

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS

ANÁLISE DA HISTOLOGIA HEPÁTICA E BRANQUIAL
EM TILÁPIA DO NILO (*Oreochromis niloticus*)
CULTIVADAS EM DIFERENTES DENSIDADES EM
TANQUES-REDE, NO RIO DO CORVO-PR

Autora: Herena Naoco Chisaki Isobe
Orientador: Prof. Dr. Lauro Vargas
Coorientadora: Prof^ª. Dr^ª. Maria Raquel Marçal Natali

MARINGÁ
Estado do Paraná
julho – 2014

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS

ANÁLISE DA HISTOLOGIA HEPÁTICA E BRANQUIAL
EM TILÁPIA DO NILO (*Oreochromis niloticus*)
CULTIVADAS EM DIFERENTES DENSIDADES EM
TANQUES-REDE, NO RIO DO CORVO-PR

Autora: Herena Naoco Chisaki Isobe

Orientador: Prof. Dr. Lauro Vargas

Coorientadora: Prof^ª. Dr^ª. Maria Raquel Marçal Natali

Tese apresentada, como parte das exigências para obtenção do título de DOUTOR EM ZOOTECNIA, no Programa de Pós-graduação em Zootecnia da Universidade Estadual de Maringá – Área de concentração Produção Animal.

MARINGÁ
Estado do Paraná
julho – 2014

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)

I85a	<p>Isobe, Herena Naoco Chisaki</p> <p>Análise da histologia hepática e branquial em tilápia do Nilo (<i>Oreochromis niloticus</i>) cultivadas em diferentes densidades em tanques-rede, no Rio do Corvo, PR / Herena Naoco Chisaki Isobe. -- Maringá, 2014.</p> <p>35 f. : il. color.</p> <p>Orientador: Prof. Dr. Lauro Vargas. Co-orientadora: Prof^a. Dr^a. Maria Raquel Marçal Natali.</p> <p>Tese (doutorado) - Universidade Estadual de Maringá, Centro de Ciências Agrárias, 2014.</p> <p>1. Tilápia do Nilo (<i>Oreochromis niloticus</i>) - Desempenho. 2. Mucinas. 3. Tilápia do Nilo (<i>Oreochromis niloticus</i>) - Brânquia e Fígado - Alterações. 4. Hepatócitos. I. Vargas, Lauro, orient. II. Natali, Maria Raquel Marçal. III. Universidade Estadual de Maringá. Centro de Ciências Agrárias. III. Título.</p> <p>CDD 22.ed. 639.3774</p>
------	---




UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS

**ANÁLISE DA HISTOLOGIA HEPÁTICA E BRANQUIAL
EM TILÁPIA DO NILO (*Oreochromis niloticus*)
CULTIVADAS EM DIFERENTES DENSIDADES EM
TANQUES-REDE, NO RIO DO CORVO, PR**


Autora: Herena Naoco Chisaki Isobe
Orientador: Prof. Dr. Lauro Daniel Vargas Mendez

TITULAÇÃO: Doutora em Zootecnia - Área de Concentração Produção
Animal

APROVADA em 30 de julho de 2014.



Prof. Dr. Ricardo Pereira Ribeiro




Prof. Dr. Carlos Antonio
Lopes de Oliveira



Prof. Dr. Jayme Aparecido Povh



Dr. Luiz Alexandre Filho



Prof. Dr. Lauro Daniel
Vargas Mendez
(Orientador)

Minha filha Mônica, companheira, amiga e pequena (Ti) estrela (ho).

Meus irmãos Chinobu, Harumi, Matsuo, Jorge e Alice, porque somos o que somos, porque somamos.

Minha mãe, Tokie (*in memoriam*), uma mulher à frente do seu tempo.

Dona Ângela e família, pela amizade irrestrita e incondicional.

DEDICO...

AGRADECIMENTOS

Àqueles que possibilitaram este trabalho:

professor Lauro Vargas, pela orientação e compreensão do que sou;

professora Maria Raquel Marçal Natali, pelos ensinamentos, pela alegria e por sua arte de professorar;

professores Elias Nunes Martins e Ferenk Istvan Bankuti, pelo incentivo e crença nas nossas possibilidades e porque aprendi;

professor Carlos Oliveira, porque vislumbrei a estatística;

professor Érico Sengik, pela dedicação ao ofício de ensinar e, com honra, pela amizade;

professores Alice Eiko Murakami, Antonio Ferriani Branco, Ricardo Pereira Ribeiro, Fernea Losi Alves de Almeida, Paula Pinto e Nelson Lopera Barrero, pelos ensinamentos em produção animal;

professor Luiz Alexandre Filho, pessoal do rio do Corvo e funcionários da Estação Experimental da UEM-Codapar - Zé Geraldo, Vitor e Cleiton, pelo sucesso do experimento;

parceira nos trabalhos, Tatiani Botini Pires, sem a qual nada seria possível;

técnicas do laboratório de histotécnica animal do Departamento de Morfologia - Maria Euride e Maria dos Anjos, pela dedicação ao trabalho e paciência na busca de

resolução dos problemas nas técnicas em histologia e a Maria Ângela, pela curiosidade e pelo auxílio nas horas difíceis;

técnica do Laboratório do PeixeGen - Dilma, pela amizade e pelos encaminhamentos;

colegas do Laboratório, porque no convívio, aprendi com vocês um pouco mais sobre a histologia;

funcionários do PPZ - Denilson, pela atenção e pronto atendimento;

funcionários da DZO - Bete e Francisco, pela amizade;

colegas da Unemat e do Dinter - Édson Júnior, Samuel, Marice, Maurício; especialmente Cristiano e Edson Egushi, pela parceria;

Universidade Estadual de Maringá (UEM) e ao Programa de Pós-graduação em Zootecnia (PPZ) que junto com a Universidade do Estado de Mato Grosso (Unemat) e a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Mato Grosso (Fapemat), pela oportunidade da realização do doutorado;

Kátia Setsuko Kimura, aluna do curso de Zootecnia, pela imensa hora dedicada aos trabalhos de processamento do material histológico; pela amizade, dedicação e acima de tudo, pela compreensão;

Oswaldo de Souza, pelos encaminhamentos da análise estatística e sua esposa Lucilaine, porque dividimos o cafezinho nas horas alegres e tristes;

Márcia Matos de Abreu, Olinda Guimarães, Pilar Rodriguez-Rodriguez, Daniela Menezes, Aline e Elenice, com vocês compartilhei os dias em Maringá e construí uma amizade;

Mônica Tiho Chisaki Isobe, companheira de todas as horas, pelas intermináveis horas de conversa sobre o trabalho e sobre a vida; todo amor e toda dedicação a você, minha filha.

BIOGRAFIA

HERENA NAOCO CHISAKI ISOBE, filha de Tokie Chisaki e de Chiomatsu Chisaki, nasceu no dia 02 de setembro de 1954, em Itapetininga, no Estado de São Paulo.

Cursou a graduação em Ciências Biológicas na Universidade de São Paulo, concluindo em 1978.

Em 1985, mudou-se para o Estado de Mato Grosso, residindo no então pequeno município de Guarantã do Norte, onde atuou como professora do ensino fundamental e médio até 1993. A partir dessa data até 1997 atuou em projetos de Formação de Professores da Secretaria do Estado de Educação até o ingresso na Universidade do Estado do Mato Grosso - Unemat em 1998.

No período de 1998 a 2006, foi coordenadora dos cursos de licenciatura em Ciências Biológicas no projeto de Licenciaturas Parceladas, destinado à formação de professores em serviço, ofertada pela Unemat em parceria com a Secretaria do Estado de Educação.

Em 2000, ingressou no curso de mestrado em educação, pela Universidade Federal de Mato Grosso, na área de educação ambiental, tendo defendido em março de 2003.

Em 2006, assumiu o cargo de professora na Unemat, no Campus de Pontes e Lacerda, no Departamento de Zootecnia.

Em setembro de 2010, ingressou no curso de doutorado, como aluna do doutorado interinstitucional firmado entre a Universidade Estadual de Maringá e a Universidade do Estado de Mato Grosso, na área de produção animal.

No tempo presente submete-se a arguição da Banca Examinadora para a defesa da tese.

ÍNDICE

	Página
LISTA DE TABELAS	vii
LISTA DE FIGURAS	viii
RESUMO	x
ABSTRACT	xii
I – INTRODUÇÃO GERAL	1
1.1 Cultivo de peixes em tanques rede	1
1.2 Histologia de brânquias	4
1.3 Histologia de fígado	6
Referências	8
II– OBJETIVOS GERAIS	11
III –ANÁLISE DA HISTOLOGIA HEPÁTICA E BRANQUIAL EM TILÁPIA DO NILO (<i>Oreochromis niloticus</i>) CULTIVADAS EM DIFERENTES DENSIDADES EM TANQUES-REDE, NO RIO DO CORVO-PR	12
Resumo	12
Abstract	13
Introdução	14
Material e Métodos	15
Resultados e Discussão	20
Conclusão	30
Referências	31

LISTA DE TABELAS

	Página
<p>III – ANÁLISE DA HISTOLOGIA HEPÁTICA E BRANQUIAL EM TILÁPIA DO NILO (<i>Oreochromis niloticus</i>) CULTIVADAS EM DIFERENTES DENSIDADES EM TANQUES-REDE, NO RIO DO CORVO-PR</p>	
Tabela 1	Média ± desvio-padrão (DP) dos parâmetros ambientais físicos e químicos no período execução do experimento 21
Tabela 2	Média ± desvio-padrão do número de células mucosas, produtoras de mucinas ácidas e de mucinas neutras, presentes na região apical, intermediária e basal de filamentos branquiais de tilápias do Nilo em peixes iniciais (PI) e cultivadas em densidades de 500, 1.000 e 1.500 peixes/tanque rede com capacidade útil de 6,0 m ³ 22
Tabela 3	Valores médios de alteração (VMA) presentes nos filamentos branquiais de tilápias do Nilo em peixes iniciais (PI) e cultivadas em densidades de 500, 1.000 e 1.500 peixes/tanque-rede com capacidade útil de 6,0 m ³ 26
Tabela 4	Probabilidade de ocorrência de vacuolização em hepatócitos de tilápias do Nilo em peixes iniciais (PI) e cultivadas em densidades de 500, 1.000 e 1.500 peixes/tanque-rede com capacidade útil de 6,0 m ³ 28
Tabela 5	Valores médios da área celular (AH) e do número de hepatócitos (NH) em tilápias do Nilo em peixes iniciais e cultivadas em densidades de 500, 1.000 e 1.500 peixes/tanque-rede com capacidade útil de 6,0 m ³ 30

LISTA DE FIGURAS

	Página
<p>III – ANÁLISE DA HISTOLOGIA HEPÁTICA E BRANQUIAL EM TILÁPIA DO NILO (<i>Oreochromis niloticus</i>) CULTIVADAS EM DIFERENTES DENSIDADES EM TANQUES-REDE, NO RIO DO CORVO-PR</p>	
Figura 1	16
Figura 2	17
Figura 3	23
Figura 4	24
Figura 5	25

- Figura 6 Visualização de células com características de células adiposas (CCA) no hepatopâncreas de diferentes tratamentos: F1: TR500 – PAS 20X (Barra = 10µm); F2: TR1000 – PAS 10X (Barra = 10µm); F3: TR1500 – PAS 20X (Barra = 10µm). Tecido pancreático exócrino (Pex) intra-hepático, com disposição acinar e difuso no parênquima do tecido hepático (PH): F4 (TR500), F5 (TR1000) e F6 (TR1500) HE 40X (Barra = 10µm) 28
- Figura 7 Parênquima hepático evidenciando estrutura cordonal dos hepatócitos (CH); sinusoides (Sn); vacuolização citoplasmática (VCit); deslocamento periférico do núcleo de hepatócitos (NP); veia central (VCen). G1: PI, G2: TR500; G3: TR1000; G4: TR1500. HE 40X (Barra = 10µm) 29

RESUMO

Diferentes métodos de validação do estado sanitário dos organismos aquáticos podem levar à melhoria do desempenho, com aumento significativo da produtividade. O diagnóstico histopatológico, integrado com outros fatores componentes do sistema produtivo apresenta-se como ferramentas para a análise e prevenção da sanidade dos organismos cultivados. O presente estudo analisou as alterações teciduais em brânquias e fígado de tilápias do Nilo, *Oreochromis niloticus*, pós-revertidas, da linhagem GIFT (*Genetic Improvement of Farmed Tilapia*) cultivadas em tanques rede de 6,0 m³ sob diferentes densidades de estocagem: 500, 1.000 e 1.500 peixes/tanque no rio do Corvo – PR. Utilizou-se delineamento experimental inteiramente casualizado com três tratamentos e 12 repetições. Registros limnológicos foram tomados a cada 15 dias. Cortes de 6,0 µm de espessura de amostras de fígado de 12 peixes por tratamento foram corados pelo método de coloração hematoxilina-eosina (HE) para análise da área citoplasmática, posição do núcleo na célula, vacuolização citoplasmática e quantidade de hepatócitos. Dos mesmos 12 peixes retirou-se uma parte das amostras de brânquias que foram coradas pelo HE para análise morfológica de alterações branquiais e outra, submetida à técnica histoquímica *Alcian Blue* + ácido periódico de Schiff (PAS), modificada (*Alcian Blue* pH 2,5 - PAS), para a evidenciação das células produtoras de mucinas neutras e mucinas ácidas. As condições limnológicas encontravam-se dos padrões para o cultivo da espécie. Houve uma diminuição significativa na quantidade de células produtoras de mucinas ácidas inversamente à densidade de estocagem, contudo não ocorreram diferenças significativas na quantidade de células produtoras de mucinas neutras entre os tratamentos. Células mucosas ácidas encontravam-se em maior quantidade que as neutras. Ocorreram diferenças significativas na presença de elevação epitelial, fusão lamelar, hiperplasia de células epiteliais, sendo que os tanques com 500

peixes apresentaram valores médios inferiores dessas alterações e maior valor médio de telangectasias. A análise das variáveis morfométricas do fígado, em geral, não mostrou diferenças estatísticas significativas entre os três tratamentos. Densidades populacionais inadequadas, aliadas às condições ambientais e ao manejo impróprio, podem levar a modificações estruturais no fígado e brânquias. Mantidas essas condições por um tempo mais prolongado, pode ocorrer a diminuição da produção por agravamento das alterações teciduais.

