

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO DO SUL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL
CURSO DE DOUTORADO

BIOMETRIA E HISTOMORFOLOGIA DE FÍGADO, BAÇO E RIM DE
PIRARUCU (*Arapaima gigas*) PRODUZIDOS EM PISCICULTURA
SEMI-INTENSIVA

Klaus Casaro Saturnino

CAMPO GRANDE, MS
2016

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO DO SUL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL
CURSO DE DOUTORADO**

**BIOMETRIA E HISTOMORFOLOGIA DE FÍGADO, BAÇO E RIM DE
PIRARUCU (*Arapaima gigas*) PRODUZIDOS EM PISCICULTURA SEMI-
INTENSIVA**

Liver, spleen and kidney biometry and histomorphology from pirarucu
(*Arapaima gigas*) semi-intensive fish-farming.

Klaus Casaro Saturnino

Orientador: Prof. Dr. Carlos Eurico dos Santos Fernandes

Tese apresentada à Universidade
Federal de Mato Grosso do Sul, como
requisito à obtenção do título de Doutor
em Ciência Animal.

Área de concentração: Saúde Animal.

CAMPO GRANDE, MS 2016

Certificado de aprovação

KLAUS CASARO SATURNINO

Biometria e histomorfologia de fígado, baço e rim de *Arapaima gigas*
em piscicultura semi-intensiva

Liver, spleen and kidney biometry and histamorphology of pirarucu
(*Arapaima gigas*) from semi- intensive fish-farming

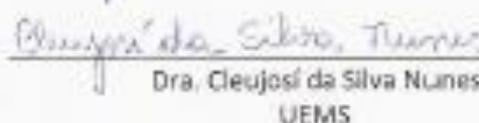
Tese apresentada à Universidade
Federal de Mato Grosso do Sul, como
requisito à obtenção do título de
doutor em Ciência Animal.

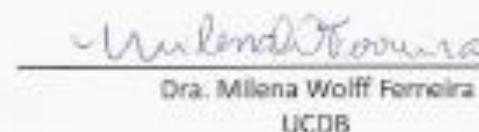
Área de concentração: Saúde Animal.

Aprovado(a) em: 07/04/2016

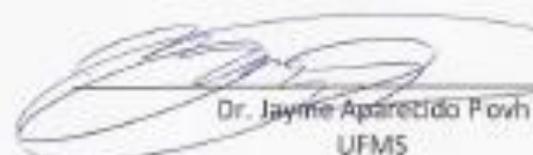
BANCA EXAMINADORA:


Dr. Carlos Eurico dos Santos Fernandes
(UFMS) – (Orientador)


Dra. Cleujosi da Silva Nunes
UEMS


Dra. Milena Wolff Ferreira
UCDB


Dra. Livia Medeiros Cordeiro
UFMS


Dr. Jayme Aparecido Povh
UFMS

Dedicatória

Dedico este trabalho a todos àqueles que direta ou indiretamente me auxiliaram nesta etapa de minha vida, especialmente para Katyuscia, minha esposa e meus filhos João Gabriel e Mateus que estiveram ao meu lado durante todo este tempo. Também a meus pais Salvador e Yeda, meu irmão Piero, assim como meu sogro José e minha falecida sogra Solange, que acreditaram em meu trabalho e junto comigo se esforçaram para o sucesso do projeto.

A minha sogra Solange Yanez do Nascimento

In memoriam

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por possibilitar esta jornada e conquista para minha vida e de minha família, nos protegendo e encorajando a nunca desistir. A minha esposa pela paciência nos momentos difíceis e apoio, cuidando de nossos filhos com dedicação e carinho, mesmo em minha ausência. A meus pais, sogro e falecida sogra que me apoiaram em todos os momentos, me encorajando e torcendo pela conquista.

À minha tia Adir que sempre abriu as portas de sua casa, tão hospitaleira e gentil.

Aos primos Osmar e Teca que também me acolheram nas viagens a Campo Grande em sua residência, com muita atenção e presteza.

Aos alunos da Universidade Federal de Rondônia Henrique, Guilherme e Igor que auxiliaram nas colheitas amostrais com dedicação, respeito e profissionalismo no trabalho realizado.

Aos amigos e colegas de pós-graduação Robson Andrade, Sandy e Gizela que me auxiliaram nos trabalhos laboratoriais quando estava com dúvidas ou com muito trabalho, pela paciência e presteza, assim como Claudio, técnico laboratorial, que foi muito atencioso e paciente na realização dos procedimentos laboratoriais, me auxiliando e instruindo nas técnicas histológicas.

E claro, a meu orientador Carlos Eurico, que além de orientador, sempre um grande amigo, que acreditou em meu trabalho e dedicação, mesmo estando tão longe.

Resumo

SATURNIO, K.C. Biometria e histomorfologia de fígado, baço e rim de pirarucu (*Arapaima gigas*) produzidos em piscicultura semi-intensiva. 2016. 86 f. Tese (Doutorado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande, MS, 2016.

Arapaima gigas (pirarucu) é um peixe característico da bacia Amazônica e tem tido sua produção muito valorizada em função do seu alto rendimento de carcaça e rusticidade. Sua produção em cativeiro tem aumentado nos últimos anos, porém muitos aspectos relacionados à fisiologia e desenvolvimento corporal ainda apresentam algumas lacunas. Neste contexto, o sistema hematopoiético assume um papel preponderante considerando suas funções homeostáticas, metabólicas e de defesa. O presente estudo busca oferecer subsídios sobre diferentes aspectos associados ao desenvolvimento hepático, do baço e do rim, a partir de técnicas biométricas histomorfométricas em espécimes provenientes de um sistema semi-intensivo de criação. Foram conduzidos dois experimentos. O primeiro experimento baseou-se no estudo do fígado, cujos objetivos foram avaliar o desenvolvimento macro e microscópico, a relação hepatossomática, aspectos histomorfométricos, assim como a densidade volumétrica percentual da sua estrutura em diferentes fases de crescimento. Foram considerados 27 espécimes de *A. gigas* de uma unidade produtora comercial. Os espécimes foram divididos em seis categorias: Alevinos (n=4), Juvenil 5 cm (n=4), Juvenil 10 cm (n=4), Juvenil 20 cm (n=4), Juvenil 80 cm (n=4) e Abate (n=7). Os resultados mostraram que não há variações morfológicas biométricas e teciduais associadas ao desenvolvimento corporal. Tríades portais foram observadas a partir de indivíduos com cinco centímetros de comprimento. O fígado não apresenta organização lobular nesta espécie. O percentual de hepatócitos predomina em todas as categorias, seguido do percentual dos espaços sinusoidais. A análise morfométrica revelou que nos animais com vinte centímetros os hepatócitos são maiores. No segundo experimento, avaliou-se o desenvolvimento do baço e rim, suas relações somáticas, assim como diferentes aspectos histométricos. Foram utilizados 15 espécimes distribuídos em três categorias: Juvenil 20 cm (n=4), Juvenil 80 cm (n=4) e Abate (n=7). Houve variações na densidade da polpa vermelha e polpa branca conforme o desenvolvimento corporal. Túbulos contornados proximais e o tecido linfóide renal foram as estruturas mais prevalentes e os glomérulos desempenham importante papel excretor no rim desta espécie. Conclui-se com esse estudo que *Arapaima gigas* possui

características em comum com demais espécies de teleósteos, mas particularidades específicas que diferenciam a espécie e seu sistema de criação.

Palavras-chave: pirarucu; histologia; peixe; morfometria.

Abstract

SATURNINO, K.C. Liver, spleen and kidney biometry and histomorphology of pirarucu (*Arapaima gigas*) semi-intensive fish-farming. 2016. 60 f. Tese (Doutorado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande, MS, 2016.

Arapaima gigas, characteristic fish of the Amazon, popularly known as pirarucu, has highly valued production because of high carcass yield and hardiness kind. Farmed production has been achieved through the development of rummage in production area, but many gaps on health and development are present. In this context, the haematopoietic system plays an important role considering homeostatic, metabolic and defense functions. This study aims to provide insight about different aspects associated with the development of the liver, spleen and kidney, from histomorphometric techniques in specimens from a semi-intensive fish-farming system. Two experiments were conduct. The first experiment was based in liver study whose objectives were to assess the development macro and microscopical, the hepatosomatic relationship, histomorphometric aspects, as well as the percentage volume density of the structure at different stages of growth. Twenty-seven specimens of *A. gigas* of a commercial unit production were consider. The specimens were divid into six categories: Fry (n = 4), Juvenile 5 cm (n = 4), Juvenile 10 cm (n = 4), Juvenile 20 cm (n = 4), Juvenile 80 cm (n = 4) and Slaughter (n = 7). The results showed that no biometric and morphological variations associated with body tissue development. Portal triads were observe in individuals with five centimeters long. The liver has no lobular organization in this species. The percentage of hepatocytes predominates in all categories, followed by the percentage of sinusoidal whitespace. The morphometric analysis revealed that in animals with twenty centimeters hepatocytes are higher. The second experiment evaluated the development of the spleen and kidney, their somatic relations, as well as different histometric aspects. Fifteen specimens were used divided into three categories: Juvenile 20 cm (n = 4), Juvenile 80 cm (n = 4) and Abate (n = 7). There were variations in the density of red pulp and white pulp as the body development. Proximal convoluted tubule and renal lymphoid tissue were the most prevalent structures and glomeruli play an important role in excretory kidney in this species. This study concludes that *Arapaima gigas* has features in common with other species of teleost, but specific characteristics that differentiate the species and its breeding system.

Keywords: pirarucu; fish; histology; morphometric.

Lista de ilustrações

Revisão bibliográfica

- Figura 1 – *Heterotis niloticus* em desenho ilustrativo e forma natural. 01
- Figura 2 – *Arapaima gigas*. (A) Amostra de cultivo em tanques escavados em Rondônia. (B) Detalhe da cauda com as nadadeiras de um exemplar macho, comprovado pela necropsia. 01

Artigo 1

- Figura 1 – Cavidade celomática de espécime de pirarucu com aproximadamente 80cm de comprimento (categoria Juvenil 80 – JU80) expondo localização topográfica do fígado. (A) Vista da localização hepática logo após abertura da cavidade sem deslocamento das demais vísceras. (B) Mesma vista de (A), mas com deslocamento do fígado, demonstrando sua topografia em relação ao esôfago. 42
- Figura 2 – Fígados de pirarucu em diferentes fases de crescimento corporal. (A) Fígado de espécime com aproximadamente 20 cm de comprimento (categoria Juvenil 20 – JU20) apresentando coloração mais clara. (B) Fígado de espécime com aproximadamente 80 cm de comprimento (categoria Juvenil 80 – JU80) evidenciando coloração marrom avermelhado escuro. 43
- Figura 3 – Secção histológica do fígado de pirarucu. (A) JU80; aspecto característico cordonal dos hepatócitos, (H&E) (400x), Barra = 50µm. (B) JU 40; tríade portal com reduzida quantidade de tecido conectivo envoltório, (H&E) (400x), Barra = 50µm. (C) JU80; tríade portal com evidenciação do tecido conectivo envoltório em maior quantidade do que em (B), (Gomori) (400x), Barra = 50µm. (D) JU20; hepatócitos distendidos com citoplasma repleto por vacúolos (*) e núcleo deslocado periféricamente (seta) (1000x), Barra = 5µm. 44
- Figura 4 – Densidade volumétrica hepática (%) de *Arapaima gigas* produzidos em piscicultura semi-intensiva. AL (n=4), JU5 (n=4), JU10 (n=4), JU20 (n=4), JU80 (n=4) e AB (n=7). 46
- Figura 5 – Imagens microscópicas de fígado de espécimes de pirarucu com aproximadamente 80 cm de comprimento (JU80) demonstrando localização dos centros melanomacrófagos (setas) nas áreas peri-portais (X). (400x). Barra = 50µm. 47

Artigo 2

Figura 1 – Cavidades celomáticas de *Arapaima gigas* expondo as vísceras e microscopia de luz em H&E de baço e rim. (A) Topografia esplênica em relação às demais vísceras celomáticas. (B) Bexiga natatória aberta expondo trabéculas que realizam as trocas gasosas (a) e o rim centralmente (b). (C) Corte histológico de baço evidenciando polpa vermelha (*), polpa branca (**), vaso arterial (seta), venoso (cabeça de seta) e centros melanomacrófagos (seta pontilhada). Barra = 100µm. (D) Histologia do baço em maior aumento evidenciando a polpa vermelha (a) e polpa branca (b). Barra = 50µm. (E) Corte transversal apresentando arquitetura renal; região cortical constituída por tecido hematopoiético (quadrado negro) e medular com estruturas renais típicas (***). Barra = 150µm. (F) Mesmo rim em maior aumento demonstrando as estruturas arquitetônicas renais e hematopoiéticas. Notar os centros de melanomacrófagos (seta branca), glomérulos (cabeça de seta branca) e túbulos contornados proximais com bordas em escova (a). Barra = 50µm.

Lista de tabelas

Artigo 1

Tabela I - Médias, desvio padrão (\pm) e intervalo de confiança (95%) do peso hepático, relação hepatossomática e fator de condição de <i>Arapaima gigas</i> (n=15) de acordo com o desenvolvimento corporal, produzidos em piscicultura semi-intensiva.....	41
Tabela II - Médias, desvio padrão (\pm) e intervalo de confiança (95%), de diferentes medidas morfométricas de hepatócitos de <i>Arapaima gigas</i> (n=27) de acordo com desenvolvimento corporal, produzidos em piscicultura semi-intensiva.....	45

Artigo 2

Tabela I - Médias e desvio padrão (\pm) do peso esplênico e renal, relação esplenossomática e nefrossomática, e comprimento renal de <i>Arapaima gigas</i> (n=15), de acordo com o desenvolvimento corporal, produzidos em piscicultura semi-intensiva.....	69
Tabela II - Densidade volumétrica esplênica e renal (%) de <i>Arapaima gigas</i> (n=15) de acordo com o desenvolvimento corporal, produzidos em piscicultura semi-intensiva.	70
Tabela III - Médias e desvio padrão (\pm) de diferentes medidas morfométricas de porções de néfron de <i>Arapaima gigas</i> (n=15) de acordo com o desenvolvimento corporal, produzidos em piscicultura semi-intensiva.....	72

Lista de abreviaturas e siglas

AB	Abate
AL	Alevino
ANCOVA	Análise de covariância
BR	Brasil
Cm	Centímetros
CMM	Centro melanomacrófago
CT	Comprimento total
CTR	Comprimento total do rim
D. biliar	Ducto biliar
DDT	Dicloro-difenil-tricloroetano
G	Gramas
H&E	Hematoxilina e eosina
HAP	Hidrocarbonetos policíclicos
JU	Juvenil
Ka	Fator de condição alométrico
Kf	Fator de condição de Fulton
Kn	Fator de condição relativo
Log	Logaritmo
min	Minutos
ml	Mililitro
PB	Peso do baço
PB	Proteína bruta
PC	Peso corporal
PCB	Bifenilos policlorados
PF	Peso do fígado
PR	Peso do rim
RES	Relação esplenossomática
RHS	Relação hepatossomática
RNS	Relação nefrossomática
RO	Rondônia
SEAGRI	Secretaria de Estado da Agricultura, Pecuária, Desenvolvimento e Regularização Fundiária.
Tec. Conj.	Tecido conjuntivo
µm	Micrômetro

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	01
<i>Arapaima gigas</i>	01
Aspectos econômicos da criação do pirarucu.....	03
Parâmetros corporais.....	03
Estudos Histologicos e anatômicos.....	05
Fígado.....	06
Baço.....	07
Rim.....	08
Relações somáticas.....	11
Estereologia.....	13
Referências.....	14
Artigos.....	21
Biometria, histomorfometria e densidade volumétrica do fígado de pirarucu (<i>Arapaima gigas</i>) produzidos em piscicultura semi-intensiva.....	21
Abstract.....	22
Introdução.....	23
Material e métodos.....	25
Resultados e discussão.....	28
Conclusão.....	33
Resumo.....	34
Referências.....	35
Histomorfologia de baço e rim de pirarucu (<i>Arapaima gigas</i>) produzidos em piscicultura semi-intensiva.....	48
Abstract.....	49
Introdução.....	50
Material e métodos.....	52
Resultados.....	54
Discussão.....	57
Conclusão.....	61
Resumo.....	62
Referências.....	63

INTRODUÇÃO

Arapaima gigas

O pirarucu (*Arapaima gigas*, Schinz, 1822), como é conhecido no Brasil, ou paiche em outros países, pertence à classe Actinopterygii, ordem Osteoglossiformes (maior membro desta ordem) e família Arapaimidae. A família caracteriza-se pela existência da língua óssea, pouco móvel, cabeça roliça; escamas grandes em forma de mosaico; nadadeiras anal e dorsal alongadas, contornando grande parte da porção posterior do corpo e quase se unindo à caudal. Nela estão incluídos dois gêneros e duas espécies, sendo uma da África, *Heterotis niloticus* (Fig. 1), e outra da Amazônia, *Arapaima gigas* (Fig. 2) (Piazza, 2012).

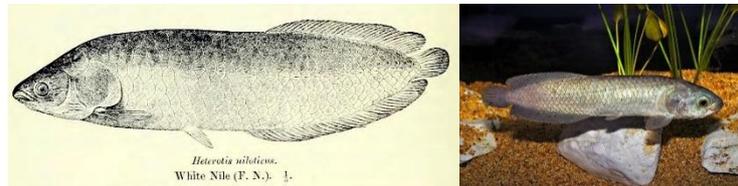


Figura 1. *Heterotis niloticus* em desenho ilustrativo e forma natural.
Fonte: www.wikipedia.org e www.pbase.com



Figura 2. *Arapaima gigas*. (A) Amostra de cultivo em tanques escavados em Rondônia.
(B) Detalhe da cauda com as nadadeiras de um exemplar macho, comprovado pela necropsia. Fonte: autor

O espécime tem o corpo moderadamente cilíndrico, apresentando-se um pouco mais largo depois da cabeça, considerada pequena em relação ao corpo, que fica progressivamente mais comprido a partir da origem da nadadeira dorsal. A boca superior é grande e oblíqua, contendo língua óssea e dentes cônicos em ambas as maxilas. A partir do oitavo ou nono mês de idade a coloração do corpo ganha tons castanho-claro, onde, nos adultos, a região caudal apresenta coloração avermelhada mais intensa durante o período reprodutivo. As escamas são do tipo ciclóides grandes, espessas, estriadas e granuladas. A nadadeira dorsal fica situada na parte posterior do corpo, sendo os últimos raios mais longos, ultrapassando a origem da caudal. A nadadeira anal é comprida, iniciando após a nadadeira dorsal, e a ventral é curta estando

localizada próxima à anal. A nadadeira caudal Fig. (2B) é arredondada, característica da família a que pertence (Soares et al. 2008).

Peixe endêmico da Bacia Amazônica, habita, principalmente, lagos de várzeas e florestas inundadas (Castello 2008), com águas pretas e tranquilas, não sendo encontrado, portanto, nas zonas de forte correnteza e nas águas ricas em sedimentos (Bard & Imbiriba, 1986).

Considerado um dos maiores peixes de água doce da América do Sul, pode atingir até três metros de comprimento e pesar mais de 200 kg (Imbiriba, 2001). Anteriormente, era obtido na natureza pela pesca com arpões e redes, sendo atualmente produzido graças a sua boa adaptação ao adensamento, alta tolerância ao déficit de oxigênio e crescimento muito rápido (Bard & Imbiriba, 1986).

Apresenta significativo desenvolvimento ponderal (Ono & Kehdi, 2013) e superior rusticidade em ambiente tropical, quando comparado a outros peixes de cultivo, o que viabiliza sua produção (Bard & Imbiriba, 1986). Possui hábito alimentar carnívoro começando a se alimentar de outros peixes por volta do sexto mês de vida, mantendo em sua dieta moluscos, insetos, vermes d'água e até caranguejos, quando em seu habitat natural (Pereira-Filho et al., 2003; Pereira-Filho & Roubach, 2010).

