

# Efeito de poluentes químicos cumulativos e mutagênicos durante o desenvolvimento ontogenético de *Poecilia vivipara* (Cyprinodontiformes, Poeciliidae)

Eduardo José de Almeida Araújo\*, José Oscar Rodrigues de Moraes, Paulo Roberto de Souza e Simone Maria Teixeira de Sabóia-Morais

Laboratório de Comportamento Celular, Departamento de Morfologia, ICB IV, Universidade Federal de Goiás, Cx Postal 131, 74001-970, Goiânia, Goiás, Brasil. \*Author for correspondence. e-mail: edubyo@aol.com

**RESUMO.** Viver em sociedade é uma característica do *Homo sapiens*, e esta vantagem permitiu-lhe ocupar tantos biomas. Aumento populacional e desenvolvimento tecnológico trouxeram paralelamente acréscimo ao volume de dejetos eliminados nos mananciais de água. Conhecer modelos biológicos que permitam averiguar níveis de contaminação destes mananciais é o propósito desta pesquisa. Células do epitélio branquial do guaru (*Poecilia vivipara*) modificam o seu comportamento em face de variações ambientais, mantendo a homeostasia em condições adversas. Nosso propósito foi conhecer a origem e diferenciação dos tipos celulares no desenvolvimento das brânquias, procurando detectar variações do epitélio branquial em embriões de fêmeas prenhes expostas ao chumbo (poluente cumulativo e mutagênico). Formaram-se dois grupos, o controle e o experimental, que foi exposto à solução de acetato de chumbo a 1 ppm. Observaram-se os embriões nos estágios 24, 30 e 36 (Vernier, 1969), analisados sob microscopia de luz e eletrônica de varredura. Foram quantificados e mensurados os embriões por fêmea. Notou-se a formação dos arcos, filamentos, rastelo e lamelas branquiais. No epitélio, células do cloro se diferenciam primeiro, e no estágio 36 surgem as células mucosas no rastelo branquial. Não houve diferenças morfológicas de células epiteliais das brânquias entre os grupos. A viviparidade pode ser o fato de explicação.

**Palavras-chave:** desenvolvimento ontogenético, brânquia, chumbo, poluição química.

**ABSTRACT.** Effect of cumulative chemical and mutagenic pollutants during ontogenic development of *Poecilia vivipara* (Cyprinodontiformes, Poeciliidae). Living in society is a feature of *Homo sapiens* and this fact gives him the advantage of occupying many biomes. Population increase and technological development brought a growth in the volume of dejects thrown into water sources. Knowledge of biological models that evaluates contamination levels of these sources is the aim of this research. Cells of the branchial epithelium of *Poecilia vivipara*, popularly known as guaru, modify their behavior in the presence of environmental variations and keep the homeostasis in adverse conditions. Our intention was to know the origin and the differentiation of cell types in the development of the gill and to detect variations of the branchial epithelium in embryos of pregnant females exposed to lead (a cumulative and mutagenic chemical pollutant). Two groups were formed, the control and the experimental group, which was exposed to a solution of 1 ppm lead acetate. Embryos in stages 24, 30 and 36 were observed (Vernier, 1969) and analyzed under light and electronic scanning microscopy. Embryos of the females were quantified and measured. The formation of the arcs, filaments, rays and lamellae gill were registered. In the epithelium, first the chlorine cells differentiated; in stage 36 mucous cells appear in the branchial ray. There were no morphological differences between the groups in the epithelial cells of the gill. Viviparity may be the explanatory factor.

**Key words:** ontogenic development, gill, lead, chemical pollution.

Conhecer a morfologia branquial de peixes tem sido uma das formas de elucidar os mecanismos que contribuem para a adaptação destes animais às

alterações ambientais. Isso é importante, visto que a cada dia, toneladas de poluentes são liberadas sem tratamento em mananciais de água, as quais de

forma direta ou indireta, afetam a vida aquática. Cada tipo celular presente no epitélio branquial modifica o seu comportamento no intuito de permitir ao animal retornar à sua homeostasia (Laurent, 1984). Faz-se necessário, portanto, conhecer como surge cada tipo epitelial, para interpretação de sua plasticidade funcional.

A ação antropogênica tem aumentado as oscilações do ambiente aquático, permitindo a liberação indiscriminada de agentes poluidores, como agrotóxicos, metais pesados, substâncias eutrofisantes, moluscicidas, etc. Uma forma de o animal se proteger contra essa perturbação do ambiente é secretar um camada superficial de glicoproteínas e glicolipídeos sobre o epitélio branquial (Schulta e Celch, 1990; Castels *et al.*, 1992; Burkhard-Holm, 1997); e outra é diminuir a superfície de contato com o meio aquático, reduzindo micropregas e microvilos (Whitcar, 1990; Perry e Laurent, 1993; Araújo *et al.*, 1997).

Atualmente, os metais pesados têm sido muito utilizados pelo homem. Dentre estes, o chumbo, empregado como aditivo de gasolina, tintas de impressoras, esmalte vitrificado para louças, corantes, explosivos, inseticidas, plásticos, etc., tem contaminado os ambientes aquáticos, podendo determinar alterações complexas nos níveis de consumo deste poluente pelos teleósteos nos últimos séculos.

A morfologia branquial de peixes adultos normais foi descrita em várias espécies (Newstead, 1967; Morgan e Tovell, 1973; Hughes, 1984; Laurent, 1984; Mallat e Paulsen, 1986; Lazar *et al.*, 1992; Sabóia-Morais *et al.*, 1996), bem como a organização dos tipos celulares presentes no epitélio branquial de peixes adultos (Hootman e Philpott, 1980; Laurent, 1984; Pisam *et al.*, 1989; Bailly *et al.*, 1992; Sabóia-Morais *et al.*, 1992; Zaccane *et al.*, 1992; Pisam *et al.*, 1993; Sabóia-Morais, 1996); contudo, pouco se sabe sobre o desenvolvimento ontogenético branquial (Kimmel *et al.*, 1995; González *et al.*, 1996; Rombough, 1999).