Palavras-chave: desempenho, mucinas, alterações branquiais, hepatócitos

ABSTRACT

Different methods of health validation of aquatic organisms may lead to improved performance, with a substantial increase in productivity. The histopathologic diagnosis integrated with other components of the production system factors is presented as tools for the analysis and prevention of health of cultured organisms. The present study analyzed the tissue changes in gills and liver of tilapia niloticus, post-reversed, GIFT lineage (Genetic Improvement of Farmed Tilapia) grown in net tanks of 6.0 m³ at different stocking densities: 500, 1000 and 1500 fish/tank on the Corvo River - PR. We used a completely randomized design with three treatments and 12 replications. Limnological parameters were measured every 15 days. Sections of 6.0 µm thick of liver samples from twelve fish per treatment were stained by hematoxylin-eosin method (HE) for analysis of cytoplasmic area, the position of the cell nucleus, cytoplasmic vacuolization and quantity of hepatocytes. From the same twelve fish were cut a portion of the gills samples and then one of them were stained by HE for morphological analysis of gill changes and the other one submitted to histochemical technique Alcian Blue+Periodic acid-Schiff (PAS), modified (Alcian Blue pH 2.5 - PAS) to point the producing cells of neutral and aci mucins. Limnological conditions were within the standards for species growing. As higher storage density there was a significant reduction in the number of cells producing acid mucins, however there were no significant differences in the quantity of cells producing neutral mucins among treatments. Acid mucous cells were in greater quantity than the neutral. There were significant differences in the presence of epithelial lifting, lamellar fusion, hyperplasia of epithelial cell and tanks with 500 fish had lower average values of these changes and higher mean of telangiectasia. The morphometric analysis of the liver, in general, showed no statistically differences among the three treatments. Inadequate population

densities, combined with inappropriate environmental conditions and management may lead to structural changes in the liver and gills of fishes. These conditions maintained over a longer time, can cause a decrease in production due the aggravation of the tissue changes.

Keywords: performance, mucins, gill changes, hepatocytes

I – INTRODUÇÃO GERAL

1.1 Cultivo de peixes em tanques rede

O cultivo de peixes em tanque-rede constitui-se em alternativa para o aproveitamento do potencial hídrico brasileiro, sendo a tilápia do Nilo, *Oreochromis niloticus*, a espécie mais cultivada em tanques-rede (Zimmermann e Hasper, 2003; MPA, 2011), pois esse tipo de sistema de cultivo, além do papel essencial de confinamento, permite a maior troca de água com o ambiente, cuja função é influenciada pelo volume tanque-rede, forma e material constituintes do tanque.

Tanques-rede são recintos fechados, com fio ou rede de malha. O tamanho da malha retém a tilápia, mas permite a troca de água e remoção de resíduos. Em tanques-rede de grande volume (capacidade maiores de 5,0 m³), podem ser estocadas entre 50 a 100 tilápias macho e até 600 tilápias por metro cúbico em tanques de pequeno volume (menores de 5,0 m³) e alimentados com ração nutricionalmente completa.

As pequenas gaiolas são mais produtivas por unidade de volume por causa da troca de água mais eficiente (Popma e Lovshin, 1995; Schmittou, 1997). Altas densidades de estocagem (de 300 a 500 tilápias m⁻³) podem ser utilizadas em tanques com capacidade 1 a 4 m³, com uma produção de 150 a 250 kg m⁻³ de tilápias, como evidenciou Schmittou (1997).

Entretanto, EL-Khaldi (2010) considerou que as altas densidades de estocagem são estressores e pode afetar a fisiologia dos peixes em geral, assim uma densidade intermediária tende a aumentar a eficiência do crescimento e diminuir a incidência de doenças.

Quando não é determinada a densidade populacional adequada, esta pode se tornar um importante agente estressor na produção, que pode desencadear nos peixes

respostas ao agente que irão minimizar o estresse (Val et al., 2004). Segundo esses autores, as classes de agentes estressores são químicos, biológicos, físicos e de manejo. A densidade populacional imprópria, entre outros, tais como o confinamento, tratamento de doenças e transporte, é um agente estressor de manejo.

As respostas dos peixes ao agente estressor podem iniciar, basicamente, com a liberação dos hormônios de estresse – catecolaminas e cortisol – consideradas respostas primárias, passando por mudanças metabólicas, fisiológicas e estruturais, que constituem respostas secundárias, evoluindo para respostas terciárias quando ocorrem alterações na totalidade do animal, na população, nos padrões de crescimento e reprodução (Val et al., 2004).

As densidades nas quais diferentes espécies podem ser estocadas é um importante fator na determinação do custo de produção. A densidade depende das condições ambientais, fluxo de água e nível tecnológico empregado na criação, fatores intrínsecos muitas vezes para cada região. Assim, é necessário determinar a densidade de estocagem ideal para cada situação para obter a produtividade almejada (Brandão et al., 2004). Popma e Lovshin (1995) indicaram que rendimentos de 50 a 300 kg de tilápia m^{-3} são possíveis em tanques-rede.

Em truta arco-íris, North et al. (2006) verificaram que as interações biológicas não produziram efeitos consistentes nas médias de crescimento ou alterações fisiológicas aparentes em densidades de estoque de 80 kg de truta m^{-3} .

Sampaio e Braga (2005) não constataram diferença significativa no peso médio final, bem como no ganho em peso total por peixe e ganho em peso diário por peixe em tilápias nilóticas da linhagem Chitralada, revertidos, na fase de engorda cultivadas em densidades de 150, 200 e 250 tilápias m^{-3} , em tanques-rede com volume útil de 4,0 m^3 . Paiva et al. (2008) utilizaram densidades de 200, 250 e 300 tilápias nilóticas m^{-3} em tanques-rede de 1 m^3 , colocados em viveiros de 2.400 m^2 , povoados e não povoados com a mesma espécie, obtendo melhores resultados de ganho em peso significativamente superiores em tilápias cultivadas em tanque-rede instalados em viveiros não povoados. Os autores relataram que não houve diferença de ganho em peso nas densidades de 200 e 250 peixes m^{-3} .

Entretanto, Lambert e Dutil (2001) mostram que a densidade de estocagem pode influenciar no consumo de alimento e, concomitantemente, no crescimento, relacionados com as interações sociais ou biológicas estabelecidas, como o

desenvolvimento de hierarquia, de territorialidade e estresses associados a altas densidades.

O uso da técnica de criação de peixes em tanques-rede visa o aumento da produtividade por área de cultivo e, conseqüentemente, maior lucratividade. As perdas econômicas resultantes da combinação de técnicas de monitoramento aquático e de manejo dos peixes e a falta de reconhecimento de agentes estressores na criação dos animais podem levar à baixa produtividade e representam fatores de risco para os piscicultores. Portanto, tornam-se necessárias pesquisas que visem melhorar os índices de crescimento e de produção de peixes, associados à qualidade do produto final, (Resende, 2009).

O desempenho produtivo depende das características sanitárias e estruturais do animal. Um peixe sem alterações morfológicas teciduais pode representar ganho em peso, menor tempo de crescimento e melhor aproveitamento do alimento (Oba, 2009).

O manejo como densidades populacionais inadequadas, pode levar a modificações estruturais de órgãos dos peixes, principalmente em sistemas de confinamento como tanques-rede, que, em primeira instância pode não mostrar alterações de produtividade (Mallat, 1985). Entretanto, em sistemas intensivos de criação, que cada vez mais vem crescendo no país, o confinamento sob baixas densidades populacionais levam à baixa produtividade por área (Schmittou, 1997) e em altas densidades podem acarretar outros tipos de estresse nos organismos por meio de estressores químicos, como baixos níveis de oxigênio, pH impróprio, níveis impróprios de amônio e nitrito e níveis impróprios de cátions e ânions presentes na água que podem levar a alterações histopatológicas (Mallat, 1985; Kubitza, 1997; Monteiro et al., 1999).

Souza et al. (1998), ao cultivar tilápias nilóticas em tanques de dimensão média de 4,5 x 8,5 x 1,0 m de profundidade, com fundo de terra e paredes inclinadas, revestidas com tijolos em espelho, nas densidades 3; 6 e 9 peixes m⁻³, mostraram que ocorreu aumento dos teores de amônia no ambiente com a elevação da densidade de populacional de *O. niloticus* e encontrou menores valores de oxigênio dissolvido em maiores densidades de estocagem. Os valores de oxigênio dissolvido foram considerados toleráveis para a espécie cultivada no experimento, pois a tilápia do Nilo sobrevive em índices menores que 1,0 mg L⁻¹. Contudo, a sobrevivência dos peixes não descarta a possibilidade de alterações estruturais na morfologia dos tecidos das brânquias e do fígado em densidades populacionais inadequadas.

1.2 Histologia de brânquias

Em tilápias, como na maioria dos teleósteos, as brânquias constituem o principal órgão responsável pelas trocas gasosas, além de desempenharem papel essencial nos processos de osmorregulação, equilíbrio ácido-básico e excreção de compostos nitrogenados (Fontainhas-Fernandes et al., 2008; Tseng e Hwang, 2008; Torres et al., 2010).

Nas tilápias, as brânquias estão localizadas simetricamente ao lado da cavidade bucal e são constituídas por duas regiões bem delimitadas, os arcos branquiais e os filamentos branquiais. Quatro pares de arcos branquiais se estendem do piso até o teto da cavidade vestibular, estrutura constituída por tecido ósseo, coberto por uma membrana serosa, associado com músculos estriados abductor e adutor que facilitam o movimento das brânquias na respiração. Na membrana serosa passam os vasos sanguíneos que irrigam os filamentos e retornam o sangue nas trocas gasosas (Torres et al., 2010).

Cada arco branquial tem uma série de filamentos branquiais ou holobrânquias, cada um dos quais é constituído por duas metades, denominado de hemibrânquias, formadas pelas lamelas branquiais, que proporcionam uma grande superfície que suporta as funções respiratória e excretora. Filamentos branquiais são especializações constituídas por um suporte cartilaginoso central hialino, arteríolas aferentes e eferentes e outros vasos anastomosados, compreendendo o seio venoso central. Eles são cobertos com um epitélio plano simples e uma lâmina própria de tecido conjuntivo frouxo, contíguo com o revestimento de arcos branquiais e da mucosa oral da cavidade bucal. A evaginação do epitélio do filamento aumenta a área de superfície das brânquias e cada lamela é formada por um envelope de células apoiadas sobre uma membrana basal, suportadas por células pilares. Espaços entre células pilares, denominadas lacunas, conectam arteríolas aferentes e eferentes. A contratilidade de células pilares controlam o diâmetro lacunar regulando assim o fluxo de sangue (Genten et al., 2009; Torres, 2010)

Células de cloro, cercadas por células pavimentosas achatadas, podem ser observadas na junção entre as lamelas primárias e as secundárias; são estruturas-chave na troca iônica por meio das brânquias nos peixes teleósteos, secretam NaCl por meio de um gradiente eletroquímico pela ação de uma ATPase Na^+/K^+ e participam da regulação do balanço ácido base e processos de aclimatação no bombeamento de sal para dentro (Ca^{2+} e Cl^-) em água doce. Estas células coram fortemente com eosina e são

ricamente dotadas de mitocôndrias intrinsecamente relacionadas com uma rede tubular de retículo endoplasmático liso (Tseng e Hwang, 2008; Torres, 2010)

Outra população de células presentes nos filamentos branquiais é as células caliciformes produtoras de mucinas que produzem uma interface rica em muco entre os peixes e seu ambiente aquoso proporcionando proteção mecânica, além de participarem na regulação iônica e proteção imunológica, atuando como barreira contra agentes patógenos e substâncias tóxicas (Genten et al., 2009).

O epitélio da brânquia é a principal superfície de contacto com o ambiente e na presença de agentes estressores, as brânquias podem exibir modificações que são consideradas respostas de defesa, visto que algumas levam ao aumento da distância entre o meio externo e o meio interno, diminuindo a área da superfície em contato com o meio. Agentes estressores químicos, físicos ou biológicos induzem reações nos tecidos causando distúrbios circulatórios, como congestão, telangectasia, edema e a proliferação de células como a hiperplasia epitelial e de células mucosas, além de processos inflamatórios que podem levar a necrose dos tecidos (Garcia-Santos et al., 2007; Fontaínhas-Fernandes et al., 2008; Schram et al., 2010).

Telangectasia lamelar ou aneurisma é uma alteração característica dos sinusoides branquiais e está associada a traumas físicos ou químicos. Apresenta-se após manejos mais severos e pode estar associada com lesões parasitárias, resíduos metabólicos ou contaminantes químicos. Quando muitas lamelas são afetadas, a função respiratória pode diminuir especialmente em temperaturas altas, quando os níveis de oxigênio são baixos e a demanda metabólica é alta (Santos, 2010).