Com respiração aérea obrigatória graças à peculiaridade de sua bexiga natatória (Almeida et al., 2011), atinge maturidade sexual no quarto ou quinto ano de vida, além de apresentar processo reprodutivo com formação de casal, construção de ninho e desovas parceladas que ocorrem durante o ano, se concentrando no período mais chuvoso na Amazônia (Ono et al., 2004). Este comportamento reprodutivo o torna vulnerável para sua pesca, visto que os machos, enquanto cuidam de sua prole, são alvos fáceis para pescadores ribeirinhos artesanais (Castello, 2008).

Popularmente é considerado o "bacalhau brasileiro" pela forma de sua comercialização artesanal, possuindo valor nutritivo superior ao do verdadeiro (*Gadus mohrrua*) (Imbiriba et al., 1994), com rendimento de carcaça de até 57% (Imbiriba, 2001), carne de coloração levemente rosada, textura firme, ausente de espinhas e baixo teor de gordura. Estas características conferem à espécie grande interesse comercial na sua produção pelo valor agregado de sua carne (Galvão de Lima & Batista, 2012).

Aspectos econômicos da criação do pirarucu

O Brasil saltou de uma produção de pescado de 273.268 toneladas em 2003, para 707.461 toneladas em 2012 (FAO, 2013). Rondônia tem uma produção estimada de 64.833 toneladas de pescados por ano, segundo estatísticas da Secretaria de Desenvolvimento Ambiental, resultantes do cultivo em 10.805 hectares de lâmina de água doce. Possui 3.250 propriedades licenciadas, sendo que 80% correspondem à produção de tambaqui (*Colossoma macroporum*), pirarucu (*Arapaima gigas*), jatuarana (*Brycon* sp.) e pintado (*Pseudoplatystoma* sp.). O sistema de produção mais utilizado é o intensivo com a média de 6 a 10 toneladas de pescado por hectare, ao ano, em tanques escavados (Sedam, 2014). Na safra 2012/2013, apenas uma empresa frigorífica, beneficiou 1.100 toneladas de pirarucu, produzidas na região central deste estado, sendo uma parte comercializada no mercado interno e outra exportada. Neste contexto, Rondônia é o maior produtor de pirarucu em cativeiro no país possuindo estimativa de produção de 80 mil toneladas de pescado para 2015 (SEAGRI, 2015).

Parâmetros corporais

A abordagem de avaliação da saúde de ecossistemas aquáticos por meio da utilização de indicadores biológicos abrange objetivos e práticas da pesquisa ecológica, como a identificação de padrões espaciais e temporais (Scrimgeour & Wicklum, 1996). Neste contexto, um estudo das características biométricas externas e dos diferentes órgãos em animais saudáveis, possibilita encontrar informações sobre características de espécies em seu habitat de cultivo, e suas relações, na busca pela compreensão de possíveis desequilíbrios que possam ocorrer durante o crescimento, assim como em processos patológicos (Tavares-Dias et al., 2000).

A relação peso-comprimento é uma importante ferramenta matemática utilizada frequentemente nos estudos de biologia pesqueira e ecologia de diferentes espécies de peixes (Le Cren, 1951; Gomiero & Braga, 2003; Lemos et al., 2006). Esta relação é útil para determinar o peso e a biomassa, quando apenas as medidas de comprimento são avaliadas, indicando condições e permitindo comparações entre o crescimento de diferentes espécies (Tavares-Dias et al., 2006; Tavares-Dias et al., 2008) e populações diferentes de uma mesma espécie, tanto em ambiente natural como em cativeiro (Tavares-Dias et al., 2006). As medidas de comprimento e peso de espécies de peixe têm sido usadas também para transformar dados coletados a campo em índices apropriados (Gomiero & Braga, 2003; Lemos et al., 2006; Tavares-Dias et al., 2006). No ciclo reprodutivo esta relação tem sido usada também como uma maneira de estimar o fator de condição, indicador quantitativo do bem estar do peixe em sua

interação com o meio (acúmulo de gordura, suscetibilidade às mudanças ambientais, desenvolvimento gonadal, etc) (Araújo et al., 1999). Por exemplo, durante as pesquisas de campo o comprimento pode ser medido mais fácil e acuradamente que o peso, assim as informações sobre o peso do peixe podem ser estimadas a partir do comprimento, quando a relação peso-comprimento é conhecida para aquela determinada população (Tavares-Dias et al., 2006; Tavares-Dias et al., 2010).

A equação da relação peso-comprimento pode fornecer informações sobre o crescimento relativo de uma determinada espécie, usando a curva de potência, representada pela equação $W = a \cdot L^b$, onde W é o peso total em gramas e a variável dependente; e L é o comprimento total em centímetros e a variável independente (Navarro et al., 2006). Os valores de a e b são constantes, que são estimadas pela regressão linear da equação transformada $W = \log A + B \cdot \log L$. Finalmente, estima-se os valores de a e b da curva de potência, sendo $a = e^A$ e $b = B$ (Araújo et al., 1999; Tavares-Dias et al., 2010). Os valores estimados da constante de regressão (b) podem variar de 2,50 a 3,50 (Le Cren, 1951), de acordo com fatores bióticos e abióticos (Gomiero & Braga, 2003; Lemos et al., 2006). Quando o crescimento é isométrico ($b=3,00$) sugere-se incremento do peso e comprimento na mesma proporção (Tavares-Dias et al., 2006; Rego et al., 2008), ou seja, o peso aumenta com o comprimento elevado ao cubo, o que teoricamente é o ideal para peixes (Gomiero & Braga, 2003; Tavares-Dias et al., 2010). Por outro lado, quando $b < 3,0$ o incremento é devido ao peso, e quando $b > 3,0$ o incremento é devido ao comprimento (Rocha et al., 2005). Rego et al. (2008) sugerem que estudos de alometria devem ser usados para caracterizar as diferentes estratégias de crescimento dos peixes associados aos fatores ecológicos, comportamentais e fisiológicos das espécies.

O fator de condição (K) é um importante indicador do grau de higidez de um indivíduo e seu valor reflete as condições nutricionais recentes e/ou gastos das reservas em atividades cíclicas, sendo possível relacioná-lo às condições ambientais e aos aspectos comportamentais das espécies (Gomiero et al., 2010). Pode ser utilizado para avaliar o uso da fonte alimentar, as diferentes condições de alimentação em espécies distintas, assim como interferências da densidade populacional, do clima e de outras condições (Souza et al., 2000; Lizama & Ambrósio, 2002). Portanto, nos peixes, o fator de condição é um índice corporal que reflete as interações entre o peixe e o ambiente em que se encontra (Tavares-Dias et al., 2008).

O fator de condição de Fulton (K_f), assume que a relação peso-comprimento é isométrica, enquanto o fator de condição alométrico (K_a) que as várias espécies de peixes

podem ter diferentes relações de peso-comprimento (Rocha et al., 2005) e o fator de condição relativo (Kn) considera a relação entre o peso observado e o peso esperado (Le Cren, 1951).

Estudos histológicos e anatômicos

Análises laboratoriais como citologia, análises bioquímicas, histologia e histomorfometria têm sido empregadas com o objetivo de avaliar os efeitos tóxicos nos tecidos dos seres vivos, apesar destes não averiguarem as substâncias em si, mas as lesões causadas por elas (Ferguson, 1989).

A histologia ainda é uma ferramenta de pouco uso na aquicultura, devido à escassez de informações, pois estas se encontram dispersas. Porém, o maior objetivo desta técnica tem sido esclarecer o funcionamento dos tecidos quanto às células e suas correlações, para que a histopatologia possa ser utilizada como ferramenta para o diagnóstico de doenças, por meio do uso deste conhecimento na compreensão das alterações patológicas teciduais, se inflamatórias, degenerativas, necróticas ou neoplásica, por exemplo. Ainda assim, existe a necessidade de que se tenha um bom conhecimento das estruturas normais, possíveis alterações e variações sazonais que normalmente possam ocorrer nos órgãos dos peixes (Rocha et al., 1997; Cavichiolo, 2009).

A histologia é considerada um excelente método de avaliação de respostas às agressões em bioindicadores causados por agentes tóxicos sobre uma determinada fauna em situações de impacto ambiental. Quando associada à histomorfometria, possibilita quantificar as transformações teciduais em diferentes tecidos responsivos a agentes tóxicos (Ferguson, 1989). Estas técnicas, e conseqüentemente a histopatologia, são ferramentas que quando utilizadas como biomarcadores, além de serem métodos rápidos na detecção de agressões, especialmente as subletais, apresentam importantes características biológicas organizacionais (Bernet et al., 1999).

Existem, atualmente, programas de monitoramento que buscam estudar os ecossistemas marinhos e a influência da poluição ambiental sobre as características histológicas em peixes (Bernet et al., 1999). Alguns estudos, por exemplo, correlacionam o aparecimento de lesões neoplásicas e pré-neoplásicas com o contato dos animais com substâncias nocivas como hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (HAP), bifenilos policlorados (PCB), dicloro-difenil-tricloroetano (DDT), entre outros. Os resultados indicam que há indícios que peixes jovens estão mais susceptíveis a lesões não neoplásicas, e adultos à neoplásicas, havendo forte correlação entre os graus de poluição e presença de lesões nestes animais (Myers et al., 1992).

As padronizações das técnicas que descrevem as lesões histológicas em peixes de água doce são poucas e, associadas às particularidades encontradas nas diferentes espécies, dificultam a realização de estudos comparativos (Bernet et al., 1999).

Desta forma, o estudo de características biométricas de determinados órgãos, possibilitaria identificar informações sobre a característica desta espécie em seu sistema de produção. Isso seria possível por meio da descrição de uma ferramenta de avaliação que possa ser aplicável em qualquer órgão, levando a uma quantificação padronizada, permitindo a possibilidade de comparação legítima entre diferentes estudos e com algumas ressalvas, a comparação entre diferentes órgãos também. Além disso, podem ser obtidos dados que serviriam de base para futuros estudos para uma melhor compreensão do significado histológico após interferência de contaminantes que provoquem impactos econômicos nesta cadeia produtiva, de vital importância para a economia.

Neste contexto, a escolha dos órgãos alvos é crucial para a relevância dos dados obtidos, podendo, principalmente, envolver órgãos de contato direto com o agente intoxicante. De uma maneira geral, os órgãos de metabolismo e de defesa são os mais indicados para tal estudo, como o fígado, baço, rim e as brânquias, em peixes.

Fígado

O fígado tem sido um importante ponto de análise para compreensão das diferenças entre espécies, especialmente dos peixes. Assim como nos demais vertebrados é relativamente grande e um importante órgão no controle de funções vitais da fisiologia íctia, armazenando nutrientes, produzindo bile e mantendo a homeostase corpórea com o processamento de carboidratos, proteínas, lipídeos e vitaminas (Bruslé & Anadon, 1996). Além disso, desempenha papel chave na síntese de proteínas do plasma, como albumina, fibrinogênio e fatores complementares tanto pelo anabolismo quanto pelo catabolismo e detoxificação. É crucial para a vitelogênese e, pelo fato dos peixes serem mais sensíveis a poluentes que os demais vertebrados, é considerado um órgão chave na avaliação de parâmetros biológicos e ambientais que podem afetar sua arquitetura e função (Genten et al., 2009).

Localizado crânio-ventralmente na cavidade celomática, anterior ao estômago, ventral ao esôfago e separado do coração por uma fina membrana conjuntiva, o septo transversal (De Iuliis & Pulerá, 2007), pode estar disposto em dois ou mais lóbulos distintos ou ainda em um único órgão.

Em seu polo cranial estão localizadas a artéria celomática e veia cava, assim como em sua face visceral a vesícula biliar, veia porta e ducto biliar comum (Roberts & Ellis, 2012). Apresenta coloração vermelho escura (De Iuliis & Pulerá, 2007), mas assim como seu tamanho, a cor pode variar devido ao estado nutricional, variando de amarelada, devido ao acúmulo de lipídeos e glicogênio no interior das células hepáticas, a marrom avermelhada, pela intensa vascularização (Roberts 2000).

O órgão apresenta-se revestido por uma fina cápsula de tecido conjuntivo e é constituído principalmente por hepatócitos poliédricos com núcleos centrais, fortemente corados marginalmente e nucléolo evidente (Roberts, 2000). Além disso, possui muitos ductos, sinusóides, capilares e veias, os quais se encontram entremeados entre os hepatócitos, facilitando trocas constantes entre o sistema circulatório e o tecido hepático. Pela artéria hepática o fígado recebe o oxigênio e pela veia porta recebe metabólitos e nutrientes provenientes do trato digestório, os quais são processados e posteriormente distribuídos para os demais tecidos do organismo (Gonçalves et al., 2012).

Pode ser único ou associado a outra víscera, como o pâncreas e, ao contrário dos mamíferos, os hepatócitos possuem pouca tendência em arranjar-se em cordões, e exibir lóbulos envoltos por tecido conectivo e tríade portal tão evidente (Roberts, 2000). Os sinusóides estão distribuídos irregularmente, em menor número que nos mamíferos e delineados por células endoteliais de núcleo evidente. As células de Kupffer não são encontradas rodeando os sinusóides, que são revestidos por células fenestradas delimitando o espaço de Disse, representando uma zona entre as células sinusoidais e os hepatócitos, ambos contendo micróvilos, assim como células de armazenamento chamadas de células de Ito. Os canalículos biliares são revestidos por uma camada de células epiteliais cuboides que se anastomosam em ductos de diâmetros maiores (Gonçalves et al., 2012). Estes se fundem para formar a vesícula biliar, que contém bile amarelo esverdeada, conduzida ao intestino pelo ducto biliar comum. Tecido hematopoiético completo, incluindo centros melanomacrófagos, também podem ser encontrados em quantidades variáveis em torno de veias calibrosas (Roberts, 2000).

Baço

O baço é um dos principais órgãos hematopoiéticos, assim como o rim (Genten et al., 2009), e, em menor extensão as áreas peri-portais do fígado. Funciona como um sítio para filtrar o sangue, destruindo células e armazenando eritrócitos (Morrison, 2007)

Geralmente apresenta-se como um órgão vermelho escuro localizado na porção ventral da cavidade peritoneal, podendo ser triangular, oval ou arredondado (Yanong, 2003). Localizado perto da grande curvatura do estômago ou na flexão do intestino, pode ser único, ou dividido em uma estrutura maior e outras menores (Morrison, 2007; Roberts & Ellis, 2012). Possui os mesmos elementos básicos que nos vertebrados superiores, como vasos sanguíneos, polpas vermelha e branca, além de ser coberto por uma fina cápsula fibrosa com pouca evidência de capacidade contrátil (Morrison, 2007; Genten et al., 2009).

A polpa vermelha é um extenso sistema interligado de cordões esplênicos e capilares sinusóides, que consiste principalmente de células eritróides e trombócitos e, geralmente, compreende a maior parte do parênquima esplênico. A polpa branca consiste principalmente de células linfóides, tipicamente envolvida por vasos arteriais e centros melanomacrófagos (MMC) formando pequenos aglomerados no parênquima (Genten et al., 2009).

Estudo realizado por Maciel et al. (2012) revelou que em alevinos de pirarucu com aproximadamente 8 cm de comprimento, o baço apresentou coloração vermelho escura, dividindo-se em três lobos, sendo um deles maior. Estavam localizados próximo ao intestino anterior, envolto por tecido adiposo abdominal, onde, para os três lobos, havia regiões de polpa branca dispersas no parênquima, ricas em células linfóides, e polpa vermelha, caracterizada pela presença dos cordões esplênicos formados por eritrócitos, trombócitos e células semelhantes a fibroblastos. Vasos sanguíneos estavam presentes no seio do parênquima esplênico, assim como pequenos e dispersos centros de melanomacrófagos (CMM), sendo revestido externamente por uma cápsula de tecido conectivo fibroso e fina camada de músculo liso.

Rim

O rim é importante órgão no que diz respeito à manutenção do ambiente interno estável, quanto à água e ao sal, excreção e também em parte do metabolismo de xenobióticos. É um órgão misto, composto de elementos hematopoiéticos, fagocitários, endócrinos e excretores. Varia no formato nas diferentes espécies, podendo ser fundido, situando-se em uma posição retro peritoneal e ventral à coluna vertebral (Morrison, 2007), acima da bexiga natatória (De Iullis & Pulerá, 2007), estendendo-se da região cefálica até a região posterior do abdômen, ou dividido em rim cefálico e caudal. Sua superfície externa é revestida por uma fina capsula conjuntiva que o separa da cavidade abdominal. Suprimento sanguíneo ocorre pelas artérias renais que se originam diretamente da aorta (Roberts, 2000). O cefálico, quando presente, possui maior constituição hematopoiética enquanto o caudal, excretora propriamente dita. Esta

possui glomérulos bem vascularizados, túbulos contorcidos proximais divididos em dois segmentos: o primeiro com células com cílios bem desenvolvidos voltados para o lúmen, e o segundo com cílios menores; túbulos contornados intermediários e distais, sem cílios, que se conectam em pequenos túbulos coletores que se juntam e desembocam nos ureteres (Roberts, 2000; Genten et al., 2009). Os ureteres conduzem a urina dos canais de colheita para a papila urinária que abre para o meio externo na abertura urogenital, posterior ao ânus (De Iullis & Pelurá, 2007; Morrison, 2007).

Maciel et al. (2012) relatam que o rim de alevinos de pirarucu, com aproximadamente 8 centímetros de comprimento, apresenta coloração vermelho amarronzada, consistência esponjosa, formato alongado e segmentado. O órgão encontra-se alojado na região dorsal da cavidade celomática, imediatamente ventral à artéria aorta dorsal e à bexiga natatória modificada. O estudo demonstrou que o órgão ocupou os dois terços finais da cavidade celomática, sendo o rim direito maior que o esquerdo. Os lobos renais mostraram-se parcialmente fundidos, e nas três porções de rim analisadas a organização histológica seguiu padrão similar: a região externa (cortical) composta por tecido hematopoiético e a região mais central (medular) apresentou túbulos renais – túbulos contornados proximal e distal, e túbulos coletores - e pouco tecido intersticial hematopoiético e linfóide. Os ductos coletores estenderam-se desde a porção cranial até a caudal e localizaram-se na região central de cada lobo renal. Caracterizaram-se por apresentarem um extenso lúmen circundado por epitélio pseudoestratificado com células epiteliais mucosas e fina camada de células musculares lisas. Foi observada maior quantidade de glomérulos no rim medial e néfrons imaturos nas três porções do rim. Registraram-se poucos e reduzidos centros de melanomacrófagos. A veia cardinal posterior estendeu-se desde o rim caudal até o cranial, onde aumentou de calibre para levar sangue ao coração. A partir dessas análises, observou-se que o rim de alevinos de pirarucu exibiu organização diferenciada da maioria dos peixes teleósteos, apresentando ductos coletores também do rim cranial.

A função primária do rim em peixes é a regulação osmótica de água e sais, diferente dos mamíferos, que excretam resíduos nitrogenados. Nos peixes, a excreção da maior parte destes resíduos ocorre nas brânquias. Em peixes de água doce, os rins conservam sais e eliminam o excesso de água, graças à uma elevada taxa de filtração glomerular, reabsorção dos sais pelos túbulos proximais e diluição da urina nos túbulos contornados distais (Morrison, 2007). Além disso, sua porção hematopoiética desenvolve importante papel na remoção de partículas estranhas, células senis e agentes infecciosos provenientes do corpo (Yanong, 2003). As células

blásticas estão situadas dentro de um estroma de tecido reticuloendotelial, similar ao mesmo que ocorre na medula óssea de mamíferos (Roberts, 2000).

A função imune ocorre graças à presença de centros de melanomacrófagos (CMM), aglomerados de células pretas ou marrons, também comumente encontradas no baço e fígado, dependendo da espécie, condição característica dos teleósteos (Genten et al., 2009). Possuem uma delicada cápsula argirofílica e geralmente restringem-se aos canais vasculares.

Inúmeras são as funções dos melanomacrófagos, envolvendo fagocitose de patógenos resistentes, como esporos de parasitos e bactérias, apresentação de antígenos na resposta imune, destruição, detoxificação ou reciclagem de materiais endógenos e exógenos, depósito de metabólitos de células mortas, incluindo-se os eritrócitos e resposta a corpos estranhos, incluindo agentes infecciosos. Essas estruturas têm analogia primitiva com os centros germinativos de linfonodos das aves e mamíferos e contêm diferentes pigmentos, como a melanina, hemossiderina, lipofucsina e pigmento lipogênico que podem auxiliar nos mecanismos de defesa do hospedeiro (Campos et al., 2008).

