

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
DEPARTAMENTO DE APOIO A PESQUISA
PROGRAMA INSTITUCIONAL DE APOIO A PESQUISA

**Investigação das subpopulações de células mucosas encontradas em
Arapaima gigas submetidos em ambiente de água branca e água preta e
sua influência na homeostase do animal.**

Bolsista: Janilson Moraes Serudo, FAPEAM

MANAUS

2012

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
DEPARTAMENTO DE APOIO A PESQUISA
PROGRAMA INSTITUCIONAL DE APOIO A PESQUISA

RELÁTÓRIO FINAL

PIB-B/0002/2011

Bolsista: **Janilson Moraes Serudo**, FAPEAM

Orientador: Prof. Dr. Cleverson Agner Ramos

MANAUS

2012

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	4
2. JUTIFICATIVA.....	6
3. OBJETIVOS.....	7
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	8
4.1. Aquisição dos animais.....	8
4.2. Protocolo experimental	9
4.3. Processamento para microscopia óptica	10
4.5. Caracterização histoquímica das sub-populações de células mucosas	11
4.6. Análise Estatística	13
5. RESULTADOS.....	13
6. DISCUSÃO.....	19
7. CONCLUSÃO.....	21
8. REFERÊNCIAS.....	21

1. Introdução

Os peixes nativos da bacia Amazônica possuem estratégias de adaptabilidade admiráveis, devido às diferenças físico-químicas encontradas nas águas da região. JUNK (1983) e diversos outros autores dividem-na em três grupos diferentes: rios de água branca, rios de água preta e rios de água clara. Os rios de água branca nascem na região no Andes e carregam uma grande quantidade de material em suspensão oriundo principalmente de formações geológicas antigas ou da própria erosão dos vales encontrado nos Andes Orientais. Os rios de água branca possuem turbidez e condutividade elevada e pH próximo do neutro, devido ao bicarbonato diluído na água (BARTHEMAN & FABRÉ, 2003). Os rios de água preta têm suas nascentes em relevos suaves, como as Guianas ou em sedimentos terciários da bacia amazônica; como consequência os processos erosivos e o transporte de sedimentos para o leito do rio é baixo, dessa forma o resultado são rios com águas pobres em íons e com um caráter ácido (JUNK, 1983). E, os rios de água clara apresentam cor esverdeada e transportam poucos materiais em suspensão.

Em toda bacia hidrográfica dessa região, encontra-se, com facilidade, o pirarucu (*Arapaima gigas*). Essa espécie endêmica pertence à família Arapaimidae e é considerada o maior teleósteo de água doce do mundo podendo atingir peso máximo de 200 kg e 2 a 3 metros comprimento (SAINT-PAUL, 1986); (GRAHAM, 1997) (IMBIRIBA, 2001); (FERRARIS, 2003). A biologia do *A. gigas* bastante peculiar, uma vez que, essa espécie apresenta respiração bimodal, ou seja, possui respiração aquática e aérea obrigatória em fases distintas de sua vida (RAMOS, 2008). Após a eclosão dos ovos, nas primeiras semanas, as brânquias dos alevinos são semelhantes às brânquias dos teleósteos de respiração aquática obrigatória. Portanto, quando alevinos, esses

peixes respiram, exclusivamente, através das brânquias (GRAHAM, 1997). Por outro lado, quando adultos, as brânquias dessa espécie não são mais capazes de capturar O₂ suficiente para atender as necessidades fisiológicas do animal, portanto, a maior absorção de O₂ ocorre através da bexiga natatória modificada, que é muito semelhante ao pulmão dos peixes pulmonados, entretanto este órgão apresenta apenas uma câmara, diferentemente dos pulmões que são, geralmente, órgãos pares (VAL e ALMEIDAVALE, 1995). No entanto, as brânquias não se limitam na captação de O₂. Elas exercem outras funções, tais como, osmorregulação, equilíbrio ácido-base e iônico, proteção contra choques mecânicos, parasitas e poluentes. Portanto, as brânquias são órgãos multifuncionais e são formadas, basicamente, por três tipos de células, estão são: células pavimentosas que são responsáveis por revestir o epitélio e estão relacionadas como as trocas gasosas, células ricas em mitocôndrias que possuem a função de manter a osmorregulação, absorvendo íons Cl⁻ e Ca₂⁺ nos peixes de água doce e excretando Na⁺ e Cl⁻ nos peixes marinhos e é formada também por células mucosas que estão relacionadas como a produção e excreção de mucosubstância (RAMOS, 2008); (MORON, 2009); (TAO, 2000); (CINAR, 2009).

As células mucosas são células grandes, com o citoplasma bem desenvolvido e possuem características químicas diferentes devido aos grânulos que contém macromoléculas que podem ser de origem neutra, sulfata ou ácida. Essas células são responsáveis por revestir o epitélio branquial com uma matriz extracelular contendo uma variedade dessas macromoléculas. Essas macromoléculas são chamadas de glicosaminoglicanos ou GAG's, como são conhecidas na literatura, e possuem grandes complexos de cadeia heteropolissacarídeos com carga negativa. Elas têm a capacidade especial de absorver grande quantidade de água e interagir com as outras moléculas

permitindo a viscosidade do muco (CINAR, 2009); (TAO, 2000). O muco é um material multifuncional (SHEPARD, 1994), pois, possui uma gama de funções que influenciam na homeostasia e na sanidade do animal. Fisiologicamente, o muco secretado nas brânquias lubrifica, contribui na captação de O₂ e íons, previne a proliferação de bactérias e fungos e protege as brânquias contra choques mecânicos de objetos boiando na água, a exposição ao ar e contra substâncias tóxicas diluídas na água. Além disso, o muco pode ser considerado como um mecanismo de adaptação em diferentes condições de ambientes aquáticos (MORON, 2009).

