

UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO  
CENTRO UNIVERSITÁRIO NORTE DO ESPÍRITO SANTO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIODIVERSIDADE TROPICAL

ALINE BARBOSA SANTOS

**Análises Estrutural, Citoquímica e Morfométrica da Epiderme de  
*Pseudauchenipterus affinis* (Steindachner, 1877) (Siluriformes:  
Auchenipteridae)**

São Mateus

2016

ALINE BARBOSA SANTOS

**Análises Estrutural, Citoquímica e Morfométrica da Epiderme de  
*Pseudauchenipterus affinis* (Steindachner, 1877) (Siluriformes:  
Auchenipteridae)**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade Tropical da Universidade Federal do Espírito Santo como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Biodiversidade Tropical.

Orientadora: Dra. Karina Carvalho Mancini

Co-orientador: Dr. Leonardo Ferreira da Silva Ingenito

São Mateus

2016

Dados Internacionais de Catalogação na publicação (CIP)  
(Divisão de Biblioteca Setorial do CEUNES - BC, ES, Brasil)

---

- S237a Santos, Aline Barbosa, 1990-  
Análise estrutural, citoquímica e morfométrica da epiderme de  
*Pseudauchenipterus affinis* (Steindachner, 1877) (Siluriformes:  
Auchenipteridae) / Aline Barbosa Santos. – 2016.  
74 f. : il.

Orientador: Karina Carvalho Mancini.  
Coorientador: Leonardo Ferreira da Silva Ingenito.  
Dissertação (Mestrado em Biodiversidade Tropical) –  
Universidade Federal do Espírito Santo, Centro Universitário  
Norte do Espírito Santo.

1. Morfologia. 2. Pele. 3. Bagre (Peixe). 4. Microscopia óptica.  
5. Células caliciformes. I. Mancini, Karina Carvalho. II. Ingenito,  
Leonardo Ferreira da Silva. III. Universidade Federal do Espírito  
Santo. Centro Universitário Norte do Espírito Santo. IV. Título.

CDU: 502

---

**" Análise estrutural, citoquímica e morfométrica da epiderme de *Pseudauchenipterus affinis* (Steindachner, 1877) (Siluriformes: Auchenipteridae)"**

**ALINE BARBOSA SANTOS**

Dissertação apresentada à Universidade Federal do Espírito Santo, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade Tropical, para obtenção do título de Mestre em Biodiversidade Tropical.

Aprovada: 22/03/2016.



---

Profª. Drª. Karina Carvalho Mancini  
Universidade Federal do Espírito Santo  
Orientadora



---

Prof. Dr. Luiz Fernando Duboc da Silva  
Universidade Federal do Espírito Santo  
Examinador Interno



---

Prof. Dr. Jorge Dergam  
Universidade Federal de Viçosa  
Examinador Externo

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por me dar sabedoria, fé, colocar no meu caminho pessoas tão especiais, e permitir que eu chegasse até aqui em meio as dificuldades.

Aos meus irmãos, mãe, pai por me apoiarem em todas as minhas escolhas.

Ao meu esposo Fabrício pelo incentivo, compreensão e carinho.

A minha querida orientadora Profa. Dra. Karina Carvalho Mancini, a ela toda minha admiração e gratidão por abrir tantas portas. Mesmo em meio aos contratemplos e dificuldades enfrentadas estive pronta a ajudar, sempre com um plano “B”. Muito obrigada pelo seu profissionalismo, paciência, por me ensinar tantas coisas que me ajudaram a crescer, na vida acadêmica e pessoal.

Ao meu co-orientador Prof. Dr. Leonardo Ferreira da Silva Ingenito principalmente pela disposição, atenção e pelo esforço, sempre muito empenhado. Obrigada pelo incentivo, pelos ensinamentos, discussões e sugestões que me ajudaram muito e foram de grande importância para realização deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Luiz Fernando Duboc pelo grande auxílio nas análises estatísticas, disponibilidade e atenção. Obrigada por aceitar fazer parte da banca de dissertação.

A Profa. Dra. Juliana Castro Monteiro pela ajuda na metodologia das análises morfométricas e estágio supervisionado.

Ao Prof. Dr. Jorge Abdala Dergam dos Santos por ter aceito o convite para fazer parte da banca de dissertação.

Aos alunos do Laboratório de Biologia Estrutural pela colaboração.

A Andressa (apoio técnico) pela amizade, companhia de laboratório, por colaborar com o processamento de material, sempre disposta a ajudar. Sua ajuda foi indispensável. Obrigada pelas sugestões, incentivo e parceria nas caminhadas.

A Ana Maria pela alegre amizade, descontração no convívio de laboratório e processamento de material. Muito obrigada por sua companhia.

A Lorena pela amizade, incentivo, rotina do laboratório e auxílio nas contagens de células.

Ao Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade Tropical pela oportunidade de desenvolver este trabalho.

Aos professores do programa por contribuírem para minha formação.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de estudos.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq, Processo 350672/2011-3, bolsa DCR para LFSI), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES, bolsa PROFIX para LFSI), e Fundação Estadual de Amparo à Pesquisa do Estado do Espírito Santo (FAPES, Processos 53132203/2011, bolsa e projeto DCR para LFSI; e 68856598/2014, projeto PROFIX para LFSI) pelo apoio financeiro.

Enfim, meus sinceros agradecimentos a todos que contribuíram de alguma forma direta ou indiretamente para realização deste trabalho, mas me que falhou a memória.

*Tudo tem o seu tempo determinado, e há tempo para todo propósito debaixo do céu:  
há tempo de nascer e tempo de morrer; tempo de plantar e tempo de arrancar o que se plantou;  
tempo de derrubar e tempo de edificar;  
tempo de chorar e tempo de rir; tempo de prantejar e tempo de saltar de alegria;  
tempo de espalhar pedras e tempo de ajuntar pedras; tempo de abraçar e tempo de afastar-se de abraçar;  
tempo de buscar e tempo de perder; tempo de guardar e tempo de deitar fora;  
tempo de rasgar e tempo de coser; tempo de estar calado e tempo de falar;  
tempo de amar e tempo de aborrecer; tempo de guerra e tempo de paz.*

*Eclesiastes 3:1-8*

## RESUMO

A epiderme nos peixes apresenta alta complexidade e diversidade de estruturas, sendo considerada um tecido multifuncional ainda pouco compreendido. Embora seja um grupo com grande abundância de espécies, apenas um pequeno número de Siluriformes teve sua epiderme analisada. A descrição das estruturas da epiderme dos bagres pode contribuir com informações filogenéticas entre os Siluriformes ou auxiliar na compreensão das relações entre a morfologia e o ambiente, as quais permanecem pouco conhecidas. O presente estudo representa a primeira descrição estrutural da epiderme de um membro da família Auchenipteridae. A estrutura, citoquímica e morfometria da epiderme do bague *Pseudauchenipterus affinis* foi investigada em quatro regiões do corpo ao longo de um ano. A pele de *P. affinis* é formada pela epiderme, derme e tecido subcutâneo em todas as regiões analisadas. A epiderme consiste em três tipos principais de células (epiteliais, de muco e alarme) e em menor quantidade células de pigmento, células granulares eosinofílicas e linfócitos. Foram ainda descritas estruturas sensoriais (papilas gustativas, órgãos ampulares e neuromastos canal). Análises citoquímicas detectaram glicoproteínas neutras e ácidas na secreção das células de muco e conteúdo proteico nas células de alarme. As características morfológicas e citoquímicas encontradas estão de acordo com aquelas descritas para outros Ostariophysi. Análises morfométricas evidenciaram que (1) existe dimorfismo sexual em relação à altura do epitélio; (2) a densidade de células de muco é menor que das células de alarme e epiteliais; (3) as diferentes regiões do corpo não são uniformes com relação à densidade de células muco, altura do epitélio e diâmetro, como relatado na literatura; (4) a região lateral anterior apresentou maior altura do epitélio e diâmetro das células de muco quando comparada a região lateral posterior; (5) a densidade de células de muco e células de alarme, a altura do epitélio e o diâmetro das células de muco sofreram variações sazonais, provavelmente como resultado da elevação da salinidade no local de coleta durante o estudo.

**Palavras-chave:** Morfologia, pele, bagres, célula de muco, microscopia de luz.

## ABSTRACT

The epidermis in fishes has highly complex and diverse structures and is considered a multifunctional tissue still poorly understood. Although it is a group with abundance of species, only a small number of Siluriformes had their epidermis analyzed. The description of the epidermal structures of catfishes can contribute with phylogenetic information in Siluriformes or help on the understanding of the relationship between morphology and environment, which remain little known. This study represents the first structural description of the epidermis of a member of the family Auchenipteridae. The structure, cytochemistry and morphometry of the *Pseudauchenipterus affinis* catfish epidermis was investigated in four body regions throughout the one year. The *P. affinis* skin is formed by epidermis, dermis and subcutaneous tissue in all analyzed regions. The epidermis consists of three major cell types (epithelial, mucus and alarm) and in fewer amount of pigment, granular eosinophilic and lymphocytes cells. There were also described sensory structures (taste buds, ampullary organs and neuromasts channel). Cytochemical analysis detected neutral and acid glycoproteins in the mucus cells secretion, and protein in the alarm cells. The morphological and cytochemical features are consistent with those described for other Ostariophysi. Morphometric analysis highlighted that (1) there is sexual dimorphism in relation to the height of the epithelium; (2) the mucus cell density is smaller than alarm and epithelial cells; (3) the different body regions is not uniform in relation to mucus cells density, height and diameter of the epithelium, such as reported in the literature; (4) the anterior lateral body region showed greater epithelium height and mucous cells diameter compared to posterior lateral body region; (5) mucus and alarm cells density, epithelial height and diameter of the mucus cells had seasonal variations, probably as result of the salinity increase in the collection site during the study.

**Keywords:** Morphology, skin, catfish, mucus cell, light microscopy.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1.** Algumas funções propostas para a secreção mucosa dos peixes, organizadas em funções que envolvem a produção e manutenção da camada de muco que recobrem o peixe, e funções que envolvem a liberação de muco e de substâncias associadas para a água circundante. Componentes do muco são produzidos por uma variedade de células na epiderme dos peixes (e.g. células de muco, epiteliais e de alarme). Modificação da Fig. 1 em Shephard (1994) e da Fig. 1 em Elliott, (2011a)..... 24
- Figura 2.** *Pseudauchenipterus affinis* coletado no rio São Mateus, São Mateus, Espírito Santo, Brasil - CZNC 1213 - 76,8mm. Locais onde foram obtidas as amostras. (1) Lateral anterior, (2) lateral posterior, (3) dorsal e (4) ventral. (Foto de Leonardo Ferreira da Silva Ingenito)..... 28
- Figura 3.** Análise de Imagem no software Image-Pro Plus para densidade volumétrica. Células epiteliais..... 31
- Figura 4.** Análise de Imagem no software Image Pro Plus para altura do epitélio. .... 32
- Figura 5.** Análise de Imagem no software Image-Pro Plus para diâmetro das células de muco.. 32
- Figura 6.** Micrografias de luz de secções transversais do epitélio de *P. affinis* em H/E. (A) Estrutura geral do epitélio dorsal formado por tecido epitelial (TE) com órgão ampular (OA), tecido conjuntivo (TC), tecido subcutâneo (TS) e tecido muscular (TM). (B e C) Detalhes dos componentes celulares da epiderme nas regiões lateral anterior e ventral, respectivamente; célula de muco (cm) com núcleo basal (n); células epiteliais (ce); células de alarme (ca) mononucleadas (n) e binucleadas (seta) e células granulares eosinofílicas (cg)..... 42
- Figura 7.** Micrografias de luz de secções transversais da epiderme em diferentes regiões do corpo de *P. affinis* (PAS). (A e B). Organização histológica geral da pele dorsal, tecido epitelial (TE), conjuntivo (TC), subcutâneo (TS) e muscular (TM), estruturas sensoriais - papila gustativa (P) e órgão ampular (OA). Estrutura geral do epitélio dorsal (C), ventral (D), lateral anterior (E) e lateral posterior (F) com células de muco (cm), mostrando forte reação na detecção de glicoproteínas,

células epiteliais (ce), células de alarme (ca) binucleadas (n), células granulares eosinofílicas (cg), linfócitos (seta) e melanóforos (m). Vasos sanguíneos (vs) na derme. .... 43

**Figura 8.** Micrografias de luz de secção transversal e longitudinal da epiderme de diferentes regiões do corpo de *P. affinis* (PAS). (A) Secção transversal da epiderme lateral anterior, organização das células em estratos superficial, constituído por células de muco (cm) núcleo basal (n) e células epiteliais (ce); estrato intermediário formado por células de alarme (ca) e epiteliais (ce); e o estrato basal formado por uma camada única de células epiteliais (ce) indiferenciadas. (B e C) secções longitudinais das regiões lateral anterior e ventral do epitélio, mostrando sob um diferente ângulo a organização estrutural da epiderme formada por células de muco (cm), com núcleo (n) deslocado lateralmente, células epiteliais (ce), células de alarme (ca), e melanóforos (m). .... 44

**Figura 9.** Micrografias de luz de secções transversais da epiderme de diferentes regiões do corpo de *P. affinis* (AB pH2.5/PAS). (A-D) Estrutura geral do epitélio dorsal, ventral, lateral anterior e posterior; reação positiva do conteúdo das células muco. (E-H) Detalhes da organização epidérmica células de muco (cm) com forte reação e conteúdo repleto de grânulos glicoproteicos. Fraca reação nas células epiteliais (ce), reação negativa nas células de alarme (ca), e reação positiva nas células granulares eosinofílicas (cg). Observar numerosas células de muco (seta e cm) liberando seu conteúdo sobre a superfície da pele (cabeça de seta). .... 45

**Figura 10.** Micrografias de luz dos órgãos sensoriais na epiderme de *P. affinis* (PAS). (A-C) Secções transversais das papilas gustativas, conjunto células epiteliais especializadas (asterisco), área receptora (cabeça de seta). Células epiteliais (ce) não especializadas. (D-G, I e J) Secções transversais órgãos ampulares isolados ou (E) agrupados, conjunto de células receptoras (cr) e células de suporte (cs). Detalhe das células epiteliais cúbicas (cabeça de seta) revestindo o ducto e material glicoproteico (asterisco). (H) Secção longitudinal de uma papila gustativa e órgãos ampulares (oa). (K) Secção transversal do canal da linha lateral com um neuromastos canal, canal ossificado (od) revestido por células epiteliais (ce). Células sensoriais ciliadas (csc) apoiadas sobre as células de suporte (cp). .... 46

**Figura 11.** Micrografias de secções transversais da pele de *P. affinis* de distintas regiões do corpo com diferentes técnicas histoquímicas. (A) Epitélio dorsal, tecido epitelial (TE), conjuntivo (TC),

subcutâneo (TS) e muscular (TM). (B) Detalhe do tecido epitelial (TE), células de muco (cm), epiteliais (ce) e alarme (ca) (Tricrômico de Mallory). (C e D) Tecido epitelial em vermelho (TE) constituído por células de muco (cm), epiteliais (ce) e de alarme (ca); e derme formada por tecido conjuntivo (TC) em azul e abaixo tecido subcutâneo (TS) (Tricrômico de Masson). (E e F) Tecido epitelial em azul formado por células de muco (cm) com reação negativa e células de alarme (ca), epiteliais (ce) e granular (cg) com reação positiva. Derme constituída de tecido conjuntivo em verde, e melanóforos (m) (Azul de Bromofenol). ..... 47

**Figura 12.** Comparação da altura do epitélio entre machos e fêmeas de *P. affinis* em diferentes regiões do corpo (Teste Mann-Whitney  $p < 0.05$ ). (A) Região Lateral anterior. (B) Lateral posterior. (C) Dorsal. (D) Ventral. .... 48

**Figura 13.** Comparação da altura do epitélio (A), densidade de células de muco (B) e diâmetro das células de muco (C) entre as regiões do corpo (LA-lateral anterior, LP-posterior, D-dorsal, V-ventral,) em *P. affinis* (Teste Kruskal-Wallis  $p < 0.05$ ). ..... 49

**Figura 14.** Comparação da densidade de células de muco na epiderme de diferentes regiões do corpo de *P. affinis* ao longo ano. C1 (fevereiro/verão); C2 (maio/outono); C3 (agosto/inverno); C4 (novembro/primavera) (Teste Kruskal-Wallis  $p < 0.05$ ). (A) Região lateral anterior. (B) Lateral posterior. (C) Dorsal. (D) Ventral. .... 50

**Figura 15.** Comparação da densidade de alarme na epiderme de diferentes regiões do corpo de *P. affinis* ao longo ano C1 (fevereiro/verão); C2 (maio/outono); C3 (agosto/inverno); C4 (novembro/primavera). (Teste Kruskal-Wallis  $p < 0.05$ ). (A) Região lateral anterior. (B) Lateral posterior. (C) Dorsal. (D) Ventral. .... 51

## SUMÁRIO

<b>RESUMO</b> .....	viii
<b>ABSTRACT</b> .....	ix
<b>LISTA DE ILUSTRAÇÕES</b> .....	x
<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	14
1.1. Superordem Ostariophysi .....	14
1.2. Ordem Siluriformes .....	14
1.3. Família Auchenipteridae .....	15
1.3.1. Pseudauchenipterus .....	16
1.4. A epiderme nos teleósteos .....	17
1.5. Principais tipos de células da epiderme .....	18
1.5.1. Células Epiteliais .....	18
1.5.2. Células de Muco (Caliciformes).....	19
1.5.3. Células de Alarme (Claviformes).....	20
1.6. Receptores sensoriais epiteliais .....	21
1.7. Aspectos funcionais .....	23
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	27
<b>3. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	28
3.1. Local de Coleta .....	28
3.2. Microscopia de Luz .....	29
3.3. Análises Estereológicas e Morfométricas .....	31
3.4. Análises Estatísticas.....	33
<b>4. RESULTADOS</b> .....	34
4.1. Estrutura geral da pele .....	34
4.2. Epiderme .....	34
4.3. Derme.....	40
<b>5. DISCUSSÃO</b> .....	52
<b>6. CONCLUSÕES</b> .....	61
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	63

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1. Superordem Ostariophysi

Os Ostariophysi (Teleostei, Actinopterygii), um dos maiores grupos de Teleostei, representam aproximadamente 28% das espécies de peixes conhecidas no mundo, correspondendo a maioria (cerca de 75%) de peixes de água doce (BONE & MOORE, 2008; NELSON, 2006). Os Ostariophysi estão presentes em todos os continentes, exceto na Antártida, Groenlândia e Nova Zelândia (NELSON, 2006).

Esse táxon é dividido em duas séries, Anotopterygii e Otopterygii (NELSON, 2006). Atualmente, a superordem abrange cinco ordens – Gonorynchiformes (*milkfishes*), Cypriniformes (carpas, barbos, dojôs), Characiformes (tetras, lambaris, pacus), Gymnotiformes (poraquês, sarapós, ituí) e Siluriformes (bagres, cascudos, abotoados e mandis) distribuídas em 68 famílias, 1.075 gêneros e cerca de 7.900 espécies (NELSON, 2006).

### 1.2. Ordem Siluriformes

A ordem Siluriformes é o maior, mais diversificado e amplamente distribuído grupo entre os Ostariophysi, com cerca de 470 gêneros, 36 famílias e 3000 espécies (FERRARIS JR., 2007).

Em geral, as espécies deste táxon possuem o corpo desprovido de escamas, sendo recoberto por uma pele espessa. Normalmente possuem três pares de barbilhões podendo chegar a quatro pares: um par nasal, um (ou dois) par(es) maxilar(es) e dois pares inferiores ou mentais. Os barbilhões são providos de numerosas papilas gustativas utilizadas na detecção de alimentos. Frequentemente possuem um raio espinhoso nas nadadeiras dorsal e peitorais, osso maxilar sem dentes ou com dentes rudimentares e nadadeira adiposa geralmente presente (TEUGELS, 1996; NELSON, 2006). Diversas espécies de bagres são conhecidas por serem venenosas, podendo causar ferimentos graves através de espinhos e injetar um veneno produzido por células glandulares (NELSON, 2006). São animais de atividade predominantemente noturna com pouca movimentação, orientando-se principalmente por quimiorrecepção, habitando fundo de rios entre pedras e vegetação (BRITSKI, 1981).

A ordem inclui desde indivíduos que não ultrapassam 20 mm quando adultos (e.g. Scoloplacidae) até de comprimento superior a 2 m podendo chegar a quase 3 m (e.g. Siluridae, Pimelodidae e Pangasiidae) (TEUGELS, 1996; BRITTO, 2002; NELSON, 2006). Representantes de Siluriformes exibem uma ampla variedade de hábitos alimentares desde onívoros (e.g. Astroblepidae), herbívoros (e.g. Loricariidae), carnívoros (e.g. Auchenipteridae), planctófagos (e.g. Hypophthalmidae), hematófagos (e.g. Trichomycteridae) ou ainda lepidófagos (e.g. Trichomycteridae) (BRITTO, 2002).

A maioria dos Siluriformes é restrita às águas continentais, no entanto algumas espécies das famílias Auchenipteridae, Aspredinidae e Pangasidae são resistentes à águas salobras encontradas em estuários ou às vezes no mar, e duas famílias, Ariidae e Plotosidae, são exclusivamente marinhas (TEUGELS, 1996; NELSON, 2006). São amplamente distribuídos, encontrados em todos os continentes (NELSON, 2006). Esta variedade morfológica e comportamental de Siluriformes é refletida em sua complexidade taxonômica (BRITTO, 2002).

A maior diversidade de bagres ocorre na região tropical, principalmente na América do Sul, África Subsaariana, e sul e sudeste da Ásia (TEUGELS, 1996; de PINNA, 1998). Na região neotropical, os Siluriformes compreendem o segundo maior grupo de peixes, onde ocorrem aproximadamente 60% das espécies em 14 famílias (de PINNA, 1998; BRITTO, 2002; NELSON, 2006; FERRARIS JR, 2007).

### **1.3.Família Auchenipteridae**

Dentre as famílias de Siluriformes, Auchenipteridae é restrita à região Neotropical, representada por 20 gêneros e cerca de 90 espécies (FERRARIS JR, 2007) que estão distribuídas em duas subfamílias: Centromochlinae e Auchenipterinae (AKAMA, 1999).

Auchenipteridae, cujas espécies são conhecidas popularmente como cantaraí, fidalgo, mandubé, palmito, judeu, ximbé, cangati e cachorro de padre, é representada por um grupo de bagres de pequeno e médio porte. Várias sinapomorfias sustentam a monofilia da família, sendo caracterizados principalmente pelo dimorfismo sexual da nadadeira anal (transformado em órgão intromitente para condução de esperma nos machos sexualmente maduros) e por inseminação interna, característica única entre as famílias de Siluriformes (AKAMA, 1999; BIRINDELLI, 2010). São peixes geralmente de hábitos crepusculares ou noturnos, mas na maioria das formas a

biologia não é bem conhecida (BIRINDELLI, 2010; SARMENTO-SOARES & MARTINS-PINHEIRO, 2007). A maior parte dos auquenipterídeos alimenta-se de insetos na superfície da água, enquanto alguns são primariamente planctívoros ou piscívoros (FERRARIS JR, 2003).

Em várias famílias de Siluriformes é conhecida a capacidade de produção de sinais sonoros (KAATZ, 2002). Doradoidea (Doradidae + Auchenipteridae), em particular, apresenta uma variação bioacústica diversificada. Espécies deste táxon são capazes de emitir sinais sonoros em contextos agonísticos, reprodutivos e de perturbações, além de exibirem habilidade de distinção de seus próprios sons (KAATZ & STEWART, 2012).

