

CARMEN LÚCIA BAGGETTI FERRAZ DE LIMA



ESTUDO HISTOLÓGICO E HISTOQUÍMICO DO TRATO INTESTINAL
DE MATRINCHÃ *Brycon cephalus*, GÜNTHER, 1869 (PISCES,
CHARACIDAE)

Campinas, SP
1997

CARMEN LÚCIA BAGGETTI FERRAZ DE LIMA

ESTUDO HISTOLÓGICO E HISTOQUÍMICO DO TRATO INTESTINAL DE MATRINCHÃ *Brycon cephalus*, GÜNTHER, 1869 (PISCES, CHARACIDAE)

Este exemplar corresponde à redação final da tese defendida pelo(a) candidato(a) Carmen Lucia Baggetti Ferraz de Lima e aprovada pela Comissão Julgadora

7612/97
Norair Salviano dos Reis

Dissertação apresentada ao Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas, para obtenção do Título de Mestre em Ciências Biológicas, na área de Morfologia.

Orientador: Prof. Dr. Norair Salviano dos Reis

Campinas, SP
1997

9802460

CHAMADA: UNICAMP
 L628w
 80 BC 30154
 C. 305198
 CO R\$ 1,00
 SP/01/98
 CPD

CM-00105516-B

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
 BIBLIOTECA CENTRAL DA UNICAMP

L628w

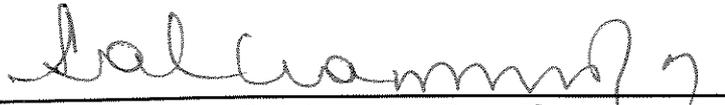
F413e

Ferraz de Lima, Carmen Lúcia Baggetti
 Estudo histológico e histoquímico do trato intestinal de matrinhã
Brycon cephalus, Günther, 1869 (Pisces, Characidae) / Carmen
 Lúcia Baggetti Ferraz de Lima. Campinas, SP : [s.n.], 1997.

Orientador: Norair Salviano dos Reis
 Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de Campinas.
 Instituto de Biologia.

1. Intestino^x 2. Histologia^x 3. Histoquímica^x 4. *Brycon*^x 5.
 histoenzimologia. Reis, Norair Salviano II. Universidade Estadual
 de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

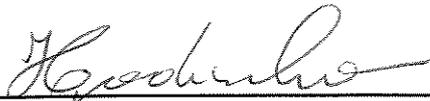
BANCA EXAMINADORA



Prof. Dr. Norair Salviano dos Reis (**Orientador**)
Deptº Histologia e Embriologia/IB - UNICAMP



Profª Dra. Iara Maria Silva de Luca
Deptº Histologia e Embriologia/IB - UNICAMP



Profª Dra. Héloisa Maria Godinho
Instituto de Pesca de São Paulo -
Secr. Agricultura e Abastecimento - SP

Prof. Dr. Paulo Pinto Joazeiro
Deptº Histologia e Embriologia/IB - UNICAMP

AGRADECIMENTOS

Ao Professor Dr. Norair Salviano dos Reis, Assistente Doutor do Departamento de Histologia e Embriologia do Instituto de Biologia da Universidade de Campinas - UNICAMP, pela orientação segura, apoio, incentivo e profunda amizade

Ao Prof. Dr. Aúreo Tatsumi Yamada, Assistente Doutor do Departamento de Histologia e Embriologia e Coordenador do Curso de Pós-Graduação em Morfologia do Instituto de Biologia da UNICAMP, pela colaboração no desenvolvimento de protocolos experimentais fundamentais para o desenvolvimento deste trabalho.

Ao Professores Membros da Banca Examinadora: Prof. Dra. Iara Maria Silva de Luca (Morfologia /UNICAMP), Prof. Dr. Paulo Pinto Juazeiro (Morfologia /UNICAMP), e Profa. Dra. Heloisa Maria Godinho (Instituto de Pesca/Secr. de Agricultura - SP) pelas sugestões apresentadas para o enriquecimento desta dissertação.

Aos demais Professores do Curso de Pós-Graduação em Morfologia do Instituto de Biologia da UNICAMP, pela amizade e pelos importantes ensinamentos adquiridos.

À Bióloga chefe do Laboratório de Técnicas Histológicas do Departamento de Histologia e Embriologia do Instituto de Biologia da UNICAMP, MSc Marta B. Leonardo, e às técnicas Marta Almeida e Cleusa O. Franco, pela amizade, força e apoio constante, durante o desenvolvimento e realização das técnicas histológicas gerais, histoquímicas e de histoenzimologia.

À direção e administração do Centro de Pesquisa e Treinamento em Aquicultura - CEPTA/IBAMA, durante as gestões dos chefes gerais: José Augusto Ferraz de Lima (93/96) e MSc. Geraldo Bernardino (atual), pela nossa liberação para a realização deste curso, dentro do programa de engrandecimento intelectual do corpo técnico do CEPTA, além das facilidades concedidas.

Ao técnico Baltazar Pereira de Paula, do Departamento de Histologia e Embriologia do Instituto de Biologia da UNICAMP, pela amizade, incentivo e apoio na realização dos experimentos, coleta do material, além do auxílio em técnicas histoquímicas.

Ao Biólogo Luiz Alberto Gaspar e grupo de apoio do CEPTA/IBAMA, pela colaboração na obtenção dos animais, amizade e agradável convívio.

À amiga Luzdalma Prozillo, colega de curso de Pós Graduação, pela colaboração na realização das fotografias dos animais utilizados para este estudo, pelo incentivo e amizade.

Aos Biblioteconomistas: Elenice Beck Banin Campos, Maria Anita P. Silva e Antônio Carlos Timóteo, da Biblioteca do CEPTA/IBAMA, pela valiosa colaboração na obtenção da bibliografia referenciada neste trabalho, com muita amizade.

À Vânia, Helena, Rita, D. Raquel e Silvia Helena, funcionárias dos Departamentos de Histologia e Embriologia e de Anatomia do Instituto de Biologia da UNICAMP, pela atenção, colaboração e amizade, no decorrer do curso.

A todos os colegas pesquisadores e funcionários do CEPTA/IBAMA, pela amizade e incentivo.

Aos colegas de classe, bem como a todos os colegas do Curso de Pós-Graduação em Morfologia do Instituto de Biologia da UNICAMP, pela amizade, força apoio e convivência agradável.

À Fundação Universidade Federal de Mato Grosso (UFMT), da qual orgulhamo-nos em pertencer ao quadro docente.

A todos aqueles que direta ou indiretamente contribuíram para execução deste trabalho.

À CAPES, CEPTA/IBAMA e FAEP-UNICAMP, pelo apoio financeiro.

SUMÁRIO

RESUMO

1. INTRODUÇÃO	5
2. REVISÃO DE LITERATURA	7
3. MATERIAL E MÉTODOS	16
3.1 MATERIAL	16
3.2 MÉTODOS	16
3.2.1 PROCESSAMENTO DOS TECIDOS PARA HISTOLOGIA E HISTOQUÍMICA	18
4. RESULTADOS	24
4.1 ANÁLISE MACROSCÓPICA	24
4.2 ANÁLISE MICROSCÓPICA	26
5. DISCUSSÃO	49
6 - CONCLUSÕES	57
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	59

ABSTRACT

RESUMO

O matrinchã *Brycon cephalus*, é um peixe oriundo da Bacia Amazônica, que tem despertado grande interesse para a piscicultura. Assim, o conhecimento de aspectos morfológicos, nutricionais e metabólicos, tornam-se importantes para a sua criação em cativeiro. O presente estudo teve como objetivo avaliar a relação morfofuncional do tubo intestinal, através de aspectos histológicos e histoquímicos. O intestino foi seccionado em cinco segmentos de tamanhos semelhantes e os cecos pilóricos, os quais foram respectivamente fixados em Bouin para embebição em parafina ou, fixados em solução de paraformaldeído a 4% com CaCl_2 a 1% e pós-fixados em OsO_4 a 1% para embebição em glicol metacrilato. Os cortes desparafinizados e posteriormente corados com H.E. e tricrômicos de Masson e Gomori foram usados para análise morfológica e para a análise histoquímica de carboidratos (PAS, Alcian blue pH 0,5 e 2,5). O conteúdo lipídico foi avaliado em cortes de fragmentos intestinais pós-fixados em OsO_4 a 1% embebidos em glicol metacrilato e criosecções obtidas de fragmentos fixados em formol cálcio e coradas pelo Sudan Black. A atividade da fosfatase ácida foi avaliada pelo método histoenzimológico de Gomori em criosecções de fragmentos intestinais. O epitélio intestinal é formado por enterócitos colunares intercalados com células caliciformes, as

quais possuem vesículas contendo glicoconjugados neutros, ácidos carboxilados e sulfatados. Os enterócitos encontrados nos três primeiros segmentos e nos cecos pilóricos mostraram uma considerável quantidade de gotículas lipídicas, e os encontrados no quarto segmento mostraram vesículas PAS positivas na região supranuclear e forte atividade da fosfatase ácida junto à membrana celular. O quinto e último segmento, tinha uma grande quantidade de células caliciformes, mas os enterócitos não mostraram qualquer reação preferencial pelos métodos histoquímicos utilizados. Este estudo demonstra que o intestino do matrinchã possui três regiões morfológicamente distintas, com funções absorptivas diferenciadas. A região anterior compreende os três primeiros segmentos; a região média o quarto; e a região distal o quinto segmento, incluindo o reto.

1. INTRODUÇÃO

Várias espécies de peixes nativos têm despertado interesse para a piscicultura nacional. Dentre elas, destacam-se as do gênero *Brycon*, por apresentarem características de espécies nobres, de grande valor comercial e aceitabilidade no mercado. Diversas publicações nacionais e estrangeiras mostram alguns aspectos da biologia de espécies desse gênero, no ambiente natural e em condições de cultivo (Seminário Sobre Criação de Espécies do Gênero *Brycon* - CEPTA/IBAMA, 1994).

O matrinchã (*Brycon cephalus*, Günther, 1869) é um briconíneo da Bacia Amazônica, que possui hábito alimentar omnívoro, com preferência por frutos e sementes; aproveitando-se também de insetos e pequenos peixes (GOULDING, 1980). Além do tipo de alimentação diversificada, esta espécie apresenta bom desempenho em relação ao seu crescimento em cativeiro, outra característica que é importante para a seleção de uma espécie para piscicultura. (SAINT PAUL *et al.*, 1980; GRAEF *et al.*, 1986; PEREIRA FILHO *et al.*, 1988; MENDONÇA *et al.*, 1993).

Informações concernentes aos estudos morfológicos dos peixes são fundamentais para o conhecimento de sua biologia e constituem-se em importantes subsídios para o desenvolvimento de uma piscicultura bem estruturada, que visa o sucesso na criação dessas espécies..

Estudos clássicos através de descrições detalhadas da organização histológica do sistema alimentar em peixes já vêm sendo realizados há várias décadas (DAWES, 1929; ROGICK, 1931; BLAKE, 1930,1936; CURRY, 1939; AHSAN-UL-ISLAM, 1949; AL-HUSSAINI, 1945, 1946, 1947 a,b; GIRGIS, 1952 a,b; KAPOOR, 1953; BARRINGTON, 1969; HARDER, 1975; KAPOOR *et al.*, 1975; SMITH, 1980).

Assim, o presente trabalho tem por finalidade, avaliar as relações morfofuncionais do trato intestinal de matrinhã (*Brycon cephalus*), através de uma caracterização histológica e histoquímica visando fornecer subsídios para o aprimoramento da criação dessa espécie em cativeiro, tomando-se por base seus aspectos nutricionais e metabólicos. Tal aprimoramento seria de grande valia para a piscicultura nacional em virtude do gênero *Brycon* abrigar espécies nobres de grande valor comercial.

2. REVISÃO DE LITERATURA

A ausência de aspectos estruturais macroscópicos marcantes no intestino dos peixes teleósteos não permite uma diferenciação anatômica clara dos diferentes segmentos do trato intestinal, como acontece nos animais superiores (SIS *et al.*, 1979; GILLAUME, 1991). Para AL-HUSSAINI (1949a), inclusive, as características histológicas do intestino dos teleósteos, foi considerada como uma das mais simples entre os vertebrados, em razão desses animais também não possuírem regiões macroscopicamente diferenciadas ao longo do trato intestinal.

Em contraposição, existe uma série de adaptações do trato digestivo adquiridas durante a evolução dos teleósteos, associando diferentes hábitos alimentares a formas particulares do corpo e morfologias funcionais do crânio, tais como: forma e posição da boca, dentição nas mandíbulas, região buco-faringeana, conformação dos rastros branquiais, e comprimento intestinal (AL-HUSSAINI, 1947b, 1949; DAS & MOITRA, 1956a,b; BERTIN, 1958; BARRINGTON, 1957; KEAST & WEBB, 1966; KEAST, 1970, 1977, 1979; KAPOOR *et al.*, 1975; HYATT, 1979; WEATHERLEY & GILL, 1977).

A relação do comprimento total do intestino com o comprimento total do corpo do peixe, varia entre as diversas espécies e parece estar relacionado aos seus hábitos alimentares. Aquela dos herbívoros é comumente maior do que a dos carnívoros, provavelmente devido a maior parte da digestão dos últimos, ser realizada no estômago, além da digestão de alimentos de origem animal ser mais fácil do que a de alimentos vegetais que incluem as duras paredes celulares (HEPHER, 1990). O comprimento relativo do intestino dos omnívoros pode variar. De acordo com AL-HUSSAINI (1947b) e KAPOOR *et al.*, (1975) esta variação depende da proporção de materiais indigeríveis a digeríveis em sua dieta.

Segundo BERTIN (1958), na relação do comprimento do intestino em relação ao comprimento do corpo, dado pelo coeficiente do comprimento relativo (RLG=relative length gut) nos três grupos varia da seguinte maneira; em carnívoros de 0,2 a 2,5; em omnívoros de 0,6 à 8; e em herbívoros de 0,8 à 15.

A divisão do trato digestivo dos peixes é considerada sob dois aspectos: um embriológico, e outro histofisiológico. Segundo o critério embriológico adotado por BERTIN (1958), considera segmentos sucessivos formados: pela cavidade buco-faríngea ou intestino cefálico ou extracelômico (que começa no orifício bucal e termina ao nível do último par de arcos branquiais); pelo intestino anterior compreendendo o

esôfago e o estômago; este último se presente, vai até os orifícios dos canais hepatopancreáticos ou até a válvula pilórica, (quando existir); pelo intestino médio (cujo limite posterior é determinado em algumas espécies pela presença de uma válvula ou , geralmente, pela inserção de uma glândula retal ou de cecos e pelo intestino posterior (que inclui o reto até o ânus). Os intestinos médio e o posterior, constituem o intestino propriamente dito. Segundo BARRINGTON (1957), o intestino médio e o posterior dos peixes equivalem morfológica e funcionalmente ao intestino dos mamíferos.

Já o critério histofisiológico surgiu devido à ausência de um estômago e a existência ou não de evaginações da parede intestinal ou cecos pilóricos em algumas espécies de peixes.. Este critério foi introduzido inicialmente por GAUTHIER & LANDIS (1972), constatando em peixes sem estômago a existência de um gradiente proximal-distal, correlacionando especializações microscópicas intestinais com diferentes sítios fisiológicos de absorção de lipídios (região proximal) e de proteínas (região distal). NOAILLAC-DEPEYRE & GAS (1973a,b; 1974, 1976) subdividiram histofisiologicamente o intestino propriamente dito em três regiões: segmento proximal (as zonas do intestino que absorvem gorduras), segmento médio (responsável pela pinocitose e digestão intracelular de macromoléculas protéicas) e um segmento posterior (responsável pelo transporte de íons e água).

Dentre as pesquisas relacionadas à histofisiologia do intestino dos peixes, esses segmentos já foram descritos tanto em peixes sem estômago, (NOAILLAC-DEPEYRE & GAS, 1973a, 1973b, 1974, 1976; STROBAND & DABROWSKI, 1979; STROBAND & DEBETS, 1979; STROBAND & VAN DER-VEEN, 1981) quanto com estômago (KAYANJA *et al* , 1975; NOAILLAC-DEPEYRE & GAS, 1979; STROBAND & KROON, 1981; NOAILLAC-DEPEYRE & GAS, 1983).

Recentemente, foram realizados alguns trabalhos a partir de estudos histofisiológicos através da absorção de lipídios e proteínas com peixes nacionais, das espécies *Prochilodus scrofa* e *Pimelodus maculatus*, enfocando aspectos citofisiológicos do epitélio intestinal; ao nível de microscopia fotônica e de microscopia eletrônica (NACHI, 1988; NACHI & HERNANDEZ-BLASQUEZ, 1993; NACHI *et al*, 1993; e HERNANDEZ-BLASQUEZ, 1989).

Histologicamente, a organização geral da parede intestinal dos teleósteos é constituída de 4 túnicas, normalmente encontradas no tubo digestivo dos vertebrados superiores: mucosa, submucosa, muscular e serosa (BLAKE, 1930; SUYENIRO, 1942; AL-HUSSAINI, 1946; WEINREB & BILSTAD, 1955; BARRINGTON, 1957; VEGAS-VELEZ, 1972).

Na túnica mucosa da luz do tubo para a periferia, encontram-se uma mucosa pregueada, revestida por um epitélio simples prismático (ou absorptivo) com numerosas células secretoras de muco, e apoiadas em uma lâmina própria de tecido conjuntivo frouxo bastante vascularizado.

Em estudos histoquímicos, do epitélio intestinal de várias espécies de peixes teleósteos, foram revelados para as células califormes de todo o trato intestinal, uma reação positiva para glicoconjugados neutros, ácidos carboxilados e sulfatados, e sugerindo também a presença de ácido siálico (SANTOS, 1979; CLARKE & WITCOMB, 1980; NACHI, 1988).

A partir de estudos histofisiológicos, nos quais introduziu-se oralmente gordura insaturada no estômago de peixes em jejum, evidenciou-se que as porções mais cefálicas (equivalentes à porção proximal do intestino e dos cecos pilóricos) são as responsáveis pela absorção de lipídios. Uma vez que foram observadas vesículas lipídicas no ápice dos enterócitos dessas regiões (GAUTHIER & LANDIS, 1972; BROUSSY & SERFATY, 1958; IWAI, 1969; IWAI & TANAKA, 1968; BERGOT & FLECHON, 1970 a,b; NOAILLAC-DEPEYRE & GAS, 1974; KIMURA, 1973; BAUERMEISTER *et al.* 1979; NACHI, 1988; HERNANDEZ-BLASQUEZ, 1989)

Na porção média do intestino, as células absorptivas ou enterócitos mostram na região supranuclear não só uma PAS positividade como também demonstram positividade à fosfatase ácida. (GAUTHIER & LANDIS, 1972; NOAILLAC-DEPEYRE & GAS, 1973; NACHI, 1988).