Em todos os vertebrados, a região faríngeica dos embriões desenvolve uma série de bolsas viscerais evaginantes e sulcos ectodérmicos invaginantes (González *et al.*, 1996). Um contato temporário com a faringe é formado quando a bolsa endodérmica funde-se com o sulco ectodérmico (Hopper e Hart, 1985). Os arcos branquiais são formados quando o contato com a faringe é rompido e abre-se um canal entre a cavidade da faringe e o meio externo (Morgan, 1974; Waterman, 1985; Miller *et al.*, 1993; González *et al.*, 1996).

O objetivo deste trabalho foi descrever as características morfológicas do desenvolvimento ontogenético branquial do guaru (*Poecilia vivipara*) através da microscopia de luz e eletrônica de varredura, em condições naturais e expostas ao acetato de chumbo, um poluente químico cumulativo e mutagênico.

## Material e métodos

Este estudo foi feito com o peixe *Poecilia vivipara*, pertencente à ordem Cyprinodontiformes e família Poeciliidae. Foram utilizadas 30 fêmeas prenhes colhidas aleatoriamente e que possuíam embriões em diferentes estágios do desenvolvimento (Vernier, 1969).

Para a realização do experimento dividimos os animais em dois grupos:

O grupo controle, constituído por 15 animais, foi mantido em um aquário com 24 litros de água com a condição padrão específica para essa espécie: aeração, controle da tubidez, pH 6,9 e alimentação "ad libitum" (Tetrafood - Alemanha).

O grupo experimental, também constituído por 15 animais, foi mantido em um aquário com 24 litros de água, onde foram diluídos 24 mg de acetato de chumbo,  $Pb(C_2H_3O_2)_2 + 3H_2O$ , obtendo-se uma solução final com concentração de 1 ppm. Os animais foram expostos a este meio durante 15 dias.

Fêmeas dos grupos experimental e controle foram sacrificadas a cada 5 dias, retirando-se os embriões, para uma posterior análise estatística descritiva e inferencial, ou seja, número médio de embriões, tamanho médio dos embriões, possíveis diferenças entre o grupo controle e experimental quanto a estes parâmetros. Todos os embriões de uma mesma fêmea foram contados, e medidos quanto ao comprimento total de cabeça à cauda, utilizando-se um paquímetro.

Alguns embriões do grupo-controle e do grupo experimental foram fixados em ZIO, Zinc Iodide-Osmium, (Watrin e Mayer-Gostan, 1996) durante 24 horas, outros em McDowell modificado (Brancroft e Stevens, 1982) durante 1,5 hora, e o restante em Karnovsky modificado (Glutaraldeído a 2,5% + Paraformaldeído a 4% em tampão fosfato de sódio 0,1M pH 7,2) durante 24 horas.

O material fixado com ZIO foi incluído em parafina. Cortes de 4  $\mu$ m foram corados com Alcian Blue pH 2,5 e, analisados em fotomicroscópio Zeiss. Os embriões fixados em McDowell modificado foram incluídos em parafina, e os cortes foram corados com Azul de Metileno 1%, Azul de Toluidina 1%, Azul de Toluidina 1% + Floxina 1%. O material fixado em Karnovsky foi desidratado,

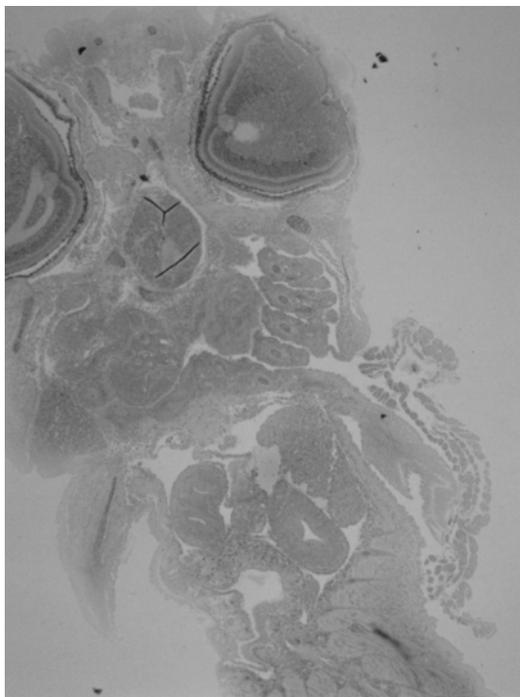
secado em aparelho de ponto crítico (Balzers CPD-010), metalizado com liga ouro-paládium (Balzers SCD-050) e analisado num microscópio eletrônico de varredura (JEOL-JSM-5300), operado a 15 KV.

Os resultados obtidos nos permitiram verificar a taxa de natalidade e a média do comprimento total dos embriões, tanto do grupo-controle quanto do grupo experimental, além de termos realizado inferência estatística através do Teste de “t”.

