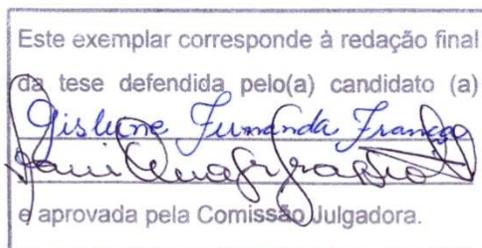




UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
INSTITUTO DE BIOLOGIA

Gisleine Fernanda França

“CARACTERIZAÇÃO DO EPITÉLIO GERMINATIVO
DAS FÊMEAS E MACHOS DE *Gymnotus* sp., E PERFIL
HORMONAL DURANTE O CICLO REPRODUTIVO
(TELEOSTEI, OSTARIOPHYSI, GYMNOTIFORMES)”



Tese apresentada ao Instituto de
Biologia para obtenção do Título de
Doutor em Biologia Celular e Estrutural,
na área de Biologia Celular.

Orientadora: Profa. Dra. Irani Quagio-Grassiotto

Campinas, 2010

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA – UNICAMP

F844c

França, Gisleine Fernanda

Caracterização do epitélio germinativo das fêmeas e machos de *Gymnotus* sp., e perfil hormonal durante o ciclo reprodutivo (Teleostei, Ostariophysi, Gymnotiformes) / Gisleine Fernanda França. – Campinas, SP: [s.n.], 2010.

Orientadora: Irani Quagio-Grassiotto.

Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.

1. Epitélio germinativo masculino. 2. Epitélio germinativo feminino. 3. Gymnotiformes. 4. Foliculogênese. 5. Esteróides sexuais. 6. Ciclo reprodutivo. I. Quagio-Grassiotto, Irani. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

(rcdt/ib)

Título em inglês: Characterization of the female and male germinal epithelium of the *Gymnotus* sp., and the hormonal profile during the reproductive cycle (Teleostei, Ostariophysi, Gymnotiformes).

Palavras-chave em inglês: Male germinal epithelium; Female germinal epithelium; Gymnotiformes; Foliculogenesis; Sexual steroids; Reproductive cycle.

Área de concentração: Biologia Celular.

Titulação: Doutora em Biologia Celular e Estrutural.

Banca examinadora: Irani Quagio-Grassiotto, Renata Guimarães Moreira, Luís Fernando Favaro, Hugo Pereira Godinho, Clarice Bernhardt Fialho.

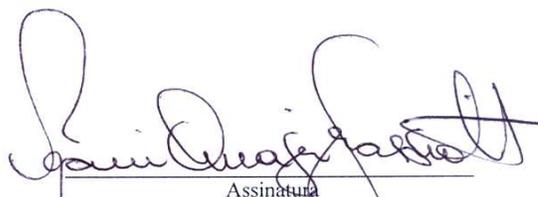
Data da defesa: 12/03/2010.

Programa de Pós-Graduação: Biologia Celular e Estrutural.

Campinas, 12 de março de 2010.

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Irani Quagio Grassiotto (Orientadora)



Assinatura

Prof. Dr. Luís Fernando Favaro



Assinatura

Prof. Dr. Hugo Pereira Godinho



Assinatura

Profa. Dra. Renata Guimarães Moreira



Assinatura

Profa. Dra. Clarice Bernhardt Fialho



Assinatura

Profa. Dra. Maria Ines Borella

Assinatura

Profa. Dra. Elizabeth Romagosa

Assinatura

Prof. Dr. Carlos Alberto Vicentini

Assinatura

Nenhum homem realmente produtivo pensa como se estivesse escrevendo uma dissertação.

Albert Einstein

Meus agradecimentos

- À Prof.^a Dr.^a Irani Quagio-Grassiotto pela orientação dada a mim desde a iniciação científica até os dias de hoje, que é quando estou prestes a conquistar algo de extrema importância em minha vida, o título de doutora. Nestes nove anos de amizade, convívio, ajuda e ensinamentos, aprendi muito, muito sobre células, histologia de gônadas... mas também posso dizer que aprendi outras “coisas”, não da Dr. Irani, mas da amiga e meio “mãe” Irani, que sempre esteve por perto, observando e atentando para tudo que acontecia. Muito obrigada pela confiança em mim depositada, por todo o “cuidado” que teve por mim todos estes anos. Só tenho a dizer Muito Obrigada Mesmo!!

- Ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural pela oportunidade de realização da pós-graduação;

- A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES/PROEX) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela bolsa estudantil fornecida a mim;

- A Prof.^a Dr.^a Renata Guimarães Moreira, ao Prof. Dr. Hugo Pereira Godinho e ao Prof. Dr. Luís Fernando Fávaro, pela disponibilidade e revisão minuciosa na banca prévia, fornecendo assim contribuições valiosas a este trabalho;

- Aos membros da Banca Examinadora pela disponibilidade e por ter aceitado fazer parte da banca de defesa;

- À Líliam Alves Senne Panagio, secretária do Programa Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural, UNICAMP, pela imensa ajuda e amizade;

- Ao Departamento de Morfologia, I.B., UNESP, Botucatu pela acolhida nos últimos nove anos e pelo uso das instalações para o desenvolvimento deste trabalho;

- Ao Centro de Microscopia Eletrônica, I.B., UNESP, Botucatu pela utilização das instalações;

- Aos técnicos do Laboratório de Rotina em Biologia Celular e de Reprodução de Peixes Neotropicais, Depto. de Morfologia, I.B., UNESP, Botucatu, Antônio Vicente Salvador e Ricardo André dos Santos Teixeira, pela colaboração no processamento do material e nas coletas;

- Aos técnicos Sueli Michelim e José Eduardo Bozzano pela grande colaboração fornecida ao projeto “onipresente” no Depto. de Morfologia;

- À Luciana Cristina Montes, secretária do Depto. de Morfologia, I.B., UNESP, Botucatu, pela amizade e colaboração;

- Ao “Seu” Eduardo pela grande contribuição na coleta dos animais, fato este essencial para o desenvolvimento deste trabalho, e pela companhia e conversa madrugada afora em busca das tuviras;
- À Profa. Dra. Rosana Nogueira de Moraes, do Depto. Fisiologia, UFPR, por me auxiliar e me instruir com os primeiros procedimentos para a técnica de ELISA,
- À Profa. Dra. Renata Guimarães Moreira por ter cedido seu laboratório para que eu fizesse as dosagens hormonais, e por toda atenção a mim dispensada;
- Aos meus amigos do Laboratório de Reprodução de Peixes Neotropicais, I.B., UNESP, Botucatu, Daniel, Júlio, Laura, Paula, Renata, Rinaldo, e especialmente para a Talita, sempre tão companheira e prestativa, por todo o convívio e por tornar os meus dias de trabalho mais divertidos e leves;
- À equipe do laboratório Lamerao – USP, pela acolhida no período que permaneci no laboratório, e especialmente à Juliane, que tanto me auxiliou com a técnica de ELISA, à Larissa e Carol, por toda presteza, e à Aline e Cristiéli, que além da amizade, apoio, forneceram à mim condições para permanecer em São Paulo;
- Ao meu namorado Newton pelo todo amor, carinho, atenção, compreensão e ajuda, a mim dedicados. Confesso que toda esta luta tornou-se mais leve por você estar ao meu lado, sempre querendo o melhor para mim. Agradeço também por todo apoio, literalmente, dedicado ao meu trabalho, pela ajuda em coletas, por sempre se interessar pelos “meus” assuntos, Muito obrigada;
- À minha família, por todo apoio e compreensão pelos momentos em que me ausentei, e especialmente à minha irmã e grande amiga Gisela, pelo incentivo constante, por sempre acreditar e confiar em mim, e estar sempre presente;
- As minhas amigas Ana Luísa (Tsé²), Arielle (Pankêka), Gisela (Crotalaria), Glaura (Gersa) e Raquel (Grozéia) pela amizade e companheirismo;
- À todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.;

Muito Obrigada!!!