Levando em consideração à variação na concentração de íons nesses rios e que as células mucosas e o muco produzido e secretado por elas podem atuar como um mecanismo de adaptação, é de se supor que os peixes apresentem estratégias distintas de adaptação em tais ambientes e uma destas estratégias pode refletir no tipo de mucosubstância secretada e sua dinâmica de secreção, portanto o objetivo do presente estudo é o de investigar os tipos de células mucosas, com base em suas glicosaminoglicanas (GAGs), presentes nas brânquias de *A. gigas*, um peixe de respiração aérea que apresenta suas brânquias muito mais relacionadas às funções de regulação iônica que respiratória nas etapas mais adiantadas de seu desenvolvimento (RAMOS, 2008), em função da exposição à água branca e preta por um período crônico.

2. Justificativa

A carne do *A. gigas* tem ótima aceitação no mercado, esses peixes são bastante apreciados na culinária nacional e internacional. Além do valor econômico, essa espécie é muito explorada na região amazônica, uma vez que, esses animais são muito resistentes, sendo capazes de suportar alta densidade de estocagem (BRANDÃO, 2006).

Portanto o *A. gigas* são ótimos animais para a criação em técnicas de piscicultura. Entretanto, até o advento das técnicas de criação por fazendas de piscicultura esta espécie chegou a ser ameaçada. Desta forma o conhecimento dos mecanismos de ajustes iônicos desta espécie, dentre estes os fatores relacionados à produção de muco por células mucosas poderá contribuir para o manejo da espécie com extrapolações sobre suas respostas em ambientes de água branca e preta. Do ponto de vista ecológico e biogeográfico, com base na adaptabilidade do animal em diferentes tipos de águas, poderemos inferir se o rio Negro pode ser considerado uma barreira para as populações desse peixe. Do ponto de vista biotecnológico poderá ser verificado posteriormente a características antimicrobianas dos GAGs produzidos pelas células mucosas de *A. gigas*, principalmente em relação àqueles que interferem na produtividade da piscicultura.

3. Objetivo

3.1. Objetivos gerais

Observar e registrar a presença de células mucosas nas brânquias de *A. gigas*, classificando-as quanto ao tipo de GAG e relacioná-lo aos processos de ajustes iônicos dos animais e na sua sanidade, em ambientes de água branca e preta.

3.2. Objetivos específicos

- Expor os animais em água branca e água preta por um período crônico e avaliar as respostas quanto a proliferação de CMs;
- Avaliar as diferenças quantitativas e qualitativas das CMs nos dois tipos de água e entre fases distintas do desenvolvimento de *A. gigas*;

- Avaliar as CMs evidenciadas pelos métodos de alcian blue e PAS, de acordo com diferentes protocolos para a identificação de GAGs;
- Relacionar as alterações no número e nas subpopulações de CMs à dinâmica de regulação iônica de *A. gigas* em água branca e água preta;
- Avaliar os GAGs encontrados, de acordo com a sua natureza, e relacionar seu papel aos processos referentes à sanidade dos animais, quando comparadas diferentes etapas de seu desenvolvimento e em condições distintas;

4. Metodologia

4.1. Aquisição dos modelos experimentais e aclimação

Exemplares de *Arapaima gigas* foram adquiridos de pisciculturas da região de Manaus e transportados para o Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA), Laboratório de Fisiologia Aplicada à Aquicultura (**Figura 1**).



Figura 1. Fazendo de piscicultura do INPA

Tendo em vista as alterações na estrutura branquial de *A. gigas* ao longo de seu desenvolvimento foram divididos dois grupos de animais; animais na faixa dos 400g e animais acima de 1000g. Os animais foram mantidos em viveiros de piscicultura por

pelo menos 15 dias para aclimação e recuperação do transporte. Durante o período os animais foram alimentados “*ad libitum*” com ração comercial e após a aclimação nos viveiros foram transferidos para tanques experimentais onde foram submetidos ao protocolo experimental.

4.2. Protocolo experimental

Os animais foram transferidos para tanques de fibroamianto 1000L, respeitando a densidade de 06 peixes por m³ (**Figura 2**).



Figura 2. Tanques de aclimatização contendo 6 animais.

As amostras foram separados em 3 grupos: o controle onde a água será a mesma dos viveiros, o grupo de exposição em água branca e o grupo de exposição em água preta; cada grupo subdividido em 2, animais na faixa de 400g e animais acima de 100g de forma que o total de grupos está representado na tabela abaixo (**Tabela I**):

TABELA I. GRUPOS EXPERIMENTAIS

Massa Corpórea	Controle	Água Branca	Água Preta
~400g	6 animais	6 animais	6 animais
≥1000g	6 animais	6 animais	6 animais

Tabela I. Animais dividido pelo tamanho e pelo tipo de água.

Os animais foram submetidos à água branca, preta ou controle por um período de 7 dias de forma que 2/3 da água dos tanques é renovada a cada 48h. Para avaliar a qualidade da água serão verificados os parâmetros físico-químico da água como pH, condutividade, alcalinidade, dureza, CO₂, O₂, amônia e nitrito. Ao final do experimento será feita biometria dos animais, sacrifício e retirada dos arcos branquiais.

4.3.Procedimento geral para retirada dos arcos branquiais

Após biometria dos animais, os mesmos sofreram lesão medular para amenizar o sofrimento dos animais e em seguida as brânquias foram dissecadas. Os arcos branquiais (Abs) foram retirados, lavados em solução fisiológica de NaCl 0,9%, e mantidos nesta até o momento da fixação. A fixação foi feita em Glutaraldeído 3%, tamponado em solução de Fosfato de Sódio a 0,2M e pH 7,4. Os Abs foram colocados em frascos de vidro, e mantidos sob refrigeração até o momento do processamento laboratorial das amostras.

4.4.Processamento para Microscopia Óptica

Dos abs fixados, foram retiradas porções da região ceratobranquial de cada arco. A escolha desta região deve-se ao fato de uma padronização para a observação das CMs

e devido ao maior fluxo de água nesta região durante a respiração do animal. As amostras foram desidratadas em série crescente de etanol (70-950%) seguido de inclusão em historesina Leica®. Cortes histológicos sagitais e seriados com aproximadamente 3µm foram obtidos com micrótomo Leica RM 2125RT. Os cortes foram acondicionados em lâminas histológicas onde serão empregadas técnicas de histoquímica para diferenciação das CMs.