A muscular da mucosa (embora haja variação nas diferentes espécies) é muito fina e de difícil demonstração em peixes (ASHLEY, 1975); quando presente, as fibras musculares lisas se dispõem longitudinalmente ao longo do intestino, formando uma camada situada logo abaixo da lâmina própria (GODINHO *et al.* ; 1970), podendo também ser esparsa e incompleta (SIS *et al.*, 1979). Existem determinadas espécies que não apresentam muscular da mucosa nem submucosa (BLACK, 1930, 1936; BURNSTOCK, 1959; ALVES, 1969; NACHI, 1988). Outras espécies possuem somente a submucosa (CURRY, 1939; AL-HUSSAINI, 1946, 1947a, 1949a, b; GOMES, 1981).

A túnica submucosa constituída também por tecido conjuntivo frouxo, apresenta-se na maioria das vezes pouco definida; gânglios do plexo submucoso também podem ser encontrados nessa camada (BLAKE, 1930, 1936; AL-HUSSAINI, 1946, 1947; AL-HUSSAINI & KHOLY, 1950-53).

A túnica muscular apresenta-se constituída de duas camadas de células musculares lisas: uma circular interna e outra longitudinal externa. Entre as duas camadas musculares estão as células e fibras

nervosas do plexo mioentérico (BLAKE, 1930, 1936; AL-HUSSAINI, 1946, 1947a; NICOL, 1952).

A túnica serosa é constituída por epitélio pavimentoso simples, que se encontra apoiado sobre uma delgada camada de tecido conjuntivo frouxo, apresentando continuidade com o mesentério. Nas regiões em que a serosa possui tecido adiposo, encontram-se ácinos pancreáticos e grandes vasos (AL-HUSSAINI, 1946, 1947a).

Diferentemente dos vertebrados superiores, muitos peixes possuem um número de expansões tubulares em fundo cego, situados em torno do piloro, no início do segmento proximal intestinal, denominadas cecos pilóricos. Peixes que não possuem estômago, também não apresentam cecos pilóricos no tubo intestinal (HEPHER, 1990). Estas estruturas são histologicamente semelhantes ao intestino, sendo portanto formadas por um epitélio colunar simples rico em células secretoras (LAWRENCE, 1950).

Várias funções têm sido sugeridas para os cecos pilóricos, tais como: a de um reservatório alimentar acessório; digestiva suplementar àquelas do estômago e do intestino, de absorção de carboidratos e gorduras, e de reabsorção de água e íons inorgânicos. Esses cecos pilóricos propiciam um aumento da área da superfície intestinal (KAPOOR *et al.*, 1975).

No epitélio intestinal, além dos dois tipos celulares básicos encontrados, os enterócitos e as células caliciformes, existem outros tipos celulares que podem infiltrar-se no epitélio tais como: os linfócitos em maior proporção (BLAKE, 1930; AL-HUSSAINI, 1946; BULLOCK, 1963; ALVES, 1969) e em menor proporção as células granulares denominadas também de células eosinofílicas granulares, ou “leucócitos granulares PAS positivos” ou ainda células granulocíticas especiais - CGE (BLAKE, 1936; AL-HUSSAINI, 1946, 1950-53; GIRGIS, 1952a, b; BARBER & WESTERMAN, 1978; RIBEIRO, 1978; NACHI, 1988).

As CGE possuem como característica peculiar, a presença de grânulos grosseiros acidófilos e PAS positivos que preenchem o citoplasma, às vezes, mascarando o núcleo. Além de sua localização intraepitelial, podem também estar concentradas na lâmina própria, formando, assim, o estrato granuloso em algumas espécies de peixes (BLAKE, 1936; AL-HUSSAINI, 1946; WEINREB & BILSTAD, 1955; SANTOS, 1979). A distribuição das CGE em várias espécies de peixes é bastante ampla podendo também ser encontradas nos rins, baço, fígado e sangue periférico.

Os linfócitos embora sejam mais comuns no espaço intercelular, junto à base das células absorptivas, podem migrar entre essas células até o seu bordo livre. As células granulares por sua vez, são particularmente abundantes na submucosa, podendo, ainda invadir a

parte basal da camada epitelial, sem alcançar a porção apical dos enterócitos (AL-HUSSAINI, 1945, 1946, 1947a, 1949). O formato dessas células em geral é ligeiramente elíptico ou circular, com núcleo de forma irregular (BARBER & WESTERMAN, 1977; RIBEIRO, 1978).

Outro tipo celular, a célula fagocítica intraepitelial (CFI), descrita pela primeira vez no epitélio intestinal de teleósteos por NACHI (1988), consiste em um fagócito encontrado no espaço intersticial do epitélio intestinal, frequentemente na altura do terço superior do epitélio, sendo menos frequente na base. No seu citoplasma vêem-se restos celulares em diferentes fases de digestão, e o material fagocitado assemelha-se à fragmentos da CGE. Devido à deformação do núcleo e do citoplasma, pelo produto fagocitado nos cortes, pode apresentar a forma de uma semi-lua. NACHI, (1988), demonstrou que a CFI aparece em grande quantidade no segmento intestinal médio do curimatá (*Prochilodus scrofa*).

Finalmente, um quarto tipo celular, a célula em bastonete, de ocorrência pouco frequente, compreende células com formato esboçado de pêra ("pear-shaped cell"), que alcança a superfície apical, sendo reconhecíveis por suas inclusões citoplasmáticas e núcleo esferoidal (AL-HUSSAINI, 1949a,b). Segundo MORRISON e ODENSE (1978), muitos autores consideravam-na como um parasita esporozoário, por serem encontradas em uma grande variedade de tecidos e por possuírem uma

cápsula proeminente, distinta, e com vesículas em forma de bastonetes semelhantes a esporozoitos no seu interior, orientadas longitudinalmente ao maior eixo da célula, são denominadas de "rodlet cells". No epitélio orientam - se com a porção basal que contém o núcleo, localizado distalmente em relação ao lúmen intestinal, possuindo função provavelmente secretora (BULLOCK, 1963). Conforme descrito por LEINO (1974), existem evidências que essas células desenvolvem-se de tipos celulares indiferenciados situados próximos à membrana basal epitelial e migram para a luz, para secretar seus conteúdos de uma maneira holócrina na superfície epitelial.

Apesar de existir uma série de publicações concernentes a vários aspectos da histologia, histoquímica e histofisiologia do trato intestinal dos peixes, a aplicação dos conhecimentos de uma espécie para outra é dificultada, devido as extremas variações que ocorrem entre a morfologia do trato digestivo e dos hábitos alimentares.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Material

Para este estudo foram utilizados 20 espécimes de matrinhã (*Brycon cephalus* Günther, 1869, Pisces, Characidae), jovens, de ambos os sexos, com peso total médio aproximado (\bar{W} t) de 387,25 g e comprimento total médio (\bar{L} t) de 30,2cm (Fig. 1), provenientes dos viveiros de criação do Centro de Pesquisa e Treinamento em Aquicultura - CEPTA/IBAMA, Pirassununga, S.P. Os exemplares foram transportados em sacos plásticos contendo O₂, ao Biotério de Animais Heterotermos do Departamento de Histologia e Embriologia da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP).

3.2 Métodos

Os animais foram mantidos em caixas pretas de PVC rígido, com capacidade para 200 litros, munidas de filtro biológico, aerador e termostato automático à temperatura média de 26°C, em jejum durante 5 a 6 dias para garantir a integridade morfológica da mucosa do tubo intestinal.

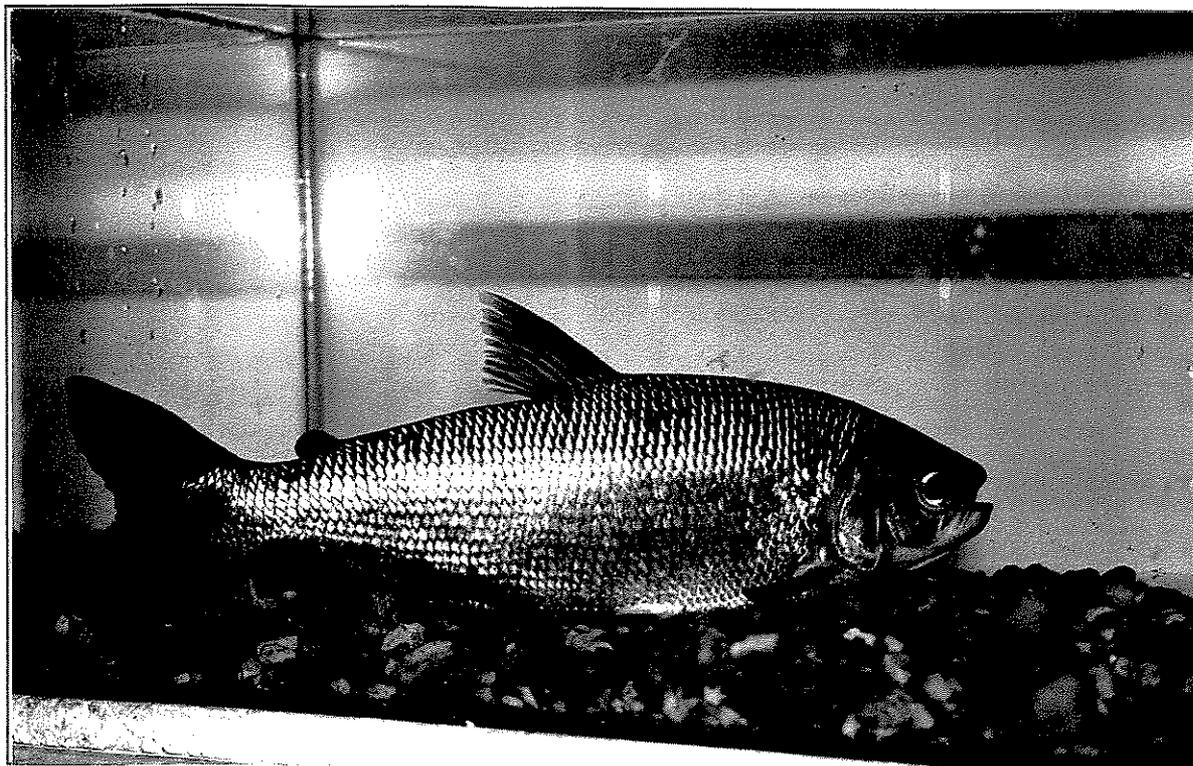


Fig. 1 - Exemplar jovem de Matrinchá, *Brycon cephalus* Günther, 1869 (Pisces, Characidae).

Wt (g) 387,25 - Lt (cm) 30,2.

O sacrifício dos exemplares foi realizado por decapitação, com a retirada do tubo digestivo através de incisão longitudinal da parede ventral do abdomen e imediata dissecação e retirada do tubo digestivo.

3.2.1 Processamento dos tecidos para Histologia e Histoquímica

Para a análise da organização histológica foram utilizados 5 exemplares. As amostras foram obtidas da porção mediana de 5 segmentos intestinais, divididos igualmente, desde o piloro até o ânus, e

também dos cecos pilóricos. Essas amostras foram mergulhadas no Líquido de Bouin, durante 24 horas. Após a desidratação e diafanização, as peças foram embebidas em parafina (histosec) e, em seguida os blocos foram aparados e levados ao micrótomo rotativo da Americal Optical C°, para a obtenção de cortes com 5-7 micrômetros de espessura.

Após a desparafinização, a coloração teste padrão foi a da Hematoxilina-Eosina (Lillie, 1954) e quando as estruturas apresentaram características favoráveis a outros estudos, os blocos foram submetidos às demais técnicas de coloração discriminadas a seguir:

a) Para evidenciar aspectos morfológicos gerais:

- Método do Tricômico de Masson (BEÇAK & PAULETE, 1976)
- Método do Tricômico de Gomori (LUNA, 1968)

b) Reações histoquímicas para glicoconjugados:

b.1) Para evidenciar a presença do grupo vic glicol (CHOH-CHOH) e afins:

- Ácido periódico de Schiff (PAS) (LISON, 1960)
- Bloqueio pela acetilação, segundo McMANUS & CASON (1950), seguida do PAS

- Acetilação e saponificação (LISON, 1960), seguida do PAS
- PAS-amilase salivar segundo LISON (1960)

b.2) Para evidenciar a presença de grupos ácidos (éster sulfúrico e carboxila);

- Alcian blue em pH 2,5, segundo LISON (1960).

b.3) Reações para a distinção entre os grupos ácidos (carboxila e éster sulfúrico):

- Alcian blue a 1% em ácido acético a 3%, dando pH 2,5 final, segundo LISON (1960), e Alcian blue a 1% em HCl 1N, dando pH 0,5 final conforme LEV & SPICER (1964).

- Bloqueio pela metilação, segundo LISON (1960), seguido de Alcian blue a 1% em ácido acético a 3%, dando pH final 2,5.

- Metilação + saponificação (LISON, 1960), seguida de Alcian blue em pH 2,5.

b.4) Reação combinada para evidenciação conjunta de glicoconjugados ácidos e neutros:

- Alcian blue em pH 2,5, seguido do PAS, segundo VIALLI, como descrito por LISON (1960).

b.5) Para evidenciar a presença do ácido siálico:

- Alcian blue em pH 2,5, após hidrólise ácida, segundo QUINTARELLI *et al* (1961).

c) Estratégia para a identificação dos segmentos que absorvem gorduras:

Seguindo-se a metodologia utilizada por NACHI (1988) e HERNANDEZ -BLASQUEZ (1989) com algumas modificações, introduziu-se nos animais em jejum, 1ml de óleo de milho no estômago, por meio de uma sonda de PVC atóxico n.º 10, acoplada à uma seringa hipodérmica de 5 ml.

Para a detecção de lipídios, foram utilizados 12 espécimes de *Brycon cephalus* divididos em 4 grupos de 3 animais, cada um. Ao grupo controle, constituído de 3 animais, não foi fornecido óleo. Os demais grupos foram sacrificados em tempos correspondentes a 3, 6, e 9 horas após a ingestão de óleo. Observações prévias foram realizadas sob microscópio estereoscópico, da luz intestinal visando obter-se uma idéia do tempo de trânsito gastrointestinal, usando-se para isso 1ml de uma suspensão de óleo de milho com carvão ativado a 1%, como marcador.

Foram obtidas amostras da porção mediana de 5 segmentos intestinais, conforme previamente descrito.

Os fragmentos obtidos dos grupos com diferentes tempos de ingestão de óleo, foram processados adotando-se 4 procedimentos:

1) Procedimento I:

- Fixação dos fragmentos (2 a 3mm de espessura) por 24 horas em uma solução gelada de paraformaldeído a 4% em cloreto de cálcio a 1%(formol - cálcio de Baker, com exceção da adição do cloreto de cádmio a 1%, BANCROFT & STEVENS, 1982).

- Lavagem das peças 3 vezes em água destilada (em banho de gelo) por 5 minutos cada banho.

- Pós-fixação em OsO_4 1% durante 3 horas em banho de gelo.

- Lavagem em água destilada 3 vezes em banho de gelo

- Embebição com a resina glicol metacrilato Technovit 7.100 (historesina) lentamente em banho de gelo, nas proporções e tempos discriminados abaixo:

- 30% de resina + 70% de água destilada por 12 horas
- 50% de resina + 50% de água destilada por 24 horas
- 70% de resina + 30% de água destilada por 24 horas
- resina pura por 24 horas

- A polimerização (inclusão) foi realizada em cápsulas contendo resina pura (15ml), acrescida de endurecedor ou Harter II (1 ml), em uma cuba contendo pedras de gelo, uma vez que se trata de reação rápida e exotérmica.

- os cortes de 2,0 a 4,0 μm de espessura foram cortados em um ultramicrotomo PORTER-BLUM da SORVALL INC. e corados a quente com azul de toluidina a 0,25%.

2) Procedimento II

Semelhante ao Procedimento I, com exclusão da pós-fixação pelo OsO_4 .

OBS: A coloração de fundo utilizada para os procedimentos I e II, foi a do Azul de Toluidina a 0,25%.

3) Procedimento III

A fixação das peças foi feita em solução de Formol-Cálcio por 24 horas gelado, e os cortes obtidos em micrótomo de congelação, com a espessura aproximada de $10\mu\text{m}$, foram corados pela Técnica do Sudan Black B (Merck) para evidenciação de lipídios.

d) Detecção de Atividade da Fosfatase Ácida.

Para a demonstração histoquímica da fosfatase ácida, foram utilizados fragmentos intestinais obtidos do grupo controle, os quais foram preparados de duas maneiras diferentes de fixação, para preservação dos fragmentos: uma utilizando-se paraformaldeído a 4% com tampão fosfato em banho de gelo, e outra, mergulhando-se os fragmentos em N-hexano previamente resfriado à temperatura do nitrogênio líquido durante 2 minutos. Ambos fragmentos foram fixados em

suportes metálicos, utilizando como adesivo o "TISSUE-TEK - OCT-COMPOUND, Miles Inc. Diagnostics Division USA" cortados em criótomo, à temperatura de -20°C, obtendo cortes de 10 µm, os quais foram aderidos em lâminas previamente limpas e gelatinizadas. Após a secagem dos cortes, procedeu-se então a reação histoquímica para a demonstração da atividade da enzima fosfatase ácida pelo método de GOMORI(1950). O meio de incubação utilizado (10 ml de tampão acetato de sódio 0,05M a PH 5,0 + 20 mg de nitrato de chumbo + 32 mg de βglicerofosfato de sódio), atuou sobre os cortes durante 90 minutos à temperatura de 37°C na estufa.

DOCUMENTAÇÃO FOTOGRÁFICA

Os preparados histológicos selecionados foram fotomicrografados no Fotomicroscópio Carl-Zeiss/Jena, modelo JENALUMAR.

4. RESULTADOS

4.1 Análise Macroscópica

Examinando "in situ", o trato digestivo do *Brycon cephalus* está localizado na parte central inferior da cavidade do corpo. Pode-se perceber uma quantidade moderada de gordura envolvendo o referido trato, o que de certa forma dificulta a visualização das particularidades anatômicas do intestino (Fig. 2).

Após a remoção do tubo digestivo, da cavidade do corpo, e retirada parcial da gordura mesentérica, nota-se a disposição em circunvoluções do segmento intestinal. Seguindo-se à remoção do restante do tecido adiposo, além da melhor exposição, os parâmetros anatômicos puderam ser avaliados (Fig. 3).

