



Ministério da Ciência, Tecnologia, Inovações e Comunicações  
Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia  
Coordenação de Capacitação  
Divisão Apoio Técnico

**PIBIC**

**2.252**

**PROGRAMA DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DO INPA  
RELATÓRIO FINAL**

**HISTOLOGIA DO INTESTINO DE LARVAS DE PIRARUCU DURANTE A  
TRANSIÇÃO ALIMENTAR**

**BOLSISTA: Ana Beatriz de Sena Farias**

**ORIENTADOR (A): Dra. Ligia Uribe Gonçalves**

Relatório Final apresentado ao Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, como requisito para a conclusão como participante do Programa de Iniciação Científica do INPA.

Manaus – Amazonas  
2017

Realização:

Apoio Financeiro:



MINISTÉRIO DA  
CIÊNCIA, TECNOLOGIA,  
INOVAÇÕES E COMUNICAÇÕES





## **Título Trabalho do Bolsista:** Histologia do intestino de larvas de pirarucu durante a transição alimentar

### **Resumo (250 a 400 palavras)**

O objetivo deste estudo foi descrever as características histológicas e histoquímicas do intestino de larvas de pirarucu, *Arapaima gigas*, que iniciaram a co-alimentação em diferentes comprimentos. As larvas foram distribuídas em 12 tanques circulares ( $n = 242$ ) e a co-alimentação foi iniciada aos 2, 3 e 4 cm (tratamentos), com duração de 9 dias fixos. O regime alimentar foi estritamente realizado utilizando náuplios de artêmia até atingirem o comprimento desejado para iniciar a co-alimentação. A coleta das larvas foi realizada aleatoriamente, no primeiro dia de experimento (dia 0), novamente nos dias 8, 15 e 22 (10 larvas por caixa), após eutanásia por meio de choque térmico e posteriormente, fixadas em solução de paraformaldeído 4% em tampão fosfato pH 7,4, durante 24 horas. Em seguida, as amostras foram transferidas para a solução de álcool 70% e encaminhadas ao laboratório temático de microscopia eletrônica (LTME), do INPA, onde foram submetidas ao processamento histológico de rotina e a análises histoquímicas com o Ácido Periódico e Reativo de Schiff (PAS), Alcian Blue pH 2,5 e Alcian Blue pH 1,0. Não foram encontradas lesões nos tecidos que constituem o intestino das larvas que iniciaram precocemente a co-alimentação aos 2 cm. Foram identificadas vesículas intracelulares claras nos enterócitos em pequenas dimensões (gotículas de lipídeos) logo na primeira coleta, indicando desenvolvimento funcional do intestino das larvas nesse comprimento. Morfologicamente, o intestino das larvas não apresentou diferenças marcantes entre os tratamentos, tornando-se possível supor que as mudanças tenham sido em nível enzimático ou nos demais órgãos do trato digestório. Histoquimicamente, as células caliciformes das larvas dos grupos de 2, 3 e 4 cm secretaram mucossubstâncias ácidas e neutras, indicando que no momento em que ocorre a mudança do alimento, a produção e secreção dessas substâncias são influenciadas. Em todos os grupos foi possível identificar a presença de cistos não eclodidos de artêmia no intestino, confirmando a incapacidade das larvas em digeri-los.

Realização:

Apoio Financeiro:



**INPA**  
INSTITUTO NACIONAL DE  
PESQUISAS DA AMAZÔNIA

**COCP**  
COORDENADORIA DE  
CAPACITAÇÃO

MINISTÉRIO DA  
CIÊNCIA, TECNOLOGIA,  
INOVAÇÕES E COMUNICAÇÕES





Ministério da Ciência, Tecnologia, Inovações e Comunicações  
Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia  
Coordenação de Capacitação  
Divisão Apoio Técnico

**Palavras Chave:** Histoquímica, Trato gastrointestinal, Arapaima gigas, Larvas.

**Subárea**

**Multidisciplinar**

**Financiamento**

PIBIC/CNPq

Data: 07 / 11 / 2017

Orientador(a) *Conçalves*  
Dra. *Conçalves*  
Pesquisador Adjunto  
Coord. de Tecnologia e Inovação-COT/INPA  
Nº SIAPE: 2071623

Bolsista

Apoio Financeiro:



Realização:



MINISTÉRIO DA  
CIÊNCIA, TECNOLOGIA,  
INOVAÇÕES E COMUNICAÇÕES



## INTRODUÇÃO

A fase inicial de desenvolvimento é considerada um momento crítico para a maioria das larvas de peixes (Portella e Dabrowski, 2008), pois seu trato digestório está passando por modificações morfofisiológicas, ou seja, os órgãos ainda não estão completamente formados e na maioria das vezes são incapazes de digerir as dietas artificiais (Conceição *et al.*, 2010).