4.5. Caracterização histoquímica das sub-populações de células mucosas

Às lâminas histológicas obtidas foram aplicadas técnicas citoquímicas para identificação dos diferentes GAGs presentes nas células mucosas. As principais mucosubstâncias serão identificadas pelo método Ácido Periódico Schiff (PAS) e Alcian Blue (AB). O AB é um método muito eficaz que cora GAGs em azul pelo azul de alcian, identificando radicais carboxilados em um pH de 2,5 e sulfatados em pH de 0,5 e 2,5 (LEV & SPICER, 1964). Desta forma podemos classificar o tipo de GAG de acordo com o pH. Um processo de metilação será realizado imergindo as lâminas em álcool metílico contendo HCl concentrado (0,4ml de ácido para cada ml de Metanol), durante 3 horas e aquecido á 60°C, a seguir sendo submetido ao AB. A técnica de metilação impede tanto a coloração das GAGs sulfatadas quanto das carboxiladas em pH de 2,5. Após a metilação será realizada a técnica de saponificação (SPICER & LILLIE, 1959), onde as lâminas serão lavadas em álcool absoluto, com álcool 80% e em seguida com álcool 80% e hidróxido de potássio 1%, sendo as lâminas submetidas ao AB. Nesta reação apenas as GAGs carboxiladas serão coradas pois outras moléculas que apresentem reação positiva para o corante tornar-se-ão negativas à mesma coloração após a metilação sendo que após a saponificação voltam a ser positivas,

identificando apenas GAGs carboxilados enquanto que os sulfatados permanecem negativos ao corante.

Outra técnica empregada será o método do PAS com reativo de Schiff onde grupamentos de carbonos adjacentes com grupos hidroxila são convertidos em aldeídos através do íon periodato (ácido periódico ou metaperiodato de sódio). Usualmente nas moléculas de carboidratos as estruturas em anéis de monossacarídeos são quebrados e a cadeia de carbonos se mantém intacta de forma que o aldeído formado é firmemente aderido ao tecido, sendo detectado pelo reativo de Schiff que se combina covalentemente com os grupos aldeídos formando um composto violeta avermelhado (KIERMAN, 2010). As unidades de açúcar pelas quais o aldeído formado pela reação com ácido periódico por 10-60 minutos (temperatura ambiente) podem ser glicose, galactose, manose, frutose e ácidos siálicos. Com o aumento da temperatura e do tempo de imersão no ácido periódico resíduos de glicóis, ácido urônico e ácido hialurônico podem ser identificados (**Tabela II**).

TABELA II. CORANTE UTILIZADO E MUCOSUBSTANCIA MARCADA

Corante	Referência	Mucosubstância
PAS	KIERMAN, 2010	Carboidratos e glicogênio
AB pH 1,0	LEV & SPICER, 1964	Ácido sulfatado
AB pH 2,5	LEV & SPICER, 1964	Ácido carboxílico e ácido sulfatado

Tabela II. Mucosubstância marcada pelos respectivos corantes.

A coloração por Alcian Blue evidencia moléculas com radicais carboxilados em pH 2.5 e sulfatados em pH 0,5 ou 2,5. Por outro lado, o PAS+Reativo tem como finalidade marcar os agrupamentos próximos a hidroxilas.

A determinação da densidade de células mucosas será efetuada em microscópio de luz com observação de 20 campos aleatórios e não contínuos; o registro das imagens será realizado com uma câmera de vídeo acoplada a um computador que contém o software de captura de imagens. A contabilização das populações de células mucosas contabilizadas para cada grupo, controle e experimentais, serão transferidas para uma planilha de Excel e análise estatística será empregada.

4.6. Análise estatística

Os resultados serão expressos como média e erro padrão e as análises estatísticas serão realizadas com o auxílio do software Graphpad InStat 3.0, SigmaStat 3.5 ou Systat 12. Será realizado teste Kolmogorov-Smirnov ou Bartlett para verificar a normalidade dos dados e caso seja necessários os resultados poderão ser transformados para seus valores em log. Para a análise estatística será feita análise de variância (ANOVA) com aplicação de pós-testes paramétricos ou não paramétricos, com limite de confiança de 95%.

5. Resultados

A maior dos peixes teleósteos apresenta um total de oito arcos brânquias: quatro a quatro lateralmente na cavidade orofaríngea (RAMOS, 2008). No *A. gigas* acredita-se que a segunda lamela é o local onde ocorrem maiores mudanças morfológicas, devido a incidência de água nessa região. Portanto, esse estudo objetivou somente marcar

células mucosas presentes no arco branquial II. Cada coloração (Alcian Blue pH 1 e 2,5 e PAS+) foi padronizada em 10 minutos.