## Resultados

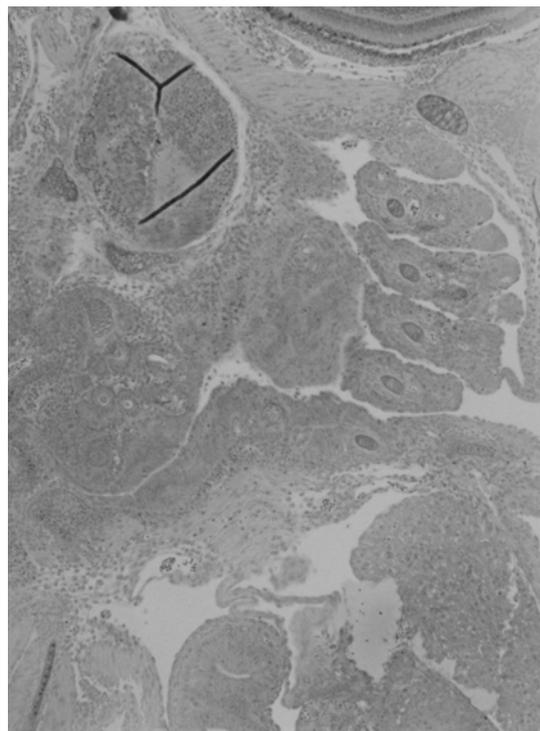
### Microscopia de Luz e Eletrônica de Varredura do Grupo de Peixes Controle nos Diversos Estágios (Vernier, 1969)

**Estágio 24.** Os embriões neste estágio possuíam um tamanho médio de 5,2 mm, e verificou-se que eles possuíam o desenvolvimento de alguns sistemas orgânicos já bem definidos: sistema visual apresentando olhos grandes (Figura 1) com camadas delimitadas; sistema nervoso central provavelmente ainda em fase de organização; sistema digestório apresentando intestino e fígado em estruturação; tecido ósseo em formação, com áreas de ossificação endocondral; além disso, verificou-se grande quantidade de tecido muscular em desenvolvimento, principalmente na cauda do embrião (Figuras 1 e 2).



**Figura 1.** Vista de um corte panorâmico de um embrião do grupo controle no estágio 24. Observar o grande volume dos olhos com camadas bem delimitadas, os quatro arcos posicionados, opérculo e intestino. H.E. 67X

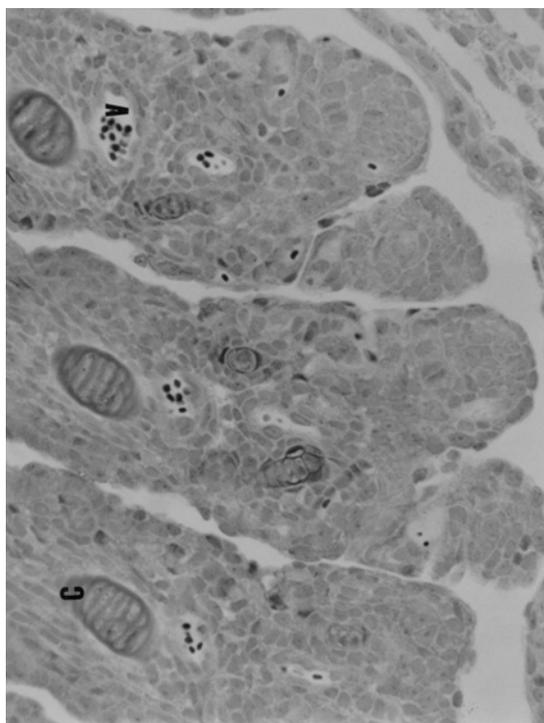
Quanto ao epitélio branquial, foram observados os quatro arcos branquiais isolados, compostos de massa celular indiferenciada, com presença de figuras de mitose (Figura 4). Essas células eram provavelmente nutridas através de vasos sanguíneos distribuídos de forma difusa (Figuras 3 e 4). Cada arco branquial possuía um esqueleto cartilaginoso composto por condrócitos e matriz extracelular acidófila (Figuras 1-3). Junto do esqueleto cartilaginoso encontramos vasos sanguíneos contendo hemácias nucleadas (Figura 3). O epitélio branquial também estava constituído basicamente por células indiferenciadas (Figura 3 e 4). Nesse estágio se observou o início da diferenciação das células do cloro, que se apresentaram, quando coradas em HE, com um volume celular maior em relação às vizinhas, a cromatina nuclear densa e o nucléolo evidente (Figura 4).



**Figura 2.** Detalhe da região cranial de embrião do grupo controle no estágio 24. Observar presença do sistema nervoso central, os quatro arcos branquiais isolados, opérculo. H.E. 238X

**Estágio 30.** Neste estágio, os embriões possuíam um tamanho médio de 5,7 mm. Uma grande atividade morfogênética foi observada em cada arco branquial, que culminou na aparição dos filamentos em direção à cavidade opercular, e também do rastelo em direção à faringe (Figura 7). Verificou-se que o esqueleto branquial se projetou dentro dos

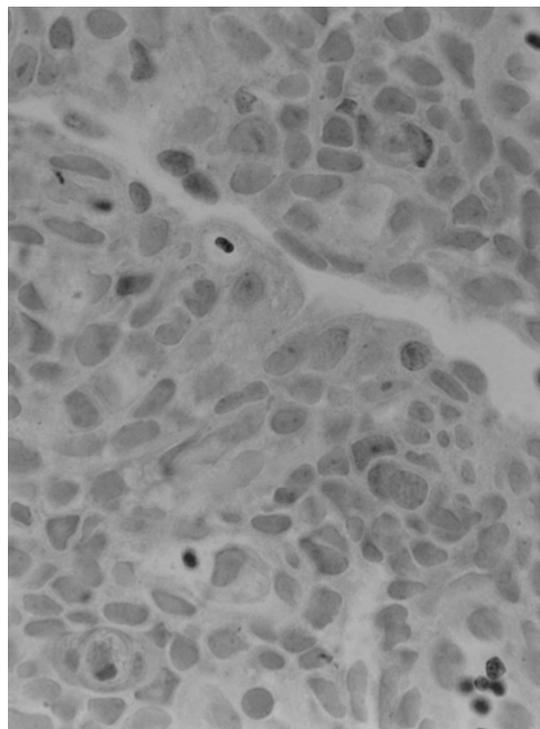
filamentos na forma de tabiques cartilagosos, acompanhado de vasos sanguíneos distribuídos difusamente em cada arco branquial. No epitélio branquial observou-se um número maior de células do cloro apresentando menor razão nucleocitoplasmática, cromatina nuclear mais difusa e células pavimentosas relativamente diferenciadas neste estágio.