Sumário

1. Resumo	1
2. Abstract	3
3. Introdução	5
3.1. Os ovários	6
3.2. Os testículos	10
3.3. O modelo experimental	14
4. Objetivos	
4.1. Objetivos gerais	16
4.2. Objetivos específicos	16
5. Materiais e métodos	
5.1. Obtenção de dados biométricos	17
5.2. Coleta de material destinado às análises histológicas	17
5.3. Morfologia gonadal à microscopia ótica e eletrônica de transmissão	18
5.4. Detecção da proliferação celular por imunocitoquímica de PCNA	18
5.5. Investigação da morte celular por apoptose pela imunocitoquímica do TUNEL	19
5.6. Investigação da fagocitose pela detecção da fosfatase ácida	19
5.7. Histoquímica enzimática da 5 Δ 3 β HSD	20
5.8. Imunolocalização da enzima 5 Δ 3 β HSD	21
5.9. Quantificação dos esteróides plasmáticos	21
5.10. Classificação morfológica	22
6. Resultados	
6.1. Fêmeas	24
6.1.1. Foliculogênese	24
6.1.2. Desenvolvimento folicular	25
6.1.3. Caracterização morfológica das fases reprodutivas	26
6.1.4. Proliferação celular	29
6.1.5. Detecção de apoptose	29
6.1.6. Índice gonadossomático	29

6.1.7. Esteróides plasmáticos	30
6.2. Machos	31
6.2.1. Caracterização morfológica das fases reprodutivas	31
6.2.2. Proliferação celular	34
6.2.3. Detecção de apoptose	35
6.2.4. Tecido endócrino testicular	35
6.2.5. Índice gonadossomático	36
6.2.6. Esteróides plasmáticos	36
7. Figuras	38
8. Discussão	
8.1. Gônadas de <i>Gymnotus</i> sp	75
8.2. Folliculogênese e desenvolvimento folicular	76
8.3. Fases Reprodutivas	77
8.3.1. Fase de regressão gonadal	78
8.4. Índice gonadossomático	80
8.5. Fases reprodutivas	81
8.5.1. Fêmeas	81
8.5.2. Machos	84
9. Conclusões	91
10. Referências	93
11. Anexo 1 - A new vision of the origin and the oocyte development in the Ostariophysi applied to <i>Gymnotus</i> sp.	107
12. Anexo 2 – Colorações	138

1. Resumo

Gymnotiformes, os peixes faca, constituem um importante componente da fauna Neotropical de água doce das Américas Central e do Sul. Este grupo compreende mais de 100 espécies válidas, distribuídas em 27 gêneros. *Gymnotus* sp., representante da família Gymnotidae, é conhecido regionalmente como tuvira, morenita, ituí ou sarapó. Apesar do fato que a dinâmica reprodutiva, morfologia do aparelho reprodutor e a histologia das gonâdas de *Gymnotus* sp. terem sido abordadas por alguns autores, informações detalhadas das alterações histológicas e fisiológicas durante o ciclo reprodutivo não estão disponíveis. Considerando a importância deste grupo de peixes na região Neotropical, o ciclo reprodutivo de *Gymnotus* sp. foi reavaliado. Obteve-se, além disto, as concentrações plasmáticas dos esteróides, dados da histologia gonadal, imunocitoquímicos, de atividade enzimática e proliferação celular. As gônadas de *Gymnotus* sp. localizam-se ventralmente na cavidade celomática e são conectadas por longos ductos à papila urogenital e que tem posição anterior no corpo do animal. Ovários são fundidos, e a morfologia interna de ambos, ovário e testículo, não diferem de outros Ostariophysi. O ciclo reprodutivo em fêmeas e machos foi dividido em cinco fases, de acordo com uma nova abordagem do desenvolvimento das células germinativas. Esta classificação, desenvolvida para ser universal, para ovário assim como para o testículo, melhor expressa as alterações histológicas durante o ciclo reprodutivo em *Gymnotus* sp.. A relação entre o índice gonadossomático e características histológicas nas fases reprodutivas foi realizada. As concentrações plasmáticas de estradiol e 11-cetotestosterona foram pouco variáveis em fêmeas, possuindo, ambos, tendência a maiores valores no início do ciclo reprodutivo e em animais com ovários possuindo oócitos aptos a desova. As concentrações de testosterona se elevam conforme o ovário desenvolve-se, sugerindo uma possível relação do hormônio com o desenvolvimento dos folículos. As células da teca responderam positivamente à localização da enzima 3 β hidroxisteróide desidrogenase que está de acordo com as concentrações plasmáticas da testosterona. Inesperado e nunca reportado para os Teleostei, as células foliculares também reagem a detecção da 3 β hidroxisteróide desidrogenase. Em

machos as concentrações plasmáticas de estradiol permanecem, praticamente, constantes durante todo o ciclo reprodutivo. A concentração plasmática de 11-cetotestosterona possui tendência a concentrações elevadas no início do ciclo, com uma queda gradual até a fase de maturação final, quando há nova elevação. O perfil hormonal da testosterona é semelhante aos dados de proliferação de espermatogônias secundárias, sugerindo uma possível relação entre as concentrações hormonais e os eventos proliferativos. Juntos concentração plasmática de esteróides, histologia gonadal, imunocitoquímica, atividade enzimática e detecção de proliferação celular forneceram uma nova compreensão do ciclo reprodutivo em *Gymnotus*.

2. Abstract

Gymnotiformes, the American knifefish, constitute an important component of the Neotropical freshwater fauna in the Central and South America. This group comprises more than 100 valid species, divided in 27 genera. *Gymnotus* sp., a representative of the family Gymnotidae, regionally known as tuvira, morenita, ituí or sarapó, is the best known gymnotid. Despite the fact that reproductive dynamic, morphology of the reproductive systems and the gonadal histology of *Gymnotus* sp. have been studied by some authors, detailed information on histological and physiological changes of the gonads along the reproductive cycle are not available. Considering the importance of this group of fish in the Neotropical region, the reproductive cycle of *Gymnotus* sp. has been reevaluated. Besides plasma steroids concentration along the reproductive cycle, data from gonadal histology, imunocitochemistry, enzymatic activity and cell proliferation were obtained. Gonads of *Gymnotus* sp. are ventrally located in the coelomic cavity and connected by long ducts to the urogenital papilla which has an anterior position in the animal body. Ovaries are fused, and the internal morphology of both, ovary and testis, do not differ from other ostariophysians. The reproductive cycle in females and males was divided in five phases, according to a new approach from the germ cells development. This classification, developed to be universal, for ovary as well as for testis better express the histological alterations during reproductive cycle in *Gymnotus* sp. The relation between the gonadosomatic index and the histological characteristics of the reproductive phases was done. Plasma concentrations of estradiol and 11-ketotestosterone were low variable in females, having, both, a tendency to high values in the beginning of the reproductive cycle and in animal's ovary with oocytes able to spawn. Testosterone concentration increasingly elevate as ovary develops, suggesting a possible relation with the follicles growth. Thecal cells positivity for the enzymatic detection of 3β hidroxisteroid desidrogenase is in agreement with the plasma concentration of testosterone. Unexpected and never reported in Teleostei also the follicle cells react to the enzymatic detection of the 3β hidroxisteroid desidrogenase. In males, the plasma concentrations of estradiol remain approximatly constant along the reproductive cycle. Plasma concentration

of 11-ketotestosterone tends to be high at the beginning of the cycle, with a gradual decrease at the final maturation phase, in which there is a new elevation. The highest concentration of testosterone along the male reproductive cycle coincides with the secondary spermatogonia proliferation, suggesting a possible relation between the concentration of this hormone and the proliferative events. Together plasma steroids concentration, gonadal histology, imunocitochemistry, enzymatic activity and detection of cell proliferation provide a new comprehension of the reproductive cycle in *Gymnotus*.

3. Introdução

Os peixes são os representantes mais numerosos e diversos entre os vertebrados, compondo cerca de 50% deste grupo (Nakatani *et al.*, 2001). Atualmente são conhecidas algo em torno de 23700 espécies viventes de peixes que ocupam os mais diversos ambientes aquáticos (Nelson, 2006). Entre estes, cerca de 23600 (99%), são peixes da infraclasse Teleostei, que constitui um dos grupos mais abundantes e diversificados. Toda esta variedade é atribuída a duplicação do genoma, um evento possivelmente ocorrido em um ancestral da infraclasse (Venkatesh, 2003). Esta duplicação genômica teria resultado em uma série de adaptações fisiológicas em relação à respiração, flutuação, nutrição, e principalmente à reprodução, as quais os habilitaram a manterem-se presentes nos mais distintos habitats aquáticos. No que diz respeito especialmente à reprodução, os peixes são caracterizados por possuírem as mais variadas estratégias reprodutivas. Assim migração, cuidado com a prole, tipo de desova, número e tipo de ovo, liberação dos gametas para fertilização externa, o desenvolvimento de órgãos especializados para fertilização interna, as diferentes construções de ninhos, são exemplos de algumas táticas reprodutivas dos teleósteos (Le Gac & Loir, 1999; Nakatani *et al.*, 2001).

A maioria dos teleósteos possui reprodução influenciada pela sazonalidade dos fatores ambientais, assim, a maturação das gônadas ocorre de forma gradual e resulta na liberação dos gametas (de forma total ou parcelada) somente em um determinado período do ciclo reprodutivo, ou seja, a sua época reprodutiva. Esse tipo de ciclo é extremamente dependente das condições ambientais favoráveis, como por exemplo, fotoperíodo, pH, temperatura e nível d'água. Em outros peixes, a reprodução é contínua, ou seja, a produção e a liberação dos gametas ocorrem ao longo de todo o ciclo reprodutivo.