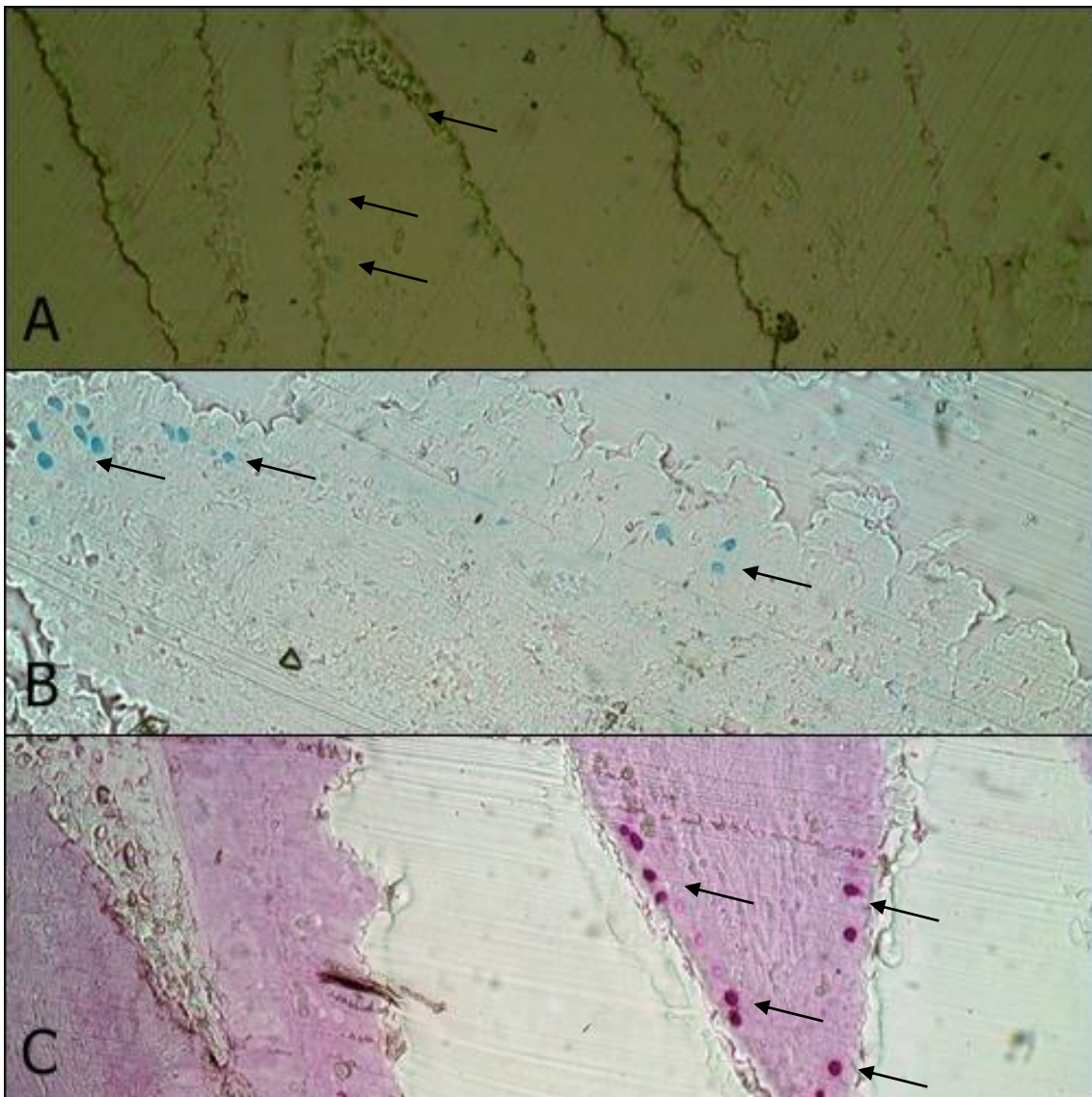


Figura 3. Células mucosas marcadas no tecido brânquias de *Arapaimas gigas* com Alcian Blue pH 1 (A), 2,5 (B) e PAS + (C). As setas evidenciam as células marcadas. Aumento: 400x.

As lamínas coradas foram analisadas em microscópios ópticos, fotografadas (Figura 3), contadas e submetidas em análise estatística. A seguir a tabela referente à marcação das células mucosa encontradas (**Tabela III**).

TABELA III. REAÇÃO HISTOQUÍMICA NO ARCO BRANQUIAL II

REAGENTES	CÉLULAS MUCOSAS	
	ANIMAIS PEQUENOS	ANIMAIS GRANDES
PAS+	++	+
AB 1.0	++	+
AB 2.0	0	0

Tabela III. Intensidade da marcação. 0, negativo. +, fraco. ++, moderado. +++, forte

No experimento, foi utilizado seis animais para cada grupo (grande e pequeno), sendo que este dois grupo foi dividido em 3 subgrupos para serem submetido nos três tipos de água. Os valores médios individuais para AB 2,5 e PAS+ de cada grupo serão mostrados nos gráficos a seguir

Gráfico referente ao animais grandes (G) expostos nos três tipos de água.

