHE de Balbina, entre outras diferenças. O perfil do metabolismo energético é diferente entre os exemplares coletados nos dois ambientes. O sistema branquial, nos peixes, é responsável por várias atividades fisiológicas e algumas situações necessitam de adaptações fisiológicas e morfológicas. As brânquias são cobertas por camadas delgadas de tecidos altamente vascularizados que facilitam as trocas gasosas e iônicas entre o tecido limitante externo em contato com o meio ambiente, e o sangue. As brânquias são tão efetivas em trocas gasosas por possuírem um meio externo, uma massa tissular de espessura finita e área superficial compatível com a demanda metabólica do animal e um sistema vascular eficiente e estruturalmente dotado de capacidade para suportar a diferença de pressão dos gases entre os dois meios. Por isso são interessantes bioindicadores das alterações bruscas no meio em que o animal vive. Através da estereologia, método bioestatístico sofisticado para inferência de medidas como volume, área superficial e espessura da barreira de troca gasosa, foi possível medir as alterações nas brânquias de tucunaré mediante as condições da hidrelétrica. Foram coletados animais à jusante e à montante da UHE de Balbina, sendo que as duas populações apresentam diferenças significativas quanto à distribuição quantitativa de seus componentes branquiais, essas diferenças podem ser uma resposta adaptativa às novas condições da água, nos animais coletados à jusante os resultados apresentaram perfil de maior eficiência de troca gasosa, provavelmente por estarem em condições mais turbulentas e/ou diferentes condições físico-químicas da água.

Sumário

1.INTRODUÇÃO.....	5
2.OBJETIVOS.....	7
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	7
4.RESULTADOS.....	13
5.DISSCUSSÃO.....	21
6.REFERÊNCIAS.....	26

1. INTRODUÇÃO

Desde antes da construção da Usina Hidrelétrica de Balbina já eram conhecidos os sérios problemas técnicos, ambientais e socioeconômicos da construção de uma usina naquela região. A produção energética já em 1983 se mostrava abaixo do esperado. O plano inicial já previa que uma imensa área de floresta seria inundada. A área alagada era constituída de 98% de floresta primária, o que tornou o lago cheio de árvores mortas, aumentando a concentração de matéria orgânica em decomposição. A decomposição da matéria orgânica produz gás sulfídrico (H_2S) no fundo do lago, como a água que move as turbinas vem do fundo do lago, a água que é despejada à jusante possui baixo teor de oxigênio dissolvido e forte cheiro de H_2S . Ambientes anóxicos provocam grande mortandade de peixes. O gás sulfídrico modifica o pH do meio e é extremamente tóxico para espécies pouco tolerantes. Foram realizados estudos prévios dos impactos ambientais para estimar a relação custo/benefício para a população, porem, há carência de informações quanto aos efeitos pós-construção de barragens do ponto de vista orgânico da interação organismo-ambiente em peixes que habitam estes ambientes.

Na UHE de Tucuruí, a mudança do ecossistema lótico em lêntico implicou em profundas mudanças nas características físico-químicas da água. Sabemos que as mudanças bruscas na composição química da água provocam profundos efeitos sobre os processos morfológicos, fisiológicos e bioquímicos dos peixes da Amazônia (COSTA, 2001). Embora que, muitos outros mecanismos biológicos ainda sejam desconhecidos, e essa mudança repentina do ambiente (lótico para lêntico) afetou negativamente a distribuição de algumas espécies de peixes, e por outro lado, sucesso adaptativo para espécies predadoras, como é o caso do tucunaré (*Cichla* spp.). O tucunaré é um ativo predador, o que o torna interessante para a pesca esportiva por seu perfil rústico e difícil

captura, traços que provavelmente são sustentados por uma alta taxa metabólica e por elevada área superficial respiratória, com fina espessura da barreira de troca água-sangue.

Em peixes, as brânquias são responsáveis por processos fisiológicos de extrema importância, como a troca de gases respiratórios e o equilíbrio iônico (RANDALL et al., 1997; PERRY, 1997; EVANS et al., 2005). O que a torna um interessante bioindicador dos efeitos das alterações bruscas no meio ambiente. Com base nisso, discutiremos como a modificação no meio, decorrentes do represamento do rio, que causaram modificações no sistema branquial, para se adaptar a nova condição metabólica do animal. As brânquias dos peixes são reconhecidamente um órgão altamente evoluído e efetivo para as trocas gasosas. O princípio básico que determina tal função é simples: um meio externo, uma massa tissular de espessura finita e área superficial compatível com a demanda metabólica do animal e um sistema vascular eficiente e estruturalmente dotado de capacidade para suportar a diferença de pressão dos gases entre os dois meios (ver revisão por MAINA, 2004).

O compromisso osmorrespiratório permite que os peixes apresentem uma plasticidade da estrutura branquial, classificada pelos autores em alterações reversíveis e alterações irreversíveis. Um exemplo de alteração irreversível é a que ocorre em *A. gigas* na transição da respiração aquática para a respiração aérea, e um exemplo de alteração reversível é o desenvolvimento de lamelas para otimizar as trocas gasosas ou o aumento da barreira de difusão. Através da estereologia é possível a quantificação dessas mudanças que ocorrem nas brânquias, este projeto se propõe a analisar morfologicamente peixes nas atuais condições da UHE de Balbina.

2. OBJETIVOS

2.1 Geral

Executar um estudo sobre a eficiência do sistema de troca iônica, capacidades de troca gasosa no sistema respiratório branquial de *Cichla* spp. coletadas a montante e a jusante da barragem da UHE de Balbina. O conjunto dessas informações poderá fornecer subsídios para a melhor compreender os impactos causados à biota aquática pela intervenção humana através da construção da hidrelétrica.

2.2 Específicos

- i) Aplicar modernas técnicas estereológicas para a determinação do volume total, área superficial, relação superfície-volume, espessura da barreira de troca gasosa, capacidade de difusão morfométrica e fator de difusão anatômico em brânquias de *Cichla* spp.;
- ii) Comparar as diferenças anatômicas e morfométricas encontradas em exemplares coletados a montante e a jusante da UHE de Balbina.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Coleta das amostras de tecido

Os peixes (n=10 para montante e n=5 para jusante) de cada local de coleta foram capturados com o uso de instrumentos convencionais de pesca (anzol, curríco, malhadeira ou zagaia) e anestesiados (MS-222 tamponado). Imediatamente os animais foram sacrificados através de contusão na região cefálica. Após esta etapa, todos os animais foram pesados e medidos (comprimento total) antes da coleta dos tecidos.

As brânquias (um lado completo) foram coletadas e fixadas *in situ* por imersão em solução de glutaraldeído 2,5% + solução tampão de fosfato de Na⁺ (pH 7,8; osmolaridade, aproximadamente 300mOsmol). Os arcos branquiais foram analisados no Laboratório de Citologia do ICB/UFAM.

Em cada local de coleta foram analisados os parâmetros físico-químicos da água através de multiparâmetro HI991300 Hanna Instruments, com medidas de pH, EC, TDS, temperatura e concentração de oxigênio dissolvido.