O esôfago curto e largo é seguido pelo estômago curvado, que é do tipo intermediário, entre o sifonal e o cecal,. (BERTIN, 1958). Existe um tufo de expansões digitiformes, os cecos pilóricos, que desembocam no intestino logo após o piloro, demarcando o começo do intestino.

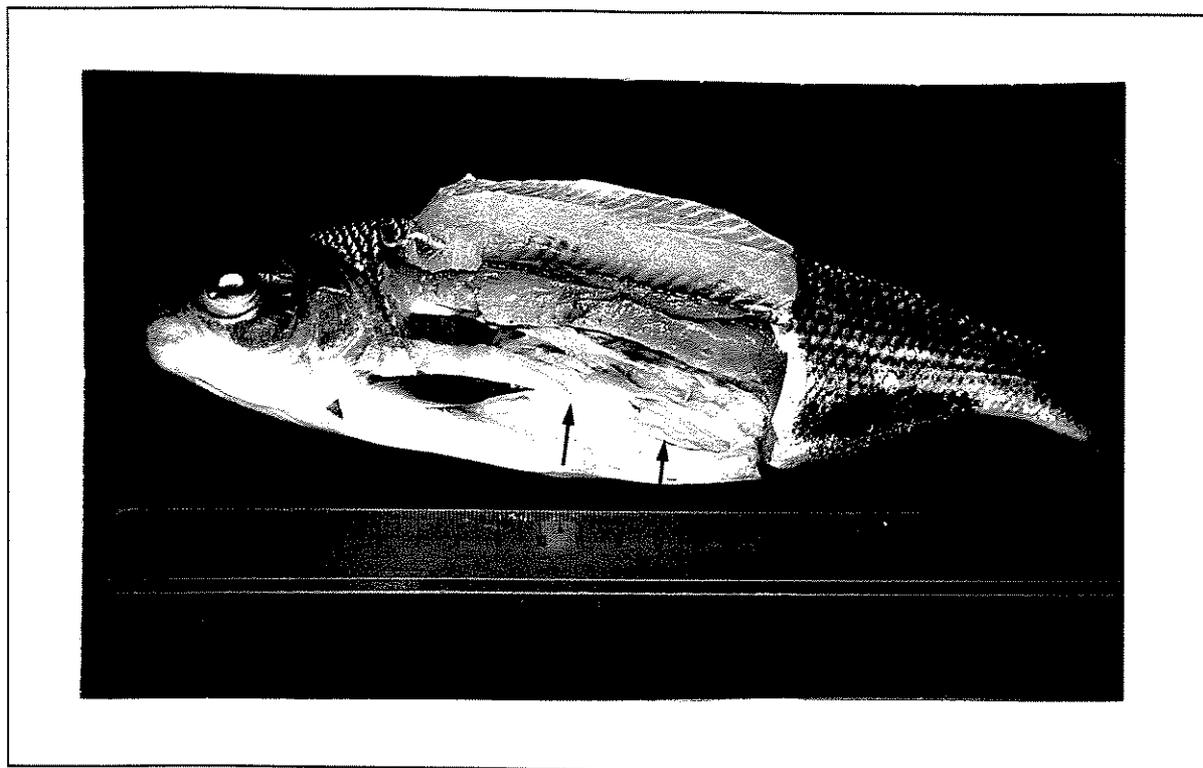


Fig. 2 - Tubo digestivo de *Brycon cephalus* localizado na cavidade do corpo, onde o intestino (→) encontra-se encoberto por gordura.



Fig. 3 - Tubo digestivo de matrinhã removido da cavidade do corpo e dissecado, mostrando as 5 subdivisões em partes iguais, adotadas para este estudo, indo desde os cecos pilóricos (*) até o ânus (→).

Inicialmente, o intestino estira-se para trás acompanhando o comprimento do estômago no sentido caudal e retorna para frente novamente (sentido cranial) formando uma curvatura em alça relativamente curta, e retornando no sentido caudal seguindo um trajeto praticamente linear como um tubo reto até o ânus.

O comprimento total do intestino é relativamente pequeno, representando de 3,0 à 6,0 cm a menos em relação ao comprimento total (Lt) do corpo do peixe. A média dos valores dos índices, do comprimento do intestino em relação ao comprimento total do corpo do peixe (coeficiente de comprimento relativo intestinal = RLG) encontrada para o matrinchã, está mostrada na Tabela I,

4.2 Análise Microscópica

4.2.1 - Estrutura geral do intestino de *Brycon cephalus*

A constituição histológica da parede do intestino de matrinchã, mostrou 4 túnicas: mucosa, submucosa, muscular e serosa (Figs. 4 e 5).

- Túnica mucosa - A mucosa se projeta em direção à luz do intestino, formando pregas primárias circulares dispostas transversalmente ao longo do comprimento intestinal, semelhantes às vilosidades intestinais dos mamíferos e, principalmente, nos primeiros segmentos, encontram-se também pregas secundárias ou ramificações. (Fig. 4)

- Tabela I - Medidas de peso total (Wt), comprimento total do corpo (Lt) e comprimento do intestino (Lint.), dos exemplares de matrinhãs *Brycon cephalus*, utilizados neste estudo, com os respectivos coeficientes de comprimento relativo do intestino ($RLG = Lint/Lt$).

Nº do Peixe	Peso Total Wt (g)	Comprimento total Lt (cm)	Comprimento total do intestino Lint (cm)	Coefficiente de comprimento relativo ao intestino (RLG)
01	460	30,5	27,0	0,88
02	340	29,0	24,0	0,83
03	300	28,5	25,0	0,88
04	360	30,0	27,0	0,90
05	400	31,0	25,0	0,80
06	270	28,0	23,0	0,82
07	360	30,5	25,5	0,83
08	350	29,0	25,5	0,88
09	420	32,5	26,5	0,81
10	390	31,5	27,0	0,85
11	380	29,5	24,0	0,81
12	385	30,0	26,5	0,88
13	450	29,0	25,0	0,86
14	430	30,0	25,5	0,85
15	270	28,5	25,0	0,87
16	450	32,0	26,0	0,81
17	510	33,0	27,0	0,82
18	500	31,5	27,0	0,85
19	270	28,5	25,0	0,87
20	450	31,0	26,0	0,84
Média	387, 25	30,2	24,35	0,84

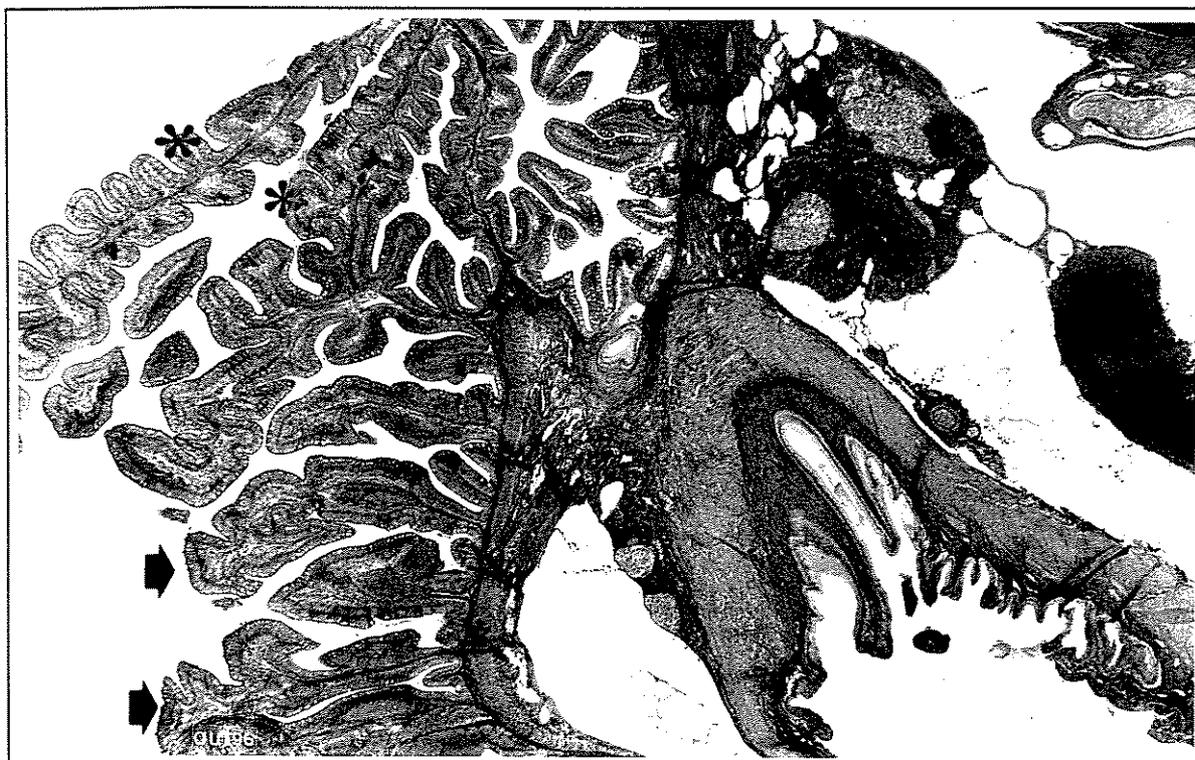


Fig.4 - Aspecto panorâmico da região inicial do intestino de matrinhã. Mucosa bastante irregular com pregas primárias (→) e secundárias (*) Fixador: Bouin; Coloração: Tricrômio de Masson; Aumento: 41 X

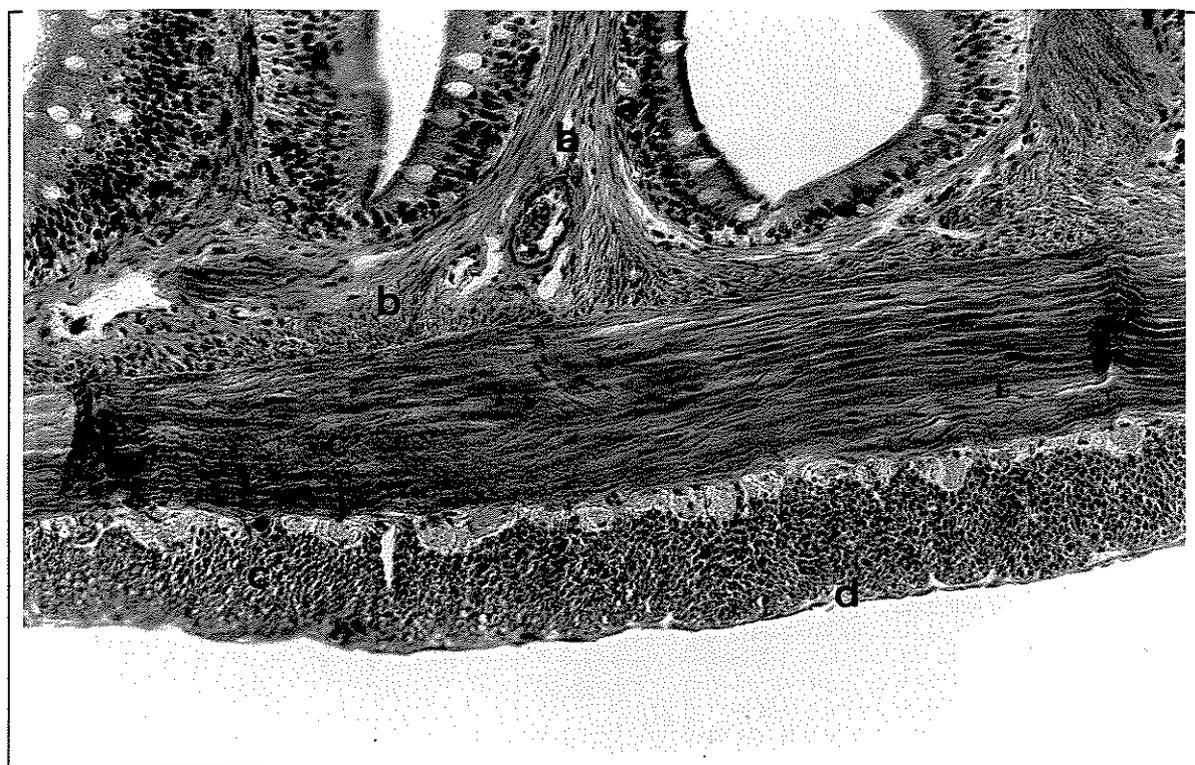


Fig. 5 - Intestino. Terceiro segmento. Constituição histológica da parede intestinal de matrinhã: (a) mucosa; (b) submucosa; (c) muscular; (d) serosa. Fixador: Bouin; Coloração: Tricrômio de Gomori; Aumento: 320 x

A lâmina própria ou cório, localizada abaixo do epitélio de revestimento, é delgada e formada por tecido conjuntivo frouxo apresentando vasos sanguíneos e linfáticos, e fibras musculares lisas provenientes da muscular da mucosa e variados tipos celulares, como leucócitos e CGE. No 5º segmento intestinal, a lâmina própria é mais ricamente vascularizada. A muscular da mucosa, possivelmente tem trajeto circular helicoidal, devido ao arranjo variado das fibras musculares lisas que seguem várias direções num mesmo plano de corte, apresentando-se esparsa e descontínua.

- Túnica submucosa - é constituída de tecido conjuntivo frouxo e vasos sanguíneos, apresentando-se mais proeminente e vascularizada, no último segmento intestinal
- Túnica muscular - é formada de duas camadas de fibras musculares lisas: uma interna circular e outra externa longitudinal, que torna-se mais espessa em sentido anal formando curvaturas semelhantes ao epíploon , juntamente com a serosa.
- Túnica serosa - é encontrada acompanhando todo o intestino, sendo constituída por epitélio pavimentoso simples, o qual se apoia sobre uma delgada camada de tecido conjuntivo frouxo, apresentando continuidade com o mesentério.

4.2.2 - Resultados obtidos com os tipos celulares presentes no tecido epitelial de revestimento dos 5 segmentos intestinais, e dos cecos pilóricos:

Em todo o comprimento do epitélio intestinal assim como o dos cecos pilóricos, possuem basicamente dois tipos celulares: as células caliciformes e os enterócitos ou células absorptivas (Fig. 6).

As células caliciformes possuem granulação cuja cor magenta obtida pela reação do PAS revela que o conteúdo dos grânulos dessas células possui glicoconjugados neutros dotados de radicais glicólicos vicinais (Fig. 7). Além disso, a metacromasia dada pelo uso do Azul de Toluidina (Fig. 8), é indicativa também da presença de radicais sulfato nesse glicoconjugado, fato esse confirmado pela coloração azulada das células caliciformes quando se utiliza o Azul de Alcian, pH 0,5 (Fig.9). O emprego deste mesmo corante em pH 2,5 retrata além da presença do radical SO_4^{--} , radicais carboxila (Fig. 10). As contraprovas realizadas através da acetilação e/ou metilação + reagente, acetilação e/ou metilação + saponificação + reagente, confirmaram que trata-se de um glicoconjugado que contém carboidrato neutro e ácido.

Quando se emprega uma hidrólise ácida, seguida do azul de Alcian, pH 2,5, a diminuição da positividade obtida, como observada no nosso material, sugere a presença de ácido siálico no conteúdo granular.

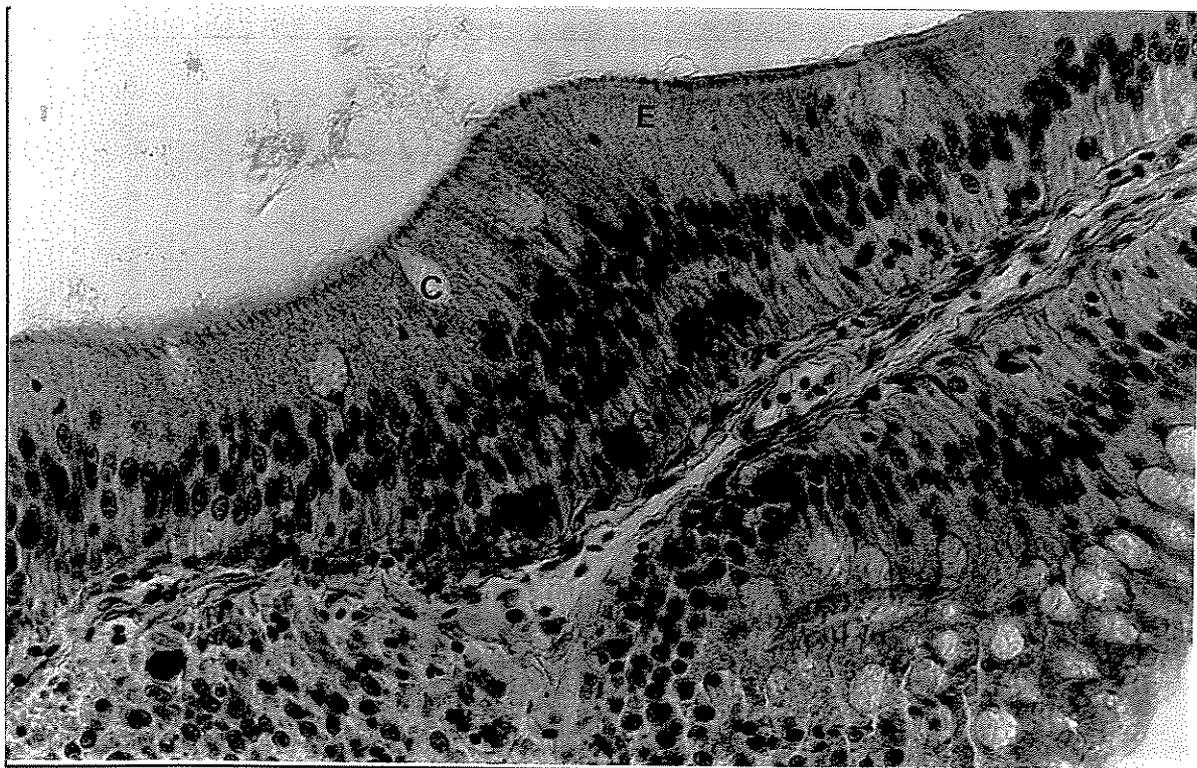


Fig. 6 - Intestino. Terceiro segmento. Mucosa intestinal de matrinhã destacando os tipos celulares básicos: (E) enterócitos; e, (C) células caliciformes. Aparecem algumas células granulocíticas especiais (G). Fixador: Bouin; Coloração: Tricrômico de Gomori; Aumento: 640 x