A co-alimentação (alimento vivo em conjunto com o alimento inerte) é uma técnica eficiente, pois contribui no suprimento de nutrientes e é uma fase de adaptação importante para as larvas. Dessa forma, indivíduos que passam precocemente pela mudança do alimento vivo para o alimento inerte não apresentam índices de desenvolvimento satisfatórios (Dabroski, 1991).

Os alimentos vivos são os principais itens na dieta de larvas. São mais fáceis de serem visualizados e possuem capacidade de nadar na coluna d'água, estando constantemente disponíveis, diferentemente das dietas formuladas que tendem a se agregar na superfície da água ou afundar, tornando-se menos visíveis (Conceição *et al.*, 2010).

Os manejos alimentares que utilizam organismos vivos, como náuplios de artêmia e zooplâncton juntamente com as rações, quando substituídos gradualmente tem proporcionado melhores resultados no desempenho das larvas, quando comparadas com larvas alimentadas apenas com alimento vivo ou alimentadas com ração (Hayashi, 2014).

O trato gastrintestinal dos animais é o local onde ocorrem os processos de digestão do alimento ingerido e de absorção de nutrientes pela mucosa intestinal, e as alterações morfológicas podem servir como um instrumento para avaliar danos causados pela má nutrição dos peixes (Guyton e Hall, 2008).

Com base na importância da transição alimentar à qual são submetidas as larvas de peixes e a falta de informações sobre o momento ideal da mudança do alimento vivo para o alimento seco (rações balanceadas), este estudo pretende avaliar histologicamente o intestino de larvas de pirarucu, *Arapaima gigas*, que tiveram a transição alimentar iniciada em animais com diferentes comprimentos, a fim de obter informações para a proposição de protocolos de manejo ideais à larvicultura da espécie.

## MATERIAL E MÉTODOS

As larvas de pirarucu foram provenientes da Piscicultura Boa Esperança, no município Pimenta Bueno (RO). A coleta das larvas ocorreu com auxílio de um puçá, em seguida foram encaminhadas à estação experimental de aquicultura do INPA. As larvas foram distribuídas em 12 tanques circulares de fibra de vidro (1000 L; 242 larvas por tanque) em um delineamento inteiramente casualizado ( $n = 4$ ), em sistema fechado de recirculação. Durante o período experimental, foram monitorados temperatura ( $27,2 \pm 0,9$  °C), oxigênio dissolvido ( $6,86 \pm 1,38$  mg/L) e pH ( $6,78 \pm 0,17$ ) da água, mantendo-se estáveis.

A co-alimentação foi realizada em larvas de 2, 3 e 4 cm (tratamentos) com duração de nove dias fixos. Inicialmente, os peixes tinham  $2,09 \text{ cm} \pm 0,13$  e pesavam  $0,04 \text{ g} \pm 0,01$ . O regime alimentar foi estritamente realizado com náuplios de artêmia até atingirem o comprimento desejado para iniciar a co-alimentação (Figura 1). As alimentações ocorreram 13 vezes ao dia, durante quarenta dias.

Para a realização da microscopia ótica, a coleta das larvas foi realizada aleatoriamente, no primeiro dia de experimento (dia 0), novamente nos dias 8, 15 e 22 (10 larvas por caixa). Foram obtidos comprimento total e peso das larvas e posteriormente, as larvas foram eutanasiadas com choque térmico e posteriormente fixadas em solução de paraformaldeído 4% em tampão fosfato pH 7,4, durante 24 horas. Em seguida, transferidas para a solução de álcool 70% e encaminhadas ao laboratório temático de microscopia eletrônica (LTME), do INPA, onde as amostras foram desidratadas em gradientes de etanol (70%, 80%, 95% e 100%) e clarificadas em xilol. Logo em seguida foram submetidas à rotina histológica, para inclusão em parafina. As secções longitudinais ( $3\mu\text{m}$ ) foram realizadas com auxílio do micrótomo semiautomático (LEICA RM 22 45).