A estrutura do néfron de peixes varia consideravelmente entre as espécies marinhas e de água doce, demonstrando as diferenças significativas de acordo sua função. Mesmo assim, a arquitetura celular básica é similar. Cada néfron consiste de vários segmentos com estrutura e função específica (Morrison, 2007). O glomérulo das diferentes espécies de teleósteos varia em número e tamanho dos tufo capilares. O epitélio parietal é achatado e o espaço de Bowman é relativamente pequeno. O colo glomerular é contínuo com o epitélio visceral e parietal da cápsula de Bowman, demonstrando lúmen estreito rodeado por células epiteliais colunares ou cúbicas de citoplasma basófilo. Este segmento é curto e abre para o túbulo contorcido proximal, mais amplo, que contém células colunares com proeminente borda em escova (microvílos) saliente para dentro do lúmen, vacúolos apicais abundantes e núcleo basal. Alguns peixes apresentam a porção mais proximal deste túbulo menos eosinofílico do que a segunda porção, que possui borda em escova menos desenvolvida. Nos túbulos contorcidos proximais, as células apresentam-se manchadas pela maior concentração de mitocôndrias relacionadas às dobras da membrana plasmática basal. O segmento intermediário possui lúmen mais estreito, rodeado por células cuboides que normalmente possuem cílios, que auxiliam na filtração. O segmento distal é delineado por epitélio colunar bem definido sem a borda em escova. Túbulos e ductos coletores estão espalhados por todo o rim. Seu epitélio colunar é levemente eosinofílico, com o núcleo basal e sem borda em escova. Sua anastomose origina ductos mais calibrosos que

possuem epitélio pseudoestratificado associado a glândulas mucosas, incorporando tecido muscular e conectivo em seu percurso (Genten et al., 2009).

Relações somáticas

O estudo das características biométricas dos órgãos do sistema hematopoiético em animais possibilita a compreensão de possíveis desequilíbrios que possam ocorrer durante o crescimento, assim como em processos patológicos (Tavares-Dias et al., 2000).

Os teleosteos são desprovidos de medula óssea e linfonodos (Tavares-Dias & Moraes, 2004), tendo o baço, timo, fígado e rim como os órgãos imunes mestres, de forma que esses são importantes órgãos eritro, trombo e leucopoiéticos. Além disso, o baço participa do sistema imunológico específico e inespecífico (Benacon et al., 2015) e o fígado estoca grande quantidade de gordura e glicogênio, servindo de reserva energética (Tavares-Dias et al., 2006). Os tamanhos e formas variam entre as espécies. Nas espécies tropicais cultivadas o fígado é relativamente grande, alongado e de coloração marrom (Ranzani-Paiva & Tavares-Dias, 2002). Fatores como infecções parasitárias, estresse e outros, podem produzir alterações no bem estar dos peixes e nos tecidos hematopoiéticos, conseqüentemente, interferindo no crescimento corporal dos animais, bem como no tamanho relativo destas vísceras. Assim, a determinação de valores padrão da relação hepatossomática, esplenossomática e nefrossomática são de grande importância para compreensão dos distúrbios que possam ocorrer durante os processos mórbidos (Tavares-Dias et al., 2006).

As relações víscerosomáticas representam o percentual de massa do órgão de interesse em relação ao peso corporal. O resultado fornece um valor relativo que pode servir de base para comparação entre indivíduos da mesma espécie em diferentes condições de sobrevivência ou cultivo, com presença de doenças de diversas naturezas ou em diferentes fases de crescimento. Os índices hepatossomático (RHS), esplenossomático (RES) e nefrossomático (RNS) podem ser calculados pelas respectivas equações: $RHS = (\text{peso do fígado (g)} \times 100) / \text{peso corporal (g)}$; $RES = (\text{peso do baço (g)} \times 100) / \text{peso corporal (g)}$; $RNS = (\text{peso do rim (g)} \times 100) / \text{peso corporal (g)}$ (Tavares-Dias et al., 2000).

O índice hepatossomático está diretamente relacionado com o estoque energético (glicogênio) em peixes carnívoros, sendo este encontrado em grande quantidade no fígado e músculo destes animais, responsável, junto com os lipídeos, pelo crescimento e ganho de peso (Cyrino et al., 2000).

Segundo Shearer (1994), em peixes juvenis o crescimento da carcaça é maior que o crescimento das outras partes do corpo, onde os órgãos internos, com exceção do lipídio visceral, tendem a aumentar de peso em proporções pequenas. Este mesmo autor cita que o tamanho relativo dos tecidos e órgãos, sob condições adequadas de nutrição são dependentes apenas do tamanho do peixe e do ciclo de vida. Entretanto, em geral, são encontradas diferenças marcantes em tamanho e peso do fígado de peixes alimentados com diferentes dietas.

Altos níveis de proteína geralmente causam uma quebra do balanço na relação energia/proteína nas dietas, fazendo com que os peixes supram suas necessidades em energia a partir da elevação do consumo de alimento, piorando a conversão alimentar e reduzindo o ritmo de ganho de peso, com sérios prejuízos aos resultados econômicos das criações (Cyrino et al., 2000).

Estudos mostraram que os valores da relação hepatossomática encontrados eram inversamente proporcionais aos níveis de proteína e diretamente proporcionais aos níveis de carboidratos digestíveis dietéticos, o que mostra que quanto menor o nível de proteína dietética, maior a utilização de carboidratos e a deposição de glicogênio no fígado (Hanley, 1991). Neste contexto, variações na quantidade de gordura e/ou glicogênio estocados no fígado influenciam significativamente no peso deste órgão, alterando assim a relação hepatossomática (Tavares-Dias et al., 2000).

Nos peixes a maturação sexual e o desenvolvimento das gônadas envolvem significantes alterações fisiológicas. Assim, à medida que as gônadas entram em processo de maturação decresce o peso do fígado e das vísceras. Esse decréscimo é decorrente da redução da ingestão de alimentos, que faz com que o organismo utilize parte da energia acumulada nas vísceras e no fígado (Ranzani-Paiva & Tavares-Dias, 2002).

A esplenomegalia sugere o desenvolvimento de respostas leucocitárias às infecções ou a produção de eritrócitos para reposição sanguínea em processos anêmicos. O aumento no volume do baço ocorre devido a alterações bioquímicas, fisiológicas e imunológicas necessárias para manter a homeostasia orgânica como resposta às infecções (Lowe-Jinde, 1980). Redução na RES em peixes pode ser interpretada como evidência de contração esplênica, pois os peixes tendem a deprimir os estoques esplênicos de eritrócitos quando em situação de estresse hipóxico ambiental (Tavares-Dias et al., 2008).

Estudos revelam que o parasitismo produz redução (De Faria et al., 2014) e intoxicação por tetracloreto de carbono, assim como processo infeccioso provoca o aumento da RES

(Moraes, 2014). Assim, os estudos indicam que apesar do tamanho do baço e fígado variar entre as diferentes espécies de peixes, é possível obter estimativas relativas do tamanho desses órgãos, com a utilização das relações espleno e hepatossomática, especialmente nas espécies em que o peso de seus órgãos tem vinculação direta com o peso corpóreo do animal (Tavares-Dias et al., 2006).

A relação nefrossomática é muito pouco descrita na literatura, e quase inexistente em teleosteos, apesar da importante função do rim nos animais. O fato de apresentar em sua constituição tanto tecido excretor quanto hematopoiético (Maciel et al., 2012), reflete diretamente na fisiologia do animal, quando submetido a condições sanitárias, nutricionais e de manejo ruins (Tavares-Dias et al., 2000). Neste contexto, ressalta-se a necessidade da realização de estudos mais detalhados deste órgão em animais aquáticos, especialmente em peixes.

Estereologia

A estereologia é um conjunto de ferramentas que busca analisar pela microscopia de cortes histológicos bidimensionais a estimativa das quantidades geométricas, tais como o volume, a área de superfície, o comprimento ou o número de partículas (células ou outras estruturas) presentes nos diferentes tecidos. Ao contrário do que se pensa a estereologia possui forte embasamento matemático e estatístico que garantem acurácia e precisão na estimativa tridimensional a partir de imagens microscópicas bidimensionais, desde que respeitadas as dimensões da amostra com colheita sistematizada e randomização. A morfometria avalia sobretudo variáveis bidimensionais através de calibradores micrométricos que fornecem medidas convertidas em unidades reais de micrômetros (μm). Estes métodos são, atualmente, vistos como métodos essenciais na quantificação de células ou outras estruturas que compõem os diferentes tecidos (Marcos et al., 2012), também denominado de densidade volumétrica do órgão (Sundberg, 1992).

Em estudo realizado por Rocha et al. (1997), com fígado de truta marrom (*Salmo trutta* – Telostei, Salmonidae), observou que não havia diferença morfométrica significativa entre machos e fêmeas e forte correlação entre o volume do fígado e corpóreo. O parênquima monopolizou o volume hepático com aproximadamente 95,2%. As veias ocuparam aproximadamente 76,3% do estroma (isto é, aproximadamente 3,8% do volume hepático), seguido pelos ductos biliares (aproximadamente 17,4% do estroma, e 0,8% do volume hepático), e finalmente o tecido conectivo, artérias, e centros melanomacrófagos (os três

correspondendo a aproximadamente 6,3% do estroma, e conseqüentemente 0,3% do volume hepático).

Acharezzi et al. (2015) compararam dados histológicos e morfométricos de hepatócitos de ratos Windstar expostos ao chá de ayahuasca (cipó de *Banisteropsis caapi* e folhas de *Psycotria viridis*) e constataram que mesmo sem alterações histológicas visuais, houve alteração nos parâmetros de fosfatase alcalina e gama-glutamil-transferase com diferença significativa na morfometria nuclear e celular entre o grupo controle e tratados, evidenciando a importância da técnica.

REFERÊNCIAS

ACHAREZZI, B.; TANGERINO, G.C.; SPERANDIO, L.G.; MESTRINER, A.C.D.; MALFARÁ, W.R. Avaliação hepática em ratos Wistar expostos ao chá de ayahuasca. Revista Saúde e Pesquisa, 8(3):225-232, 2015.

ALMEIDA, J.G.; REBOUCAS, P.M.; GALVAO, J.A.S.; SILVA, M.C.; BARBOSA FILHO, J.A.D.; GADELHA, C.R.F. Estudo Preliminar Sobre o Comportamento Respiratório de Pós-larvas de pirarucu *Arapaima gigas* (Curvier, 1817) em Viveiros Escavados. In: VII CONGRESSO BRASILEIRO DE ENGENHARIA DE PESCA, Belém. Engenharia de Pesca: Construindo o Desenvolvimento Sustentável do Setor Pesqueiro Nacional, 2011.

ARAÚJO, F.G.; DUARTE, S.; GOLDBERG, R.S.; FICHBERG, I. Indicadores reprodutivos de *Parauchenipterus striatulus* (Steindachner) (Pisces, Auchenipteridae) na Represa de Ribeirão das Lajes, Rio de Janeiro, Brasil. Revista Brasileira de Zoologia, 16(4):1071-1079, 1999.

BARD, J.; IMBIRIBA, E.P. Piscicultura do pirarucu - *Arapaima gigas*. Circular técnica, EMBRAPA - CPATU, Belém, 1986. 17p.

BENACON, M. DA S.; SANTOS, S.M.; ARAÚJO, R.L.; PANTOJA-LIMA, J.; ARIDE, P.H.R.; OLIVEIRA, A.T. Índices de condição corporal de *Brycon amazonicus* matrinxã do Rio Juruá, Amazonas. Revista Colombiana de Ciência Animal, 7(1):44-49, 2015.

BERNET, D.; SCHIMIDT, H.; MEIER, W.; BURKRARDT-HOLM, P.; WAHLI, T. Histopathology in fish: proposal for a protocol to assess aquatic pollution. *Journal of fish disease*. n.22. p. 25-34, 1999.

BRUSLÉ, J.; AMADON, G.G. The structure and function of fish liver. In: MUNSHI, J.S.D.; DUTTA, H.M. *Fish morphology*. North-Holland: Science Publishers, 1996. P. 77-93.

CAMPOS, C.M.; MORAES, J.R.E.; MORAES, F.R. Histopatologia de fígado, rim e baço de *Piaractus mesopotamicus*, *Prochilodus lineatus* e *Pseudoplatystoma fasciatum* parasitados por myxosporídios, capturados no rio Aquidauna, Mato Grosso do Sul, Brasil. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, 17(4):200-205, 2008.

CASTELLO, L. Nesting habitat of *Arapaima gigas* (Schinz) in Amazon floodplains. *Journal of Fish Biology*, 72:1520-1528, 2008.

CAVICHIOLO, F. Histologia: ferramenta relevante para estudos em peixes cultivados. In: TAVARES-DIAS et al. *Manejo e sanidade de peixes em cultivo*. Capítulo 23. EMBRAPA Amapá, Macapá. 2009.

CYRINO J.E.P.; PORTZ, L.; MARTINO, R. Retenção de proteína e energia em juvenis de “Black Bass” *Micropterus salmoides*. *Scientia Agricola*, 57(4):609-616, 2000.

DE FARIA, V.P. BELO, M.A. de A.; DE MORAES, A.C.; PRADO, E.J. da R.; FOZ, E.P. Acantocefalose em piranhas (*Serrasalmus maculatus*) resultou em alterações somáticas. 41º Conbravet, Gramado-RS, 2014.

DE IULIIS, G.; PULERÁ, D. *The dissection of vertebrates – A laboratorial manual*. Elsevier, 2007. 298p.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS (FAO), Fisheries and Aquaculture Department. *Global Aquaculture Production Statistics for the year 2013*, Roma, Italia, 2013.

FERGUSON, H.W. Systemic pathology of fish, a text and atlas of comparative tissue responses in diseases of teleosts. Ames: Iowa State University Press, 1989.

GALVÃO DE LIMA, L.; BATISTA, V.S. Estudos etnoictiológicos sobre o pirarucu *Arapaima gigas* na Amazônia Central. *Acta Amazônica*, 42(3):337-344, 2012.

GENTEN, F.; TERWINGHE, E.; DANGUY, A. Atlas of fish histology. Université Libre de Bruxelles: Science Publisher. 2009. 219p.

GOMIERO, L.M.; BRAGA, F.M.S. Relação peso-comprimento e fator de condição para *Cichla* cf. *ocellaris* e *Cichla monoculus* (Perciformes, Cichlidae) no reservatório de Volta Grande, rio Grande-MG/SP. *Acta Scientiarum* 25:79-86, 2003.

GOMIERO, L.M.; VILLARES-JUNIOR, G.A.; BRAGA F.M.S. Relação peso-comprimento e fator de condição de *Oligosarcus hepsetus* (Cuvier, 1829) no Parque Estadual da Serra do Mar - Núcleo Santa Virgínia, Mata Atlântica, estado de São Paulo, Brasil. *Biota Neotropica*, v. 10, n. 1, p. 101-105. 2010.

GONÇALVES, L.U.; RODRIGUES, A.P.O.; MORO, G.V.; CARGNIN-FERREIRA, E.; CYRINO, J.E.P. Morfologia e fisiologia do sistema digestório de peixes. In: FRACALOSSO, D.M.; CYRINO, J.E.P. NUTRIAQUA – Nutrição e alimentação de espécies de interesse para aquicultura brasileira. Florianópolis: Sociedade Brasileira de Aquicultura e Biologia Aquática, 2012. 375p.

HANLEY, F. Effects of feeding supplementary diets containing varying levels of lipid on growth, food conversion, and body composition of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* (L.). *Aquaculture*, 93:323-334, 1991.

IMBIRIBA, E.P.; LOURENÇO JUNIOR, J.B.; DUTRA, S. Rendimento de carne de pirarucu, *Arapaima gigas* (CUVIER). Belém: EMBRAPA-CPATU, 1994. 21p. (EMBRAPA-CPATU. Boletim de Pesquisa, 150).

IMBIRIBA, E.P. Potencial de criação de pirarucu, *Arapaima gigas*, em cativeiro. *Acta Amazônica*. 31(2):299-316, 2001.

LE CREN, E.D. The length-weight relationship and seasonal cycle in gonadal weight and condition in the perch (*Perca fluviatilis*). *Journal of Animal Ecology*. 20:201-19, 1951.

LEMOS, J.R.G.; TAVARES-DIAS, M; MARCON, J.L.; LEMOS, P.E.M.; AFFONSO, E.G. & ZAIDEN, S.F. Relação peso comprimento e fator de condição em espécies de peixes ornamentais do Rio Negro, Estado do Amazonas, Brasil. *CIVA 2006* (<http://civa2006.org>): 721-725, 2006.

LIZAMA, M.A.P.; AMBRÓSIO, A.M. Condition factor in nine species of fish of the Characidae Family in the upper Paraná River floodplain, Brazil. *Brazilian Journal of Biology* 62:113-24, 2002.

LOWE-JINDE, L. Observations of rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson, infected with *Cryptobia salmostica*. *Journal Fish Biological*. London, 17(1):23-30, 1980.

MACIEL, P.O.; RODRIGUES, A.P.O.; GALECO, L.N.; MORON, S.E. Anatomia e histologia funcional do rim e baço de alevinos de pirarucu (*Arapaima gigas*). Congresso da Sociedade Brasileira de Aquicultura e Biologia Aquática, 5. Unir, consolidar e avançar. Palmas: AQUABIO, 2012.

MARCOS, R.; MONTEIRO, R.A.F.; ROCHA, E. The use of design-based stereology to evaluate volumes and numbers in the liver: a review with practical guidelines. *Journal of Anatomy*. 220:303-317, 2012.

MORAES, A.C. Participação hepática e efeito glicocorticoide na resposta inflamatória aguda induzida por *Aeromonas hydrophila* em tilápia do Nilo, intoxicada por CCl₄. Programa de Pós-Graduação (Mestrado) da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da Universidade Estadual Paulista, Campus de Jaboticabal, 2014. 72p.

MORRISON, J. Normal histology. *In*: MUMFORD, S.; HEIDEL, J.; SMITH, C.; MORRISON, J.; MACCONNELL, B.; BLAZER, V. *Fish hitology and histopathology*. United States Fish and Wildlife Service - National Conservation Training Center, 2007. 357p.

MYERS, M.S.; OLSON, O.P.; JOHNSON, L.L.; STEHR, C.S.; HOM, T.; VARANASI, U. Hepatic lesions other than neoplasms in subadult flatfish from Puget Sound, Washington: relationships with indices of contaminant exposure. *Marine Environmental Research*. 34:45-51, 1992.

NAVARRO, R.D.; DA SILVA, R.F.; RIBEIRO FILHO, O.P.; CALADO, L.L.; REZENDE, F.P.; SILVA, C.S.; SANTOS, L.C. Comparação morfométrica e índices somáticos de machos e fêmeas do lambari prata (*Astyanax scabripinnis* Jerenyns, 1842) em diferente sistema de cultivo. *Zootecnia Tropical*, 24(2):165-176, 2006.

ONO, E.A.; HALVERSON, M.R.; KUBITZA, F. Pirarucu o gigante esquecido. *Panorama da aquicultura*. 14(81):14-25, 2004.

ONO, E.A.; KEHDI, J. Manual de boas práticas de produção do pirarucu em cativeiro. 1ª ed. SEBRAE, Brasília, 2013. 45p.

PEREIRA-FILHO, M.; CAVERO, B.A.S.; ROUBACH, R.; ITUASSÚ, D.R.; GANDRA, A.L.; CRESCÊNCIO, R. Cultivo do pirarucu (*Arapaima gigas*) em viveiro escavado. *Acta Amazonica*, 33(4):715-718, 2003.

PEREIRA-FILHO, M.; ROUBACH, R. Pirarucu (*Arapaima gigas*). In: BALDISSEROTTO, B.; GOMES, L.C. Espécies nativas para a piscicultura no Brasil. 2ª ed. Santa Maria: Editora da UFSM, 2010. 608p.

PIAZZA, T.B. Estudo descritivo das categorias taxinômicas do pirarucu *Arapaima gigas*. Universidade do Estado de Santa Catarina, Laguna, 2012.