Em espécies sazonais, os fatores ambientais são transmitidos para áreas específicas do encéfalo, desencadeando uma cascata hormonal responsável por alterações histológicas e fisiológicas, que ocorrem principalmente nas gônadas, as quais desenvolverão determinadas características dependente da fase reprodutiva

em que se encontram. Estes eventos culminam com a formação de gametas aptos à fertilização.

3.1. Os Ovários

Na grande maioria dos Teleostei, os ovários são órgãos pares, saculiformes, localizados longitudinal e dorsalmente à cavidade celomática, presos à parede do corpo pelo mesovário. À diferença dos mamíferos, são cavitários com o compartimento germinativo em forma de lamelas que se projetam a partir da cápsula em direção à luz do órgão. A cavidade ovariana é contínua com os oviductos que se unem caudalmente, e desembocam na papila urogenital (Nagahama, 1983; Selman & Wallace, 1986; Connaughton & Aida, 1998).

Em alguns grupos, durante o desenvolvimento gonadal, os ovários podem fundir-se em um órgão único, e em outros, um deles pode degenerar, permanecendo em ambos os casos somente um ovário funcional (Nagahama, 1983). As células tronco da linhagem germinativa persistem ao longo de toda a vida, dividem-se continuamente, dando origem às oogônias que entram em oogênese. Entende-se por oogênese o processo através do qual as oogônias transformam-se em oócitos aptos a serem fertilizados. Não existe, portanto, um limite para o número de oócitos que podem ser produzidos (Tyler & Sumpter, 1996).

Após a diferenciação sexual e no início de cada ciclo reprodutivo, as células tronco presentes no epitélio germinativo feminino dividem-se várias vezes por mitose (Tokarz, 1978). Assim auto-renovam-se e/ou diferenciam-se em oogônias que se reúnem em conjuntos ou ninhos. Nos ninhos, as oogônias entram em meiose dando origem aos oócitos que avançam para a prófase da primeira divisão e estacionam em diplóteno (Grier, 2000; Grier *et al.*, 2009).

Células epiteliais, pré-foliculares, oriundas das lamelas ovígeras envolvem os oócitos em diplóteno isolando-os e gradualmente sintetizam a membrana basal sobre a qual se apoiam. Os oócitos deixam os ninhos mas permanecem conectados ao epitélio germinativo por certa extensão da membrana basal que compartilham com o epitélio (Grier, 2000; Grier *et al.*, 2005; 2007; 2009).

A partir do conjuntivo circundante, as células pré-tecais dispõem-se ao redor do folículo em formação, sobre a membrana basal recém sintetizada, e dão origem à teca. Completa-se, assim a formação do complexo folicular. O complexo folicular é, portanto, constituído pelo oócito diplotênico, envolto sequencialmente pelas células foliculares apoiadas na membrana basal e circundadas pela teca (para revisão veja Grier *et al.*, 2009).

O término da formação dos folículos marca o início do crescimento primário dos oócitos. Conhecido também por crescimento pré-vitelogênico que é caracterizado por um drástico aumento do volume celular (Wallace & Selman, 1981; Nagahama, 1983; Selman & Wallace, 1989; West, 1990; Patiño & Sullivan, 2002; Grier *et al.*, 2009). No núcleo, os organizadores nucleolares são amplificados, destacam-se dos cromossomos, tornam-se circulares e dão origem a inúmeros nucléolos que se dispõem junto ao envoltório nuclear. Uma grande quantidade de RNA heterogêneo e RNA ribossomal é sintetizada (Guraya, 1986; Tyler & Sumpter, 1996; Wallace & Selman, 1990). Os RNAs associados às proteínas, são transferidos para o citoplasma onde dão origem a corpos densos conhecidos como “nuages” (Edy, 1975; Clérot, 1976; Toury *et al.*, 1977).

No período de crescimento primário, glicoproteínas são produzidas e incorporadas aos alvéolos recém formados na periferia do oócito. Os alvéolos corticais formam-se a partir de depressões do oolema, tornam-se progressivamente maiores e constituem as grandes vesículas que margeiam a superfície oocitária (Wallace & Selman, 1981; Nagahama, 1983; Selman & Wallace, 1989; West, 1990; Guimarães & Quagio-Grassiotto, 2001; Patiño & Sullivan, 2002; Grier *et al.*, 2009).

Nos oócitos, principalmente nos peixes marinhos, a deposição de lipídeos , geralmente, tem início no período pré-vitelogênico (Selman & Wallace, 1989; Le Menn *et al.*, 2007; Grier *et al.*, 2009). No período, a proliferação das organelas membranosas é intensa. Inicialmente dispostas ao redor do núcleo, aumentam em número e extensão, espalham-se pelo citoplasma e atingem a periferia do oócito (Selman & Wallace, 1989; Le Menn *et al.*, 2007; Grier *et al.*, 2009).

Pequenas microvilosidades que se projetam na superfície do oócito, e na

superfície das células foliculares, são os primeiros indícios da formação da zona pelúcida. Durante o desenvolvimento oocitário, as microvilosidades aumentam em número e comprimento, e estendem-se por poros ou canais resultantes da deposição de material elétron-denso ao seu redor (Abraham *et al.*, 1984; Iwamatsu *et al.*, 1988; Guimarães & Quagio-Grassiotto, 2005; Le Menn *et al.*, 2007; Grier *et al.*, 2009). O material elétron-denso se organiza em camadas variáveis em número, espessura, composição química, estrutura e elétron-densidade (Selman & Wallace, 1989; Wallace & Selman, 1990; Quagio-Grassiotto & Guimarães, 2003; Le Menn *et al.*, 2007).

Nos oócitos em crescimento secundário, o núcleo tem um contorno altamente irregular. Os nucléolos são periféricos, instalam-se nas chanfraduras do envoltório nuclear, e na sua correspondência, no citoplasma organizam-se as “nuages”. Inclusão de corpos lipídicos, formação do envelope oocitário propriamente dito, e o aparecimento da célula micropilar entre as células foliculares, determinando o polo animal, são outras características destes tipos celulares (Selman & Wallace, 1989; Wallace & Selman, 1990; Tyler & Sumpter, 1996; Guimarães & Quagio-Grassiotto, 2002; Le Menn *et al.*, 2007; Grier *et al.*, 2009).

O início e o término da vitelogênese ocorrem ao longo do crescimento secundário dos oócitos. No processo, a vitelogenina (uma lipofosfoglicoproteína, precursora das proteínas vitelínicas) sintetizada e secretada pelo fígado, atinge a superfície dos folículos em crescimento, via circulação, difunde-se pela membrana basal (que separa as células da teca, das foliculares), pelos espaços intercelulares do epitélio folicular, pelos canais do envelope vitelínico e finalmente atinge as microvilosidades do oócito, onde faz contato com o oolema. É capturada por endocitose mediada por receptores, translocada via vesículas cobertas para o citoplasma, e quebrada por proteólise no sistema endossoma/lisossoma. Resultantes do processo, a lipovitelina e a fosfovítina (as subunidades polipeptídicas das proteínas vitelínicas) são utilizadas na formação dos grânulos de vitelo (Busson-Mabillot, 1984; Wallace, 1985; Stifani *et al.*, 1990; Wallace & Selman, 1990; Guimarães & Quagio-Grassiotto, 2005; Le Menn *et al.*, 2007; Grier

et al., 2009). As proteínas vitelínicas constituem uma importante fonte de aminoácidos e lipídeos para os embriões e sustentam o seu desenvolvimento.

Durante o crescimento secundário, ocorre, portanto, um novo e drástico aumento do volume oocitário, devido agora ao acúmulo de vitelo. A deposição de vitelo é feita na forma de grânulos, limitados por membrana, formados pela fusão das vesículas cobertas menores, que aparecem inicialmente no citoplasma periférico e que gradualmente preenchem o ooplasma (Wallace & Selman, 1981; Nagahama, 1983; Selman & Wallace, 1989; Wallace & Selman, 1990; West, 1990; Tyler & Sumpter, 1996; Guimarães & Quagio-Grassiotto, 2002; Le Menn *et al.*, 2007; Grier *et al.*, 2009).

Mudanças estruturais consideráveis ocorrem no envelope oocitário que completa a sua formação. Os microvilos do oócito e das células foliculares alongam-se, a deposição de substância amorfa ao seu redor acelera-se, levando ao espessamento da estrutura como um todo. A substância amorfa depositada ao redor dos microvilos é de natureza principalmente protéica. Suas proteínas precursoras são variadas e têm origem hepática ou ovariana ou mesmo de ambas (Patiño & Sullivan, 2002; Le Menn *et al.*, 2007; Grier *et al.*, 2009).