3.2 Estereologia de brânquias (microscopia óptica)

Os procedimentos de amostragem e orientação dos tecidos foram planejados para combinar o Princípio de Cavalieri para a determinação do volume de referência (MICHEL & CRUZ-ORIVE, 1988) com o método de seccionamento vertical para a determinação de área superficial (BADDELEY et al., 1986; COSTA et al., 2001). Os quatro arcos branquiais de um lado foram dissecados e os rastros e os ossos epibranquiais e ceratobranquiais foram removidos. As porções dos elementos epi- e ceratobranquial foram separadas e posteriormente seccionadas ao meio, produzindo assim três amostras de cada arco branquial. As amostras foram desidratadas em concentrações crescentes de etanol e emblocadas em hidroxietil-metacrilato (Technovit 7100, Külzer-Heraeus, Alemanha) seguindo o procedimento abaixo:

1) As amostras foram numeradas e dispostas sobre uma mesa com o lado opercular voltado para baixo (isto definiu o plano horizontal). Números ao acaso foram usados para definir a seqüência inicial. Os planos verticais foram todos os planos perpendiculares ao plano horizontal.

2) Cada porção de brânquia foi rodada seqüencialmente de um mínimo de 0° a um máximo de 90° relativo ao eixo do plano vertical, de acordo com o método de amostragem sistemática e ao acaso (GUNDERSEN & JENSEN, 1987).

De cada peixe, o ponto inicial foi escolhido ao acaso entre 0°-15° de uma orientação inicial e em seguida 15° foi adicionado para cada amostra de brânquia. Três amostras foram incluídas por bloco, uma sobre a outra à temperatura ambiente durante o processo de polimerização. Assim, todos os arcos de um lado de um peixe foram incluídos em um bloco em que cada amostra representou diferentes orientações ao acaso. Os blocos foram seccionados com espessura de 3µm e corados com PAS (periodic acid Schiff reaction; KIERNAN, 1990) e azul de toluidina 0,5%.

3.2.1 Determinação do volume de referência de acordo com o princípio de Cavalieri

Após a remoção dos blocos, uma marca na resina serviu como orientação do plano vertical (VUR sections) (BADDELEY et al., 1986). Com a ajuda de um estereomicroscópio Olympus SZ40 equipado com uma lente micrometrada o comprimento total projetado (L_t) do tecido dentro dos quatro blocos foi medido perpendicularmente ao plano do seccionamento, isto é, na direção em que o bloco avançou durante a microtomia. Assim, $L_t = \text{SOMA } L_1+L_2+L_3+L_4$. L_t foi dividido pelo número de seções desejadas (N_s). Neste estudo, o número de dez seções por brânquias foi estabelecido como satisfatório.

O volume do tecido branquial foi determinado usando um microscópio Olympus BX-41 conectado com uma câmara-clara (Olympus U-DA) e posicionado sobre um negatoscópio onde sistemas teste de contagem contendo pontos e arcos ciclóides serviram como parâmetros de determinação (PERRY, 1978). O volume de referência (V_t) dos filamentos e lamela secundária juntos foi calculado pela contagem de pontos

(HOWARD & REED, 1998) como $V_t = \sum_{i=1}^n P_i(a/p) * T_s$, onde $p \sum_{i=1}^n P_i$ é o número total de pontos sobre os tecidos do filamento e da lamela secundária, a/p é a área representada por cada ponto e T_s é a distância entre as seções sequenciais (HOWARD & REED, 1998). Um coeficiente de erro de 5% e desvio de 15% foram considerados aceitáveis (GUNDERSEN & JENSEN, 1987).

3.2.2 Determinação dos volumes diferencias (relativos)

Os volumes dos diferentes componentes branquiais (filamento, lamela, epitélio, sistema de células pilares) foram determinados por contagem de pontos empregando as mesmas seções usadas para determinação do volume segundo Cavalieri, mas em aumento maior (1050 X). Um sistema teste para seções verticais com uma relação contendo arcos ciclóides e pontos foi empregado.

3.2.3 Determinação da área superficial da espessura da barreira de difusão: seções verticais

A área superficial (S) foi estimada em conjunto com a determinação dos volumes diferenciais. A área superficial dos filamentos e da lamela secundária foi estimada de suas respectivas relações superfície-volume (S_V), determinadas a partir das interseções das superfícies branquiais com os arcos ciclóides de comprimento conhecido multiplicado pelo volume de cada componente (filamento e lamela secundária), de acordo com BADDELEY *et al.* (1986). O valor de S_V de filamento e lamela secundária foi calculado como $S_V = 2I/L$, onde I é o número de interseções das linhas teste com a superfície e L é o comprimento total das linhas teste.

A espessura da barreira de difusão água-sangue foi estimada no maior aumento. Um sistema de linhas paralelas será sobreposto ao sistema teste estereológico, o ângulo de inclinação dessas linhas é variável escolhido ao acaso usando dados de 10 lados. As distâncias (l_i) foram medidas usando-se uma régua semi-logarítmica (PERRY, 1981), construída de modo que a porção mais acurada (linear) da régua correspondesse com o máximo de frequência das medidas. A média harmônica da espessura da barreira (WEIBEL & KNIGHT, 1964) foi calculada para cada animal como $\tau_h = 2/3 l_h$, onde l_h é a média harmônica dos comprimentos medidos ao microscópio, corrigidos em relação ao aumento.

3.2.4 Superfícies respiratórias e não-respiratórias

Os pontos de interseção foram classificados em três categorias: 1) aqueles coincidindo com superfícies respiratórias (S_R), 2) aqueles coincidindo com superfícies não-respiratória (S_{NR}) e 3) aqueles em que a natureza respiratória e não-respiratória da superfície não pode ser determinada (S_{NA}). A porcentagem de área superficial que será considerada respiratória (% S_R) será calculada como:

$$\%S_R = \frac{I_R}{I_R + I_{NR}} * 100$$

Onde I_R é a soma de todas as interseções que tocam superfícies respiratórias e I_{NR} é a soma de todas as interseções que tocam superfícies não-respiratórias.

3.2.5 Fator de difusão anatômico e capacidade de difusão morfométrica

O fator de difusão anatômico (FDA) (PERRY, 1978) foi calculado como a área superficial respiratória em relação à massa corporal (S_R/M_B) dividido pela média harmônica da espessura da barreira (τ_h). A capacidade de difusão morfométrica (D) foi calculada como o produto da ADF e o coeficiente de difusão de Krogh (K) da camada tissular respectiva corrigido para 25 °C (WEIBEL & KNIGHT, 1979).

3.2.6 Estimativa da constante de difusão de Krogh (K)

Os valores de K para os gases respiratórios no tecido epitelial são aproximadamente duas vezes daqueles para o tecido conjuntivo. Portanto o volume relativo das células epiteliais será estimado separadamente daqueles das células pilares e membrana basal associada. O valor obtido por cada tecido será multiplicado pelo valor de K apropriado. Essa relação numérica proporcional produzirá valores de K para o oxigênio (K_{O_2}) no tecido branquial. O mesmo procedimento será realizado para o K_{CO_2} .