### ***1.3.1. Pseudauchenipterus***

Entre os gêneros de Auchenipteridae, *Pseudauchenipterus* possui uma extensa e típica distribuição, particularmente são encontrados no estuário em rios desde a Venezuela ao rio Doce (Espírito Santo, Brasil). Apenas quatro espécies são consideradas válidas, todas encontradas em rios brasileiros: *P. affinis*, *P. nodosus*, *P. flavescens* e *P. Jequitinhonha*. As principais características deste grupo são a presença de papilas dérmicas na região umeral, primeiros raios da nadadeira anal prolongados (nos machos) e tolerância a elevadas taxas de salinidade (AKAMA, 1999). A resistência deste táxon às águas salobras ou salgadas é um dos poucos casos conhecidos de Siluriformes tolerantes à alta salinidade, e único entre os gêneros de Auchenipteridae.

*Pseudauchenipterus affinis*, objeto do presente estudo, ocorre nos rios litorâneos do Espírito Santo (rio Doce) e extremo sul da Bahia (rio Jucurussu, rio Itanhén, rio Mucuri) (AKAMA, 1999). Seus representantes possuem porte médio, e corpo afilado. Apresentam coloração acinzentada, principalmente no dorso. Nos indivíduos vivos, as nadadeiras anal e caudal são de tonalidade amarelada. Possuem hábito generalista alimentando-se principalmente de invertebrados aquáticos, insetos, matéria vegetal e detritos (AKAMA, 1999; SARMENTO-SOARES & MARTINS-PINHEIRO, 2007). São poucos os estudos em relação ao gênero, limitando-se à sistemática e taxonomia (AKAMA, 1999).

#### 1.4. A epiderme nos teleósteos

A epiderme é um epitélio estratificado multifuncional cuja principal e mais importante função é atuar como a primeira barreira entre o organismo e o meio. Nos ambientes aquáticos, ela funciona como um importante sistema de defesa contra patógenos, uma vez que os peixes são continuamente expostos a múltiplos desafios microbianos em seu hábitat (RAKERS *et al.*, 2010). Além da função de proteção, a epiderme nos peixes pode desempenhar outros papéis essenciais, como comunicação, percepção sensorial, locomoção, respiração, regulação iônica, excreção e regulação térmica (ELLIOTT, 2011a, 2011b).

A composição da epiderme dos peixes está relacionada à mucogênese (formação de camada mucosa composta por células vivas), diferente da queratinização (formação de uma camada externa de células mortas queratinizadas) encontrada nos tetrápodes. Estas formas de desenvolvimento estão relacionadas à adaptação ambiental (HENRIKSON & MATOLTSY, 1968a; MITTAL *et al.*, 1995). Tipos de células queratinizantes ocorrem predominantemente em animais terrestres, enquanto que as células produtoras de muco são encontradas em formas anfíbias e aquáticas (HENRIKSON & MATOLTSY, 1968a; MITTAL *et al.*, 1995). A queratinização na epiderme de peixes pode ocorrer sob a forma de estruturas especializadas, como tubérculos nupciais ou órgãos de contato, projeções córneas como órgãos de fixação nos lábios e nadadeiras e placas poliédricas nos bagres asiáticos do gênero *Bagarius* Bleeker, as quais servem para ajudar a proteger o peixe contra danos mecânicos (MITTAL & WHITEAR, 1979; MITTAL & MUNSHI, 1970; WHITEAR, 1986; WILEY & COLLETTE, 1970).

A epiderme nos peixes é organizada em camadas constituídas por diferentes células. A camada superficial, em contato com a superfície externa, é formada por células epiteliais achatadas. Abaixo, a camada intermediária é composta por vários tipos de células, incluindo as glândulas unicelulares (células de muco e alarme), células sensoriais, ionócitos, além das células epiteliais (ZACCONE *et al.*, 2001; ELLIOTT, 2011b; CHANG & HWANG, 2011). A camada basal é uma camada única indiferenciada de células epiteliais, considerada como um reservatório de células estaminais. Esta camada se encontra ligada à membrana basal por meio de junções celulares e conecta firmemente a epiderme à derme (LE GUELLEC *et al.*, 2004).

Dentre os teleósteos, a pele dos Siluriformes tem sido objeto de vários estudos através de diferentes técnicas. A histologia da pele através da microscopia óptica é conhecida em alguns

bagres (HERRICK, 1901; HENRIKSON & MATOLTSY, 1968b; MITTAL & MUNSH, 1970; ZACCONE & CASCIO, 1981; GARG & MITTAL, 1990; AGRAWAL & MITTAL, 1992; ARRATIA & HUAQUÍN, 1995; ZACCONE *et al.*, 2001; PARK *et al.*, 2003; GUERRA *et al.*, 2006; BONILLA LIZARAZO *et al.*, 2008; DAMASCENO *et al.*, 2012). Na literatura a ultraestrutura e histoquímica é analisada em vários gêneros de bagres (MITTAL *et al.*, 1976; MITTAL & WHITEAR, 1979; AL-HASSAN *et al.*, 1987; HENDERSON, 1995; FASULO *et al.*, 1998; PARK *et al.*, 2003; KUMARI *et al.*, 2009; AL- BANAW *et al.*, 2010; GARG *et al.*, 2010; DAMASCENO *et al.*, 2012). Estruturas sensoriais como os mecanorreceptores da linha lateral, eletorreceptores e quimiorreceptores foram analisados em alguns estudos nos Siluriformes (NORTHCUTT *et al.*, 2000; WHITEHEAD *et al.*, 2000; WHITEHEAD *et al.*, 2003; NORTHCUTT, 2005; WHITEHEAD *et al.*, 2009; GAUTHIER *et al.*, 2015).

## **1.5. Principais tipos de células da epiderme**

Para lidar com os estresses ambientais (e.g. temperaturas flutuantes, estresse osmótico e infecção por microrganismos) os peixes teleósteos têm desenvolvido vários tipos de células epidérmicas as quais realizam funções distintas a fim de protegê-los (RAKERS *et al.*, 2010).

### ***1.5.1. Células Epiteliais***

Assim como na epiderme de outros vertebrados, a unidade estrutural básica da epiderme dos peixes é a célula epitelial (HENRIKSON & MATOLTSY, 1968a; ELLIOTT, 2011b), conhecida por várias classificações, incluindo célula de Malpighi, célula epidérmica, célula contendo filamento, célula filamentosa, célula poligonal, célula poliédrica, queratócito, queratinócito, célula principal e célula comum (WHITEAR, 1986; ELLIOTT, 2011b). Nos peixes teleósteos, as células epiteliais são mitoticamente ativas em todas as camadas epidérmicas, apesar de ser mais comum nas camadas inferiores do epitélio (ELLIOTT, 2011b; HENRIKSON & MATOLTSY, 1968b).

As células epiteliais normalmente são pequenas, em relação aos demais tipos de células da epiderme, e podem variar na forma dependendo da sua localização (ELLIOTT, 2011b). As células da camada basal são cuboides ou colunares, enquanto que as células superficiais são

frequentemente achatadas. A presença de filamentos intermediários (tonofilamentos) é uma característica marcante de seu citoplasma (WHITEAR, 1986) e confere resistência mecânica (ELLIOTT, 2011b; HENRIKSON & MATOLTSY, 1968b). As células epiteliais superficiais produzem secreções mucosas, as quais auxiliam na proteção do peixe contra agentes patogênicos e outras agressões. Essa secreção mucosa forma uma cutícula na superfície da pele, composta por secreções oriundas de vários tipos celulares distintos, a qual é continuamente renovada e descartada (ELLIOTT, 2011b; WHITEAR, 1970). A membrana plasmática das células epiteliais superficiais é ornamentada com micropregas ou micropapilas, as quais formam um padrão espécie-específico (FISHELSON, 1984). Essas ornamentações auxiliam na retenção das substâncias secretadas e fornecem maior superfície de contato melhorando a eficiência da secreção na superfície celular (WHITEAR, 1970).

### ***1.5.2. Células de Muco (Caliciformes)***

As células caliciformes são glândulas exócrinas unicelulares comuns à maioria dos grupos de animais, presentes na superfície corporal de quase todos os peixes (WHITEAR, 1986; ELLIOTT, 2011a). Elas apresentam geralmente, formato de cálice com núcleo basal alongado e citoplasma volumoso globular rico em secreção (daí a denominação caliciforme).

De acordo com WHITEAR (1986), nos peixes existem dois tipos células caliciformes, as mucosas e as serosas. As secreções mucosas contêm glicoproteínas, que geralmente apresentam coloração fracamente basofílica ou permanecem sem coloração em cortes histológicos, ao passo que as serosas contêm proteínas básicas e, conseqüentemente, apresentam coloração acidofílica (BLACKSTOCK & PICKERING, 1980). Células caliciformes mucosas são muito mais comuns do que as serosas. Mesmo nos peixes em que as células caliciformes serosas ocorrem, elas podem ser menos numerosas em relação às células caliciformes mucosas (WHITEAR, 1986). Neste trabalho serão abordadas somente as células caliciformes mucosas ou células de muco.

As células de muco estão situadas frequentemente nas camadas intermediárias e superficiais da epiderme. Evidências sugerem que estas se diferenciam a partir de células epiteliais nas camadas inferiores da epiderme e, quando diferenciadas, perdem a capacidade de sofrer divisão mitótica (ELLIOTT, 2011b).

Células de muco imaturas, geralmente, são arredondadas e aumentam de tamanho à medida que avançam em direção à superfície da epiderme. O núcleo e as organelas geralmente posicionam-se na periferia celular, à medida que as secreções são sintetizadas na célula em maturação (ELLIOTT, 2000). Ao atingir a superfície da pele, emergem entre células epiteliais adjacentes, ocorrendo a ruptura da membrana plasmática na região apical, por onde o conteúdo celular é liberado, seguido de morte celular (HARRIS & HUNT, 1975).

Uma variedade de funções tem sido atribuída às secreções caliciformes, incluindo lubrificantes que reduzem a fricção e danos mecânicos, funções de proteção contra microorganismos e regulatórias, como na osmorregulação, e trocas gasosas. A substituição contínua das secreções de muco a partir de células caliciformes mucosas pode impedir a colonização por microrganismos patogênicos na superfície do corpo (ELLIOTT, 2000).

### ***1.5.3. Células de Alarme (Claviformes)***

Além das células epiteliais e de muco, a epiderme dos peixes possui outros tipos de células secretoras. Um exemplo são as células de alarme presentes em abundância entre os Ostariophysi (WHITEAR, 1986; NELSON, 2006; ELLIOTT, 2011b).

As células de alarme estão frequentemente localizadas nas camadas intermediárias do epitélio e, diferentemente das caliciformes mucosas, não possuem abertura para superfície da epiderme. São células geralmente grandes, de formato redondo/oval ou em forma de clava (daí a denominação claviforme), com um ou dois núcleos centrais (HENRIKSON & MATOLTSY, 1968b; PFEIFFER, 1977).

Embora sua função não se encontre definitivamente estabelecida, considera-se que estas células sejam multifuncionais (ZACCONI *et al.*, 2001). Nos Ostariophysi, estas células possuem um feromônio (substância de alarme) que é liberado quando a epiderme é danificada (e.g. predação), lesionando estas células e alertando os demais peixes do cardume (DUBOC, 2007).

As células de alarme podem ainda produzir substâncias que auxiliam na cicatrização de ferimentos na epiderme (AL-HASSAN *et al.*, 1991; RALPHS & BENJAMIN, 1992; PÄKK, 2012). Além disso, estudos identificaram uma variedade de substâncias bioativas, incluindo agentes antipatogênicos (CHIVERS *et al.*, 2007), toxinas e fatores específicos que podem estar envolvidos na regulação das células epidérmicas (IGER *et al.*, 1994).

A epiderme dos peixes possui outros tipos de células como as células saciformes (outra categoria de células secretoras), células de Merkel, células granulares, ionócitos, glândulas holócrinas associadas a espinhos, dentre outras (WHITEAR, 1986; ELLIOTT, 2000).

### **1.6. Receptores sensoriais epiteliais**

A pele dos peixes é composta por uma série de receptores sensoriais que interagem com o ambiente aquático e sinalizam inúmeras reações no indivíduo. Dentre estes receptores estão os mecanorreceptores, os eletorreceptores e os quimiorreceptores.

Os mecanorreceptores e os eletorreceptores têm origem na linha lateral. O sistema da linha lateral é o resultado de interações complexas de desenvolvimento que envolvem: o placoide, uma área espessa em forma de placa da ectoderme embrionária que dá origem ao neuromastos e seu nervo associado; os ossos dérmicos, que suportam os canais da linha lateral; e a musculatura axial, o que pode servir como um guia para a migração placoidal. Esse sistema está presente em todos os peixes e nos bagres é formado por dois subsistemas baseados nos neuromastos (mecanorreceptores) e órgãos ampulares/tuberosos (eletorreceptores) (ARRATIA, 2003).

Os neuromastos são pequenos órgãos receptores epiteliais compostos de centenas ou, em alguns casos, milhares de células sensoriais ciliadas, além de células de suporte e de células do manto (WEBB, 2011). Os feixes ciliares são cobertos por uma cúpula gelatinosa que serve como interface entre a biomecânica das células e a água no ambiente circundante. Quando o fluxo de água passa por um neuromasto, a cúpula e os feixes ciliares se dobram, gerando um estímulo que é transmitido para o cérebro através de neurônios de um nervo da linha lateral (ZACCONE *et al.*, 2001; WEBB, 2011). Os neuromastos superficiais (localizados sobre a pele) diferem dos neuromastos canais (encontrados nos canais da linha lateral) no tamanho, localização, forma, estrutura e desenvolvimento. A orientação das células ciliadas em neuromastos canal é paralela ao eixo ao longo do canal, de modo que os fluxos de água no canal têm o potencial de estimular os neuromastos. Neuromastos superficiais são geralmente menores que os neuromastos canais e podem formar linhas nas regiões dorsolaterais, cabeça e tronco nos bagres (ARRATIA, 2003; WEBB, 2011).

Os órgãos eletorreceptores, também originários da linha lateral, mostram uma grande diversidade morfológica, podendo ser classificados como ampulares ou tuberosos (ZACCONE *et*

*al.*, 2001; ARRATIA, 2003). Geralmente, os órgãos ampulares são caracterizados por um duto, com um poro na superfície da pele e um epitélio sensorial na porção apical do duto. O canal que conecta o epitélio sensorial ao ambiente pode variar consideravelmente em comprimento, sendo preenchido com um gel mucoso de baixa resistência elétrica. A parede do duto ampular é constituída por células achatadas ligadas entre si por junções (oclusão e desmossomos), criando uma fronteira com alta resistência elétrica (JØRGENSEN, 2011). Os órgãos ampulares são especializados na detecção de campos elétricos de baixa frequência, primariamente de origem biológica e são usados na orientação, localização de presas e comunicação social (ARRATIA, 2003).

Órgãos tuberosos são encontrados exclusivamente em peixes elétricos pertencentes às ordens Mormyriiformes e Gymnotiformes (ZACCONE *et al.*, 2001). Eles diferem dos órgãos ampulares uma vez que são localizados em uma cavidade intra-epidérmica fechada, sem existência de duto da superfície da pele até o órgão sensorial. Em vez disso, o órgão sensorial é coberto por uma camada de células epidérmicas pouco organizadas e sensíveis a campos elétricos de alta frequência (ZACCONE *et al.*, 2001).

Nos bagres, órgãos quimiossensoriais são conhecidos como papilas gustativas e células quimiorreceptoras solitárias (ARRATIA, 2003). Assim como em outros vertebrados, nos peixes as papilas gustativas são órgãos sensoriais periféricos do sistema gustativo que permitem ao animal identificar o alimento através da detecção de substâncias químicas a uma curta distância. As papilas gustativas ocorrem no epitélio da cavidade orofaringe-branquial e em algumas espécies também na epiderme (REUTTER *et al.*, 2000). Estes órgãos apresentam formato alongado e são constituídos por grupos de 30 a 100 células receptoras alongadas (RAJI & NOROZI, 2010).

As papilas gustativas nos peixes são compostas por vários tipos celulares, como as células alongadas claras e escuras que formam o epitélio sensorial. Essas células possuem microvilosidades que formam a área receptora. Em sua porção basal, as células escuras permitem a sinapse do órgão à fibra nervosa. Abaixo desse epitélio sensorial, encontram-se células basais, e na periferia do órgão, células marginais atuam como células epiteliais não especializadas (REUTTER *et al.*, 2000).

## 1.7. Aspectos funcionais

A pele é considerada um órgão com funções variadas devido ao seu contato com o meio externo, assim como as diversas células que a compõe nos peixes. É considerada um importante órgão acessório ao aparelho respiratório para a maioria das espécies de peixes (ELLIOTT, 2011a). O tegumento é o único local significativo de trocas gasosas entre o organismo e seu ambiente durante desenvolvimento embrionário (ROMBOUGH, 2011). Ainda, certos peixes adultos como o *Pseudobagrus brevicorpus* (Mori 1936) (Bagridae) e *Liobagrus mediadiposalis* (Mori 1936) (Amblycipitidae), adaptados para sobreviver em emersão temporária durante estações de seca, podem utilizar o oxigênio atmosférico via difusão através da pele (PARK *et al.*, 2010).

A função do tegumento no equilíbrio osmótico e de minerais nos peixes não é bem esclarecida. No entanto, alguns estudos em teleósteos mostraram a transferência de certos íons através da superfície da pele. Além disso, células responsáveis pelo transporte de íons através do epitélio (ionócitos) em espécies de água doce e marinhas, são encontradas no epitélio de várias regiões do corpo (ELLIOTT, 2011a).

A pele também está envolvida em algumas adaptações para reduzir o impacto da temperatura sobre as funções fisiológicas, apesar da maioria dos peixes serem ectotérmicos obrigatórios. Alguns atuns por exemplo, mantêm a temperatura muscular vários graus acima da temperatura da água do ambiente, através de trocas de calor por meio de vasos sanguíneos originados na pele (ELLIOTT, 2011a). Proteínas anticongelantes são abundantes no tegumento de peixes que vivem em regiões polares, e parecem ser importantes para a proteção dos tecidos externos ao congelamento (ELLIOTT, 2011a).

A função secretora do epitélio é predominante e esse muco secretado na superfície da epiderme é considerado um material altamente multifuncional (Fig. 1) (SHEPHARD, 1994).

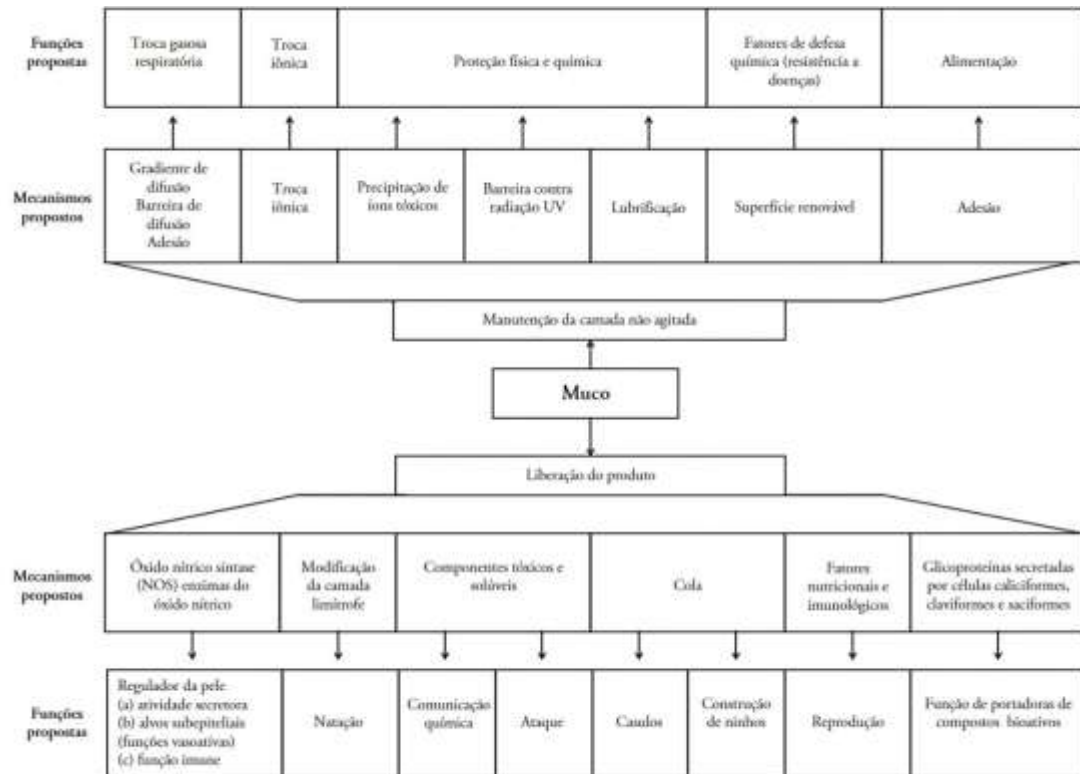


Figura 1. Algumas funções propostas para a secreção mucosa dos peixes, organizadas em funções que envolvem a produção e manutenção da camada de muco que recobrem o peixe, e funções que envolvem a liberação de muco e de substâncias associadas para a água circundante. Componentes do muco são produzidos por uma variedade de células na epiderme dos peixes (e.g. células de muco, epiteliais e de alarme). Modificação da Fig. 1 em Shephard (1994) e da Fig. 1 em Elliott, (2011a).

Os estudos sobre a importância fisiológica das secreções mucosas em peixes têm aumentado devido a descobertas relacionadas às interações proteína-carboidrato e carboidrato-carboidrato, em condições normais e patológicas (ZACCONE *et al.*, 2001). Os carboidratos, devido a sua complexidade estrutural, possuem alta capacidade de transportar informações, sendo capazes de desempenhar papéis de destaque na comunicação, adesão e reconhecimento intercelular (ZACCONE *et al.*, 2001).

O muco representa uma mistura de glicoproteínas altamente glicosiladas, denominadas de mucopolissacarídeos. Outras substâncias, como proteoglicanos, glicosaminoglicanos, lisozima, imunoglobulinas, anidrase carbônica, lectinas, crinotoxinas, calmodulina, proteína C-reativa, feromônios e enzimas proteolíticas também podem ser encontradas em menores quantidades (FLIK

*et al.*, 1984; SHEPHARD, 1994; ZACCONE *et al.*, 2001). Estudos ainda sugerem que a secreção mucosa seja uma fonte constitutiva de formas neuronais e endoteliais da enzima óxido nítrico sintase (NOS), responsável pela produção de óxido nítrico (NO), um proeminente mensageiro neuronal e vascular que regula muitas funções epiteliais (ZACCONE *et al.*, 2001). A maior parte do muco produzido na epiderme dos peixes, é sintetizada pelas células caliciformes mucosas, mas células epidérmicas da camada superficial também sintetizam glicoproteínas que formam o glicocálice e a cutícula mucosa (WHITEAR, 1970, 1986).

Em relação ao papel protetor, em determinadas situações de estresse como manipulação, predação, alterações na salinidade, exposição a metais pesados e em resposta à infecção bacteriana o volume do muco aumenta (SHEPHARD, 1994). Além disso, certas espécies tropicais secretam um casulo de muco que os envolve à noite e os protege contra predadores (ELLIOTT, 2011a). O muco gelatinoso tem importante função na locomoção de alguns peixes, reduzindo o atrito com a água, o que aumenta a velocidade e diminui o gasto energético (SHEPHARD, 1994). Além de filtrar materiais em suspensão das brânquias e da pele em águas altamente turvas ou poluídas, melhorando a movimentação e respiração (ELLIOTT, 2011a). A secreção mucosa auxilia também na alimentação de certos peixes. O muco, em peixes com cuidado parental, fornece nutrientes para os alevinos que se alimentam da superfície da pele de seus pais (ELLIOTT, 2011a). Em peixes que obtêm alimento filtrando partículas em suspensão (como bactérias e plâncton), o muco funciona um importante mecanismo de alimentação, retendo os fragmentos associados aos rastros branquiais e superfícies orais (SHEPHARD, 1994; ELLIOTT, 2011a).