Ao final do crescimento secundário o oócito entra em maturação e retoma o processo meiótico. O núcleo (vesícula germinativa) migra para a periferia da célula, em direção à região da micrópila, e o envoltório nuclear fragmenta-se. Os cromossomos condensam e avançam para a metáfase da primeira meiose. O primeiro corpúsculo polar é eliminado e completa-se a primeira divisão da meiose, em seguida inicia-se a segunda divisão meiótica. Os cromossomos remanescentes avançam para a metáfase, e aí permanecem (Nagahama, 1983; Selman & Wallace, 1989; West, 1990; Khan & Thomas, 1998; Patiño & Sullivan, 2002; Le Menn *et al.*, 2007; Grier *et al.*, 2009).

A oogênese, ainda que bastante estudada nos Teleostei, segue pouco clara em vários pontos. Mais recentemente, alguns desses pontos têm sido alvos da curiosidade dos investigadores. Nesse contexto, além da atividade esteroidogênica das células foliculares e tecais, chamam a atenção, a gênese e atresia dos folículos e sua regressão após a ovulação. Esses processos que nos

seus extremos contrapõem os mecanismos de proliferação e morte celular, são particularmente exuberantes naquelas fêmeas dos Teleostei cujo ciclo reprodutivo tem forte influência sazonal, como parece ser o caso dos Gymnotiformes.

3.2. Os Testículos

Na maioria dos Teleostei, os testículos são órgãos pares, alongados, localizados longitudinal e dorsalmente à cavidade celomática. Podem variar de simples bolsas alongadas que convergem para a papila urogenital, a órgãos foliáceos com função predominantemente espermatogênica, contendo regiões diferenciadas com função secretora ou armazenadora de esperma. Alguns grupos chegam inclusive a apresentar estruturas similares em função às vesículas seminais, as ampolas (Loir *et al.*, 1989a; Le Gac & Loir, 1999).

No interior dos testículos, o compartimento seminífero organiza-se em lóbulos ou em túbulos (Grier, 1993) e o ducto espermático, em geral, tem posição dorsal (Schulz, 2003). Nos testículos lobulares, o compartimento seminífero é digitiforme e tem o fundo cego voltado para a periferia ventro-lateral do órgão. Pode sofrer anastomoses, porém apenas na região do ducto espermático. Esse tipo de organização testicular é encontrado nos Teleostei mais derivados - Percomorpha e Atherinomorpha. Nos testículos tubulares, presentes nos demais Teleostei, o compartimento seminífero forma alças na periferia ventro-lateral do órgão. Os túbulos sofrem anastomoses em diferentes alturas, e principalmente na região do ducto espermático. Esse tipo de organização testicular, comum aos demais Teleostei, é denominado de tubular anastomosado (Grier, 1993).

Nos testículos lobulares, as espermatogônias podem estar distribuídas ao longo de todo o lóbulo ou confinadas apenas na sua porção distal. Os primeiros, encontrados nos Percomorpha, são ditos irrestritos e os últimos, típicos dos Atherinomorpha, são ditos restritos. Nos testículos tubulares, comuns à maioria dos Teleostei, as espermatogônias distribuem-se ao longo de todo o compartimento seminífero (Grier, 1993; Parenti & Grier, 2004; Nóbrega *et al.*, 2009).

O compartimento seminífero, na forma de lóbulos ou túbulos anastomosados, determina a presença de cavidades no interior do testículo, que são revestidas

pelo epitélio germinativo. O epitélio germinativo masculino é formado pelas células germinativas (espermatogônias, espermatócitos, espermátides e espermatozóides) e pelas células somáticas (células de Sertoli), unidas por complexos juncionais e apoiadas na membrana basal. Nos teleósteos, o epitélio germinativo organiza-se em cistos formados por grupos de células germinativas em desenvolvimento sincrônico, envoltas pelas células de Sertoli (Grier, 1981; 2002; Billard, 1986; Pudney, 1995; Guraya, 2001). Devido a sua organização em cistos, o epitélio germinativo, passa por várias alterações morfológicas ao longo do ciclo reprodutivo. Conforme a época do ciclo, os cistos contendo as células germinativas distribuem-se de forma contínua ou descontínua sobre a membrana basal. Essa variação do epitélio, de contínuo a descontínuo, e o tipo de células germinativas que predominam nos cistos, ou no lume do compartimento seminífero, têm sido utilizados para caracterizar diferentes classes reprodutivas, ao longo do ciclo gonadal de alguns Percomorpha e, parece aplicar-se, com algumas adaptações, aos demais teleósteos (Grier, 2002).

A espermatogênese tem início com a proliferação mitótica das espermatogônias, que progride para a meiose (divisão I e II) dos espermatócitos e chega ao seu término com a espermiogênese, na qual as espermátides haplóides se diferenciam em espermatozóides (Miura, 1998; Schulz & Miura, 2002; Miura & Miura, 2003; Schulz, 2003; Nóbrega *et al.*, 2009; Schulz *et al.*, 2010). A manutenção do processo ao longo da vida reprodutiva do animal é garantida pelas células tronco da linhagem espermatogonial, presentes nos testículos, que ao dividirem-se, auto renovam-se, e dão origem às espermatogônias destinadas à espermatogênese (Schulz & Miura, 2002; Schulz, 2003; Schulz *et al.*, 2010).

Nos Teleostei, as espermatogônias destinadas à espermatogênese são envoltas individualmente por processos citoplasmáticos das células de Sertoli, enquanto as células tronco espermatogoniais permanecem em contato com a membrana basal. A produção das células gaméticas masculinas ocorre, portanto, no interior dos cistos, no epitélio germinativo que reveste o compartimento seminífero dos testículos (Grier, 1981; 2002; Billard, 1986; Pudney, 1995; Guraya, 2001; Schulz *et al.*, 2010).

As células de Sertoli respondem pela sustentação e nutrição das células germinativas em desenvolvimento no interior dos cistos e pela fagocitose dos resíduos citoplasmáticos da espermiogênese. Controlam a composição do fluido seminal e ao final de cada ciclo reprodutivo fagocitam os espermatozóides residuais (Billard, 1970; Grier, 1993; Pudney, 1993). No epitélio germinativo, as células de Sertoli unem-se através de complexos juncionais, inúmeros desmossomas, e formam a barreira hemato-testicular. Propiciam um ambiente estrutural e molecular favorável para o desenvolvimento da espermatogênese (Grier, 1993; Pudney, 1993; Loir *et al.*, 1995). São responsáveis pela secreção de vários fatores de crescimento que atuam na proliferação e/ou diferenciação das células germinativas (Miura, 1998; Le Gac & Loir, 1999).

As células de Leydig, presentes no interstício testicular próximas a vasos sanguíneos, constituem a principal fonte de produção e secreção dos esteróides gonadais que respondem pela espermatogênese e junto com as células de Sertoli coordenam as funções testiculares (Loir *et al.*, 1989b; Loir, 1990; Pudney, 1993; Callard, 1996). Células esteroideogênicas típicas, as células de Leydig possuem retículo endoplasmático liso e complexo de Golgi bem desenvolvidos, numerosas mitocôndrias com cristas tubulares, lisossomos, peroxissomos (Payne *et al.*, 1996; Guraya, 2001; Nóbrega & Quagio-Grassiotto, 2007). Apesar da lipofilia constituir uma característica das células produtoras de esteróides, as células de Leydig nos teleosteos não costumam apresentar gotas de lipídio (Guraya, 1976; Billard *et al.*, 1982; Nagahama, 1983; Dodd & Sumpter, 1986; Loir *et al.*, 1989b; Loir 1990; Cauty & Loir, 1995; Grier, 1981; Pudney, 1996; Nóbrega & Quagio-Grassiotto, 2007).

A reprodução dos teleosteos, assim como dos demais cordados, é controlada pelo eixo encéfalo-hipófise-gônadas. Fatores externos (fotoperíodo, temperatura da água e precipitação pluviométrica) e internos são transmitidos como sinais para áreas específicas do hipotálamo que processam essas informações e secretam o hormônio liberador de gonadotropina (GnRH). O GnRH ativa regiões específicas da adenohipófise, promovendo a liberação dos hormônios gonadotrópicos (hormônio luteinizante - LH e hormônio folículo estimulante - FSH) na corrente

sanguínea. As gonadotropinas estimulam receptores presentes nas gônadas, influenciando a produção de esteróides sexuais, que são responsáveis pela proliferação das células germinativas iniciais, a entrada em meiose, a diferenciação, liberação e a maturação dos gametas. O LH atua nas células de Leydig e o FSH, nas células de Sertoli (Ball & Baker, 1969; Dodd, 1972; Callard *et al.*, 1978; van Oordt & Peute, 1983; Schulz & Miura, 2002; Miura & Miura, 2003; Schulz, 2003). Os esteróides sexuais são principalmente sintetizados pelas células somáticas gonadais, as células de Leydig (Pudney, 1996).