3.3 ESTATÍSTICA

Os dados estereológicos obtidos através da microscopia de luz foram avaliados para cada tratamento e o estimador da variância foi determinado usando o coeficiente de erro (C.E.) para cada parâmetro. A precisão da estimativa do volume de referência segundo Cavalieri foi determinada de acordo com Cruz-Orive (1993) e Howard & Reed (2005):

$$CE(\sum P) = \frac{\sqrt{\text{var } P}}{\sum P}$$

A $\text{var } P$ depende do “noise” (acurácia do sistema teste) e a variância da soma das áreas ($\text{var}_{\Sigma \text{area}}$): $\text{var } P = \text{noise} + \text{var}_{\Sigma \text{area}}$ (Gundersen & Jensen, 1987; Howard & Reed 2005). O “noise” indica o quanto a estimativa poderia mudar se o sistema teste fosse disposto de

modo diferente. A variância da área é uma função do número de seções e é calculada baseada na análise de covariograma dos dados sobre as áreas transversais (Howard & Reed, 2005).

O *CE* da relação superfície-volume (S_v) foi estimada de acordo com Howard &

Reed (2005) usando a equação:
$$S_v = \frac{2 \cdot \sum_{i=1}^n l_i}{l/p \cdot \sum_{i=1}^n P_i}$$

Onde n é o número de campos usados para a estimativa da densidade de superfície, l_i é o número de interseções entre as linhas teste e interfaces, P_i é o número de pontos que tocam o espaço de referência, l/p é o comprimento da linha teste por ponto.

Como o desvio padrão da média harmônica da barreira de difusão não é definido, o estimador da variância da espessura da barreira foi dado como SD e CE da média aritmética do comprimento dos interceptos.

Os resultados são apresentados como média \pm erro padrão da média, E. P. M. Diferença estatisticamente significativa entre os tratamentos foi detectada por meio de análise de variância one-way ANOVA seguida pelo t-teste de múltiplas comparações de Bonferroni. Diferença significativa foi considerada quando $P < 0,05$.

3.4 Parâmetros físico-químicos da água

Em cada local de coleta (montante e jusante), foram realizadas três amostragens dos parâmetros físico-químicos. As amostras foram retiradas sempre na mesma profundidade (0,5 m) e em pontos distantes entre si para evitar pseudo-réplicas espaciais. Os parâmetros estudados foram: pH, temperatura ($^{\circ}\text{C}$), oxigênio dissolvido ([mg/l]), sólido total em suspensão (TDS, mg/l), condutividade ($\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$) e potencial

redox (mV). Todos os parâmetros acima foram determinados por meio de sondas específicas acopladas a um analisador multiparâmetro portátil CONSORT C535, exceto os teores de cálcio que foram analisados por absorção atômica.

4. RESULTADOS

4.1 Parâmetros físico-químicos dos locais de coleta

Os principais parâmetros limnológicos analisados nos locais de coleta estão apresentados na Tabela 1. Pode-se observar diferenças no valor do pH (4,8 e 6,0), nos valores de oxigênio dissolvido (4,8 e 6,0 mg/l), no potencial redox (26,0 e 59,3 $\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$) e no conteúdo de sólidos totais em suspensão (5,3 e 7,1 mg/l) à montante e à jusante, respectivamente.

Tabela 1. Média (em negrito) e amplitude (mínimo – máximo) dos parâmetros físico-químicos da água à montante e à jusante da barragem da UHE de Balbina.

Locais	Oxigênio (mg/l)	pH	Temperatura (°C)	Pot. Redox (mV)	Condutividade ($\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$)	Sol. Total Dis. (mg/l)	Cálcio (μM)
Montante	4,8	6,3	30,6	26,0	13,0	5,3	10,0
	(4,0 – 6,1)	(6,2 – 6,5)	(30,4 – 30,8)	(23,0 – 29,0)	(9,8 – 14,9)	(5,1 – 5,4)	
Jusante	6,0	5,5	29,5	59,3	12,2	7,1	6,3
	(5,6 – 6,3)	(5,4 – 5,5)	(29,0 – 30,0)	(51,0 – 66,0)	(8,5 – 15,2)	(5,3 – 8,0)	

4.2 Morfologia branquial

A espécie *Cichla* spp. apresenta longos filamentos branquiais com lamelas secundárias ressaltadas (Figura 1). Como é comum de teleósteos, também possui 4 arcos branquiais, onde a partir de cada arco irradiam, posteroventralmente, duas fileiras de filamentos (sendo cada uma considerada hemibrânquia). Na figura 1 os rastros branquiais e parte do arco branquial foram removidos. O arco contém as artérias branquiais aferentes

(supre sangue) e eferentes (drenam sangue) e a partir daí, se originam as artérias filamentosas aferentes que se estendem ao longo do filamento, dando origem a vasculatura da lamela.

A Figura 2 mostra a organização interna do filamento e da lamela em secção longitudinal. As lamelas são compostas por duas fileiras de células epiteliais e uma membrana basal, que também é comum com as células pilares, que mantém a integridade mecânica dos canais vasculares. As flanges citoplasmáticas das células pilares formam o componente mais interno (endotelial) da barreira de difusão água-sangue. Um espaço intersticial que contém tecido conjuntivo e elementos celulares, assim como vasos linfáticos, ocorre entre as células endoteliais e as células epiteliais.

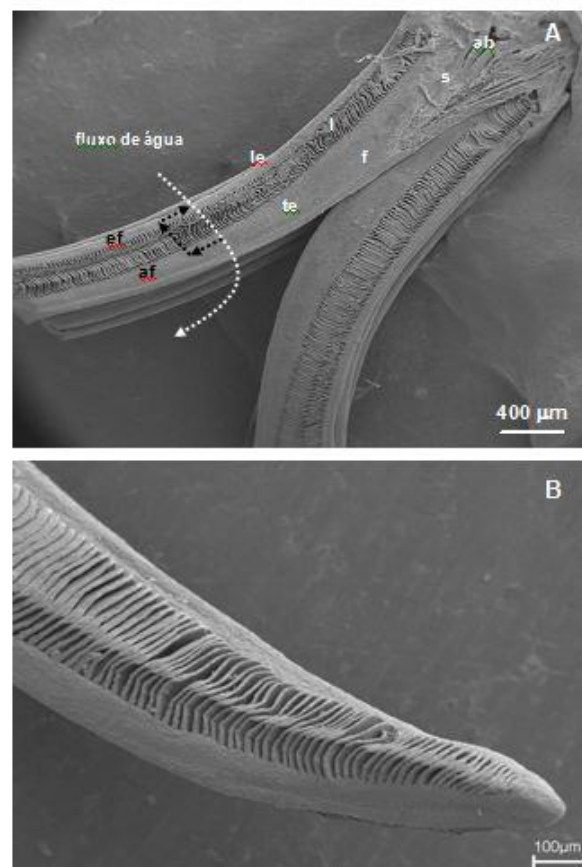


Figura 1. Microscopia eletrônica de varredura de brânquias de *Cichla spp.* (A-B). ab, arco branquial; s, septo; l, lamelas secundárias; f, filamento; le e te, região eferente e aferente do filamento, respectivamente, quanto ao fluxo de água; ef e af, região eferente e aferente do filamento, respectivamente, quanto ao fluxo de sangue.