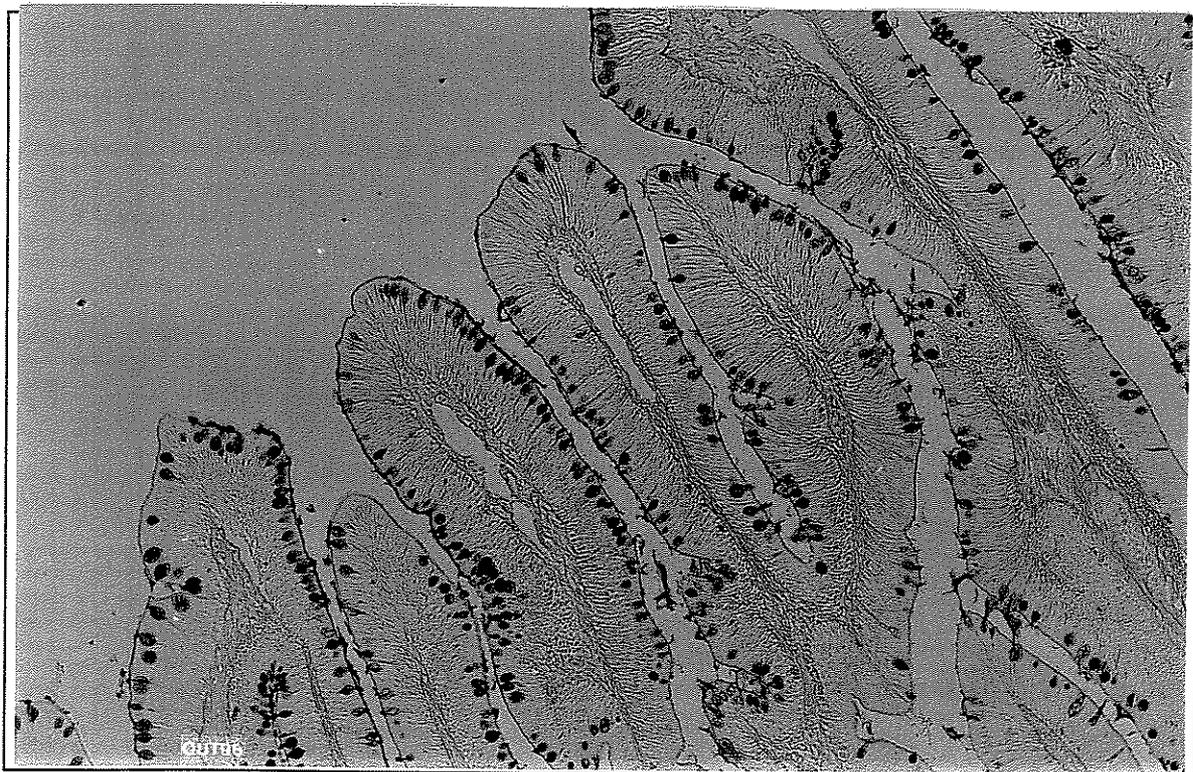


Fig.7 - Intestino. Primeiro segmento Pregas intestinais de matrinhã. Células caliciformes PAS positivas. Fixador: Bouin; reação do PAS; Aumento: 80 x



Fig. 8 - Intestino. Quarto segmento. Pós fixação com OsO_4 e embebição em glicol metacrilato. Notar as células caliciformes evidenciadas metacromaticamente (*) e a muscular da mucosa esparsa e descontínua (→). Coloração: Azul de toluidina
Aumento: 320x

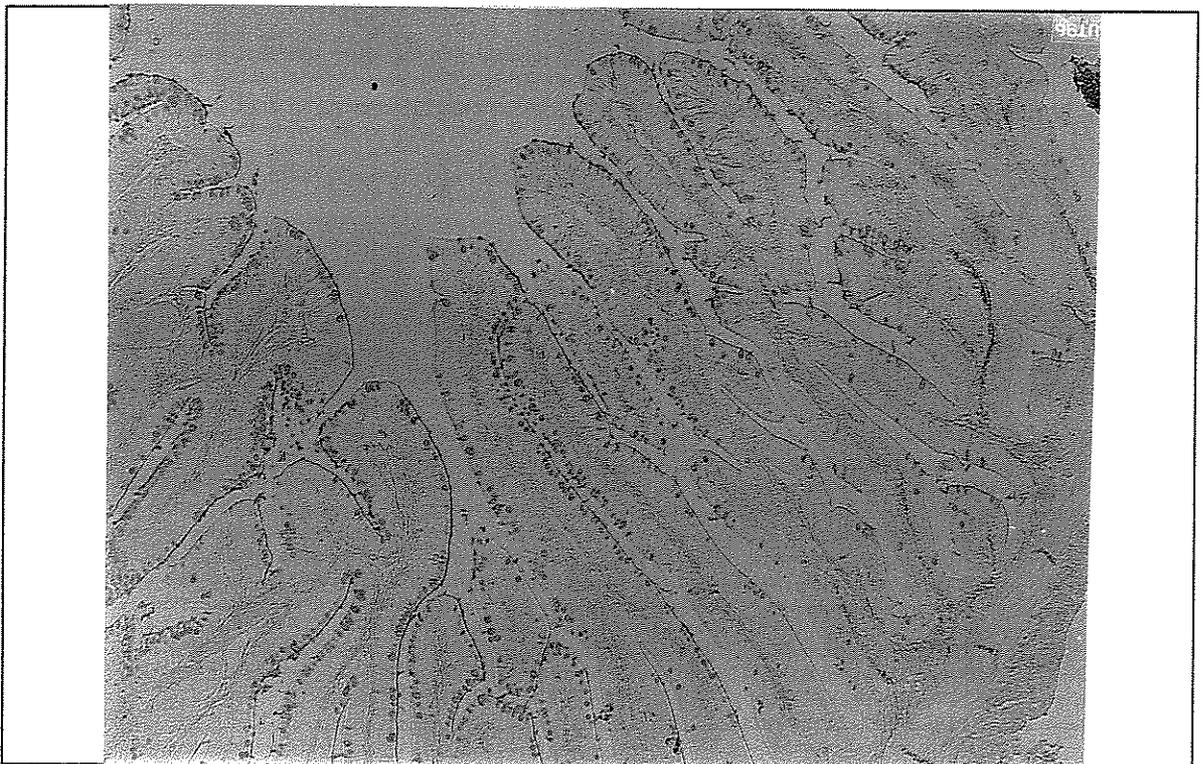


Fig. 9 - Intestino. Primeiro segmento Células caliciformes positivas à reação para radicais sulfatados. Azul de Alcian, pH 0,5; Aumento: 81 X

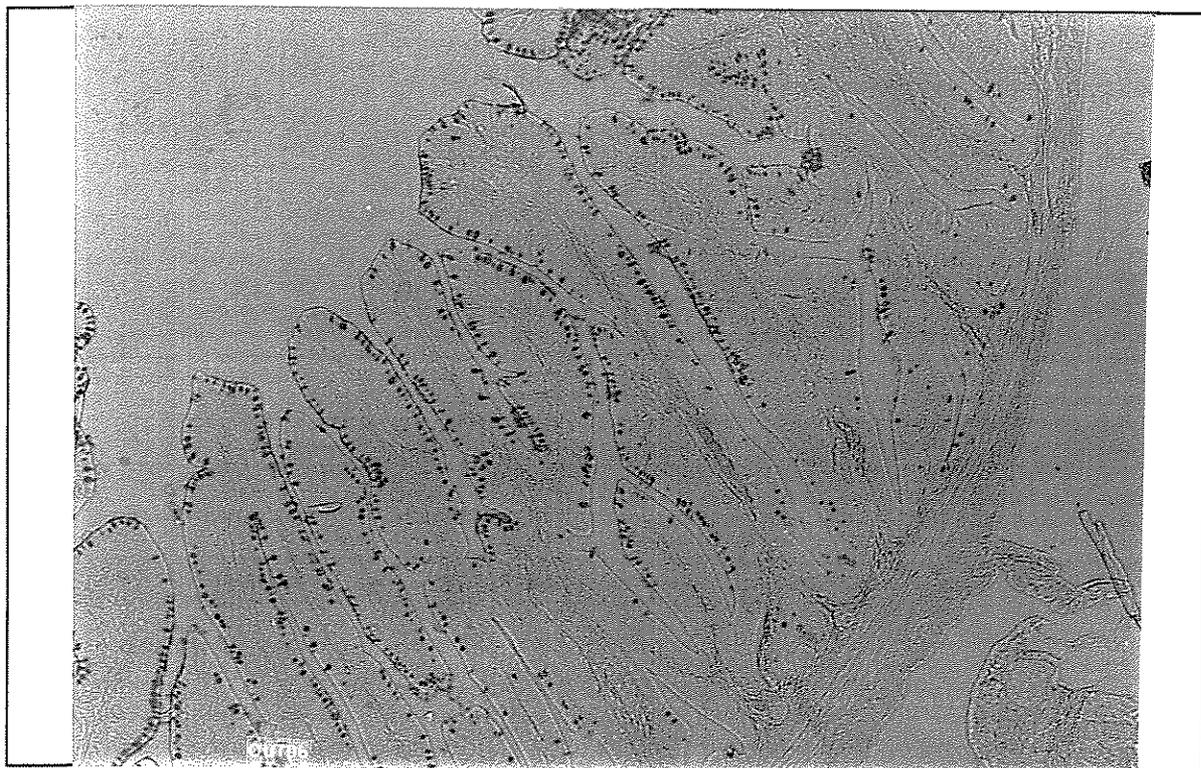


Fig. 10 - Intestino. Primeiro segmento. Positividade das células caliciformes à reação para radicais sulfatados e carboxilados. Azul de Alcian, pH 2,5; Aumento: 81 X

O comportamento das células caliciformes e dos enterócitos, frente aos testes histoquímicos para glicoconjugados, está sumariado na Tabela II.

Tabela II - Sumário de reações histoquímicas mostrando constituintes glicoconjugados no epitélio intestinal de *Brycon cephalus*

Reações (Autores)	Funções e/ou componentes demonstrados	Segmentos 1º, 2º, 3º			Segmento 4º			Segmento 5º			Cecos Pilóricos		
		E	C	CGE	E	C	CGE	E	C	CGE	E	C	CGE
Reação de Schiff (1865)	Aldeídos livres	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Ácido Periódico de Schiff (PAS) (Lison, 1960)	Glicogênio, mucosubstância neutra e/ou glicoproteínas	0	4M	2M	2M	4M	2M	0	4M	2M	0	4M	2M
Amilase + PAS (Lison, 1960)	Glicogênio	0	4M	2M	2M	4M	2M	0	4M	2M	0	4M	2M
Acetilação + PAS (McManus & Cason, 1950)	Bloqueio dos grupamentos vic-glicólicos	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Acetilação+saponificação+PAS (Lison, 1960)	Reativação dos grupos vic-glicólicos	0	4M	2M	2M	4M	2M	0	4M	2M	0	4M	2M
Alcian Blue (AB) (pH 2,5) (Lison, 1960)	Glicoconjugados ricos em carboxila (sulfatados ou não)	0	4A	0	0	4A	0	0	4A	0	0	4A	0
Alcian Blue (AB) (pH 0,5) (Lev & Spicer, 1964)	Glicoconjugados ácidos sulfatados	0	2A	0	0	2A	0	0	2A	0	0	2A	0
Metilação + AB (pH2,5) (Lison, 1960)	Bloqueio dos grupos carboxila	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Metilação+saponificação +AB(pH2,5) (Lison, 1960)	Reativação dos grupos carboxila	0	4A	0	0	4A	0	0	4A	0	0	4A	0
Hidrólise ácida + AB (pH 2,5) (Quintarelli et al., 1961)	Ácido siálico	0	2A	0	0	2A	0	0	2A	0	0	2A	0

. Grau de coloração: 4, intensa; 3, marcante; 2, moderada; 1, fraca; 0, negativa; -, ausente

. Abreviações de cor: A, azul; M, magenta

. Abreviações das células: E, enterócito ou célula absorviva; C, célula caliciforme; CGE, célula granulocítica especial

Com relação à distribuição deste tipo celular pode-se dizer que a mesma está presente em todos os segmentos intestinais demarcados, atingindo maior concentração na sua porção final, à semelhança do que acontece nos mamíferos.

Os enterócitos ou células absorptivas são prismáticas com uma borda estriada na região apical, representando o conjunto de microvilosidades na microscopia eletrônica de transmissão, além de um núcleo elíptico em posição sub-central ou basal. (Fig 6). Seu citoplasma homogêneo em quase todos os segmentos intestinais, pode apresentar diferentes tonalidades de coloração dependendo do tipo de técnica utilizada e da região intestinal estudada.

Através da utilização de coloração com o tricômico de Masson os enterócitos do quarto segmento intestinal revelam ainda a presença de vacúolos em posição supranuclear. Esses vacúolos são formações de diâmetros variados chamando a atenção a presença de um material mais denso e basófilo no centro desses vacúolos. (Fig. 11)

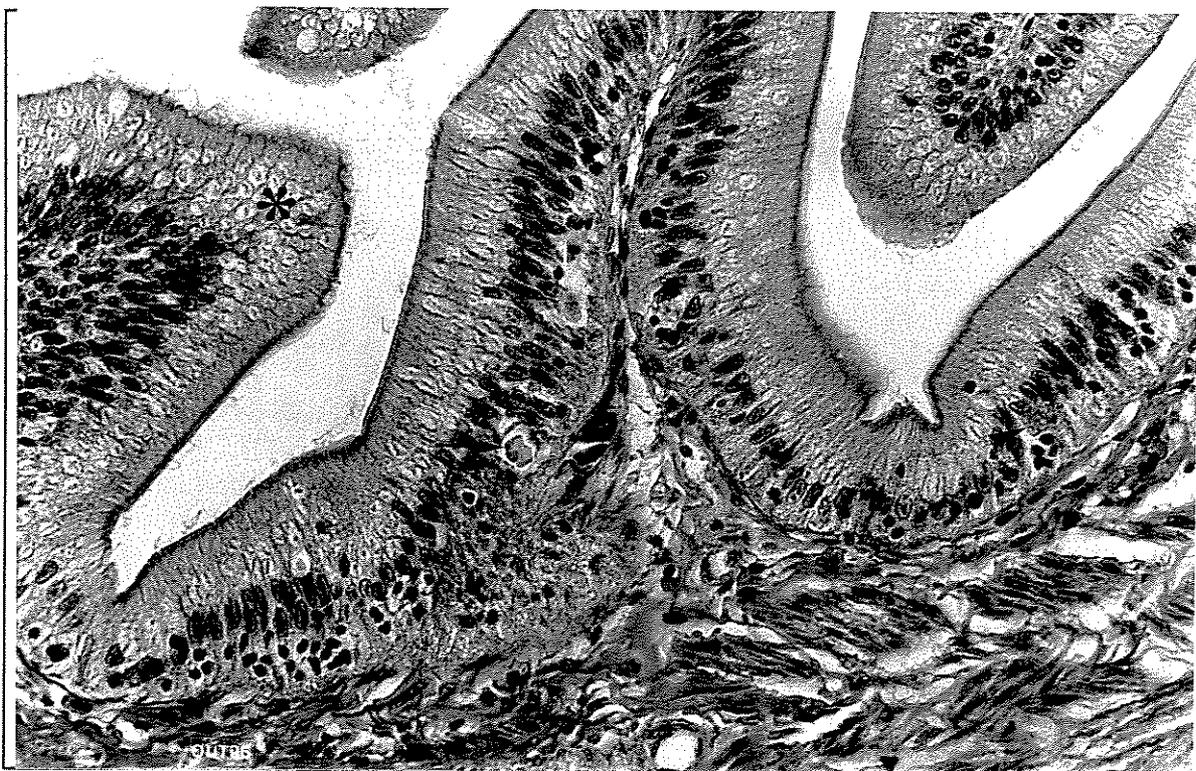


Fig. 11 - Mucosa intestinal (altura do 4º segmento) com os enterócitos exibindo na porção supranuclear vacúolos de diferentes tamanhos, com seu centro basófilo (*) Nota-se ainda uma célula fagocítica intraepitelial (→) e uma célula granulocítica especial (>). Fixador: Bouin; Coloração: Tricrômio de Masson; Aumento: 640 x

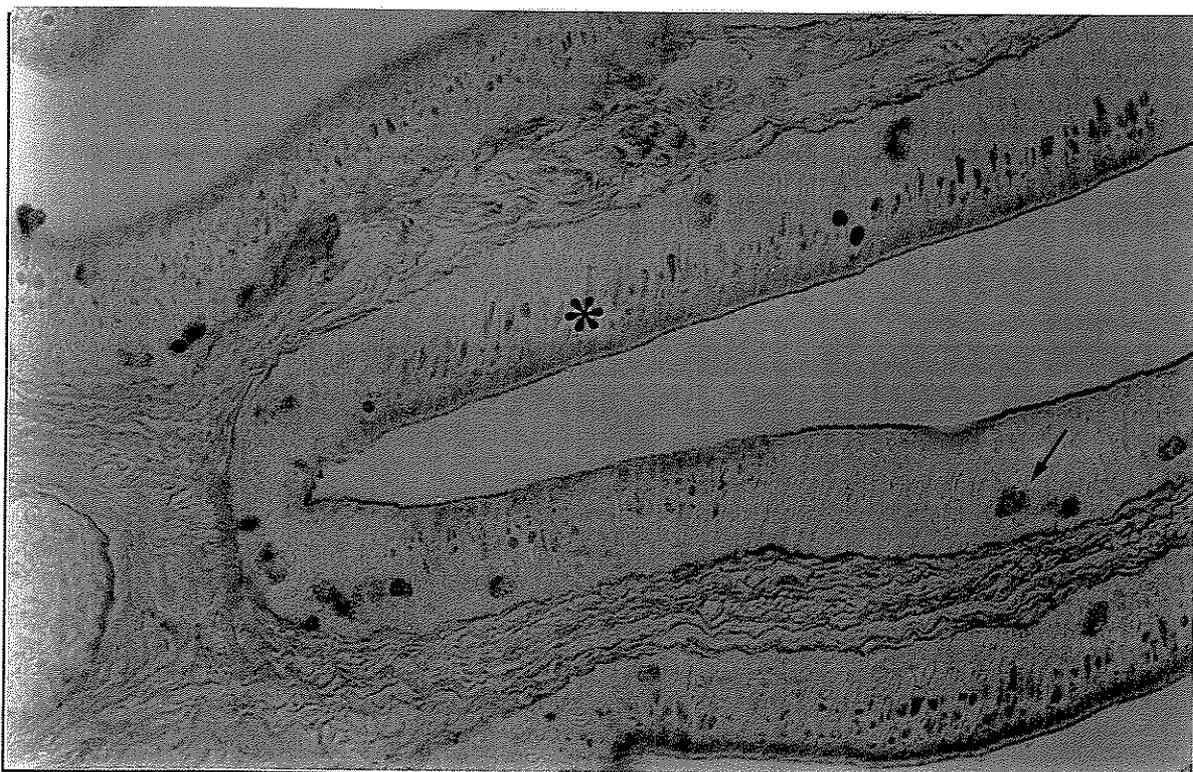


Fig. 12- Mucosa intestinal (altura do 4º segmento) exibindo vacúolos PAS + em posição supranuclear (*) e células granulocíticas especiais (→). Fixador: Bouin; Reação do PAS; Aumento: 640 x

As reações histoquímicas e contraprovas para gliconjugados neutros nos enterócitos, assim como para a presença de radicais SO_4^- e COOH são negativas, exceto no quarto segmento, onde se nota uma reação positiva para gliconjugados neutros com confirmação pelas contraprovas, nos vacúolos presentes na região supranuclear (Fig. 12 e Tabela II).