As lâminas permanentes foram coradas com Hematoxilina/Eosina para as análises morfológicas. Para análise histoquímica das mucinas epiteliais do intestino, foi utilizado o método PAS (*Periodic Acid Schiff*) para detecção de glicoconjugados neutros (MacManus, 1948) e para glicoconjugados ácidos, os métodos Alcian Blue (AB) pH 2,5 (carboxilados) e pH 1,0 (sulfatados) (Scott, 1972), além da associação AB pH 2,5 com PAS, para ambos.

A visualização e captura de imagens do intestino foi realizada em microscópio Axio Lab A1-Zeiss acoplado a uma câmera fotográfica digital AxioCam ERc5s por meio do analisador de imagem Zen 2 lite.

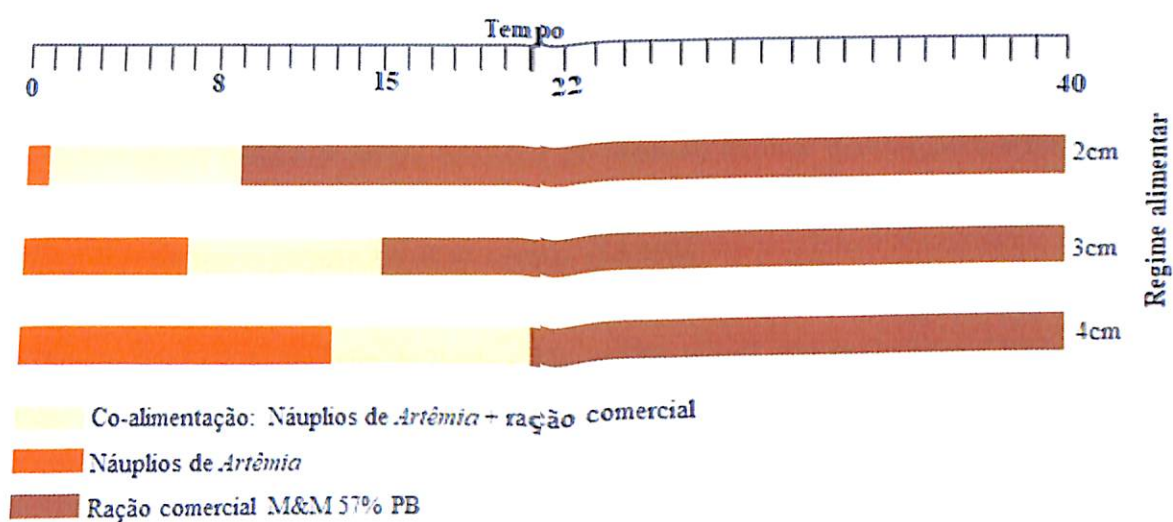


Figura 1. Manejo alimentar das larvas de pirarucu durante o período experimental

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Inicialmente as larvas de pirarucu, *Arapaima gigas* ( $2,09 \text{ cm} \pm 0,13$ ), apresentaram os órgãos do trato digestório bem formados, e histologicamente diferenciados, com boca e ânus abertos, sem reservas vitelínicas (Figura 2a), semelhantes às larvas de pintado, *Pseudoplatystoma coruscans*, aos 3 dias após a eclosão (DAE), porém o saco vitelínico nesse momento estava presente (Mangetti, 2006). As camadas que revestem o intestino eram finas e descontínuas (Figura 2b), porém na camada mucosa há predominância de células caliciformes, AB pH 2,5 + PAS e AB pH 2,5 positivas, com maior intensidade e enterócitos com borda em escova PAS positiva, moderadamente (Figura 2c; Tabela 1), sendo visualizadas como uma bordadura no pólo apical dos enterócitos (Carvalho e Collares- Buzato, 2005).

No 8º dia após o início da co-alimentação, as larvas que receberam precocemente o alimento inerte (2 cm) apresentaram camadas de revestimento do intestino mais espessas quando comparadas com o dia 0 (Figura 3A). As células caliciformes aparentemente aumentaram levemente em número

e foram AB pH 2,5 + PAS positivas com forte intensidade, indicando que há secreção de glicoconjugados neutros e ácidos ricos em carboxila (Tabela 1). Nas duas últimas coletas, 15° e 22°, quando já estavam sendo alimentadas somente com alimento inerte, também foi verificada alta secreção de mucossustâncias neutras e ácidas carboxiladas. Nesse período, observamos a presença de vesículas intracelulares claras nos enterócitos em pequenas dimensões, denominadas de gotículas de lipídeos (Figura 3B). Esse acúmulo de lipídios na mucosa intestinal quando a alimentação passa a ser exclusivamente inerte pode ser um indicador de digestão luminal e absorção e armazenamento temporal de lipídios, refletindo o desenvolvimento funcional do intestino (Gisbert et al., 2008), porém a presença dessas gotículas era relativamente reduzida.