RANZANI-PAIVA, M.J.T.; TAVARES-DIAS, M. Eritrograma, relação viscerossomática, hepatossomática e esplenosomática em tainhas *Mugil platanus* Günther (Osteichthyes, Mugilidae) parasitadas. *Revista Brasileira de Zoologia*, 19(3):807-818, 2002.

REGO, A.C.L.; PINESE, O.P.; MAGALHÃES, P.A.; PINESE, J.F. Relação peso-comprimento para *Prochilodus lineatus* (Valenciennes, 1836) e *Leporinus friderici* (Bloch, 1794)

(Characiformes) no reservatório de Nova Ponte –EPDA de Galheiro, Rio Araguari, MG. Revista Brasileira de Zootecias 10: 13-21, 2008.

ROBERTS, R.J. Fish pathology. 3^a ed. W.B. Saunders. 2000. 508p.

ROBERTS, R.J.; ELLIS, A.E. The Anatomy and physiology of teleosts. In.: ROBERTS, R.J. et al., Fish Pathology, 4^o ed. Blackwell Publishing, Wiley-Blackewll, Iowa, USA, p.17-61, 2012. 581p.

ROCHA, E.; MONTEIRO, R.A.F.; PEREIRA, C.A. Liver of the Brown Trout, *Salmo trutta* (Teleostei, Salmonidae): A stereological study at light and electron microscopic levels. The Anatomical Recorder, 247:317-328, 1997.

ROCHA, M.A.; RIBEIRO, E.L.; MIZUBUTI, I.Y.; SILVA, L.D.F.; BOROSKY, J.C.; RUBIN, K.C.P. Uso do fator de condição alométrico e de fulton na comparação de carpa (*Cyprinus carpio*), considerando os sexos e idade. Semina: Ciências Agrárias, Londrina, 26(3):429-434, 2005.

SCRIMGEOUR, G.J.; WICKLUM, D. Aquatic ecosystem health and integrity: problems and potencial solutions. Journal of North American Benthological Society. 15:254-261, 1996.

SEAGRI, Secretaria de Estado da Agricultura, Pecuária, Desenvolvimento e Regularização Fundiária. www.rondonia.ro.gov.br/seagri/ . Acessado em 24/06/2015.

SEDAM, Secretaria de Estado de Desenvolvimento Ambiental de Rondônia. www.sedam.ro.gov.br .Acessado em 24/06/2015.

SHEARER, K.D. Factors affecting the proximate composition of cultured fishes with emphasis on salmonids. Aquaculture, 119:63-88, 1994.

SOARES, M.G.M.; COSTA, E.L.; SIQUEIRA-SOUZA, F.K.; ANJOS, H.D.B.; YAMAMOTO, K.C.; FREITAS, C.E.C. Peixes de lagos do médio Rio Solimões. 2^a ed. Manaus: Instituto Piatam, 2008. 160p.

SOUZA, R.A.L.; PERET, A.C.; MELO, J.S.C.; RODRIGUES, M.J.J. Desenvolvimento do tambaqui (*Colossoma macropomum* Cuvier) (Pisces, Characidae) criado em várzeas do Rio Guamá, Estado do Pará, Brasil. Boletim Técnico do CEPTA, 13:11-21, 2000.

SUNDBERG, M.D. Na introduction to stereological analysis: morphometric technouques for beginning biologists. In: GOLDMAN, C.A.; ANDREWS, S.E.; HAUTA, P.L.; KETCHUM, R. Tested studies for laboratory teaching. Vol. 6. Proceedings of the 6th Workshop/Conference of the Association for Biology Laboratory Education (ABLE), 1992.

TAVARES-DIAS, M.; MORAES, F.R.; MARTINS, L.M. Relação hepatossômática e esplenossômática em peixes teleósteos de cultivo intensivo. Revista Brasileira de Zoologia, 17(1):273-281, 2000.

TAVARES-DIAS M.; MORAES F.R. Hematologia de Peixes Teleósteos. M. Tavares-Dias, Ribeirao Preto, 2004. 144p.

TAVARES-DIAS, M.; MORAES, F.R.; MARTINS, L.M. Equação da relação peso-comprimento, fator de condição, relação hepato e esplenossômática de 11 teleósteos dulciaquícolas cultivados no Brasil. Comunicacion científica, IV Congresso Iberoamericano de Acuicultura (CIVA), 2006. p.713-720.

TAVARES-DIAS M.; MARCON, J.L.; LEMOS, J.R.G.; FIM, J.D.I.; AFFONSO, E.G.; ONO, E.A. Índices de condição corporal em juvenis de *Brycon amazonicus* (SPIX & AGASSIZ, 1829) e *Colossomoma macropomum* (CUVIER, 1818) na Amazônia. Boletim do Instituto de Pesca, 34(2):197-204, 2008.

TAVARES-DIAS, M.; ARAÚJO, C.S.O.; GOMES, A.L.S.; ANDRADE, S.M.S. Relação peso-comprimento e fator de condição relativo (Kn) do pirarucu *Arapaima gigas* Schinz, 1822 (Arapaimidae) em cultivo semi-intensivo no estado do Amazonas, Brasil. Revista Brasileira do Zoociências, 12(1):59-65, 2010.

YANONG, R.P.E. Necropsy techniques for fish. Seminars in avian and exotic pet medicine. 12(2):89-105, 2003.

Biometria, histomorfometria e densidade volumétrica do fígado de pirarucu (*Arapaima gigas*) produzidos em piscicultura semi-intensiva.

KLAUS CASARO SATURNINO¹, ARNO SOARES SEERIG², DELCIO GONÇALVES DA CUNHA², THAÍS RABELO DOS SANTOS¹, ELVINO FERREIRA¹, ROBSON ANDRADE RODRIGUES³ AND CARLOS EURICO DOS SANTOS FERNANDES³

¹Departamento de Medicina Veterinária, Universidade Federal de Rondônia, *Campus* Rolim de Moura, Avenida Norte-Sul, 7300, 76940-000, Rolim de Moura, RO, Brasil.

²Gerente de Produção Mar e Terra, Pimenta Bueno, RO 76970-000.

³Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul. Av. Senador Filinto Muller, 2443, 79070-900, Campo Grande, MS, Brasil.

Key words: histology, fish, morphometry, hematopoiesis

Liver histomorphology of *Arapaima gigas* fish-farming

Ciências Agrárias

Corresponding author: Klaus Casaro Saturnino. Departamento de Medicina Veterinária – Universidade Federal de Rondônia – UNIR, Campus Rolim de Moura, Av. Norte-Sul, 7300, Bairro Nova Morada, 76940-000, Rolim de Moura, RO, Brasil. Fones: (69) 3449-3803, (69) 8454-5779.

E-mail: klauscasaro@gmail.com

ABSTRACT

The pirarucu (*Arapaima gigas*), is one of the largest freshwater fish in South America Breathing air and carnivorous habit, doesn't have bone marrow and lymph nodes, like others teleosts, taking the liver important role on hematopoietic and save function, jointly to spleen and kidney. Histology is a resource that has been increasingly use with the purpose of elucidate the functioning of cells of tissues and their correlations. The present study aimed to appreciate the macro and microscopic development, using hepatosomatic relationship, histomorphometry of hepatocytes and liver volumetric density from semi-intensive system in different stages of growth. Twenty-seven specimens were rank according to the total length. Body weight (g), total length (cm) and liver weight were measure. After H&E liver routine histological processing of all samples, diameter (μm), circumference (μm) and nuclear area (μm^2), hepatocyte area (μm^2) and perimeter (μm) of 60 hepatocytes/specimen, were assess. The liver retained the shape and anatomical position with the body development, with lighter coloring in four minor categories and red brownish in the two largest. The hepatocytes architecture presented with cellular cords organized with fish growth, except AL, without this pattern, besides the absence of characteristic lobation. JU20 category showed greater area of hepatocytes, checking this category the highest RHS. Hepatocytes were predominant in the liver structural formation (66,88-87,50%) and melanomacrophage centers were view only in the two largest categories, indicating that the defense function in smaller categories is exercised by the spleen and kidney.

Key words: fish, hematopoiesis, histology, morphometry

INTRODUÇÃO

O pirarucu (*Arapaima gigas*, Schinz, 1822), é considerado um dos maiores peixes de água doce da América do Sul, podendo atingir até três metros de comprimento com mais de 200 kg (Imbiriba 2001).

De natureza carnívora, inicia sua ictiofagia por volta do sexto mês de vida (Pereira-Filho e Roubach 2010). Sua respiração baseia-se na forma aérea obrigatória graças à peculiaridade de sua bexiga natatória altamente vascularizada (Almeida et al. 2011). Forma casais na maturidade sexual, com desova parcelada, especialmente no período mais chuvoso na Amazônia (Ono et al. 2004), seu habitat natural (Castello 2008).

Assim como os demais teleósteos, o pirarucu é desprovido de medula óssea e linfonodos (Tavares-Dias e Moraes 2004), tendo o fígado, baço, timo e rins como os órgãos imunes mestres. Entretanto há variações entre os peixes, podendo determinada espécie ter um ou mais órgãos com tecidos mieloides e linfoides associados (Campos et al. 2008).

O fígado de teleósteos desempenha funções iguais aos mamíferos pois é responsável pela assimilação de nutrientes, produção de bile, detoxificação e outras funções (Genten et al. 2009). Possui papel fundamental no metabolismo, e conseqüentemente na excreção de xenobióticos (Bernet et al. 1999) pelo seu aporte sanguíneo significativo, elevada capacidade metabólica e depurativa, por meio de sua microvascularização, atividade dos hepatócitos, de células fagocíticas e do sistema biliar intra-hepático. Sendo assim, desempenha papel fundamental na homeostase e sobrevivência do organismo (Hinton et al. 2001)

Pela importância metabólica do fígado, este tem sido um importante ponto de análise para compreensão dos mecanismos fisiológicos e patológicos. Desta forma, o estudo de suas características biométricas ao decorrer do crescimento corporal, possibilitaria a compreensão de distúrbios que possam ocorrer em processos patológicos (Tavares-Dias et al. 2000),

contribuindo para a compreensão e elucidação de problemas enfrentados na piscicultura, que geram perdas econômicas.

Uma das ferramentas que pode contribuir muito na compreensão do desenvolvimento hepático de peixes é a histologia, que vem sendo cada vez mais utilizada na aquicultura (Cavichiolo 2009). O maior objetivo desta técnica tem sido esclarecer o funcionamento dos tecidos quanto às células e suas correlações, para que a histopatologia possa contribuir para o diagnóstico de doenças, por meio do conhecimento das alterações patológicas teciduais (Rocha et al. 1997).

Sob este contexto, o presente estudo teve por objetivo avaliar o desenvolvimento hepático macro e microscópico, considerando a relação hepatossomática, histomorfometria e densidade volumétrica do fígado de pirarucus em diferentes fases de crescimento produzidos semi-intensivamente.

MATERIAL E MÉTODOS

Amostras

Vinte e sete espécimes de pirarucu provenientes de uma piscicultura comercial de Pimenta Bueno, Rondônia, BR (11°40'21'S e 61°11'37'W, 18 a 40°C; umidade relativa do ar entre 80 a 85% e precipitação chuvosa entre 2000 a 2500mm/ano) foram utilizados. Com base na fase de desenvolvimento, os espécimes foram agrupados em categorias de acordo com o comprimento total médio (CT) e peso corporal médio (P) em: alevino (AL; CT=3,48±0,13cm; P=0,20±0,03g; n=4), juvenil 5 (JU5; CT=5,35±0,10cm; P=1,0±0,10g; n=4), juvenil 10 (JU10; CT=9,63±0,19cm; P=5,80±0,45g; n=4), juvenil 20 (JU20; CT=21,15±0,37cm; P=65,09±6,23g; n=4), juvenil 80 (JU80; CT=84,75±5,12cm; P=4.323,75±918,12g; n=4) e abate (AB; CT=107,14±5,01cm; P=9.530,0±2.696,39g; n=7). As quatro primeiras categorias eram mantidas em tanques plásticos de 500 litros (AL, JU5 e JU10) ou de alvenaria de 5.000 litros (JU20), sendo as três primeiras categorias alimentadas apenas com zooplâncton produzido na própria propriedade e JU20 treinada gradativamente para ingestão de ração com 40-45% de proteína bruta (PB). As demais categorias eram mantidas em tanques escavados, sendo alimentados com ração comercial contendo entre 40-45% de proteína bruta (PB). O sistema utilizado na propriedade é sistema semi-intensivo com seis tratamentos diários. Durante o experimento foi realizado acompanhamento da temperatura da água diariamente, além dos parâmetros físico-químicos de oxigênio dissolvido, pH, amônia total e nitrito semanalmente, por análise colorimétrica. Para tal foi utilizado kit comercial de análise de água para piscicultura.

Biometria externa, visceral e fator de condição

Após captura (redes e puçás), os espécimes foram eutanasiados por meio de imersão em solução de 2-fenoxietanol (0,10 ml/L, 10min) associada à concussão cerebral por objeto pontiagudo após total cessação dos movimentos corporais. Todas as categorias foram pesadas (g) e medidas (comprimento total, cm), sendo as amostras AL, JU5 e JU10 fixadas em formaldeído 10% tamponado, integralmente, após abertura da cavidade abdominal por incisão ventral longitudinal. As categorias JU20, JU80 e AB foram prontamente necropsiadas de acordo com Fisher e Myers (2000). Os espécimes foram abertos por incisão longitudinal ventral da papila urogenital até a base do opérculo, expondo a cavidade celomática. O exame macroscópico foi realizado deslocando-se os órgãos sem retirá-los da posição original, registrando-se a presença e característica de possíveis lesões conforme Roberts e Rodger (2012).

O fígado foi removido por meio da secção da artéria celomática, veia cava e veia porta junto ao órgão que, em seguida, teve a vesícula biliar dissecada e retirada na origem do ducto biliar (Fisher e Myers, 2000), na face visceral do fígado. Este foi pesado individualmente para obtenção da relação hepatossomática através da fórmula: $RHS = (\text{peso do fígado}/\text{peso total}) \times 100$ (Tavares-Dias et al. 2000).

Para estimativa da relação peso-comprimento, a curva de potência obtida, representada por $y = a \cdot x^b$ foi linearizada assumindo $\log y = \log A + B \cdot \log x$, obtendo-se os valores da constante de regressão (A) e do coeficiente de regressão (B). Finalmente, estimou-se os valores de a e b da curva de potência, sendo $a=e^A$ e $b=B$, para obtenção do tipo de crescimento e da equação que descreve a relação peso-comprimento. O fator de condição de Fulton foi determinado para cada grupo experimental através da fórmula $Kf=(W/L^3) \times 100$, onde: W=peso em gramas e L=comprimento total em cm (Araújo et al. 1999).

Histologia e histometria hepática

Para análise hepática, os espécimes das categorias AL e JU5, fixados integralmente, foram descalcificados em EDTA por dez dias, incluídos em parafina, cortados a 5 μm e corados pelas técnicas de hematoxilina e eosina (HE) e gomori. A mesma técnica foi utilizada para fragmentos hepáticos retirados sistematicamente como preconizado na literatura (Sundberg 1992, Marcos et al. 2012) nas demais categorias.

Para cada espécime, imagens (n=10) foram capturadas em uma câmera fotográfica (Nikon D3100[®]) acoplada a um adaptador (P95-T2 1,6x DSLR) em microscópio de campo claro (Zeiss Primo Star) na magnitude de 1000x (4608x3072 *pixels*). Para histometria foram obtidos o diâmetro (μm), perímetro (μm), e área nuclear (μm^2), assim como área (μm^2) e perímetro celular (μm) de 60 hepatócitos de cada amostra, mensurados aleatoriamente. O *software* Motic 2.0 ML foi usado para essas análises.

Densidade volumétrica hepática

Imagens (n=10) captadas pelo sistema anteriormente descrito, em magnitude de 400x foram utilizadas para análise da densidade das estruturas parenquimatosas e estromais hepáticas. Cada imagem foi sobreposta com gradículas ajustadas para 50.000 *pixels*² totalizando 294 intersecções, que corresponderam aos pontos utilizados na técnica estereológica manual clássica com base na contagem de pontos (Sundberg 1992, Rocha et al. 1997). Em cada imagem, determinou-se as densidades estruturais (%) de hepatócitos, espaços sinusoidais, vasos sanguíneos, tecido conectivo (arterial ou de sustentação), centro de melanomacrófagos (CMMs) e ductos biliares. O percentual de cada estrutura foi calculado para cada imagem pela seguinte fórmula: estrutura (%) = (contagem total/294) x100. O software ImageJ 1.46[®] foi utilizado para realizar as análises.

Análise estatística

Os dados biométricos do fígado, histometria celular e densidade volumétrica hepática foram comparados entre as categorias sendo submetidos à análise de variância (ANOVA) modelo univariado (Teste de Tukey, $P < 0,05$). Para tal foi utilizado pacote estatístico SPSS 17.0.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

As características físico-químicas médias da água dos viveiros de onde foram obtidos os pirarucus foram: temperatura – 28°C, oxigênio – 5,5mg/L, pH – 6,5, amônia total – 1,0mg/L e nitrito – 0,0mg/L, demonstrando que os valores observados estão dentro dos limites sugeridos por outros autores (Soares et al. 2007), inclusive para produção de pirarucu (Cavero et al. 2003).

Em todos os espécimes não foram encontradas alterações sugestivas de lesões macro ou microscópicas, assim como ausência de parasitas externos e internos.

No presente estudo a equação exponencial que descreveu a relação peso-comprimento foi: $W = 0,005848.L^{3,05}$ ($R^2 = 0,98$), e o coeficiente de correlação linear calculado para as relações logarítmicas entre o peso e o comprimento total foi de 0,99 ($P < 0,01$), demonstrando uma relação altamente positiva entre essas variáveis.

Os pirarucus avaliados apresentaram crescimento isométrico, com $b = 3,05$, indicando um incremento de peso e comprimento na mesma proporção, considerado ideal para peixes (Le Cren 1951), principalmente em cultivo. Estima-se que a constante de regressão (b) pode variar de 2,50 a 3,50 (Le Cren 1951), e essa ampla variação ocorre em função de fatores bióticos e abióticos, especialmente em condições intensivas de cultivo.

Na literatura a relação peso-comprimento foi utilizada para descrição de tipos de crescimento em pacu (*Piaractus mesopotamicus*), tambaqui (*Colossoma macropomum*), matrinxã (*Brycon amazonicus*), piracanjuba (*Brycon orbignyanus*), híbrido tambacu, curimatá

(*Prochilodus lineatus*), tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*), piavuçu (*Leporinus macrocephalus*) e carpa-comum (*Cyprinus carpio*), com resultados alométricos (Tavares-Dias et al. 2006). Esta mesma metodologia também foi utilizada em pirarucu (*Arapaima gigas*), obtendo-se resultados de crescimento alométrico positivo (Scorvo-Filho et al. 2004, Alcântara et al. 2005) e negativo (Alcântara e Guerra 1992, Ruffino e Isaac 1995).

Rego et al. (2008) sugerem que estudos de crescimento utilizando-se a relação peso-comprimento devem ser usados para caracterizar as diferentes estratégias de crescimento dos peixes associando os resultados aos fatores ecológicos, comportamentais e fisiológicos das espécies. Desta forma, os resultados encontrados no presente estudo sugerem que as metodologias empregadas na criação dos pirarucus avaliados, associado as condições ambientais foram adequadas.

A relação peso-comprimento pode ser utilizada para determinar o peso, apenas quando as medidas de comprimento são colhidas, permitindo comparações e indicando condições entre o crescimento de diferentes espécies (Lemos et al. 2006, Tavares-Dias et al. 2010). Alterações no bem estar de peixes afetam seu crescimento corporal, bem como o tamanho relativo de seus órgãos. Desta forma, a análise da relação hepatossomática (RHS) é de grande importância na compreensão de alterações que possam ocorrer em processos patológicos, independentemente de sua causa (Tavares et al. 2006). Na Tabela I são apresentados os valores médios encontrados para as variáveis biométricas de peso do fígado, assim como a relação hepatossomática e fator de condição com os respectivos desvios padrão para os grupos JU20, JU80 e AB.