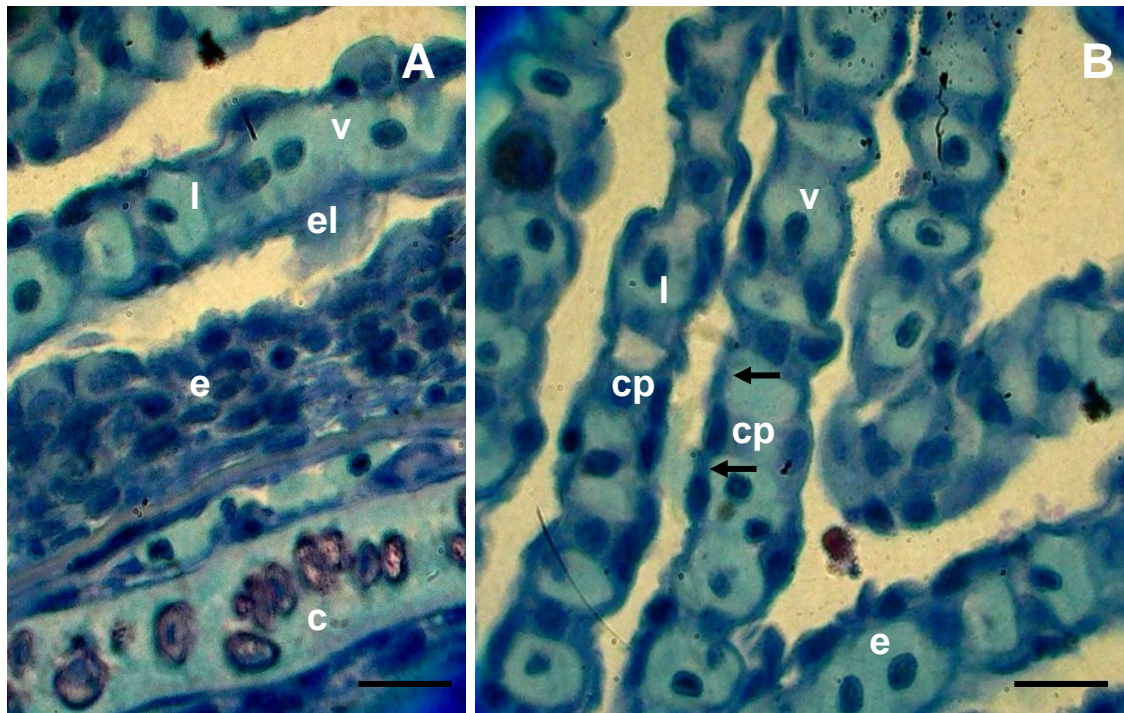


Figura 2. (A-B) Seção longitudinal de filamento branquial de *Cichla spp.* revelando a cartilagem (c) e a projeção de várias lamelas secundárias (l). ef, epitélio do filamento; el, epitélio da lamela; cp, célula pilar; (→), flange de célula pilar; v, vaso; e, eritrócitos. Seção em resina (3 μm) corada com azul de toluidina. Barra = 20 μm.

4.3 Análise esterológica das brânquias

Os volumes totais dos filamentos branquiais e da lamela secundária, obtidos em 10 seções por animal, dos peixes coletados a montante e a jusante da UHE de Balbina são mostrados na Figura 3. Os volumes dos filamentos e das lamelas foram significativamente ($P = 0,002$) maiores nos peixes coletados a jusante (Fig. 3). A montante o volume da lamela foi de $2,50 \pm 0,03 \text{ cm}^3/\text{kg}$ e o volume do filamento foi de $6,38 \pm 0,03 \text{ cm}^3/\text{kg}$. Enquanto que a jusante esses valores foram elevados a $4,17 \pm 0,02 \text{ cm}^3/\text{kg}$ para a lamela e $8,01 \pm 0,02 \text{ cm}^3/\text{kg}$ para o filamento. Os volumes diferenciais (densidade de volume) dos filamentos branquiais e componente da lamela secundária à montante, foram 71,32% das brânquias foi composta por filamentos e 28,68% de lamelas secundárias. À jusante, os filamentos representavam 76% e as lamelas, 24%. Na Figura 4 são representados os componentes da lamela em cm^3/kg . O volume das células

pilares não sofreu alteração nos peixes analisados a montante e a jusante. Contudo, o volume dos vasos sanguíneos e do epitélio estiveram significativamente aumentados à jusante ($P < 0,05$). Para os vasos este aumento foi em torno de 136% (de $0,96 \pm 0,21$ a montante para $2,27 \pm 0,22$ cm^3/kg a jusante). Para o epitélio lamelar o aumento foi em torno de 124% (de $0,53 \pm 0,10$ a montante para $1,19 \pm 0,13$ cm^3/kg a jusante).

VOLUMES BRANQUIAIS

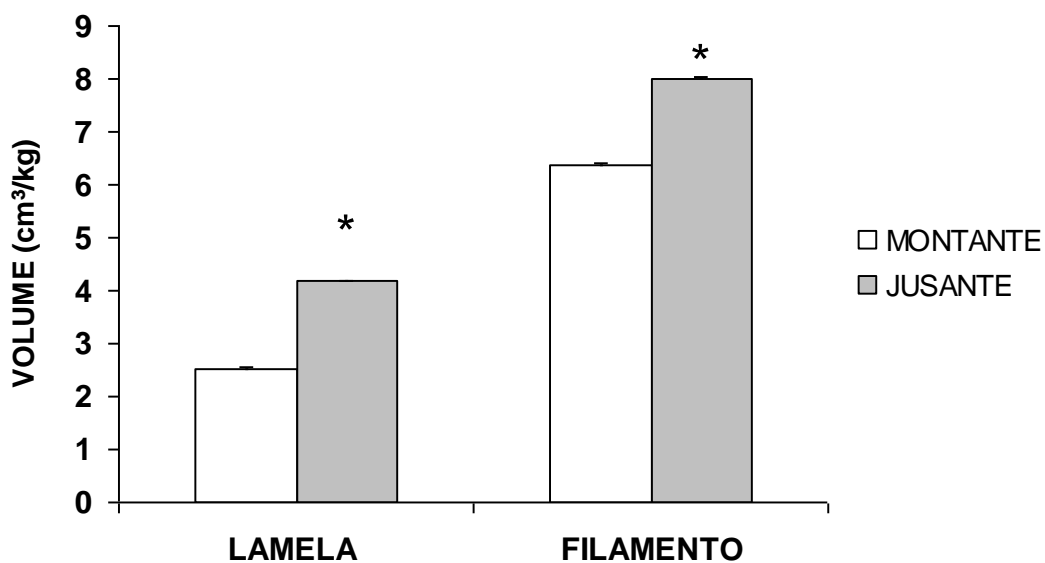


Figura 3. Volume dos componentes branquiais (lamela e filamento) obtidos via Princípio de Cavalieri em *Cichla* spp. coletados a montante e a jusante da UHE de Balbina, Presidente Figueiredo, AM. * indica diferença significativa ($P < 0,05$).