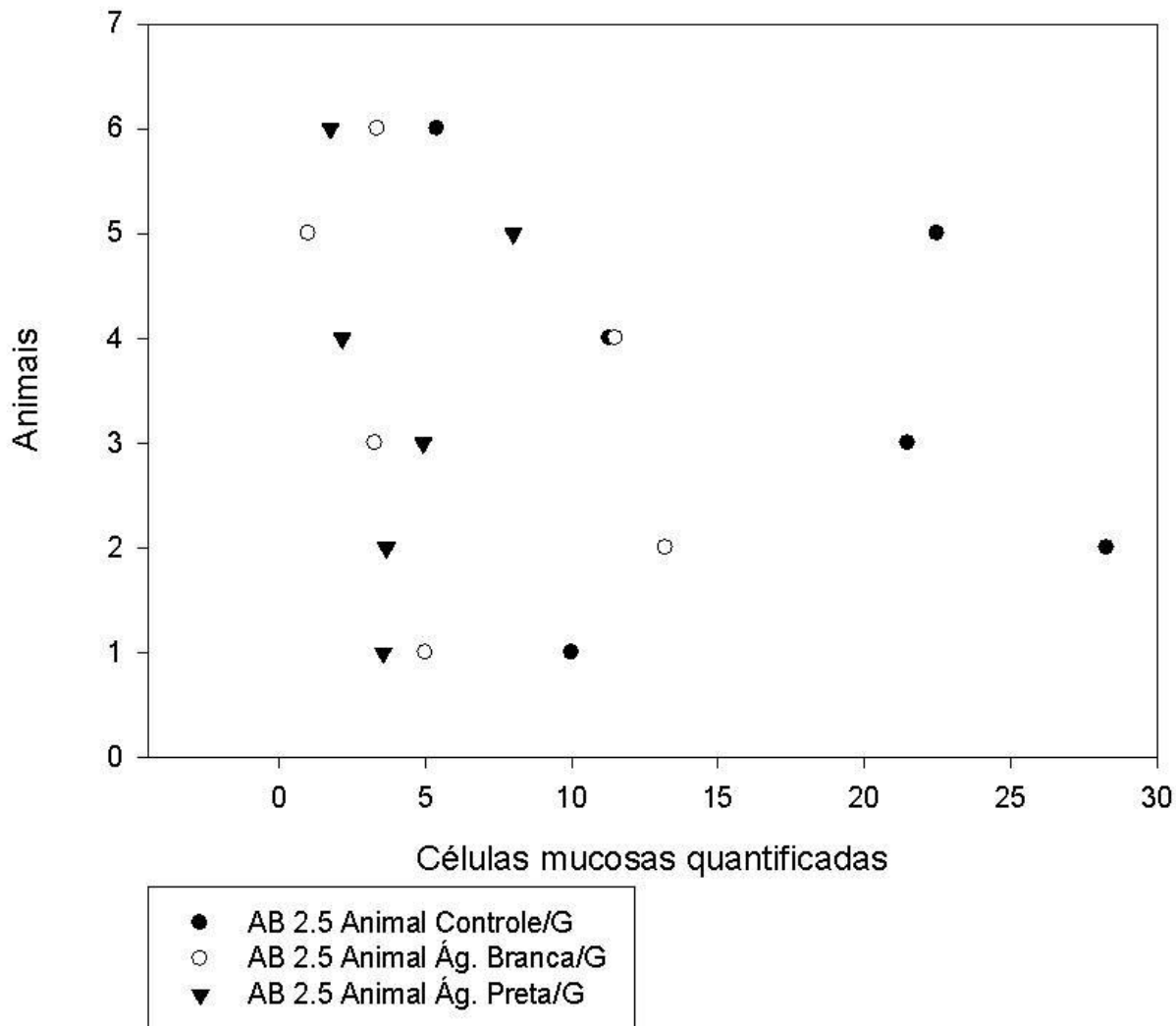


Gráfico 1. Número total de animais utilizado no experimento e a média de células mucosas do tipo AB 2.5 encontradas em animais grandes submetidos nos três tipos de água.

Gráfico referente ao animais grandes (G) expostos em três diferentes tipos de água.

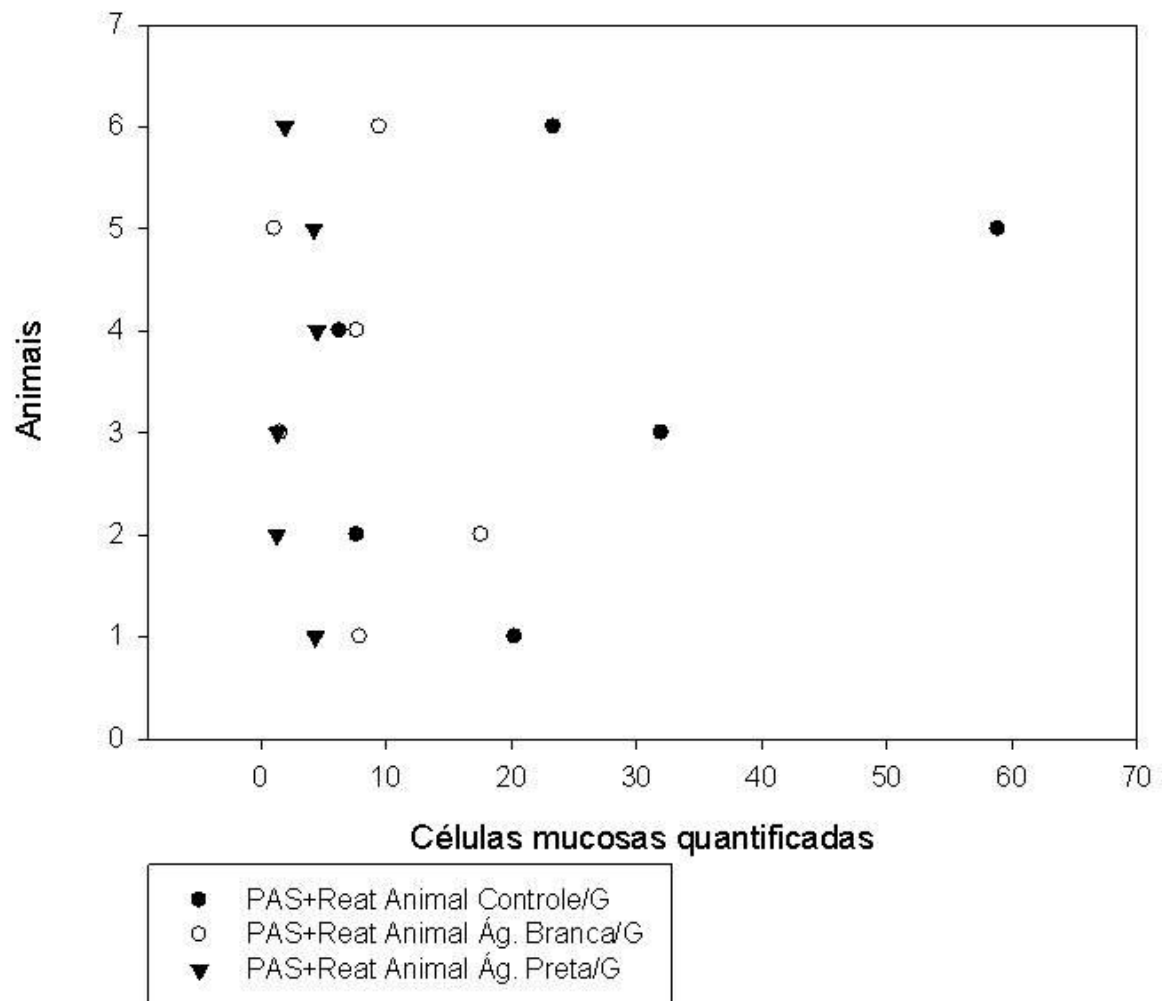


Gráfico 2. Número total de animais utilizado no experimento e a média de células mucosas do tipo PAS+ encontradas em animais grandes submetidos nos três tipos de água.