Além dos diversos mecanismos relacionados diretamente às secreções mucosas, as células presentes na pele dos peixes desempenham inúmeras ações que contribuem para a multifuncionalidade desse tegumento.

A proliferação de células epiteliais é uma resposta que resulta em um espessamento da epiderme, em peixes infestados por parasitas de pele, expostos a poluentes ou em atividades de desova (ELLIOTT, 2011a). A migração de células epiteliais, além de cobrir as regiões lesionadas, pode ajudar na proteção da superfície da pele contra a invasão de patógenos por meio da atividade fagocitária, e assim ainda desempenhar um papel no desenvolvimento da imunidade local no tegumento (RAKERS, *et al.*, 2010). Substâncias tóxicas liberadas por células especializadas na pele (células saciformes) e ou por glândulas associadas a espinhos nas nadadeiras e opérculos que também ajudam no sistema de defesa, afastando predadores (ELLIOTT, 2011a).

Leucócitos são componentes importantes de ambos os sistemas imune inato e adaptativo de peixes, e podem aumentar significativamente em quantidade na cicatrização de lesões de pele, doenças infecciosas, ou exposição a poluentes e outros estressores (ELLIOTT, 2011a). Os cromatóforos (células de pigmento), também constituintes do tegumento nos peixes, atuam essencialmente na proteção do corpo contra a radiação ultravioleta (KALETA, 2009), além de ajudar na camuflagem do peixe através dos diversos padrões de pigmentação (ELLIOTT, 2011a). A pigmentação da epiderme, além da função de proteção, pode ter um importante papel na comunicação intraespecífica, pois ao mudar a coloração do tegumento o peixe pode se camuflar ou tornar-se socialmente chamativo (BURTON, 2011). Neste sentido, a comunicação entre os peixes pode ser facilitada por substâncias produzidas no tegumento, como é caso dos feromônios presentes na substância de alarme. Quando liberados na água, por células de alarme danificadas na pele de algumas espécies de peixes, podem alertar outros peixes da mesma espécie sobre a presença de predadores (PFEIFFER, 1977).

No que se refere à percepção sensorial, várias estruturas sensoriais especializadas estão localizadas no tegumento, como os mencionados mecanorreceptores (WEBB, 2011), quimiorreceptores e eletrorreceptores (JORGENSEN, 2011; ELLIOTT, 2011a).

Considerando a complexidade e diversidade das estruturas que compõem a pele dos peixes, é notável sua importância em vários aspectos funcionais, alguns ainda pouco compreendidos. Segundo ARRATIA (2003), a epiderme e suas funcionalidades têm sido exploradas para poucos Siluriformes, apesar de existir diversos estudos sobre a morfologia da pele de vários teleósteos. Além disso, as relações filogenéticas e taxonômicas entre a superfamília Doradoidea (Doradidae + Auchenipteridae) e as demais famílias de Siluriformes é ainda bastante controversa. A maioria dos estudos morfológicos relacionam a família africana Mochokidae, único relacionamento neotrópico com a África em Siluriformes, como seu grupo irmão. Esse clado por sua vez, é relacionado à família Ariidae (de PINNA, 1998; CALEGARI, 2015). Da mesma forma, as relações entre os gêneros de Auchenipteridae ainda não estão totalmente esclarecidas (AKAMA, 1999; CALEGARI, 2015). É possível que as estruturas da epiderme dos Siluriformes contribuam com informações evolutivas e pistas de relações filogenéticas em diferentes níveis taxonômicos entre os Siluriformes, e sobretudo Auchenipteridae, ou ainda podem auxiliar na compreensão das relações entre a morfologia e o ambiente, as quais permanecem pouco conhecidas.

## 2. OBJETIVOS

### Geral

- Caracterizar a epiderme de *Pseudauchenipterus affinis* na bacia do rio São Mateus, ao longo do ano.

### Específicos

- Caracterizar a organização da pele;
- Descrever a morfologia das células que constituem a epiderme;
- Determinar a composição química da secreção produzida pelas células de muco, através de técnicas citoquímicas;
- Verificar a existência de dimorfismo sexual em relação à (1) abundância de células de muco, epiteliais e alarme; (2) a altura do epitélio; (3) e diâmetro das células de muco;
- Quantificar e comparar a densidade de células de muco, epiteliais e de alarme, a espessura do epitélio e o diâmetro das células de muco, em distintas regiões do corpo e ao longo do ano;
- Relacionar estes resultados obtidos com os dados existentes na literatura para outros Siluriformes.

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1. Local de Coleta

Foram realizadas quatro coletas sazonais, abrangendo as estações do ano, pelo período de um ano (*verão* - fevereiro, *outono* - maio, *inverno* - agosto e *primavera* – novembro de 2015) na bacia do rio São Mateus visando à obtenção de exemplares de *Pseudauchenipterus affinis* (Fig. 2). Um número amostral de 10 espécimes de *P. affinis* (cinco machos e cinco fêmeas) foi examinado em cada estação do ano, totalizando 40 indivíduos ao fim do período do estudo.

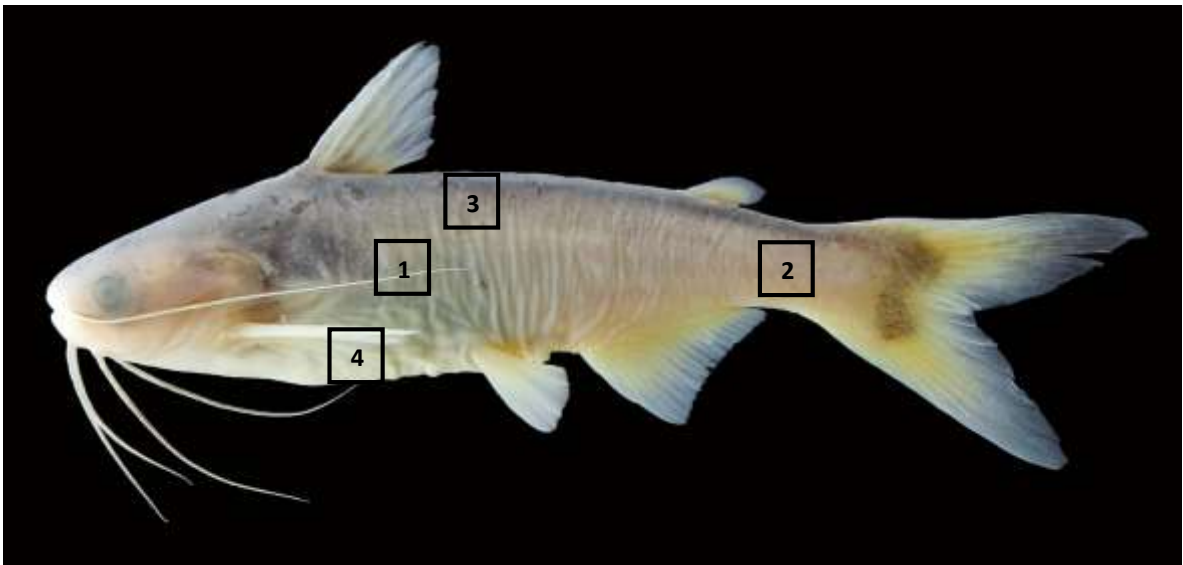


Figura 2. *Pseudauchenipterus affinis* coletado no rio São Mateus, São Mateus, Espírito Santo, Brasil - CZNC 1213 - 76,8mm. Locais onde foram obtidas as amostras. (1) Lateral anterior, (2) lateral posterior, (3) dorsal e (4) ventral. (Foto de Leonardo Ferreira da Silva Ingenito).

Os indivíduos foram coletados por pescadores profissionais com auxílio de tarrafas e redes de espera de tamanhos variados na calha do rio São Mateus, na localidade de Pedra d'Água, dentro da área urbana do município de São Mateus (18°37'41''S 40°06'41''O). Ainda em campo, os exemplares foram fixados em solução de formaldeído 10% com o mínimo de manipulação possível, visando não danificar a epiderme. No laboratório de Vertebrados Aquáticos do Centro Universitário Norte do Espírito Santo da Universidade Federal do Espírito Santo (CEUNES/UFES), os exemplares tiveram sua identificação confirmada e foram pesados em

balança digital de precisão, medidos com paquímetro digital com precisão de 0,1 mm. Os indivíduos machos apresentaram comprimento padrão entre 6,5-9,0 cm e as fêmeas entre 5,3-9,8 cm. O peso corporal nos machos variou de 5,5-15,0 g e nas fêmeas de 3,3-21,2 g. Após as medições, os indivíduos foram dissecados para a remoção de amostras do epitélio em no máximo 10 horas após a captura. Após 48 horas em solução de formaldeído os exemplares dissecados foram transferidos para uma solução de álcool etílico 70% e tombados na Coleção Zoológica Norte Capixaba (CZNC, UFES, São Mateus - CZNC 998, CZNC 1070, CZNC 1212, CZNC 1261).

### **3.2. Microscopia de Luz**

Todos os procedimentos para microscopia de luz descritos abaixo foram realizados no Laboratório de Biologia Estrutural (CEUNES, UFES).

Amostras da pele de *P. affinis*, com aproximadamente 1 cm<sup>3</sup>, foram removidas das regiões, lateral anterior, lateral posterior, dorsal e ventral (Fig. 2) e fixados com solução Bouin durante 24 horas a 4°C. Os fragmentos foram então lavados em tampão fosfato de sódio 0.1M, pH 7.2, desidratados em série crescente de etanol por três minutos em cada banho, diafanizados em xilol por 30 minutos em cada solução (xilol I e xilol II) e então incluídos em parafina. Após inclusão, as amostras foram seccionadas transversalmente e longitudinalmente na espessura de 5 µm em micrótomo rotativo e montadas sobre lâminas histológicas.

#### **3.2.1. Colorações Convencionais**

Algumas lâminas foram coradas em Hematoxilina de Harris (HARRIS, 1900) por 5 minutos, lavadas em água corrente, coradas em Eosina 2.5% por 4 minutos, desidratadas, montadas e fotografadas em microscópio de luz equipado com sistema de captura de imagem.

#### **3.2.2. Colorações Citoquímicas**

Na realização das *colorações citoquímicas*, as lâminas foram hidratadas e submetidas aos métodos de *Tricrômico de Mallory*, *Tricrômico de Masson* (MASSON, 1929), *Ácido Periódico-*

*Schiff (PAS)* (MCMANUS, 1946), *Alcian Blue pH 2,5* (LEV & SPICER, 1964) e *Azul de Bromofenol*.

Para o método *Tricrômico de Mallory*, visando à distinção do tecido conjuntivo, as lâminas foram coradas em Hematoxilina de Harris por 3 minutos, lavadas em água corrente, coradas em Fucsina Ácida aquosa 0.5% por 2 minutos, imersas em solução de Azul de Anilina 0.5% – Orange G 2% – Ácido Fosfotúngstico 1% por 20 minutos. Em seguida, foram lavadas em água corrente, desidratadas, montadas e fotodocumentadas.

No método de *Tricrômico de Masson* (com *azul de anilina*), recomendado também para tecido conjuntivo, foi utilizado o kit de coloração EasyPath EP-11-20013 seguindo as instruções do fabricante.

Na técnica de *PAS*, para detecção de glicoproteínas neutras, as lâminas foram banhadas em Ácido Periódico 1% por 10 minutos, lavadas em água destilada e mergulhadas em Reativo de Schiff por 20 minutos. Seguiu-se uma nova lavagem em água de corrente por 10 minutos, coloração em Hematoxilina de Harris por 3 minutos, lavagens em água destilada, desidratação, montagem e fotodocumentação.

No método de *Alcian Blue pH 2.5/PAS*, para detecção de glicoproteínas ácidas carboxiladas e neutras, as lâminas foram lavadas em ácido acético 3% por 3 minutos, imersas em solução de Alcian Blue pH 2.5 por 30 minutos, lavadas em água corrente por 3 minutos e novamente em ácido acético 3%. Em seguida as lâminas foram deixadas em solução de ácido periódico por 10 minutos, logo após submetidas às lavagens em água corrente por 5 minutos e em água destilada. Seguiu-se com a imersão no Reativo de Schiff por 30 minutos, lavagem em água corrente por 5 minutos, coloração com hematoxilina por 5 minutos, e uma nova lavagem em água. Por fim as lâminas foram mergulhadas em álcool ácido por 30 segundos, lavadas por 3 minutos em água corrente, desidratadas, montadas e fotodocumentadas.

Para a técnica de *Azul de Bromofenol*, visando à detecção de proteínas, as lâminas foram hidratadas e imersas diretamente em solução aquosa de Azul de Bromofenol 1% durante 15 minutos. Foram então lavadas em ácido acético 0.5%, desidratadas, montadas e fotodocumentadas.

### 3.3. Análises Estereológicas e Morfométricas

Foram obtidas micrografias, em microscópio Leica LCC50 HD, de diferentes campos em lâminas coradas com PAS em um aumento de 400X. Foram mensurados; densidade volumétrica (células de muco, epiteliais e alarme), altura do epitélio e diâmetro das células de muco utilizando o software Image-Pro Plus (MEDIA CYBERNETICS, 2001)

A *densidade volumétrica* (Fig. 3) dos componentes do tegumento (células epiteliais, células de muco e células claviformes) foi obtida pelos métodos de estereologia descritos por WEIBEL (1979). A estereologia foi empregada utilizando um sistema-teste com aproximadamente 500 pontos em uma área conhecida. As densidades de volume das estruturas foram estimadas como  $V_v[\text{estrutura}] = P_p[\text{estrutura}] / PT$ , sendo (Pp) o número de pontos que se sobrepõem ao longo da estrutura e (PT) o número total de pontos de teste contidos na zona rodeada pela moldura (grade).

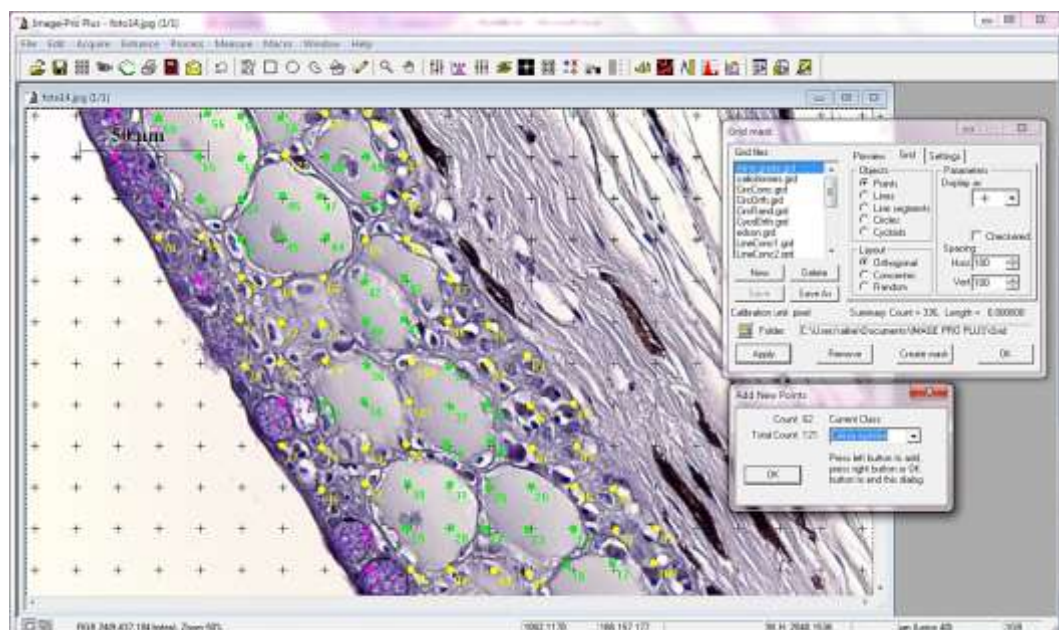


Figura 3. Análise de Imagem no software Image-Pro Plus para densidade volumétrica. Células epiteliais (pontos amarelos), células claviformes (pontos verdes) e células de muco (pontos vermelhos).

A *altura do tecido epitelial* (Fig. 4) e o *diâmetro das células de muco* (Fig. 5) foram medidos com um aumento de 400X. Seis micrografias das regiões anterior, posterior, dorsal e ventral de cada espécime foram utilizadas para as medições totalizando 24 por animal. As medidas de altura

do epitélio e diâmetro das células de muco foram obtidas através da média de cinco repetições em cada uma das seis imagens.

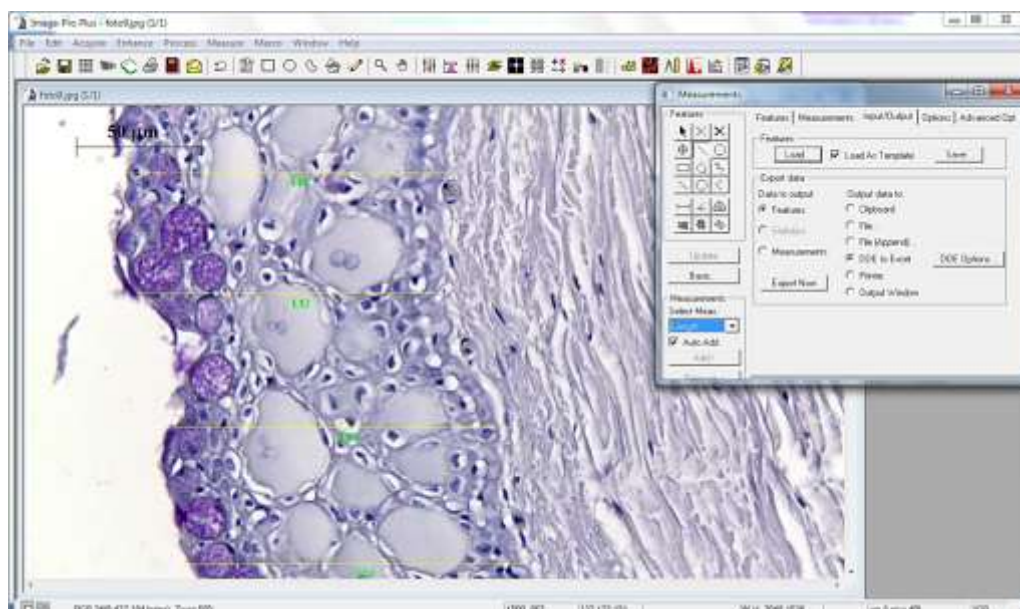


Figura 4. Análise de Imagem no software Image Pro Plus para altura do epitélio.

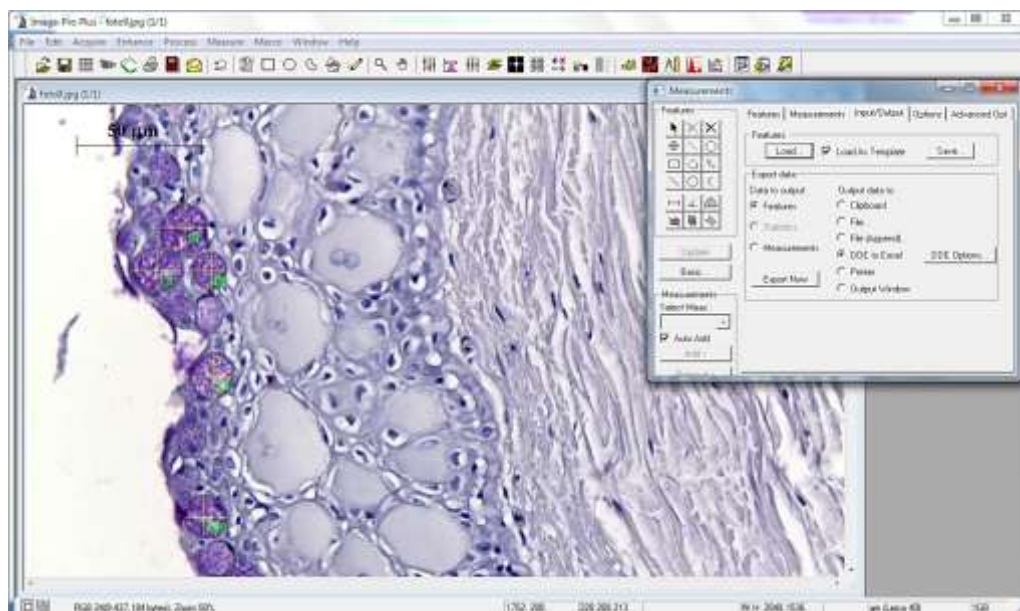


Figura 5. Análise de Imagem no software Image-Pro Plus para diâmetro das células de muco.

### **3.4. Análises Estatísticas**

As análises estatísticas foram realizadas através dos testes não-paramétricos de Mann-Whitney (Teste U) com  $p < 0.05$ , para testar o dimorfismo entre macho e fêmea em relação (1) ao diâmetro das células de muco, (2) às densidades de células de muco, alarve e epitelial e (3) a altura do epitélio. Para testar as diferenças entre os parâmetros citados nas quatro épocas do ano e diferentes regiões do corpo foi empregado o teste de Kruskal-Wallis com  $p < 0.05$  no software Statistica (STATSOFT, 2005).

## 4. RESULTADOS

### 4.1. Estrutura geral da pele

A pele de *Pseudauchenipterus affinis* é lisa, desprovida de escamas, apresenta coloração distinta com grande concentração de cromatóforos na região dorsal. As regiões analisadas (lateral anterior, posterior, dorsal e ventral) são constituídas por um tecido epitelial escamoso estratificado não queratinizado, sobrejacente a uma derme espessa, seguida de um tecido subcutâneo e tecido muscular. A derme é formada por uma camada de tecido conjuntivo frouxo e logo após por tecido conjuntivo denso. Entre o tecido conjuntivo e o tecido muscular, encontra-se tecido subcutâneo pouco desenvolvido. Nessa camada subcutânea, em algumas regiões, pode ser observada uma pequena quantidade de tecido adiposo subjacente ao tecido conjuntivo denso assim como entre o tecido muscular, além de fibras colágenas frouxas dispostas paralelamente (Fig. 6A; 7A-F).

### 4.2. Epiderme

A epiderme em *P. affinis*, analisada em microscopia de luz, consiste em um epitélio estratificado composto basicamente de três tipos celulares principais, morfologicamente distintos: células epiteliais, células de muco (caliciformes) e células de alarme (claviformes), sendo as duas últimas glândulas unicelulares intraepidérmicas (Fig. 6B-C; 7C-F). Órgãos sensoriais tais como quimiorreceptores (papilas gustativas) e eletrorreceptores (órgãos ampulares) são encontrados ao longo do epitélio (Fig. 6A; 7B). Adicionalmente, células intrusivas que fazem parte do sistema imune dos peixes – linfócitos e células granulares eosinofílicas – podem ser observadas no epitélio (Fig. 6B-C; 7C-D).

O tecido epitelial encontra-se organizado em três regiões: estrato superficial, intermediário e basal (Fig. 8A). O estrato superficial é constituído por células de muco, geralmente dispostas lado a lado em uma camada única, entre as células epiteliais. O estrato intermediário é composto, predominantemente, pelas volumosas células de alarme que contribuem para a maior parte da espessura da epiderme, organizadas em até três camadas e entre estas também se encontram as células epiteliais. O estrato basal, estruturado sobre a membrana basal, é formado por uma camada de células progenitoras epidérmicas indiferenciadas, de formato cuboide, as quais se diferenciam,

quando necessário, no estrato intermediária, repondo células adicionais que posteriormente são recrutadas para a camada epidérmica superficial (Fig. 8A-B).