Tabela I

A análise da relação hepatossomática demonstrou que pirarucus das categorias JU20 apresentaram valores superiores quando comparados com as demais categorias. Estudos descrevem o crescimento corpóreo do pirarucu muito rápido quando comparado a outras espécies sob as mesmas condições (Ono et al. 2004, Ono e Kehdi 2013), sem ganho de peso do

fígado na mesma proporção (Shearer 1994), como no presente estudo ($P < 0,01$). Outro fator que interfere na relação hepatossomática está diretamente relacionada ao estoque energético no fígado de peixes, já descrito na literatura (Cyrino et al. 2000). Esta condição pode ter ocorrido pela condição alimentar mais favorável para JU20, onde as categorias AL, JU5 e JU10, vinham se alimentando de zooplâncton, uma rica fonte de nutrientes altamente digestível, seguido de treinamento para ingestão de ração comercial, resultando em acúmulo energético no citoplasma celular, como descrito em outros estudos (Tavares-Dias et al. 2000, Ono e Kehdi 2013).

Pesquisas com *P. mesopotamicus* (Fujimoto et al. 2007) e *B. orbigniannus* (Lorenz 2010, dados não publicados) demonstram que o aumento da densidade de peixes também podem provocar aumento da RHS, o que também pode ter ocorrido no presente estudo, visto que as categorias até JU20 são cultivados em tanques plásticos e de alvenaria com pequenas proporções, antes de serem transferidos para tanques escavados com consequente diminuição da densidade.

O fator de condição (K) é um importante indicador do grau de hígidez de um indivíduo e seu valor reflete as condições nutricionais recentes e/ou gastos das reservas em atividades cíclicas, sendo possível relacioná-lo às condições ambientais e aos aspectos comportamentais das espécies. Os resultados podem sofrer alterações em função de fatores intrínsecos (reservas orgânicas, desenvolvimento gonadal e tamanho dos exemplares) e extrínsecos (disponibilidade alimentar, temperatura, fotoperíodo, entre outros) (Gomiero et al. 2010).

O fator de condição de Fulton (Kf), assume que a relação peso-comprimento é isométrica, como encontrado no presente estudo, enquanto o fator de condição alométrico (Ka) que as várias espécies de peixes podem ter diferentes relações de peso-comprimento (Rocha et al., 2005) e o fator de condição relativo (Kn) considera a relação entre o peso observado e o peso esperado (Le Cren, 1951).

A categoria JU20 apresentou valores de Kf maiores que JU80 e AB, que pode ter ocorrido pela condição alimentar mais favorável, como anteriormente descrito. A diferença entre JU80 e AB foi menor em função do manejo padronizado para ambos.

Anatomicamente, o fígado, em todas as categorias, apresentou-se compacto, sem delimitação por sulcos ou fissuras, constituindo um único lobo, com margem obtusa cranial e uma margem aguda caudalmente. Em todos os espécimes estava localizado crânio-ventralmente na cavidade celomática, anterior ao estômago, ventral ao esôfago e separado do coração por uma fina membrana conjuntiva, o septo transversal (Figura 1 A e B), corroborando com outras descrições em teleósteos (De Iuliis e Pulerá 2007).

Figura 1

As categorias menores (AL, JU5, JU10 e JU20) apresentaram fígado com coloração vermelho claro, enquanto as maiores (JU80 e AB), o fígado era marrom avermelhado (Figura 2 A e B). Estas observações corroboram com estudos que relatam sobre a variação da cor do fígado em função da dieta (De Iuliis e Pulerá 2007), com vermelho mais claro pelo acúmulo de reservas energéticas no citoplasma dos hepatócitos, e marrom avermelhada pela alta vascularização (Roberts 2000). No polo mais cranial do fígado foram observadas a artéria celomática e veia cava, assim como em sua face visceral a vesícula biliar, veia porta e ducto biliar comum, como descrito para os teleósteos de uma forma geral (Roberts e Ellis 2012).

Figura 2

Microscopicamente a arquitetura hepática apresentou-se repleta de ductos, sinusóides, capilares e veias, os quais se encontravam entremeados entre os hepatócitos poliédricos com núcleos centrais, fortemente corados marginalmente e nucléolo evidente (Figura 3A), seguindo a descrição histológica padrão para teleósteos (Roberts e Ellis 2012). Na categoria AL não foi evidenciada tríade portal, enquanto JU5 e JU10 apresentaram tríades em menor quantidade que JU80 e AB, com artéria hepática, veia porta e ducto biliar (Figura 3B). O arranjo arquitetônico

dos hepatócitos formava cordões celulares que organizavam-se progressivamente com o crescimento do peixe, com exceção de AL, sem este padrão. Além disso, não foram observados lóbulos envoltos por tecido conectivo em nenhuma categoria, corroborando com descrições para teleósteos de uma forma geral (Roberts 2000) (Figura 3C).

A Tabela II apresenta valores médios com respectivos desvios padrão, intervalos de confiança (IC - 95%) e diferenças significativas para a morfometria de hepatócitos das seis categorias avaliadas. As categorias JU10 e JU20 destacam-se nas medidas avaliadas em relação às demais categorias, principalmente quanto à área média dos hepatócitos. Nestas fases de desenvolvimento corporal, como já descrito na relação hepatossomática, os hepatócitos apresentam em seu citoplasma, grande quantidade de reservas energéticas intracitoplasmáticas (Figura 3D), graças ao manejo alimentar favorável, corroborando com descrições por outros pesquisadores (Tavares-Dias et al. 2000, Ono e Kehdi 2013). Outro aspecto que demonstra o acúmulo destas reservas no fígado, é a mudança gradativa de cor do fígado, migrando de vermelho claro para marrom avermelhado, corroborando com outras descrições em teleósteos (Roberts 2000, De Iuliis e Pulerá 2007).

Tabela II

Figura 3

A Figura 4 apresenta a densidade volumétrica hepática dos pirarucus em diferentes fases de crescimento corporal e suas relações. Hepatócitos variaram de 66,88% a 87,50%, seguido do espaço sinusoidal (6,59% a 25,50%), vasculatura (1,17% a 4,32%) e tecido conectivo (1,68% a 4,43%). Desta forma, as densidades volumétricas hepáticas observadas do presente estudo poderão ser comparadas com a de outras espécies já descritas (Hinton et al. 2001), ou com pirarucus submetidos a manejos diferentes ou condições ambientais variadas.

Figura 4

A histologia não revelou a presença de centros melanomacrófagos no fígado das categorias AL, JU5, JU10 e JU20. Nas demais foram observados nas áreas peri-portais, com coloração característica (Figura 5), da mesma forma como são visualizados nos demais teleósteos já descritos (Morrison 2007). Estas estruturas possuem inúmeras funções, envolvendo fagocitose de patógenos, apresentação de antígenos na resposta imune, destruição, detoxificação ou reciclagem de materiais endógenos e exógenos, depósito de metabólitos de células mortas, incluindo eritrócitos e resposta a corpos estranhos, como agentes infecciosos (Campos et al. 2008). Desta forma, conclui-se que a função imunológica exercida pelos centros melanomacrófago, nas categorias menores, é desempenhado em outros órgãos que constituem o sistema hematopoiético desta espécie, como o baço e o rim. O fígado passa a desempenhar esta função posteriormente como evidenciado neste estudo.

Figura 5

CONCLUSÃO

O fígado de pirarucu nas fases de crescimento corporal avaliadas não altera seu formato, localização e lobação. A coloração varia de vermelho claro nas fases iniciais de desenvolvimento corporal a marrom avermelhado nas mais tardias. O crescimento ponderal hepático não acompanha o crescimento corpóreo, assim como em outros teleósteos. A arquitetura tecidual do fígado possui aspecto cordonal dos hepatócitos que se organizam progressivamente com o crescimento corporal, com observação de tríades portais a partir de indivíduos com cinco centímetros de comprimento. A espécie não apresenta lobulação do fígado, e o percentual de hepatócitos predomina a estrutura hepática, seguido dos espaços sinusoidais em todas as categorias avaliadas. A análise morfométrica comprovou que animais com aproximadamente vinte centímetros possuem hepatócitos maiores, relacionado ao maior acúmulo de reservas energéticas intracitoplasmáticas.

Agradecimentos

Os autores agradecem à empresa Mar & Terra e toda a sua equipe pela disponibilidade das amostras e auxílio técnico.

RESUMO

O pirarucu, como é conhecido no Brasil, é considerado um dos maiores peixes de água doce da América do Sul. De natureza carnívora e respiração aérea, é desprovido de medula óssea como os demais teleósteos, tendo o fígado, papel importante na função hematopoiética e de defesa, junto com o baço e o rim. A histologia é uma ferramenta que vem sendo cada vez mais utilizada com o objetivo de esclarecer o funcionamento dos tecidos quanto às células e suas correlações, para que a histopatologia possa ser utilizada no diagnóstico de doenças. O presente trabalho teve por objetivo avaliar o desenvolvimento macro e microscópico, por meio da relação hepatossomática, histomorfometria e densidade volumétrica do fígado de *Arapaima gigas* em diferentes fases de crescimento produzidos semi-intensivamente. Foram utilizados 27 espécimes provenientes de piscicultura semi-intensiva, divididos em seis categorias de acordo o tamanho corporal. Foram obtidos o peso corporal (g), comprimento total (cm) e peso do fígado das três categorias maiores. Após processamento histológico de rotina em HE do fígado obteve-se, de todas as amostras, o diâmetro (μm), perímetro (μm), e área nuclear (μm^2), área (μm^2) e perímetro do hepatócito (μm) de 60 hepatócitos/espécime. Também foi calculado o percentual de estruturas hepáticas. O fígado manteve seu formato e posição anatômica com o desenvolvimento da espécie, com coloração mais clara nas quatro categorias menores e vermelho amarronzado nas duas maiores e mais tardias. Os hepatócitos estavam dispostos em cordões celulares que se organizavam progressivamente com o crescimento corporal, com exceção de AL, que não apresentou este padrão. Além disso, não foi observada lobulação hepática. A categoria JU20 apresentou maior área de hepatócitos, conferindo nesta categoria a maior RHS. Os hepatócitos foram predominantes na formação estrutural do fígado (66,88-

87,50%) e os centros melanomacrófagos foram observados apenas nas duas maiores categorias, indicando que a função de defesa nas categorias menores é exercida por outros órgãos como o baço e rim.

Palavras-chaves: hematopoiese, histologia, peixe, morfometria

REFERÊNCIAS

- ALCÂNTARA FB, GUERRA HF. 1992. Cultivo de paiche, *Arapaima gigas*, utilizando bujurqui, *Cichlassoma bimaculatum*, como presa. *Folia Amazónica*, 4: 133-144.
- ALCÂNTARA FB, ALDEA MG, ARRARTE PR, VEINTEMILLA CV, DEL CASTILLO DT, TELLO MS. 2005. Cultivo de paiche, *Arapaima gigas* en estanques de produtores en Loreto, Perú, In: RENNO J-F, GARCÍA C, DUPONCHELLE F Y NUÑEZ J (Eds). *Biología de las Poblaciones de Peces de la Amazonía y Piscicultura. Comunicaciones del Primer Coloquio Internacional de la Red de Investigación sobre la Ictiofauna Amazónica*, Iquitos, Perú: RIA, Iquitos, Peru, p.163-168.
- ALMEIDA JG, REBOUCAS PM, GALVAO JAS, SILVA MC, BARBOSA FILHO JAD, GADELHA CRF. 2011. Estudo Preliminar Sobre o Comportamento Respiratório de Pós-larvas de pirarucu *Arapaima gigas* (Cuvier, 1817) em Viveiros Escavados. In: VII CONGRESSO BRASILEIRO DE ENGENHARIA DE PESCA, Belém. *Engenharia de Pesca: Construindo o Desenvolvimento Sustentável do Setor Pesqueiro Nacional*.
- ARAÚJO FG, DUARTE S, GOLDBERG RS, FICHBERG I. 1999. Indicadores reprodutivos de *Parauchenipterus striatulus* (Steindachner) (Pisces, Auchenipteridae) na Represa de Ribeirão das Lajes, Rio de Janeiro, Brasil. *Rev Bras Zool* 16(4): 1071-1079.

- BERNET D, SCHIMIDT H, MEIER W, BURKRARDT-HOLM P, WAHLI T. 1999. Histopathology in fish: proposal for a protocol to assess aquatic pollution. *J Fish Dis* 22: 25-34.
- CAMPOS CM, MORAES JRE, MORAES FR. 2008. Histopatologia de fígado, rim e baço de *Piaractus mesopotamicus*, *Prochilodus lineatus* e *Pseudoplatystoma fasciatum* parasitados por myxosporídios, capturados no rio Aquidauna, Mato Grosso do Sul, Brasil. *R Bras Parasitol Vet* 17(4): 200-205.
- CASTELLO, L. Nesting habitat of *Arapaima gigas* (Schinz) in Amazon floodplains. *Journal of Fish Biology*, 72:1520-1528, 2008.
- CAVERO BAS, PEREIRA-FILHO M, ROUBACH R, ITUASSU DR, GANDRA AL, CRESCÊNCIO R. 2003. Efeito da densidade de estocagem sobre a eficiência alimentar de juvenis de pirarucu (*Arapaima gigas*) em ambiente confinado. *Acta Amazonica* 33(4):631-636.
- CAVICHIOLO F. 2009. Histologia: ferramenta relevante para estudos em peixes cultivados. In: TAVARES-DIAS et al. Manejo e sanidade de peixes em cultivo. EMBRAPA Amapá, Macapá, Capítulo 23.
- CYRINO JEP, PORTZ L, MARTINO R. 2000. Retenção de proteína e energia em juvenis de “Black Bass” *Micropterus salmoides*. *Sci Agric* 57(4): 609-616.
- DE IULIIS G, PULERÁ D. 2007. The dissection of vertebrates – A laboratorial manual. San Diego: Elsevier, 298 p.
- FISHER JP, MYERS MS. 2000. Fish Necropsy. In.: OSTRANDER, G. The Laboratory Fish. Academic Press, Elsevier Ltda, p. 543-556.

- FUJIMOTO RY, CASTRO MP, MARTINS ML et al. 2007. Parâmetros sanguíneos de pacu *Piaractus mesopotâmicus* (Holmberg, 1887) alimentados com dietas suplementadas com cromo trivalente em duas densidades de estocagem. *Acta Sci Anim Sci*, 29(4): 465-471.
- GENTEN F, TERWINGHE E, DANGUY A. 2009. Atlas of fish histology. Université Libre de Bruxelles: Science Publisher, 219 p.
- GOMIERO LM, VILLARES-JUNIOR GA, BRAGA FMS. 2010. Relação peso-comprimento e fator de condição de *Oligosarcus hepsetus* (Cuvier, 1829) no Parque Estadual da Serra do Mar - Núcleo Santa Virgínia, Mata Atlântica, estado de São Paulo, Brasil. *Biota Neotrop*, 10(1): 101-105.
- HINTON DE, SEGNER H, BRAUNBECK T. 2001. Toxic responses of the liver. In: SCHLENK D, BENSON WH. Target organ toxicity in marine and freshwater teleosts. New York: Taylor & Francis, v.1, 415 p.
- IMBIRIBA EP. 2001. Potencial de criação de pirarucu, *Arapaima gigas*, em cativeiro. *Acta Amaz* 31(2): 299-316.
- LE CREN ED. 1951. The length-weight relationship and seasonal cycle in gonadal weight and condition in the perch (*Perca fluviatilis*). *J Anim Ecol* 20: 201-19.
- LEMOS JRG, TAVARES-DIAS M, MARCON JL, LEMOS PEM, AFFONSO EG, ZAIDEN SF. 2006. Relação peso-comprimento e fator de condição em espécies de peixes ornamentais do rio Negro, Estado do Amazonas, Brasil. *CIVA*, p. 721-725.
- MARCOS R, MONTEIRO RAF, ROCHA E. 2012. The use of designed-based stereology to evaluate volumes and numbers in the liver: a review with practical guidelines. *J Anat* 220: 303-317.

- MORRISON J. Normal histology. In: MUMFORD S, HEIDEL J, SMITH C, MORRISON J, MACCONNELL B, BLAZER V. 2007. Fish histology and histopathology. United States Fish and Wildlife Service - National Conservation Training Center, 357 p.
- ONO EA, HALVERSON MR, KUBITZA F. 2004. Pirarucu o gigante esquecido. *Pan Aquic* 14(81): 4-25.
- ONO EA, KEHDI J. 2013. Manual de boas práticas de produção do pirarucu em cativeiro. 1ª ed. Brasília: SEBRAE, 45 p.
- PEREIRA-FILHO M, ROUBACH R. 2010. Pirarucu (*Arapaima gigas*). In: BALDISSEROTTO B, GOMES LC. Espécies nativas para a piscicultura no Brasil. 2ª ed. Santa Maria: Editora da UFSM, 608 p.
- REGO ACL, PINESE OP, MAGALHÃES PA, PINESE JF. 2008. Relação peso-comprimento para *Prochilodus lineatus* (Valenciennes, 1836) e *Leporinus friderici* (Bloch, 1794) (Characiformes) no reservatório de Nova Ponte –EPDA de Galheiro, Rio Araguari, MG. *Rev Bras Zoociênc* 10: 13-21.
- ROBERTS, R.J. 2000. Fish pathology. 3ª ed. W.B. Saunders, 508 p.
- ROBERTS RJ, ELLIS AE. 2012. The Anatomy and physiology of teleosts. In.: ROBERTS RJ et al. Fish Pathology, 4º ed. Iowa, USA: Blackwell Publishing, p. 17-61.
- ROBERTS RJ, RODGER HD. 2012. The Pathophysiology and Systematic Pathology of Teleosts. In.: ROBERTS RJ. Fish Pathology. 4ª ed. Iowa, USA: Blackwell Publishing, p. 62-143.
- ROCHA E, MONTEIRO RAF, PEREIRA CA. 1997. Liver of the Brown Trout, *Salmo trutta* (Teleostei, Salmonidae): A stereological study at light and electron microscopic levels. *Anat Rec* 247: 317-328.

- ROCHA, M.A.; RIBEIRO, E.L.; MIZUBUTI, I.Y.; SILVA, L.D.F.; BOROSKY, J.C.; RUBIN, K.C.P. 2005. Uso do fator de condição alométrico e de fulton na comparação de carpa (*Cyprinus carpio*), considerando os sexos e idade. *Semina: Ciências Agrárias*, Londrina, 26(3):429-434.
- RUFFINO ML, ISAAC VJ. 1995. Life cycle and biological parameters of several Brazilian Amazon fish species. *NAGA - The ICLARM Quarterly* 18: 41-45.
- SCORVO-FILHO JD, ROJAS NET, SILVA CM, KONOIKE T. 2004. Criação de *Arapaima gigas* (teleostei osteoglossidae) em estufa e sistema fechado de circulação de água, no Estado de São Paulo. *B Inst Pesca* 30: 161–170.
- SHEARER KD. 1994. Factors affecting the proximate composition of cultured fishes with emphasis on salmonids. *Aquaculture*, 119: 63-88.
- SOARES EC, PEREIRA-FILHO M, ROUBACH M, SILVA RCS. 2007. Condicionamento alimentar no desempenho zootécnico do tucunaré. *Ver Bras Eng Pesca (Esp)*. 2:35-48.
- SUNDBERG MD. 1992. An introduction to stereological analysis: morphometric techniques for beginning biologists. In: GOLDMAN CA, ANDREWS SE, HAUTA PL, KETCHUM R. *Tested studies for laboratory teaching*. Vol. 6. *Proceedings of the 6th Workshop/Conference of the Association for Biology Laboratory Education (ABLE)*.
- TAVARES-DIAS M, MORAES FR, MARTINS LM. 2000. Relação hepatossômática e esplenossômática em peixes teleósteos de cultivo intensivo. *Rev Bras Zool*, 17(1): 273-281.
- TAVARES-DIAS M, MORAES FR. 2004. *Hematologia de peixes teleósteos*. Ribeirão Preto: USP, 144 p.
- TAVARES-DIAS M, MORAES FR, MARTINS LM. 2006. Equação da relação peso-comprimento, fator de condição, relação hepato e esplenossômática de 11 teleósteos

dulciaquícolas cultivados no Brasil. Comunicacion científica, IV Congresso Iberoamericano de Aquicultura (CIVA), p. 713-720.