No 8° dia de experimento, nas larvas de *A. gigas* que iniciaram a co-alimentação aos 3 cm, já verificamos presença de gotículas de lipídeos na região apical dos enterócitos (Figura 4A). As células caliciformes da mucosa secretam mucossustâncias ácidas carboxiladas e neutras, por apresentarem forte reação à associação AB pH 2,5 + PAS. Em contrapartida, há secreção de mucossustâncias ácidas sulfatadas, com moderada intensidade em AB pH 1,0 (Tabela 1). Do 15° ao 22° dia, as células caliciformes se encontravam distribuídas tanto no ápice, laterais e base das pregas da mucosa, preenchidas com numerosos e grandes grânulos (Figura 4B). Essa distribuição reflete a maior produção de muco para maior lubrificação, proteção e homogeneização do alimento com as enzimas digestivas, no momento em que as larvas estão recebendo ração que possui cerca de 90% de matéria seca, diferente do alimento vivo (náuplios de artêmia) em que o teor de matéria seca é de apenas 15-20% (Carvalho e Collares- Buzato, 2005). Ainda referente ao 15° dia, momento em que se encerra a co-alimentação, as células caliciformes do intestino reagiram moderadamente à associação AB pH 2,5 + PAS, diferente do que se observou após o 22° dia, em que estas larvas estavam sendo alimentadas apenas com ração comercial, as quais apresentaram forte reação a esta mesma associação, indicando secreção de mucossustâncias ácidas carboxiladas e neutras (Tabela 1).

No momento em que larvas de 4 cm ainda eram alimentadas somente com o alimento vivo no 8° dia de experimento, as células caliciformes tiveram reação fraca ao PAS, indicando baixa secreção de mucossustâncias neutras. Também foi verificada a distribuição das células caliciformes ao longo das pregas da mucosa (Figura 5A). Porém no momento que as larvas estavam na co- alimentação, 15° dia de experimento, a secreção de mucossustâncias neutras foi PAS positiva (Figura 5B) e no 22° dia, período em que estavam se alimentando exclusivamente de alimento inerte, a secreção destes

glicoconjugados voltou a reagir ao PAS fraca. E a reação AB pH 2,5 + PAS foi forte apenas no momento em que as larvas estavam se alimentando de ração comercial uma vez que a alteração total do alimento faz com que essas células produzam glicoproteínas ácidas, especializadas em proteger e lubrificar o revestimento do intestino (Tabela 1) (Junqueira e Carneiro, 2006).

Em geral, não foram identificadas diferenças marcantes dentre as características morfológicas do intestino, é possível que as mudanças sejam em nível enzimático ou nos demais órgãos do trato digestório. Em larvas de pacu, *Piaractus mesopotamicus*, a principal diferença entre as larvas que iniciaram a transição precoce e tardia era o desenvolvimento dos cecos pilóricos (Freitas, 2015)

Em todos os grupos (2, 3 e 4 cm), foi possível identificar os cistos não eclodidos de *Artemia* no intestino, confirmando a incapacidade das larvas em digerir-los (Figura 6).

Tabela 1. Análise histoquímica das mucossustâncias nas células intestinais de larvas de *Arapaima gigas*, durante a co-alimentação.

| Coleta (dias) | Técnica aplicada  | Células caliciformes |      |      |
|---------------|-------------------|----------------------|------|------|
|               |                   | 2 cm                 | 3 cm | 4 cm |
| Inicial       | PAS               |                      | ++   |      |
|               | AB pH 2,5         |                      | +++  |      |
|               | AB pH 1,0         |                      | ++   |      |
|               | AB (pH 2,5) + PAS |                      | +++  |      |
| 8°            | PAS               | ++                   | ++   | +    |
|               | AB pH 2,5         | ++                   | ++   | ++   |
|               | AB pH 1,0         | ++                   | ++   | ++   |
|               | AB (pH 2,5) + PAS | +++                  | +++  | ++   |
| 15°           | PAS               | ++                   | ++   | +++  |
|               | AB pH 2,5         | +                    | ++   | ++   |
|               | AB pH 1,0         | ++                   | ++   | ++   |
|               | AB (pH 2,5) + PAS | +++                  | ++   | ++   |
| 22°           | PAS               | +++                  | +    | +    |
|               | AB pH 2,5         | +++                  | ++   | ++   |
|               | AB pH 1,0         | ++                   | +++  | ++   |
|               | AB (pH 2,5) + PAS | +++                  | +++  | +++  |