A altura da epiderme nas diferentes regiões variou entre 28-123 $\mu$ m (média = 77.6 $\mu$ m  $\pm$ 15.26) nos machos e 43-182 $\mu$ m nas fêmeas (média = 96.16  $\mu$ m  $\pm$ 16.86) (Tabela 1). Os resultados encontrados mostraram que a altura do epitélio difere significativamente entre machos e fêmeas nas regiões lateral anterior, lateral posterior e ventral, sendo que nas fêmeas, o epitélio é mais espesso (Fig. 12A-C e Tabela 1). A região dorsal não apresentou diferença na altura entre os sexos (Fig. 12D e Tabela 1). Em relação à altura do epitélio nas diferentes regiões do corpo, em ambos os sexos, a região lateral posterior apresentou um tecido epitelial menos espesso quando comparado às regiões lateral anterior e ventral. (Tabela 2 e Fig. 13A).

As análises da pele, considerando as quatro coletas em diferentes estações do ano, indicaram que a altura do epitélio variou significativamente diminuindo sua espessura (regiões lateral anterior e ventral) entre a coleta de fevereiro (verão) e a de novembro (primavera) (Tabela 3).

### ***Célula Epitelial***

As células epiteliais são pequenas, quando comparadas às células de muco e células de alarme (Fig. 6B-C; 7A-F; 8A-C). Estão distribuídas nos três estratos da epiderme, entre as células de muco e alarme, embora sejam observadas em maior abundância nas camadas basal e superficial do epitélio (Fig. 7A-F). No estrato basal, elas apresentaram formato cuboide ou colunar e núcleo localizado na região central da célula, proeminente, arredondado e com cromatina pouco condensada (Fig. 8A). Elas formam uma camada única sobrejacente à membrana basal. Já no estrato intermediário, as células epiteliais estão distribuídas entre as células de alarme, possuem formato arredondado a achatado, o núcleo é central e acompanha a morfologia da célula (Fig. 8A). As células epiteliais do estrato superficial apresentam morfologia semelhante àquelas da camada basal, porém em formato variam de arredondadas a achatadas (Fig. 6C).

Quanto aos métodos de colorações citoquímicas, o conteúdo das células epiteliais da camada superficial apresentou reação positiva para os métodos de PAS (Fig. 6A-C; 7A-F) e Alcian Blue pH 2.5/PAS (Fig. 9A-H). A densidade das células epiteliais, de forma geral, é um pouco maior que a densidade das células de muco e de alarme. Não houve diferença significativa na

densidade de células epiteliais entre machos e fêmeas (Tabela 1), assim como nas quatro distintas regiões do corpo (Tabela 2). Em relação às coletas nas diferentes estações do ano, a densidade foi significativamente maior na primeira coleta de fevereiro (verão) comparada à segunda coleta em maio (outono), mas igual nas terceira e quarta, inverno e primavera, respectivamente (Tabela 3).

### *Células de Muco*

As células de muco foram observadas amplamente distribuídas ao longo do epitélio em todas as quatro regiões do corpo analisadas (Fig. 6A-C; 7A-F). Encontram-se concentradas, geralmente, em uma camada contínua de células localizadas na região superficial do epitélio com sua porção apical secretora voltada para a superfície da pele através de um poro (Fig. 6B e C; 8A). Possuem formato esférico, com o núcleo achatado periférico fortemente basofílico e com cromatina condensada (Fig. 8A-B). Estas células não foram localizadas nos estratos intermediário e basal da epiderme em nenhuma das regiões analisadas.

Em coloração convencional, o citoplasma dessas células apresentou ligeira basofilia e núcleo fortemente basófilo (Fig. 6A-C). Para coloração citoquímica PAS e Alcian Blue pH 2.5/PAS (detecção de glicoconjugados) o citoplasma das células de muco apresentou forte reação às técnicas em todas as regiões de pele analisadas, indicando grandes quantidades de glicoproteínas neutras e ácidas carboxiladas (Fig. 8A-B; 9A-H). Em vários cortes histológicos, é possível observar numerosas células de muco liberando seu conteúdo sobre a superfície da pele (Fig. 9C e G). Quanto à técnica de Azul de Bromofenol, para detecção de proteínas, as células de muco apresentaram reação negativa (Fig. 11E-F).

A densidade de células de muco foi menor que a densidade das células epiteliais e de alarme. Não ocorreram variações significativas quanto à densidade dessas células entre machos e fêmeas (Tabela 1). Dentre as regiões do corpo, na região lateral anterior foi maior que na região ventral, as demais regiões não apresentaram diferenças (Tabela 2 e Fig. 13B). A densidade de células de muco sofreu variações sazonais consideráveis ao longo do ano. A densidade dessas células nas coletas de fevereiro e maio (verão e outono, respectivamente) foi similar entre si e mais elevada que nas coletas de agosto e novembro (inverno e primavera, respectivamente) (Tabela 3 e Fig. 14A-D).

O diâmetro das células de muco possui em média  $15.27\mu\text{m}$  ( $\pm 1.69$ ) (Tabela 1). Não houve diferença entre os sexos (Tabela 1). Entre as regiões do corpo, esse diâmetro foi menor nas células da região lateral posterior em relação às células das regiões lateral anterior e dorsal (Tabela 2 e Fig. 13C). Acerca das coletas ao longo do ano, em ambas regiões lateral anterior e posterior, o diâmetro das células de muco variou entre as coletas de maio (outono) e novembro (primavera), sendo que na coleta de maio (outono) as células apresentavam diâmetro maior (Tabela 3).

### *Células de Alarme*

As células de alarme encontram-se dispostas, geralmente, em uma ou até três camadas, ocupando a maior extensão do epitélio (Fig. 6B-C; 7C-F). São localizadas na região intermediária entre as células epidérmicas dos estratos superficial e basal (Fig. 8A). Caracterizam-se por seu tamanho volumoso e apresentam formato globular, e podem ser mono- ou binucleadas. Quando binucleadas estes são contíguos, situam-se na porção central, de formato irregular, com cromatina pouco condensada, porém com algumas regiões de compactação (Fig. 6B-C; 7D; 8B). Diferentemente das células de muco, as células de alarme não apresentaram abertura para a superfície do epitélio.

O conteúdo citoplasmático parece homogêneo, basofílico e fracamente eosinofílico em coloração convencional, e apresenta grau variável de vacuolização. Quanto à composição química da secreção (substância de alarme), esta apresentou reação negativa à técnica de PAS (Fig. 7 e 8) e Alcian Blue pH 2.5/PAS (Fig. 9), para detecção de glicoproteínas, enquanto apresentou reação positiva à técnica de Azul de Bromofenol, para detecção de proteínas, (Fig. 11E-F).

A densidade das células de alarme, assim como das células de muco e epiteliais, não apresentou variações consideráveis entre os sexos (Tabela 1), bem como nas regiões do corpo (Tabela 2). Já em relação às coletas ao longo do ano foi observado um comportamento inverso àquele relatado para as células de muco, uma vez que houve uma menor densidade de células de alarme na coleta de fevereiro (verão) e uma elevação nas coletas de maio, agosto e novembro (outono, inverno e primavera, respectivamente) (Fig. 15A-D e Tabela 3).

Tabela 1. Medidas da altura do epitélio, densidade de células de muco, células de alarme e epitelial, e diâmetro de célula de muco em macho e fêmea de *P. affinis*. LA: lateral anterior; LP: lateral posterior; D: dorsal; V: ventral.

Regiões do corpo	Altura do epitélio ( $\mu\text{m}\pm\text{DP}$ )		Densidade de célula de muco (cels/50 $\mu\text{m}$ )		Densidade de célula de alarme (cels/50 $\mu\text{m}$ )		Densidade de célula de epitelial (cels/50 $\mu\text{m}$ )		Diâmetro de célula de muco ( $\mu\text{m}\pm\text{DP}$ )	
	Macho	Fêmea	Macho	Fêmea	Macho	Fêmea	Macho	Fêmea	Macho	Fêmea
LA	85.82 $\pm$ 10.19 <sup>a</sup>	103.01 $\pm$ 13.94 <sup>b</sup>	7.89 $\pm$ 4.11	8.07 $\pm$ 3.13	43.22 $\pm$ 8.33	41.68 $\pm$ 8.66	48.72 $\pm$ 7.56	50.05 $\pm$ 6.98	15.45 $\pm$ 1.55	16.31 $\pm$ 1.64
LP	54.72 $\pm$ 8.13 <sup>a</sup>	74.56 $\pm$ 11.33 <sup>a</sup>	6.10 $\pm$ 3.62	6.23 $\pm$ 3.24	40.09 $\pm$ 7.26	39.96 $\pm$ 10.20	53.31 $\pm$ 5.46	53.71 $\pm$ 7.77	13.84 $\pm$ 1.59	14.81 $\pm$ 1.17
D	84.21 $\pm$ 9.17 <sup>a</sup>	92.79 $\pm$ 13.98 <sup>a</sup>	7.97 $\pm$ 4.36	9.82 $\pm$ 4.45	40.51 $\pm$ 9.79	43.77 $\pm$ 6.29	51.45 $\pm$ 51.45	46.12 $\pm$ 3.71	15.68 $\pm$ 1.42	16.22 $\pm$ 1.57
V	85.63 $\pm$ 11.68 <sup>a</sup>	114.29 $\pm$ 20.42 <sup>b</sup>	5.46 $\pm$ 3.3	5.25 $\pm$ 3.29	48.69 $\pm$ 9.36	44.42 $\pm$ 10.79	45.25 $\pm$ 8.45	49.78 $\pm$ 8.61	14.8 $\pm$ 1.43	15.09 $\pm$ 1.84
	86.88 $\pm$ 26.33		7.1 $\pm$ 1.58		42.8 $\pm$ 2.93		49.8 $\pm$ 3.06		15.27 $\pm$ 1.69	

Valores = Média  $\pm$  Desvio Padrão. Letras diferentes na mesma linha  $p < 0.05$  (Kruskall-Wallis).

Tabela 2. Medidas da altura do epitélio, densidade de células de muco, de alarme e epitelial, e diâmetro de célula de muco em diferentes regiões do corpo de *P. affinis*. LA: lateral anterior; LP: lateral posterior; D: dorsal; V: ventral.

Regiões do corpo	Altura do epitélio ( $\mu\text{m}\pm\text{DP}$ )	Densidade de célula de muco (cels/50 $\mu\text{m}$ )	Densidade de célula de alarme (cels/50 $\mu\text{m}$ )	Densidade de célula de epitelial (cels/50 $\mu\text{m}$ )	Diâmetro de célula de muco ( $\mu\text{m}\pm\text{DP}$ )
LA	94.41 $\pm$ 23.22 <sup>a</sup>	7.98 $\pm$ 3.91 <sup>a</sup>	42.74 $\pm$ 11.03	48.82 $\pm$ 9.87	15.88 $\pm$ 1.63 <sup>a</sup>
LP	64.64 $\pm$ 17.78 <sup>b</sup>	6.16 $\pm$ 3.68 <sup>a,b</sup>	40.02 $\pm$ 9.52	53.10 $\pm$ 7.97	14.33 $\pm$ 1.46 <sup>b</sup>
D	88.50 $\pm$ 19.83 <sup>a,b</sup>	8.90 $\pm$ 4.92 <sup>a,b</sup>	42.14 $\pm$ 10.9	47.95 $\pm$ 9.70	15.95 $\pm$ 1.5 <sup>a</sup>
V	99.96 $\pm$ 28.87 <sup>a</sup>	5.36 $\pm$ 3.50 <sup>b</sup>	46.56 $\pm$ 12.77	47.31 $\pm$ 11.60	14.95 $\pm$ 1.63 <sup>a,b</sup>

Valores = Média  $\pm$  Desvio Padrão. Letras diferentes na mesma linha  $p < 0.05$  (Kruskall-Wallis).

Tabela 3. Medidas da altura do epitélio, densidade de células de muco, alarme e epitelial, e diâmetro de célula de muco em diferentes estações *P. affinis*. LA: lateral anterior; LP: lateral posterior; D: dorsal; V: ventral.

		Regiões do corpo			
		LA	LP	D	V
Altura do epitélio ( $\mu\text{m} \pm \text{DP}$ )	Verão	103.1 $\pm$ 20.80 <sup>a</sup>	66.43 $\pm$ 23.17	88.56 $\pm$ 14.90	112.76 $\pm$ 34.54 <sup>a</sup>
	Outono	102.05 $\pm$ 26.83 <sup>ab</sup>	68.93 $\pm$ 12.79	87.05 $\pm$ 24.25	98.23 $\pm$ 22.33 <sup>ab</sup>
	Inverno	95.17 $\pm$ 15.18 <sup>ab</sup>	69.48 $\pm$ 17.69	93.65 $\pm$ 21.3	105.34 $\pm$ 34.48 <sup>ab</sup>
	Primavera	77.33 $\pm$ 21.93 <sup>b</sup>	53.74 $\pm$ 15.72	84.75 $\pm$ 19.82	83.51 $\pm$ 14.59 <sup>b</sup>
Densidade de célula de muco (cels/50 $\mu\text{m}$ )	Verão	11.62 $\pm$ 2.4 <sup>a</sup>	9.77 $\pm$ 2.03 <sup>a</sup>	11.21 $\pm$ 3.53 <sup>a</sup>	8.28 $\pm$ 2.06 <sup>a</sup>
	Outono	10.38 $\pm$ 2.92 <sup>a</sup>	8.37 $\pm$ 3.4 <sup>a</sup>	13.80 $\pm$ 4.2 <sup>ab</sup>	7.96 $\pm$ 2.64 <sup>a</sup>
	Inverno	5.967 $\pm$ 1.77 <sup>b</sup>	3.655 $\pm$ 1.09 <sup>b</sup>	6.114 $\pm$ 1.54 <sup>abc</sup>	3.439 $\pm$ 1.34 <sup>b</sup>
	Primavera	3.952 $\pm$ 2.26 <sup>b</sup>	2.876 $\pm$ 1.74 <sup>b</sup>	4.479 $\pm$ 3.08 <sup>c</sup>	1.75 $\pm$ 2.14 <sup>b</sup>
Densidade de célula de alarme (cels/50 $\mu\text{m}$ )	Verão	31.80 $\pm$ 7.49 <sup>a</sup>	27.78 $\pm$ 4.82 <sup>a</sup>	31.51 $\pm$ 7.56 <sup>a</sup>	32.23 $\pm$ 6.32 <sup>a</sup>
	Outono	48.92 $\pm$ 8.7 <sup>b</sup>	44.40 $\pm$ 6.34 <sup>b</sup>	41.1 $\pm$ 12.66 <sup>ab</sup>	52.96 $\pm$ 7.15 <sup>b</sup>
	Inverno	40.00 $\pm$ 7.35 <sup>ab</sup>	40.9 $\pm$ 6.4 <sup>b</sup>	45.08 $\pm$ 3.6 <sup>b</sup>	48.16 $\pm$ 13.89 <sup>ab</sup>
	Primavera	49.15 $\pm$ 10.87 <sup>b</sup>	47.011 $\pm$ 6.75 <sup>b</sup>	49.98 $\pm$ 8.98 <sup>b</sup>	52.88 $\pm$ 10.07 <sup>b</sup>
Densidade de célula de epitelial (cels/50 $\mu\text{m}$ )	Verão	55.85 $\pm$ 7.49 <sup>a</sup>	61.2 $\pm$ 5.86 <sup>a</sup>	55.60 $\pm$ 11.22 <sup>a</sup>	57.52 $\pm$ 6.62 <sup>a</sup>
	Outono	40.67 $\pm$ 7.9 <sup>b</sup>	47.32 $\pm$ 5.39 <sup>b</sup>	44.18 $\pm$ 12.69 <sup>b</sup>	39.05 $\pm$ 6.03 <sup>b</sup>
	Inverno	54.01 $\pm$ 6.2 <sup>a</sup>	55.43 $\pm$ 6.2a <sup>b</sup>	48.787 $\pm$ 3.33 <sup>ab</sup>	48.38 $\pm$ 13.93 <sup>ab</sup>
	Primavera	46.88 $\pm$ 10.26 <sup>ab</sup>	50.10 $\pm$ 7.4 <sup>b</sup>	45.52 $\pm$ 7.2 <sup>ab</sup>	45.34 $\pm$ 10.66 <sup>ab</sup>
Diâmetro de célula de muco ( $\mu\text{m} \pm \text{DP}$ )	Verão	16.32 $\pm$ 0.94 <sup>a</sup>	14.41 $\pm$ 1.39 <sup>a</sup>	16.19 $\pm$ 1.02	15.43 $\pm$ 1.57
	Outono	17.00 $\pm$ 0.74 <sup>ab</sup>	15.54 $\pm$ 0.94 <sup>ab</sup>	16.45 $\pm$ 1.60	15.49 $\pm$ 1.04
	Inverno	15.70 $\pm$ 1.42 <sup>a</sup>	14.04 $\pm$ 1.09 <sup>a</sup>	16.04 $\pm$ 1.35	15.38 $\pm$ 1.44
	Primavera	14.50 $\pm$ 2.09 <sup>a</sup>	13.31 $\pm$ 1.56 <sup>a</sup>	15.10 $\pm$ 1.79	13.49 $\pm$ 1.66

Valores = Média  $\pm$  Desvio Padrão. Letras diferentes na mesma coluna p<0.05 (Kruskall-Wallis).

### *Células Granulares Eosinofílicas*

Várias células granulares eosinofílicas foram observadas principalmente no estrato basal e intermediário da epiderme de *P. affinis*. Estas células possuem formato irregular, núcleo esférico localizado lateralmente, com forte basofilia e cromatina altamente condensada. O citoplasma, em coloração convencional, tem aspecto granular e eosinofílico (Fig. 6B-C). Apresentam reação positiva aos métodos de coloração citoquímicas de PAS, Alcian Blue pH 2.5/PAS e Azul de Bromofenol (Fig. 7C-D; 11F). A densidade volumétrica destas células não foi quantificada.

### ***Papilas Gustativas***

Apenas um tipo de papila gustativa foi observado na superfície epidérmica das quatro regiões analisadas em *P. affinis*, bem como na extremidade apical de papilas dérmicas (projeções epidérmicas constituídas de células epiteliais localizadas sobre a epiderme na região lateral anterior). As papilas gustativas são piriformes e estão orientadas perpendicularmente à superfície do epitélio formando uma saliência (Fig. 7B; 10A-C). Estas estruturas são constituídas por um epitélio sensorial composto por um conjunto de células epiteliais especializadas alongadas paralelas ao eixo vertical do órgão. As terminações apicais destas células alcançam a superfície do epitélio constituindo a área receptora. Células epiteliais não especializadas comuns da epiderme revestem as papilas gustativas (Fig. 10A-C e H).

### ***Órgãos Ampulares***

Os órgãos ampulares em *P. affinis* foram encontrados em todas as regiões do corpo analisadas (Fig. 6A; 7B). Eles ocorrem alinhados na epiderme, isolados ou em agrupamentos de até três órgãos (Fig. 10D-J). Algumas vezes dois órgãos formavam uma única estrutura (Fig. 10E). São caracterizados por uma cavidade globular, inserida no limite da membrana basal, terminada em um curto duto, conectada a superfície da pele através de um poro apical (Fig. 10D-J). Na região basal encontra-se um conjunto de células receptoras alongadas, com núcleo central, apoiadas sobre as células de suporte (Fig. 10D e J). O curto duto é revestido por células epiteliais cúbicas (Fig. 10F-G) e células achatadas revestem a cavidade do órgão. O lúmen apresentou material positivo para coloração citoquímica PAS (Fig. 10F-J).

### **4.3.Derme**

Abaixo do epitélio encontra-se a derme, formada por uma camada de tecido conjuntivo frouxo com fibroblastos e melanóforos associados (Fig. 6A; 7A-B). Abaixo deste tecido conjuntivo frouxo identifica-se uma espessa camada de tecido conjuntivo denso não modelado, cujos fibroblastos são aprisionados em fibras de colágeno altamente orientadas e evidenciadas em azul pela técnica de Tricrômico de Mallory e Tricrômico de Masson (Fig. 11A-D). Vasos sanguíneos e

mecanorreceptores (neuromastos canais) também foram encontrados em algumas regiões na derme (Fig. 7F; 10K). Subjacente à derme, camadas de tecido muscular estriado esquelético são evidenciadas em marrom pela coloração de Tricrômico de Mallory (Fig. 11A).

Células de pigmento, em *P. affinis* os melanóforos, encontraram-se distribuídos dispersos e abundantemente na derme em várias camadas na região dorsal, em menor quantidade nas regiões lateral anterior e posterior, e ausentes na região ventral (Fig. 6A; 7A-C). São mais evidentes como uma camada quase contínua abaixo da membrana basal na região dorsal. Ocasionalmente, podem ocorrer algumas destas células dispersas nas camadas da epiderme. Estas células mostraram-se altamente desenvolvidas, bastante ramificadas em forma dendrítica (Fig. 8C) e repletas de grandes grânulos de pigmento (coloração marrom) (Fig. 11F).

### ***Neuromasto Canal***

Os neuromastos canais, uma das duas submodalidades de mecanorreceptores encontrados nos peixes ósseos e associados ao canal da linha lateral, estão presentes em *P. affinis*. Estes órgãos foram encontrados no epitélio que reveste o fundo dos canais da linha lateral, localizados na derme. Em secção transversal, o neuromasto canal apresentou formato redondo ou oval. Ele é delimitado por um canal ossificado, o qual forma o canal da linha lateral. No interior desta estrutura revestida internamente por células epiteliais, várias células sensoriais ciliadas estão apoiadas sobre as células de suporte (não sensoriais) na região basal do canal em relação a epiderme (Fig. 10K). Neuromastos superficiais não foram observados em *P. affinis*.

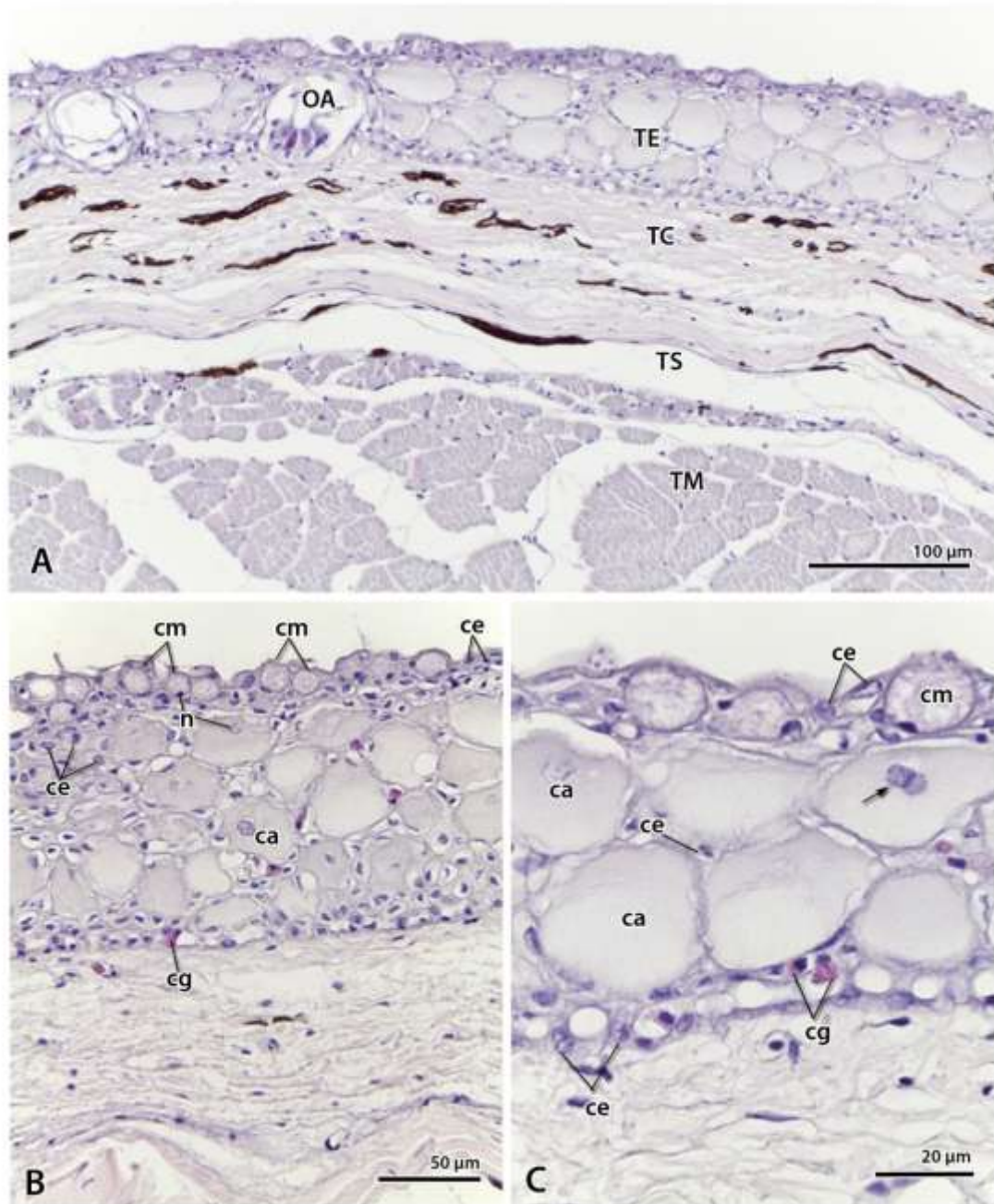


Figura 6. Micrografias de luz de seções transversais do epitélio de *P. affinis* em H/E. (A) Estrutura geral do epitélio dorsal formado por tecido epitelial (TE) com órgão ampular (OA), tecido conjuntivo (TC), tecido subcutâneo (TS) e tecido muscular (TM). (B e C) Detalhes dos componentes celulares da epiderme nas regiões lateral anterior e ventral, respectivamente; célula de muco (cm) com núcleo basal (n); células epiteliais (ce); células de alarme (ca) mononucleadas (n) e binucleadas (seta) e células granulares eosinofílicas (cg).