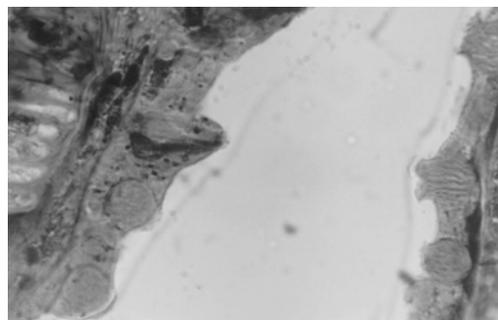
**Figura 3.** Arcos branquiais isolados de embrião do grupo controle no estágio 24. Observar cartilagem bem acidófila, vasos e ausência de um epitélio diferenciado. H.E. 458X

**Estágio 36.** Os embriões deste estágio possuíam um tamanho médio de 6,35 mm. As brânquias tinham muitas características semelhantes às observadas nos adultos. Em cada filamento observou-se uma projeção cartilaginosa originada no arco. Notou-se o surgimento de lamelas perpendiculares aos filamentos, as quais eram revestidas por epitélio simples pavimentoso. Dentro das lamelas observou-se um vaso sanguíneo, sendo que cada vaso é ramo das artérias filamentosas, que por sua vez se dividem originando os capilares. No epitélio, as células pavimentosas recobrem as lamelas e todo o arco branquial, observando-se também as células do cloro totalmente diferenciadas no epitélio interlamelar e na região proximal das lamelas. A característica do epitélio neste estágio foi o surgimento das células mucosas apenas no rastelo

branquial (Figuras 5 e 6). Observou-se, no entanto, que fato semelhante ao do surgimento destas células ocorre simultaneamente na mucosa da faringe (Figura 5). As células mucosas coraram-se fortemente pelo azul de toluidina.



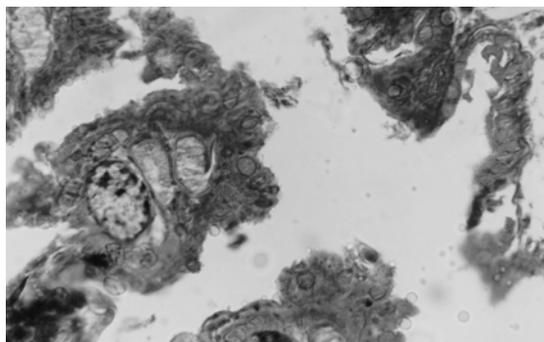
**Figura 4.** Detalhe de uma arco branquial de embrião do grupo controle no estágio 24. Observar figuras de mitose e células do cloro em diferenciação. H.E. 1240X



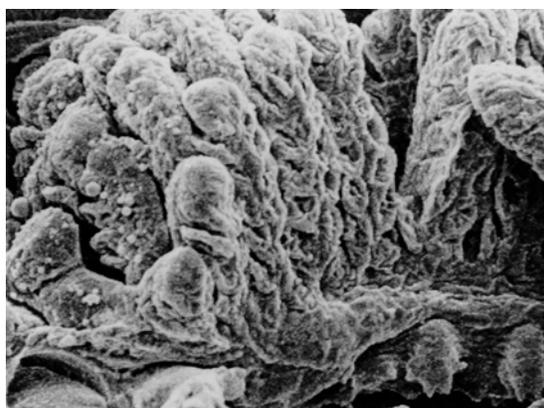
**Figura 5.** Detalhe de células mucosas do epitélio faringeal (à direita) e branquial (à esquerda) de embrião do grupo controle no estágio 36. A.B. pH 2,5 458X

#### Microscopia de Luz e Eletrônica de Varredura do Grupo de Peixes Experimental

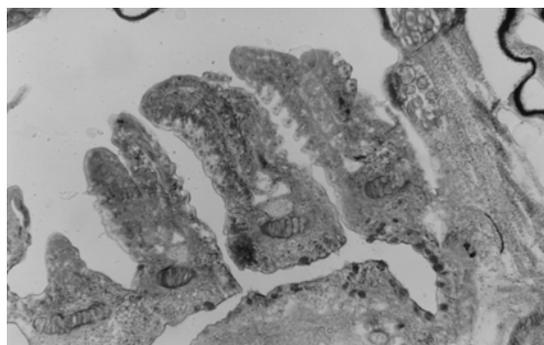
As características morfológicas observadas no grupo controle também se repetiram de modo similar no grupo experimental (Figuras 8, 9 e 10).



**Figura 6.** Faringe (à direita) e arcos branquiais (à esquerda) de embrião do grupo controle no estágio 36. Observar células mucosas no epitélio faríngeo e no epitélio branquial (somente rastelo). A.B. pH 2,5 238X



**Figura 7.** Detalhe de arcos branquiais de um embrião do grupo controle no estágio 30 em Microscopia Eletrônica de Varredura. Observar arco branquial, filamentos, lamelas e rastelo branquial (RB) 200X

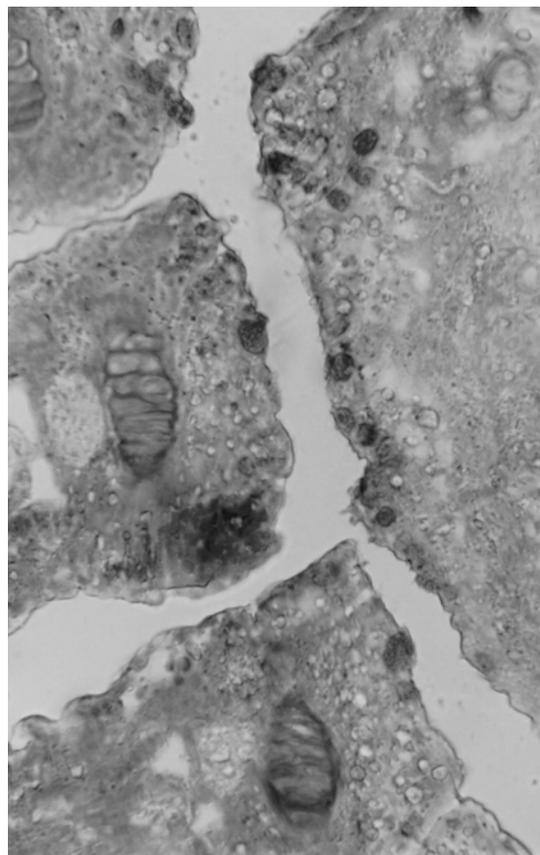


**Figura 8.** Arcos branquiais de embrião do grupo experimental (15 dias) no estágio 36. Observar células mucosas presentes no rastelo branquial e na faringe. A.B. pH 2,5. 180X