É de se destacar, que a positividade ao PAS está restrita a uma região apical dos enterócitos respeitando a área celular submembranosa (zona estreita somente vista em grande aumento, localizada logo abaixo da membrana celular) que é negativa, e a uma parte dos vacúolos citados anteriormente. Além disso, a positividade de alguns vacúolos é diferente daquela das células caliciformes. (Figs. 12 e 13).

A positividade para atividade de fosfatase ácida ocorre em todos os segmentos intestinais e cecos pilóricos, sendo mais pronunciada na borda livre e no citoplasma apical dos enterócitos. Nas células caliciformes a reação para a fosfatase ácida foi negativa. No entanto, na túnica muscular, entre as camadas circular interna e longitudinal externa, no endotélio de alguns vasos sanguíneos e nas células fagocíticas intraepiteliais, também houve reatividade. Entretanto, ao nível dos cecos pilóricos e do quarto segmento intestinal (Fig. 14), observa-se uma reação mais intensa, devido a um acúmulo de grânulos na região apical dos enterócitos encontrados nesses locais.

Nos cortes do material intestinal pós fixados pelo OsO_4 e embebidos em glicol metacrilato os vacúolos da região supranuclear dos enterócitos do quarto segmento, apresentam-se como granulações grosseiras coradas fortemente pelo Azul de Toluidina, a 0,25% não apresentando metacromasia. (Fig. 15).

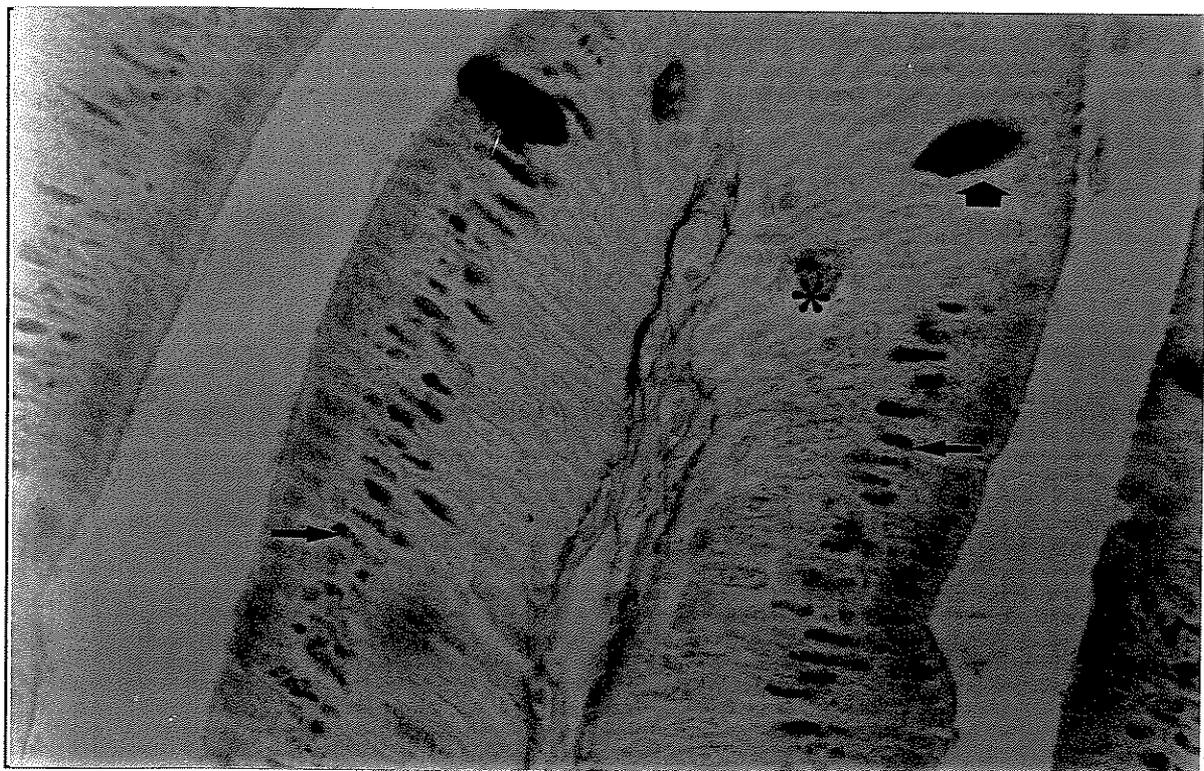


Fig. 13 - Intestino. Quarto segmento. Vacúolos PAS + em posição supranuclear dos enterócitos (→); célula caliciforme (↑) e células granulocíticas especiais (*). Fixador: Bouin; Reação do PAS; Aumento: 1.280 x

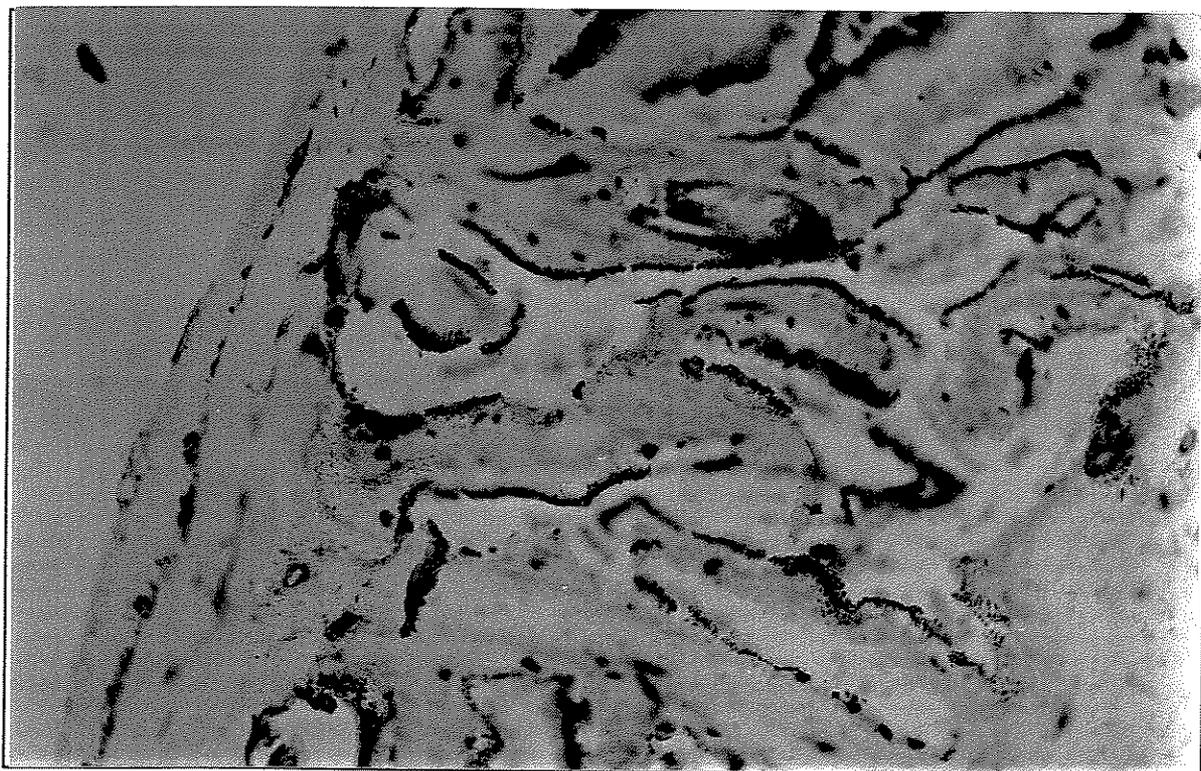


Fig. 14 - Atividade fosfatásica ácida + do quarto segmento. Mais forte (castanho escuro) no citoplasma apical dos enterócitos. método de Gomori ; Aumento: 640 x

Sem a pós-fixação pelo ósmio, essas granulações apresentaram-se como grandes vacúolos fundidos de tonalidade azul clara (após a coloração pelo Azul de Toluidina a 0,25%). (Fig. 16)

O tempo necessário para que o óleo de milho percorresse todo o trato intestinal, nas condições propostas, foi de 9 horas após a introdução oral de uma solução de carvão ativado a 1% (marcador) em óleo de milho.

A análise microscópica dos preparados intestinais, após técnicas histológicas e histoquímicas para detecção de lipídios, revelou gotículas lipídicas de tamanhos variáveis no citoplasma apical dos enterócitos dos três primeiros segmentos intestinais, e dos cecos pilóricos, (Fig. 17 e 18). e que vão decrescendo em quantidade até o 3º segmento, deixando de existir no 4º e 5º segmentos (Figs19 e 23)..

A maior quantidade de lipídios foi evidenciada nos cecos pilóricos. Após a fixação pelo OsO₄ e embebição em glicol metacrilato, e através de cortes obtidos em micrótomo de congelação, e coloração pelo Sudan Black B, os resultados em relação à presença de gotículas lipídicas nos segmentos intestinais, foram semelhantes:



Fig. 15 - Intestino. Quarto segmento.. Pós-fixação em OsO₄. Embebição em glicol metacrilato. Notar que na região supranuclear dos enterócitos (→), as vesículas são contrastadas com coloração azul intensa (diferente dos três primeiros segmentos e dos cecos pilóricos, nos quais os enterócitos apresentam vesículas apicais enegrecidas pelo ósmio). Coloração: Azul de Toluidina; Aumento: 640 x.

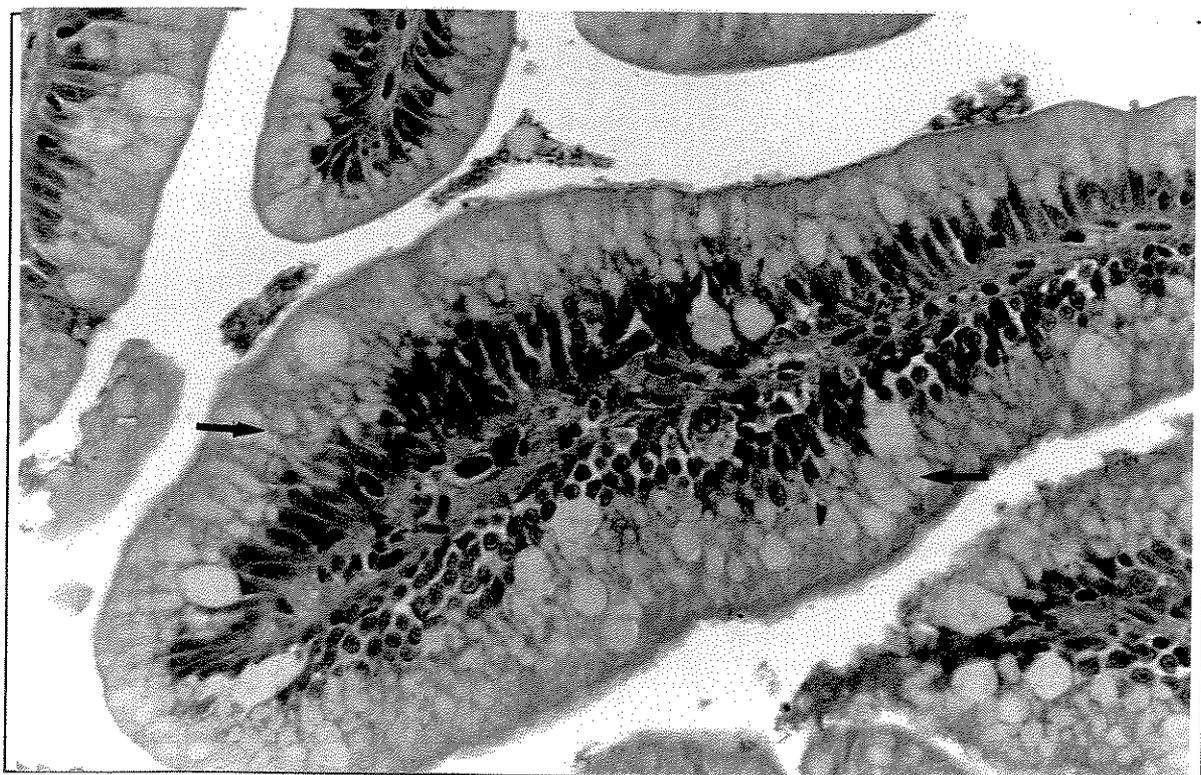


Fig. 16 - Intestino. Quarto segmento. Ausência de pós-fixação em OsO₄. Embebição em glicol metacrilato - Observar que granulações grosseiras presentes na região supranuclear dos enterócitos, se unem formando grandes vacúolos fundidos, de tonalidade azul clara (→). Azul de Toluidina. Aumento: 640 x.

Dentre os tipos celulares intraepiteliais presentes em todo epitélio intestinal, foram também evidenciadas as células granulocíticas especiais (CGE), semelhantes aos mastócitos dos mamíferos; as células fagocíticas intraepiteliais (CFI) às vezes em formato de semi-lua; as esparsas células em bastonetes (Rodlet cells) e os linfócitos. (Figs. 11, 13, 20 e 23)

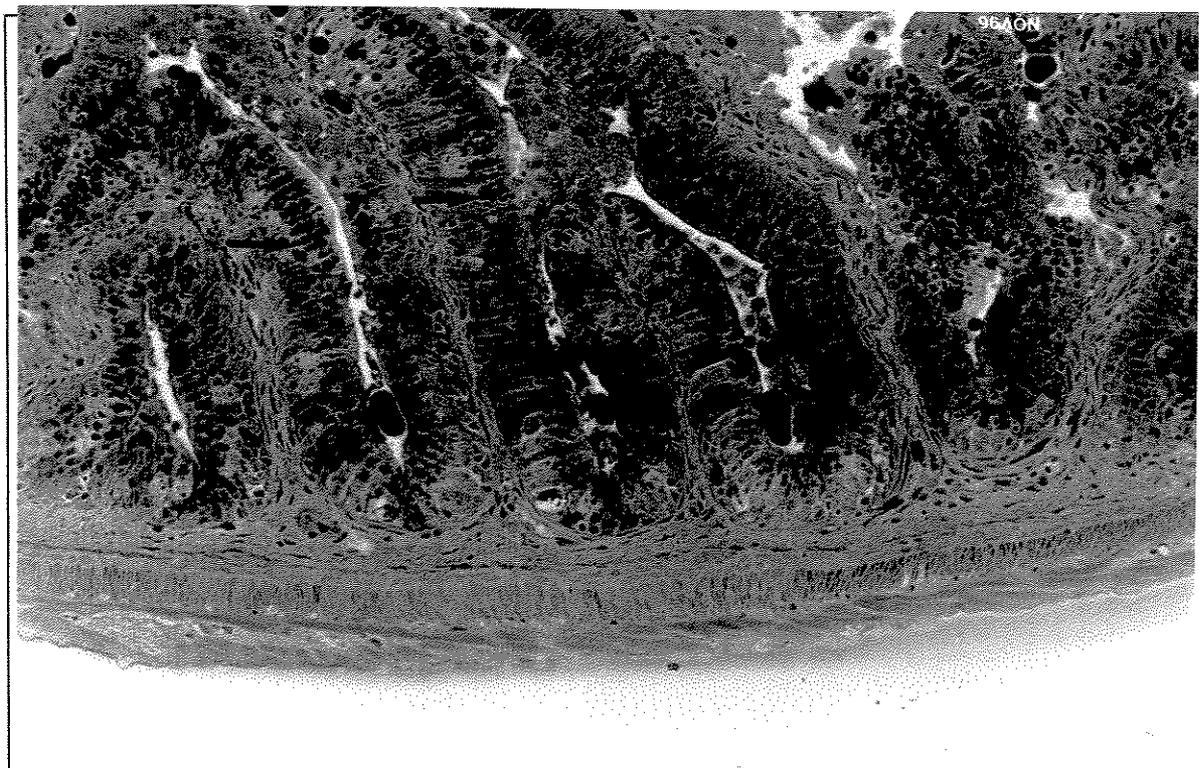


Fig. 17 -Cecos pilóricos.Pós-fixação em OsO_4 . Embebição em glicol metacrilato. Notar as gotículas lipídicas nos ápices dos enterócitos, evidenciadas em negro pelo ósmio (→). Coloração: Azul de Toluidina. Aumento: 320 x.

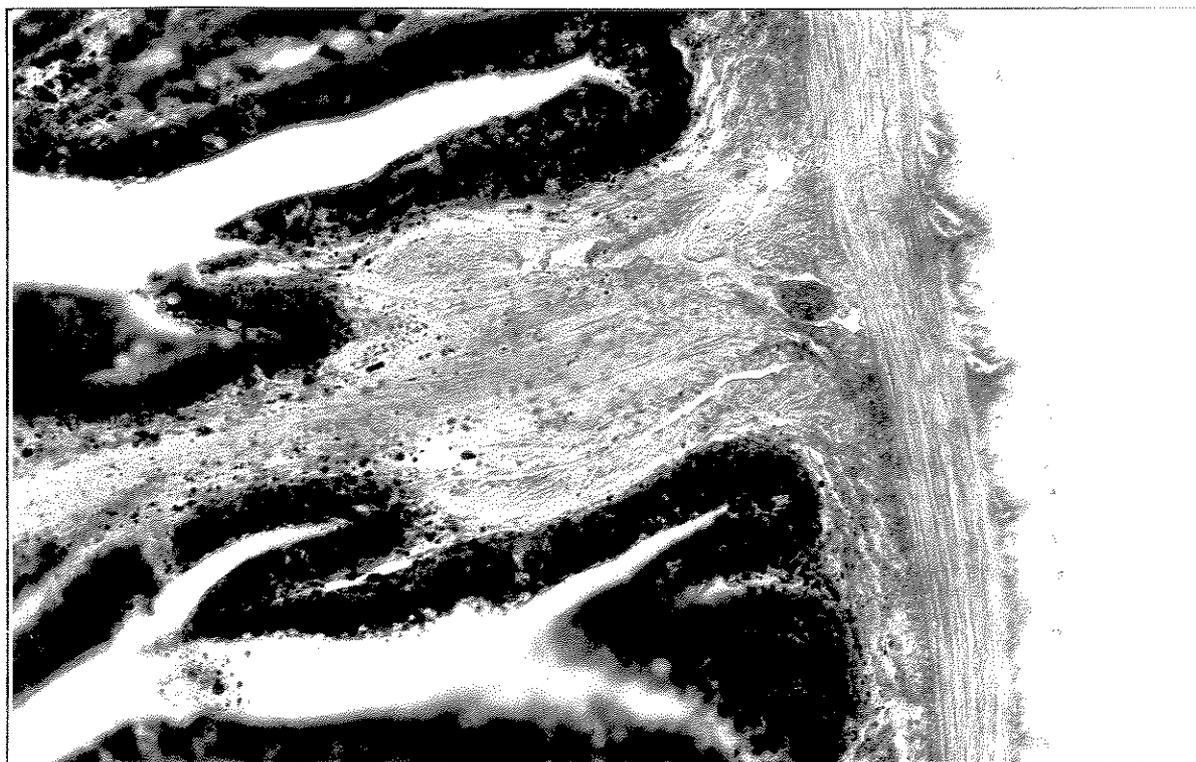


Fig. 18 - Intestino. Primeiro segmento. Corte em congelação. As gotículas apicais dos enterócitos ficam, também, evidenciadas em negro pelo Sudan Black B. Aumento: 320 x.