Gráfico referente aos animais pequenos (P) expostos em três tipos diferentes de águas

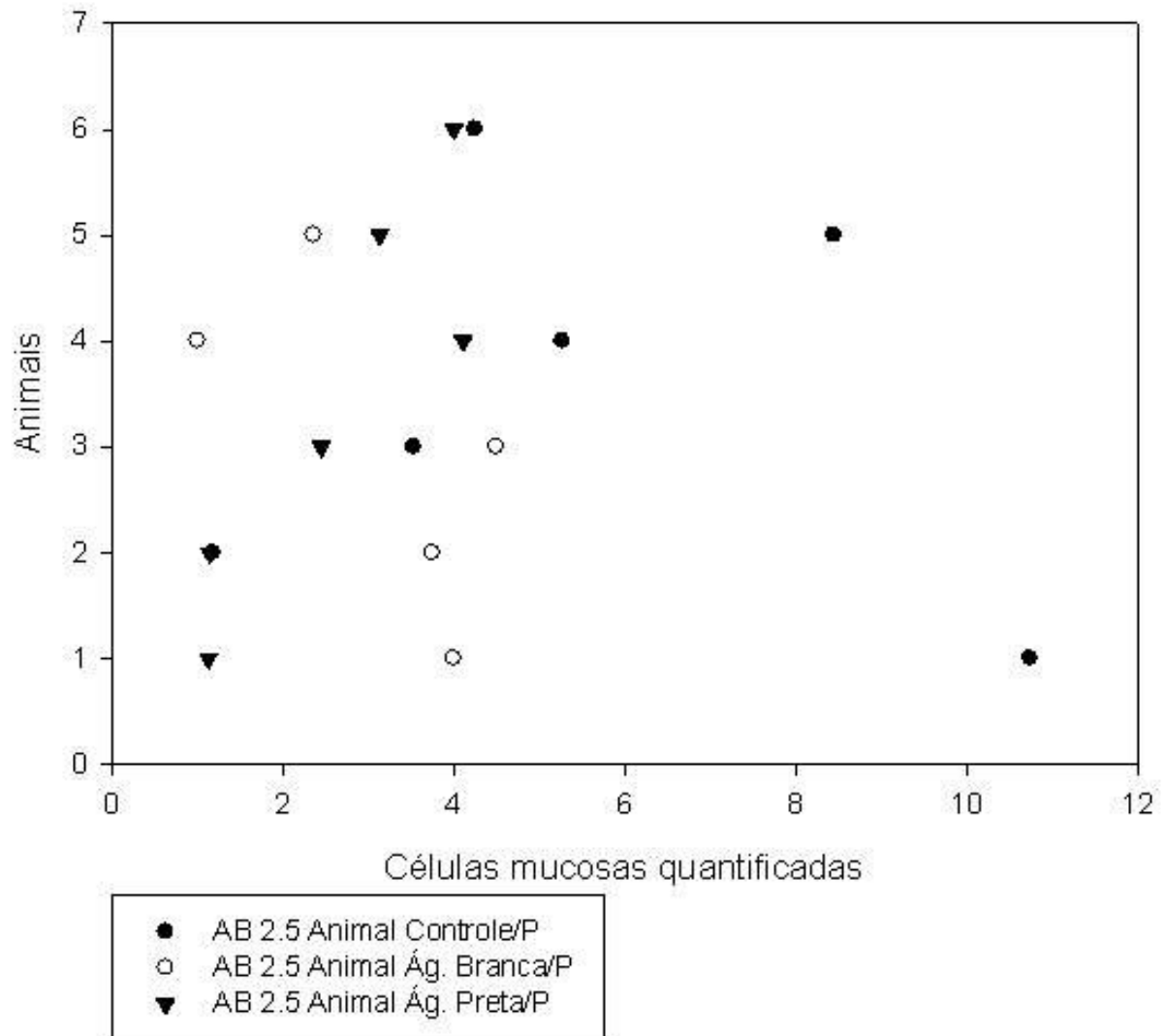


Gráfico 3. Número total de animais utilizado no experimento e a média de células mucosas do tipo AB 2.5 encontradas em animais pequenos submetidos nos três tipos de água.

Gráfico referente aos animais pequenos (P) expostos em três tipos diferentes de água.