Vários estudos realizados com *O. niloticus* têm demonstrado que a exposição das brânquias a poluentes ambientais produzem alterações nos filamentos branquiais como o espessamento do epitélio filamentar, que podem advir da proliferação de células de cloro e de células indiferenciadas do epitélio. A proliferação celular pode conduzir à fusão parcial ou total das lamelas branquiais (Schwaiger et al., 1997; Garcia-Santos et al., 2007; Fontaínhas-Fernandes et al., 2008; Reis et al., 2009).

As alterações histológicas, por exemplo, a fusão lamelar, podem funcionar como mecanismos de defesa, diminuindo a área de superfície da brânquia ou, também, aumentando a barreira de difusão ao agente poluente ou estressor; entretanto, a maior dificuldade respiratória pode induzir à vasodilatação, podendo levar ao aparecimento de edemas e descolamento do epitélio branquial (Erkmen e Kolankaya, 2000). Em bagres africanos (*Clarias gariepinus*), Schram (2010) detectou alterações branquiais com o

aumento da concentração de amônia na água como o espessamento do epitélio interlamelar e lamelar e a conseqüente redução do espaço interlamelar, bem como hiperplasia basal com fusão lamelar, além do aumento da secreção de muco quando expostos a concentrações elevadas de NH_3 . Ainda nesse caso, houve aumento das células de cloro.

1.3 Histologia de fígado

O fígado da tilápia do Nilo (*O. niloticus*) é o maior órgão extramural e é formado por dois lóbulos que estão relacionados com o intestino. A vesícula biliar é bem desenvolvida e tem uma forma arredondada. O fígado de tilápias é constituído pelo estroma e pelo parênquima. O estroma recobre o órgão, protegendo-o e dele partem tabiques de tecido conjuntivo que fornecem sustentação ao órgão (Vicentini et al., 2005; Torres et al., 2010).

O parênquima é formado por dois componentes: o fígado e o pâncreas. O componente hepático é constituído pelos hepatócitos e um sistema de condutos que drenam a bile. Os hepatócitos são células poliédricas, grandes, geralmente com um núcleo central e nucléolos característicos, espalhados como cordões dispostos em duas camadas celulares, e rodeado por sinusoides. Os ductos biliares são geralmente encontrados perto da veia porta e eles são revestidos por epitélio cuboide simples (Vicentini et al., 2005; Genten et al., 2009; Torres et al., 2010).

Ainda no parênquima hepático identifica-se um tecido pancreático exócrino intra-hepático, com um arranjo acinar e difuso. O pâncreas, separado por cordões de hepatócitos por meio de uma camada delgada de septos de tecido conjuntivo, forma uma massa de células acinosserosas, de forma piramidal, núcleo arredondado e citoplasma contendo grânulos de zimogênio (Genten et al., 2009).

Semelhantes aos mamíferos, as funções do fígado incluem a assimilação de nutrientes, a produção de bile, desintoxicação, manutenção da homeostase metabólica do animal que inclui o processamento de carboidratos, proteínas, lipídios e vitaminas. O fígado também desempenha papel-chave na síntese de proteínas plasmáticas, como a albumina e fibrinogênio. A histologia do fígado varia entre espécies, mas existem características gerais que são encontradas na maioria das espécies. A estrutura hepática normalmente pode variar muito com o sexo, idade, alimentação disponível (especialmente no que diz respeito ao conteúdo de glicogênio e gordura), ou

temperatura, e com influência do sistema endócrino fortemente ligado ao meio ambiente regulados nas condições de criação (Genten et al., 2009).

Os hepatócitos podem ser considerados o primeiro alvo de toxicidade de uma substância, o que caracteriza o fígado como um órgão biomarcador da poluição ambiental (Zelikoff, 1998). Alterações como vacuolização dos hepatócitos, redução do estoque de glicogênio, inflamação, alteração no formato dos capilares sinusoides e neoplasmas podem ser interpretados como respostas ao estresse ambiental, sendo, considerados indicadores histopatológicos da qualidade do ambiente (Teh et al.1997;).

A histopatologia, integrada com outros métodos, como a bioquímica, a imunologia, avaliação de crescimento e diagnóstico de doenças, é utilizada para a avaliação dos efeitos ambientais como a qualidade da água e as condições de internas de peixes, resultantes, por exemplo, da nutrição. Em casos de uma nutrição inadequada, observam-se alterações histológicas no fígado, sendo comumente reconhecidos vacuolização dos hepatócitos, degeneração gordurosa do fígado, alterações na atividade metabólica, alterações no parênquima hepático e necrose (Rašković et al., 2011).

Referências

- Balarin, J.D.; Haller, R.D. 1982. The intensive culture of tilapia in tanks, raceways e cages. p. 267-355. In: Muir, J.F.; Roberts R.J., eds. Recent advances in aquaculture. Croom Helm, London, UK.
- Beveridge, M.C.M. 1996. Cage aquaculture. 2ed. Fishing News Books, Oxford, UK.
- Brandão, F.R.; Gomes, L.C.; Chagas, E.C.; Araújo, L.D. 2004. Stocking density of tambaqui juveniles during second growth phase in cages. Pesquisa Agropecuária Brasileira 39: 357-362 (in Portuguese, with abstract in English).
- El Khaldi, A.T.F. 2010. Effect of different stress factors on some physiological parameters of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). Saudi Journal of Biological Sciences 17: 241-246.
- Erkmen, B.; Kolankaya, D. 2000. Effects of water quality on epithelial morphology in the gill of *Capoeta tinca* living in two tributaries of Kizilirmak River, Turkey. Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology 64: 418-425.
- Fontainhas-Fernandes, A.; Luzio, A.; Garcia-Santos, S.; Carrola, J.; Monteiro, S. 2008. Gill histopathological alterations in Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*, exposed to treated sewage water. Brazilian Archives of Biology e Technology 51: 1057-1063.
- Garcia-Santos, S.; Monteiro, S.M.; Carrola, J.; Fontainhas-Fernandes, A. 2007. Histological alterations in gills of Nile tilapia *Oreochromis niloticus* caused by cadmium. Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia 59: 376-381 (in Portuguese, with abstract in English).
- Genten, F.; Terwinghe, E.; Danguy, A. 2009. Atlas of fish histology. Science Publishers, Enfield, NH, USA.
- Kubitza, F. 1997. Nutrição e alimentação dos peixes. Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba, SP, Brazil.
- Lambert, Y.; Dutil, J.D. 2001. Food intake and growth of adult Atlantic cod (*Gadus morhua* L.) reared under different conditions of stocking density, feeding frequency and size-grading. Aquaculture 192: 133-147.
- Mallat, J. 1985. Fish gill structural changes induced by toxicants and other irritants: a statistical review. Canadian Journal of Fisheries e Aquatic Sciences 42: 630-648.
- Ministério da Pesca e Aquicultura [MPA]. 2011. Fisheries and Aquaculture Statistical Bulletin = Boletim Estatístico da Pesca e Aquicultura. Available at: <http://www.mpa.gov.br/index.php/informacoes-e-estatisticas/estatistica-da-pesca-e-aquicultura>. [Accessed Feb 28, 2014] (in Portuguese)
- Monteiro, S.M.; Mancera, J.M.; Fontainhas-Fernandes, A.; Sousa, M. 2005. Copper induced alterations of biochemical parameters in the gill and plasma of *Oerochromis niloticus*. Comparative Biochemistry Physiology. Part C. Toxicology & Pharmacology 141: 375-383.

- North, B.P.; Turnbull, J.F.; Ellis, T.; Porter, M.J.; Migaud, H.; Bron, J.; Brounage, N.R. 2006. The impact of stocking density on the welfare of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture* 255: 466-479.
- Oba, E.T.; Mariano, W.S.; Santos, L.R.B. 2009. Stress in farmed fish: mitigating and aggravating for the profitable management = Estresse em peixes cultivados: agravantes e atenuantes para o manejo rentável. p. 226-247. In: Tavares-Dias, M., ed. Management and health of fish farming = Manejo e sanidade de peixes em cultivo. EMBRAPA, Macapá, AP, Brazil (in Portuguese).
- Paiva, M.; Mainardes-Pinto, C.S.R.; Verani, J.R., Silva, A.L. 2008. Production of thailand tilapia *Oreochromis niloticus*, stocked at different stocking densities in small cages placed in fish farm ponds populated with the same specie and not populated. *Boletim do Instituto de Pesca* 34:79-88 (in Portuguese, with abstract in English).
- Philippart, J.C.; Ruwet, J.C. 1982. Ecology and distribution of tilapias. p. 15-59. In: Pullin, R.S.V.; Lowe McConnell, R.H., eds. Biology and culture of tilapias. ICLARM, Manila, PHL.
- Popma, T.J.; Lovshin, L.L. 1995. Worldwide prospects for commercial production of tilapia. International Center for Aquaculture and Aquatic Environments. Auburn, AL, USA.
- Rašković, B.S.; Stanković, M.B.; Marković, Z.Z.; Poleksić, V.D. 2011. Histological methods in the assessment of different feed effects on liver and intestine of fish. *Journal of Agricultural Sciences* 56: 87-100.
- Reis, A.B.; Sant'ana, D.M.G.; Azevedo, J.F.; Merlini, L.S.; Araújo, E.J.A. 2009. The influence of the aquatic environment in tanks sequentially interconnected with PVC pipes on the gill epithelium and lamellas of tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Pesquisa Veterinária Brasileira* 29: 303-311 (in Portuguese, with abstract in English).
- Resende, E.K. 2009. Research in network in aquaculture: technological basis for sustainable development of aquaculture in Brazil. *Aquabrazil. Revista Brasileira de Zootecnia* 38: 52-57 (in Portuguese, with abstract in English).
- Sampaio, J.M.C.; Braga, L.G.T. 2005. Raising tilapias in net-cages at Ribeirão de Salomea's dam – Floresta Azul – Bahia. *Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal* 6: 42-52 (in Portuguese, with abstract in English).
- Santos, D.M.S. 2010. Water quality and fishes organs histopatology originated from Itapecuru Mirim, Maranhão fish farm pounds = Qualidade da água e histopatologia de órgãos de peixes provenientes de criatórios do município de Itapecuru Mirim, Maranhão. Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, SP, Brazil. Available at: <http://www.fcav.unesp.br/download/pgtrabs/pan/d/127.pdf>. [Accessed Aug 22, 2011] (in Portuguese).
- Schmittou, H.R. 1993. High density fish culture in low volume cages. American Soybean Association, Singapore, SGP.
- Schram, E.; Roques, J.A.C.; Wout Abbin, W.; Spanings, T.; Vries, P.; Biermana, S.; Vis, H.; Flik, G. 2010. The impact of elevated water ammonia concentration on physiology, growth and feed intake of African Catfish (*Clarias gariepinus*). *Aquaculture* 306: 108-115.
- Schwaiger, J.; Adam, S.; Pawert, M.; Honnen, W.; Triebkorn, R. 1997. The use of histopathological indicators to evaluate contaminant-related stress in fish. *Journal of Aquatic Ecosystem Stress e Recovery* 6: 75-86.
- Souza, M.L.R.; Castagnolli, N.; Kronka, S.N. 1998. Influence of stocking densities and aeration systems on Nile tilapia (*Oreochromis niloticus* Linnaeus, 1757). *Acta Scientiarum* 20: 387-393 (in Portuguese, with abstract in English).

- Teh, S.J.; Adams, S.M.; Hinton, D.E. 1997. Histopathological biomarkers in feral freshwater fish populations exposed to different types of contaminant stress. *Aquatic Toxicology* 37: 51-70.
- Torres, R.G.A.; González, P.S.; Peña, S.E. 2010. Anatomical, Histological and Ultrastructural Description of the Gills and Liver of the Tilapia (*Oreochromis niloticus*). *International Journal of Morphology* 28: 703-712 (in Spanish, with abstract in English).
- Tseng, Y.C.; Hwang, P.P. 2008. Some insights into energy metabolism for osmoregulation in fish. *Comparative Biochemistry e Physiology* 148: 419-429.
- Val, A.L.; Menezes, A.C.L.; Ferreira, M.S.; Silva, M.N.P.; Araújo, R.M.; Almeida-Val, V.M.F. 2006. Stress in fish: built for survival and adaptation responses = Estresse em peixes: respostas integradas para a sobrevivência e a adaptação. p. 211-228. In: Souza-Silva, A.T., ed. *Health of Aquatic Organisms in Brazil = Sanidade de Organismos Aquáticos no Brasil*. ABRAPOA, Maringá, PR, Brazil (in Portuguese).
- Vicentini, C.A.; Franceschini-Vicentini, I.B.; Bombonato, M.T.S.; Bertolucci, B.; Lima, S.G.; Santos, A.S. 2005. Morphological study of the liver in the teleost *Oreochromis niloticus*. *International Journal of Morphology* 23: 211-216.
- Zelikoff, J.T. 1998. Biomarkers of immunotoxicity in fish e other non-mammalian sentinel species predictive value for mammals. *Toxicology. Limerick* 129: 63-71.
- Zimmermann, S.; Hasper, T.O.B. 2003. Fish farming in Brazil: the process of intensification of tilapia = Piscicultura no Brasil: o processo de intensificação da tilapicultura. SBZ, Santa Maria, MG, Brazil. Available at: <http://www.sbz.org.br/reuniaoanual/anais/> [Accessed Aug 22, 2011] (in Portuguese).

II – OBJETIVOS GERAIS

O presente estudo teve o objetivo de analisar as alterações teciduais em brânquias e fígado de tilápias do Nilo, *Oreochromis niloticus*, em diferentes densidades de estocagem, cultivadas em tanques-rede, no rio do Corvo - PR.