COMPONENTES DA LAMELA

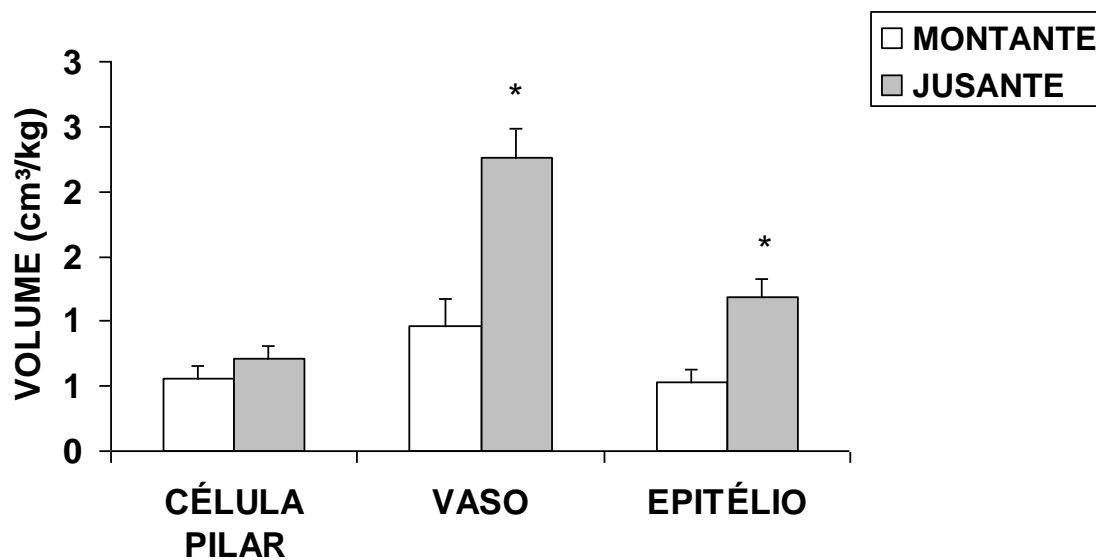


Figura 4. Volume dos componentes branquiais normalizados em função da massa de cada animal. * indica diferença significativa entre os tratamentos ($P < 0,05$).

4.4 Área superficial

Na Figura 5 é apresentada a distribuição proporcional da área superficial entre filamento e lamela (porção respiratória e não respiratória). Nos dois ambientes estudados (montante e jusante) a proporção de área de filamento ficou entorno de 25%. A porção respiratória da lamela secundária alterou de 55% a montante para 60% a jusante. Esta distribuição foi possível devido a uma redução na porção não-respiratória de 20% a montante para 15% a jusante. Na análise estatística os valores não mostraram diferença significativa. No entanto, a área superficial respiratória foi elevada de $1,17 \pm 0,22 \text{ cm}^2/\text{g}$ a montante para $2,14 \pm 0,51 \text{ cm}^2/\text{g}$ a jusante. Paralelo com estas diferenças, a S_R foi elevada de 73,47% a montante para 79,76% a jusante. O significativo aumento de volume do filamento e da lamela contribuiu para a queda na relação superfície-volume destes dois componentes branquiais.

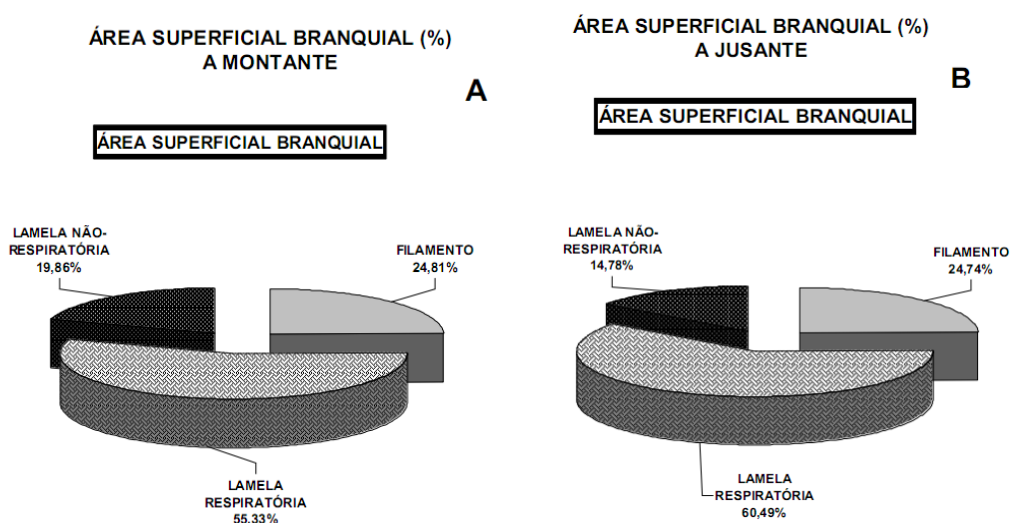


Figura 5. Estimativa da porcentagem da área superficial branquial (filamento, lamela respiratória e lamela não-respiratória) de *Cichla spp.* coletados a montante (A) e a jusante (B) da UHE de Balbina, Presidente Figueiredo, AM.

ÁREA SUPERFICIAL BRANQUIAL

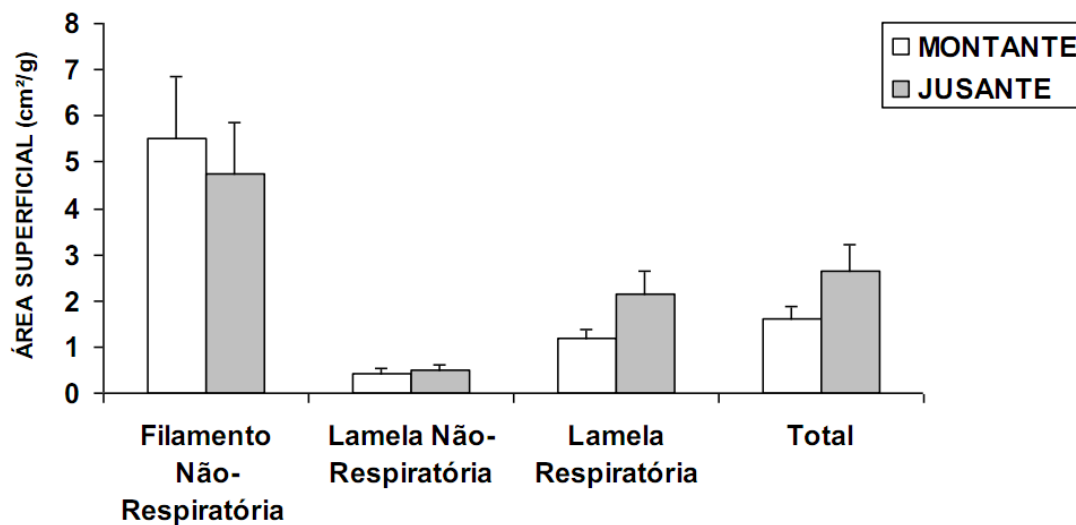


Figura 5. Área superficial respiratória e não-respiratória em cm²/g de *Cichla* spp. coletados a montante e a jusante da UHE de Balbina, Presidente Figueiredo, AM.

Espessura da barreira de troca água-sangue e capacidade de difusão

A média harmônica (τ_h e $2/3 \tau_h$) da barreira de difusão morfométrica esteve reduzida significativamente à jusante ($P = 0,043$), como mostra a Figura 6. Não foi observada diferença significativa nos valores de capacidade de difusão morfométrica para o oxigênio (DO_2), de dióxido de carbono (DCO_2) e o fator de difusão anatômica (FDA) entre os peixes de jusante e montante (Figura 7).