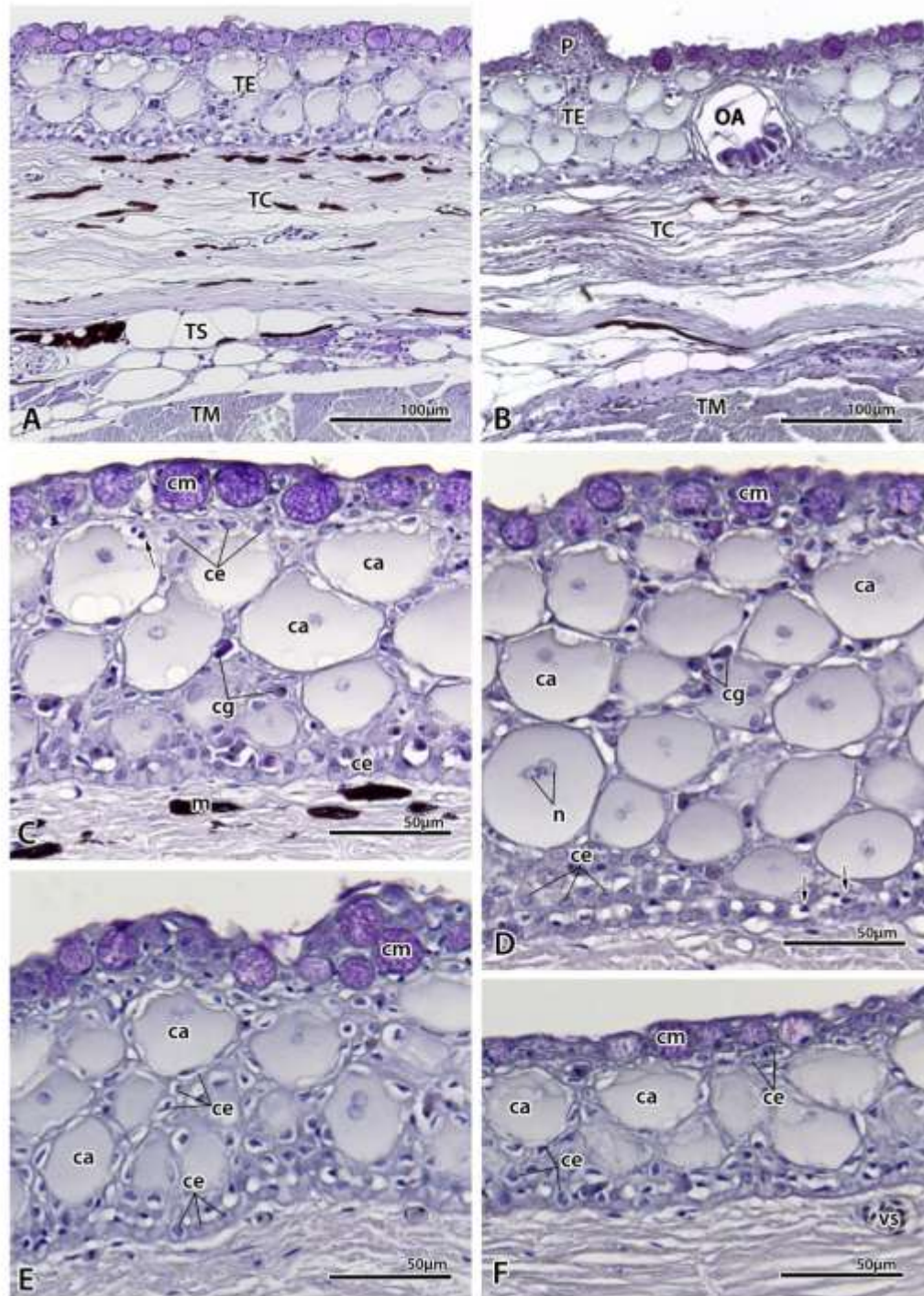


Figura 7. Micrografias de luz de secções transversais da epiderme em diferentes regiões do corpo de *P. affinis* (PAS). (A e B). Organização histológica geral da pele dorsal, tecido epitelial (TE), conjuntivo (TC), subcutâneo (TS) e muscular (TM), estruturas sensoriais - papila gustativa (P) e órgão ampular (OA). Estrutura geral do epitélio dorsal (C), ventral (D), lateral anterior (E) e lateral posterior (F) com células de muco (cm), mostrando forte reacção na detecção de glicoproteínas, células epiteliais (ce), células de alarme (ca) binucleadas (n), células granulares eosinofílicas (cg), linfócitos (seta) e melanóforos (m). Vasos sanguíneos (vs) na derme.

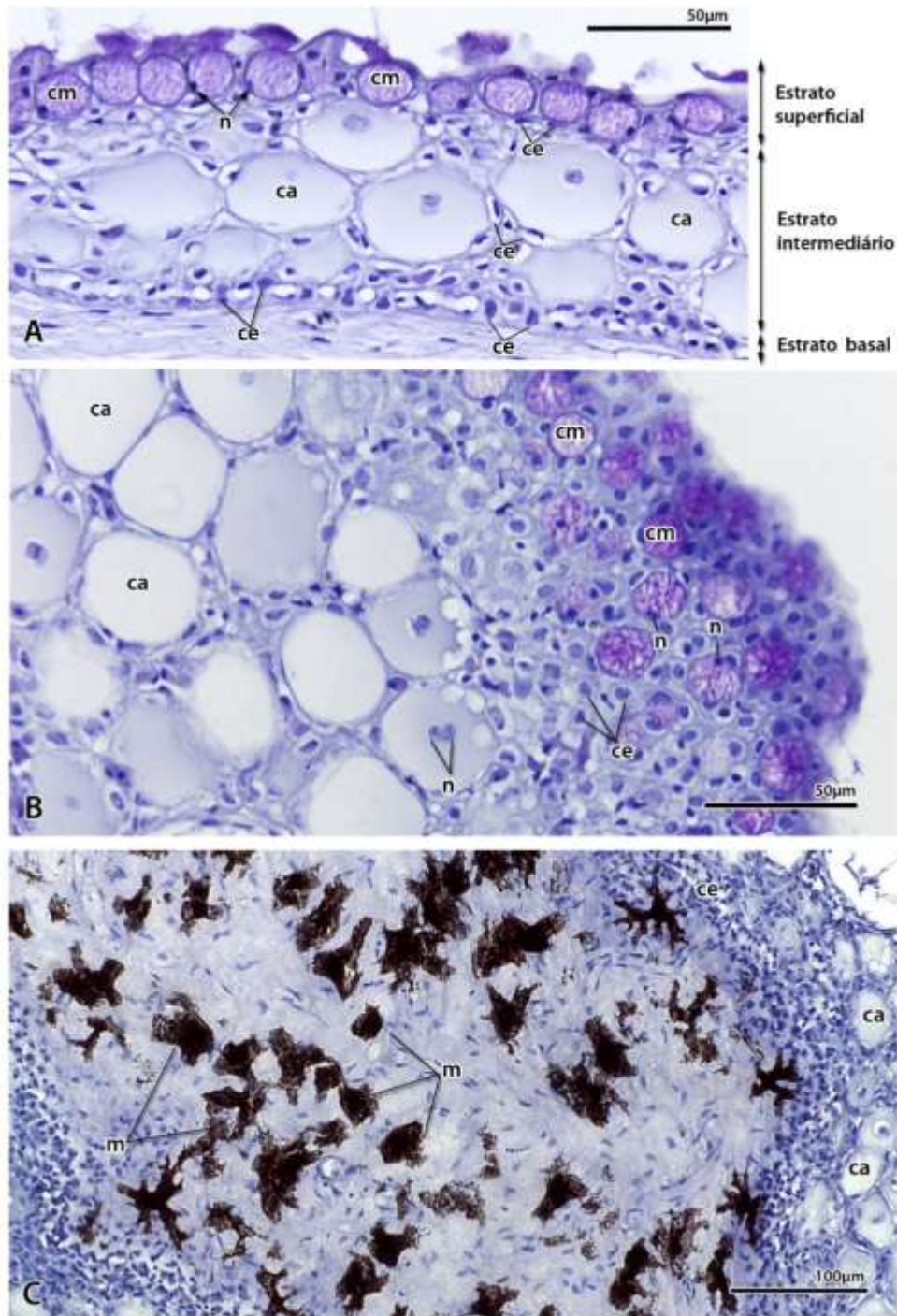


Figura 8. Micrografias de luz de secção transversal e longitudinal da epiderme de diferentes regiões do corpo de *P. affinis* (PAS). (A) Secção transversal da epiderme lateral anterior, organização das células em estratos superficial, constituído por células de muco (cm) núcleo basal (n) e células epiteliais (ce); estrato intermediário formado por células de alarme (ca) e epiteliais (ce); e o estrato basal formado por uma camada única de células epiteliais (ce) indiferenciadas. (B e C) secções longitudinais das regiões lateral anterior e ventral do epitélio, mostrando sob um diferente ângulo a organização estrutural da epiderme formada por células de muco (cm), com núcleo (n) deslocado lateralmente, células epiteliais (ce), células de alarme (ca), e melanóforos (m).

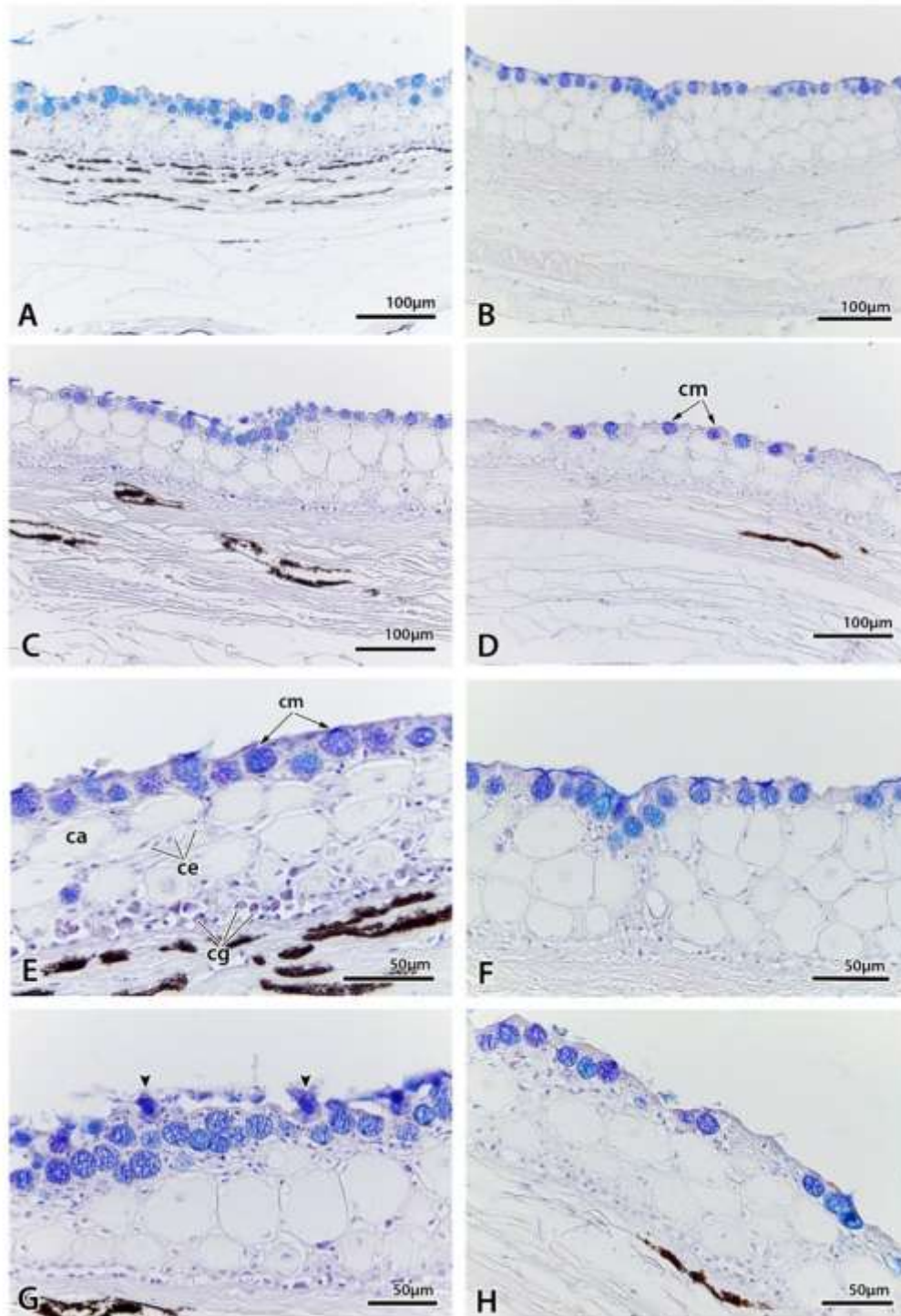


Figura 9. Micrografias de luz de secções transversais da epiderme de diferentes regiões do corpo de *P. affinis* (AB pH2.5/PAS). (A-D) Estrutura geral do epitélio dorsal, ventral, lateral anterior e posterior; reação positiva do conteúdo das células muco. (E-H) Detalhes da organização epidérmica células de muco (cm) com forte reação e conteúdo repleto de grânulos glicoproteicos. Fraca reação nas células epiteliais (ce), reação negativa nas células de alarme (ca), e reação positiva nas células granulares eosinofílicas (cg). Observar numerosas células de muco (cm) liberando seu conteúdo sobre a superfície da pele (cabeça de seta).

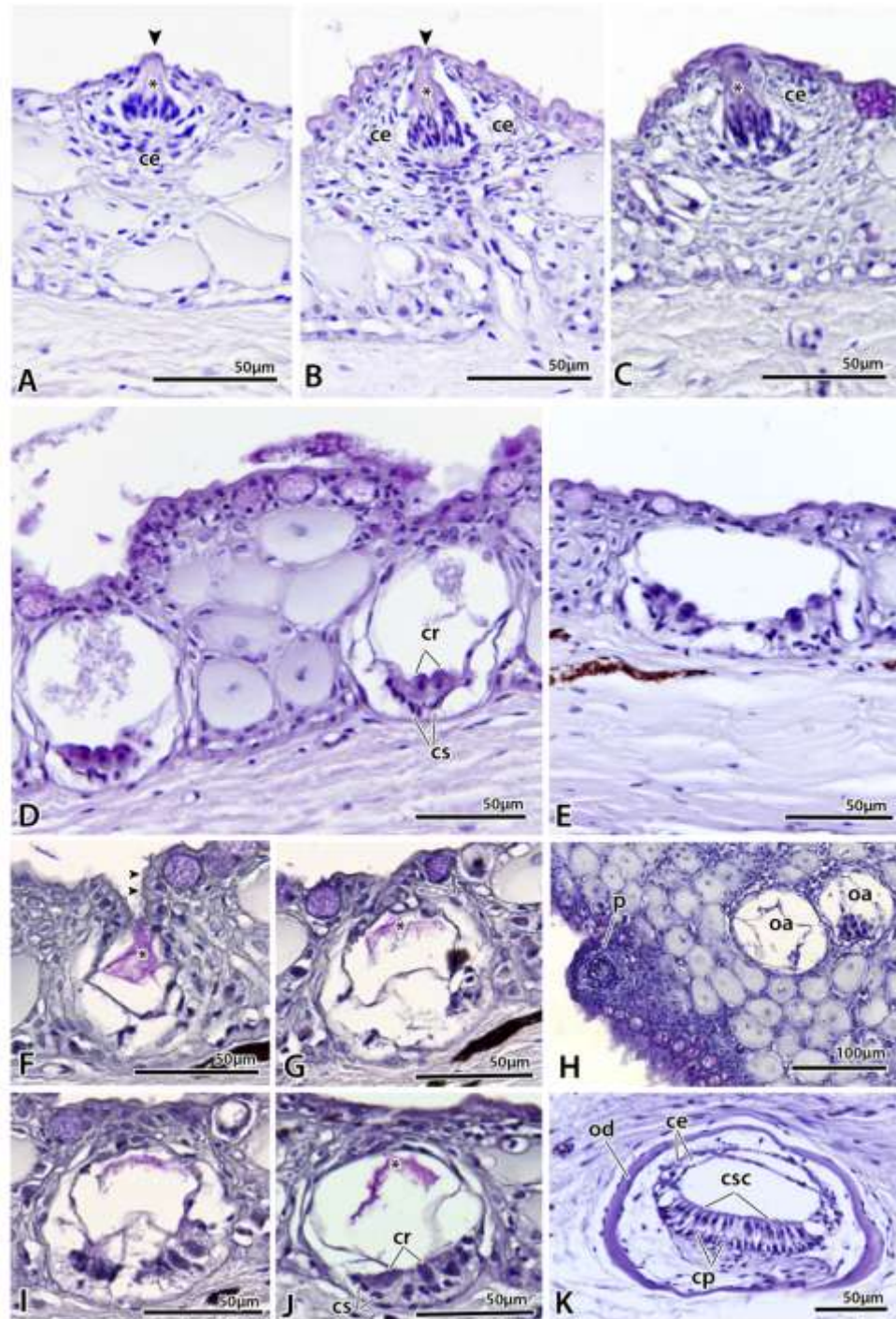


Figura 10. Micrografias de luz dos órgãos sensoriais na epiderme de *P. affinis* (PAS). (A-C) Secções transversais das papilas gustativas, conjunto células epiteliais especializadas (asterisco), área receptora (cabeça de seta). Células epiteliais (ce) não especializadas. (D-G, I e J) Secções transversais órgãos ampulares isolados ou (E) agrupados, conjunto de células receptoras (cr) e células de suporte (cs). Detalhe das células epiteliais cúbicas (cabeça de seta) revestindo o ducto e material glicoproteico (asterisco). (H) Secção longitudinal de uma papila gustativa e órgãos ampulares (oa). (K) Secção transversal do canal da linha lateral com um neuromastos canal, canal ossificado (od) revestido por células epiteliais (ce). Células sensoriais ciliadas (csc) apoiadas sobre as células de suporte (cp).

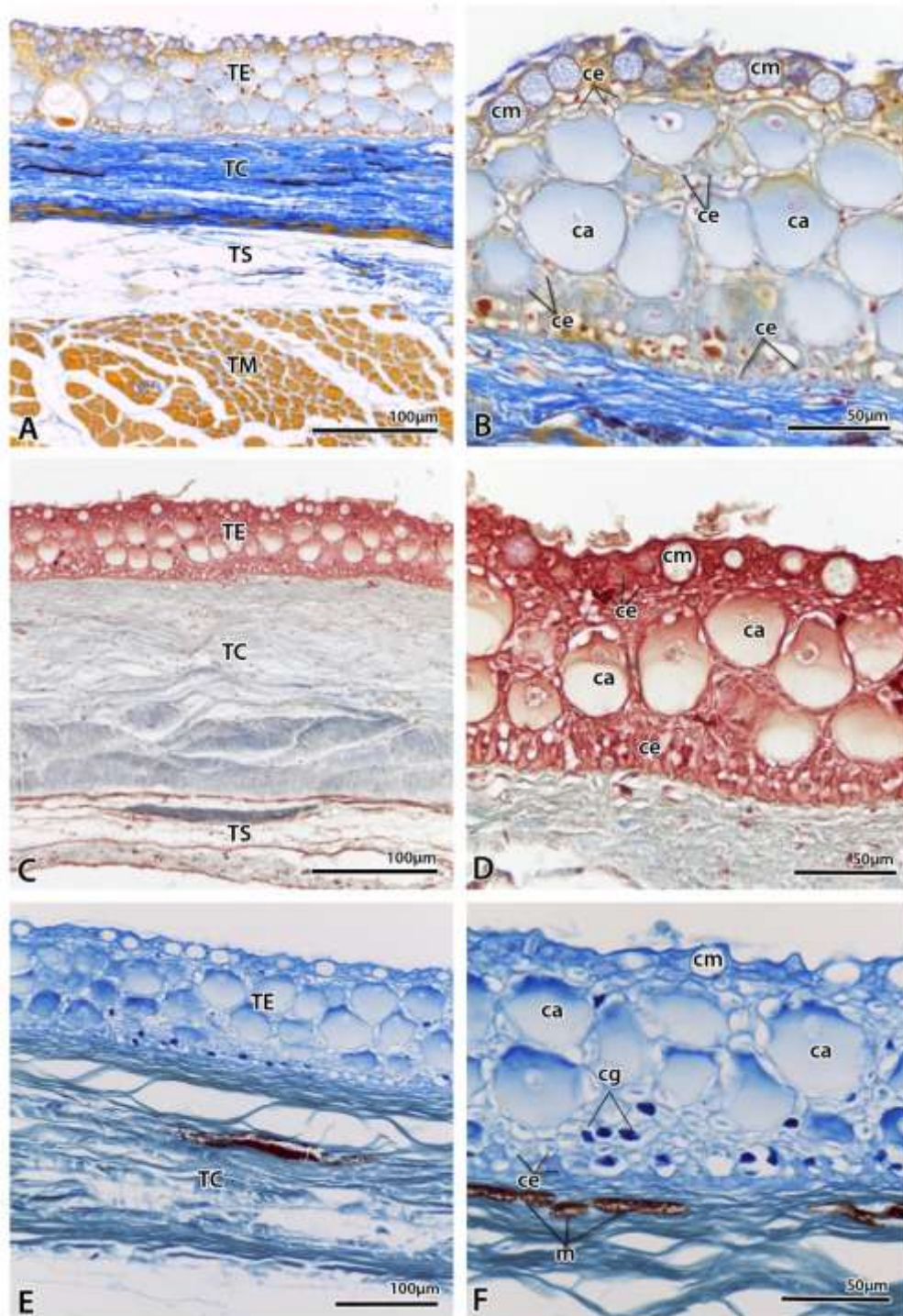


Figura 11. Micrografias de seções transversais da pele de *P. affinis* de distintas regiões do corpo com diferentes técnicas histoquímicas. (A) Epitélio dorsal, tecido epitelial (TE), conjuntivo (TC), subcutâneo (TS) e muscular (TM). (B) Detalhe do tecido epitelial (TE), células de muco (cm), epiteliais (ce) e alarme (ca) (Tricrômico de Mallory). (C e D) Tecido epitelial em vermelho (TE) constituído por células de muco (cm), epiteliais (ce) e de alarme (ca); e derme formada por tecido conjuntivo (TC) em azul e abaixo tecido subcutâneo (TS) (Tricrômico de Masson). (E e F) Tecido epitelial em azul formado por células de muco (cm) com reação negativa e células de alarme (ca), epiteliais (ce) e granular (cg) com reação positiva. Derme constituída de tecido conjuntivo em verde, e melanóforos (m) (Azul de Bromofenol).