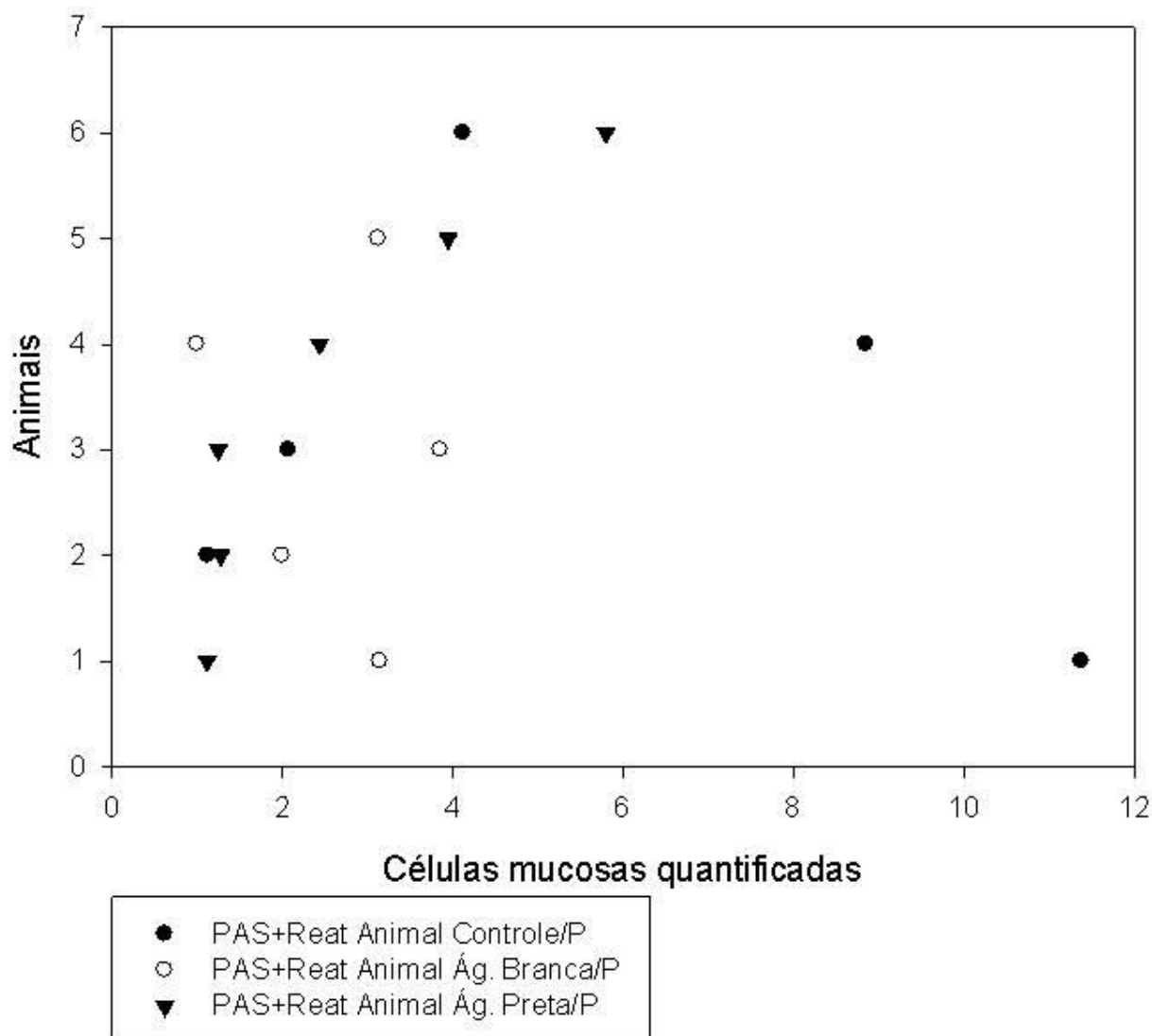


Gráfico 4. Número total de animais utilizado no experimento e a média de células mucosas do tipo PAS+ encontradas em animais pequenos submetidos nos três tipos de água.

6. Discussão

Os glicosaminoglicanos são as principais macromoléculas que constituem a camada mucosa, estas moléculas possuem alto peso molecular e podem ser classificadas como neutra, ácida ou sulfatada. Os GAGs, como são conhecidos na literatura,

interagem com a água e com outras moléculas presente atribuindo a característica viscosa do muco. Além dessas moléculas é possível, no meio mucoso, enzimas proteolíticas, lectinas e imunoglobulinas. Provavelmente, essas moléculas estão relacionadas com a sanidade do animal, conferindo-o proteção (SHEPHARD, 1994).

ROBERTS E POWELL (2003) estudando salmão do Atlântico induziram a proliferação de amebas nas brânquias de *Salmo salar* para avaliar a produção de muco em peixes sadios e peixes doentes quando expostos em água doce. Eles observaram que, durante 3 horas de exposição, havia diferenças no efluxo de Cl^- e excreção de amônia entre peixes sadios e peixes doentes. Peixes afetados apresentaram maior efluxo de íons do que não afetados, a produção excessiva de amônia agravou a patologia nas brânquias. Outros autores, como DIAZ (2008) e SHEPHARD (1994), assumem que as brânquias desempenham outras funções importante. DIAZ e colaboradores notaram que a camada mucosa que cobre as brânquias do *Odontesthes Argentinensis*, teleósteos que vive nas mesmas condições que o *A. gigas*, ou seja, vivem em regiões tropicais e ambientes frescos, possui a função de proteger esse órgão contra parasitas e mudanças nocivas do meio. EBRAN (1999) também avaliou a atividade antiparasita do muco nos experimentos realizados observou que o muco possui proteínas capazes de perfurar a membrana celular de bactérias e, dessa forma, promover a defesa do organismo.

Experimentos com outros peixes como a traíra e jeju, teoleosteos cuja biologia assemelha-se com o pirarucu, apresentaram dados interessantes. MORON (2009) realizou experimentos com dois teleósteos distintos: a traíra (*Hoplias malabaricus*) é uma espécie com respiração exclusivamente aquática, enquanto que o jeju (*Hoplerythrinus unitaeniatus*) é uma espécie com respiração aérea facultativa. Ele e os colaboradores notaram diferenças nas células mucosas dos animais que foram expostos

na água deionizada e depois transferidos para água com alto teor de íons. Houve maior produção de muco na espécie *H. unitaeniata*, devido essa espécie emergir para capturar oxigênio, suas brânquias ficam expostas, ou seja, a produção de muco ajuda a lubrificação do órgão, impedido o ressecamento. Além disso, a proliferação de células mucosas pode reduzir a perda de água quando o peixe emergir e a perda de íons quando esta espécie estiver dentro da água. No presente trabalho, observa-se que os animais grandes e pequenos apresentaram redução nas populações de células mucosas quando expostos em ambas as águas. Os animais grandes apresentaram maior densidade de células mucosas dos que os animais pequenos, apesar disso, quando comparados aos controles, ambos os peixes apresentaram uma queda na densidade de células mucosas. Os animais grandes tiveram redução significativa quando expostos a água preta quanto comparados ao controle, provavelmente, isso ocorreu porque as águas pretas são ricas em íons, portanto, não houve necessidade de produção da camada mucosa para captação de mais íons. No entanto, como visto por Moron (2009) peixes cuja respiração aérea é obrigatória apresentam grande quantidade de muco, os peixes submetidos em água preta obteve densidade de células mucosas igual e até superior com os peixes grandes submetidos em águas brancas, no entanto, o mesmo não pode ser aplicado em peixes pequenos, uma vez que, estes animais possuem respiração aquática obrigatória. Ao contrario das águas pretas, as águas brancas são pobres em íons e ricas em sais (JUNK, 1983), os resultados obtidos nesse trabalho mostram a presença constante e instável de células mucosas nos peixes grandes e pequenos submetidos em água branca. Nesse tipo de águas, essas células, além da captar íons, deve manter o equilíbrio ácido-base do animal, além de evitar possíveis danos nas brânquias como visto por ROBERTS e POWELL (2003).