#### Análise estatística

Os valores da taxa de natalidade e a média do comprimento total do grupo controle estão expressos na Tabela 1 e, do grupo experimental na

Tabela 2. Utilizando-se Teste de “t”, verificou-se que não houve diferença significativa ( $P > 0,05$ ) entre a taxa de natalidade e a média do comprimento total dos embriões, tanto no grupo controle quanto no grupo experimental.

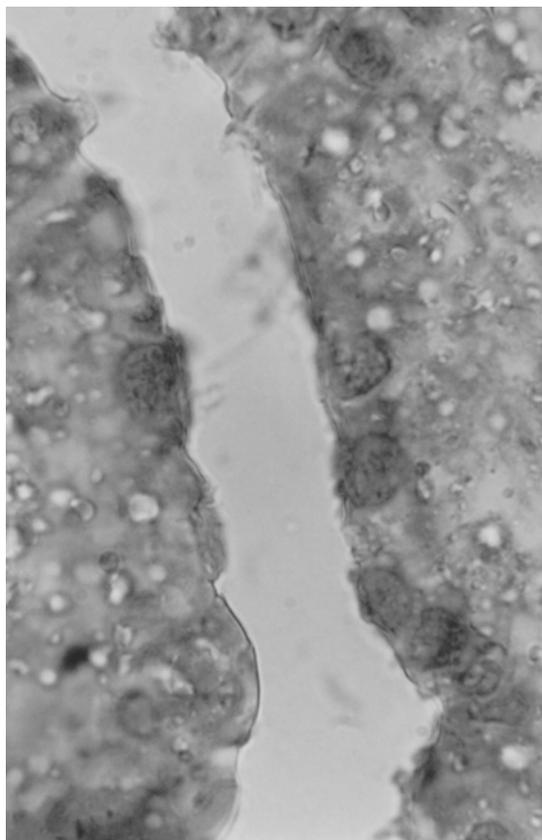


**Figura 9.** Detalhe de arcos branquiais (à esquerda) e faringe (à direita) de embrião do grupo experimental (15 dias) no estágio 36. Observar células mucosas. A.B. pH 2,5. 396X

**Tabela 1.** Taxa de natalidade e comprimento total dos embriões do grupo controle

Animal	Nº de Embriões	Comprimento Total (mm)*
Fêmea 1	24	5,55
Fêmea 2	23	5,30
Fêmea 3	24	5,80
Fêmea 4	25	6,00
Fêmea 5	30	5,70
Fêmea 6	28	5,50
Fêmea 7	27	5,90
Fêmea 8	25	5,85
Fêmea 9	30	5,65
Fêmea 10	24	5,80
Fêmea 11	28	5,90
Fêmea 12	26	5,45
Fêmea 13	29	6,00
Fêmea 14	25	5,65
Fêmea 15	26	5,55

\* Média do comprimento total de todos os embriões de uma mesma fêmea



**Figura 10.** Detalhe do rastelo branquial (à esquerda) e do epitélio faríngeal (à direita) de embrião do grupo experimental no estágio 36. Observar células mucosas. A.B. pH 2,5. 897X

**Tabela 2.** Taxa de natalidade e comprimento total dos embriões do grupo experimental

Animal	Nº de Embriões	Comprimento Total (mm) <sup>*</sup>
Fêmea 1	26	5,90
Fêmea 2	25	5,65
Fêmea 3	24	5,50
Fêmea 4	28	5,70
Fêmea 5	25	5,85
Fêmea 6	27	5,90
Fêmea 7	25	5,85
Fêmea 8	24	5,85
Fêmea 9	23	5,70
Fêmea 10	30	5,80
Fêmea 11	27	5,85
Fêmea 12	24	5,55
Fêmea 13	24	5,80
Fêmea 14	28	6,00
Fêmea 15	27	5,85

<sup>\*</sup> Média do comprimento total de todos os embriões de uma mesma fêmea

## Discussão

Os estudos realizados sobre a formação dos arcos branquiais mostram que esta se inicia na região faríngea, na qual diversas bolsas faríngeas evaginam-se e, quando entram em contato com os sulcos

ectodérmicos invaginantes, fundem-se e formam um disco faríngeo temporário, sendo que esta etapa é comum a todos os vertebrados (Hopper e Hart, 1985). Nos peixes, o disco faríngeo temporário perfura-se, dando origem a um canal, que passa a oferecer uma comunicação entre a cavidade da faringe e o meio externo e, dessa forma, as fendas branquiais são formadas (Morgan, 1974; Waterman, 1985; Miller *et al.*, 1993; González *et al.*, 1996). Os resultados do atual trabalho deixaram evidente que se formam primeiro os arcos branquiais (estágio 24); em seguida os filamentos e o rastelo branquial (estágio 30) e, por último as lamelas (estágio 30). Isso é indicativo de que há um aumento crescente da superfície de contato da brânquia com o meio externo. Segundo Piniagua e Nistal (1983), está é uma característica muito importante para que o sistema respiratório de peixes seja eficaz, o que nos permite extrapolar também para os peixes estudados.