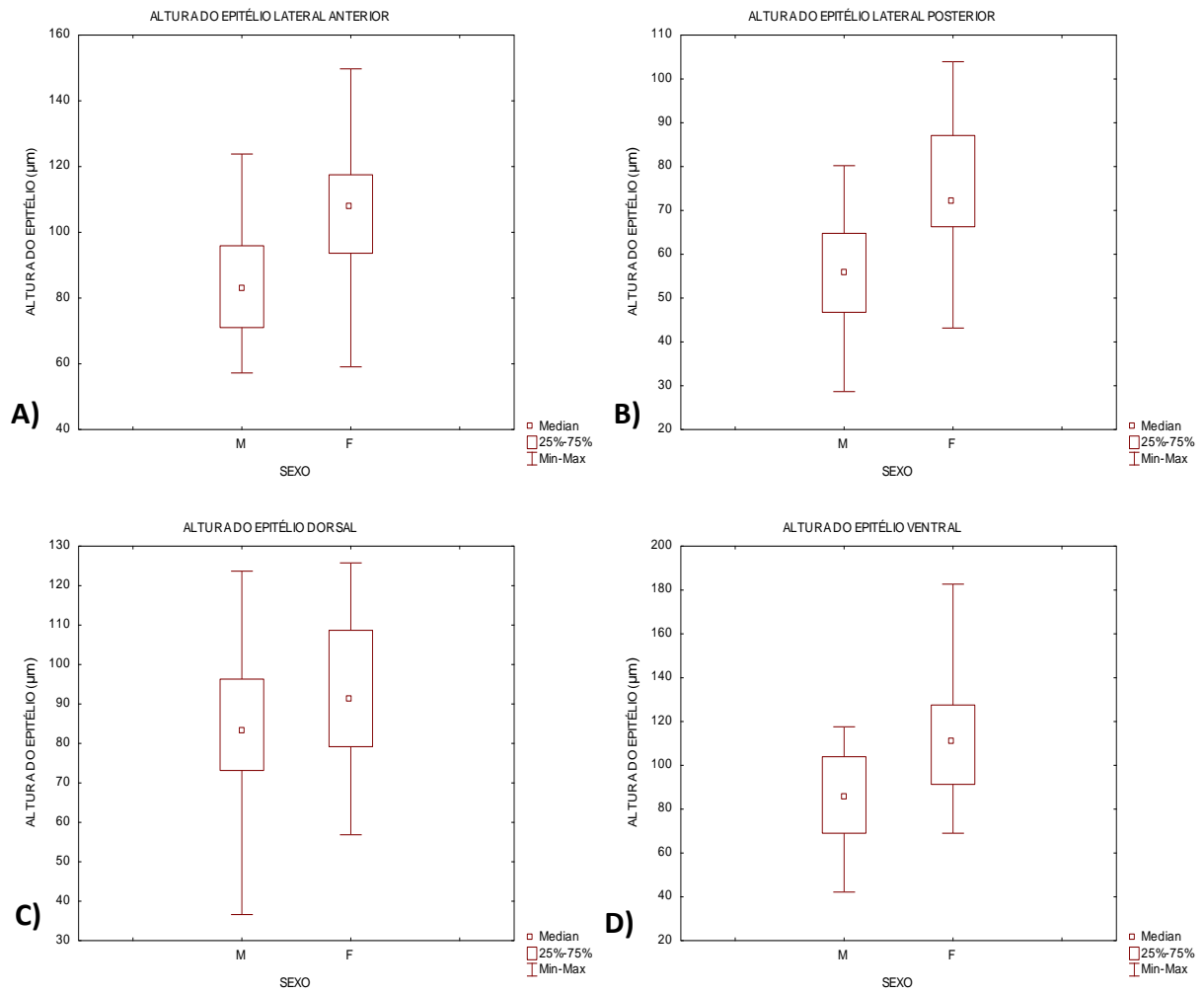


Figura 12. Comparação da altura do epitélio entre machos e fêmeas de *P. affinis* em diferentes regiões do corpo (Teste Mann-Whitney  $p < 0.05$ ). (A) Região Lateral anterior. (B) Lateral posterior. (C) Dorsal. (D) Ventral.

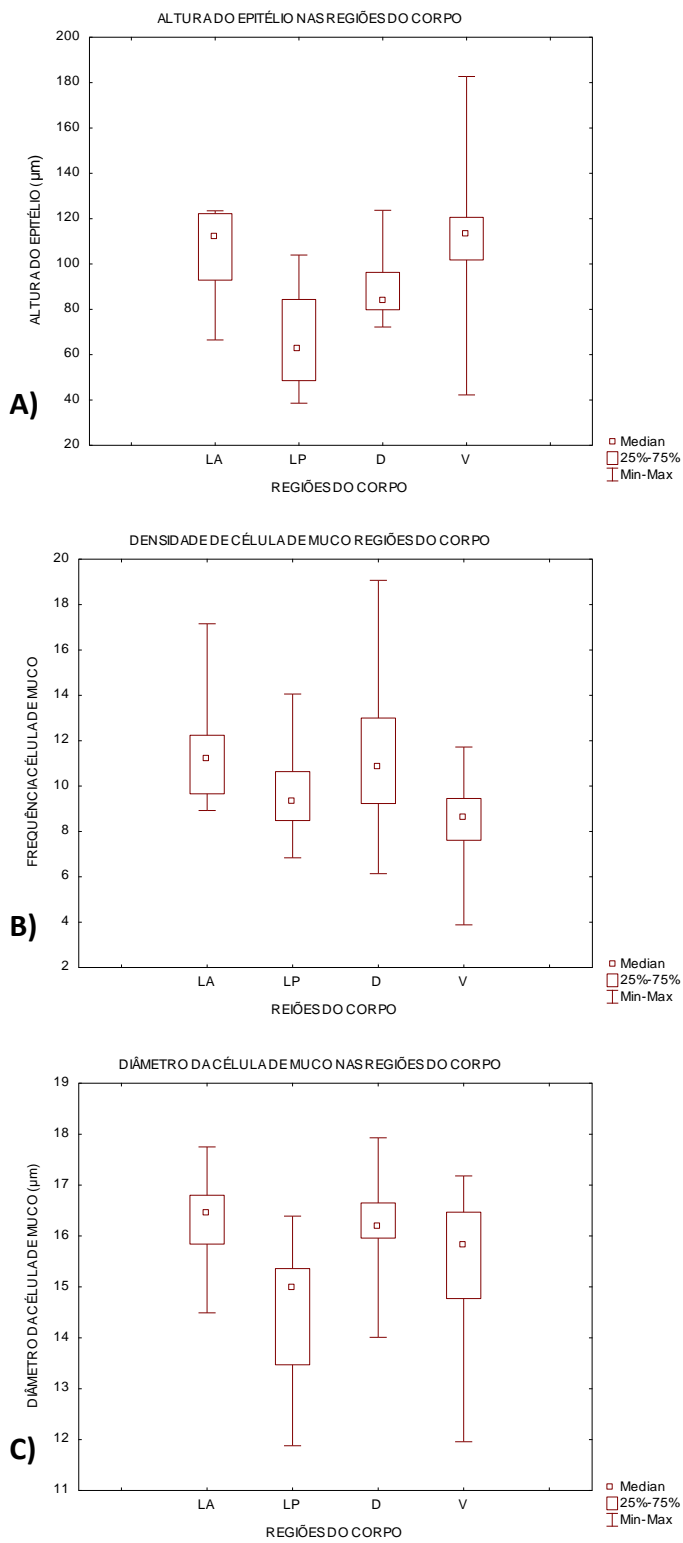


Figura 13. Comparação da altura do epitélio (A), densidade de células de muco (B) e diâmetro das células de muco (C) entre as regiões do corpo (LA-lateral anterior, LP-posterior, D-dorsal, V-ventral,) em *P. affinis* (Teste Kruskal-Wallis  $p < 0.05$ ).

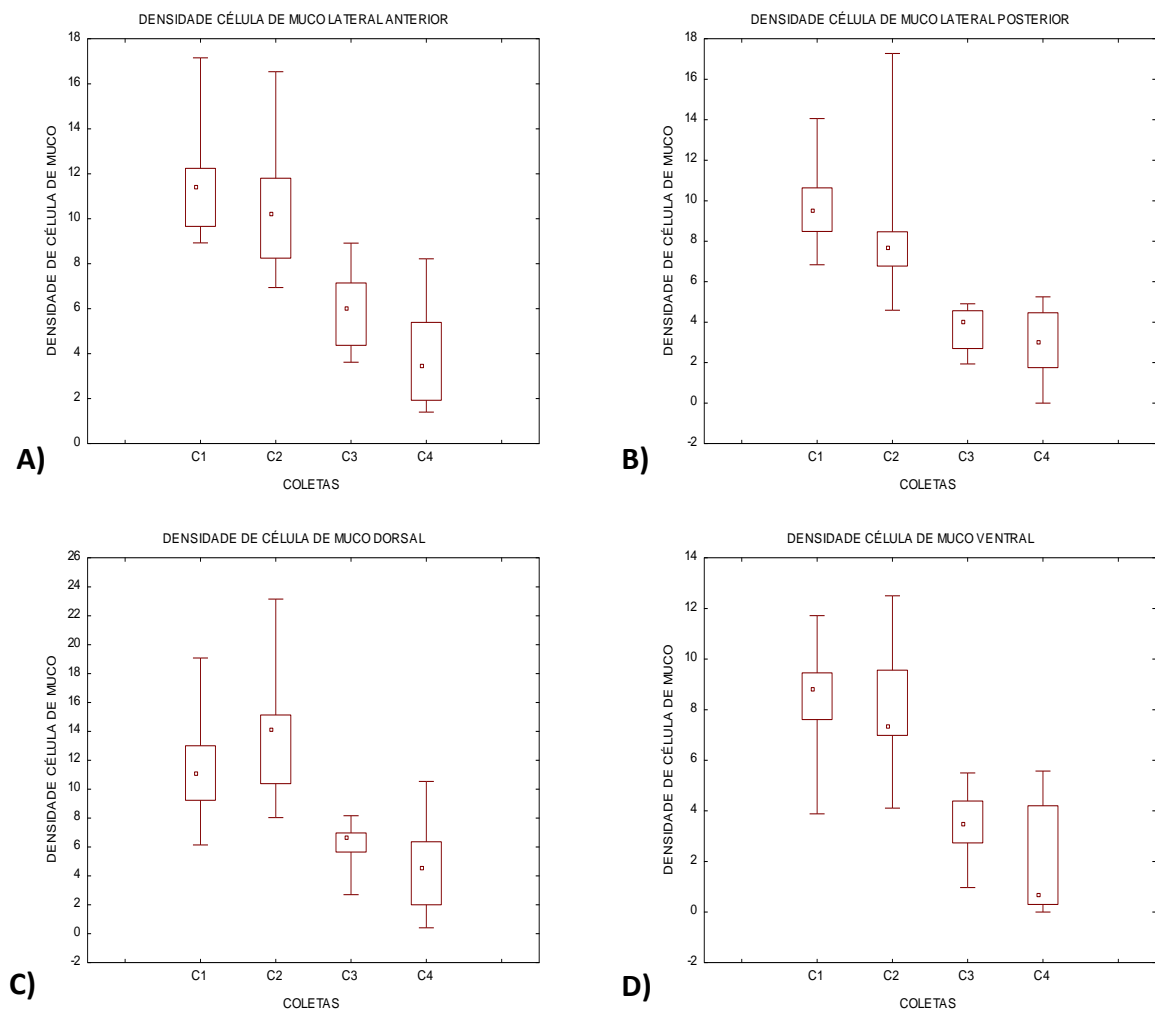


Figura 14. Comparação da densidade de células de muco na epiderme de diferentes regiões do corpo de *P. affinis* ao longo ano. C1 (fevereiro/verão); C2 (maio/outono); C3 (agosto/inverno); C4 (novembro/primavera) (Teste Kruskal-Wallis  $p < 0.05$ ). (A) Região lateral anterior. (B) Lateral posterior. (C) Dorsal. (D) Ventral.

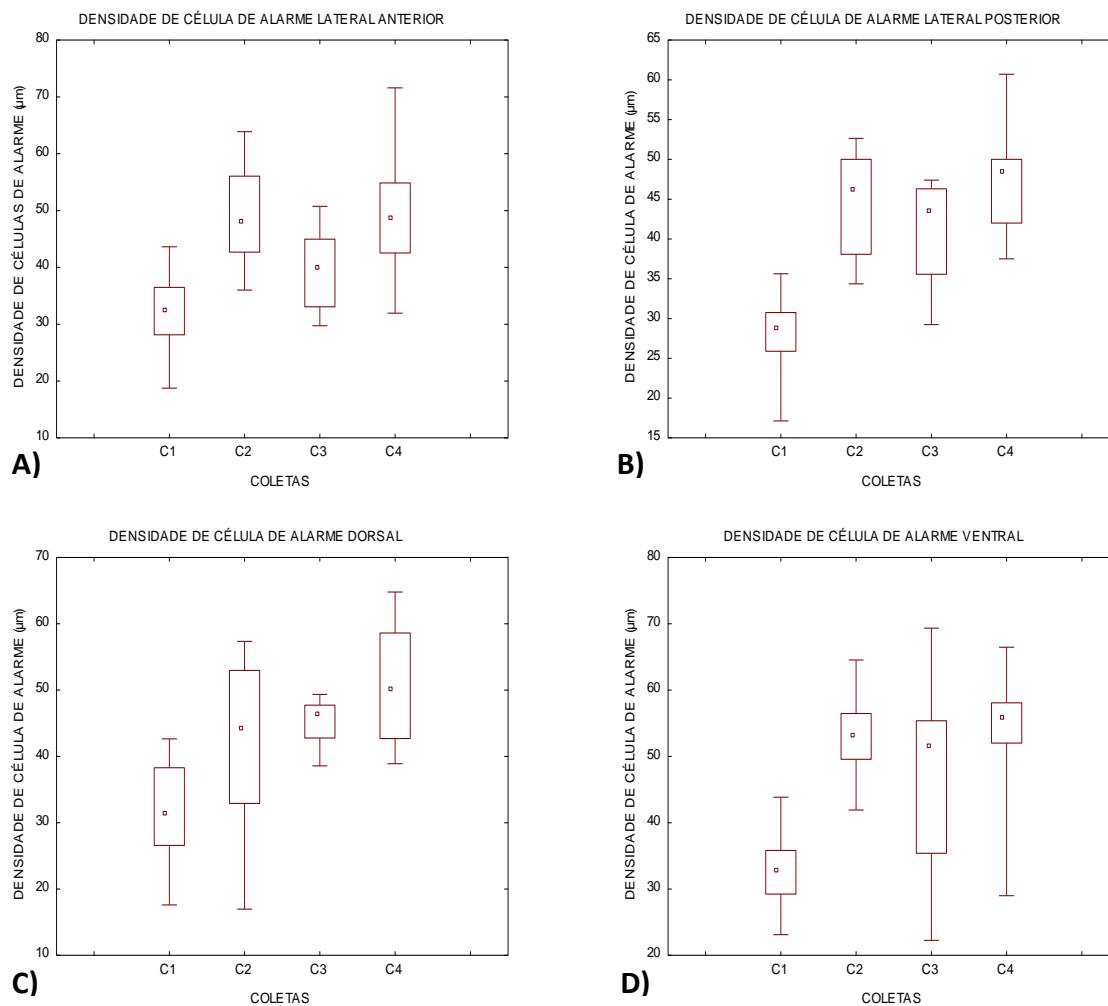


Figura 15. Comparação da densidade de alarme na epiderme de diferentes regiões do corpo de *P. affinis* ao longo ano C1 (fevereiro/verão); C2 (maio/outono); C3 (agosto/inverno); C4 (novembro/primavera). (Teste Kruskal-Wallis  $p < 0.05$ ). (A) Região lateral anterior. (B) Lateral posterior. (C) Dorsal. (D) Ventral.

## 5. DISCUSSÃO

A pele dos peixes está continuamente exposta e em contato com o ambiente onde vivem. Sendo assim, análises morfológicas das estruturas que a compõe, bem como a organização deste órgão em peixes são importantes no fornecimento de dados que possam refletir a taxonomia ou a história evolutiva do grupo (como a presença ou perda de estruturas dentro de um táxon). Além disso, podem auxiliar no entendimento funcional de seus constituintes (por meio da determinação de sua composição química, por exemplo) e da influência do ambiente (e.g. salinidade, temperatura, patógenos e substâncias tóxicas) sobre o organismo.

A organização estrutural da pele de *Pseudauchenipterus affinis* nas quatro regiões analisadas (dorsal, ventral, lateral anterior e posterior) em ambos os sexos, é formada por epiderme, derme e tecido subcutâneo, assim como o padrão conhecido em outros Siluriformes (MITTAL & MUNSHI, 1970; AGRAWAL & MITTAL, 1992; ARRATIA & HUAQUÍN, 1995; ARRATIA, 2003; PARK *et al.*, 2003, 2010; BONILLA LIZARAZO *et al.*, 2008; AL-BANAW *et al.*, 2010; GARG *et al.*, 2010). A camada subcutânea em *P. affinis* é pouco desenvolvida, semelhante ao observado em *Bagarius bagarius* (Hamilton 1822) (Sisoridae) (MITTAL & MUNSHI, 1970) e diferente de *Clarias gariepinus* (Burchell 1822) (Clariidae) (GUERRA *et al.*, 2006), onde esta camada é altamente organizada e composta de grandes aglomerados alongados de adipócitos circundados por uma cápsula de tecido conjuntivo. Em peixes, células de pigmento (cromatóforos) ocorrem na derme, na camada subcutânea ou ocasionalmente na epiderme (ELLIOTT, 2011a). Na derme de *P. affinis*, camadas de células de pigmento são abundantes na região dorsal da pele, abaixo da membrana basal, que resulta na pigmentação característica observada nesta região macroscopicamente. Segundo LE GUELLEC e colaboradores (2004), a organização epidérmica em três estratos, como descrita em *P. affinis* é comum a todas as espécies de peixes teleósteos. No entanto, ocorrem diversas variações na composição de células e espessura da epiderme que estão envolvidas com a adaptação ecológica das espécies. Em peixes pelágicos, a epiderme é frequentemente mais grossa na região dorsal do corpo, mas, em espécies bentônicas, a epiderme da superfície ventral é frequentemente mais espessa (LE GUELLEC *et al.*, 2004). De fato, a região dorsal em *P. affinis* apresentou menor espessura em comparação à região ventral, apesar de tal diferença não ser significativa estatisticamente. Contudo, a epiderme da superfície ventral apresentou maior espessura comparada à região lateral posterior. Diferente do encontrado em *P.*

*affinis*, resultados obtidos por BONILLA LIZARAZO e colaboradores (2008) mostraram que a espessura da epiderme no cambeva *Eremophilus mutisii* (Humboldt 1805) (Trichomycteridae) não variou de acordo com a região da pele analisada. Estas diferenças podem estar relacionadas as características biológicas de cada espécie, sendo Trichomycteridae um grupo extremamente derivado dentre os Siluriformes.

A espessura da epiderme dorsal em *P. affinis* em média foi menor que a epiderme de bagres das famílias Bagridae e Amblycipitidae (88.5  $\mu\text{m}$  versus 203  $\mu\text{m}$  e 374  $\mu\text{m}$ , respectivamente) (PARK *et al.*, 2003; PARK *et al.*, 2010). Já em Trichomycteridae (96.7  $\mu\text{m}$ ), Clariidae (97.6  $\mu\text{m}$ ) e Heteropneustidae (94.3  $\mu\text{m}$ ,) a espessura foi próxima a observada em *P. affinis* (ABRAHAM, 2010; BONILLA LIZARAZO *et al.*, 2008). Esta distribuição de espessura da epiderme parece não estar relacionada a filogenia dos grupos, uma vez que foi semelhante em grupos filogeneticamente distantes, o que pode ser reflexo do ambiente ou hábito da espécie. Além disso, existem diversos fatores que podem influenciar a espessura da epiderme além da região do corpo, tais como espécie, idade, tamanho, sexo e grau de maturação sexual do animal (BURTON & BURTON, 1989; NAKARI *et al.*, 1986; PANKHURST, 1982; PICKERING & RICHARDS, 1980; PICKERING, 1977). A ausência na literatura de um padrão amostral e dados morfométricos das regiões do corpo, dificultou a comparação da espessura da epiderme nas demais áreas aqui analisadas, sendo a área dorsal a mais frequentemente amostrada.

As análises morfométricas mostraram que *P. affinis* apresenta dimorfismo sexual em relação à espessura da epiderme, uma vez que nas fêmeas a epiderme é mais espessa em quase todas as regiões analisadas (lateral anterior, posterior e ventral). Resultados semelhantes foram descritos para a enguia europeia prateada *Anguilla anguilla* (Linnaeus 1758) (Elopomorpha: Anguillidae) (SAGLIO *et al.*, 1988). NAKARI *et al.* (1986), PICKERING (1977), e JOHNSON *et al.* (2006) encontraram resultados diferentes para salmonídeos (Euteleostomorpha), onde a epiderme foi mais espessa nos machos (particularmente em indivíduos sexualmente maduros). Estas variações na espessura da pele podem estar relacionadas a aumentos nos níveis de hormônios sexuais, principalmente andrógenos na circulação, ou ainda ao tamanho corporal, como relatado por PICKERING (1974) para *Salmo trutta* (= *Salmo abanticus* Tortonese 1954). Em salmonídeos, os machos tendem a ser maiores e com epiderme mais espessa que as fêmeas e assim diferenças na espessura da pele podem refletir, em parte, diferenças no tamanho corporal (JOHNSON *et al.*, 2006). Dessa forma, o dimorfismo sexual encontrado em *P. affinis* também pode estar relacionado

ao maior tamanho corporal das fêmeas analisadas neste estudo. Não foram encontrados estudos sobre dimorfismo sexual na espessura da epiderme em Siluriformes ou grupos filogeneticamente próximos para comparação.

A epiderme de *P. affinis* apresentou um epitélio constituído por três tipos celulares principais: as células epiteliais, células de muco e células de alarme. A existência destes três tipos em *P. affinis* é condizente com a ocorrência no epitélio do barbilhão no auquenipterídeo *Trachelyopterus striatulus* (Steindachner 1877) e em outros Siluriformes que tiveram sua estrutura epitelial analisada (ZACCONI & CASCIO, 1981; GARG & MITTAL, 1990; PARK *et al.*, 2003; 2010; GUERRA *et al.*, 2006; BONILLA LIZARAZO *et al.*, 2008; AL-BANAW *et al.*, 2010; SANTOS *et al.*, 2015). Somente no Siluriforme *Pimelodella lateristriga* não foram observadas células de muco (DAMASCENO *et al.*, 2012).