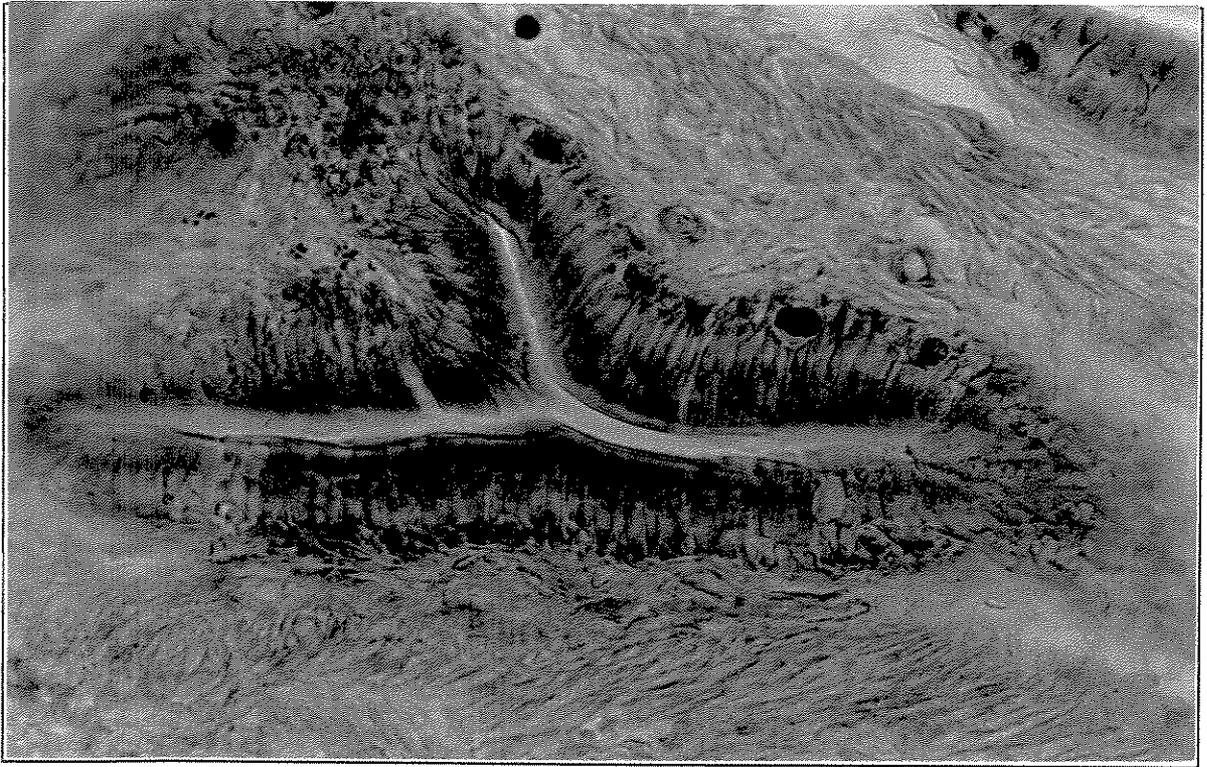


Fig. 19 - Intestino. Quarto segmento. Corte em congelação. Os enterócitos não apresentam gotículas lipídicas, não sendo portanto contrastadas pelo Sudan Black B. Neste segmento aparecem células fagocíticas intraepiteliais (CFI), em grande quantidade (→). Aumento: 640 x.



Fig. 20- Intestino. Quarto segmento. Ausência de pós-fixação pelo OsO_4 . Embebição em glicol metacrilato. As CFI (→) aparecem em grande quantidade neste segmento. Coloração: Azul de Toluidina. Aumento: 320 x.

As células granulocíticas especiais (CGE) são tipos celulares encontrados em todo o epitélio intestinal. As granulações grosseiras das CGE, apresentam afinidade pela eosina e PAS, mesmo após acetilação seguida de saponificação (Figs. 12 e 13), e coram-se ortocromaticamente pelo azul de toluidina.

As células fagocíticas intraepiteliais (CFI) variam de acordo com o tipo de processamento e fixação (Figs. 11, 19 e 20). Apresentam-se de maneira geral arredondada, com o núcleo geralmente em posição excêntrica e achatado, e quando vista em corte, pode apresentar-se semelhante a uma semi-lua, devido a deformação de parte do citoplasma juntamente com o núcleo em relação ao produto fagocitado (Fig. 19).

As células em bastonetes "rodlets cells", encontram-se em raras ocasiões no epitélio intestinal, sendo ovais e freqüentemente paralelas às células epiteliais intestinais. Apresentam o núcleo em posição basal e a presença de estruturas semelhantes a bastonetes orientados longitudinalmente no citoplasma em relação ao maior eixo da célula, e apresentam uma cápsula evidente. Em relação as técnicas utilizadas, apresentam-se em geral, claras, evidenciando ligeiramente somente a cápsula e suas inclusões (bastonetes). São melhor evidenciadas com o uso de imersão (Fig. 21).

No 5º segmento (segmento distal e reto) o epitélio não apresentou as mesmas particularidades encontradas nos enterócitos dos

quatro segmentos anteriores, pois não foram detectadas gotículas de lipídios, nem vesículas de secreção PAS positivas. Além disso, os enterócitos são mais altos e mais delgados e, provavelmente, com bordadura estriada mais baixa; alguns enterócitos apresentam citoplasma mais corado e o núcleo com cromatina condensada. Além disso, nesse segmento, há um maior número de linfócitos intraepiteliais na região basal epitelial e um acúmulo de células caliciformes no fundo entre as vilosidades intestinais mais curtas (Figs. 22 e 23).

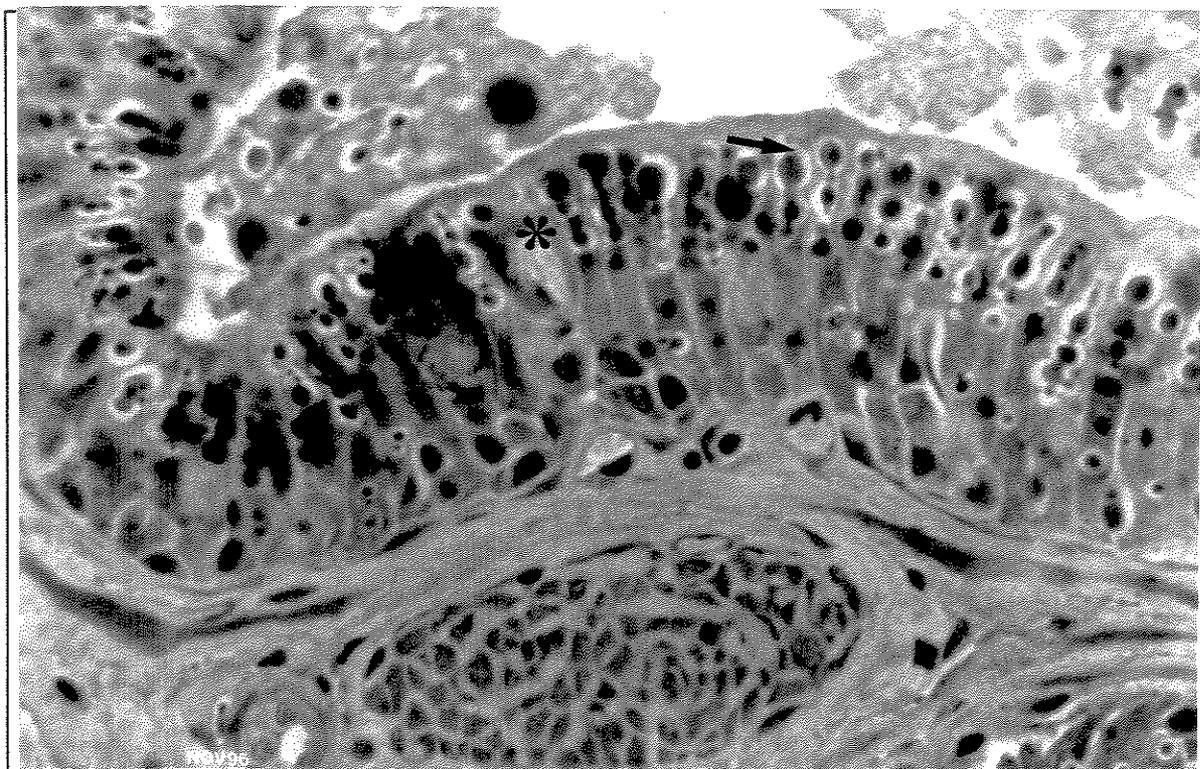


Fig. 21 - Intestino. Primeiro segmento. Pós-fixação pelo OsO_4 . Embebição em glicol metacrilato. Entre os enterócitos com vesículas apicais lipídicas enegrecidas pelo ósmio(\rightarrow), nota-se a célula em bastonete ou "rodlet cell", com sua cápsula evidente e as inclusões (bastonetes) em sentido longitudinal acompanhando o maior eixo da célula (*). Coloração: Azul de Toluidina. Aumento: 1280 x.

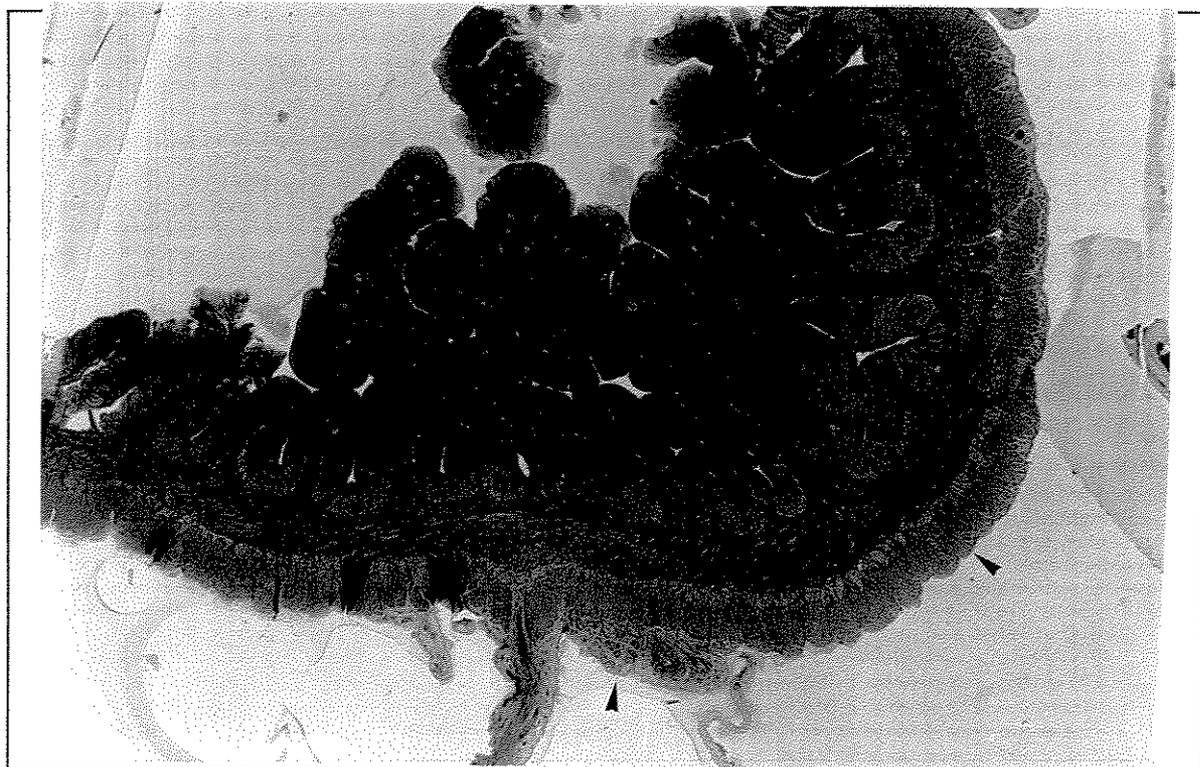


Fig. 22 - Intestino. Quinto segmento. Pós-fixação pelo OsO_4 . Embebição em glicol metacrilato. Notar as células caliciformes concentradas no fundo entre as pregas intestinais (\rightarrow). A túnica serosa neste segmento forma um pregueamento semelhante ao epiploon do intestino grosso dos mamíferos ($>$). Este segmento não apresenta vesículas lipídicas na região apical dos enterócitos. Coloração: Azul de Toluidina. Aumento aproximado: 80 x.

As paredes dos cecos pilóricos são histologicamente similares àquelas do intestino, embora o diâmetro e o comprimento das pregas sejam bem menores, e a espessura da parede, especialmente da túnica muscular, muito mais delgada, não possuindo aparentemente nem muscular da mucosa, nem submucosa (Fig. 24).

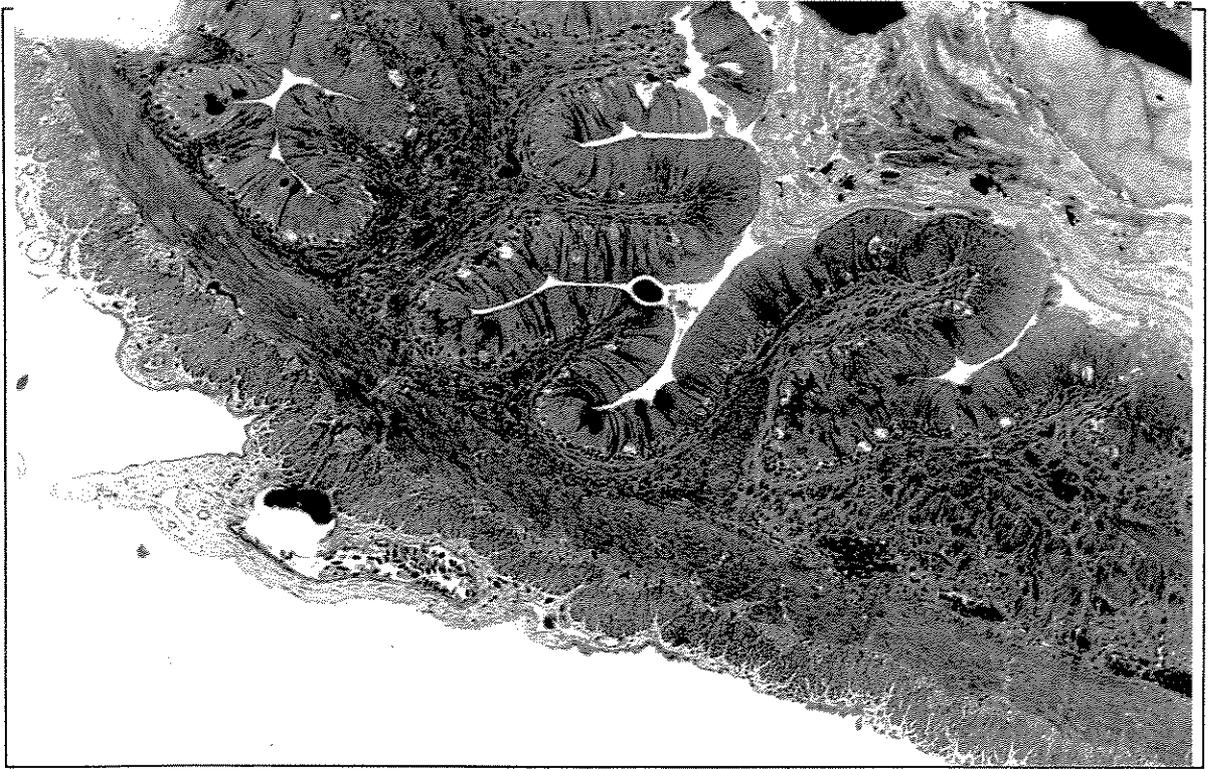


Fig. 23 - Intestino. Quinto segmento. Pós-fixação pelo OsO_4 . Embebição em glicol metacrilato. Os enterócitos não apresentam gotículas de lipídios, da mesma forma que a fotomicrografia anterior, Coloração: Azul de Toluidina. Aumento: 160 x.