A origem precisa de cada tipo celular presente no epitélio branquial não tem sido considerada relevante (Hughes, 1984); contudo supõe-se que diferenças na origem do epitélio que formará os filamentos e lamelas poderiam explicar a distribuição irregular de cada tipo celular presente no epitélio de peixes adultos (Laurent, 1984; Pisam *et al.*, 1989, 1993). Bertin (1958) considerou que a origem do epitélio branquial é endodérmica, enquanto Morgan (1974) o contradisse, acreditando em uma origem ectodérmica. Estudos mais recentes propuseram uma origem mista ectodérmica e endodérmica para o epitélio branquial de peixes (González *et al.*, 1996). Dessa forma, segundo González *et al.* (1996), as células do cloro, como estão associadas com a camada superficial do epitélio do filamento branquial, em peixes adultos, poderiam derivar da ectoderme. As células do cloro foram observadas por González *et al.* (1996) desde o estágio 24. Através da reação com ZIO, neste trabalho pôde-se comprovar a presença desse tipo celular neste estágio, o qual estava tanto em camadas superficiais, quanto em camadas mais profundas do arco branquial, o que difere dos achados dos últimos autores. Isto nos induziu a pensar que a origem das células do cloro ainda não está esclarecida, como quer entender González *et al.* (1996). Portanto são necessários mais estudos para esclarecimentos da possível origem tanto ectodérmica como endodérmica, do epitélio branquial, tanto nesta espécie como em outras. Em continuidade, ainda no estágio 24, segundo González *et al.* (1996) em *Oncorhynchus mykiss*, as células do cloro são observadas em alta densidade na região do arco branquial que dá origem aos filamentos, resultado também observado no

desenvolvimento ontogenético de *Poecilia vivipara* (guarus). Dessa forma, sugere-se que a presença de grupos de células do cloro no arco branquial durante o desenvolvimento ontogenético induz o surgimento de atividades morfogenéticas que culminam na aparição dos filamentos branquiais.

A fixação com ZIO (Watrin e Mayer-Gostan, 1996) para a detecção de “ionócitos” foi utilizada com o intuito de identificar células do cloro em animais adultos nesta mesma espécie por Souza *et al.* (1999). Dessa forma, tanto no adulto, onde as células do cloro já estão completamente diferenciadas, como no embrião, quando estão em processo de diferenciação, elas possuem precocemente características de células transportadoras de íons, devido à positividade da técnica.

No estágio 30, as células do cloro foram observadas no epitélio interlamelar e na base das lamelas, sendo a mesma distribuição observada nos animais adultos (Laurent, 1984; Sabóia-Morais, 1992; González *et al.*, 1996; Sabóia-Morais *et al.*, 1996; Bablolle *et al.*, 1997). É importante destacar aqui quão precocemente este grupo celular se consolida, o que nos permite refletir que isto acontece devido à sua importância funcional, imediatamente após a eclosão do embrião na vida livre.

No estágio 36 surgiram as células mucosas somente no rastelo branquial (tipo IV, segundo Sabóia-Morais *et al.*, 1996). Estes resultados contrariam aquilo que foi evidenciado em *Oncorhynchus mykiss* por González *et al.* (1996), quando se referiram à presença de células mucosas em toda a brânquia. O fato de esta espécie que estudamos ter característica de desenvolvimento embrionário interno pode explicar essa diferença, à medida que os animais estudados pelo autor acima são de desenvolvimento embrionário externo. Essas células foram reativas ao Alcian Blue pH 2,5, evidenciando a presença de radicais ácidos carboxilados e ou sulfatados (pertencentes aos grupamentos: éster sulfúrico e/ou carboxila). Da mesma forma, as células mucosas da faringe foram reativas, sugerindo também possuir a mesma natureza ácida para seus glicoconjugados, fato também observado por Bablolle *et al.* (1997) em *Yellowtail flounder*. Por esse motivo, propõe-se que as células mucosas do tipo IV do epitélio branquial provavelmente possuam a mesma origem das células mucosas do epitélio faringeal. González *et al.* (1996) acreditaram que as células mucosas originam-se da endoderme, porque estas células surgem como grupos de camadas mais profundas do epitélio branquial da espécie por eles estudada.

O comportamento de cada tipo celular do epitélio branquial pode ser afetado por uma grande quantidade de agentes presentes no fluxo de água (Zaccone, 1981; McDonald, 1983; Mallat, 1985; Sabóia-Morais, 1992; Perry e Laurent, 1993; Araújo *et al.*, 1997, 1999; Souza *et al.*, 1999; Sabóia-Morais *et al.*, 1999). Geralmente, a população de células do cloro aumenta se o agente tóxico acelera a taxa de perda de íons ou prejudica as trocas iônicas (Laurent e Perry, 1991).

Os resultados deste trabalho mostraram que as células do grupo experimental não foram afetadas pela presença de chumbo na água. Isto reforça a nossa tese de que os embriões gerados internamente não são afetados pelos agentes poluentes aos quais o ambiente materno está submetido.

As células mucosas liberam um muco que fica retido junto à superfície celular, principalmente nas micropregas de células pavimentosas (Olson e Fromm, 1973). Este muco tem a função de proteção mecânica ao epitélio, de retardar possíveis infecções fúngicas e ainda prevenir o ataque de parasitas (Fletcher *et al.*, 1976; Gona, 1979). A presença de metais pesados na água irrita o epitélio branquial e estimula o aumento de células mucosas, aumentando, conseqüentemente, o volume de muco liberado (Araújo *et al.*, 1999); contudo, quando esse muco entra em contato com o chumbo, forma-se um filme rígido que pode ser impermeável para os gases (Van Oosten, 1957; Somero *et al.*, 1977; Yang e Thompson, 1996). Essas alterações não foram observadas em nossos resultados, pois as células mucosas não proliferavam por toda a brânquia, mas somente no rastelo branquial. Fato este que corrobora a idéia de que esta espécie realmente consegue proteger os seus embriões das adversidades do meio, através do desenvolvimento interno.