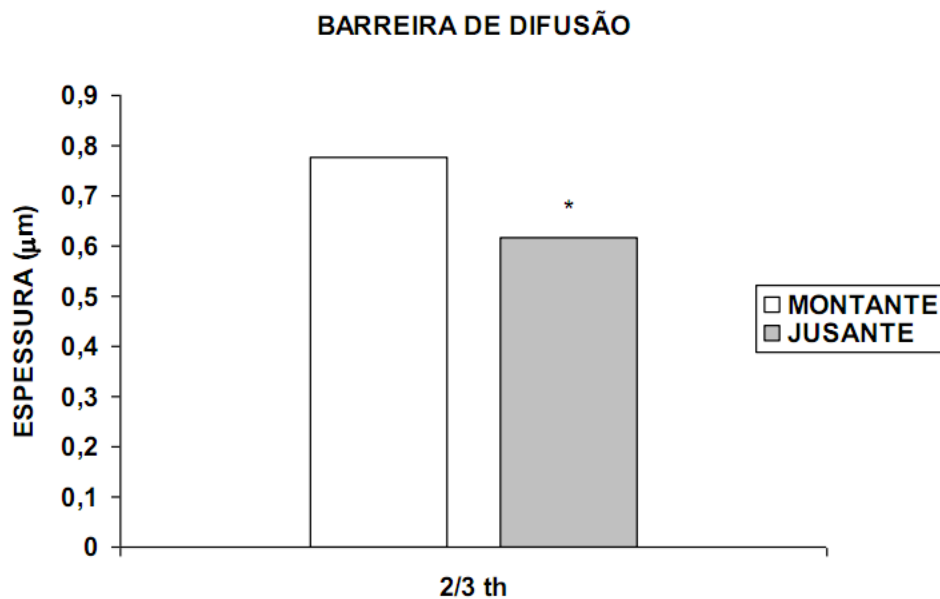


Figura 6. Barreira de difusão morfométrica (epitélio, membrana basal e célula pilar) de *Cichla* spp. coletados à montante e à jusante da UHE de Balbina. * indica a diferença significativa entre os tratamentos ($P < 0,05$).

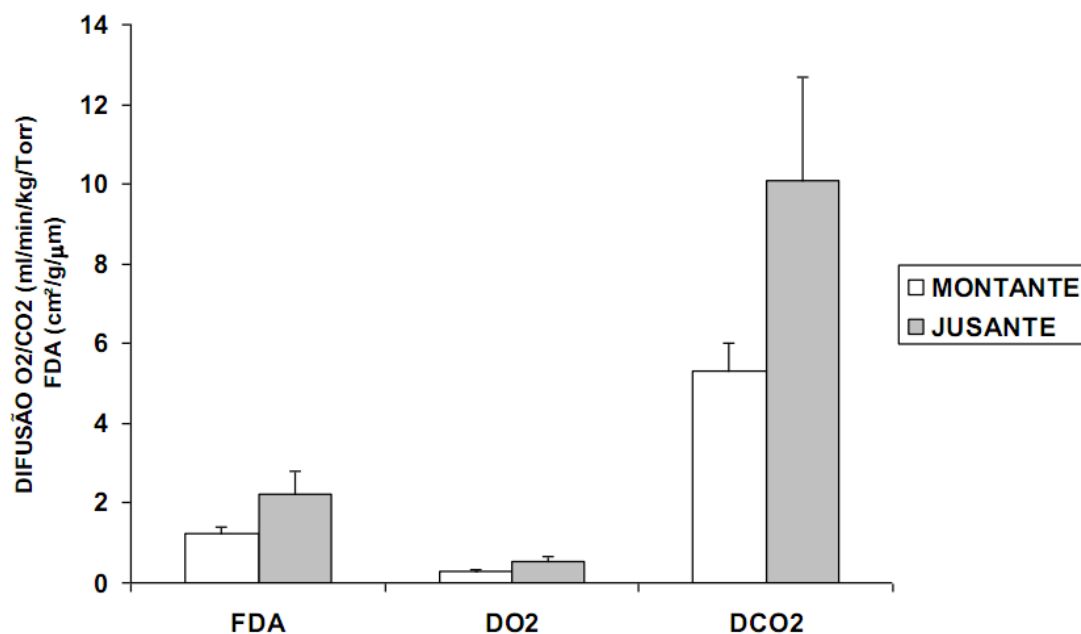


Figura 7. Capacidade de difusão morfométrica para o oxigênio (DO_2) e dióxido de carbono (DCO_2) e o fator de difusão anatômico (FDA) na porção respiratória da lamela secundária de *Cichla* spp. coletados à montante e à jusante da UHE de Balbina.

5. Discussão

Com os resultados obtidos a partir deste estudo foi notório a resposta adaptativa das brânquias aos requerimentos íon-respiratórios em *Cichla* spp. considerando que houveram modificações morfológicas na barreira de difusão água-sangue que afetam a transferência difusiva de gases. Em peixes de respiração exclusivamente aquática, o balanço iônico e a troca gasosa são processos fisiológicos dependentes das condições morfológicas do epitélio de revestimento branquial. Em peixes de água doce a troca iônica e gasosa são processos mantidos constantemente sob um rigoroso controle homeostático. A perda difusiva de íons, pode ser evitada com o aumento da barreira de difusão, porém, isso pode afetar a excreção de compostos nitrogenados (p. ex. amônia) e também a capacidade de troca de O₂ e CO₂ com o meio, já que é um processo inversamente proporcional a espessura da barreira tissular. As brânquias dos peixes possuem uma grande área superficial em contato com o meio ambiente, e justo este contato com o meio ambiente, a grande área superficial exposta e a reduzida barreira tissular água-sangue, se por um lado favorece as trocas gasosas, por outro expõe uma grande área superficial do epitélio branquial a um vasto número de estressores ambientais.

Alterações morfológicas que resultam em aumento da área superficial e decréscimo da espessura da barreira de troca gasosa estão relacionadas ao aumento da eficiência do sistema respiratório. O aumento de volume lamelar a jusante foi devido ao aumento do volume do sistema vascular e epitélio de revestimento. Nesses casos, comumente se observa um aumento na barreira de difusão, contudo, foi observado o contrário. A explicação mais plausível para este fato é que o aumento de volume lamelar esteja relacionado ao aumento da área superficial respiratória a jusante, o que

acarretou aumento no comprimento da lamela e redução da barreira de difusão. A diferença na concentração de O₂ entre os dois locais de coleta é baixa o suficiente para considerarmos um efeito deste fator sobre os resultados morfométricos. Contudo, há diferença na composição iônica nos dois locais de coleta e este é um fator que deve ser levado em consideração.