Nos teleósteos, o potencial esteroidogênico das células de Leydig tem sido evidenciado através de sua ultraestrutura, típica de célula esteroidogênica, e pela detecção enzimática da 3 β -hidroxiesteróide desidrogenase (3 β -HSD) (Marshall & Lofts, 1956; Yaron, 1966; van den Hurk *et al.*, 1978; Shanbhag & Nadkarni, 1979; Cruz-Höfling & Cruz-Landim, 1984; Borges Filho, 1987; Silva, 1987; van Vuren & Soley, 1990; Cauty & Loir, 1995; Cinquetti & Dramis, 2003; Lo Nostro *et al.*, 2004; García-López *et al.*, 2005; Nóbrega & Quagio-Grassiotto, 2007). A enzima 3 β -hidroxiesteróide desidrogenase (3 β -HSD) está envolvida em diversas etapas da biossíntese dos hormônios esteróides. É responsável pelas conversões: pregnenolona em progesterona; 17 α -hidroxipregnenolona em 17 α -hidroxiprogesterona; dehidroepiandrosterona em androstenediona; e androstenediol em testosterona (Kime, 1993; Kobayashi *et al.*, 1996). A 3 β -HSD atua no grupo hidroxila (OH), ligado em posição beta ao carbono 3 do esteróide. Em uma primeira etapa, a enzima oxida a hidroxila (OH), que ao doar seus elétrons, converte-se em um grupamento cetona (=O). Nessa reação de oxidorredução, o NAD⁺ (forma oxidada) recebe os elétrons da OH e passa para sua forma reduzida (NADH). Em uma segunda etapa, a 3 β -HSD age como uma isomerase, isto é, transfere a dupla ligação do carbono 5 para o carbono 4 do esteróide, convertendo assim os hidroxiesteróides Δ 5 em Δ 4. Recentemente, estudos *in vitro* (Loir, 1990) e o desenvolvimento de anticorpos específicos para a via esteroidogênica dos peixes (Kobayashi *et al.*, 1996, 1998), também confirmam as células de Leydig como os principais sítios de produção de andrógenos nos testículos dos teleósteos, documentado em vários Teleostei (Shanbhag &

Nadkarni, 1979; van den Hurk *et al.*, 1978; Borges Filho, 1987; Cuevas *et al.*, 1993; Cinquetti & Dramis, 2003; Lo Nostro *et al.*, 2004; Nóbrega & Quagio-Grassiotto, 2007).

3.3. Modelo Experimental

Os Gymnotiformes são um componente importante da ictiofauna de água doce das Américas Central e do Sul. Compreendem mais de 100 espécies descritas, distribuídas em 27 gêneros. Estas espécies possuem o corpo alongado em formato de faca ou de cutelo, e são capazes de produzir e detectar campos elétricos de diferentes intensidades para compensar a falta de conexão entre o aparelho visual e o encéfalo (Mago-Leccia, 1994; Albert & Campos-da Paz, 1998; Campos-da-Paz & Albert, 1998; Albert, 2001; Albert & Crampton, 2005).

Gymnotus sp., representante da família Gymnotidae, é conhecido regionalmente como tuvira, morenita, ituí ou sarapó, distribui-se pela região que abrange o leste da Guatemala até o Paraguai, tendo ampla distribuição nas águas continentais do Brasil (Campos-da-Paz, 2003). Seu período reprodutivo estende-se de outubro a dezembro, a desova é parcelada, sazonal prolongada para a enchente. Pode ser antecipada ou atrasada, na dependência das condições climáticas (Vazzoler, 1996).

O conhecimento da biologia da reprodução de qualquer espécie é um aspecto essencial seja para a conservação da diversidade íctica, ou para as medidas de preservação e/ou manejo.

A dinâmica da reprodução e biologia reprodutiva de *Gymnotus* sp. tem sido abordada por alguns autores como Barbieri & Barbieri (1984, 1985), González *et al.* (2001) e Cognato & Fialho (2006), no entanto informações detalhadas sobre os aspectos histológicos das gônadas ao longo do ciclo reprodutivo não encontram-se disponíveis. A reprodução, em linhas gerais, é dependente de eventos celulares nas gônadas, que ao final resultam em células gaméticas aptas à fecundação. Atualmente dados da foliculogênese e oogênese em Teleostei são principalmente oriundos de espécies marinhas pertencentes a ordens mais derivadas na escala evolutiva, como os Perciformes (Wallace & Selman, 1981; Selman & Wallace, 1989; Grier, 2000, 2002; Pina *et al.*, 2003; Grier *et al.*, 2005,

2007; Fishelson & Gon, 2008; Grier *et al.*, 2009) . Dados relativos à foliculogênese nos Ostariophysi só mais recentemente começaram a ser disponibilizados (Mazzoni *et al.*, aceito; França *et al.*, submetido).

4. Objetivos

4.1. Objetivos gerais

Utilizando diferentes métodos para detecção de proliferação celular, morte celular, atividade enzimática de células esteroidogênicas, análise morfológica, dosagem dos esteróides plasmáticos e dados de índice gonadossomático, traçou-se um paralelo entre todos estes parâmetros buscando o melhor entendimento a cerca do ciclo reprodutivo de *Gymnotus* sp., e conseqüentemente da ordem Gymnotiformes. Os dados não buscaram somente compreender alguns dos mecanismos histo-fisiológicos ocorrido nas gônadas durante o ciclo reprodutivo, mas também compará-los com os existentes na literatura para outras espécies.

4.1. Objetivos específicos

Face ao exposto e trabalhando com machos e fêmeas de *Gymnotus* sp. como modelo experimental, analisou-se ao longo do ciclo reprodutivo:

(1) a morfologia gonadal com especial atenção ao epitélio germinativo considerando o desenvolvimento das células gaméticas e somáticas, as células da teca e as foliculares das fêmeas bem como as células de Sertoli e de Leydig nos machos;

(2) os processos de proliferação e morte celular nas gônadas de ambos os sexos, o potencial fagocítico das células de Sertoli nos machos e das células foliculares das fêmeas, e atividade esteroidogênica das células de Leydig, e das células foliculares e tecais das fêmeas;

(3) as concentrações plasmáticas dos hormônios esteróides, testosterona, 11-ceto testosterona e estradiol;

(4) a correlação do status histológico das gônadas de ambos os sexos com, o índice gonadossomático, e as concentrações plasmáticas dos hormônios esteroidais.

5. Materiais e Métodos

5.1. Obtenção de dados biométricos

Para cada animal foi registrado o comprimento total (Lt) que é a distância, em centímetros, entre o focinho e a extremidade posterior do peixe, o peso total (Wt) e o peso das gônadas (Wg) em gramas. O comprimento total foi obtido com auxílio de ictiômetro. O peso foi determinado em balança de precisão com sensibilidade de 0.01g. Os dados biométricos obtidos foram utilizados para calcular o índice gonadossomático (IGS). O índice gonadossomático (porcentagem que as gônadas representam do peso total do indivíduo) é utilizado como indicador do estado funcional das gônadas (Vazzoler, 1996).

O índice gonadossomático é calculado pela fórmula $IGS = (Wg / Wt) \times 100$, onde:

IGS= índice gonadossomático; Wg = peso das gônadas; Wt = peso total

Os dados obtidos ao longo de todo o período reprodutivo foram analisados por pacote estatístico utilizando-se o método de Kruskal-Wallis, e as comparações multipareadas pelo teste “a posteriori” de Dunn’s.

5.2. Coleta de material destinado a análises histológicas

Indivíduos adultos de *Gymnotus* sp. foram coletados mensalmente no Rio Tietê, Distrito de Rio Bonito, município de Botucatu – SP (S 22°41'00.9" W 48°19'58.1"), pelo período aproximado de dois anos (setembro/2006 a abril/2008), perfazendo um total de 150 machos e 100 fêmeas, com o intervalo de comprimento total de 23 a 47,5 cm. Os animais foram anestesiados por imersão em solução aquosa de benzocaína, dissolvida em álcool absoluto, na dose de 1mg/L, e sacrificados de acordo com as norvas do comitê de ética da instituição.

Os órgãos presentes na cavidade celomática foram expostos através de uma secção ventral do corpo do animal e as gônadas foram rapidamente removidas, pesadas e imersas em solução fixadora, de acordo com cada técnica histológica utilizada.

5.3. Morfologia gonadal à microscopia de luz e eletrônica de transmissão

As gônadas destinadas a análises morfológicas foram fixadas em solução de Karnovsky, constituído de 2% de glutaraldeído e 4% de paraformaldeído em tampão Sorensen (0.1M 7.2 pH). O material destinado à microscopia de luz foi desidratado em série crescente de álcool (70% por 24 horas; 95% por no máximo 4 horas), transferido para uma solução de resina metacrilato e álcool absoluto 1:1 por 6 horas, infiltrado em solução de resina pura por toda à noite e embebidos em resina. Cortes com 3µm de espessura foram obtidos em micrótomo equipado com navalha de vidro e corados com Hematoxilina/Eosina, Azul de Toluidina Bórax e PAS + Hematoxilina + Metanil Yellow (Quintero-Hunter *et al.*, 1991). Toda a documentação histológica foi feita em sistema computadorizado para análise de imagens.