III – Análise da histologia hepática e branquial em tilápia do nilo (*Oreochromis niloticus*) cultivadas em diferentes densidades em tanques-rede, no rio do Corvo-PR

RESUMO

O estudo teve como objetivo analisar as alterações teciduais em brânquias e fígado de tilápias do Nilo, *Oreochromis niloticus*, cultivadas em tanques rede de 6,0 m³ em diferentes densidades de estocagem: 500, 1.000 e 1.500 peixes/tanque. Utilizou-se delineamento experimental inteiramente casualizado, com três tratamentos e 12 repetições. Registros limnológicos foram tomados a cada 15 dias. Cortes de 6,0 µm de espessura de amostras de fígado foram coradas pelo método de coloração Hematoxilina-Eosina - HE. Parte das amostras de brânquias foi corada pelo HE para análise morfológica de alterações branquiais e outra, submetida à técnica histoquímica *Alcian Blue* + ácido periódico de Schiff - PAS. As condições limnológicas encontravam-se nos padrões para o cultivo da espécie. Houve uma diminuição significativa na quantidade de células produtoras de mucinas ácidas inversamente à densidade de estocagem, contudo não ocorreram diferenças significativas na quantidade de células produtoras de mucinas neutras entre os tratamentos, em menor quantidade que as ácidas. Ocorreram diferenças significativas na presença de elevação epitelial, fusão lamelar, hiperplasia de células epiteliais, sendo que os tanques com 500 peixes apresentaram valores médios inferiores dessas alterações e maior valor médio de telangectasias. A análise das variáveis morfométricas dos hepatócitos, em geral, não mostrou diferenças estatísticas significativas entre os tratamentos. As análises dos tecidos possibilitaram verificar a sanidade dos tecidos hepático e branquial de tilápias do Nilo cultivadas em diferentes densidades de estocagem.

Palavras-chave: desempenho, mucinas, alterações branquiais, hepatócitos

Liver and gill histological analysis in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) cultured at different densities in net- tanks in the river corvo in Paraná state

ABSTRACT

The study analyzed the tissue changes in gills and liver of Nile tilapia, (*Oreochromis niloticus*) grown in net tanks of 6.0 m³ at different stocking densities: 500, 1000 and 1500 fish/tank. We used a completely randomized design with three treatments and 12 replications. Limnological parameters were measured every 15 days. Sections of 6.0 µm thick of liver were stained by hematoxylin-eosin method (HE). Portions of the gills were stained by HE for morphological analysis of gill changes as the others were submitted to histochemical technique Alcian Blue + PAS. Limnological conditions were within the standards for species growing. The higher storage density present a significant decrease in the quantity of cells producing acid mucin, however there were no significant differences in the quantity of cells producing neutral mucin among treatments which also were in less quantity than acids. There were significant differences in the presence of epithelial lifting, lamellar fusion, hyperplasia of epithelial cell and tanks with 500 fish had lower average values of these changes and higher mean of telangiectasia.. The analysis of morphometric data of hepatocytes, in general, showed no statistically differences among treatments. Analyses of tissues allowed observing the health of liver and gill tissues of tilapia grown in different stocking densities.

Keywords: performance, mucins, gill changes, hepatocytes

Introdução

O manejo adequado, que atestem a sanidade dos organismos aquáticos utilizados na alimentação humana, tem sido objeto de estudos nas últimas décadas, na busca de atender um mercado cada vez mais preocupado com a oferta de produtos com garantias sanitárias, ambientais e sociais na produção (Ostrensky, 2007; Resende, 2009).

Entre os organismos aquáticos, destaca-se a produção de peixes, um empreendimento em franca expansão em um país de clima favorável e um grande potencial hídrico, além de áreas disponíveis para a implantação da piscicultura industrial (Bozano, 2002). Atualmente, na América do Sul, o Brasil tem-se destacado pela forte expansão e contínuo crescimento da aquicultura, com destaque para a produção de peixes (57,9%), seguida pela produção de crustáceos e moluscos, que totalizam conjuntamente 42,1% (FAO, 2012).

No Brasil, a intensificação nos sistemas de produção aquícola nacional de origem continental teve um incremento de 38%, sendo a tilápia a espécie mais cultivada, representando 46,62% da produção nacional de pescado da aquicultura continental, no período de 2010 a 2011 (MPA, 2011).

Nesse contexto, com a intensificação nos sistemas de produção, a sanidade de organismos aquáticos passou a ter grande importância. Buscar o equilíbrio dos sistemas, entre os organismos cultivados, organismos oportunistas e patógenos e o ambiente requer a incorporação de formas de prevenção para a melhoria do sistema de produção. Diferentes métodos de validação do estado sanitário dos organismos aquáticos podem levar à melhoria do desempenho, com aumento significativo da produtividade. Entre estes métodos, o diagnóstico parasitológico, hematológico e histopatológico, integrado com a nutrição, manejo do cultivo, monitoramento ambiental e outros fatores componentes do sistema produtivo apresentam-se como ferramentas para a análise e prevenção da sanidade dos organismos cultivados (Resende, 2009; Sampaio et al., 2013).

O desempenho produtivo depende das características sanitárias e estruturais do animal. Um peixe sem alterações morfológicas teciduais pode representar ganho em peso, menor tempo de crescimento e melhor aproveitamento do alimento. O manejo, como densidades populacionais, específico para cada tipo de sistema de produção e condições ambientais pode levar a modificações estruturais de órgãos de

peixes, principalmente em sistemas de confinamento como tanques-rede, que, em primeira instância pode não mostrar alterações de produtividade (Mallat, 1985; Monteiro et al., 1999).

As lesões histológicas são indicadores da saúde e estresse ambiental (Santos, 2010) e, no que tange às brânquias, nos peixes teleósteos, o íntimo contato com a água faz esse órgão responder a quaisquer modificações do meio aquático, sejam estressores químicos, físicos ou biológicos (Arellano et al., 1999). Esses agentes induzem reações nos tecidos causando distúrbios circulatórios, como congestão, telangectasia, edema e a proliferação de células como a hiperplasia epitelial e de células mucosas, além de processos inflamatórios que podem levar à necrose dos tecidos (Garcia-Santos et al., 2007; Fontáinhas-Fernandes et al., 2008; Schram et al., 2010).

Os hepatócitos podem ser considerados o primeiro alvo de toxicidade de uma substância, o que caracteriza o fígado como um órgão biomarcador da poluição ambiental (Zelikoff, 1998). Alterações como vacuolização dos hepatócitos, redução do estoque de glicogênio, inflamação, alteração no formato dos capilares sinusoides e neoplasmas podem ser interpretados como respostas ao estresse ambiental, sendo, considerados indicadores histopatológicos da qualidade do ambiente (Teh et al., 1997).

A realização deste estudo teve como objetivo a análise das alterações teciduais em brânquias e fígado de tilápias do Nilo, *O. niloticus*, em diferentes densidades de estocagem, cultivadas em tanques-rede.

Material e Métodos

O estudo foi realizado no rio do Corvo, afluente do rio Paranapanema, tributário do reservatório da hidrelétrica de Rosana e delimita os municípios de Diamante do Norte e Terra Rica no Estado do Paraná com acesso no km 52 da PR 557 (Figura 1). O experimento foi realizado num período de 110 dias a partir da sua implantação, em setembro de 2011.



Figura 1 – Localização da estação experimental da Universidade Estadual de Maringá, no rio do Corvo (52°45'W; 22°45'S), município de Diamante do Norte, Paraná, Brasil. Fonte: Google Maps modificado.

Para a análise histológica de brânquias e de fígado, a unidade experimental foi o peixe, utilizando delineamento inteiramente casualizado com três tratamentos e 12 repetições. Os tratamentos foram constituídos por diferentes densidades de estocagem: 500 peixes/tanque (83 peixes m^{-3} ; TR500), 1.000 peixes/tanque (167 peixes m^{-3} ; TR1000) e 1.500 peixes/tanque (250 peixes m^{-3} ; TR1500). Foram distribuídas 18.000 tilápias do Nilo pós-revertidas, da linhagem GIFT (*Genetic Improvement of Farmed Tilapia*), provenientes da piscicultura Sgarbi (Palotina-PR), com peso médio vivo inicial de $81,32 \text{ g} \pm 4,70$, denominadas de peixes iniciais (PI).

Foram analisadas as alterações histológicas em brânquias e fígado resultante do manejo de três diferentes densidades de estocagem (500, 1.000 e 1.500 peixes por tanque-rede), em tanques-rede com capacidade de $6,0 \text{ m}^3$ úteis (dimensões de 2 m/2 m/1.70 m).

Os tanques utilizados apresentam estrutura de alumínio, recobertas de telas de arame galvanizado, revestidos com PVC, malha de 3/4 de polegada, com cobertura e boias de flutuação.

Os tanques-rede foram dispostos conforme esquema a seguir (Figura 2), organizados em baterias de dois tanques, com espaçamento de 2,0 m entre si. Foram dispostas nove baterias distantes 40 m entre si.

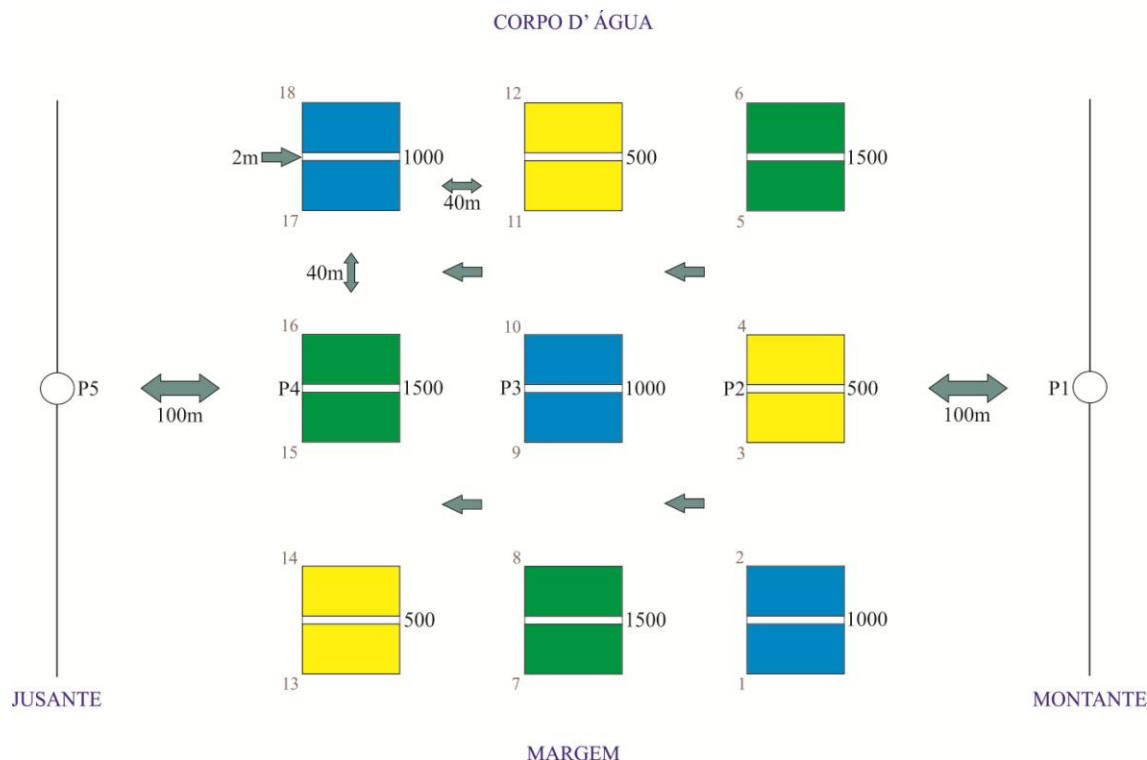


Figura 2 – Desenho esquemático da distribuição dos 18 tanques-rede no delineamento experimental e dos pontos (P1 a P5) de amostragem das variáveis limnológicas no rio do Corvo. P1: área sem cultivo de peixe a montante; P2: densidade de 83 peixes m^{-3} ; P3: densidade de 167 peixes m^{-3} ; P4: densidade de 250 peixes m^{-3} e P5: área sem cultivo de peixe a jusante.

Até uma semana anterior ao início do experimento os peixes foram alimentados com ração comercial com 40% de proteína bruta e após a distribuição nos tanques-rede com diferentes densidades até a despesca dos animais, com ração comercial com 32% de proteína bruta e granulometria de 8 mm. A dieta obedeceu às normas de manejo aplicado na Estação Experimental do rio do Corvo da Universidade Estadual de Maringá, ofertadas duas vezes ao dia (às 9 h e às 17 h), em quantidade determinada no início e durante o experimento, em função da biomassa total do tanque e da temperatura da água.

Foram realizados registros de parâmetros ambientais físicos e químicos em um intervalo aproximado de 15 dias durante o período experimental, tomando-se as medidas da transparência da água, mensurada com um disco de Secchi às 14 h; temperatura ($^{\circ}C$), oxigênio dissolvido ($mg L^{-1}$) mensurados com um oxímetro F-1050 YSI; pH obtido com um pHmetro portátil Master F-1002 e condutividade elétrica obtida com um condutivímetro modelo CD-860, sendo estas determinadas *in situ*. Foram tomadas medidas em três níveis de profundidade da coluna d'água: superfície (20 cm), intermediário (2 m) e fundo (entre 6 a 9 m) em três pontos próximos à linha mediana da

localização dos tanques-rede em relação à margem do rio e dois pontos distantes 100 m dos tanques tanto a montante quanto a jusante.