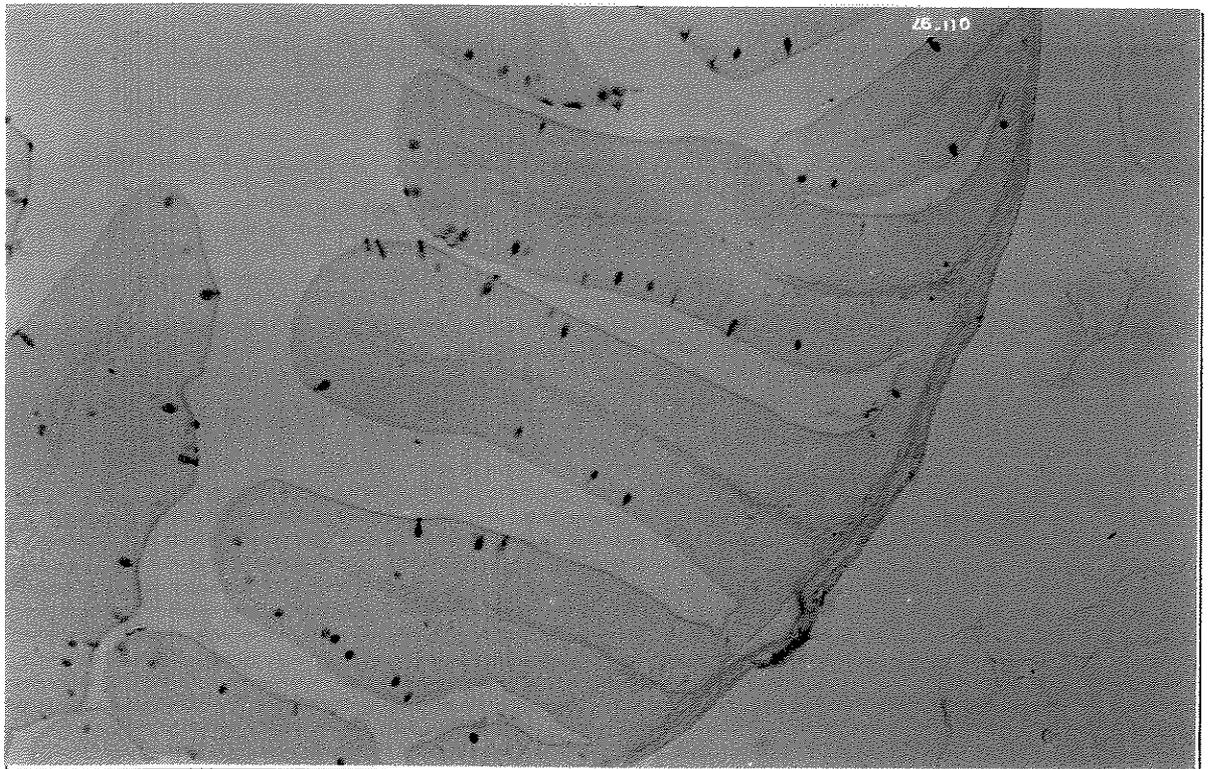


Fig. 24 - Cecos Pilóricos. Embora a constituição histológica de sua parede seja idêntica a do intestino, sua espessura e diâmetro são bem menores, além de aparentemente não possuir muscular da mucosa, nem submucosa. Reação histoquímica de PAS. Aumento: 160 x.

5. DISCUSSÃO

A maioria dos peixes teleósteos, não possui uma diferenciação anatômica clara do tubo intestinal como existe nos animais superiores, nem variações microscópicas marcantes que permitam diferenciá-lo histologicamente em regiões distintas (BARRINGTON, 1957; SIS *et al.*, 1979; GILLAUME, 1991). A morfologia do trato intestinal do *Brycon cephalus* é semelhante à descrita para a maioria dos peixes teleósteos.

O matrinhã é uma espécie que apresenta estômago, característica de peixes que segundo REIFEL e TRAVILL (1979), é a de possuir concomitantemente um intestino razoavelmente uniforme em diâmetro através de todo seu comprimento, ao contrário da maioria dos agástricos, que possuem uma dilatação intestinal proximal, denominada de dilatação intestinal (GIRGIS, 1952), ou bulbo intestinal (ROGICK, 1931; AHSAN-AL-ISLAM, 1951), ou grande ramo do intestino (CURRY, 1939) ou duodeno (BABKIN e BOWIE, 1928).

Os cecos pilóricos estão presentes , logo após o piloro, demarcando o início da região proximal do intestino do matrinchã. A similaridade morfológica entre os cecos pilóricos e o intestino proximal, nos teleósteos, tem sido evidenciada por diversos autores e foi demonstrada ultraestruturalmente, por JANSSON e OLSSON (1960).

Como regiões similares do intestino delgado, grosso e reto dos mamíferos, não podem ser identificadas nos intestinos dos teleósteos, diversos autores tentaram fazer uma demarcação inestinal macroscópica. BLAKE (1936), CURRY (1939) e JACOBSEN (1939), falharam em distinguir o reto do segmento distal, devido à ausência de qualquer demarcação externa e estreita semelhança histológica entre os dois. DAWES (1929) descreveu o reto separado do intestino por uma válvula. MOSHIN (1961, 1962), apontou um esfíncter nesta junção, estrutura não encontrada, no entanto, no matrinchã.

Entretanto, alguns autores consideram como parâmetros, que servem para demarcação de um segmento retal, as seguintes características histológicas: a redução na altura e na complexidade das pregas da membrana mucosa (AL-HUSSAINI, 1946; MOSHIN, 1962), o espessamento da musculatura e o aumento do número de células caliciformes (AL-HUSSAINI, 1945, 1946, 1949; MOSHIN, 1962). Sob este aspecto, no matrinchã, as pregas da membrana mucosa dos três primeiros segmentos intestinais, são mais alongados e com presença de

ramificações ou pequenas pregas secundárias, que vão se tornando mais curtas e mais simples distalmente. As células caliciformes que nos segmentos iniciais, apresentam-se em grande número, exceto nos cecos pilóricos, diminuem em quantidade em tôrno das pregas intestinais por volta do 4º segmento, e por fim concentrando-se sómente entre as curtas pregas no início do 5º segmento, até formar uma fileira contínua no reto.

A região do tubo digestivo de *Brycon cephalus* que foi estudada, segundo a divisão embriológica de BERTIN (1958), corresponde aos intestinos médio e posterior, que segundo BARRINGTON (1957) é o intestino propriamente dito, que se inicia no piloro, e se estende até a abertura anal.

O coeficiente de comprimento relativo intestinal (RLG), que expressa a relação matemática entre o comprimento do intestino e os hábitos alimentares, encontrado para o matrinchã, conforme demonstrado na Tabela I, foi 0,84. Este coeficiente está coerente com a média dos índices propostos por BERTIN (1958), para peixes omnívoros.

Convencionou-se dividir o tubo intestinal em 5 segmentos iguais, e nesta divisão procurou-se estudar e aplicar, o critério histofisiológico, inicialmente introduzido por GAUTHIER e LANDIS (1972), que consiste na caracterização dos segmentos intestinais

segundo o seu aspecto histológico e suas propriedades absorptivas funcionais relacionadas à absorção de diferentes nutrientes.

Os resultados histoquímicos das células caliciformes presentes no epitélio do intestino e dos cecos pilóricos do *Brycon cephalus*, revelam a presença de vesículas com reação positiva para glicoconjugados neutros, ácidos carboxilados e sulfatados e sugerem, ainda, a presença de ácido siálico. Tais resultados estão de acordo com os estudos de SANTOS (1979), CLARK & WITCOMB (1980), NACHI (1988) e DOMITROVIC (1992), realizados em outros peixes teleósteos.

A morfologia, a afinidade histoquímica ao PAS, e a eosinofilia da célula granulocítica especial (CGE) de *Brycon cephalus*, estão, também, de acordo com os estudos já realizados por AL-HUSSAINI (1946, 1947a, 1949b) e NACHI (1988).

Os resultados histoquímicos relacionados à positividade ao PAS e à fosfatase ácida presentes nas vesículas de secreção na região supranuclear e apical, respectivamente, dos enterócitos de 4º segmento intestinal do *Brycon cephalus*, equivalem a mesma positividade dos enterócitos presentes no epitélio intestinal da 4ª à 5ª circunvoluções intestinais, equivalentes ao segmento médio do *Prochilodus scrofa* (NACHI, 1988); na região anterior do reto, equivalente ao segmento distal de *Gambusia affinis*, (BULLOCK, 1967); do segmento médio do intestino

de *Carassius auratus* (GAUTHIER & LANDIS, 1972) e de *Cyprinus carpius* (NOIALLAC-DEPEYRE & GAS, 1973); e do segmento distal de *Pimelodus maculatus* (HERNANDEZ-BLASQUEZ, 1989).

A região intestinal com este comportamento histoquímico, que no matrinchã corresponde ao quarto segmento, possivelmente está relacionada à absorção de macromoléculas proteicas. Em estudos utilizando-se a peroxidase de rábano (HRP) e a ferritina, foram observados numerosos lisossomos ao ME em diversas espécies de peixes teleósteos (NOIALLAC-DEPEYRE & GAS, 1974, 1976, 1979; EZEASOR & STOKOE, 1981; STROBAND *et al*, 1981; STROBAND & VAN DER VEEN, 1981).

Embora NACHI (1988) e (HERNANDEZ-BLASQUEZ, 1989) não tenham inicialmente empregado marcadores ultraestruturais para a comprovação da pinocitose de macromoléculas proteicas, no epitélio da 4ª e 5ª circunvoluções do intestino de *Prochilodus scrofa* e do segmento distal de *Pimelodus maculatus*, respectivamente, consideraram estes segmentos equivalentes ao segmento médio da divisão histofisiológica. Posteriormente, estes mesmos autores, confirmaram esse processo absorptivo no intestino de *Prochilodus scrofa*, através do estudo histológico da absorção e fagocitose de ferritina e hemoglobina (1993a) e de estudo citoquímico de enzimas lisossômicas-fosfatases ácidas (1993b), ao nível de microscopia fotônica e da microscopia eletrônica.

A partir das informações referendadas acima, poderia sugerir-se neste estudo, que o sistema para digestão intracelular ou pinocitose de macromoléculas protéicas ou proteínas exógenas, no intestino de *Brycon cephalus*, poderia estar compreendido no 4º segmento intestinal. Para tanto, o teste com ferritina e peroxidase de rábano far-se-ia necessário para confirmação dessas evidências. CLARK (1959) reportou que esta função estava relacionada com a presença de invaginações apicais dos enterócitos de ratos e camundongos recém-nascidos, após a administração de gamaglobulina bovina e ovoalbumina, mas nunca em animais adultos. Este mesmo autor sugeriu que estas invaginações participavam do mecanismo de absorção de proteínas intactas em animais em amamentação.

Entre os teleósteos, a absorção de lipídios alimentares têm lugar na região proximal do intestino e ao nível dos cecos pilóricos, nas espécies que dispõem dessas estruturas (IWAI, 1969; BERGOT e FLÉCHON, 1970a, 1970b; GAUTHIER & LANDIS, 1972; STROBAND, 1977; STROBAND e DEBETS, 1979; BAUERMEISTER *et al*, 1979; NOAILLAC-DEPEYRE e GAS, 1974, 1976, 1979, 1983). Além disso, existem indicações de que os lipídios constituem a principal fonte de reserva energética nos teleósteos (NAGAI & IKEDA, 1970; COWEY SARGENT, 1977; BAUERMEISTER *et al*, 1979), indicando superar os carboidratos.

Desta maneira, o estudo da existência de um segmento fisiologicamente definido no intestino de *Brycon cephalus*, relacionado com o metabolismo de lipídios, torna-se de fundamental importância.

Como os enterócitos dos peixes tem dificuldade maior na metabolização dos ácidos graxos insaturados, e as gotículas lipídicas só podem ser demonstradas apenas quando estes são fornecidos, é que procurou-se administrar o óleo de milho, que é rico em ácidos graxos insaturados.

Os diferentes tempos de absorção empregados, foram necessários para cientificar-se de que a dose lipídica administrada, percorresse o intestino na sua totalidade; que nesse caso, 9 horas foram suficientes.

O uso combinado da fixação em PFA a 4% com CaCl_2 , da pós fixação pelo tetróxido de ósmio e inclusão em glicol metacrilato, conforme metodologia similar utilizada por NACHI (1988) e HERNANDEZ-BLASQUEZ (1989), contribuiu muito para estabilizar e evidenciar as gorduras e melhorar a morfologia geral dos preparados histológicos.

A positividade ao Sudan Black B nos cortes de intestino de matrinhã, deu-se após 3 horas da ingestão de lipídios, evidenciando-se gotículas lipídicas no citoplasma apical dos enterócitos.

A evidenciação de vesículas de lipídios foi observada nos enterócitos dos 3 primeiros segmentos intestinais e dos cecos pilóricos do matrinchã, conforme foi demonstrado por diversos autores citados anteriormente, não tendo sido evidenciadas no 4º e 5º segmentos. O 5º segmento intestinal, incluindo o reto, de *Brycon cephalus*, é histologicamente diferente tanto dos três primeiros quanto do 4º segmento intestinal, tanto pela ausência de vesículas lipídicas quanto de PAS positivas, não mostrando qualquer preferência reacional aos métodos histoquímicos utilizados.

Portanto, de acordo com as evidências mencionadas acima, o intestino de *Brycon cephalus* possui três regiões morfológicamente distintas que estão provavelmente relacionadas a um comportamento absorptivo distinto nos diferentes segmentos.

Finalmente, deve-se salientar que, estudos complementares devem ser realizados, na tentativa de elucidar alguns pontos e, principalmente, estudar a natureza das inclusões citoplasmáticas dos enterócitos do quarto segmento intestinal, conforme foi evidenciado neste estudo experimental.

6 - CONCLUSÕES

Com a metodologia empregada neste trabalho, e através dos estudos histológicos e histoquímicos para glicoconjugados, lipídios e fosfatase ácida, observados no intestino de *Brycon cephalus* (matrinchã), permitem as seguintes conclusões:

A constituição histológica geral da parede do trato intestinal é semelhante a mesma dos teleósteos com a presença de todas as camadas.

O epitélio de revestimento intestinal é formado basicamente pelos enterócitos ou células absorptivas, e pelas células caliciformes.

As células caliciformes apresentam grânulos de secreção que histoquimicamente correspondem a glicoconjugados neutros, ácidos carboxilados e sulfatados, bem como a presença de ácido siálico.

No epitélio de revestimento intestinal ocorrem também as células intraepiteliais que são : as células granulocíticas especiais (CGE),

A partir das evidências e diferenciações descritas acima, sugere-se para o intestino de *Brycon cephalus*, segundo o critério de divisão histofisiológica, a presença de 3 regiões distintas: região anterior (compreendendo os segmentos 1,2 e 3); região média (compreendendo o 4º segmento) e a região distal (compreendendo o 5º segmento e reto), que estão provavelmente relacionadas com funções absorptivas distintas dependendo da região analisada.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AHSAN-UL-ISLAM. The comparative histology of the alimentary tract of certain fresh water teleost fishes. **Proc. Indian Acad. Sci.**, v. 33B, p. 297-321, 1949.

AL-HUSSAINI, A.H. The anatomy and histology of the alimentary tract of the coral feeding fish *Scarus sordidus* (KLUNZ). **Bull. Inst. Egypte**, v. 27, p. 349-377, 1945.

AL-HUSSAINI, A.H. The anatomy and histology of the alimentary tract of the bottom - feeder, *Mulloidides auriflamma* (Forsk). **J. Morphol.** v. 78, p. 121-154, 1946.

AL-HUSSAINI, A.H. The anatomy and histology of the plankton - feeder *Atherina forskali* (Rüpp). **J. Morphol.** v. 80, p. 251-286, 1947a.

AL-HUSSAINI, A.H. The feeding habits and the morphology of the alimentary tract of some Teleosts. **Publ. Mar. Biol. St. Ghardaga**, n. 5, 61p., 1947b.

AL-HUSSAINI, A.H. On the functional morphology of the alimentary tract of some fish in relation to differences in their feeding habits: Anatomy and histology. **Quart. J. Microscop. Sci.** v. 90, p. 109-139, 1949a.

AL-HUSSAINI, A.H On the functional morphology of the alimentary tract of some fish in relation to differences in their feeding habits: Cytology and Physiology. **Quart. J. Microscop. Sci.** v. 90, p. 323-354, 1949b.

AL-HUSSAINI, A.H & KHOLY, A.A. On the functional morphology of the alimentary tract of some omnivorous teleost fish. **Proc. Egypt. Acad. Sci.** n. 6-9, p. 17-39, 1950-53.

ALVES, M.I.M. sobre o trato digestivo da serra, *Scomberomus maculatus* (Mitchill). **Arq. Ciên. Mar.**, v. 9, p. 167-171, 1969.

ASHLEY, L.W.. Comparative fish histology, In: RIBELIN, W.E. & MIGAKI, G. (eds). **Pathology of fishes**. Madison: University of Wisconsin Press, p 3-30, 1975.

BABKIN, B.P. & BOWIE, D. J.. The digestive system and its function in *Fundulus heteroclitus*. **Biol. Bull.**, v. 54, p. 254-278, 1928.

BANCROFT, J.D. & STEVENS, A. **Theory and practice of histological techniques**. 2nd ed. London: Churchill Livingstone, 1982. 661p.

BARBER, D.L. & WESTERMANN, J.E.M.. Occurrence of the periodic acid - schiff positive granular leucocyte (PAS - GL) in some fishes and its significance. **J. Fish. Biol.**, v. 12, p. 35-43, 1978.

BARRINGTON, E.J.W. The alimentary canal and digestion. In: BROWN, M.E. (ed.). **The Physiology of Fishes**. New York: Academic Press Inc., v. 1, p. 109-61, 1957.

BAUERMEISTER, A.E.M., PIRIE, B.J.S. & SARGENT, J.R. An electron microscopic study of lipid absorption in the pyloric caeca of Rainbow trout (*Salmo gairdnerii*) fed wax ester-rich zooplankton. **Cell Tissue Res.**, v. 200, p. 475-486, 1979.

BEÇAK, W. & PAULETE, J. **Técnicas de citologia e histologia**. Rio de Janeiro: Livros técnicos e científicos Ed., 1976. v. 2., 574p.

BERGOT, P. & FLECHON, J.E.. Forme et voie d'absorption intestinale des acides gras a chaine longue chez la Truite arc-en-ciel (*Salmo gairdnerii*, Rich.). I. Lipides en particules. **Annls. Biol. anim. Biochim. Biophys.** v. 10, p. 459-472. 1970a.

BERGOT, P. & FLECHON, J.E.. Forme et voie d'absorption intestinale des acides gras a chaine longue chez la Truite arc-en-ciel (*Salmo gairdnerii*, Rich.). II. lipides 'etales'. **Annls. Biol. anim. Biochim. Biophys.** v. 10, p. 473-480, 1970b.

BERTIN, L. Appareil digestif. In: P.P. Grassé (Ed.). **Traité de Zoologie**. Paris, Masson et C^{ie}, 1958, v.13, t. 2, p. 1248-1302.

BLAKE, I. H. Studies on the comparative histology of the digestive tube of certain teleosts fishes. I. A predaceous fish, the sea-bass (*Centropristes striatus*). **J. Morphol.** v. 50, p. 39-70, 1930.

BLAKE, I. H. Studies on the comparative histology of the digestive tube of certain teleosts fishes. I. A bottom-feeding fish, the sea-robin (*Prionotus carolinus*). **J. Morphol.** v. 60, p. 77-102, 1936.

BROUSSY, J. & SERFATY, A.. Au sujet d'absorption intestinale des lipides et de sa localisation chez la Carpe miroir. **Bull. Soc. Hist. Nat. Toulouse**, v.93, p. 81-85, 1958.

BULLOCK, W. L. Intestinal histology of some salmonid fishes with particular reference to the histopathology of acanthocephalan infections. **J. Morphol.** v. 112, p. 23-35, 1963.