TAVARES-DIAS M, ARAÚJO CSO, GOMES ALS, ANDRADE SMS. 2010. Relação peso-comprimento e fator de condição relativo (K_n) do pirarucu *Arapaima gigas* Schinz, 1822 (Arapaimidae) em cultivo semi-intensivo no estado do Amazonas, Brasil. Rev Bras Zool 12(1): 59-65.

Tabela I

Médias, desvio padrão (\pm) e intervalo de confiança (95%) do peso hepático, relação hepatossomática e fator de condição de *Arapaima gigas* (n=15) de acordo com o desenvolvimento corporal, produzidos em piscicultura semi-intensiva.

Variáveis biométricas	Médias e desvio padrão/Categorias		
	PF (g)	RHS (%)	Kf
JU20 (n=4)	2,79 \pm 0,40 ^A (2,16-3,43)	4,29 \pm 0,44 ^B (3,59-4,99)	0,78 \pm 0,005 ^C (0,77-0,79)
JU80 (n=4)	24,80 \pm 3,94 ^B (18,53-31,07)	0,58 \pm 0,11 ^A (0,41-0,75)	0,51 \pm 0,015 ^B (0,48-0,53)
AB (n=7)	53,53 \pm 15,25 ^C (39,42-67,63)	0,56 \pm 0,06 ^A (0,50-0,61)	0,47 \pm 0,013 ^A (0,46-0,48)

JU20: Juvenil 20, JU80: Juvenil 80, AB: Abate, PF: Peso do fígado, RHS: Relação hepatossomática, Kf: Fator de condição de Fulton, ^{A, B, C} Letras distintas entre colunas representam diferença significativa (P<0,01).

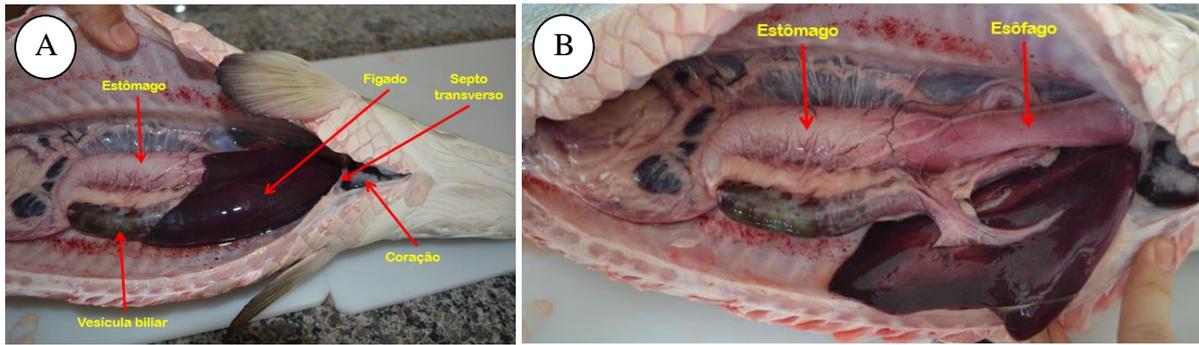


Figura 1 – Cavidade celomática de espécime de pirarucu com aproximadamente 80cm de comprimento (categoria Juvenil 80 – JU80) expondo localização topográfica do fígado. (A) Vista da localização hepática logo após abertura da cavidade sem deslocamento das demais vísceras. (B) Mesma vista de (A), mas com deslocamento do fígado, demonstrando sua topografia em relação ao esôfago.

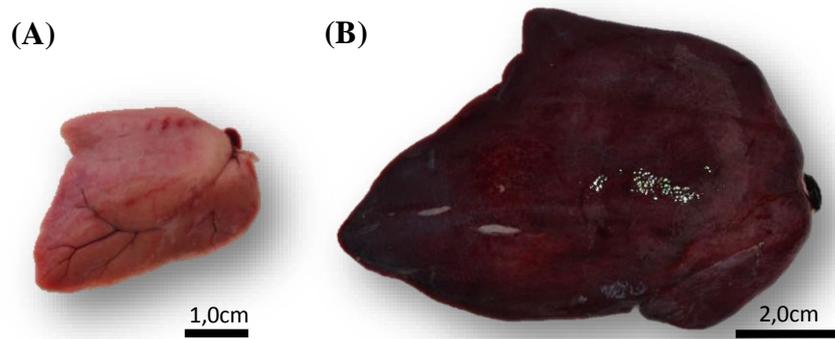


Figura 2 – Fígados de pirarucu em diferentes fases de crescimento corporal. (A) Fígado de espécime com aproximadamente 20 cm de comprimento (categoria Juvenil 20 – JU20) apresentando coloração mais clara. (B) Fígado de espécime com aproximadamente 80 cm de comprimento (categoria Juvenil 80 – JU80) evidenciando coloração marrom avermelhado escuro.

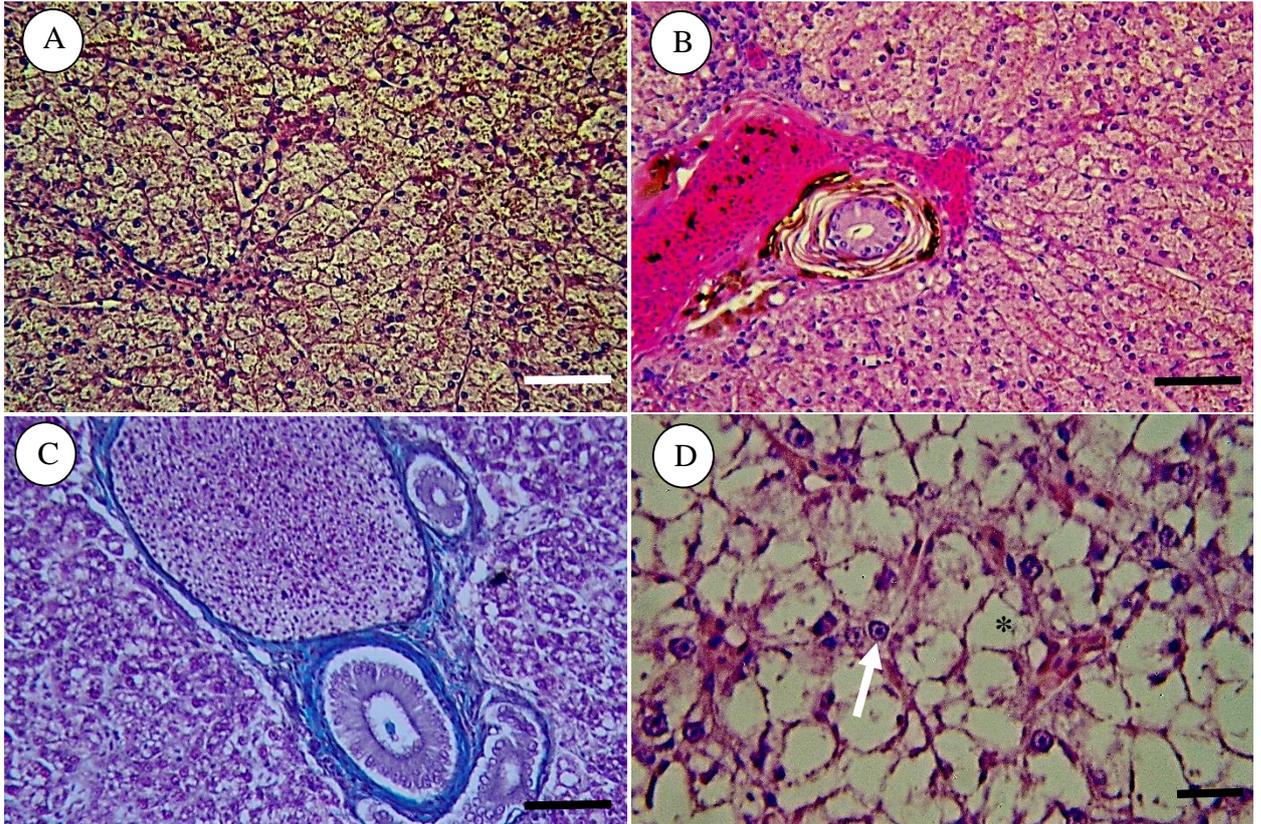


Figura 3 – Secção histológica do fígado de piracucu. (A) JU80; aspecto característico cordonal dos hepatócitos, (H&E) (400x), Barra = 50 μ m. (B) JU 40; tríade portal com reduzida quantidade de tecido conectivo envoltório, (H&E) (400x), Barra = 50 μ m. (C) JU80; tríade portal com evidência do tecido conectivo envoltório em maior quantidade do que em (B), (Gomori) (400x), Barra = 50 μ m. (D) JU20; hepatócitos distendidos com citoplasma repleto por vacúolos (*) e núcleo deslocado periféricamente (seta) (1000x), Barra = 5 μ m.

Tabela II
Médias, desvio padrão (\pm) e intervalo de confiança (95%) de diferentes medidas morfológicas de hepatócitos de *Arapaima gigas* (n=27) de acordo com o desenvolvimento corporal, produzidos em piscicultura semi-intensiva.

Categoria	DN (μm)	PN (μm)	AN (μm^2)	PH (μm)	AH (μm^2)
AL	4,34 \pm 0,03 ^B (4,28-4,39)	14,06 \pm 0,09 ^A (13,89-14,23)	13,45 \pm 0,14 ^A (13,17-13,73)	40,58 \pm 1,29 ^A (38,04-43,11)	102,45 \pm 5,30 ^A (92,06-112,83)
JU5	4,33 \pm 0,03 ^B (4,28-4,39)	14,40 \pm 0,09 ^B (14,22-14,57)	13,80 \pm 0,14 ^{AB} (13,53-14,08)	40,08 \pm 1,29 ^A (37,54-42,61)	98,21 \pm 5,30 ^A (87,82-108,59)
JU10	4,53 \pm 0,03 ^C (4,47-4,58)	15,45 \pm 0,09 ^C (15,28-15,62)	14,66 \pm 0,14 ^C (14,38-14,94)	61,13 \pm 1,29 ^C (58,59-63,66)	184,16 \pm 5,30 ^C (173,78-194,55)
JU20	4,65 \pm 0,03 ^D (4,59-4,70)	15,41 \pm 0,09 ^C (15,24-15,58)	14,61 \pm 0,14 ^C (14,33-14,89)	91,70 \pm 1,29 ^D (89,16-94,23)	452,92 \pm 5,30 ^D (442,53-463,30)
JU80	4,17 \pm 0,03 ^A (4,12-4,23)	15,11 \pm 0,09 ^C (14,95-15,29)	14,25 \pm 0,14 ^{BC} (13,97-14,53)	52,88 \pm 1,29 ^B (50,34-55,41)	152,74 \pm 5,30 ^B (142,35-163,12)
AB	4,17 \pm 0,02 ^A (4,13-4,21)	15,3 \pm 0,06 ^C (15,18-15,43)	14,50 \pm 0,11 ^C (14,29-14,71)	58,84 \pm 0,98 ^C (56,93-60,76)	175,59 \pm 4,00 ^C (177,73-183,44)

AL: Alevino, JU5: Juvenil 5, JU10: Juvenil 10, JU20: Juvenil 20, JU80: Juvenil 80, AB: Abate, DN:

diâmetro nuclear, PN: Perímetro nuclear, AN: Área nuclear, PH: Perímetro do hepatócito, AH: Área do hepatócito, ^{A, B, C, D} Letras distintas entre colunas representam diferença significativa (P<0,01).

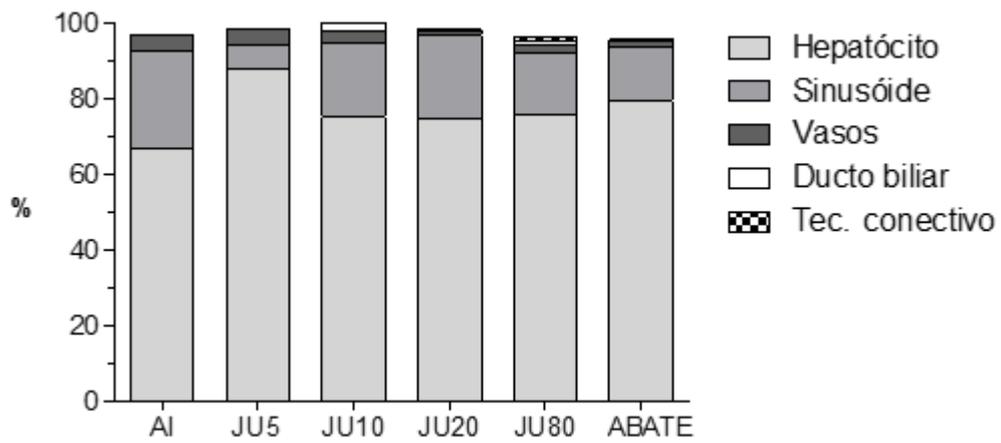


Figura 4 - Densidade volumétrica hepática (%) de *Arapaima gigas* produzidos em piscicultura semi-intensiva. AL (n=4), JU5 (n=4), JU10 (n=4), JU20 (n=4), JU80 (n=4) e AB (n=7).

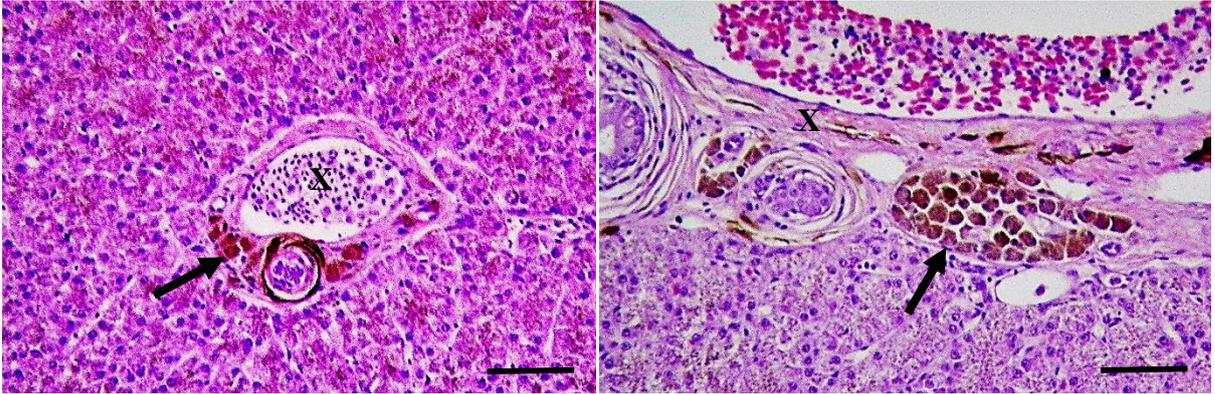


Figura 5 – Imagens microscópicas de fígado de espécimes de pirarucu com aproximadamente 80 cm de comprimento (JU80) demonstrando localização dos centros melanomacrófagos (setas) nas áreas peri-portais (X). (400x). Barra = 50µm.

Histomorfologia de baço e rim de pirarucu (*Arapaima gigas*) produzidos em piscicultura semi-intensiva

KLAUS CASARO SATURNINO¹, ARNO SOARES SEERIG², DELCIO GONÇALVES DA CUNHA², THAÍS RABELO DOS SANTOS¹, ELVINO FERREIRA¹, ROBSON ANDRADE RODRIGUES³, CARLOS EURICO DOS SANTOS FERNANDES³

¹Departamento de Medicina Veterinária, Universidade Federal de Rondônia, *Campus* Rolim de Moura, Avenida Norte-Sul, 7300, 76940-000, Rolim de Moura, RO, Brasil.

²Gerente de Produção Mar e Terra, Pimenta Bueno, RO 76970-000.

³Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul. Av. Senador Filinto Muller, 2443, 79070-900, Campo Grande, MS, Brasil.

Key words: histology, fish, morphometry, hematopoiesis

Spleen and kidney histomorphology of *Arapaima gigas* fish-farming

Ciências Agrárias

Autor para correspondência: Klaus Casaro Saturnino. Departamento de Medicina Veterinária – Universidade Federal de Rondônia – UNIR, *Campus* Rolim de Moura, Av. Norte-Sul, 7300, Bairro Nova Morada, 76940-000, Rolim de Moura, RO, Brasil. Fones: (69) 3449-3803, (69) 8454-5779.

E-mail: klauscasaro@gmail.com

ABSTRACT

Arapaima gigas, or pirarucu, is one of the oldest representatives of Arapaimidae family. This species is the largest scale fish of the Amazon Basin, its natural habitat. The spleen, kidney and thymus are important immune organs in fish, and anterior kidney is responsible for hematopoiesis, while the posterior for osmotic regulation. The spleen compress the antigens deperate, blood cells destruction and erythrocyte storage. Fifteen pirarucus, semi-intensively farmed, were euthanized, measured, weighed, necropsy technique realized and grouped in categories JU20, JU80 and AB based on their lengths. Their kidneys and spleens were weighed for splenic and renal relationship as harvested for H&E routinely histology. Arapaima's spleen follow descriptions for teleost generally, and is share into a larger and others smaller portion. The splenic red pulp is predominant, increasing with body growth, but without proportional weight gain. The kidney is located at the dorsal portion of the coelomic cavity, without portions. Microscopic architecture is composed of cortical haematopoietic tissue and excretory medullary, distinguishing the most teleost. The proximal convoluted tubules were predominant, increasing in proportion with hematopoietic tissue whereas the body growth of specimens, showing the enhance importance of the kidney hematopoietic activity.

Key words: histology, fish, morphometry, hematopoiesis

INTRODUÇÃO

Arapaima gigas, o pirarucu, como é conhecido no Brasil, é um dos representantes mais antigos da família Arapaimidae. Suas características filogenéticas, esqueleto e morfologia externa, diferem daquelas de todas as outras espécies de peixes, inclusive seu parente africano mais próximo, o *Heterotis niloticus* (Lundberg e Chermoff 1992). Esta espécie é o maior peixe de escamas da Bacia Amazônica, seu habitat natural (Scorvo-Filho et al. 2004).

O baço, rim, fígado e timo são importantes órgãos imunes em peixes. O baço concentra a filtração de antígenos, realiza a hemocaterese e estoca eritrócitos (Wells e Weber 1990). O órgão contém numerosos granulócitos neutrofílicos e eosinofílicos, tornando-se um importante sítio de fagocitose de material particulado e células sanguíneas senis, assim como de atividade hematopoiética (Fishelson 2006).

Os rins são órgãos mistos compreendendo elementos hematopoiéticos, reticulendoteliais, endócrinos e excretores (Roberts e Ellis 2012), com participação em importantes mecanismos fisiológicos tais como osmorregulação, excreção, metabolismo endócrino, hemopoiese e imunitário (Ferraz de Lima et al. 1993).

Na maioria dos teleósteos, o rim é dividido em duas porções: uma anterior, o pronefro, também denominado de rim cranial, e uma posterior, o mesonefro, opistonefro ou rim excretor (Ferraz de Lima et al. 1993, Yanong 2003, Costa et al. 2012). Em algumas espécies se estende da região cranial à caudal da cavidade celomática, como um único órgão (Genten et al. 2009).

Poucas são as informações sobre a histologia em peixes, especialmente sobre pirarucus. Para então compreender as diferentes características histológicas entre as espécies, o estudo sobre as estruturas dos diferentes órgãos envolvidos na função imune pode ser um caminho promissor (Maciel et al. 2012).

O presente estudo objetivou avaliar o desenvolvimento do baço e rim de *Arapaima gigas* produzidos em piscicultura comercial, levando em consideração o crescimento corporal, por meio da análise das relações nefro e esplenossomática, densidades volumétricas do baço e rim, assim como os aspectos histomorfométricos renais.