A disposição geral das células na epiderme de *P. affinis* está de acordo com o relatado para a maioria dos Siluriformes. Entretanto, a distribuição das células de muco em *P. affinis* está restrita à região superficial do epitélio, diferindo do descrito para outros Siluriformes nos quais as células de muco podem ser encontradas tanto na camada superficial, quanto em menor número na camada intermediária (ZACCONI & CASCIO, 1981; BONILLA LIZARAZO *et al.*, 2008; PARK *et al.*, 2003, 2010; GUERRA *et al.*, 2006; SANTOS *et al.*, 2015). Em *P. affinis* esta disposição das células de muco, restrita à superfície da epiderme, pode indicar que a diferenciação destas células, a partir das células epiteliais do estrato basal, ocorra somente após elas atingirem o estrato superficial. Isto contrasta com o do descrito na literatura por HENRIKSON & MALTOSY (1968a) onde as células de muco são encontradas imaturas na região basal da epiderme e aumentam gradualmente de tamanho à medida que passam pela camada intermediária e finalmente atingem a superfície totalmente diferenciadas.

As células epiteliais em *P. affinis* são pequenas, o que dificulta a descrição detalhada deste tipo celular através da microscopia de luz. A morfologia destas células variou dependendo de sua posição nos estratos da epiderme como descrita para outros Siluriformes (ZACCONE & CASCIO, 1981; BONILLA LIZARAZO *et al.*, 2008). No estrato basal, ou germinativo, a morfologia das células epiteliais de *P. affinis* está de acordo com o descrito para várias espécies de Diplomystidae (ARRATIA & HUAQUÍN, 1995), *Liobagrus mediadiposalis* (Mori 1936) (Amblycipitidae) (PARK *et al.*, 2003), *Clarias gariepinus* (GUERRA, *et al.*, 2006) e *Pseudobagrus brevicorpus* (= *Coreobagrus brevicorpus* (Mori 1936) (Bagridae) (PARK *et al.*, 2010). Esta descrição, entretanto,

difere da observada por BONILLA LIZARAZO *et al.* (2008) em *Eremophilus mutisii* (Humboldt 1805) (Trichomycteridae), onde não é possível observar uma camada de células cúbicas ou colunares, mas apenas uma camada indiferenciada. Apesar de sua pequena dimensão, sua densidade foi maior em relação aos demais tipos celulares da epiderme, como também observado por GUERRA (2006) para o bagre africano *Clarias gariepinus*.

Diferente das células epiteliais, as células de muco são conspícuas e sua morfologia esférica em *P. affinis* está de acordo com a descrita em outras espécies de bagres (ARRATIA & HUAQUÍN, 1995; PARK *et al.*, 2003; GUERRA, *et al.*, 2006; BONILLA LIZARAZO *et al.*, 2008; ABRAHAM, 2010; GARG *et al.*, 2010; PARK *et al.*, 2010). Já em *Bagarius bagarius*, *Liobagrus mediadiposalis* e *Pseudobagrus brevicorpus* (= *Coreobagrus brevicorpus*) *Heteropneustes fossilis* (Bloch 1794) (Heteropneustidae) e *Clarias batrachus* (= *Silurus batrachus* Linnaeus 1758) (Clariidae) elas podem variar de esféricas a um formato de balão (MITTAL & MUNSHI, 1970; PARK *et al.*, 2003; ABRAHAM, 2010; PARK *et al.*, 2010). Estas variações de forma são consideradas estádios diferentes de maturação e migração destas células, do estrato intermediário para superfície da epiderme (ABRAHAM, 2010).

Com relação à composição química da secreção das células de muco, as técnicas de detecção de glicoconjugados usadas (PAS e Alcian Blue pH 2.5) apresentaram reações citoplasmáticas positivas indicando que o conteúdo de secreção destas células, em todas as regiões do corpo, é do tipo glicoproteico, de composição neutra e ácida. Estas características histoquímicas encontradas estão de acordo com àquelas descritas na literatura para outros Siluriformes (ALBANAW *et al.*, 2010; BONILLA LIZARAZO *et al.*, 2008; GARG *et al.*, 2010; KUMARI *et al.*, 2009; PARK *et al.*, 2003; SANTOS *et al.*, 2015).

A morfometria (densidade e o diâmetro) das células de muco em *P. affinis* é próxima a descrita para outros bagres com a pele lisa (PARK *et al.*, 2003; GUERRA *et al.*, 2006; PARK *et al.*, 2010). No entanto, essa densidade foi maior quando comparada à epiderme de *Ancistrus dolichopterus* (GARG *et al.*, 2010) que possui o corpo coberto por placas ósseas e *Bagarius bagarius* (MITTAL & MUNSHI, 1970) o qual a superfície da pele possui estruturas queratinizadas com função de proteção contra danos físicos. Uma maior densidade de células de muco em Siluriformes que têm a pele nua, pode estar relacionada a função de proteção atribuída as secreções dessas células, compensando a ausência de estruturas protetoras.

Segundo NAKARI *et al.* (1986) e PICKERING (1974, 1977), o número de células de muco pode variar entre machos e fêmeas da mesma espécie, como o observado no bagre *Clarias macrocephalus* (Günther 1864) (Clariidae) e na enguia europeia prateada *Anguilla anguilla*, onde o número de células de muco foi maior nas fêmeas (AHMED & TAN, 1991; SAGLIO *et al.*, 1988). Contudo, *P. affinis* não apresentou dimorfismo sexual em relação à densidade de células de muco. Quando se comparam as regiões do corpo, a densidade de células de muco em *P. affinis* foi maior na região lateral anterior em relação à região ventral, assim como observado no bagre *C. macrocephalus* (AHMED & TAN, 1991). Ainda, para o bagre *C. macrocephalus*, a enguia *A. anguilla* e os salmónídeos *Salmo trutta* (= *Salmo abanticus* Tortonese 1954) e *Salvelinus alpinus* (Linnaeus 1758), o número de células de muco diminui em direção à região posterior do corpo (AHMED & TAN, 1991; PICKERING, 1974). Tal diminuição não foi constatada em *P. affinis*.

A densidade de células de muco na epiderme de *P. affinis*, variou consideravelmente entre as estações. Nas coletas de fevereiro (verão) e maio (outono) esse valor foi similar, mas diferiu das coletas de agosto (inverno) e novembro (primavera), tendo sido elevada nas duas primeiras ocasiões, e decrescendo nas duas últimas. No presente estudo, salinidade e/ou maturidade sexual foram levantados como possíveis causas da variação da densidade de células de muco ao longo do ano. Isso porque a partir do mês de junho de 2015 ocorreu severa seca na bacia do rio São Mateus, o que elevou consideravelmente a salinidade de suas águas no trecho inferior da bacia (onde os exemplares foram coletados). Isto se deu através da entrada de água do mar na calha do rio e parada quase total de escoamento de sua água doce. Este período atípico de estiagem não coincidiu com o período reprodutivo da espécie, o que foi constatado através da observação das gônadas dos exemplares estudados, de tal forma que é possível neste momento atribuir a variação da densidade das células de muco apenas à salinidade. Além disso, outro ponto a considerar é que a elevação da salinidade do rio São Mateus fez com que os peixes se deslocassem a uma maior distância, comparado ao local das duas primeiras coletas, supostamente aumentando assim o gasto energético e afetando a produção de células de muco.

A diminuição da densidade de células de muco na epiderme de *P. affinis*, possivelmente devido aos altos níveis de salinidade, também foi constatada por MATTHEIJ & STROBAND (1971) para o acará *Cichlasoma biocellatum* (= *Rocio octofasciata* (Regan 1903), Eutelesotomorpha: Cichlidae) em um experimento, no qual foram mantidos em água salgada. Em *C. biocellatum* a salinidade afeta aparentemente a produção da prolactina (hormônio que estimula

a produção de células de muco), alterando toda a estrutura da epiderme, o que não foi testado em *P. affinis*. Já em *Pungitius pungitius* (Linnaeus 1758) (Euteleostomorpha: Gasterosteidae) e no lambari *Astyanax jordani* (= *Anoptichthys jordani* (Hubbs & Innes 1936) (Characidae) transferidos para água do mar, o número de células de muco da cavidade bucal decresceu significativamente com o aumento da salinidade, porém o mesmo não ocorreu com as células da epiderme (MATTHEIJ & SPRANGERS, 1969; SOLANKI & BENJAMIN, 1982).

Como observado e discutido no presente trabalho, a abundância das células de muco pode se alterar sazonalmente durante processos de maturação sexual (PICKERING & RICHARDS, 1980; PICKERING, 1977) ou adaptação à água do mar (SOLANKI & BENJAMIN, 1982). Além desses, outros fatores, como alterações das condições ambientais ou exposição a condições ambientais adversas, deficiências nutricionais, presença de patógenos, temperatura ou outros fatores de estresse podem alterar a composição e estrutura celular da epiderme (ELLIOTT, 2011b; QUINIOU *et al.*, 1998).

A morfologia das células de alarme em *P. affinis* é bastante semelhante ao descrito para outros Ostariophysi. São facilmente distinguidas das células de muco por serem volumosas e localizadas na região intermediária da epiderme, não possuindo abertura na superfície na epiderme, contendo um ou dois núcleos centrais e terem reação negativa ao método de PAS (SMITH, 1977; HENRIKSON & MATOLTSY, 1968c; PARK, *et al.*, 2003, 2010; GUERRA *et al.*, 2006; BONILLA LIZARAZO *et al.*, 2008; STABELL & VEGUSDAL, 2010). Apesar de serem classificadas como células em formato de clava (claviformes) em outros Siluriformes (PARK, *et al.*, 2003, 2010; GUERRA *et al.*, 2006; DAMASCENO *et al.*, 2012), em *P. affinis* elas apresentam forma globular.

As características citoquímicas das células de alarme também foram semelhantes às de outros Ostariophysi (PARK *et al.*, 2003; GUERRA *et al.*, 2006; BONILLA LIZARAZO *et al.*, 2008; STABELL & VEGUSDAL, 2010). Elas apresentaram reação negativa ao método de PAS e Alcian Blue 2.5/PAS, indicando a ausência de glicoproteínas em sua composição, e reação positiva ao Azul de Bromofenol, confirmando a sua composição proteica.

A densidade das células de alarme em *P. affinis* é relativamente mais elevada que as células de muco, assim como observado para os Siluriformes *Rita rita* (Hamilton 1822) (Bagridae) (MITTAL, 1968), *Clarias gariepinus* (GUERRA *et al.*, 2006), *Pseudobagrus brevicorpus* (= *Coreobagrus brevicorpus*) (PARK *et al.*, 2010) e *Eremophilus mutisii* (BONILLA LIZARAZO *et*

*al.*, 2008). Dentre as áreas analisadas, a ventral apresentou a maior densidade de células de alarme comparada às células de muco. SINGH e MITTAL (1990) sugeriram que a baixa densidade de células de muco seja compensada pela alta densidade de células de alarme como uma adaptação eficaz de proteção (e.g. regeneração a lesões mecânicas ou infecções por patógenos). Esta integração de alterações na atividade de células de alarme com as células de muco também foi observada por PÄKK (2012) em carpas infectadas por parasitas. Estas conclusões podem ser associadas, em especial a *P. affinis*, onde a região ventral apresentou a maior densidade de células de alarme comparada as células de muco, dentre as áreas analisadas. Possivelmente, esse incremento de células de alarme esteja relacionado ao hábito bentônico de *P. affinis*, e dos bagres em geral, onde esta região fica em contato frequente com o substrato, submetida a uma maior fricção ao substrato e infecção por patógenos.

A densidade de células de alarme, em *P. affinis* apresentou alteração sazonal com comportamento inverso à densidade células muco em períodos de elevação na salinidade da água. Ou seja, podemos considerar que, possivelmente, a diminuição da densidade de células de muco ao longo do ano foi relativamente compensada pelo acréscimo das células de alarme também como mecanismo de defesa.

As células granulares eosinofílicas, descritas neste estudo, são encontradas em várias espécies de peixes, incluindo bagres e principalmente salmonídeos (POWELL *et al.*, 1990; HOLLAND *et al.*, 1998; KUMARI *et al.*, 2009; GARG *et al.*, 2010). As características morfológicas e reações positivas às técnicas de colorações convencional e de PAS e Alcian Blue pH2.5 estão de acordo com o relatado por GARG *et al.* (2010). Suas características histoquímicas e morfológicas permitem compará-las aos mastócitos em mamíferos, e ambas estão envolvidas em processos de defesa geral e imunológica específica (POWELL *et al.*, 1990, 1993a). Estas células sofrem desgranulação e aumentam sua concentração após exposição a infecções parasíticas e bacterianas, iniciando respostas inflamatórias (BURKA, *et al.*, 1992; POWELL *et al.*, 1990, 1993a, b). De fato, em *P. affinis*, foram observadas várias células granulares (assim como vários linfócitos) sofrendo degradação e liberando seu conteúdo na epiderme, em regiões lesionadas. Assim, a presença de células granulares na epiderme de *P. affinis* pode apresentar um importante mecanismo de resposta imune contra infecção por patógenos e lesões.

Apenas um tipo de papila gustativa foi identificado na epiderme de *P. affinis*, diferente do relatado para os bagres *Clarias batrachus* (= *Silurus batrachus*) (RAJI & NOROZI, 2010) e

*Pelteobagrus fulvidraco* (= *Pimelodus fulvidraco*, Richardson 1846) (ZHANG *et al.*, 2006), onde foram observados dois e três tipos morfológicos distintos, respectivamente. O tipo II observado em *Pelteobagrus fulvidraco* é similar ao identificado em *P. affinis*, pois forma uma camada elevada no epitélio. As papilas gustativas de *P. affinis*, assim como nos bagres *Ameiurus natalis* (Lesueur 1819) (ATEMA, 1971) e *Rita rita* (AGRAWAL & MITTAL, 1992), são estruturas quimiosensoriais distribuídas na superfície de todas as regiões do corpo analisadas neste estudo. Uma ampla distribuição das papilas gustativas ao longo dos barbilhões e superfície da pele é característica entre os Siluriformes, mas ausente nos demais teleósteos (ATEMA, 1971). Papilas gustativas bem desenvolvidas e distribuídas por toda a pele de bagres são consideradas uma adaptação à visibilidade restrita pela redução dos olhos, lentidão, hábito de vida noturno e criptobiótico, uma vez que estão primariamente envolvidas na localização e detecção de alimentos (ATEMA, 1971; ERAM & MICHEL, 2005).

Todos os Siluriformes possuem invaginações na epiderme que funcionam como órgãos eletrorreceptores, os quais detectam sinais externos (BULLOCK, 1983). Os órgãos ampulares em *P. affinis* foram encontrados em todas as regiões do corpo analisadas, assim como relatado nos Siluriformes *Kryptopterus bicirrhis* (= *Silurus bicirrhis* Cuvier & Valenciennes 1840) (Siluridae) e *Plotosus tandanus* (Mitchell 1838) (Plotosidae) (JORGENSEN, 1992; WHITEHEAD *et al.*, 2003). A distribuição destas estruturas em *P. affinis* sugere que tenham um papel significativo e complementar às papilas gustativas (quimiorreceptores) e neuromastos canais (mecanorreceptores) na orientação, localização de presas e comunicação social.

Quanto à morfologia, em *P. affinis*, e em famílias de água doce, o canal do órgão ampular é curto, localizado na epiderme e as células receptoras são pouco numerosas (uma a duas células) (ANDRES *et al.*, 1988; AGRAWAL & MITTAL, 1992; JORGENSEN, 1992; NORTH CUTT *et al.*, 2000; WHITEHEAD *et al.*, 2003). Já nas espécies marinhas ou estuarinas, como *Euristhmus lepturus* (= *Cnidoglanis lepturus*, Günther 1864) (Plotosidae) (WHITEHEAD, 2009) e *Neoarius graeffei* (GAUTHIER *et al.*, 2015), o canal do órgão ampular é longo, localizado desde a superfície da epiderme até a derme e o número de células receptoras é maior (de 242 a 285 em *Euristhmus lepturus*) (WHITEHEAD, 2009). Esta diferença é atribuída às propriedades condutoras do ambiente (WHITEHEAD *et al.*, 1999, 2003) e, de acordo com Kalmijn (1974), espécies marinhas necessitam de longos canais através dos tecidos do corpo de modo a produzir uma diferença de potencial para aumentar a sensibilidade de percepção de campos elétricos de grande escala. Os

órgãos ampulares de espécie de água doce não possuem canais longos porque a pele é altamente resistente a fluxos de íons (KALMIJN, 1974).

Os resultados descritos neste trabalho mostram, pela primeira vez, a estrutura e composição da pele de uma espécie da família Auchenipteridae. Esses resultados corroboram as principais funcionalidades atribuídas ao tegumento dos peixes na literatura, como proteção (presença das células de muco, claviformes e granulares) e percepção sensorial (estruturas sensoriais químico, mecânico e eletrorreceptoras), além de confirmar a presença de células produtoras de muco que tornam os espécimes de *P. affinis* tão escorregadios, característica que despertou o interesse em analisar a composição da pele destes peixes.

Achados importantes como o dimorfismo sexual na altura do epitélio, variações na densidade de células de muco ao longo do corpo e diminuição sazonal por efeito da salinidade nas densidades de células de muco compensada pelo aumento das células de alarme, foram descritos neste estudo. Tais resultados, mostram que a pele é um órgão sensível às alterações ambientais, refletindo as modificações ocorridas no ambiente e desenvolvendo mecanismos para lidar com vários desafios ambientais, neste estudo a salinidade.

O presente estudo representa uma referência na descrição estrutural da epiderme de *P. affinis* e sobretudo de Auchenipteridae, considerando o detalhamento morfológico apresentado e ausência de estudos do tipo neste grupo.

## 6. CONCLUSÕES

- 1) A pele de *Pseudauchenipterus affinis* apresenta uma organização – epiderme, derme e tecido subcutâneo – condizente com a relatada para outros Teleósteos.
- 2) A derme de *P. affinis* apresentou organização e composição semelhante ao descrito para os Ostariophysi; espessa camada de tecido conjuntivo com fibras colágenas e presença de melanóforos.
- 3) Três tipos principais de células foram identificados na epiderme – células epiteliais, células de muco e de alarme, conforme retratado para diversos Ostariophysi.
- 4) Os tipos de células da epiderme de *P. affinis* seguem a descrição relatada para outros Siluriformes, embora existam algumas variações na morfologia, densidade e distribuição destas células.
- 5) O conteúdo das células de muco apresentou reação positiva as técnicas PAS e Alcian Blue pH2.5 e negativa à Azul de Bromofenol, portanto, relacionado à produção de substâncias glicoproteicas neutras e ácidas. Por outro lado, as células de alarme apresentaram reação negativa PAS e Alcian Blue pH2.5 e positiva a Azul de Bromofenol, assim como relatado em outros Siluriformes.
- 6) As células de muco em *P. affinis* foram encontradas apenas na região superficial da epiderme, diferente do descrito em outros bagres, que possivelmente representa uma variação no padrão de maturação das células de muco.
- 7) O dimorfismo sexual foi constatado apenas em relação à altura do epitélio (e não para densidade de células e diâmetro de célula de muco). Em três das quatro regiões analisadas (lateral anterior, posterior e ventral) a fêmea possui a epiderme mais espessa.
- 8) As diferentes regiões do corpo analisadas não são uniformes com relação à densidade de células muco, altura do epitélio e diâmetro, confirmando o relatado na literatura.
- 9) A densidade de células de muco e células de alarme, a altura do epitélio e o diâmetro das células de muco sofreram variações sazonais. A densidade de células de alarme apresentou comportamento inverso ao de células muco em períodos de elevação na salinidade da água.
- 10) Estruturas sensoriais quimio, eletro e mecanorreceptoras (papilas gustativas, órgão ampulares e neuromastos canais) foram encontradas na pele de *P. affinis*, também descritas em outros Siluriformes, confirmando a função sensorial deste órgão.

- 11) Apenas um tipo de papila gustativa foi identificado na epiderme de *P. affinis*, diferente do relatado para outros Siluriformes.
- 12) A morfologia do órgão ampular é condizente com a apresentada por diversas espécies de bagres de água doce.
- 13) O presente estudo representa uma referência na descrição estrutural da epiderme de *P. affinis* e sobretudo de Auchenipteridae, considerando o detalhamento morfológico apresentado e ausência de estudos do tipo neste grupo.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABRAHAM, J., 2010. Comparative study of the skin of some fresh water catfishes. Mahatma Gandhi Univ. Kottayam.
- AGRAWAL, N., MITTAL, A.K., 1992. Structure and histochemistry of the epithelia of the lips and associated structures of a catfish *Rita rita*. Japanese J. Ichthyol. 39, 93–102.
- AHMED, G.U., TAN, B.S.P., 1991. Distribution of mucous cells in the skin of a catfish, *Clarias microcephalus*. Indian Journal of Fisheries. 38, 165–168.
- AKAMA, A. 1999. Sistemática do gênero *Pseudauchenipterus* Bleeker, 1862 (Siluriformes, Auchenipteridae). Dissertação de mestrado, Universidade de São Paulo, São Paulo, 123 p.
- AL-BANAW, A., KENNGOTT, R., AL-HASSAN, J.M., MEHANA, N., SINOWATZ, F., 2010. Histochemical analysis of glycoconjugates in the skin of a catfish (*Arius tenuispinis*, Day). J. Vet. Med. Ser. C Anat. Histol. Embryol. 39, 42–50. doi:10.1111/j.1439-0264.2009.00977.x
- AL-HASSAN, J.M., DYSON, M., YOUNG, S.R., THOMSON, M., CRIDDLE, R.S., 1991. Acceleration of wound healing responses induce by preparations from the epidermal secretions of the Arabian Gulf catfish (*Arius bilineatus*, Valenciennes). J. Wildrness Med. 2, 153–163.
- AL-HASSAN, J.M., THOMSON, M., BRENT, S., CRIDDLE, R.S., 1987. Protein composition of the threat induced epidermal secretion from the arabian gulf catfish, *Arius thalassinus* (ruppell). Comp. Biochem. Physiol. 88B, 813–822. doi:10.1016/0305-0491(87)90146-5
- ALONSO, L., FUCHS, E., 2003. Stem cells of the skin epithelium. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 100 Suppl , 11830–11835. doi:10.1073/pnas.1734203100
- ANDRES, K.H., VON DÜRING, M., PETRASCH, E., 1988. The fine structure of ampullary and tuberous electroreceptors in the South American blind catfish *Pseudocetopsis spec*. Anat. Embryol. (Berl). 177, 523–535. doi:10.1007/BF00305139
- ARRATIA, G., 2003. The skin of catfishes-a review, In: Arratia, G., Kapoor, B. G., Chardo, M. & Diogo, R., E. (Ed.), Catfishes. Science Publishers Inc, Enfield, NH and Plymouth, pp. 177–199.