Na implantação do experimento, oito tilápias do Nilo (*O. niloticus*) foram sacrificadas por secção da medula cervical, após serem anestesiadas com benzocaína (1 g/10 mL de álcool/10L de água) (Stoskopf, 1993). O fígado e os arcos branquiais foram removidos, lavados em solução fisiológica (NaCl 0,9%) e processadas as amostras de fígado (porção mediana do lobo esquerdo) e brânquias (segundo arco branquial direito).

Ao final do período experimental, tanto para a análise da morfometria do fígado como para a análise das alterações branquiais e quantidade de células mucosa foram retirados 12 peixes por tratamento (2 peixes/repetição), totalizando 36 peixes, dos quais foram coletados os materiais para as análises.

As amostras foram fixadas em solução de *Bouin* aquoso (BEHMER, 1976) e posteriormente transferidas para frascos contendo álcool 70% para conservação do material.

As análises histológicas do fígado e das brânquias foram realizadas no Laboratório de Histotécnica Animal do Departamento de Morfologia da Universidade Estadual de Maringá. A preparação do fígado e das brânquias foi realizada segundo a rotina do laboratório.

O material foi desidratado pelas passagens em séries crescentes de alcoóis, diafanizado em xilol e incluído em parafina, para a obtenção de cortes transversais semisseriados, com 6,0 µm de espessura para o fígado e brânquias, com auxílio de micrótomo rotativo LEICA, no Laboratório de Histotécnica Animal do Departamento de Morfologia da Universidade Estadual de Maringá.

Amostras do fígado foram processadas e coradas pelo método de Hematoxilina e Eosina - HE (Behmer et al., 1976) para análise da área dos hepatócitos, posição do núcleo (centralizado ou periférico), vacuolização do citoplasma hepático e determinação do número de hepatócitos por área.

Para a análise da vacuolização utilizou-se o método semiquantitativo, adaptado em escala crescente de valores médios de vacuolização (VMV):

Nível 1 = vacuolização leve.

Nível 2 = vacuolização moderada e pontual.

Nível 3 = vacuolização severa e extensa.

Foram avaliadas 20 imagens por animal, totalizando 240 imagens por tratamento, conferindo a cada imagem um nível de vacuolização, das quais foi calculado o valor médio de níveis de vacuolização para o tratamento. O mesmo procedimento foi realizado para oito peixes iniciais (160 imagens) na implantação do experimento a fim de verificar o estado de vacuolização dos hepatócitos.

Estas avaliações foram realizadas com auxílio de software de análise de imagem *Image Pro Plus*[®] (version 4.5, Media Cybernetics, USA).

As análises morfométricas dos hepatócitos, independente da técnica, foram realizadas a partir de imagens capturadas em microscópio óptico Olympus BX41 acoplado com câmera QColor 3 Olympus, utilizando objetiva de 40X em quatro imagens por corte (20 imagens/animal), totalizando 240 imagens/tratamento. De cada imagem foi mensurada a área de 50 hepatócitos (1.000 hepatócitos/animal), perfazendo 12.000 hepatócitos/tratamento. Foi determinado o número de hepatócitos da área total de 240 imagens/tratamento, subtraída a área ocupada pela veia central. Nessas imagens foi observada a posição do núcleo dos hepatócitos (periférica ou centralizada) e a vacuolização do citoplasma. A área total da imagem foi 14081,50 μm^2 , da qual se subtraíram 1385,02 μm^2 da área ocupada pela veia central, obtendo-se a área útil utilizada para as medições de 12696,48 μm^2 .

Amostras das brânquias foram coradas pelo método usual de Hematoxilina-Eosina – HE (Behmer et al., 1976), para análise morfológica e verificação de possíveis alterações branquiais utilizando o método semiquantitativo proposto por Schwaiger et al. (1997), adaptado em escala crescente de valores médios de alteração (VMA), dependendo do grau de severidade das lesões, descritas por Mallatt (1985), de acordo com a seguinte escala:

Nível 1 = nenhuma alteração histológica.

Nível 2 = alterações leves.

Nível 3 = alterações moderadas e pontuais.

Nível 4 = alterações severas e extensas.

Com base nesta escala, um valor médio de alteração histológica (VMA) foi conferido para cada animal. A partir dos dados individuais foi calculada a média de VMA para cada tratamento. A ocorrência e frequência das alterações: hiperplasia, fusão lamelar, elevação epitelial e telangectasia foram analisadas em quatro cortes histológicas por animal (36 cortes por tratamento), em microscópio de luz (Olympus CX31RBSFA) e objetiva de 40X.

Parte das amostras foram submetidas à técnica histoquímica *Alcian Blue* + ácido periódico de Schiff (PAS) modificada (*Alcian Blue* pH 2,5), para a evidência das células produtoras de mucinas neutras e mucinas ácidas e posterior análise quantitativa. Esta análise foi realizada a partir de imagens capturadas em microscópio óptico Olympus BX41 acoplado com câmera QColor 3 Olympus, utilizando objetiva de 40X. Para avaliar o número de células mucosas utilizou-se toda a extensão de um filamento branquial intacto, dividido em três regiões: proximal ao rastelo, denominada de região basal (B); em posição intermediária (I) e a região mais distal do rastelo, denominada apical (A), obtendo-se sete imagens/região em cada corte, totalizando 28 imagens por região e 84 imagens/animal, perfazendo um total de 1.008 imagens/tratamento. Estas medidas foram realizadas com auxílio de software de análise de imagem *Image Pro Plus*[®] (version 4.5, Media Cybernetics, USA).

As análises estatísticas foram executadas no programa de análise estatística R (versão 3.0.2). Foi aplicado o teste de normalidade Shapiro-Wilk para cada variável para a verificação da normalidade dos dados obtidos.

Nos dados, quando apresentado normalidade, foi aplicado o modelo linear generalizado com distribuição de Gauss e submetidos à análise de variância-Anova, para cada variável resposta em nível de 5% de significância. Quando não apresentou normalidade foi aplicada a distribuição de Poisson e teste qui-quadrado. Os dados foram analisados a 5% de probabilidade.

Para a análise estatística dos valores médios de alterações (VMA) em filamentos branquiais utilizou-se a distribuição Gamma e teste F, a 5% de significância.

O protocolo do projeto foi aprovado pelo Comitê de Conduta Ética no Uso de Animais em Experimentação da Universidade Estadual de Maringá pelo parecer nº 057/2012, emitido em abril de 2012.

Resultados e Discussão

Os valores médios dos parâmetros ambientais físicos e químicos no período do experimento encontram-se na faixa considerada adequada para o cultivo da tilápia do Nilo (*O. niloticus*) (Popma e Lovshin 1996; Kubitza 2000; Ribeiro 2001; Marengoni 2006) (Tabela 1).

Tabela 1 – Média \pm desvio-padrão (DP) dos parâmetros ambientais físicos e químicos no período execução do experimento.

Variável	Área amostrada
	Média \pm DP
Profundidade (m)	7,5 \pm 0,7
Temperatura (°C)	24,9 \pm 2,9
pH	6,8 \pm 0,4
Condutividade elétrica (μ S cm ⁻¹)	0,05 \pm 0,04
Oxigênio (mg L ⁻¹)	5,5 \pm 1,2

O crescimento de tilápias é influenciado pela genética, bem como a quantidade e qualidade dos alimentos, a qualidade da água, a temperatura da água, o sexo, a idade, o tamanho, a saúde e densidade (Popma e Lovshin, 1995).

As interações biológicas no sistema de produção intensiva, como a produção de tilápias em tanques-rede, podem levar esses animais a uma situação de estresse crônico, resultantes da utilização de altas densidades de estocagem. Esse fator somado à deterioração da qualidade da água por produtos químicos ou produtos da excreção dos animais pode trazer efeitos danosos à saúde do peixe e causar alterações e lesões histológicas, além de aumentar a susceptibilidade do animal a doenças infecciosas (Oba et al., 2009). O monitoramento de variáveis físico-químicas e biológicas de qualidade da água, da qualidade dos sedimentos e da fauna macrobentônica, associado a técnicas de monitoramento do desempenho zootécnico, a avaliação de biomarcadores fisiológicos e a dinâmica de contaminantes nos diferentes sistemas são partes da organização espacial e da dimensão manejo, nutrição e sanidade na aquicultura (Sampaio et al., 2013) que pode minimizar os efeitos de uma situação de estresse num empreendimento aquícola.

A sanidade em peixes pode ter como indicadores o controle e registro de sintomas aparentes e comportamentais (Sampaio et al., 2013). Iwama (1998) afirmou que respostas comportamentais e fisiológicas a um estressor estão intimamente relacionadas e, em resposta a um estressor, como manipulação ou aglomeração (altas densidades de estocagem, por exemplo), o peixe desencadeará alterações bioquímicas e fisiológicas para compensar o desafio imposto, cujas alterações têm sido classificadas como respostas primária (rápida liberação de hormônios do estresse, como catecolaminas e cortisol, na circulação), secundárias (hormônios do estresse ativam vias metabólicas que resultam em alterações na química do sangue e hematológica) e terciária (mudanças inteiras de animais pode ocorrer como resultado da demanda de energia reforçada associada com o estresse).

Em tilápias, como na maioria dos teleósteos, as brânquias constituem o principal órgão responsável pelas trocas gasosas, além de desempenharem papel essencial nos processos de osmorregulação, equilíbrio ácido-básico e excreção de compostos nitrogenados (Fontainhas-Fernandes et al., 2008; Tseng e Hwang, 2008; Torres et al., 2010).

Para conservar as funções fisiológicas quando ocorrem mudanças no meio, os peixes podem desenvolver estratégias adaptativas como alterações morfológicas da brânquia, como, por exemplo, hiperplasia de células produtoras de muco, que contribuem para a proteção do animal em relação às flutuações dos parâmetros do ambiente aquático. A densidade de estocagem pode afetar as interações biológicas entre os animais, alterando a quantidade das células produtoras de muco, sendo, portanto passível a análise dessa forma de proteção. Breseguelo et al. (2004), analisando a produção de mucinas em brânquias de peixe guaru (*Poecilia vivipara*), constataram que alterações do epitélio branquial podem indicar uma adaptação ao meio para o retorno a homeostasia, caracterizando mais uma proteção às superfícies teciduais.

Os valores obtidos para o número de células produtoras de muco no experimento mostrou que, de forma geral, células produtoras de mucinas ácidas encontravam-se em maior quantidade que células produzindo mucinas neutras (Tabela 2). Esse fator pode ser um indicativo das condições ambientais adequadas ao cultivo da tilápia do Nilo, considerando que as mucinas ácidas são mais solúveis que as neutras quando a qualidade da água não se encontra alterada (Myers et al., 2008; Reis et al., 2009).

Tabela 2 – Média \pm desvio-padrão do número de células mucosas, produtoras de mucinas ácidas e de mucinas neutras, presentes na região apical, intermediária e basal de filamentos branquiais de tilápias do Nilo em peixes iniciais (PI) e cultivadas em densidades de 500, 1.000 e 1.500 peixes/tanque rede com capacidade útil de 6,0 m³.

Posição	Ácidas			
	PI	TR500	TR1000	TR1500
A	709,87 \pm 181,27 ^a	1035,41 \pm 592,54 ^{Aa}	915,08 \pm 276,92 ^{Ba}	789,33 \pm 307,33 ^{Ca}
I	495,25 \pm 145,89 ^b	623,41 \pm 328,36 ^{Ab}	549,91 \pm 301,11 ^{Bb}	494,00 \pm 165,83 ^{Cb}
B	469,25 \pm 173,22 ^b	518,25 \pm 252,88 ^{Ac}	483,16 \pm 256,91 ^{Bb}	379,75 \pm 153,25 ^{Cc}
Total	1674,37 \pm 421,78	2177,07 ^A	1948,15 ^B	1663,08 ^C
Posição	Neutras			
	PI	TR500	TR1000	TR1500
A	338,12 \pm 184,21 ^a	491,83 \pm 126,97 ^{Aa}	406,66 \pm 156,82 ^{Aa}	513,58 \pm 96,37 ^{Aa}
I	180,25 \pm 62,98 ^b	265,00 \pm 89,29 ^{Cb}	354,83 \pm 131,11 ^{Ab}	322,08 \pm 93,54 ^{Bb}
B	185,87 \pm 76,29 ^b	248,41 \pm 62,19 ^{Ac}	307,25 \pm 71,94 ^{Ac}	256,66 \pm 68,86 ^{Ac}
Total	704,25 \pm 310,11	1005,24 ^A	1068,74 ^A	1092,32 ^A

Na mesma linha, médias com letras maiúsculas diferentes indicam diferenças significativas (P<0,05).

Na mesma coluna, médias com letras minúsculas diferentes indicam diferenças significativas (P<0,05).

A: Ápice; I: Intermediário; B: Basal.

No presente estudo, houve uma diminuição significativa na quantidade de células produtoras de mucinas ácidas inversamente proporcionais à densidade de estocagem. Portanto, as trocas gasosas em TR500 são mais eficientes que em TR1000 e esse, por sua vez, mais que em TR1500, pois células produtoras de mucinas ácidas nas brânquias produzem muco mais fluido, permitindo maior interação entre o epitélio branquial e o meio aquático (Reis et al., 2009).

A comparação da quantidade de células produtoras de mucinas ácidas e neutras, quando consideradas as regiões do filamento branquial (Figura 3) mostrou maior quantidade na região apical e uma tendência à diminuição desse número em direção à região basal, que corroboram a maior interação da região apical do epitélio branquial com o meio aquático (Tabela 2).