MATERIAL E MÉTODOS

Amostras

Pirarucus (n=15), colhidos com auxílio de redes e “puças” em Pimenta Bueno-RO (11°40’21’S e 61°11’37’W), foram agrupados em categorias, com base no comprimento total médio (CT) e peso corporal médio (P), da seguinte forma: juvenil 20 (JU20; CT=21,15±0,37cm; P=65,09±6,23g; n=4), juvenil 80 (JU80; CT=84,75±5,12cm; P=4.323,75±918,12g n=4) e abate (AB; CT=107,14±5,01cm P=9.530,0±2.696,39g; n=7). Os espécimes da categoria JU20 eram mantidos em tanques de alvenaria de 5.000 litros e vinham sendo alimentados com zooplâncton, e treinados gradativamente para ingestão de ração com 40-45% de proteína bruta (PB). As demais categorias eram mantidas em tanques escavados, recebendo a mesma ração, diferenciando-os somente quanto à granulometria. O sistema de produção adotado foi o semi-intensivo com seis tratos diários. Realizou-se monitoramento da temperatura da água diariamente, além dos parâmetros físico-químicos quanto ao oxigênio dissolvido, pH, amônia total e nitrito semanalmente, por análise colorimétrica. Tais procedimentos foram realizados com auxílio de kit comercial de análise de água destinado a piscicultura.

Biometria externa e visceral

Após eutanásia por imersão em solução de 2-fenoxietanol (0,10 ml/L, 10min) associado a concussão cerebral com objeto pontiagudo após cessação dos movimentos corporais, os animais foram pesados (g) e medidos (comprimento total, cm) para obtenção da relação peso-comprimento e tipo de crescimento e, posteriormente, necropsiados segundo Fisher e Myers (2000). A cavidade celomática foi aberta por incisão longitudinal ventral da papila urogenital até a base do opérculo, expondo o baço, envolvido por tecido mesentérico, que foi dissecado. Para retirada do rim, a bexiga natatória foi aberta por incisão longitudinal de sua parede por toda a sua extensão. Com auxílio de bisturi foram realizadas incisões longitudinais paralelas e

adjacentes ao rim, separando-o da bexiga natatória modificada, por dissecação. O exame macroscópico foi realizado deslocando-se os órgãos sem retirá-los da posição original, registrando-se a presença e característica de possíveis lesões de acordo critérios já descritos em outros estudos (Roberts e Rodger 2012). O baço e rim de cada espécime foram pesados (g), estabelecendo-se as relações esplênossomática (RES) e nefrossomática (RNS) de cada animal, por meio do cálculo: relação somática = (peso do órgão/peso total) x 100, seguindo metodologia utilizada por outros pesquisadores (Tavares-Dias et al. 2000).

Histologia e histometria do rim

Cortes transversais de aproximadamente um centímetro de espessura das regiões cranial, média e caudal de cada rim foram processadas pela técnica histológica de rotina e coradas em hematoxilina e eosina (H&E). Para cada peixe foram captadas imagens aleatórias de cada porção renal (n=10, 2048x1536 *pixels*) em microscopia de campo claro na magnitude de 400x. O *software* Motic 2.0 ML foi utilizado para as mensurações do diâmetro glomerular médio (μm), diâmetro médio dos túbulos contornados proximais e túbulos contornados distais (μm), assim como suas respectivas espessuras epiteliais.

Densidade volumétrica esplênica e renal

Imagens selecionadas ao acaso (n=10; 2048x1536 *pixels*) em 400x de magnitude foram obtidas para estimativa da densidade volumétrica renal nas regiões cranial, média e caudal. As imagens foram interpostas aleatoriamente com gradículas ajustadas para 50.000 *pixels*² totalizando 294 intersecções, que corresponderam aos pontos utilizados para a contagem das estruturas teciduais em túbulos contornados proximais, túbulos contornados distais, tecido hematopoiético, ductos coletores, centro melanomacrófagos (CMM), tecido conectivo (arterial ou de sustentação) e vasos sanguíneos, segundo Sundberg (1992) e Rocha et al. (1997). Para

análise do baço, foram utilizadas imagens em magnitude de 100x, determinando-se a densidade volumétrica para a polpa vermelha, polpa branca, vasos sanguíneos, tecido conectivo (arterial ou de sustentação) e CMM, conforme técnica anterior. O percentual de cada estrutura foi calculado para cada imagem: $\text{estrutura (\%)} = (\text{contagem total}/294) \times 100$.

Análise estatística

Os dados biométricos do baço e do rim, da histometria das estruturas renais citadas e as densidades volumétricas esplênicas e renais foram comparados entre as categorias pela análise de variância (ANOVA) modelo univariado (Teste de Tukey, $P < 0,05$).

RESULTADOS

As características físico-químicas médias da água dos viveiros de onde foram obtidos os pirarucus foram: temperatura – 28°C, oxigênio – 5,5mg/L, pH – 6,5, amônia total – 1,0mg/L e nitrito – 0,0mg/L. Além disso, a análise da relação peso-comprimento demonstrou que os animais apresentaram crescimento isométrico ($b=3,05$).

O baço apresentou-se como um órgão vermelho escuro localizado na porção ventral da cavidade peritoneal, próximo a grande curvatura do estômago e flexão do intestino, dividido em um lobo triangular maior e outros três menores ovais (Figura 1A).

O rim foi observado ocupando a posição dorsal da cavidade celomática, ventral a coluna vertebral e artéria aorta dorsal, dentro da bexiga natatória modificada, ocupando toda a sua extensão. Em todos os espécimes apresentou-se como um órgão alongado e segmentado, de coloração vermelho amarronzado, com consistência esponjosa, sendo o rim direito sempre maior que o esquerdo (Figura 1B).

Os parâmetros médios do peso esplênico e renal, das relações esplenossomáticas e nefrossomáticas, além do comprimento renal dos pirarucus avaliados são apresentados na

Tabela I. Este é o primeiro estudo que relata sobre o peso e comprimento do rim, assim como a relação nefrossomática, de pirarucus em diferentes fases de crescimento corporal, possibilitando a análise do desenvolvimento esplênico e renal para esta espécie.

Tabela I

As diferenças entre as categorias quanto aos pesos esplênicos e renais, assim como o tamanho dos rins demonstram que estas vísceras se desenvolvem com o crescimento corporal. Entretanto a análise das relações espleno e nefrossomáticas demonstrou que os animais da categoria JU20 apresentaram valores superiores e estatisticamente diferentes quando comparados às demais categorias, que não apresentaram diferença entre si, sugerindo ganho ponderal de ambas as vísceras menor que o crescimento corpóreo.

Microscopicamente, o baço apresentou vasos sanguíneos, centros melanomacrófagos, polpas vermelha e branca, além de ser coberto por uma fina cápsula fibrosa. A polpa vermelha apresentou-se sempre organizada como cordões esplênicos interligados, associada a capilares sinusóides (Figura 1C), enquanto a polpa branca constituiu-se de células linfóides, vasos sanguíneos e centros melanomacrófagos formando pequenos aglomerados no parênquima (Figura 1D).

A análise da densidade volumétrica esplênica é apresentada na Tabela II, evidenciando a predominância da polpa vermelha (67,2 – 75,4%) em todas as categorias e sua crescente percentagem, tendo os animais mais tardios valores estatisticamente superiores. A polpa branca representou a segunda estrutura mais frequente (14,5 – 25,9%), mas decrescendo sua densidade com o crescimento corporal, tendo os animais menores, maior densidade da polpa branca quando comparada as demais categorias. A análise dos centros melanomacrófagos demonstrou maior porcentagem nos animais mais tardios ($5,5 \pm 0,2\%$), demonstrando sua importância nesta fase de desenvolvimento corporal. Vasos sanguíneos e tecido conectivo não apresentaram

diferenças entre as categorias avaliadas, mantendo sua percentagem durante o crescimento corporal.

A análise microscópica do rim demonstrou que a camada mais externa, equivalendo à cortical, constituiu-se de tecido hematopoiético, enquanto que a região central (medular) por túbulos contornados proximais, túbulos contornados distais, glomérulos e ductos coletores, associados e pequenas ilhotas de tecido hematopoiético, por toda a sua extensão em todas as categorias avaliadas (Figura 1E e F).

A análise volumétrica renal demonstrou predominância dos túbulos contornados proximais (43,1 – 45,2%), não havendo diferença percentual entre as categorias, seguido de tecido hematopoiético (16,6 – 26,4%), com maior percentagem nas categorias JU80 e AB quando comparadas com a categoria JU20. Os túbulos contornados distais representaram 15,5 a 21,6% da constituição renal, decrescendo sua porcentagem com o crescimento corporal, o que não aconteceu com o percentual de glomérulos, que se manteve estatisticamente semelhante nas categorias avaliadas. A percentagem de vasos sanguíneos (5,9 – 11,3%) foi diferente entre todas as categorias, seguido dos centros melanomacrófagos (0,8 – 1,5%) que se manteve semelhante nos espécimes. Não houve diferença quanto à percentagem de tecido conectivo (0,4 – 1,1%) entre as categorias, enquanto que JU20 apresentou maior percentagem de ductos coletores (0,6%) quando comparado com JU80 e AB (0,04 em ambos).

Tabela II

A Tabela III descreve as características histomorfométricas de diferentes estruturas renais nas distintas fases de crescimento corporal. Estes são os primeiros relatos de medidas médias glomerulares, tubulares e de altura de epitélios em *Arapaima gigas* em diferentes fases de crescimento corporal.

As células dos túbulos contornados proximais apresentaram-se cuboides com borda em escova bem desenvolvida (Figura 1F), enquanto as células dos túbulos contornados distais, apesar de apresentarem mesmo formato, eram desprovidas da borda em escova.

Figura 1

Tabela III

DISCUSSÃO

As características físico-químicas da água dos viveiros mostram que os valores observados estão dentro dos limites sugeridos por outros autores (Soares et al. 2007), inclusive para produção de pirarucu (Cavero et al. 2003). Associado a este resultado, a relação peso-comprimento revelou crescimento tipo isométrico, considerado ideal para peixes (Le Cren 1951). Outros estudos utilizam esta mesma metodologia para outras espécies (Tavares-Dias et al. 2006, Rego et al. 2008) e também para o pirarucu com descrições de crescimento alométrico positivo (Scorvo-Filho et al. 2004, Alcântara et al. 2005) e negativo (Alcântara e Guerra 1992, Rufino e Isaac 1995). Desta forma, os resultados encontrados sugerem que as metodologias empregadas na criação dos pirarucus do presente estudo, associado as condições ambientais foram adequadas, ou seja, os valores observados não sofreram interferência por processos patológicos.

O baço é um dos principais órgãos hematopoiéticos, assim como o rim (Genten et al. 2009), e, em menor extensão as áreas peri-portais do fígado. Estes órgãos funcionam como sítios que filtram o sangue, destruindo células e armazenando eritrócitos (Morrison 2007). Destroem patógenos que alcançam a corrente circulatória, pois possuem uma extensa e importante capacidade de defesa (Press e Evensen 1999).

O baço possui dimensões pequenas e usualmente de coloração vermelho escura. Frequentemente está localizado próximo ao estômago e curvatura intestinal, com formas variando entre o triangular, oval e até alongado (Yanong 2003), corroborando com o presente estudo. Pode ser único ou, em algumas espécies, como demonstrado no pirarucu, ser dividido em duas ou mais porções menores (Morrison 2007).

A literatura descreve o rim da grande maioria dos teleósteos dividido em duas porções: uma anterior, o pronefro, também denominado de rim cranial, e uma posterior, o mesonefro, ou opistonefro ou rim excretor (Ferraz de Lima et al. 1993, Yanong 2003, Costa et al. 2012), fato este não observado no pirarucu em todas as fases de desenvolvimento corporal avaliadas, que se estendeu da região cranial à caudal da cavidade celomática, como um único órgão, corroborando com outras descrições já realizadas em alguns teleósteos (Genten et al. 2009).

Autores descrevem que a relação esplenossomática pode ser usada como indicador de condições sanitárias inadequadas, já que a esplenomegalia pode estar relacionada a processos infecciosos ou parasitários (Tavares-Dias et al. 2000). No presente estudo não foram identificados fatores que indicassem condições sanitárias inadequadas, pela ausência de lesões macro e microscópicas, assim como ausência de parasitas. Desta forma, pode-se atribuir a diferença observada entre a categoria JU20 e as demais ao tipo de manejo empregado. O pirarucu, após ser separado dos pais, é mantido em tanques de pequenas proporções para desenvolvimento e treinamento alimentar com ração comercial. Quando estão se alimentando apenas de ração, o que ocorre quando seu tamanho gira em torno de 20cm de comprimento total, são realocados para tanques escavados de proporções maiores. Durante este período de treinamento e desenvolvimento, são realizadas capturas com puçá para biometrias de classificação amostrais a cada três dias, seguindo as metodologias do sistema semi-intensivo de produção (Faria et al. 2013), o que provoca constante estresse. Estudos (Brandão et al. 2006) comprovam alterações sanguíneas significativas em pirarucus submetidos a práticas de rotina

em piscicultura. Este manejo também poderia provocar alterações esplênicas nas fases iniciais de desenvolvimento, envolvendo, inclusive a categoria JU20. Desta forma, por não apresentarem alterações macro e microscópicas, são considerados sadios pela inspeção visual, e os dados apresentados sobre o baço no presente estudo dizem respeito a pirarucus criados em sistema semi-intensivo, caracterizando esta espécie neste sistema de criação.

Outro fator que poderia ser atribuído à diferença da relação esplenossomática observada está relacionado ao acentuado desenvolvimento ponderal da espécie com curvas de crescimento bem características, comprovada por estudos já realizados com esta espécie (Ono e Kehdi, 2013), sem ganho ponderal esplênico proporcional (Shearer 1994). Além disso, o baço é um órgão dinâmico, especialmente quando a demanda por eritrócitos aumenta (Tavares-Dias et al. 2008). Portanto, os valores observados na Tabela I não seriam considerados patológicos para a espécie, no sistema semi-intensivo, possibilitando a correlação quando da ocorrência de fatores relacionados à sanidade, nutrição e manejo, que, quando inadequados, poderiam provocar esplenomegalia ou diminuição significativa deste órgão, como relatado em outros estudos (Lowe-Jinde 1980, Kurovskaya e Osadchaya 1993, Barker et al. 1994, Norris et al. 2000, Tavares-Dias et al. 2000, Maes et al. 2005, Wolf e Wolfe 2005, Tavares-Dias et al. 2006).

A arquitetura microscópica do baço do pirarucu se apresentou semelhante aos demais teleósteos, com extensa popa vermelha predominante composta por cordões esplênicos compostos por células eritróides associados a sinusóides corroborando com descrições para outras espécies de peixes (Genten et al 2009). O aumento de sua percentagem com o crescimento corpóreo do animal, demonstra o aumento da demanda eritrocitária, suprida por este órgão e seu papel hematopoiético (Roberts e Ellis 2012, Genten et al. 2009). Os centros melanomacrófagos apresentaram-se como aglomerados de células pretas ou marrons, assim como descrições para demais teleósteos (Campos et al. 2008).

O rim de teleósteos é um órgão misto compreendendo elementos hematopoiéticos, reticuloendoteliais, endócrinos e excretores (Morrison 2007). Nos teleósteos em geral, o rim cranial normalmente funciona como um complexo tecido hematopoiético, podendo ainda conter elementos endócrinos adrenocorticais, com poucos túbulos renais observados. No rim caudal predomina função excretora com elementos renais (Genten et al. 2009), diferenciando o pirarucu da maioria dos teleósteos, que apresentou em toda sua extensão arquitetura externa hematopoiética e interna excretora.

Poucos são os estudos estereológicos de rim de peixes, sendo este o primeiro relato sobre densidade volumétrica de rim de pirarucu em diferentes fases de crescimento corporal.

Os néfrons de teleósteos exibem extensa diversidade morfológica, provavelmente como reflexo das diferentes exigências e capacidades de excreção de água e retenção de sal em vários ambientes. Peixes de água doce normalmente possuem maior número de glomérulos que os marinhos (Elger e Hentschel, 1981), pois vivem em meio externo menos concentrado, como no presente estudo. Os peixes marinhos, o meio em que vivem propicia a perda de água, apresentando glomérulos em menor tamanho e número. Nestas espécies a brânquia assume papel importante na excreção de sais (Lourdes e Lima 2001). Apesar disso, mantém a mesma arquitetura celular básica (Morrison 2007).

Estudo realizado por Wong e Woo (2006) relaciona a capacidade adaptativa glomerular de brema de prata (*Sparus sarba*) em meio hipo e hipertônico, onde o mesângio dos glomérulos adaptados em meio hipotônico era mais expandido, e o lúmen capilar era amplo com eritrócitos em seu interior, indicando alta capacidade filtrativa. O diâmetro médio dos glomérulos nesta espécie foi de 13 μm , inferior ao observado no presente estudo (JU20=37,8 \pm 0,6, JU80=36,4 \pm 0,3 e AB=39,9 \pm 0,3), sugerindo que em pirarucu os glomérulos possuem maior capacidade filtrativa, especialmente na categoria mais tardia, AB.

Os mesmos autores (Wong e Woo 2006), relatam, na brema de prata, o diâmetro médio de túbulo contornado proximal e espessura de epitélio, com 55-105 μm e 25-40 μm , respectivamente. Animais em meio hipertônico aumentam o número e diâmetro dos túbulos, em comparação ao meio hipotônico, intensificando o papel dos túbulos na formação da urina. No presente estudo estas medidas foram inferiores (Tabela III) em ambos os aspectos demonstrando que em pirarucus os túbulos têm papel inferior quando comparado a brema prata, um peixe predominantemente de natureza marinha. Isso se deve, provavelmente ao fato desta espécie ser encontrada tanto em meios hiper, quanto hipotônicos e ser capaz de se adaptar tanto a condições de água doce, quanto marinhas, dependendo mais da capacidade secretória dos túbulos contornados proximais para sobrevivência (Beyenbach 2004).

A determinação de mudanças relacionadas ao crescimento corporal sobre os valores biométricos e histomorfológicos renais e esplênicos de peixes aprimora a histologia como ferramenta de diagnóstico, melhorando tanto a sanidade de peixes quanto a indústria da aquicultura (Hrubec et al. 2001). Desta forma, a histologia é uma ferramenta que deve ser cada vez mais utilizada na aquicultura, objetivando esclarecer o funcionamento dos tecidos quanto às células e suas correlações, para que a histopatologia possa ser utilizada como ferramenta para o diagnóstico de doenças (Cavichiolo 2009).

CONCLUSÃO

Com o crescimento corpóreo dos espécimes avaliados, o baço e o rim não alteram seu formato e localização. A coloração de ambas as vísceras mantém-se como nos demais teleósteos e o crescimento ponderal renal e esplênico não acompanha o crescimento corpóreo. Na arquitetura tecidual do baço houve predominância da polpa vermelha, com aumento relativo desta e dos centros melanomacrófagos. O rim do pirarucu é alongado, se estendendo desde

porção cranial até a caudal da cavidade celomática, assim como sua arquitetura microscópica apresenta cortical hematopoiética e medular excretora, mantendo estas características com o crescimento corporal, diferente dos demais peixes teleósteos. A espécie é provida de glomérulos, tendo esta estrutura papel importante na formação da urina.

Agradecimentos

Os autores agradecem à empresa Mar & Terra e toda a sua equipe pela disponibilidade das amostras e auxílio técnico.

RESUMO

Arapaima gigas, o pirarucu, é um dos representantes mais antigos da família Arapaimidae. Esta espécie é o maior peixe de escamas da Bacia Amazônica, seu habitat natural. O baço, rim e timo são importantes órgãos imunes em peixes, sendo o rim cranial responsável pela hematopoiese, enquanto a caudal à osmorregulação. O baço concentra a filtração de antígenos, hemocaterese e estocagem de eritrócitos. Quinze pirarucus cultivados semi-intensivamente, foram eutanasiados, medidos, pesados, necropsiados e agrupados nas categorias JU20, JU80 e AB de acordo comprimento corpóreo total, tendo os respectivos rins e baços pesados para obtenção das RES e RNS, assim como colhidos para histologia de rotina em H&E. O baço do pirarucu segue as descrições para teleósteos em geral, sendo dividido em uma porção maior e outras menores. A polpa vermelha predomina a composição esplênica, com seu aumento relativo com o crescimento corpóreo, mas sem ganho ponderal proporcional. O rim ocupa a porção dorsal da cavidade celomática, sem porções. Sua arquitetura microscópica é composta por cortical hematopoiética e medular excretora, distinguindo da maioria dos teleósteos. Os túbulos contornados proximais predominaram a composição renal com aumento de sua

proporção e do tecido hematopoiético durante o crescimento corpóreo dos espécimes, demonstrando a importância crescente do rim na atividade hematopoiética.