- ARRATIA, G., HUAQUÍN, L., 1995. Morphology of the lateral line system Diplomystid and Loricarioid catfishes and systematic and ecological considerations. *Bonn. zool. Monograf.* 36, 1-110.
- ATEMA, J., 1971. Structures and functions of the sense of taste in the catfish (*Ictalurus natalis*). *Brain, Behav. Evol.* 4, 273–294.
- BIRINDELLI, J.L.O., 2010. Relações filogenéticas da superfamília Doradoidea (Ostariophysi, Siluriformes). Tese de Doutorado, Universidade de São Paulo, São Paulo, 376p.
- BLACKSTOCK, N., PICKERING, A D., 1980. Acidophilic granular cells in the epidermis of the brown trout, *Salmo trutta* L. *Cell Tissue Res.* 210, 359–369. doi:10.1007/BF00220194
- BONE, Q., MOORE, R.H., 2008. *Biology of fishes*, Third Edit. ed. Taylor & Francis Group Inc, New York. 478p.
- BONILLA LIZARAZO, R.J., QUINTERO VIRGUEZ, M., GÓMEZ RAMÍREZ, E., RODRÍGUEZ CAICEDO, D., HURTADO GIRALDO, H., 2008. Histología y morfometría de piel del pez *Eremophilus mutisii* (Trychomecteridae, Siluriformes). *Rev. Biol. Trop.* 56, 885–893.
- BRITSKI, H. A. 1981. Peixes de água doce. *In: CARVALHO, J. C. M. (Coord). Atlas da fauna brasileira.* São Paulo: Melhoramentos, p. 81-93
- BRITTO, M.R., 2002. Análise filogenética da ordem Siluriformes com ênfase nas relações da superfamília Loricarioidea (Teleostei: Ostariophysi). Tese de doutorado, Universidade de São Paulo, São Paulo, 527p.
- BULLOCK, T., BODZNICK, D., NORTH CUTT, R., 1983. The phylogenetic distribution of electroreception: evidence for convergent evolution of a primitive vertebrate sense modality. *Brain Res. Rev.* 6, 25–46.
- BURKA, J.F., POWELL, M.D., HUNTSMAN, L.C., SPEARE, D.J., WRIGHT, G.M., 1992. Eosinophilic granule cells in salmonids: A potential target for anti-inflammatory therapy? *In: New Frontiers in Pharmacology, 8th Biennial Symposium of the American Academy of Veterinary Pharmacology and Therapeutics.*
- BURTON, D., 2011. The skin | Coloration and chromatophores in fishes, *encyclopedia of fish physiology.* Elsevier Inc. doi:10.1016/B978-0-12-374553-8.00041-1

- BURTON, D., BURTON, M.P.M., 1989. Individual variability in the epidermis of prespawning inshore winter flounder, *Pseudopleuronectes americanus*. J. Fish Biol. 35, 845–853. doi:10.1111/j.1095-8649.1989.tb03036.x
- CALEGARI, B.B., 2015. Sistemática filogenética dos bagres Auchenipteridae (Ostariophysi: Siluriformes): uma abordagem combinando dados morfológicos e moleculares. Tese de Doutorado, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 362p.
- CHANG, W.J., HWANG, P.P., 2011. Development of zebrafish epidermis. Birth Defects Res. Part C - Embryo Today Rev. 93, 205–214. doi:10.1002/bdrc.20215
- CHIVERS, D.P., WISENDEN, B.D., HINDMAN, C.J., MICHALAK, T. A, KUSCH, R.C., KAMINSKYJ, S.G.W., JACK, K.L., FERRARI, M.C.O., POLLOCK, R.J., HALBGEWACHS, C.F., POLLOCK, M.S., ALEMADI, S., JAMES, C.T., SAVALOJA, R.K., GOATER, C.P., CORWIN, A., MIRZA, R.S., KIESECKER, J.M., BROWN, G.E., ADRIAN, J.C., KRONE, P.H., BLAUSTEIN, A.R., MATHIS, A., 2007. Epidermal “alarm substance” cells of fishes maintained by non-alarm functions: possible defence against pathogens, parasites and UVB radiation. Proc. Biol. Sci. 274, 2611–2619. doi:10.1098/rspb.2007.0709
- DAMASCENO, E.M., MONTEIRO, J.C., DUBOC, L.F., DOLDER, H., MANCINI, K., 2012. Morphology of the epidermis of the neotropical catfish *Pimelodella lateristriga* (Lichtenstein, 1823) with emphasis in club cells. PLoS One 7, e50255. doi:10.1371/journal.pone.0050255
- DE PINNA, M. C. C. 1998. Phylogenetic relationships of neotropical Siluriformes (Teleostei: Ostariophysi): historical overview and synthesis of hypotheses. P. 279-330. In: Malabarba, L., Reis, R., Vari, R. P., Lucena, C. & L. Lucena. Phylogeny and classification of neotropical fishes. Edipucrs, Porto Alegre, Brasil.
- DUBOC, L.F., 2007. Análise comparativa e aspectos ecológicos da reação de alarme em duas espécies de *Mimagoniates* (Ostariophysi, Characidae, Glandulocaudinae). Rev. Bras. Zool. 24, 1163–1185. doi:10.1590/S0101-81752007000400038
- ELLIOTT, D.G., 2000. Integumentary system. Microscopic functional anatomy, *In*: Ostrand, G. (Ed.), The Laboratory Fish. Academic Press, pp. 271–306. doi:10.1016/S0074-2740(75)80016-X

- ELLIOTT, D.G., 2011a. The skin | The many functions of fish integument, Encyclopedia of Fish Physiology. Elsevier Inc. 1, 476-488. doi:10.1016/B978-0-12-374553-8.00285-9
- ELLIOTT, D.G., 2011b. The skin | Functional morphology of the integumentary system in fishes, Encyclopedia of Fish Physiology. Elsevier Inc. 1, 476-488. doi:10.1016/B978-0-12-374553-8.00108-8
- ERAM, M., MICHEL, W.C., 2005. Morphological and biochemical heterogeneity in facial and vagal nerve innervated taste buds of the channel catfish, *Ictalurus punctatus*. J. Comp. Neurol. 486, 132–144. doi:10.1002/cne.20543
- FASULO, S., MAUCERI, A, TAGLIAFIERRO, G., RICCA, M.B., LO CASCIO, P., AINIS, L., 1998. Immunoreactivity to calcium-binding proteins (CaBPs) in the epithelia of skin and gill of the catfish, *Heteropneustes fossilis*. Ital. J. Zool. 65, 149–153. doi:10.1080/11250009809386738
- FERRARIS Jr., C.J., 2007. Checklist of catfishes, recent and fossil (Osteichthyes: Siluriformes), and catalogue of siluriform primary types. Zootaxa 1418, 1–628.
- FISHELSON, L., 1984. A comparative study of ridge-mazes on surface epithelial cell-membranes of fish scales (Pisces, Teleostei). Zoomorphology 104, 231–238. doi:10.1007/BF00312036
- FLIK, G., VAN RIJS, J.H., WENDELAAR BONGA, S.E., 1984. Evidence for the presence of calmodulin in fish mucus. Eur. J. Biochem. 138, 651–654.
- GARG, T.K., MITTAL, A.K., 1990. The epidermal and inner epithelial lining of the operculum in *Clarias batrachus* (Clariidae, Siluriformes). Japanese J. Ichthyol. 37, 149–157.
- GARG, T.K., VALDEZ DOMINGOS, F.X., ALMEIDA-VAL, V.M.F., VAL, A.L., 2010. Histochemistry and functional organization of the dorsal skin of *Ancistrus dolichopterus* (Siluriformes: Loricariidae). Neotrop. Ichthyol. 8, 877–884. doi:10.1590/S1679-62252010000400018
- GAUTHIER, A.R.G., WHITEHEAD, D.L., BENNETT, M.B., TIBBETTS, I.R., 2015. Morphology of the teleost ampullary organs in marine salmontail catfish *Neoarius graeffei* (Pisces: Ariidae) with comparative analysis to freshwater and estuarine conspecifics. J. Morphol. 276, 1047–1054. doi:10.1002/jmor.20396
- GUERRA, R.R., SANTOS, N.P., CECARELLI, P., MANGETTI, A. J., SILVA, J.R.M.C., HERNANDEZ-BLAZQUEZ, F.J., 2006. Stratum adiposum, a special structure of the african

- catfish skin (*Clarias gariepinus*, Burchell 1822). J. Vet. Med. Ser. C Anat. Histol. Embryol. 35, 144–146. doi:10.1111/j.1439-0264.2005.00614.x
- HARRIS, J.E., HUNT, S., 1975. The fine structure of the epidermis of two species of salmonid fish, the Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) and the brown trout (*Salmo trutta* L.). I. General organization and filament-containing cells. Cell Tissue Res. 157, 553–565. doi:10.1007/bf00222607
- HENDERSON, V., 1995. Relationship of the tubular system with other organelles in chloride cells of the channel catfish, *Ictalurus punctatus*. J. Morphol. 224, 31–45.
- HENRIKSON, R.C., MATOLTSY, A.G., 1968a. The fine structure of teleost epidermis. I. Introduction and filament-containing cells. J. Ultrastruct. Res. 21, 194–212.
- HENRIKSON, R.C., MATOLTSY, A.G., 1968b. The fine structure of teleost epidermis. II. Mucous cells. J. Ultrastruct. Res. 221, 213–221.
- HENRIKSON, R.C., MATOLTSY, A.G., 1968c. The fine structure of teleost epidermis. III. Club cells and other cell types. J. Ultrastruct. Res. 232, 222–232.
- HERRICK, C.J., 1901. Comparative the cranial nerves and cutaneous sense. J. Comp. Neurol. XI, 177–249.
- HOLLAND, J.W., ROWLEY, A.F., 1998. Studies on the eosinophilic granule cells in the gills of the rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Pharmacology, Toxicology and Endocrinology 120, 321–328.
- IGER, Y., ABRAHAM, M., WENDELAAR BONGA, S.E., 1994. Response of club cells in the skin of the carp *Cyprinus carpio* to exogenous stressors. Cell Tissue Res. 277, 485–491. doi:10.1007/s004410050176
- JOHNSON, S.P., CARLSON, S.M., QUINN, T.P., 2006. Tooth size and skin thickness in mature sockeye salmon: Evidence for habitat constraints and variable investment between the sexes. Ecol. Freshw. Fish 15, 331–338. doi:10.1111/j.1600-0633.2006.00175.x
- JORGENSEN, J.M., 1992. The electrosensory cells of the ampullary organ of the transparent catfish (*Kryptopterus bicirrhus*). Acta Zool. 73, 79–83. doi:10.1111/j.1463-6395.1992.tb00951.x
- JORGENSEN, J.M., 2011. Morphology of electroreceptive sensory organs, Encyclopedia of Physiology Peixe. doi:http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-374553-8.00131-3

- KAATZ, I.M., 2002. Multiple soundproducing mechanisms in teleost fishes and hypotheses regarding their behavioural significance, *bioacoustics: The International Journal of Animal Sound and its Recording*, 12:2-3, 230-233, DOI: 10.1080/09524622.20029753705
- KAATZ, I.M., STEWART, D.J., 2012. Bioacoustic variation of swimbladder disturbance sounds in Neotropical doradoid catfishes (Siluriformes : Doradidae, Auchenipteridae): Potential morphological correlates Neotropical doradoid catfishes (Siluriformes : Doradidae, Auchenipteridae): Potential morphological correlates. *Current Zoology*, 58, 171–188. doi:10.1093/czoolo/58.1.171
- KALETA, K., 2009. Morphological analysis of chromatophores in the skin of trout. *Bull. Vet. Inst. Pulawy* 53, 117–121.
- KALMIJN, A.J., 1974. The detection of electric fields from inanimate and animate sources other than electric organs, *in: Handbook of Sensory Physiology: Electroreceptors and Other Specialized Receptors in Lower Vertebrates*. Springer-Verlag, Berlin, pp. 147–200.
- KUMARI, U., YASHPAL, M., MITTAL, S., MITTAL, A.K., 2009. Histochemical analysis of glycoproteins in the secretory cells in the gill epithelium of a catfish, *Rita rita* (Siluriformes, Bagridae). *Tissue Cell* 41, 271–280. doi:10.1016/j.tice.2008.12.006
- LE GUELLEC, D., MORVAN-DUBOIS, G., SIRE, J.Y., 2004. Skin development in bony fish with particular emphasis on collagen deposition in the dermis of the zebrafish (*Danio rerio*). *Int. J. Dev. Biol.* 48, 217–231. doi:10.1387/ijdb.15272388
- LEV, R., SPICER, S.S., 1964. Specific staining of sulfate groups with alcian blue at low ph. *J. Histochem. Cytochem.* 12, 309.
- MASSON, P.J., 1929. Trichrome stainings and their preliminary techniques. *J. Tech. Met.* 12, 7.
- MATTHEIJ, J.A., SPRANGERS, J.A., 1969. The site of prolactin secretion in the adenohipophysis of the stenohaline teleost *Anoptichthys jordani* and the effects of this hormone on mucous cells. *Z. Zellforsch* 99, 411–419.
- MATTHEIJ, J.A.M., STROBAND, H.W.J., 1971. The effects of osmotic experiments and prolactin on the mucous cells in the skin and the ionocytes in the gills of the teleost *Cichlasoma biocellatum*. *Z. Zellforsch.* 121, 93–101. doi:10.1007/BF00330920
- MCMANUS, J. F. A., 1946. Histological demonstration of mucin after periodic acid. *Nature* 158, 202.

- MEDIA CYBERNETICS, Inc., 2001. Image-Pro Plus (Image Analysis Software), version 4.5. Programa e Documentação.
- MITTAL, A. K. 1968. Studies on the structure of the skin of *Rita rita* (Ham.) (Bagridae, Pisces) in relation to its age and regional variations. *Ind. J. Zool*, 9, 61-78.
- MITTAL, A. K. GARG, T.K. VERMA, M., 1995. Surface architecture of the skin of the indian catfish, *Bagarius bagarius* (HAMILTON) (SISORIDAE; SILURIFORMES). *Japanese J. Ichthyol.* 42, 187–191.
- MITTAL, A., MUNSHI, D.J.S., 1970. Structure of the Integument of a Fresh-water Teleost, *Bagarius bagarius* (Ham.) (Sisoridae, Pisces). *J. Morphol.* 130, 3–10.
- MITTAL, A.K., RAI, A.K., BANERJEE, T.K., AGARWAL, S.K., 1976. Lipids in the skin of a catfish *Heteropneustes fossilis* (Bloch) (Heteropneustidae, Pisces). A histochemical investigation. *Histochemistry* 48, 177–185. doi:10.1007/BF00497453
- MITTAL, A.K., WHITEAR, M., 1979. Keratinization of fish skin with special reference to the catfish *Bagarius bagarius*. *Cell Tissue Res.* 202, 213–230.
- NAKARI, T., SOIVIO, A., PESONEN, S., 1986. Effects of advanced photoperiod cycle on the epidermis and gonadosomatic index of 2-year-old rainbow trout, *Salmo gairdneri* R., reared at natural temperature. *J. Fish Biol.* 29, 451–457. doi:10.1111/j.1095-8649.1986.tb04960.x
- NELSON, J.S., 2006. *Fishes of the world*. 4 ed. John Wiley, New Jersey. 622p. doi:10.1007/BF00005935
- NORTHCUTT, R.G., 2005. Taste bud development in the channel catfish. *J. Comp. Neurol.* 482, 1–16. doi:10.1002/cne.20425
- NORTHCUTT, R.G., HOLMES, P.H., ALBERT, J.S. 2000. Distribution and innervation of lateral line organs in the channel catfish. *J. Comp. Neurol.* 421, 570–592.
- PÄKK, P., 2012. Alterations of epidermal cells functional activity in fish due to infection. Estonian University of Life Sciences. Tese de Doutorado, Estonian University of Life Sciences, Tartu. 108p.
- PANKHURST, N., 1982. Relation of visual changes to the onset of sexual maturation in the European eel *Anguilla anguilla* (L.). *J. Fish Biol.* 127–140. doi:10.1111/j.1095-8649.1982.tb03994.x

- PARK, J.Y., KIM, I.-S., KIM, S.-Y., 2003. Structure and histochemistry of the skin of a torrent catfish, *Liobagrus mediadiposalis*. Environ. Biol. Fishes 66, 3–8. doi:10.1023/A:1023298520696
- PARK, J.Y., OH, M.K., KANG, E.J., KIM, C.H., BEON, M.S., 2010. On the vascularization and structure of the skin of a korean bullhead *Pseudobagrus brevicorpus* (Bagridae, Teleostei) based on its entire body and appendages. J. Appl. Ichthyol. 26, 64–70. doi:10.1111/j.1439-0426.2009.01354.x
- PFEIFFER, W., 1977. The distribution of fright reaction and alarm substance cells in fishes. Copeia 4, 653–665.
- PICKERING, A. D., RICHARDS, R., 1980. Factors influencing the structure, function and biota of the salmonid epidermis. Proc. R. Soc. Edinburgh 79, 93–104. doi:10.1017/S0269727000010344
- PICKERING, A., 1974. The distribution of mucous cells in the epidermis of the brown trout *Salmo trutta* (L.) and the char *Salvelinus alpinus* (L.). J. Fish Biol. 6, 111–118.
- PICKERING, A.D., 1977. Seasonal changes in the epidermis of the brown trout *Salmo trutta* (L.) J. Fish Biol. 10, 561–566.
- POWELL, M.D., BRIAND, H.A., WRIGHT, G.M., BURKA, J.F., 1993b. Rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum) intestinal eosinophilic granule cell (EGC) response to *Aeromonas salmonicida* and *Vibrio anguillarum* extracellular products Fish & Shellfish Immunology 3, 279-289.
- POWELL, M.D., WRIGHT, G.M. AND BURKA, J.F. 1993a. Morphological and distributional changes in the eosinophilic granule cell (EGC) population of the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) intestine following systemic administration of capsaicin and substance P. Journal of Experimental Zoology 266, 19-30.
- POWELL, M.D., WRIGHT, G.M., BURKA, J.F., 1990. Eosinophilic granule cells in the gills of rainbow trout: evidence of migration. Journal of Fish Biology.
- QUINIOU, S.M. A, BIGLER, S., CLEM, L.W., BLY, J.E., 1998. Effects of water temperature on mucous cell distribution in channel catfish epidermis: a factor in winter saprolegniasis. Fish Shellfish Immunol. 8, 1–11. doi:10.1006/fsim.1997.0115

- RAJI, A. R., NOROZI, E., 2010. Distribution of external taste buds in walking catfish (*Clarias batrachus*) and piranha (*Serrasalmus nattereri*). J. Appl. Anim. Res. 37, 49–52. doi:10.1080/09712119.2010.9707092
- RAKERS, S., GEBERT, M., UPPALAPATI, S., MEYER, W., MADERSON, P., SELL, A.F., KRUSE, C., PAUS, R., 2010. “Fish matters”: The relevance of fish skin biology to investigative dermatology. Exp. Dermatol. 19, 313–324. doi:10.1111/j.1600-0625.2009.01059.x
- RALPHS, J., BENJAMIN, M., 1992. Chondroitin and keratan sulphate in the epidermal club cells of teleosts. J. Fish Biol. 40, 473–475.
- REUTTER, K., BOUDRIOT, F., WITT, M., 2000. Heterogeneity of fish taste bud ultrastructure as demonstrated in the holosteans *Amia calva* and *Lepisosteus oculatus*. Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci. 355, 1225–1228. doi:10.1098/rstb.2000.0672
- ROMBOUGH, P.J., 2011. Ventilation and animal respiration | respiratory gas exchange during development: respiratory transitions, Encyclopedia of Fish Physiology. Elsevier Inc. doi:10.1016/B978-0-12-374553-8.00272-0
- SAGLIO, P., ESCAFFRE, A.M., BLANC, J.M., 1988. Structural characteristics of the epidermal mucosa in yellow and silver European eel, *Anguilla anguilla* (L.). J. Fish Biol. 32, 505–514. doi:10.1111/j.1095-8649.1988.tb05390.x
- SANTOS, M.L., ARANTES, F.P., PESSALI, T.C., SANTOS, J.E., 2015. Morphological, histological and histochemical analysis of the digestive tract of *Trachelyopterus striatulus* (Siluriformes : Auchenipteridae ) 32, 296–305.
- SARMENTO-SOARES, L.M., MARTINS-PINHEIRO, R.F., 2007. Os Auchenipteridae do Leste do Brasil. Bol. da Soc. Bras. Ictiol. 87, 7–8.
- SHEPHARD, K.L., 1994. Functions for fish mucus. Rev. Fish Biol. Fish. 4, 401–429. doi:10.1007/BF00042888
- SINGH, S.K., MITTAL, A.K., 1990. A comparative study of the epidermis of the common carp and the three Indian major carp. J.-Fish-Biol. 36, no. 1, 9–19.
- SMITH, R.J.F., 1977. Chemical communication as adaptation: alarm substance in fish, in: D. Müller-Schwarze et al. (eds.) (Ed.), Chemical Signals in Vertebrates. New York, pp. 303–320.

- SOLANKI, T.G., BENJAMIN, M., 1982. Changes in the mucous cells of the gills, buccal cavity and epidermis of the nine-spined stickleback, *Pungitius pungitius* L., induced by transferring the fish to seawater. *J. Fish Biol.* 21, 563–575. doi:10.1111/j.1095-8649.1982.tb02860.x
- STABELL, O.B., VEGUSDAL, A., 2010. Socializing makes thick-skinned individuals: On the density of epidermal alarm substance cells in cyprinid fish, the crucian carp (*Carassius carassius*). *J. Comp. Physiol. A Neuroethol. Sensory, Neural, Behav. Physiol.* 196, 639–647. doi:10.1007/s00359-010-0550-4
- STATSOFT, Inc., 2005. STATISTICA (data analysis software system), version 7.1. www.statsoft.com. Programa e Documentação.
- TEUGELS, G.G., 1996. Taxonomy, phylogeny and biogeography of catfishes (Ostariophysi, Siluroidei): an overview. *Aquat. Living Resour.* 9, 9–34. doi:10.1051/alr:1996039
- WEBB, J., 2011. Hearing and lateral line | lateral line structure, *Encyclopedia of Fish Physiology*. Elsevier Inc. doi:10.1016/B978-0-12-374553-8.00010-1
- WEIBEL, E. R., 1979. *Stereological methods. I. Practical methods for biological morphometry*. Academic Press, London.
- WHITEAR, M. 1986. The skin of fishes including cyclostomes: Epidermis. In: BEREITER-HAHN, J.; MATOLTSY, A.G. & RICHARDS, K.S. (ed.) *Biology of the Integument*. Vol. 2, Vertebrates, Springer Verlag, New York. pp. 9–64.
- WHITEAR, M., 1970. The skin surface of bony fish. *J. Zool., Lond.* 160, 437–454.
- WHITEHEAD, D.L., KWIK, J.T.B., TIBBETTS, I.R., 2009. Distribution and morphology of the ampullary organs of the estuarine long-tailed catfish, *Euristhmus lepturus* (Plotosidae, Siluriformes). *Zoomorphology* 128, 111–117. doi:10.1007/s00435-008-0078-0
- WHITEHEAD, D.L., TIBBETTS, I.R., DADDOW, L.Y., 2000. Ampullary organ morphology of freshwater salmontail catfish, *Arius graeffei*. *J. Morphol.* 246, 142–149. doi:10.1002/1097-4687(200011)246:2<142::AID-JMOR8>3.0.CO;2-D
- WHITEHEAD, D.L., TIBBETTS, I.R., DADDOW, L.Y.M., 1999. Distribution and morphology of the ampullary organs of the salmontail catfish, *Arius graeffei*. *J. Morphol.* 239, 97–105. doi:10.1002/(SICI)1097-4687(199901)239:1<97::AID-JMOR7>3.0.CO;2-#
- WHITEHEAD, D.L., TIBBETTS, I.R., DADDOW, L.Y.M., 2003. Microampullary organs of a freshwater eel-tailed catfish, *Plotosus (tandanus) tandanus*. *J. Morphol.* 255, 253–260. doi:10.1002/jmor.10063

- WILEY, M. L. COLLETTE, B.B., 1970. Breeding tubercles and contact organs in fishes: their occurrence, structure, and significance. *Bull. Am. Museum Nat. Hist.* 143, 142–216. doi:10.1021/nl201650u
- ZACCONE, G., KAPOOR, B.G., FASULO, S., AINIS, L., 2001. Structural, histochemical and functional aspects of the epidermis of fishes, *Advances in Marine Biology*. doi:10.1016/S0065-2881(01)40004-6
- ZACCONE, G., LO CASCIO, P., 1981. Studies on the structure and histochemistry of the epidermis in the marine catfish *Plotosus lineatus* (Thunberg, 1791 (Plotosidae, Pisces). *Acta Histochem.* 69, 106–118. doi:http://dx.doi.org/10.1016/S0065-1281(81)80014-1
- ZHANG, G., DENG, S., ZHANG, H., LI, H., LI, L., 2006. Distribution of different taste buds and expression of  $\alpha$ -gustducin in the barbells of yellow catfish (*Pelteobagrus fulvidraco*). *Fish Physiol. Biochem.* 32, 55–62. doi:10.1007/s10695-006-6937-z