Neste trabalho, não foram observadas todas alterações descritas na literatura causadas pelo chumbo em peixes adultos (Carpenter, 1924, 1925, 1926, 1927, 1930; Araújo *et al.*, 1999). Além disso, verificou-se que a presença de chumbo na água não influenciou a taxa de natalidade, bem como a alteração do tamanho corpóreo total dos embriões. Acreditamos que isso se deva ao fato de os embriões de guarus (*Poecilia vivipara*) serem gerados dentro do ventre materno. Dessa forma, sugere-se, que mesmo sendo interno o desenvolvimento dos embriões desta espécie, eles não possuem contato com nenhum tecido materno que permita troca de metabólitos e ou catabólitos e, por esse motivo, os embriões não foram afetados pela presença do acetato de chumbo. Outro fator que corrobora esta sugestão é a grande quantidade de vitelo observada

junto ao embrião nas diferentes fases observadas. Esses aspectos são indicativos da não-existência de interação materno-fetal nesta espécie.

### Referências

- ARAÚJO, E.J.A. *et al.* Effects of irritant agents on surface ultrastructure of gill rays and filaments of guppy (*Poecilia vivipara*), *Acta Microsc.*, Rio de Janeiro, v. 6 (B), p. 700-701, 1997.
- ARAÚJO, E. J. A. *et al.* Toxic action of heavy metals on the branchial epithelium of guppies (*Poecilia vivipara*). *Acta Microsc.*, Rio de Janeiro, v. 8 (B), p. 355-356, 1999.
- BABLOLE, C. J. *et al.* Ontogeny of the digestive tract during larval development of Yellowtail flounder: a light microscopic and mucous histochemical study. *J. Fish Biol.*, London, v. 51, p. 120-134, 1997.
- BAILLY, Y. *et al.* The neuroepithelial cells of the fish gill filament: Indolamine-immunocytochemistry and innervation. *Anat. Rec.*, New York, v. 233, p. 143-161, 1992.
- BERTIN, L. Organes de la respiration aquatique. In: GRASSÉ, P. P. (Ed.). *Traité de Zoologie*. Paris: Masson, 1958. p. 1303-1341.
- BRANCROFT, J. D.; STVENS, A. *Theory and practice of histological techniques*. London: Churchill Livingstone, 1982.
- BURKHARD-HOLM, P. Lectin histochemistry of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) gill and skin. *Histochem. J.*, London, v. 29, p. 893-899, 1997.
- CARPENTER, K. E. A study of the fauna of rivers polluted by lead mining in the Aberystwyth district of Cardiganshire. *Ann. Appl. Biol.*, Wellesbourne, v. 11, p. 1-8, 1924.
- CARPENTER, K. E. On the biological factors involved in the destruction of river-fisheries by pollution due to lead-mining. *Ann. Appl. Biol.*, Wellesbourne, v. 12, p. 1-10, 1925.
- CARPENTER, K. E. The lead mine as an active agent in river pollution. *Ann. Appl. Biol.*, Wellesbourne, v. 13, p. 1-10, 1926.
- CARPENTER, K. E. The lethal action of soluble metallic salts on fish. *Br. J. Exp. Biol.*, Cambridge, v. 4, p. 378-385, 1927.
- CARPENTER, K. E. Further researches on the action of metallic salts on fishes. *J. Exp. Zool.*, Cambridge, v. 56, p. 407-413, 1930.
- CASTELS, M. T. *et al.* Ultrastructural localization of glycoconjugates in human bronchial glands: the subcellular organization of N- and O- linked oligosacarid chains. *J. Histochem. Cytochem.*, Seattle, v. 40, p. 265-274, 1992.
- FLETCHER, T. C. *et al.* Identification of glycoproteins in globet cells of epidermis and gill paice (*Pleuronectes platessa*) (L), flounder (*Platichthys flesus*) (L), and rainbow trout (*Salmo gairdneri* Richardson). *Histochem. J.*, Dordrecht, v. 8, p. 597-608, 1976.
- GONA, O. Mucous glycoproteins of teleostean fish: a comparative histochemical study. *Histochem. J.*, Dordrecht, v. 11, p. 709-718, 1979.
- GONZÁLEZ, M. E. *et al.* Early gill development in the rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *J. Morphol.*, New York, v. 229, p. 201-217, 1996.
- HOOTMAN, S. R.; PHILPOTT, C. W. Accessory cells in teleost branchial epithelium. *Am. J. Physiol.*, Bethesda, v. 238 (R), p. 199-205, 1980.
- HOPPER, A. F.; HART, no. H. *Foundations of animal development*. New York: Oxford University Press, 1985.
- HUGHES, G. M. General anatomy of the gills. In: HOAR, W. S.; RANDALL, D. J. (Ed.). *Fish physiology*. New York: Academic Press, 1984. p. 1-72.
- KIMMEL, C. B. *et al.* Stages of embryonic development of the zebrafish. *Dev. Dyn.*, New York, v. 203, p. 253-310, 1995.
- LAURENT, P. Gill internal morphology. In: HOAR, W. S.; RANDALL, D. J. (Ed.). *Fish physiology*. New York: Academic Press, 1984. p. 73-183.
- LAURENT, P.; PERRY, S. F. Environmental effects on fish gill morphology. *Physiol. Zool.*, Chicago, v. 64, no. 1, p. 4-25, 1991.
- LAZAR, G. *et al.* Central projections and motor nuclei of the facial, glossopharyngeal, and vagus nerves in mormyrid fish *Gnathonemus petersii*. *J. Comp. Neurol.*, New York, v. 325, p. 343-358, 1992.
- MALLAT, J. Fish gill structural changes induced by toxicants and other irritants: a statistical review. *Can. J. Fish Aquat. Sci.*, Ottawa, v. 42, p. 630-647, 1985.
- MALLAT, J.; PAULSEN, C. H. Gill ultrastructure of the Pacific hagfish *Eptatretus stouti*. *Am. J. Anat.*, New York, v. 177, p. 243-269, 1986.
- McDONALD, D. The effects of H<sup>+</sup> upon the gills of freshwater fish. *Can. J. Zool.*, Ottawa, v. 61, p. 691-703, 1983.
- MILLER, S. A. *et al.* Role for differential cell proliferation in perforation and rupture of chick pharyngeal closing plates. *Anat. Rec.*, New York, v. 237, p. 408-414, 1993.
- MORGAN, M. The development of gill arches and gill blood vessels of the rainbow trout, *Salmo gairdneri*. *J. Morphol.*, New York, v. 142, p. 351-363, 1974.
- MORGAN, M.; TOVELL, P. W. A. The structure of the gill of the trout, *Salmo gairdneri* (Richardson). *Z. Zellforsch. Mikrosk. Anat.*, [S. l.], v. 142, p. 147-162, 1973.
- NEWSTEAD, J. D. Fine structure of the respiratory lamellae of teleostean gills. *Z. Zellforsch. Mikrosk. Anat.*, [S. l.], v. 79, p. 396-428, 1967.
- OLSON, K. R.; FROMM, P. O. A scanning electron microscopic study of secondary lamellae and chloride cells of rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *Zenblaunt. Zellforsch. Heidelberg*, v. 143, p. 439-449, 1973.
- PERRY, S. F.; LAURENT, P. Environmental effects on fish gill structure and function. In: RANKIN, J. C.; JENSEN, F. B. (Ed.). *Fish Ecophysiol*. Chapman end Hall: London, 1993. p. 231-264.