BULLOCK, W. L. The intestinal histology of mosquito fish *Gambusia affinis* (BAIRD and GIRARD). **Acta Zoologica.** v. 48, p. 1-17, 1967.

BURNSTOCK, G. The morphology of the gut of the Brown Trout, *Salmo trutta*.. **Quart. J. Micr. Soc. London**, v. 100, n.2, p. 183-198, 1959.

CEPTA/IBAMA. **Seminário sobre Criação de Espécies do Gênero *Brycon***. Anais...Pirassununga: CEPTA, p. 82, 1994

CLARK, S.L. The ingestion of protein and colloidal material by columnar absorptive cells of small intestine in suckling rats and mice. **J. biophys. biochem. Cytol.**, v. 5, p. 41-50, 1959.

CLARKE, A.J. & WITCOMB, D.M. A study of the histology and morphology of the digestive tract of the common eel *Anguilla anguilla*. **J. Fish. Biol.**, v. 16, p. 159-70, 1980

COWEY, C.B. & SARGENT, J.R. Lipid nutrition in fish. **Comp. Biochem. Physiol.** v. 578, p. 269-273, 1977

CURRY, E. The histology of the digestive tube of the carp (*Cyprinus carpio communis*). **J. Morphol.** v. 65, p. 53-78, 1939.

DAS, S.M. & MOITRA, S.K. Studies on the food of some common fishes of Uttar Pradesh, India. Part II. **Proc. natn. Acad. Sci. India**, v. 26, p. 213-223, 1956a.

DAS, S.M. & MOITRA, S.K. Studies on the food of some common fishes of Uttar Pradesh, India. Part II. **Proc. natn. Acad. Sci. India**, v. 26, p. 224-233, 1956b.

DAWES, B. The histology of alimentary tract of the plaice (*Pleuronectes platessa*). **Quart. J. Microscop. Sci.** v. 73, p. 243-274, 1929.

DOMITROVIC, H.A. Histochemical study of digestive tract of *Prochilodus platensis* (Holmberg; 1980, Pisces, Prochilodontidae). **Revista de Ictiologia**, v. 1, n. 1 p. 35-44, 1992.

EZEASOR, D.N. & STOKOE, W.M. Light and electron microscopic studies on the absorptive cells of the intestine, caeca and rectum of the adult rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson. **J. Fish Biol.**, v. 18, p. 527-544, 1981.

GAUTHIER, G.F. & LANDIS, S.C. The relationship of ultrastructural and cytochemical features to absorptive activity in the goldfish intestine. **Anat. Rec.**, v. 172, p. 675-701, 1972.

GILLAUME, J. Las bases de la nutrición de los salmonidos. I. Generalidades, Requerimientos Cualitativos. In: **Primeira Jornada sobre Nutrition y Alimentation de Peces**. Chile: Facultad de Ciências Veterinárias/Universidad Austral de Chile, 1991.

GIRGIS, S. The Bucco-pharyngeal feeding mechanism in an herbivorous bottom-feeding cyprinoid, *Labeo horie* (Cuvier). **J. Morphol.** v.90, p. 281-315, 1952a.

GIRGIS, S. On the anatomy and histology of the alimentary tract of an herbivorous botton-feeding cyprinoid fish, *Labeo horie* (Cuvier). **J. Morphol.** v.90, p. 317-362, 1952b.

GODINHO, H. TOKUMARU, M & FERRI, A.G.. Histologia do trato digestivo de *Pimelodus maculatus* Lácèpede, 1803 (Pisces, Siluroidei). **Rev. Bras. Biol.** v. 30, p. 583-593, 1970.

GOMES, R. M. **Estudo morfológico e histoquímico (carboidratos) do trato digestivo da *Rhamdia branneri*, Hasemann, 1911 (Pisces).** Curitiba: UFC (Universidade Federal de Curitiba), 1981. Dissertação (Mestrado).

GOMORI, G. An improved histochemical technic for acid phosphatase. **Stain Technol.**, v. 25, p. 81-85, 1950.

GOULDING, M. **The fishes and the forest: explorations in Amazonian Natural History.** Berteley: University of California Press, 1980.. 200p.

GRAEF, E. W., RESENDE, E. K., PETRY, P. *et al.* Crescimento de matrinchã (*Brycon cephalus*) e jaraqui (*Semaprochilodus insignis*) em pequenas represas. In: SIMPÓSIO BRASILEIRO DE AQUICULTURA, 4., 1986, Cuiabá/MT. **Programa e Resumos.** p. 26.

- HARDER, W. **Anatomy of fishes**. Part. I. Text. Part II. Figures and plates. Stuttgart: E. Schweizerbart'sche Verlags-buchhandlung, Pt 1: 612p., Pt 2: 123p. 1975.
- HEPHER, B. **Nutrition of Pond Fishes**. Cambridge: Cambridge University Press, 1990. 388p.
- HERNANDEZ-BLASQUEZ, F.J. **Modificações histoquímicas e ultraestruturais dos enterócitos de *Pimelodus maculatus* Lacépède, 1803 (Pisces) durante a absorção de lipídeos**. São Paulo: USP (Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo), 1989 Tese (Doutorado).
- HYATT, K.D. Feeding strategy. In: W.S.HOAR, D.J. RANDALL & J. R. BRETT, (eds.) **Fish Physiology**. vol. VIII. Bioenergetics and Growth. New York.; Academic Press, 1979.
- IWAI, I. Fine structure of gut epithelial cells of larval and juvenile carp during absorption of fat and protein. **Arch. histol. jap.** v. 30, p. 183-199, 1969.
- IWAI, I & TANAKA, M. The comparative study of the digestive tract of teleost larvae. IV. Absorption of fat by the gut of the halfbeak larvae. **Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.**, v. 34, p. 871-875, 1968.

JACOBSEN, E. M. Anatomy and histology of the digestive tract of a deep-sea fish, *Coelorhynchus carminatus*. **Univ. Nebl. Stud. Sci.**, v. 39, n. 1, 1939.

JANSSON, B. O. & OLSSON, R. The cytology of the caecal epithelial cells of perca. **Acta Zoologica**, v. 41, p. 267-276, 1960.

KAPOOR, B. G. The anatomy and histology of the alimentary canal in relation to its feeding habits of a siluroidei fish, *Wallago attu* (Bl. & Schn.) **J. Zool. Soc. (Índia)** v.5, p. 191-210, 1953.

KAPOOR, B. G; SMIT, H & VERIGHINA, I. A. The alimentary canal and digestion in teleosts. In: RUSSELL, .F.S. & YONGE, M. (Eds.) **Advances in Marine Biology**. New York : Academic Press, 1975.

KAYANJA, F. J. B., MALOI Y, G .M. O. & REITE, O. B.The fine structure of the intestinal epithelium of *Tilapia grahami* - **Anatomische Anzeiger**, v. 138, p. 451-462, 1975.

KEAST, A. Food specializations and bioenergetic interrelations in the fish faunas of some small Ontario Waterways. In: J.H.STEELE, (Ed) **Marine Food Chains**. Berkeley: University of California Press, 1970.

KEAST, A. Mechanisms expanding niche width and minimising intraspecific competition in two centrarchid fishes. In: M.K. HECHT, W.C. STEERE & B. WALLACE, (eds) **Evolutionary Biology**, New York: Plenum Press, 1977, v. 10.

KEAST, A. Patterns of predation in generalist feeders. In H. CLEPPER, (Ed.) **Predator-Prey Systems in Fisheries Management**. Washington : Sport Fishing Inst., 1979.

KEAST, A & WEBB, D. Mouth and body form relative to feeding ecology in the fish fauna of a small lake, Lake Opinicon, Ontario. **J. Fish. Res. Bd. Can.** v.23, p. 1845-1874, 1966.

KIMURA, N. Fine structure of the epithelial cells in the pyloric caecum of the rainbow trout, *Salmo gairdneri*. **Jap. J. Ichthyol.** v. 20, p. 13-24, 1973.

LAWRENCE, F. B. (1950). **The digestive enzymes of the bluegill bream (*Lepomis macrochirus*)**. Alabama: Auburn University (Depto. Zool) M. A. Thesis.

LEINO, R.L. Ultrastructure of immature, developing, and secretory rodlet cells in fish. **Cell Tiss.Res.** v.155, p. 367-381, 1974.

LEVY, R. & SPICER, S.S. Specific staining of sulphate groups with Alcian blue at low pH. **J.Histochem. Cytochem**, v. 12, n. 4, p. 309, 1964.

LILLIE, R.D. **Histopathologic technic and practical histochemistry**. New York: Blakiston Co., 1954. 501p.

LISON, L. **Histochimie et cytochimie animales**. 3rd ed. Paris: Gauthier - Villars, 1960. 842p.

LUNA, L.G. **Manual of Histologic Staining Methods of the Armed Forces Institute of Pathology**. 3rd ed., New York: McGraw-Hill Book Company, 1968. 258p.

MENDONÇA, J.O.J., SENHORINI, J.A.; FONTES, N.A.; *et al.* Influência da fonte protéica no crescimento do matrinchã, *Brycon cephalus* Günther, 1869 (Teleostei, Characidae), em viveiros. **B.Téc.CEPTA**, Pirassununga, v.6, n. 1, p.51-57, 1993.

Mc MANUS, J.F.A. & CASON, J.E. Carbohydrate histochemistry studied by acetylation techniques. I. Periodic acid methods. **J.Exp.Med.** v. 91, p. 651-654, 1950.

MOSHIN, S.M. Comparative morphology and histology of the alimentary canal in certain groups of indian teleosts. **Acta Zool.** v. 63, p. 79-130, 1962.

MOSHIN, S.M. The morphology and anatomy of the alimentary canal of *Glossogobius giuris* (Ham.) **Canal J.Zool.** v. 39, p. 605-813, 1961.

MORRISON, C.M. & ODENSE, P.H. Distribution and morphology of the rodlet cell in fish. **J.Fish.Res.Board Can.** v. 35, p. 101-116, 1978.

NACHI, A.M. **Intestino de *Prochilodus scrofa* (Curimbatá): estudo histológicos, histoquímico de glicoconjugados e da absorção de lipídeos utilizando diferentes métodos de inclusão.** São Paulo: USP (Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo), 1988. 106p. Dissertação (Mestrado).

NACHI, A.M & HERNANDEZ-BLASQUEZ, F.J. Estudo citoquímico ao microscópio eletrônico de citidina 5' monofosfato, β glicerofosfato e trimetafosfato no segundo seguimento intestinal de *Prochilodus scrofa*. In: ENCONTRO BRASILEIRO DE ICTIOLOGIA, 10., 1993a, São Paulo/SP. **Resumos...** São Paulo: USP, 1993. p.19.

NACHI, A.M & HERNANDEZ-BLASQUEZ, F.J & SOARES, M.A.M. Estudos histológico da absorção e fagocitose de ferritina e hemoglobina em intestino de *Prochilodus scrofa*. In: ENCONTRO BRASILEIRO DE ICTIOLOGIA, 10., 1993, São Paulo/SP. **Resumos...** São Paulo: USP, 1993b. p.18.

NAGAI, M. & IKEDA, S. Carbohydrate metabolism in fish. I Effects of starvation and dietary composition on the blood glucose level and the hepatopancreatic glycogen and lipid contents in carp. **Bull. Jap. Soc. Scient. Fish.**, v. 37, n. 5, p. 404-409, 1970.

NICOL, J. A. C. Autonomic nervous systems in lower chordates. **Biol. Revs.** v. 27, p. 1-49, 1952

NOAILLAC-DEPEYRE, J. & GAS, N. Absorption of protein macromolecules by the enterocytes of the carp (*Cyprinus carpio* L.) Ultrastructural and citochemical study. **Z. Zellforsch. Mikrosk. Anat.**, v. 146, p. 525-41, 1973a.

NOAILLAC-DEPEYRE, J. & GAS, N. Mise en évidence d'une zone adaptée au transport des ions dans l'intestine de carpe commune (*Cyprinus carpio* L.). **C. R. Acad. Sci.**, v. 276, p. 773-776, 1973b.

NOAILLAC-DEPEYRE, J. & GAS, N. Fat absorption by the enterocytes of the carp (*Cyprinus carpio* L.). **Cell Tissue Res.**, v. 155, p. 353-365, 1974.

NOAILLAC-DEPEYRE, J. & GAS, N. Electron microscopic study on the gut epithelium of the tench (*Tinca tinca* L.) with respect to its absorptive functions. **Tissue & Cell**, v.8, p. 511-530, 1976.

NOAILLAC-DEPEYRE, J. & GAS, N Structure and function of intestinal epithelial cells in the perch (*Perca fluviatilis* L.). **Anat. Rec.**, v. 195, p. 621-640, 1979.

NOAILLAC-DEPEYRE, J. & GAS, N Etude cytophysiologique de l'épithélium intestinal du poisson-chat *Ameiurus nebulosus*. **Can. J. Zool.**, v. 61, p. 2556-2573, 1983.

PEREIRA-FILHO, M., STORTI FILHO, A., GRAEF, E.W. Preparo e utilização de ingredientes produzidos em Manaus no arraçoamento do matrinhã II *Brycon* sp. Teste experimental. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ENGENHARIA DE PESCA, 5., 1987, Fortaleza/CE. **Anais...** Fortaleza : Associação dos Engenheiros de Pesca, 1988. p. 187-199.

QUINTARELLI, G. TSUIKI, S., HASHIMOTO, Y., PIGMAN, W. Studies of sialic acid containing mucins in bovine submaxillary and rat-sublingual glands. **J. Histochem. Cytochem.** v. 9, p. 176-183, 1961.

REIFEL, C. W. & TRAVILL, A. A. Structure and carbohydrate histochemistry of the intestine in teleostean species. **J. Morph.**, v. 162, p. 343-360, 1979.

- RIBEIRO, W.R. **Contribuição ao estudo da hematologia de peixes. Morfologia e citoquímica das células do sangue e dos tecidos hematopoiéticos do mandi amarelo, *Pimelodus maculatus* Lacépède, 1803.** Ribeirão Preto: Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, 1978. Tese (Doutorado).
- ROGICK, M. D. Studies on the comparative histology of the digestive tube of certain teleost fishes II. Aminnow (*Compostoma anomalum*). **J. Morphol.** v. 52, p. 1-25, 1931.
- SAINT-PAUL, U., WERDER, U., TEIXEIRA, A.S. O uso do aguapé (*Eichornia crassipes*) em experimentos de alimentação com matrinhã (*Brycon sp.*). In: SIMPÓSIO BRASILEIRO DE AQUICULTURA, 2, 1980, Jaboticabal/SP. **Resumos...** p. 83-84.
- SANTOS, M. T.; MENDES, A.F.; NEPOMUCENO, H. Estudos histoquímicos do tubo digestivo de *Plagiosciium equamosíssimus* (Heckel, 1840). **Rev. Med. Univer. Fed. Ceará**, v. 19 n. 1/2, p. 19-25, 1979.
- SASTRY, K. V. Comparative morphology and histology of the alimentary canal in two teleosts fishes. **Folia Morphol.** , v. 21, p. 31-39, 1973.

SIS, R. F.; IVES, P. J.; JONES, D. M.; LEWIS, D. H. & HAENSLY, W. E. The microscopic anatomy of the oesophagus, stomach and intestine of the channel catfish, *Ictalurus punctatus*. **J. Fish. Biol.**, v. 14, p. 179-186, 1979.

SMITH, L. S. Digestion in teleost fishes. In: **Aquaculture development and coordination programme, feed technology** - Lectures presented t the FAO/UNDP. Training Course in Fish Feed Technology; p. 3-18 , Rome: FAO, 1980.

STROBAND, H. W. J. Growth and diet dependent structural adaptations of the digestive tract in juvenile grasscarp (*Ctenopharyngodon idella*, Val.) **J. Fish. Biol.** v.II, p. 167-174, 1977.

STROBAND, H. W. J & DABROWSKI, K. R. Morphological and physiological aspects of the digestive system and feeding in fresh-water fish larvae apud **LA NUTRITION DES POISSONS**: actes du colloque. Diretor: M. Fontaine. Paris, CNRS, 1979.

STROBAND, H. W. J & DEBETS, F. M. H. The ultrastructure and renewal of the intestinal epithelium of the juvenile grasscarp *Ctenopharyngodon idella* (Val.). **Cell. Tissue Res.**, v. 187, p. 181-200, 1979.

STROBAND, H. W. J & KROON, A. G. The development of the stomach in *Clarias lazera* and the intestinal absorption of the protein macromolecules. **Cell. Tissue Res.**, v. 215, p. 397-415, 1981.

STROBAND, H. W. J & VAN DER VEEN, F. H. Localization of protein absorption during transport of food in the intestine of grasscarp *Ctenopharyngodon idella* (Val.). **J. Exp. Zool.**, v. 218, p. 249-256, 1981.

SUYENIRO, Y. A study on the digestive system and feeding habits of fish. **Jap. J. Zool.** v. 10, p. 1-303, 1942.

VEGAS-VELEZ, M. La structure histologique typique du tube digestif des poissons téléostéens. **Tethys**, v. 4, n. 1, p. 163-174, 1972.

WEATHERLEY, A. H. & GILL, H. S. **The Biology of Fish Growth**. Ontario: Academic Press, 1977. 443p.

WEINREB, E. L. & BILSTAD, N. M. Histology of the digestive tract and adjacent structures of the rainbow trout, *Salmo gairdneri irideus*. **Copeia**, v. 3, p. 194-204, 1955.

ABSTRACT

With the aim of obtaining further knowledge on fishculture conditions of *Brycon cephalus* (matrinchã), the morphofunctional relationship of intestinal segment was evaluated by histological and histochemical approach. The intestine was sectioned into five segments and fixed with Bouin for paraffin embedding or, 4% paraformaldehyde containing CaCl_2 solution and post-fixed with 1% OsO_4 for glycol-methacrylate embedding. The paraffin sections stained with H.E. and Masson's or Gomory's trichrome were used for morphological analysis and for carbohydrate histochemistry (PAS, Alcian Blue pH 0.5 and 2.5). The lipid content was evaluated in OsO_4 stained glycol-methacrylate sections and Sudan black stained cryosections. The acid phosphatase activity was evaluated in the unfixed cryosections by Gomory's histoenzymological method. The epithelial sheets of whole intestine is covered by columnar enterocytes intercalated by goblet cells. The latter contained neutral, acid carboxylated and sulphated glycoconjugate vesicles. The enterocytes found in the three former segments showed PAS positive vesicles and a strong acid phosphatase activity in the apical region. The last had a great quantity of goblet cells but the enterocytes did not show any preferential reactivity for the histochemical method used. Therefore, the intestine of *Brycon cephalus* has three morphologically distinguishable segments which are probably related to an absorptive role.