As gônadas destinadas à microscopia eletrônica de transmissão foram pós-fixadas por 2 horas no escuro em tetróxido de ósmio, contrastadas com solução aquosa de 5% de acetato de uranila por 2 horas, desidratadas em série crescente de acetona, infiltradas e incluídas em araldite. Os cortes foram corados com solução saturada de acetato de uranila 50% em álcool e com citrato de chumbo. A eletromicrografias foram obtidas em microscópio eletrônico de transmissão Philips-CM 100.

5.4. Detecção da proliferação celular por imunocitoquímica de PCNA (Proliferating Cell Nuclear Antigen)

Para avaliar a expressão do PCNA, fragmentos de gônadas de *Gymnotus* sp. foram fixados em líquido de Bouin, desidratados em álcool, clareados em xilol, embebidos em parafina e seccionados com 5µm de espessura. O material foi desparafinizado em xilol e hidratado em água destilada. A peroxidase endógena foi bloqueada com 0.5% de peróxido de hidrogênio em tampão TBS (pH 7.6) por 10 minutos. A recuperação antigênica foi realizada em microondas, em tampão citrato (0.01M a pH 6.0) durante 5 minutos em potência máxima por dois ciclos, com intervalo de 5 minutos entre os ciclos. Após a recuperação antigênica, os cortes foram lavados em tampão TBS e o bloqueio inespecífico foi realizado com

soro bloqueador (3% de leite Molico desnatado, sem Ca^{+2} , em tampão TBS) por 10 minutos. O material foi incubado com o anticorpo primário (1:400) (Novocastra – NCL-PCNA) por 1 hora a temperatura ambiente (em câmara úmida). As lâminas foram lavadas, incubadas com anticorpo secundário biotilado diluído por 30 minutos, lavadas novamente e incubadas com o reagente Super ABC (complexo avidina-biotina) por 30 minutos. O material foi revelado com DAB (3'-diaminobenzidina, dissolvido em TBS) e 0.03% H_2O_2 e contrastado com hematoxilina. Como controle negativo, em algumas lâminas, o anticorpo primário foi omitido ou substituído por TBS. A contagem das células imunomarcadas foram realizadas por área histológica, utilizando-se cinco animais para cada uma das fases reprodutivas, sendo que para cada animal foram analisados cinco campos histológicos escolhidos aleatoriamente.

5.5. Investigação da morte celular por apoptose pela imunocitoquímica do TUNEL (Terminal deoxinucleotidil transferase Uracil Nick End Labeling)

Um método para se identificar apoptose é através da fragmentação do DNA. Na apoptose, a quebra do DNA resulta em vários fragmentos com extremidades 3'-OH livres. A metodologia consiste em detectar, enzimaticamente, as extremidades 3'-OH livres com nucleotídeos modificados. Os reagentes providos pelo Kit de TUNEL marcam as extremidades 3'-OH livres. Para tanto, o tampão de reação contém nucleotídeos e a enzima TdT (terminal deoxynucleotidyl transferase). A TdT é capaz de adicionar, diretamente, nucleotídeos nas extremidades 3'-OH dos fragmentos de DNA. Os nucleotídeos incorporados formam um oligômero composto de digoxigenina conjugada com nucleotídeos. Assim, os complexos digoxigenina-nucleotídeos são reconhecidos por anticorpos anti-digoxigenina que estão conjugados com peroxidase. A revelação da peroxidase se dá pelo fornecimento do substrato DAB (3',3'-diaminobenzidina) que se apresenta de cor marrom. A técnica foi empregada em representades de todas as fases reprodutivas.

5.6. Investigação da fagocitose e da autofagia pela detecção da fosfatase ácida

Fragmentos de gônadas foram criopreservados em soluções crescentes de sacarose, congelados em nitrogênio líquido e acondicionados em freezer -20° até o momento da reação. O material congelado foi seccionado em criostato (9µm de espessura) e incubado por 1 hora a 37°C em meio contendo 32mg de β-glicerofosfato, 10 ml de tampão acetato de sódio 0.05 M a pH 5.0 e 20mg de nitrato de chumbo. A enzima presente no tecido libera o fosfato do substrato que se combina com o chumbo formando no local da atividade um precipitado não visível à microscopia de luz. Após o tempo de incubação, o material foi lavado com sulfeto de amônio a 1%, durante 2 minutos, convertendo esse precipitado em sulfeto de chumbo agora visível ao microscópio de luz. As lâminas foram lavadas em água destilada, contra coradas com Metil Green e montadas em gelatina.

5.7. Histoquímica enzimática da 5Δ 3β HSD (5 delta 3 beta hidroxisteróide desidrogenase)

A localização in situ da 3β-HSD, e conseqüentemente do tecido endócrino de *Gymnotus* sp., foi conduzida através de histoquímica enzimática segundo protocolo modificado de Borges Filho (1987) e Lo Nostro e colaboradores (2004). O princípio do método consiste no fornecimento de um substrato (esteróide) para que a enzima do tecido (3β-HSD) o oxide. O meio de incubação contém: substrato esteróide (no caso a dehidroepiandrosterona), NAD⁺ (beta nicotinamida dinucleotídeo – forma oxidada) e sal de tetrazólio (Nitro Blue Tetrazolium - NBT). Com a oxidação do esteróide, o NAD⁺ recebe elétrons e passa para a forma reduzida, NADH, que por sua vez é capaz de reduzir o NBT. A forma reduzida do NBT (formazan) é insolúvel e de coloração azul-arroxeadada, que permite identificar o local da reação enzimática. Para a reação os fragmentos de gônadas foram criopreservados em soluções crescentes de sacarose, rapidamente congelados em nitrogênio líquido e acondicionados em freezer -20°C até o momento da reação. O material congelado foi seccionado em criostato (9µm de espessura) e incubado por 2h (37°C) em meio contendo: 11.9ml de tampão fosfato (pH 7.6); 900µl de nitro blue tetrazolium (NBT) (preparado com 1mg dissolvido em 1ml de água destilada); 600µl de substrato (preparado com 4mg de dehidroepiandrosterona dissolvidos em 1 ml de dimetilsulfóxido - DMSO) e 20mg

de NAD⁺. Após incubação, o material foi lavado em tampão fosfato, fixado em formol Ca⁺² e montado em gelatina. Como controle negativo, algumas lâminas foram incubadas em (a) meio sem esteróide ou em (b) meio sem NAD⁺.

5.8. Imunolocalização da enzima 5Δ 3β HSD (5 delta 3 beta hidroxiesteróide desidrogenase)

O potencial esteroidogênico do tecido endócrino de *Gymnotus* sp. também foi analisado por meio da imunocitoquímica da enzima 5Δ 3β HSD. Para tanto fragmentos de gônadas de *Gymnotus* sp. foram fixados em líquido de Bouin, desidratados em álcool, clareados em xilol, embebidos em parafina e seccionados com 5μm de espessura. O material foi desparafinado em xilol e hidratado em água destilada. A peroxidase endógena foi bloqueada com 0.5% de peróxido de hidrogênio em tampão TBS (pH 7.6) por 10 minutos. A recuperação antigênica foi realizada a 90°C em tampão citrato (0.01M a pH 6.0) durante 30 minutos. Após a recuperação antigênica, os cortes foram lavados em tampão TBS e o bloqueio inespecífico foi realizado com soro bloqueador (3% de leite Molico desnatado, sem Ca⁺², em tampão TBS) por 10 minutos. O material foi incubado com o anticorpo primário (1:100) (Santa Cruz - SC100466) “overnight” a 4°C em câmara úmida. As lâminas foram lavadas, incubadas com anticorpo secundário biotilado diluído por 30 minutos, lavadas novamente e incubadas com o reagente Super ABC (complexo avidina-biotina) por 30 minutos. O material foi revelado com DAB (3`-diaminobenzidina, dissolvido e em algumas lâminas, o anticorpo primário foi omitido e substituído por TBS.

5.9. Quantificação dos esteróides plasmáticos

Cerca de 130 machos e 90 fêmeas de *Gymnotus* sp. foram utilizadas para a dosagem dos esteróides plasmáticos. Para obtenção do plasma sanguíneo, os animais foram anestesiados com solução de benzocaína, como previamente mencionado, e com o uso de seringas de 5 ml heparinizadas coletou-se o sangue da veia caudal. Em seguida a amostra de sangue foi depositada em tubo plástico de 1,5 ml, e para a separação do plasma fez-se o uso de centrífuga refrigerada a

4°C por 15 minutos a 3000 rpm. Fez-se a separação do plasma, o qual foi acondicionado em tubos plásticos a -20°C até o momento do ensaio.