Intensidade de coloração: (+) fraco; (++) moderado; (+++) forte



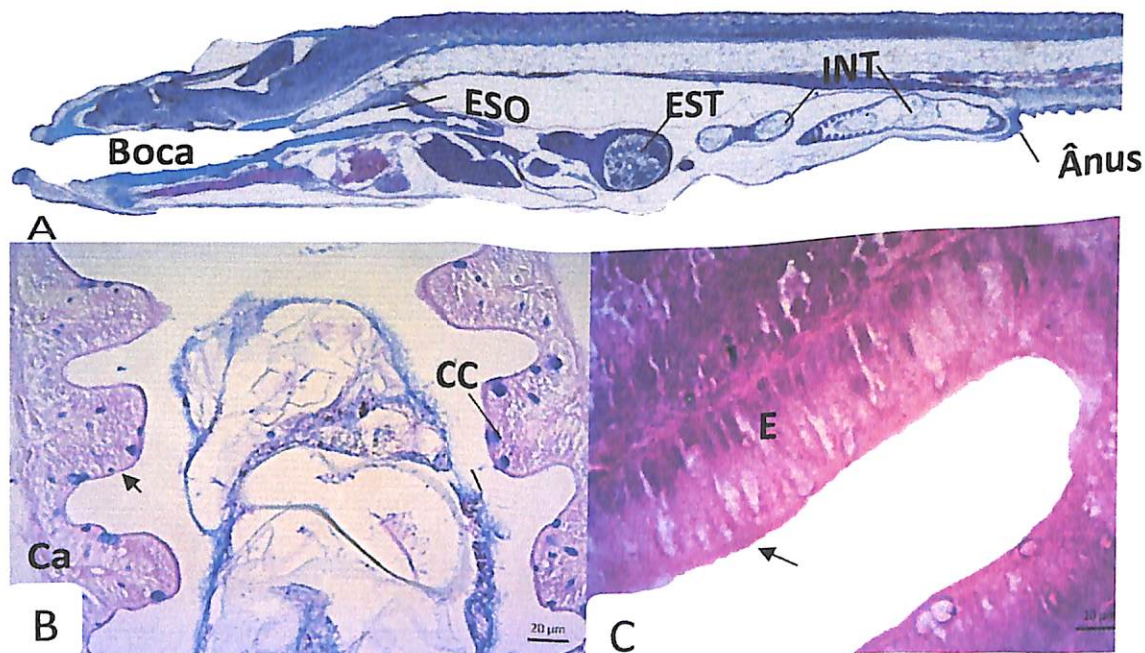


Figura 2. Corte longitudinal do intestino de larvas do dia 0. A- Órgãos do trato digestório, evidenciando: Boca e ânus abertos; Eso: Esôfago; Est: Estômago; Int: Intestino. B- Pregas da mucosa intestinal, Seta: Borda em escova; CC- Células caliciformes, AB pH 2,5 + PAS positivas e Ca- camadas de revestimentos. C- seta: Borda em escova; E -Enterócitos.