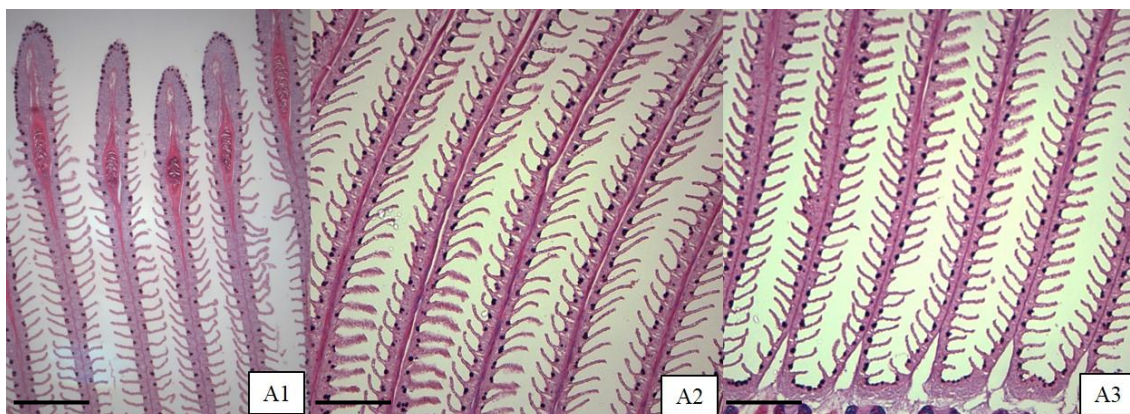


Figura 3 – Regiões de filamentos branquiais normais. A1. região apical; B2. região intermediária; C3. região basal. PAS+Alcian Blue; 20X (Barra=10 μ m).

As mucinas neutras são mais densas que as mucinas ácidas, promovendo maior proteção e lubrificação das células epiteliais branquiais em ambientes contendo substâncias abrasivas, tóxicas ou irritantes (Shiraishi et al., 2009). As boas condições ambientais podem ser confirmadas ao se observar que não houve diferenças significativas no total de células produtoras de mucinas neutras nos diferentes tratamentos (Figura 4).

Lima et al. (2006) mostraram que em sistemas de cultivo intensivo, a elevação das densidades de animais e o manejo exigido pela atividade ocasionam estresse, podendo interferir no desempenho dos peixes e consideraram ainda, que entre as respostas ao estresse, os peixes podem aumentar a demanda de absorção de oxigênio pelas brânquias, em função do aumento da taxa de ventilação, estimulando o fluxo branquial e a capacidade de difusão do oxigênio, principalmente, pelas catecolaminas circulantes (adrenalina e

noradrenalina), liberadas na circulação em condições que requerem um incremento no transporte de oxigênio do sangue e na mobilização de substratos energéticos, como da glicose hepática e de ácidos graxos livres.

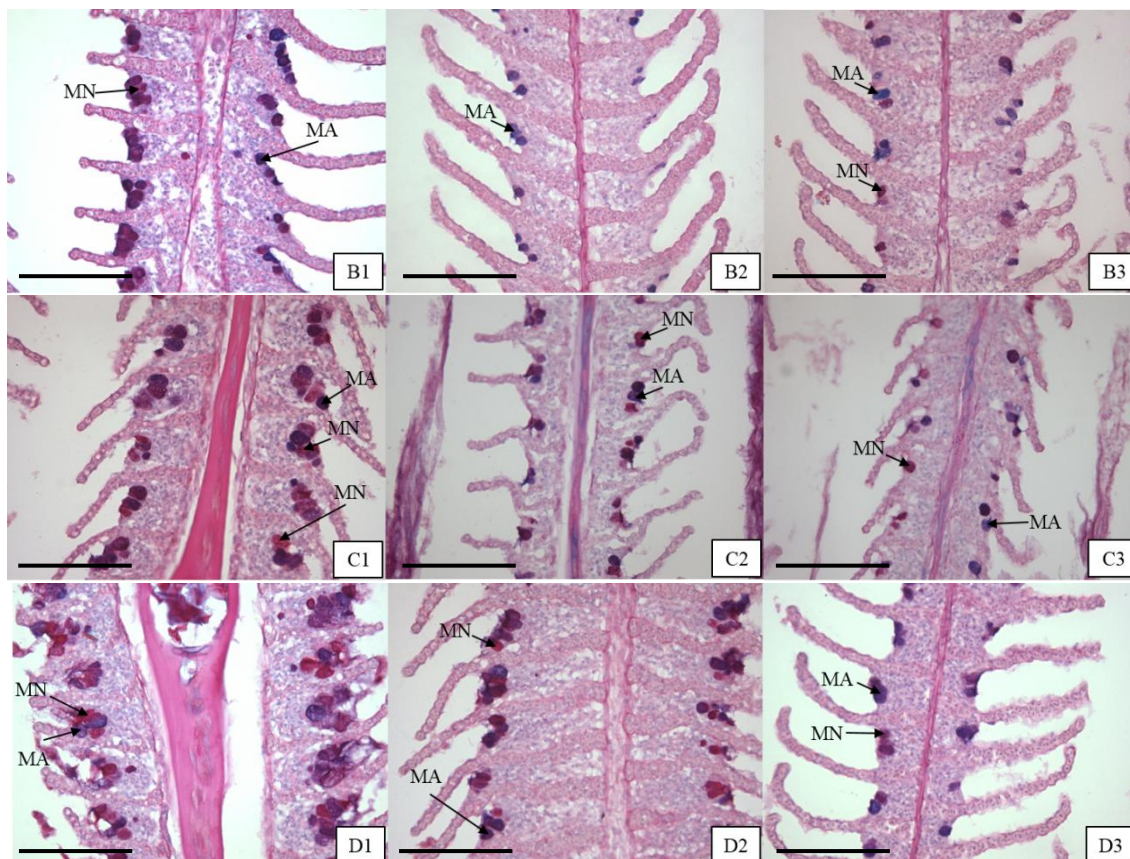


Figura 4 – Células produtoras de mucinas ácidas (MA) e células produtoras de mucinas neutras (MN) das regiões de um filamento branquial; TR500: B1: região apical. B2: região intermediária. B3: região basal. PAS + Alcian Blue, 40X (Barra = 10 μ m); TR1000: C1: região apical. C2: região intermediária. C3: região basal. PAS + Alcian Blue, 40X (Barra = 10 μ m); TR1500: D1: região apical. D2: região intermediária. D3: região basal. PAS + Alcian Blue, 40X (Barra = 10 μ m).

A realocação de energia é o mecanismo de adaptação ao estresse agudo quanto no estresse crônico; essa realocação ocorre em direção às atividades de restauração da homeostase, como respiração, locomoção, balanço hidromineral e reparação de tecidos em detrimento às atividades de alta demanda energética, como a reprodução e crescimento (Lima et al., 2006). Mallat (1985) apontou que, dependendo da severidade do processo, as funções branquiais poderão ser comprometidas.

A quantidade total de células produtoras de mucinas ácidas em brânquias retiradas de peixes iniciais, próxima ao valor encontrado em TR1500, pode ser pelo estresse que esses indivíduos foram submetidos durante o transporte e a implantação do experimento.

Os valores médios das alterações histológicas (Figura 5) na análise dos filamentos branquiais de tilápia do Nilo mostraram diferenças significativas entre os tratamentos (Tabela 3).

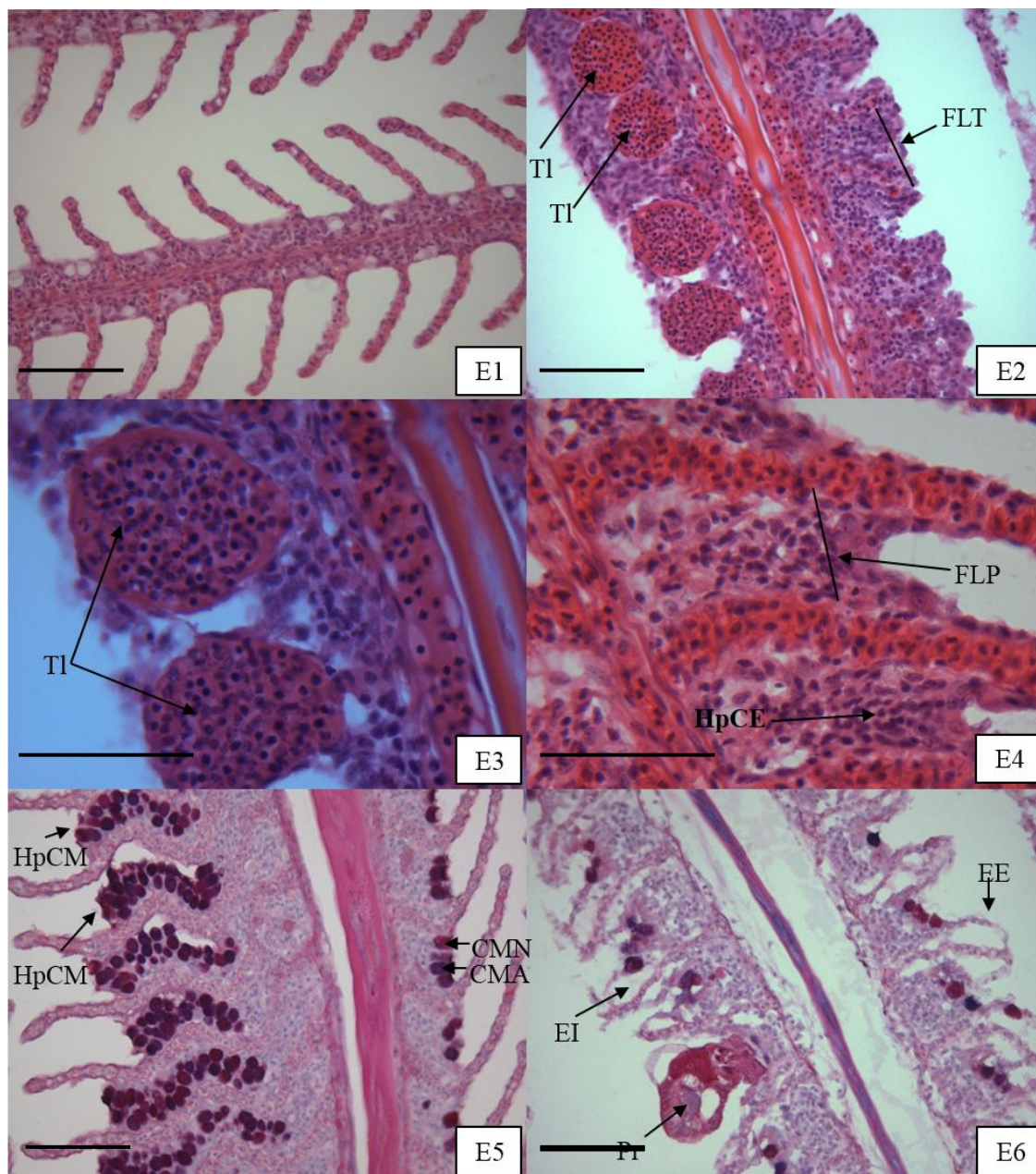


Figura 5 – E1: Filamento branquial normal no início do experimento. HE, 40X. (Barra = 10µm); E2: Telangectasia (TI), fusão lamelar total (FLT) em TR1500. HE, 40X (Barra = 10µm); E3: Detalhe de Telangectasia (TI) em TR1500. HE, 100X (Barra = 10µm); E4: Hiperplasia de células do epitélio (HpCE), com fusão parcial da lamela (FLP) em TR1500. HE, 100X (Barra = 10µm); E5: Hiperplasia de células mucosa (HpCM). PAS+Alcian Blue. 40X (Barra = 10µm); E6: Elevação epitelial (EE) com edema intersticial (EI) em TR1500, detalhe com parasito monogenoide presente na lamela branquial (Pr). PAS+Alcian Blue. 40X (Barra = 10µm).

Tabela 3 – Valores médios de alteração (VMA) presentes nos filamentos branquiais de tilápias do Nilo em peixes iniciais (PI) e cultivadas em densidades de 500, 1.000 e 1.500 peixes/tanque-rede com capacidade útil de 6,0 m³.

Alteração	PI	Tratamentos		
		T500	T1000	T1500
Elevação epitelial	2,13 ± 0,64	2,66 ± 0,89 b	2,83 ± 0,39 ab	3,00 ± 0,60 a
Fusão lamelar	2,13 ± 0,35	2,91 ± 0,67 b	3,16 ± 0,72 a	3,16 ± 0,58 a
Hiperplasia	2,63 ± 0,74	3,50 ± 0,52 b	3,50 ± 0,52 b	3,75 ± 0,45 a
Telangectasia	2,13 ± 0,52	2,41 ± 1,00 a	2,41 ± 1,00 a	1,83 ± 0,60 b

Na mesma linha, médias com letras diferentes indicam diferenças significativas (P<0,05).

A fusão lamelar, com valores médios de alteração maiores nos tanques de 1.000 e 1.500 peixes, pode acarretar o colapso da estrutura dos filamentos branquiais decorrente da adesão das células epiteliais com o sistema de sustentação das células pilares. As alterações histológicas, como a fusão lamelar, podem funcionar como mecanismos de defesa, diminuindo a área de superfície da brânquia ou, também, aumentando a barreira de difusão ao agente poluente ou estressor; entretanto, a maior dificuldade respiratória pode induzir à vasodilatação, podendo levar ao aparecimento de edemas e descolamento do epitélio branquial (Erkmen e Kolankaya, 2000).

Schwaiger et al. (1997) consideraram que o levantamento do epitélio lamelar aumenta a distância de difusão dos agentes estressores ambientais, como poluentes químicos, sendo também um mecanismo adaptativo para proteção do animal e manutenção da homeostase. Contudo, essa alteração pode indicar o aparecimento de patologias pelo prejuízo das trocas gasosas que acarretam, induzindo à vasodilatação do eixo vascular acarretando a ruptura das células pilar e, conseqüentemente, a desagregação da estrutura de suporte que levam ao aparecimento de aneurismas lamelares ou às telangectasias (Garcia-Santos, 2007).