Os esteróides gonadais testosterona (T), 11 ceto testosterona (11KT) e estradiol (E₂) foram quantificados no plasma de *Gymnotus* sp. pela técnica imunoenzimática de ELISA (Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay). Para a dosagem de T e E₂ foram utilizados kits da marca Interkit, destinado para quantificação, dos esteróides em questão, em plasma humano, e para 11 KT utilizou-se o kit da Cayman, específico para peixes. Ambos os kits utilizam placas de ELISA com anticorpos específicos, e o procedimento para o uso destes seguiu as especificações do fabricante. O princípio do método fundamenta-se na ligação competitiva do anticorpo específico presente na placa de ELISA com o hormônio presente no plasma do animal, chamado hormônio “frio” e/ou o hormônio marcado, chamado hormônio “quente”, assim chamado devido a sua ligação com uma enzima peroxidase. Assim quanto maior a quantidade de hormônio presente no plasma do animal, menor vai ser a reação entre o anticorpo e o hormônio marcado, e conseqüentemente menos intensa será a formação do complexo anticorpo-hormônio marcado, o que resulta em valores menores de absorbância no espectrofotômetro. Cada amostra foi analisada em duplicata para que se pudesse verificar alterações nos resultados das dosagens num mesmo ensaio, ou seja, obteve-se a concentração hormonal de uma mesma amostra utilizando valores de diferentes sítios na placa de ELISA (duplicata). A validação permite que os valores obtidos, em duplicatas, sejam comparados de forma que seja calculada a porcentagem de variação entre os mesmos. A leitura das placas foi realizada em leitora de microplaca Molecular Devices - SpectraMax 250, utilizando um comprimento de onda de 450 nanômetros (nm) para T e E₂, e 412nm para 11KT, segundo recomendação dos fabricantes.

5.10. Classificação morfológica

O desenvolvimento folicular foi caracterizado em estágios conforme Grier e colaboradores (2009). Esta proposta divide o desenvolvimento do folículo em diferentes etapas de acordo com as modificações ocorridas pelo oócito, resultando em três estágios: crescimento primário, crescimento secundário e maturação. A

classificação das fêmeas em fases reprodutivas foi feita utilizando como base na proposta de Brown-Peterson e colaboradores (2009), na qual o ciclo reprodutivo divide-se em cinco fases: regredida, desenvolvimento ovariano, apto à desova, desova ativa e regressão ovariana; baseado no tipo de célula germinativa presente, bem como de estruturas resultantes de eventos do ciclo reprodutivo, como a presença de complexos pós-ovulatórios, macrófagos e granulócitos.

Para caracterizar as fases reprodutivas ao longo do ciclo reprodutivo de machos de *Gymnotus* sp. as descrições foram feitas de acordo com o predomínio do tipo de célula germinativa presente nos túbulos seminíferos, a continuidade do epitélio germinativo, o tipo de células intersticiais presentes, quantificação de células imunomarcadas pelo PCNA, dados de índice gonadossomático, concentração dos esteróides plasmáticos, esteroidogênese das células de Leydig e aspecto geral dos testículos. De acordo com as análises foram descritas cinco fases reprodutivas: regredida, maturação inicial, maturação intermediária, maturação final e regressão.

6. Resultados

6.1. Fêmeas

Os ovários são órgãos alongados, localizam-se ventralmente na cavidade celomática, apoiados sobre a extensa bexiga natatória (Figs 1A e C). Devido a posição do poro urogenital, situado logo abaixo da cabeça próximo a abertura do opérculo, o ovário possui sua porção cranial em uma posição posterior e a porção caudal encontra-se em uma posição anterior, em relação ao corpo do animal. O mesórquio prende os ovários à bexiga natatória. Os ductos estão localizados anteriormente na cavidade celomática, e unem o órgão à papila urogenital. Os ovários têm desenvolvimento desigual, o direito é menor e funde-se à porção cranial do esquerdo (Fig.1C). Externamente são revestidos pela túnica albugínea, e internamente são preenchidos pelas lamelas ovígeras (Fig.1E).

6.1.2. Foliculogênese

Nas secções histológicas, o epitélio, ao longo da borda da lamela, é formado por células pavimentosas - as células somáticas - e oogônias - células germinativas - numa distribuição descontínua (Fig.2A). As oogônias sofrem várias mitoses, e as que não são solicitadas para a reprodução, auto renovam-se e permanecem como células da linhagem tronco (Fig.2B).

As células que foram recrutadas para a reprodução continuam a dividir-se por mitose e formam ninhos, que possuem em sua periferia células pré-foliculares (Fig.2C). O ninho pode ser composto de vários grupos de células germinativas, as quais podem estar em diferentes estágios de desenvolvimento. Neste estágio o conjunto projeta-se em direção ao estroma, contudo permanece sempre acima da membrana basal do epitélio lamelar (Fig.2C). As oogônias entram em meiose, originando os oócitos. Na prófase da primeira divisão meiótica, no estágio de paquíteno, ocorre o pareamento dos cromossomos homólogos seguido de sua condensação (Fig.2D), e em seguida os oócitos entram em diplóteno, entre o final do paquíteno e o começo do diplóteno os oócitos começam a ser recobertos pelas células epiteliais pré-foliculares e deixam os ninhos (Figs 2E e F). Os oócito diplotênicos permanecem neste estágio de divisão celular até a maturação.

Os oócitos diplotênicos iniciais têm núcleo redondo, e citoplasma levemente basofílico (Fig.2F) devido ao início do acúmulo de RNA. Com a amplificação nucleolar o núcleo dos oócitos passa a conter múltiplos nucléolos periféricos. Antes do final da formação do folículo inicia-se o crescimento primário. O folículo formado é constituído pelo oócito diplotênico inicial envolto pela zona radiata (em formação), células foliculares e membrana basal. Uma vez organizada a teca, tem-se o final da formação do complexo folicular.

6.1.3. Desenvolvimento folicular

No crescimento primário a síntese de componentes citoplasmáticos, como RNAs e organelas membranosas, no oócito é intensa, o que faz com que este tenha um aumento significativo de volume ao final do processo (Fig.3A). Devido a intensa síntese de organelas, inicialmente estas acumulam-se formando agregados, que à microscopia ótica mostram-se como regiões do citoplasma do oócito pouco coradas (Fig.3A). Gradualmente o citoplasma torna-se mais basofílico e as organelas dispersam formando ranhuras pelo citoplasma. O núcleo, que inicialmente tem contorno regular, torna-se irregular cheio de reentrâncias. Os alvéolos corticais iniciam sua formação, o que caracteriza o oócito em etapa de alvéolo cortical ou intermediários (Fig.3B). No início da deposição dos alvéolos corticais no oócito, estes encontram-se dispersos pelo citoplasma em vesículas menores, que com o desenvolvimento do oócito tornam-se progressivamente maiores e constituem as grandes vesículas, que nesta etapa localizam-se na região próxima ao núcleo. A zona radiata desenvolve-se e dada a sua natureza proteica, cora-se fortemente por Metanil Yellow (Fig.3B detalhe). À microscopia eletrônica é possível visualizar as alterações da zona radiata que acompanham o desenvolvimento do folículo (Fig.4). Concomitante com o desenvolvimento do folículo ocorre a deposição de membrana basal, a qual é depositada em camadas, e espessa-se com o desenvolvimento do folículo, tornando bem visível tanto na microscopia ótica quanto na eletrônica (Figs 4A-E). A micrópila, que permite a passagem do espermatozóide no oócito, surge durante o crescimento primário (Fig.3 detalhe). As células foliculares formam uma única camada pavimentosa.

No crescimento secundário, o oócito tem núcleo com contorno irregular e múltiplos nucléolos ocupam as chanfraduras do envoltório nuclear (Figs 3C e D). Gradualmente o oócito incorpora vitelogenina, produzida pelo fígado, a qual chega ao oócito por endocitose, e em seguida é quebrada em lipovitelina e fosfovítina, as quais serão utilizadas na formação dos grânulos de vitelo. As vesículas formadas fundem-se e formam grânulos de vitelo, os quais coram-se pelo corante metanil yellow e técnica de PAS, de forma a indicar a presença de glicoproteínas (Figs 3C e D). Com o crescente acúmulo de vitelo o oócito aumenta drasticamente de tamanho e os alvéolos corticais recém formados são deslocados para uma posição mais periférica. No período, polissacarídeos ácidos (metacromáticos ao Azul de Toluidina) e neutros (PAS positivas) são produzidos e incorporados aos alvéolos. A monocamada de células foliculares passa de pavimentosa a cúbica. Ao redor do folículo, em uma distribuição descontínua, é possível observar a presença de células com morfologia típica de célula esteroideogênica, contendo mitocôndrias dotadas de muitas cristas tubulares (Fig.4F). Estas células podem compor a camada de células de teca. Pelas técnicas de detecção enzimática e imunolocalização da 3 β hidroxisteróide desidrogenase obteve-se marcação em células da teca e foliculares, sendo que nestas últimas a reação fica restrita ao polo apical destas células, na região adjacente à zona radiata (Figs 6E e F). Ao final desta etapa tem-se o vitelo incorporado em sua totalidade.