- PINIAGUA, R.; NISTAL, M. *Introducción a la histología animal comparada*. Barcelona: Labor Universitaria, 1983.
- PISAM, M. *et al.* Accessory cells in the gill epithelium of the freshwater rainbow trout *Salmo gairdneri*. *Am. J. Anat.*, Lancaster, v. 184, p. 311-320, 1989.
- PISAM, M. *et al.* Effects of prolactin on  $\alpha$  and  $\beta$  chloride cells in the gill epithelium of the saltwater adapted Tilapia *Oreochromis niloticus*. *Anat. Rec.*, New York, v. 235, p. 275-284, 1993.
- ROMBOUGH, P. J. The gill of fish larvae. Is it primarily a respiratory or an ionoregulatory structure. *J. Fish Biol.*, London, v. 55 (A), p. 186-204, 1999.
- SABÓIA-MORAIS, S. M. T. Comportamento ambiental do epitélio secretor e de revestimento das brânquias do peixe eurialino *Poecilia vivipara* (Pisces - Poeciliidae) submetido a variações de salinidade. 1992. Dissertação (Mestrado) – Instituto de Ciências Biológicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1992.
- SABÓIA-MORAIS, S. M. T. *et al.* Mucous cell types in the branquial epithelium of the euryhaline fish *Poecilia vivipara*. *J. Fish Biol.*, London, v. 49, p. 545-548, 1996.
- SABÓIA-MORAIS, S. M. T. *et al.* Evaluation of the effect of extracts of cerrado plants of gill cells of guppies (*Poecilia vivipara*) used as biomonitors. *Acta Microsc.*, Rio de Janeiro, v. 8 (B), p. 357-358, 1999.
- SCHULTA, R.; CELCH, S. Sialoglycoconjugates in the lipid droplets? *Acta Histochem.*, Jena, v. 88, p. 199-201, 1990.
- SOMERO, G. N. *et al.* Lead accumulation rates in tissues of the estuarine teleost fish, *Gillichthys mirabilis*: salinity and temperature effects. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, New York, v. 6, p. 337-345, 1977.
- SOUZA, P. R. *et al.* Cytochemical and morphometric study of chloride cell modulation behavior in the presence of changes in salinity in guppies (*Poecilia vivipara*). *Acta Microsc.*, Rio de Janeiro, v. 8 (B), p. 351-352, 1999.
- VAN OOSTEN, J. The skin and scales. In: BROWN, M. E. (Ed.). *The physiology of fishes*. New York: Academic Press, 1957. p. 207.
- VERNIER, J. M. Table chronologique du développement embryonnaire de la truite arc-en-ciel, *Salmo gairdneri*. *Rich. Annal. Embryol. Morphog.*, [S. l.], v. 2, p. 495-520, 1969.
- WATERMAN, R. E. Formation and perforation of closing plates in the chick embryo. *Anat. Rec.*, New York, v. 211, p. 450-457, 1985.
- WATRIN, A.; MAYER-GOSTAN, no. Simultaneous recognition of ionocytes and mucous cells in the gill epithelium of turbot and the rat stomach. *J. Exp. Zool.*, New York, v. 276, p. 95-101, 1996.
- WHITEAR, M. Caustive aspects of microridges on the surface of fish epithelia. *J. Submicrosc. Citol. Pathol.*, Bologna, v. 22, p.211-220, 1990.
- YANG, M. S.; THOMPSON, J. A. J. Binding of endogenous copper and zinc to cadmium-induced metal-binding proteins in various tissues of *Perna viridis*. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, New York, v. 30, p. 267-273, 1996.
- ZACCONE, G. Effects of osmotic stress on the chloride and mucous cell in the ephitelium of freshwater teleost *Barbus filamentosus* (Cyprinodontiformis - Pisces). A structural and histochemical study. *Acta Histochem.*, Jena, v. 68, p. 147-159, 1981.
- ZACCONE, G. *et al.* Localization of calbindin d28K-like immunoreactivity in fish gill: A light microscopic and immunoelectron histochemical study. *Regul. Pept.*, Amsterdam, v. 41, p. 195-208, 1992.

Received on November 14, 2000.

Accepted on March 27, 2001.