As telangectasias em peixes são bastante frequentes em animais expostos a poluentes e são fartamente descritas em estudos ambientais há algumas décadas (Mallat, 1985; Arellano et al., 2000; Garcia-Santos et al., 2006; Fontainhas-Fernandes et al., 2008).

Os resultados obtidos para os valores médios de alterações nos filamentos branquiais mostram que a densidade de 500 peixes/tanque demonstra menor média de alterações quanto à elevação epitelial, fusão lamelar e hiperplasia em relação ao tratamento com 1.500 peixes/tanque. Estatisticamente, o tratamento com 1.000 peixes/tanque é igual aos demais para elevação epitelial. Já para fusão lamelar e hiperplasia, igual à densidade de 500 peixes/tanque e 1.500 peixes/tanque, respectivamente.

Em relação à telangectasia foi observado um fenômeno inverso com maior média de ocorrência nos tratamentos 500 peixes/tanque e 1.000 peixes/tanque em relação ao tratamento com 1.500 peixes/tanque, que demonstram que pode ter ocorrido uma indução à formação de aneurismas mais frequentemente pela maior média de presença de elevações epiteliais.

Cavichiolo (2009) considerou que em cultivo de tilápias é comum a presença de hiperplasia das células de filamentos branquiais e fusão lamelar em resposta a algum processo inflamatório. A inflamação é caracterizada pela produção de exsudatos e de células para a proteção do tecido lesado e uma vez cessada a ação do agente causador, o tecido pode ser reparado ou regenerado, ocorrendo a repopulação das células (Moraes e Moraes, 2009). A criação de peixes em tanques-rede, caracterizada pelas altas densidades de estocagem e níveis elevados de arraçoamento, aumenta as situações de estresse e, conseqüentemente, pode ocorrer inibição das funções digestivas, reprodutoras, imunes e de crescimento nos peixes, levando aos surtos de enfermidades causadas por agentes patogênicos e oportunistas. As interações biológicas como as interações de dominância entre os indivíduos é característica entre as tilápias do Nilo; peixes hierarquicamente subordinados podem desenvolver danos anatômicos como crescimento reduzido e alterações patológicas no tecido gastrintestinal que podem ser reduzidos com boas práticas de manejo na criação dos peixes (Franci, 2005; Oba, 2009).

A visão macroscópica de fígados de tilápias do Nilo mostrou a organização desse órgão em dois lobos, sendo que o lobo esquerdo é maior e se espalha na cavidade corporal. Observaram-se fígados de coloração vermelha amarronzada, de textura firme e superfície lisa, bem como outros com coloração amarelada, friáveis ao tato e superfície opaca. Esse último foi verificado principalmente na avaliação do fígado na implantação do experimento, quando as tilápias apresentavam peso médio vivo de $81,32 \pm 4,70$ g. Bruslé e Anadon (1996) consideraram que a coloração amarelada se deve a elevados estoques de gordura no fígado.

Microscopicamente, o parênquima hepático é formado por hepatócitos, que constituem cerca de 80% das células do órgão (Cavichiolo, 2009), dispostos em dois cordões entre dois sinusoides. Em condições ideais, cada hepatócito pode apresentar um ou dois núcleos de forma arredondada, centralizados, com um ou mais nucléolos bem evidentes (Vicentini et al., 2005, Cavichiolo, 2009).

Em todos os tratamentos, a maioria das células apresentava o núcleo em posição mais periférica e poucos hepatócitos continham dois núcleos. Na maioria dos peixes observados não foi possível distinguir com clareza os lóbulos hepáticos, com a formação característica poliédrica e organização radial.

Observações microscópicas permitiram a visualização de vários tecidos pancreáticos exócrinos intra-hepáticos, com disposição acinar e difusos no parênquima do tecido hepático (Figura 6) e presença de células com características de células adiposas nesse tecido.

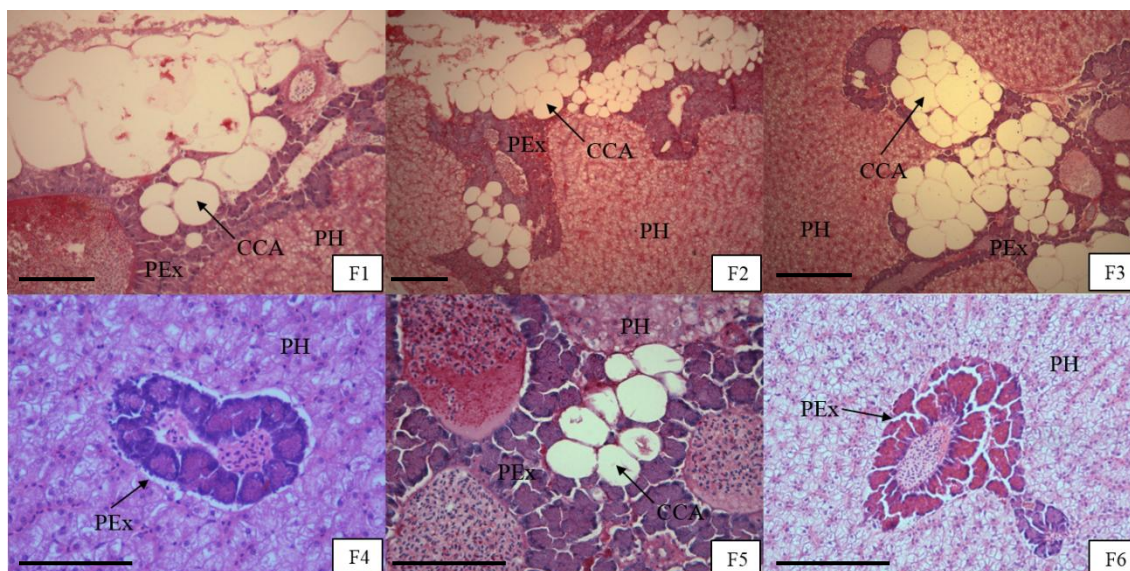


Figura 6 – Visualização de células com características de células adiposas (CCA) no hepatopâncreas de diferentes tratamentos: F1: TR500 – PAS 20X (Barra = 10 μ m); F2: TR1000 – PAS 10X (Barra = 10 μ m); F3: TR1500 – PAS 20X (Barra = 10 μ m). Tecido pancreático exócrino (Pex) intra-hepático, com disposição acinar e difuso no parênquima do tecido hepático (PH): F4 (TR500), F5 (TR1000) e F6 (TR1500) HE 40X (Barra = 10 μ m).

Na implantação do experimento, utilizando o método semiquantitativo, observou-se que 70% dos peixes apresentavam uma vacuolização extensas nos hepatócitos (nível 3) e 30% moderada e pontual (nível 2) e núcleos localizados mais periféricamente.

Ao final do experimento, verificou-se que não houve diferenças significativas entre os tratamentos nos níveis de vacuolização dos hepatócitos (Tabela 4).

Tabela 4 – Probabilidade de ocorrência de vacuolização em hepatócitos de tilápias do Nilo em peixes iniciais (PI) e cultivadas em densidades de 500, 1.000 e 1.500 peixes/tanque-rede com capacidade útil de 6,0 m³.

Probabilidade média de ocorrência de vacuolização (%)	Tratamento			
	PI	TR500	TR1000	TR1500
Nível 1	0	17,08±20,61 ^a	8,75±14,32 ^a	5,41±8,11 ^a
Nível 2	30,00	26,25±17,73 ^a	21,25±20,57 ^a	21,25±19,67 ^a
Nível 3	70,00	56,66±34,53 ^a	70,00±29,70 ^a	73,33±26,83 ^a

Na mesma linha, médias com letras diferentes indicam diferenças significativas (P<0,05)

Os dados de vacuolização dos hepatócitos corroboram o deslocamento do núcleo para a periferia, um indicativo de grande presença de gorduras no fígado dos peixes (Graciano et al., 2010). Nos teleósteos, entre as diversas funções do fígado, destaca-se a capacidade desse órgão para armazenar glicogênio e lipídios; o glicogênio é armazenado de forma mais dispersa no citoplasma, enquanto que partículas de lipídios podem apresentar um aspecto de gotas claras e de contorno bem definidas (Takashima e Hibiya, 1995; Graciano et al., 2010). Esse último aspecto foi o mais presente no fígado dos peixes nos diferentes tratamentos (Figura 7). Análises de inclusão de glicogênio e de inclusão de lipídios, com a utilização de técnicas histoquímicas, permitiriam uma análise mais precisa da vacuolização (Graciano et al., 2010).

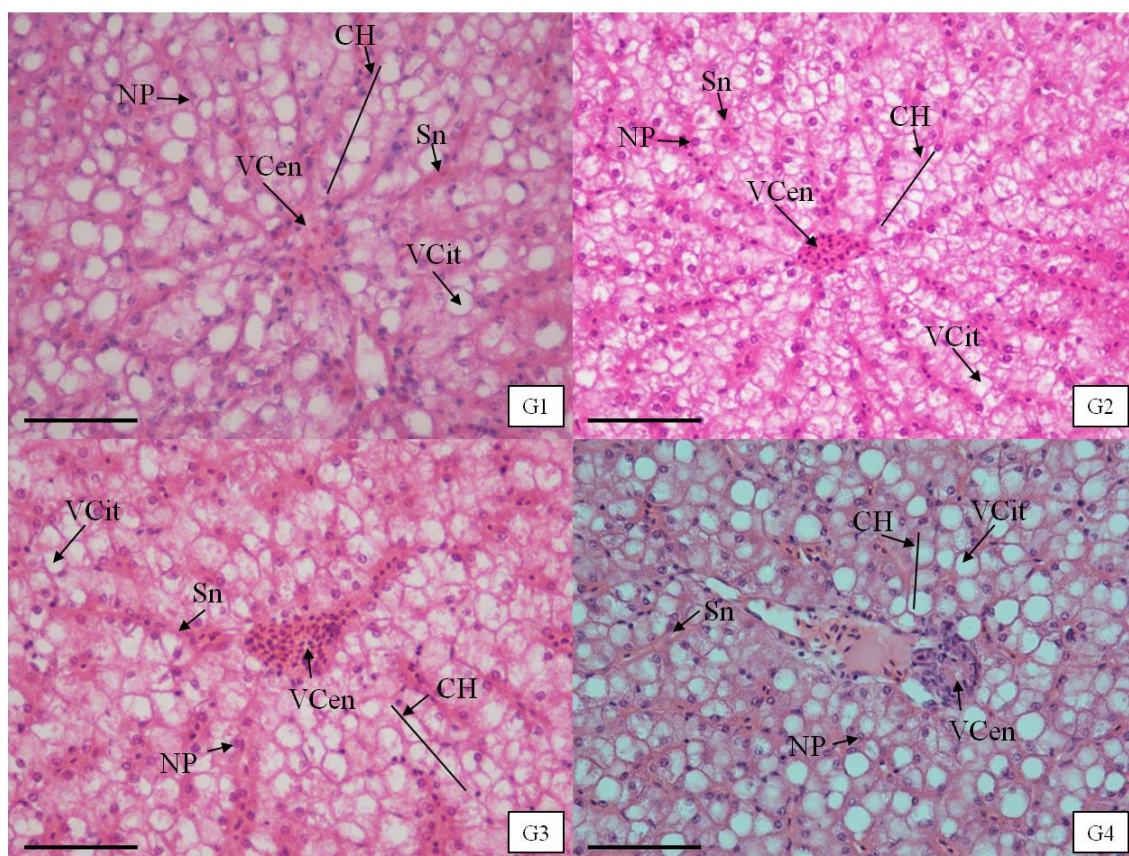


Figura 7 – Parênquima hepático evidenciando estrutura cordonal dos hepatócitos (CH); sinusoides (Sn); vacuolização citoplasmática (VCit); deslocamento periférico do núcleo de hepatócitos (NP); veia central (VCen). G1: PI, G2: TR500; G3: TR1000; G4: TR1500. HE 40X (Barra = 10 μ m).

A área média celular dos hepatócitos dos peixes no início do experimento foi de 292,77 μm^2 e a média do número de células amostradas no campo microscópico de 297,59 células. A área celular dos hepatócitos não mostrou diferenças significativas,

entre os tratamentos. Quanto ao número de hepatócitos, os animais dos tanques com 500 peixes e de 1.000 peixes mostraram uma diferença estatística significativa; todavia, tratamento com 1.500 peixes foi estatisticamente igual aos demais tratamentos (Tabela 5).

Tabela 5 – Valores médios da área celular (AH) e do número de hepatócitos (NH) em tilápias do Nilo em peixes iniciais e cultivadas em densidades de 500, 1.000 e 1.500 peixes/tanque-rede com capacidade útil de 6,0 m³.

Morfometria	Tratamento			
	PI	T500	T1.000	T1.500
AH (μm^2)	292,77±106,33	263,87±19,60 ^a	290,21±29,95 ^a	271,43±31,14 ^a
NH	297,59±110,74	248,17±45,03 ^a	186,08±36,69 ^b	220,94±47,26 ^{ab}

Na mesma linha, médias com letras diferentes indicam diferenças significativas (P<0,05).