Quanto à mucosubstância, houve maior diversidade de células mucosas nos peixes pequenos. Estes apresentaram células contendo carboidratos ou glicogênio (PAS) e células contendo substâncias ácidas (Alcian Blue 2,5). Os animais grandes também apresentaram essas mucosubstâncias, no entanto a quantidade foi menor. Não foi observadas mudanças significativas quanto células mucosas contendo, somente, ácido sulfatado em ambos os peixes. Cinar (2009) e Vigliano (2006) estudando brânquias obtiveram valores parecidos com os que foram observados nas brânquias do pirarucu. Além disso, Saraquete (2001) obteve o mesmo resultado com células mucosas presente na brânquia e no intestino de *Acipenser baeri*.

7. Conclusão

Com base nesses estudos, pode-se observar que há mudanças na população de células mucosas nas brânquias do *Arapaima gigas* quando submetidos em diferentes tipos de ambientes. No entanto, mais estudos devem ser realizados para maiores detalhes do funcionalmente biológico desse animal. Além disso, Deve-se analisar o potencial biotecnológico das mucosubstâncias encontradas.

8. Referências

- BARTHEMAN, R. B. ; FABRÉ, N. M. Biologia e diversidade dos recursos pesqueiros da Amazônia. A pesca e os recursos pesqueiros na Amazônia. 11-45. 2003
- BRANDÃO, F. R. ; GOMES, L. C. ; CHAGAS, E. C. Respostas de estresse em pirarucu (*Arapaima gigas*) durante práticas de rotina em piscicultura. Acta Amazonica. VOL. 36. p 349 – 356. 2006

- CINAR, K. ; AKSOY, A. ; EMRE, Y. ; AŞTI, R. N. The histology and histochemical aspects of gills of the flower fish, *Pseudophoxinus antalyae*. *Vet Res Commun*. Vol 33. p 453–460. 2009.
- DÍAZ, A. O. ; CASTRO, M. G. ; GARCÍA, A. M. ; ASTARLOA, J. M. D. ; FIGUEROA, D. E. Gross morphology and surface ultrastructure of the gills of *Odontesthes argentinensis* (Actinopterygii, Atherinopsidae) from a Southwestern Atlantic coastal lagoon. *Tissue Cell* (2008), doi:10.1016/j.tice.2008.10.001
- EBRAN, N. ; JULIEN, S. ; ORANGE, N. ; SAGLIO, P. ; LEIMAITRE, C. ; MOLLE, G. Pore-forming properties and antibacterial activity of proteins extracted from epidermal mucus of fish. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A* 122 (1999) 181–189
- FERRARIS JR., C.J. 2003. Arapaimidae. In: Reis, R.E.; Kullander, S.O.; Ferraris, Jr, C.J. (Eds.). Check list of the freshwater fishes of South and Central America. Edipucrs, Porto Alegre, p. 31.
- GRAHAM, J. B. Air-Breathing Fishes: Evolution, Diversity and Adaptation. 1ªed. Academic Press, 299pp, 1997.
- IMBIRIBA, E.P. 2001. Potencial da criação de pirarucu, *Arapaima gigas*, em cativeiro. *Acta Amazonica*. 31:299-316.
- JUNK, W. J. As águas da região Amazônica; em: SALATI, E. (org). Amazônia desenvolvimento, integração e ecologia. São Paulo, Brasiliense, 1983.

- LEV, R. and SPICER, S. S.. Specific staining of sulphate groups with alcian blue at low pH. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry*, v.12, p. 309, 1964.
- MORON, S. E.; ANDRADE, C. A.; FERNANDES, M. N. Response of Mucous cells of the gills of traira and jeju in response to hipo and hiper-osmotic stress. *Neotropical Ichthyology*, v.7, n.3, p.491-498, 2009.
- RAMOS, C. A. Caracterização morfofuncional das brânquias de *Arapaima gigas*, Durante a transição da respiração aquática para respiração aérea. Dissertação de Mestrado. Departamento de Ciências Fisiológicas, Universidade Federal de São Carlos, 2008.
- ROBERTS, S. D. ; POWELL, M. D. Comparative ionic flux and gill mucous cell histochemistry: effects of salinity and disease status in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Comparative Biochemistry and Physiology Part A* 134 525–537. 2003
- SAINT-PAUL,U. Potencial for aquaculture of south American freshwater fishes a review. *Aquaculture Amsterdam*. P 205-240. 1986
- SARASQUETE, C., GISBERT, E., RIBEIRO, L., VIEIRA, L. AND DINIS, M.T.,. Glycoconjugates in epidermal, branchial, and digestive mucous cells and gastric glands of gilthead seabream, *Sparus aurata*, Senegal sole, *Solea senegalensis*, and Siberian sturgeon, *Acipenser baeri* development. *Eur.J.Histochem.* 45, 267-278. 2001.
- SHEPHARD, K. L. Functions for fish mucus. *Reviews in Fish Biology and Fisheries*. Vol. 4. p 401-429. 1994

SPICER, S. S. & LILLIE, R. D. Saponification as a means of selectively reversing the methylation blockade of tissue basophilia. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry*, v.7, n.2, p.123-125, 1959.

TAO, S.; LONG, A.; LIU, C.; Dawson, r. the influence of mucus on copper speciation in the gill microenvironment of carp (*cyprinus carpio*). *ecotoxicology and environmental safety* 47, 59-64 (2009).

VAL, A. L. e ALMEIDA-VAL, V. M. F. *Zoophysiology: Vol32-Fishes of the Amazon and Their Environment - Physiological and Biochemical Aspects*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 2226pp,/ 1995.

VIGLIANO, F.A., ALEMAN, N., QUIROGA, M.I. AND NIETO, J.M.,. Ultrastructural characterization of gills in the juveniles of the Argentinian Silverside, *Odontesthes bonariensis* (Valenciennes, 1835) (Teleostei: Atheriniformes). *Anat.Histol.Embryol.* 35, 76-83. 2006.