O aumento de volume dos vasos sanguíneos (espaços de sangue) na lamela dos peixes coletados a jusante é uma indicação indireta de aumento de fluxo sanguíneo nesta região, o que resulta em aumento na qualidade da troca gasosa e iônica pelos peixes (Laurent & Hebibi, 1989). Um outro mecanismo comumente utilizado pelos peixes para maximizar as trocas com o meio é o recrutamento de filamentos e lamelas distais não usados em condições de repouso (Booth, 1978, 1979). Esse mecanismo se dá através da modulação do sistema vascular branquial e é regulado pelo sistema de células pilares (Newstead, 1967) e pela contração das células musculares nas artérias lamelares aferente e eferente (Morgan & Tovell, 1973; Laurent & Dunel, 1980). Alternativamente, é possível haver uma alteração no padrão de fluxo sanguíneo no interior das lamelas (de lamelar para canais marginais ou vice-versa) (Soivio & Hughes, 1978; Soivio & Tuurala, 1981; Farrell *et al.*, 1980). Essas alterações têm sido atribuídas ao aumento da pressão do sangue lamelar resultando em distensão passiva das lamelas (Smith & Johnson, 1977; Farrell *et al.*, 1980; Smith & Chamley-Campbell, 1981; Sundin & Nilsson, 1997). O aumento no volume dos vasos sem alterar o volume das células pilares pode ser explicado devido a vasodilatação. As células pilares mantêm a integridade da lamela contra a força interna da pressão do sangue (Laurent, 1984; Olson, 1991). O fluxo de sangue através da lamela pode ser descrito como laminar, isto é, expansivo e plano (Farrell *et al.*, 1980). O arranjo dessas células provavelmente

contribui para facilitar a troca gasosa por (1) comprimir e (2) atrasar a passagem dos eritrócitos através dos espaços de sangue (Nilsson *et al.*, 1995).

Em nosso estudo há uma significativa relação entre o aumento de volume lamelar e o aumento da área respiratória detectado nos peixes coletados a jusante. Uma possível explicação para isto pode estar relacionada às diferenças químicas da água a montante e a jusante. A análise química da água a jusante mostrou uma maior concentração de cátions (Ca^{++} e Na^{+}). De um modo geral, as águas amazônicas apresentam um valor médio baixo para íons dissolvidos quando comparado com a média mundial para corpos de água doce (Furch *et al.* 1982). A área respiratória de *Cichla spp.* foi aumentada de 55% ($1,17 \pm 0,22 \text{ cm}^2/\text{g}$) a montante para 60% ($2,14 \pm 0,51 \text{ cm}^2/\text{g}$) a jusante. Aumentar a área superficial é uma estratégia bastante empregada pelos peixes para contrapor (1) o relativo baixo teor de O_2 do meio e/ou (2) aumentar a capacidade de excreção de sub-produtos do metabolismo (especialmente compostos nitrogenados). Devido às características morfológicas do epitélio lamelar (baixa resistência à difusão) e a taxa de perfusão lamelar, as brânquias parecem ser ideais para a troca gasosa (Evans *et al.* 2005). Dentre os respiradores aquáticos, *Cichla spp.* apresenta uma área respiratória comparável a outros peixes ativos como *Tinca tinca* (tenca) e *Oncorhynchus mykiss* (truta). As características do ambiente aquático a jusante são bem contrastantes em relação a montante. A mais óbvia diferença diz respeito ao padrão de fluxo de água: lântico a montante e lótico a jusante.

É possível que o ambiente turbulento a jusante seja mais um fator contribuindo para as diferenças morfológicas observadas. Embora falem os dados experimentais, as observações de campo quanto ao estilo de vida de *Cichla spp.* a jusante nós fazem supor que este peixe utiliza uma estratégia de arrancada e perseguição de sua presa que demanda uma alta taxa de troca de O_2/CO_2 somente possível através da área superficial

lamelar disponível. É possível que a montante, devido as característica lêmicas das águas, outra estratégia seja empregada que não demande as modificações observadas a jusante. Sem dúvida que essas adaptações somente são possíveis após rigorosa negociação com os requerimentos iônicos e osmóticos.

O fator de difusão anatômico (FDA) é um parâmetro que indica o quanto determinada estrutura esta desenhada (morfologia) para atuar como órgão de troca gasosa (Perry,1992). O FDA é obtido através da relação entre a área superficial respiratória e a espessura da barreira de troca água-sangue. A capacidade de difusão de O_2/CO_2 é obtida multiplicando-se o FDA pelo respectivo coeficiente de difusão de Krogh O_2/CO_2 . A análise do FDA a jusante indica que o aumento verificado é resultado do aumento da área superficial e decréscimo da barreira de difusão em *Cichla spp.*

Vários estudos têm evidenciado a morfologia geral e a ultraestrutura dos principais tipos celulares no epitélio branquial de peixes ósseos tropicais de água doce (Laurent, 1984a; Laurent, 1984b; Laurent *et al.*, 1994; Laurent & Dunel, 1976; Costa, 2001; Fernandes *et al.*, 1995, 1999). Três tipos celulares foram identificados no epitélio do filamento (aferente) de *Cichla spp.*: células pavimentosas, células-cloreto e células mucosas. Embora as células pavimentosas cubram a maior parte da área superficial do epitélio do filamento, elas parecem ter um papel passivo na fisiologia de muitos peixes marinhos (Evans *et al.* 2005). Entretanto, para as trocas gasosas essas células são importantes, pois são achatadas (escamosas) e cobrem a maior parte do epitélio lamelar em contato com meio ambiente. A ornamentação superficial que estas células apresentam desempenham vários papéis: aumento de área superficial e ponto de ancoramento para o muco produzido pelas células mucosas. Evidências ultraestruturais indicam que, em peixes de água doce, essas células desempenham um papel ativo na tomada de íons e no transporte ácido-base (Laurent *et al.*, 1994).

6. Conclusões.

- 1) As duas populações de *Cichla spp.* apresentam diferenças significativas quanto a distribuição quantitativa de seus componentes branquiais; é possível que essas diferenças sejam uma resposta adaptativa da espécie as diferentes condições ambientais dos dois locais de coleta (jusante \times montante);
- 2) As condições mais turbulentas e/ou as diferenças físico-químicas da água a jusante podem ser a causa do aumento de volume da lamela secundária e do filamento para esses peixes; o aumento de área superficial e volume vascular é compatível com os modelos de eficiência em trocas gasosas;
- 3) Nossos resultados morfométricos corroboram o conceito estabelecido de que a área superficial branquial e a distância de difusão mostram alta correlação com o estilo de vida e habitat do peixe.

7. Referências

BADDELEY, A.J., GUNDERSEN, H.J.G. & CRUZ-ORIVE, L.M. Estimation of surface area from vertical sections. *Journal of Microscopy*. n. 142, v. 3, p. 259-276, 1986.

BOOTH, J.H. The distribution of blood flow in the gills of fish: application of a new technique to rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *Journal of Experimental Biology*. n. 73, p. 119–129, 1978.

BOOTH, J.H. Circulation in trout gills: the relationship between branchial perfusion and the width of the lamellar blood space. *Canadian Journal of Zoology*. n. 57, p. 2183–2185. 1979.

COSTA, O.T.F. Nitrito: Tolerância, hematologia, bioacumulação e morfologia em tambaqui, *Colossoma macropomum*, (Characiformes, Serrasalminae). Tese de Doutorado, Univ. Federal de São Carlos, UFSCAR, São Paulo, Brasil, 2001.

COSTA, O.T.F.; PERRY, S.F.; SCHMITZ, A. & FERNANDES, M.N. Stereological Analysis of Fish Gills: Method. In: VI International Congress of Vertebrate Morphology, 2001, Jena. *Journal of Morphology*. New York: John Wiley & Sons, Inc., n. 248, p. 219. 2001.