As diferenças nas densidades não mostraram influência sobre a área das células, entretanto, as dimensões das células hepáticas podem refletir o estado fisiológico do animal, com indicativos de um estado hiper ou hipofuncional. Um aumento das áreas celulares pode indicar um acúmulo de substâncias como lipídios e glicogênio ou ainda uma elevada taxa metabólica (Takashima e Hibiya, 1995). Oliveira et al. (2010) indicaram valores de área citoplasmática que variavam de 181,7 a 287,8 μm^2 e que o aumento da área decorreu de um acúmulo de glicogênio hepático, comprovado pelo teste de amilase realizado, embora, indiquem que este acúmulo depende da dieta, do tamanho e do sexo dos peixes.

A análise das variáveis morfométricas do fígado, em geral, não mostrou diferenças estatísticas significativas entre os três tratamentos, indicando que densidades de 1.500 peixes em relação a densidades menores de estocagem (500 e 1.000 peixes por tanque-rede) não causam diferenças significativas na morfometria do tecido hepático, nas condições de criação do experimento.

Conclusão

As células produtoras de mucinas ácidas das brânquias encontravam-se em maior quantidade do que as células produzindo mucinas neutras, indício de que as condições ambientais foram adequadas ao cultivo da tilápia do Nilo e que a qualidade da água não se encontrava alterada no local do experimento, sendo que a densidade de

estocagem de 500 peixes em tanques com capacidade útil de 6,0 m³ apresentou estatisticamente maior quantidade de células produtoras de mucinas ácidas.

A densidade de 500 peixes/tanque mostrou menor média de elevação epitelial, fusão lamelar e hiperplasia em relação ao tratamento com 1.500 peixes/tanque.

A análise das variáveis morfológicas do fígado, em geral, não mostrou diferenças estatísticas significativas entre os três tratamentos, nas condições de criação do experimento.

As análises dos tecidos branquiais e hepáticos mostraram que a densidade de estocagem de 500 peixes em tanques com capacidade útil de 6,0 m³ apresentaram tecidos com menos modificações que os tanques com densidades maiores.

Referências

- Arellano, J.M.; Storch, V.; Sarasquete, C. 1999. Histological changes and copper accumulation in liver and gills of the Senegales Sole *Solea senegalensis*. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 44: 62-72.
- Behmer, O.A.; Tolosa, E.M.C.; Freitas Neto, A.G. 1976. Manual techniques for normal and pathological histology = Manual de técnicas para histologia normal e patológica. EDUSP, São Paulo, SP, Brazil. (in Portuguese).
- Bozano, G.L.N. 2002. Technical feasibility of raising fish in tanks Network = Viabilidade técnica da criação de peixes em tanques rede. p. 107-111. In: Anais do 12º Simpósio Brasileiro de Aqüicultura. ABRAq, Goiânia, GO, Brazil (in Portuguese).
- Breseghele, L.; Cardoso, M.P.; Borges-de-Oliveira, R.; Costa, M.F.; Barreto, J.C.B.; Sabóia-Morais, S.M.T.; Yamada, A.T. 2004. Effects of sodium fluoride in gill epithelium of Guppy fish (*Poecilia vivipara*). *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science* 46:685-695 (in Portuguese, with abstract in English).
- Bruslé, J.; Anadon, G.G. 1996. The structure and function of fish liver. p. 77-93. In: Munshi, J.S.D.; Dutta, H.M.F. *Fish morphology: horizon of new research*. Oxford IBH Publishing Co., New Delhi, CCU, IN.
- Cavichiolo, F. 2009. Histology: relevant tool for studies in cultured fish = Histologia: ferramenta relevante para estudos em peixes cultivados. p. 602-324. In: Tavares-Dias, M., ed. *Management of Health and Safety in Fish Farming = Manejo e Sanidade de Peixes em Cultivo*. EMBRAPA, Macapá, AP, Brazil (in Portuguese).
- Erkmen, B.; Kolankaya, D. 2000. Effects of water quality on epithelial morphology in the gill of *Capoeta tinca* living in two tributaries of Kizilirmak River, Turkey. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 64: 418-425.
- Food and Agriculture Urbanization of the United Nations [FAO]. 2012. The state of world fisheries and aquaculture. FAO Fishery and Aquaculture Department, Rome, IT. Available at: <http://www.fao.org>. [Accessed Aug 09, 2014].
- Fontainhas-Fernandes, A.; Luzio, A.; Garcia-Santos, S.; Carrola, J.; Monteiro, S. 2008. Gill histopathological alterations in Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*, exposed to treated sewage water. *Brazilian Archives of Biology e Technology* 51: 1057-1063.

- Franci, C.R. 2005. Stress: Process Adaptive and Non-Adaptive = Estresse: Processos Adaptativos e Não-Adaptativos. In: Antunes, R.J.; Moreira, A.C.; Elias, L.L.K.; Castro, M. Basic and Applied Neuroendocrinology = Neuroendocrinologia Básica e Aplicada. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, RJ, Brazil (in Portuguese).
- Furlaneto, F.P.B.; Ayroza, D.M.M.R.; Ayroza, L.M.S. 2006. Cost and profitability of tilapia (*Oreochromis spp.*) In cages in the Middle Paranapanema, state of São Paulo, season 2004/2005 = Custo e rentabilidade da produção de tilápia (*Oreochromis spp.*) em tanque-rede no Médio Paranapanema, estado de São Paulo, safra 2004/2005. Informações Econômicas 36: 63-69 (in Portuguese).
- Garcia-Santos, S.; Monteiro, S.M.; Carrola, J.; Fontainhas-Fernandes, A. 2007. Histological alterations in gills of Nile tilapia *Oreochromis niloticus* caused by cadmium. Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia 59: 376-381 (in Portuguese, with abstract in English).
- Graciano, T.S.; Natali, M.R.M.; Vidal, L.V.O.; Michelato, M.; Righetti, J.S.; Furuya, W.M. 2010. Performance and hepatic morphology of Nile tilapia juveniles fed methionine and choline supplemented diets. Pesquisa Agropecuária Brasileira 45: 376-381 (in Portuguese, with abstract in English).
- Iwama, G.K. 1998. Stress in fish. Annals of the New York Academy of Sciences 851: 304-310.
- Kubitza, F. 2000. Tilapia: planning and technology in the commercial production = Tilápia: tecnologia e planejamento na produção comercial. Author Edition, Jundiaí, SP, Brazil (in Portuguese).
- Lima, L.C.; Ribeiro, L.P.; Leite, R.C.; Melo, D.C. 2006. Stress in fishes. Revista Brasileira de Reprodução Animal 30: 113-117 (in Portuguese, with abstract in English).
- Mallat, J. 1985. Fish gill structural changes induced by toxicants and other irritants: a statistical review. Canadian Journal of Fisheries e Aquatic Sciences 42: 630-648.
- Marengoni, N.G. 2006. Production of the Nile tilapia *Oreochromis niloticus* (Chitralada Strain) reared in cages with different stocking densities. Archivos de Zootecnia 55: 127-138 (in Portuguese, with abstract in English).
- Ministério da Pesca e Aquicultura [MPA]. 2011. Fisheries and Aquaculture Statistical Bulletin = Boletim Estatístico da Pesca e Aquicultura. Available at: <http://www.mpa.gov.br/index.php/informacoes-e-estatisticas/estatistica-da-pesca-e-aquicultura>. [Accessed Feb 28, 2014] (in Portuguese).
- Monteiro, S.M.; Mancera, J.M.; Fontainhas-Fernandes, A.; Sousa, M. 2005. Copper induced alterations of biochemical parameters in the gill and plasma of *Oerochromis niloticus*. Comparative Biochemistry Physiology. Part C. Toxicology & Pharmacology 141: 375-383.
- Moraes, F.R.; Moraes, J.R.E. 2009. Nutraceuticals at fish inflammation and scarring of zootechnical interest = Nutracêuticos na inflamação e cicatrização de peixes de interesse zootécnico. p. 625-723. In: Tavares-Dias, M., ed. Management of Health and Safety in Fish Farming = Manejo e Sanidade de Peixes em Cultivo. EMBRAPA, Macapá, AP, Brazil (in Portuguese).
- Myers, R.B.; Fredenburgh, J.L.; Grizzle, W.E. 2008. Carbohydrates. p. 161-187. In: Bancroft, J.D.; Gamble, M., eds. Theory and practice of histological techniques. 6ed. Elsevier, Philadelphia, PA, USA.
- Oba, E.T.; Mariano, W.S.; Santos, L.R.B. 2009. Stress in farmed fish: mitigating and aggravating for the profitable management = Estresse em peixes cultivados: agravantes e atenuantes para o manejo rentável. p. 226-247. In: Tavares-Dias, M., ed. Management and health of fish farming = Manejo e sanidade de peixes em cultivo. EMBRAPA, Macapá, AP, Brazil (in Portuguese).

- Oliveira, R.H.F.; Silva, E.M.P.; Bueno, R.S.; Barone, A.A.C. 2010. The passion fruit on hepatocytes morphometry of Nile tilapia. *Ciência Rural* 40(12): 2562-2567 (in Portuguese, with abstract in English).
- Ostrensky, A.; Borghetti, J.R.; Soto, E.D., eds. 2007. Sector study for the consolidation of sustainable aquaculture in Brazil = Estudo setorial para consolidação de uma aquicultura sustentável no Brasil. GIA, Curitiba, PR, Brazil (in Portuguese).
- Popma, T.J.; Lovshin, L.L. 1995. Worldwide prospects for commercial production of tilapia. International Center for Aquaculture and Aquatic Environments, Auburn, AL, USA.
- Reis, A.B.; Sant'ana D.M.G.; Azevedo, J.F.; Merlini, L.S.; Araújo, E.J.A. 2009. The influence of the aquatic environment in tanks sequentially interconnected with PVC pipes on the gill epithelium and lamellas of tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Pesquisa Veterinária Brasileira* 29: 303-311 (in Portuguese, with abstract in English).
- Resende, E.K. 2009. Research in network in aquaculture: technological basis for sustainable development of aquaculture in Brazil. *Aquabrazil. Revista Brasileira de Zootecnia* 38: 52-57 (in Portuguese, with abstract in English).
- Ribeiro, R.P. 2001. Exotic species = Espécies exóticas. p. 91-121. In: Moreira, H.L.M.; Vargas, L.; Ribeiro, R.P.; Zimmermann, S., eds. Foundations of modern aquaculture = Fundamentos da moderna aquicultura. Ulbra, Canoas, RS, Brazil (in Portuguese).
- Sampaio, F.G.; Losekann, M.E.; Luiz, A.J.B.; Neves, M.C.; Frascá-Scorvo, C.M.D.; Rodrigues, G.S. 2013. Environmental monitoring and management of fish farming in cages in reservoirs = Monitoramento e gestão ambiental da piscicultura em tanques-rede em reservatórios. *Informe Agropecuário* 34: 1-11 (in Portuguese).
- Sampaio, J.M.C.; Braga, L.G.T. 2005. Raising tilapias in net-cages at Ribeirão de Salomea's dam – Floresta Azul – Bahia. *Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal* 6: 42-52 (in Portuguese, with abstract in English).
- Santos, D.M.S. 2010. Water quality and fishes organs histopatology originated from Itapecuru Mirim, Maranhão fish farm pounds = Qualidade da água e histopatologia de órgãos de peixes provenientes de criatórios do município de Itapecuru Mirim, Maranhão. Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, SP, Brazil. Available at: <http://www.fcav.unesp.br/download/pgtrabs/pan/d/127.pdf>. [Accessed Aug 22, 2011] (in Portuguese).
- Schram, E.; Roques, J.A.C.; Wout Abbin, W.; Spanings, T.; Vries, P.; Biermana, S.; Vis, H.; Flik, G. 2010. The impact of elevated water ammonia concentration on physiology, growth and feed intake of African Catfish (*Clarias gariepinus*). *Aquaculture* 306: 108-115.
- Schwaiger, J.; Adam, S.; Pawert, M.; Honnen, W.; Tribskorn, R. 1997. The use of histopathological indicators to evaluate contaminant-related stress in fish. *Journal of Aquatic Ecosystem Stress e Recovery* 6: 75-86.
- Shiraishi, C.S.; Azevedo, J.F.; Silva, A.V.; Sant'Ana, D.M.G.; Araújo, E.J.A. 2009. Morphometric analysis of the intestinal wall and the dynamic of mucins secreted in the chicken ileum infected with *Toxoplasma gondii*. *Ciência Rural* 39: 2146-2153 (in Portuguese, with abstract in English).
- Stoskopf, M.K. 1993. Fish medicine. 9ed. W.B. Saunders Company, Philadelphia, PA, USA.
- Takashima, F.; Hibiya, T. 1995. An atlas of fish histology: normal and pathological features. 2ed. Fisher, New York, NY, USA.
- Teh, S.J.; Adams, S.M.; Hinton, D.E. 1997. Histopathological biomarkers in feral freshwater fish populations exposed to different types of contaminant stress. *Aquatic Toxicology* 37: 51-70.

- Torres, R.G.A.; González, P.S.; Peña, S.E. 2010. Anatomical, Histological and Ultrastructural Description of the Gills and Liver of the Tilapia (*Oreochromis niloticus*). International Journal of Morphology 28: 703-712 (in Spanish, with abstract in English).
- Tseng, Y.C.; Hwang, P.P. 2008. Some insights into energy metabolism for osmoregulation in fish. Comparative Biochemistry e Physiology 148: 419-429.
- Vicentini, C.A.; Franceschini-Vicentini, I.B.; Bombonato, M.T.S.; Bertolucci, B.; Lima, S.G.; Santos, A.S. 2005. Morphological study of the liver in the teleost *Oreochromis niloticus*. International Journal of Morphology 23: 211-216.
- Zelikoff, J.T. 1998. Biomarkers of immunotoxicity in fish e other non-mammalian sentinel species predictive value for mammals. Toxicology. Limerick 129: 63-71.