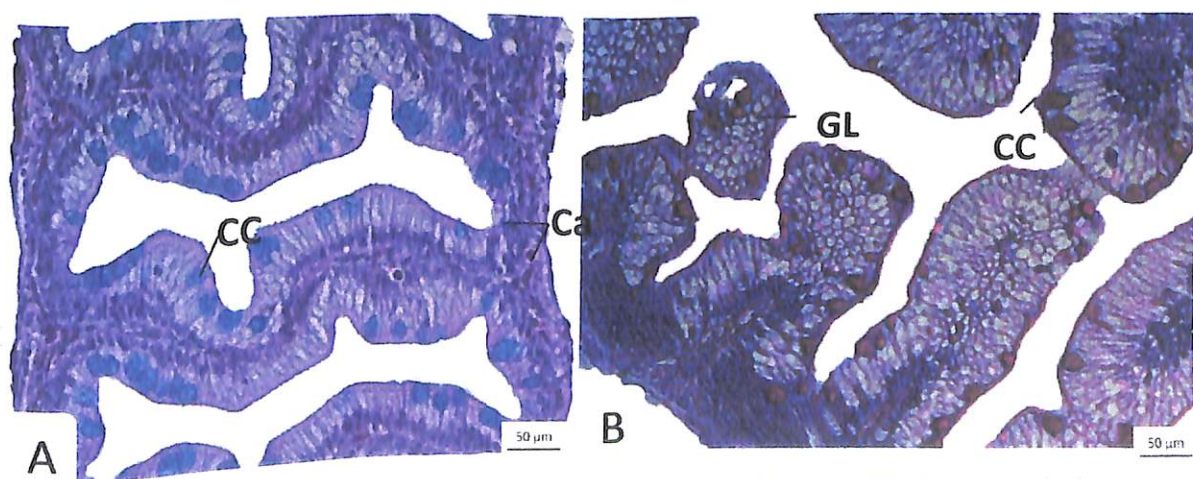


Figura 3. Corte longitudinal da mucosa intestinal de larvas com 2cm. A- CC: Células caliciformes; Ca- Camadas de revestimento B- GL- Gotículas de lipídeos na região apical dos enterócitos.



Figura 6. Corte longitudinal do intestino indicando os cistos de Artêmia não digeridos (Ci).

## CONCLUSÃO

O intestino de larvas de pirarucu que iniciaram a co-alimentação com 2cm não apresentou lesões nos órgãos do trato gastrointestinal. Morfologicamente o intestino das larvas que iniciaram a co-alimentação em diferentes comprimentos não apresentou diferenças marcantes, podendo assim supor que as diferenças tenham ocorrido em nível enzimático ou nos demais órgãos do trato digestório. Histoquimicamente, as células caliciformes do intestino das larvas de 2, 3 e 4 cm secretaram mucossubstâncias ácidas e neutras, indicando que a mudança de alimento, influencia na produção e secreção dessas substâncias.

## REFERÊNCIAS

- Carvalho, H. F.; Collares-Buzato, C. B. 2005. *Células: uma abordagem multidisciplinar*. Barueri: Manole p. 127-164pp.
- Conceição, L.E.C.; Yúfera, M.; Makridis, P.; Morais, S.; Dinis, M. T. 2010. *Live feeds for early stages of fish rearing*. *Aquaculture Research*, 41, 613-640 pp.
- Dabroski, K. 1991. *Dietary requirement for freshwater fish larvae - In Search of a common thread*. In: *Fish & Crustacean Larviculture Symposium, 1991*. Anais, 9-10 pp.

- Freitas, T.M. 2015. *Capacidade digestiva durante a ontogenia de larvas de pacu, Piaractus mesopotamicus*. Tese de doutorado, Universidade Estadual Paulista, Centro de Aquicultura da UNESP, 25p.
- Gisbert, E., Ortiz-Delgado, J.B., Sarasquete, C. (2008). *Nutritional cellular biomarkers in early life stages of fish*. *Histology and Histopathology* 23, 1525-1539pp.
- Guyton, A. C. & Hall, J. E. 2008. *Gastro Intestinal physiology*. In: Text book of medical Physiology, 11th (Edn). Elsevier Publication, Noida, India. 771-818pp.
- Hayashi, C. 2014. Desenvolvimento inicial das larvas de dourado *Salminus brasiliensis* (cuvier, 1816); suplementados com plâncton, artêmia e rações, em cultivos experimentais. *X Fórum Ambiental da Alta Paulista*, v. 10, n. 3, 137-150 pp.
- Junqueira, L. C.; Carneiro, J. 2006. *Histologia Básica*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 11ed. 312pp.
- MacManus, J. F. A. 1948. *Histological and histochemical uses of periodic acid*. *Stain Technology*, 23: 99- 108pp.
- Mangetti, A. J. 2006. *Desenvolvimento histomorfológico do trato digestório de larvas de pintado, Pseudoplatystoma coruscans (Agassiz, 1829)*. Dissertação de mestrado, Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. 95p.
- Portella, M.C.; Dabrowski, K. 2008. Diets, physiology, biochemistry and digestive tract development of freshwater fish larvae, p. 227-279. In: Cyrino, J.E.P; Bureau, D.; Kapoor, B.G. (Ed.) *Feeding and digestive functions in fishes*. New Hampshire: CRC Press.
- Scott, J., 1972. *Histochemistry of Alcian blue*. II. The structure of Alcian blue 8GX. *Histochemie*, 30: 215-234 pp.

Apoio Financeiro:



Realização:



MINISTÉRIO DA  
CIÊNCIA, TECNOLOGIA,  
INOVAÇÕES E COMUNICAÇÕES