Palavras-chaves: hematopoiese, histologia, histomorfometria, peixe.

REFERÊNCIAS

- ALCÂNTARA FB, GUERRA HF. 1992. Cultivo de paiche, *Arapaima gigas*, utilizando bujurqui, *Cichlassoma bimaculatum*, como presa. *Folia Amazónica*, 4: 133-144.
- ALCÂNTARA FB, ALDEA MG, ARRARTE PR, VEINTEMILLA CV, DEL CASTILLO DT, TELLO MS. 2005. Cultivo de paiche, *Arapaima gigas* en estanques de produtores en Loreto, Perú, In: RENNO J-F, GARCÍA C, DUPONCHELLE F Y NUÑEZ J (Eds). *Biología de las Poblaciones de Peces de la Amazonía y Piscicultura. Comunicaciones del Primer Coloquio Internacional de la Red de Investigación sobre la Ictiofauna Amazónica*, Iquitos, Perú: RIA, Iquitos, Peru, p.163-168.
- BARKER DE, KHAN RA, HOOPER R. 1994. Bioindicators of stress in winter flounder, *Pleuronectes americanus* captured adjacent to a pulp and paper mill in St. George's bay, Newfoundland. *Can J Fish Aquat Sci* 51: 2203-2209.
- BEYENBACH KW. 2004. Kidneys sans glomeruli. *Am J Physiol Renal Physiol* 286: 811-827.
- BRANDÃO FR, GOMES LC, CHAGAS EC. 2006. Respostas de estresse em pirarucu (*Arapaima gigas*) durante práticas de rotina em piscicultura. *Acta Amaz* 36(3): 349-356.
- CAMPOS, C.M.; MORAES, J.R.E.; MORAES, F.R. Histopatologia de fígado, rim e baço de *Piaractus mesopotamicus*, *Prochilodus lineatus* e *Pseudoplatystoma fasciatum* parasitados

- por myxosporídios, capturados no rio Aquidauna, Mato Grosso do Sul, Brasil. Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária, 17(4):200-205, 2008.
- CAVERO BAS, PEREIRA-FILHO M, ROUBACH R, ITUASSU DR, GANDRA AL, CRESCÊNCIO R. 2003. Efeito da densidade de estocagem sobre a eficiência alimentar de juvenis de pirarucu (*Arapaima gigas*) em ambiente confinado. Acta Amazonica 33(4):631-636.
- COSTA GM, LIMA MG, KFOURY JR JR. 2012. Histologia e ultraestrutura do rim e rim cefálico do pacu. Pesq Vet Bras 32(5): 453-458.
- DE IULIIS G, PULERÁ D. 2007. The dissection of vertebrates – A laboratorial manual. San Diego: Elsevier, 298 p.
- ELGER M e HENTSCHEL H. 1981. The glomerulus of a stenohaline fresh-water teleost, *Carassius auratus gibelio*, adapted to saline water. Cell Tis Res 220: 73–85.
- FARIA RHS, MORAIS M, SORANNA, MRGS, SALLUN WB. 2013. Manual de criação de peixes em viveiros. Brasília: Codevasf, 136 p.
- FERRAZ DE LIMA CLB, REIS NS, CECCARELLI PS. 1993. Estudo topográfico e histológico do rim de pacu *Piaractus mesopotâmicus* Holmberg, 1887 (Teleostei, Serrasalminae). Boletim Técnico CEPTA, 6(2): 41-52.
- FISHELSON L. 2006. Cytomorphological alterations of the tymus, spleen, head-kidney, and liver in cardinal fish (Apogonidae, Teleostei) as bioindicators of stress. J Morphol 267:57-69.
- FISHER JP, MYERS MS. 2000. Fish Necropsy. In: OSTRANDER G. The Laboratory Fish. Anew York: Elsevier, p. 543-556.
- GENTEN F, TERWINGHE E, DANGUY A. 2009. Atlas of fish histology. Université Libre de Bruxelles: Science Publisher, 219 p.

- HRUBEC TC, SMITH SA, ROBERTSON JL. 2001. Age-related changes in hematology and plasma chemistry values of hybrid striped bass (*Morone chrysops* x *Morone saxatilis*). *Vet Clin Pathol* 30: 8-15.
- KUROSIVSKAYA LN, OSADCHAYA SA. 1993. The influence of *Ichthyophthirius multifiliis* on underyearling carp, *Cyprinus carpio*. *J Ichthyol* 33(4): 81-92.
- LE CREN ED. 1951. The length-weight relationship and seasonal cycle in gonadal weight and condition in the perch (*Perca fluviatilis*). *J Anim Ecol* 20: 201-19.
- LOURDES BRR, LIMA S. 2001. Anatomia de peixes. In: MOREIRA HLM et al. Fundamentos da moderna aquicultura. Canoas: Ed. ULBRA, 200 p.
- LOWE-JINDE L. 1980. Observations of rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson, infected with *Cryptobia salmostica*. *J Fish Biol* 17(1): 23-30.
- LUNDBERG JG, CHERMOFF B. 1992. A miocene fossil of the Amazonian fish *Arapaima* (Teleostei, Arapaimidae) from the Magdalena River Region of Colombia – Biogeography and evolutionary implications. *Biotropica* 24(1): 2-14.
- MACIEL PO, RODRIGUES APO, GALECO LN, MORON SE. 2012. Anatomia e histologia funcional do rim e baço de alevinos de pirarucu (*Arapaima gigas*). Congresso da Sociedade Brasileira de Aquicultura e Biologia Aquática, 5. Unir, consolidar e avançar. Palmas: AQUABIO.
- MAES GE, RAEYMAEKERS JA, PAMPOULIE C, SEYNAEVE A, GOEMANS G, BELPAIRE C, VOLCKAERT FAM. 2005. The catadromous European eel *Anguilla anguilla* (L.) as a model for freshwater evolutionary ecotoxicology: Relationship between heavy metal bioaccumulation, condition and genetic variability. *Aquatic Toxicol* 73:99-114.

- MORRISON J. Normal histology. In: MUMFORD S, HEIDEL J, SMITH C, MORRISON J, MACCONNELL B, BLAZER V. 2007. Fish histology and histopathology. United States Fish and Wildlife Service - National Conservation Training Center, 357 p.
- NORRIS DO, CAMP JM, MALDONADO TA, WOODLING JD. 2000. Some aspects of hepatic function in feral brown trout, *Salmo trutta*, living in metal contaminated water. *Comp Biochem Physiol. Part-C*, 127: 71-78.
- ONO EA, KEHDI J. 2013. Manual de boas práticas de produção do pirarucu em cativeiro. 1ª ed. Brasília: SEBRAE, 45 p.
- PRESS CM, EVENSEN O. The morphology of the immune system in teleost fishes. 1999. *Fish & Shellfish Immunology*, 9:309-318.
- REGO ACL, PINESE OP, MAGALHÃES PA, PINESE JF. 2008. Relação peso-comprimento para *Prochilodus lineatus* (Valenciennes, 1836) e *Leporinus friderici* (Bloch, 1794) (Characiformes) no reservatório de Nova Ponte –EPDA de Galheiro, Rio Araguari, MG. *Rev Bras Zoociênc* 10: 13-21.
- ROBERTS RJ, ELLIS AE. 2012. The Anatomy and physiology of teleosts. In.: ROBERTS RJ et al. *Fish Pathology*, 4º ed. Iowa, USA: Blackwell Publishing, p. 17-61.
- ROBERTS RJ, RODGER HD. 2012. The Pathophysiology and Systematic Pathology of Teleosts. In.: ROBERTS RJ. *Fish Pathology*. 4ª ed. Iowa, USA: Blackwell Publishing, p. 62-143.
- ROCHA E, MONTEIRO RAF, PEREIRA CA. 1997. Liver of the Brown Trout, *Salmo trutta* (Teleostei, Salmonidae): A stereological study at light and electron microscopic levels. *Anat Rec* 247: 317-328.
- RUFFINO ML, ISAAC VJ. 1995. Life cycle and biological parameters of several Brazilian Amazon fish species. *NAGA - The ICLARM Quarterly* 18: 41-45.

- SCORVO-FILHO JD, ROJAS NET, SILVA CM, KONOIKE T. 2004. Criação de *Arapaima gigas* (teleostei osteoglossidae) em estufa e sistema fechado de circulação de água, no Estado de São Paulo. B Inst Pesca 30: 161–170.
- SHEARER KD. 1994. Factors affecting the proximate composition of cultured fishes with emphasis on salmonids. Aquaculture, 119: 63-88.
- SOARES EC, PEREIRA-FILHO M, ROUBACH M, SILVA RCS. 2007. Condicionamento alimentar no desempenho zootécnico do tucunaré. Ver Bras Eng Pesca (Esp). 2:35-48.
- SUNDBERG MD. 1992. An introduction to stereological analysis: morphometric techniques for beginning biologists. In: GOLDMAN CA, ANDREWS SE, HAUTA PL, KETCHUM R. Tested studies for laboratory teaching. Vol. 6. Proceedings of the 6th Workshop/Conference of the Association for Biology Laboratory Education (ABLE).
- TAVARES-DIAS M, MORAES FR, MARTINS LM. 2000. Relação hepatossomática e esplenossomática em peixes teleósteos de cultivo intensivo. Rev Bras Zool, 17(1): 273-281.
- TAVARES-DIAS M, MORAES FR, MARTINS LM. 2006. Equação da relação peso-comprimento, fator de condição, relação hepato e esplenossomática de 11 teleósteos dulciaquícolas cultivados no Brasil. Comunicacion científica, IV Congresso Iberoamericano de Aquicultura (CIVA), p. 713-720.
- TAVARES-DIAS M, MARCON JL, LEMOS JRG, FIM JDI, AFFONSO EG, ONO EA. 2008. Índices de condição corporal em juvenis de *Brycon amazonicus* (SPIX & AGASSIZ, 1829) e *Colossomoma macropomum* (CUVIER, 1818) na Amazônia. B Inst Pesca, 34(2): 197-204.
- YANONG RPE. 2003. Necropsy techniques for fish. Semin Avian Exot Pet 12(2): 89-105.

- WELLS RMG, WEBER RE. 1990. The spleen in hypoxic and exercised rainbow trout. *J Exp Biol* 150: 461-466.
- WOLF JC, WOLFE MJ. 2005. A brief overview of nonneoplastic hepatic toxicity in fish. *Toxicol Pathol*, 33: 75-85.
- WONG MKS, WOO NYS. 2006. Rapid changes in renal morphometrics in silver sea bream *Sparus sarba* on exposure to different salinities. *J Fish Biol* 69: 770–782.

Tabela I

Médias e desvio padrão (\pm) do peso esplênico e renal, relação esplenossomática e nefrossomática, e comprimento renal de *Arapaima gigas* (n=15), de acordo com o desenvolvimento corporal, produzidos em piscicultura semi-intensiva.

Variáveis Biométricas	JU20 (n=4)	JU80 (n=4)	AB (n=7)
PB (g)	0,22 \pm 0,05 ^A	2,85 \pm 0,19 ^B	6,60 \pm 2,77 ^C
PR (g)	2,36 \pm 0,35 ^A	20,38 \pm 3,87 ^B	44,89 \pm 13,08 ^C
RES (%)	0,34 \pm 0,05 ^B	0,07 \pm 0,01 ^A	0,07 \pm 0,01 ^A
RNS (%)	3,62 \pm 0,35 ^B	0,48 \pm 0,07 ^A	0,47 \pm 0,05 ^A
CTR (cm)	5,11 \pm 0,13 ^A	25,00 \pm 2,71 ^B	31,14 \pm 1,68 ^C

Categorias (JU20) Juvenil 20, (JU80) Juvenil 80, (AB) Abate, (PF) Peso do fígado, (PB) Peso do

baço, (PR) Peso do rim, (RES) Relação esplenossomática, (RNS) Relação nefrossomática, (CTR)

Comprimento total do rim.

Tabela II

Densidade volumétrica esplênica e renal (%) de *Arapaima gigas* (n=15) de acordo com o desenvolvimento corporal, produzidos em piscicultura semi-intensiva.

	JU20 (n=4)	JU80 (n=4)	AB (n=7)
Baço			
Polpa vermelha	67,2 ±1,3 ^A	69,7 ±1,3 ^A	75,4 ±1,0 ^B
Polpa branca	25,9 ±1,0 ^B	23,4 ±1,0 ^B	14,5 ±0,7 ^A
CMM	3,1±0,3 ^A	3,3 ±0,2 ^A	5,5 ±0,2 ^B
Vaso sanguíneo	2,4 ±0,5 ^A	1,7 ±0,5 ^A	1,9 ±0,4 ^A
Tecido conectivo	1,3 ±0,8 ^A	1,9 ±0,8 ^A	2,7 ±0,8 ^A
Rim			
Túbulo contornado proximal	45,2 ±3,2 ^A	43,1 ±1,8 ^A	44,2 ±1,4 ^A
Túbulo contornado distal	21,6 ±1,8 ^B	20,0 ±1,0 ^{AB}	16,5 ±0,8 ^A
Glomérulo	2,9 ±0,4 ^A	3,3 ±0,2 ^A	2,9 ±0,2 ^A
Tecido hematopoiético	16,6 ±3,2 ^A	25,6 ±1,8 ^B	26,4 ±1,4 ^B
Ducto coletor	0,6 ±0,1 ^B	0,03 ±0,9 ^A	0,04 ±0,1 ^A
Centro de melanomacrófagos	0,8 ±0,4 ^A	1,5 ±0,2 ^A	1,3 ±0,2 ^A
Tecido conectivo	1,1 ±0,3 ^A	0,4 ±0,2 ^A	0,4 ±0,1 ^A
Vasos sanguíneos	11,3 ±0,6 ^C	5,9 ±0,3 ^A	8,2 ±0,3 ^B

Categorias (JU20) Juvenil 20, (JU80) Juvenil 80, (AB) Abate, ^{A, B} representam diferença (p<0,05) entre categorias.

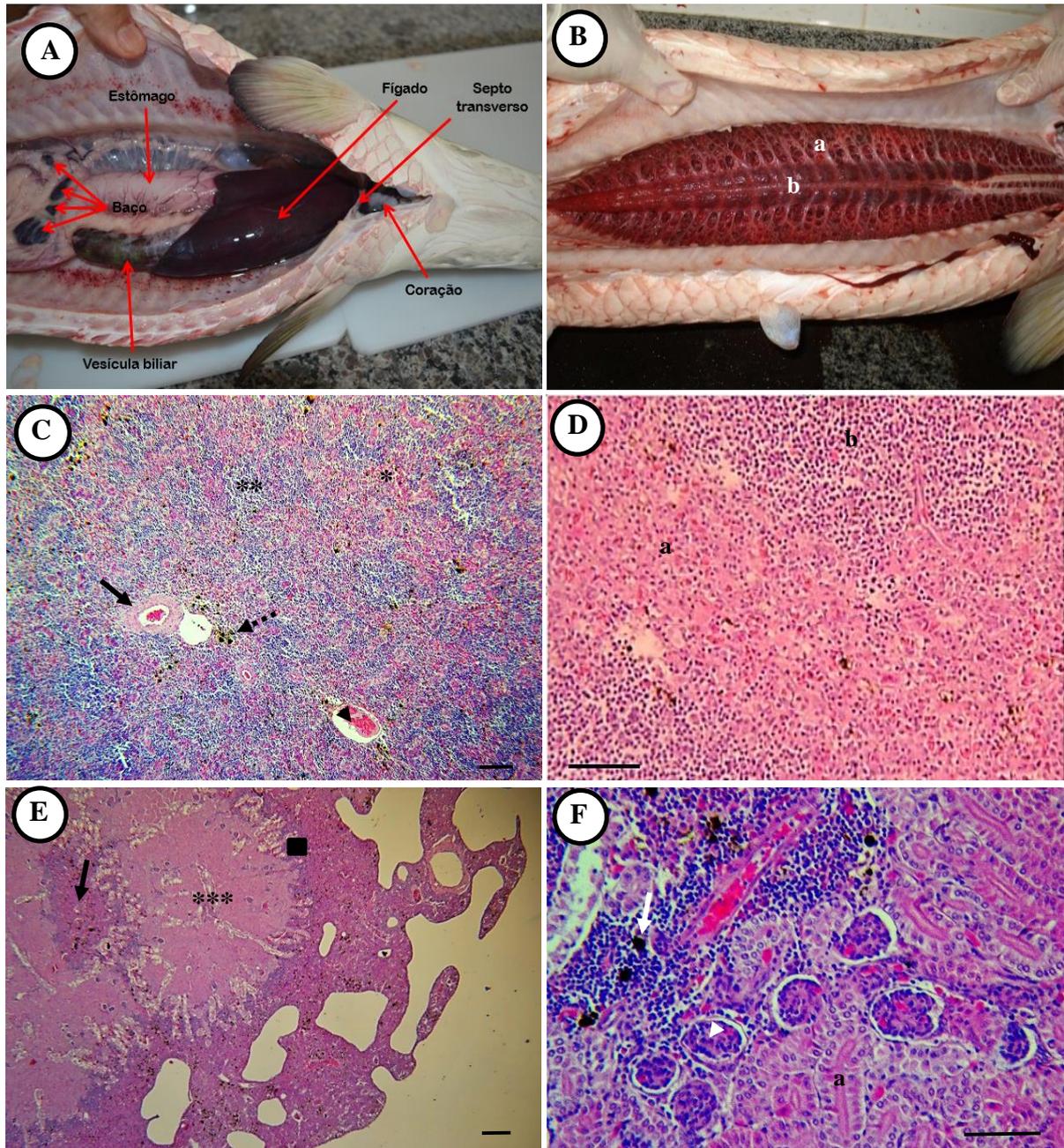


Figura 1. Cavidades celomáticas de *Arapaima gigas* expondo as vísceras e microscopia de luz em H&E de baço e rim. (A) Topografia esplênica em relação às demais vísceras celomáticas. (B) Bexiga natatória aberta expondo trabéculas que realizam as trocas gasosas (a) e o rim centralmente (b). (C) Corte histológico de baço evidenciando polpa vermelha (*), polpa branca (**), vaso arterial (seta), venoso (cabeça de seta) e centros melanomacrófagos (seta pontilhada). Barra = 100 μ m. (D) Histologia do baço em maior aumento evidenciando a polpa vermelha (a) e polpa branca (b). Barra = 50 μ m. (E) Corte transversal apresentando arquitetura renal; região cortical constituída por tecido hematopoiético (quadrado negro) e medular com estruturas renais típicas (***). Barra = 150 μ m. (F) Mesmo rim em maior aumento demonstrando as estruturas arquitetônicas renais e hematopoiéticas. Notar os centros de melanomacrófagos (seta branca), glomérulos (cabeça de seta branca) e túbulos contornados proximais com bordas em escova (a). Barra = 50 μ m.

Tabela III

Médias e desvio padrão (\pm) de diferentes medidas morfométricas de porções de néfron de *Arapaima gigas* (n=15) de acordo com o desenvolvimento corporal, produzidos em piscicultura semi-intensiva.

Estrutura	JU20 (n=4)	JU80 (n=4)	AB (n=7)
Diâmetro glomerular (μm)	37,8 \pm 0,6 ^B	36,4 \pm 0,3 ^A	39,9 \pm 0,3 ^C
Diâmetro do túbulo contornado proximal (μm)	35,4 \pm 0,5 ^B	30,5 \pm 0,3 ^A	31,1 \pm 0,2 ^A
Altura do epitélio tubular proximal (μm)	12,6 \pm 0,2 ^B	10,3 \pm 0,1 ^A	10,8 \pm 0,1 ^A
Diâmetro do túbulo contornado distal (μm)	35,9 \pm 0,7 ^B	33,5 \pm 0,4 ^A	35,8 \pm 0,3 ^B
Altura do epitélio tubular distal (μm)	12,1 \pm 0,3 ^C	10,3 \pm 0,1 ^A	11,0 \pm 0,1 ^B

Categorias (JU20) Juvenil 20, (JU80) Juvenil 80, (AB) Abate, ^{A, B, C} representam diferença ($P < 0,05$) entre categorias.