CRUZ-ORIVE, L.M. Systematic sampling in stereology. *Bull. Intern. Statis. Inst., Proceedings 49th Session, Florence*. n. 52, v. 2, p. 451-468, 1993.

EVANS D.H.; PIERMARINI, P.M. & CHOE, K.P. The Multifunctional Fish Gill: Dominant Site of Gas Exchange, Osmoregulation, Acid-Base Regulation, and Excretion of Nitrogenous Waste. *Physiological Review*. n. 85, p. 97–177, 2005.

FARRELL, A.P., SOBIN, S.S., RANDALL, D.J. & CROSBY, S. Intralamellar blood flow patterns in fish gills. *American Journal of Physiology*. n. 239, p. R428–R436, 1980.

FERNANDES, M.N., BARRIONUEVO, W.R. & RANTIN, F.T. Effects of thermal stress on respiratory responses to hypoxia of a South American Prochilodontid fish, *Prochilodus scrofa*. *Journal of Fish Biology*. n. 46, p. 123-133, 1995.

FERNANDES, M.N., SANCHES, J.R., MATSUZAKI, M., PANEPUCCI, L. & RANTIN, F.T. Aquatic respiration in facultative air-breathing fish: effects of temperature and hypoxia. In *Biology of Tropical Fishes* (Val, A. L. & Almeida-Val, V. M., Eds.). INPA, Manaus, 1999, p. 341-352.

FURCH, K.; JUNK, W.J. & KLINGE, H. Unusual chemistry of natural waters from the Amazon region. *Acta Científica Venezolana*. n. 33, p. 269– 273, 1982.

GUNDERSEN, H.J.G. & JENSEN, E.B. The efficiency of systematic sampling in stereology and its prediction. *Journal of Microscopy*. n. 147, p. 229-263, 1987.

HOWARD, C.V. & REED, M.G. *Unbiased stereology: three-dimensional measurements in microscopy*. Berlin: Springer Verlag & Bios Scientific Publishers, 1998.

KIERNAN, J.A. *Histological and histochemical methods: theory and practice*. London: Pergamon Press. 1990.

LAURENT, P. Gill internal morphology. In: *Fish Physiology*, (Hoar WS and Randall DJ, Eds). Orlando, FL: Academic, p. 73–183, 1984a.

LAURENT, P. Morphology and physiology of organs of aquatic respiration in vertebrates: the gill. *Journal of Physiology*. n. 79, p. 98–112. 1984b.

LAURENT, P. & DUNEL, S. Morphology of gill epithelia in fish. *American Journal of Physiology*. n. 238, p. R147–R159, 1980.

LAURENT, P. & HEBIBI, N. Gill morphometry and fish osmoregulation. *Canadian Journal of Zoology*. n. 67, p. 3055-3063, 1989.

LAURENT, P. & DUNEL, S. Functional organization of the teleost gill. Part 1. Blood pathways. *Acta Zoologica Stockholm*. n. 57, p. 189–209, 1976.

LAURENT, P. & PERRY, S.F. The effects of cortisol on gill chloride cell morphology and ionic uptake on the freshwater trout, *Salmo gairdneri*. *Cell and Tissue Research*. n. 259, p. 429-442, 1990.

MAINA J.N. & WEST, J.B. Thin and Strong! The Bioengineering Dilemma in the Structural and Functional Design of the Blood-Gas Barrier. *Physiological Review*. n. 85, p. 811-844, 2004.

MICHEL, R.P. & CRUZ-ORIVE, L.M. Application of the Cavalieri principle and vertical sections method to lung: estimation of volume and pleural surface area. *Journal of Microscopy*. n. 150, p. 117-136, 1988.

MORGAN, M. & TOVELL, P.W.A. The structure of the gills of the trout, *Salmo gairdneri* (Richardson). *Z. Zellforsch.* n. 142, p. 147-162, 1973.

NEWSTEAD, J.D. Fine structure of the respiratory lamellae of teleostean gills. *Z. Zellforsch.* n. 79, p. 369-428, 1967.

NILSSON, G.E.; LÖFMAN, C.O. & BLOCK, M. Extensive erythrocyte deformation in fish gills observed by in vivo microscopy: apparent adaptations for enhancing oxygen uptake. *Journal of Experimental Biology*. n. 198, p. 1151–1156, 1995.

OLSON, K.R. Vasculature of the fish gill: anatomical correlates of physiological functions. *Journal of Electronic Microscopy and Technology*. n. 19, p. 389–405, 1991.

PERRY, S.F. Quantitative anatomy of the lungs of the red-eared turtle, *Pseudemys scripta elegans*. *Respiration Physiology*. n. 35, p. 245-262, 1978.

PERRY, S.F. Morphometric analysis of pulmonary structure: methods for evaluation and comparison of unicameral lungs. *Mikroskopie* n. 38, p. 278-293, 1981.

PERRY, S.F. The chloride cell: structure and function in the gills of freshwater fishes. *Annual Review of Physiology*. n. 59, p. 325–347, 1997.

PERRY, S.F. Mainstreams in the evolution of vertebrate respiratory structures. In: *Form and Function in Birds*, vol. IV (A. S. King & J. McLelland, Eds.), London: Academic Press. p 1-67, 1989.

PERRY, S.F. Morphometry of vertebrate gills and lungs: a critical review. In: Oxygen Transport in Biological Systems, Society for Experimental Biology, Seminar Series 51, (S. Egginton & H. F. Ross, Eds.), London: Cambridge University Press. p 57-77, 1992.

RANDALL, D.J.; BURGREN, W. & FRENCH, K. Eckert Animal Physiology: Mechanisms and Adaptations, 4th ed. (D. J. Randall, W. Burgreen, & K. French, Eds.), New York: W. H. Freeman & Company, 1997.

SOIVIO, A. & HUGHES, G.M. Circulatory changes in secondary lamellae of *Salmo gairdneri* gills in hypoxia and anesthesia. *Ann. Zool. Fenn.* n. 15, p. 221–225, 1978.

SOIVIO, A. & TUURALA, H. Structural and circulatory responses to hypoxia in the secondary lamellae of *Salmo gairdneri* gills at two temperatures. *Journal of Comparative Physiology.* n. 45, p. 37–43, 1981.

SMITH, D.G. & JOHNSON, D.W. Oxygen exchange in a simulated trout gill secondary lamella. *American Journal of Physiology.* n. 233, p. R145–R161, 1977.

SMITH, D.G. & CHAMLEY-CAMPBELL, J. Localization of smooth muscle myosin in branchial pillar cells of snapper (*Chrysophus auratus*) by immunofluorescence histochemistry. *Journal of Experimental Zoology.* n. 215, p. 121–124, 1981.

SUNDIN, L. & NILSSON, G.E. Neurochemical mechanisms behind gill microcirculatory responses to hypoxia in trout: in vivo microscopy study. *American Journal of Physiology.* n. 272, p. R576–R585, 1997.

WEIBEL, E.R. *Stereological Methods. Practical methods for biological morphometry*, Vol. 1. London: Academic Press, 1979.

WEIBEL, E.R. & KNIGHT, B.W. A morphometric study on the thickness of the pulmonary air-blood barrier. *Journal of Cell Biology.* n. 21, p. 367-384, 1964.