O estágio final é a maturação do oócito. Neste estágio o núcleo retoma a meiose e desloca-se de uma posição central para uma posição periférica (Fig.3E), em direção a região onde há a micrópila. Ao final da maturação o oócito é liberado do complexo folicular e as células componentes do folículo permanecem no órgão, na estrutura dita complexo pós ovulatório (Fig.5E). Em oócitos coletados diretamente do ducto observou-se uma sutil fusão incompleta dos grânulos de vitelo, a qual provavelmente ocorreu juntamente com os eventos da maturação do oócito (Fig.3F).

6.1.4. Caracterização morfológica das fases reprodutivas

Fase Regredida

As fêmeas nesta fase de maturação gonadal apresentaram, nas lamelas ovígeras ninhos contendo oogônias em proliferação, oócitos profásicos iniciais, e oócitos pré-vitelogênicos (Figs 5A e B). No estroma da lamela é possível visualizar restos de reabsorção de oócitos não desovados ou que não completaram seu total desenvolvimento. O estroma da lamela encontra-se bem desenvolvido (Fig.5A). A foliculogênese ocorre em maior intensidade nesta fase e os oócitos alcançam seu desenvolvimento até o final da foliculogênese, permanecendo no estágio em que seu citoplasma é bastante basofílico e em etapa imediatamente anterior à formação do alvéolo cortical (Fig.5B).

Fase de desenvolvimento ovariano

Conforme o ovário avança no ciclo reprodutivo, parte dos folículos desenvolvem-se (Fig.5C). Os oócitos iniciam a formação da camada de alvéolos corticais. Ainda nesta fase é possível visualizar a deposição de vitelo em alguns oócitos. Os folículos em estágio mais avançado de desenvolvimento apresentam camada de células tecais pavimentosas, células foliculares cúbicas dispostas em monocamada e oócito em vitelogênese. Nesta fase é possível visualizar também oócitos pré-vitelogênicos, ninhos de oócitos em foliculogênese e oogônias. De todas as fases reprodutivas esta é a que contem maior variação, pois possui a maior variedade de estágios de oócitos.

Fase de oócitos aptos à desova

As lamelas ovígeras nesta fase estão repletas de oócito vitelogênicos, sendo que muitos estão no final da incorporação de vitelo (Fig.5D). Esta é a primeira fase em que é possível observar oócitos em maturação, o qual já incorporou em sua totalidade o vitelo e está passando por processos como, retomada da meiose, migração do núcleo em direção à região da micrópila e fusão parcial dos grânulos de vitelo. Nesta fase é possível visualizar ninhos com algumas poucas oogônias primárias e oócitos profásicos iniciais. São bastante raros também os oócitos pré vitelogênicos e intermediários. No estroma da lamela podem ser observados alguns aglomerados de macrófagos e granulócitos, responsáveis pela absorção dos oócitos atresicos, os quais ocorrem durante a maior parte do ciclo reprodutivo, no entanto em baixa frequência.

Fase de desova ativa

Histologicamente as lamelas possuem inúmeras estruturas dilatadas e esféricas, resultado da liberação de oócitos maduros de seus folículos, permanecendo no ovário o chamado complexo pós-ovulatório (Fig.5E). Em alguns cortes é possível visualizar o ponto de conexão do folículo com o epitélio da lamela, que coincide com o local de saída do oócito maduro. Ainda na lamela são encontrados alguns oócitos nos estágios de maturação, vitelogênese e intermediários. As oogônias são escassas, assim como os oócitos pré vitelogênicos.

Fase de regressão

Ao final do ciclo reprodutivo os oócitos em estágio avançado de desenvolvimento, em maturação, vitelogênicos, intermediários e os não desovados, sofrem atresia (Fig.5F). O primeiro indicativo que o folículo sofrerá reabsorção é a hipertrofia da camada de células foliculares (Fig.6A), seguida da liquefação dos grânulos de vitelo e rompimento da zona pelúcida (Fig.6B). No próximo estágio da atresia granulócitos e macrófagos invadem o folículo. Os macrófagos apresentam-se em grupos de células que possuem citoplasma abundante e claro, que respondem positivamente ao PAS, indicando a presença de polissacarídeos neutros (Fig.6C). A reação de fosfatase ácida revela intensa atividade das células foliculares nesta fase, evidenciando o potencial fagocítico destas células, bem como também é possível observar a formação de precipitado em células extra-foliculares, as quais provavelmente são grupos de macrófagos (Fig.6D). Ao final do processo o folículo em atresia apresenta tamanho reduzido e restam poucos granulócitos, e os restos do folículo apresentam-se dobrados sobre si mesmo, devido à diminuição da estrutura como um todo (Fig.6E). No estroma são observados grandes agregados de granulócitos e macrófagos, sendo que estes últimos apresentam estruturas com pigmentação castanha, resultado da reabsorção celular (Fig.6F). A atresia ocorre em todas as fases do ciclo reprodutivo, no entanto na fase de regressão esta é mais frequente, e responsável pela reabsorção dos oócitos remanescentes, que não foram desovados ou não completaram a total maturação.

6.1.5. Proliferação Celular

A marcação por PCNA revelou que o comportamento proliferativo das oogônias, células foliculares e células da teca, diferem de acordo com a fase reprodutiva em que o ovário se encontra, fato este diretamente relacionado com a presença e característica dos folículos presentes. As oogônias respondem positivamente à marcação pelo PCNA durante praticamente todo o ciclo reprodutivo (Fig.7A), exceto pelos ovários que se encontram na fase de regressão (Fig.7C). As células foliculares e tecais também apresentaram marcação pelo PCNA (Fig.7B), com variações de acordo com a fase do ciclo reprodutivo, e novamente durante a regressão não houve praticamente nenhuma resposta positiva ao PCNA (Fig.7D). As células foliculares proliferaram de forma proporcional ao tamanho do oócito, assim na fase regredida e desenvolvimento ovariano houve menor número de células respondendo ao PCNA, enquanto que nas fases seguintes, onde há um drástico crescimento folicular, o número de células imunomarcadas foi maior. As células da teca não proliferaram nas fases regredida e regressão, e quando houve marcação nas outras fases, esta foi proporcional ao tamanho dos folículos, assim como as células foliculares.

6.1.6. Detecção de apoptose

A técnica de detecção de morte celular por apoptose não resultou em marcações positivas nos cortes de ovário em qualquer das fases reprodutivas, principalmente na fase de regressão ovariana (Dados não mostrados).

6.1.7. Índice gonadossomático

Os dados de índice gonadossomático revelam que o valor do índice está diretamente relacionado com o desenvolvimento ovariano no ciclo reprodutivo, assim quanto mais avançada é a fase reprodutiva maior o índice (Fig.8). Inicialmente, quando o ovário prepara-se para um novo ciclo, na fase regredida, o valor do índice gonadossomático ($0.57 \pm 0.03\%$) foi o menor registrado em comparação com as outras fases, diferindo estatisticamente de todos os outros valores (Fig.8). Nas duas fases seguintes os valores de índice gonadossomático aumentam, sendo que do ovário em desenvolvimento ($0.93 \pm 0.06\%$) para o apto à

desova ($2.82 \pm 0.31\%$) há um ligeiro salto (Fig.8). Como na fase seguinte o ovário inicia a desova ($2.41 \pm 0.63\%$) este valor decai, mas ainda é bastante elevado, considerando a comparação entre as fases. Ao final do ciclo reprodutivo o ovário possui grande parte de seu conteúdo liberado pela desova e os oócitos não desovados são reabsorvidos, estes processos resultam em diminuição do índice gonadossomático ($1.90 \pm 0.53\%$) (Fig.8).

Comparando-se os valores dos índices gonadossomáticos em relação aos meses de coleta (Fig.9), pode-se ter uma idéia da época do ano em que animal está se reproduzindo. Os menores valores de IGS ocorreram nos meses de setembro/06 ($0.75 \pm 0.07\%$), abril/07 ($0.82 \pm 0.09\%$), agosto/07 ($0.49 \pm 0.05\%$), setembro/07 ($0.63 \pm 0.05\%$) e outubro/07 ($0.55 \pm 0.03\%$) (Fig.9). Nestes períodos ocorrem somente as fases regredida, desenvolvimento e regressão ovariana (Fig. 10). Os maiores valores de índice gonadossomático obtidos foram nos meses de dezembro/06 ($2.64 \pm 0.76\%$), janeiro/07 ($2.51 \pm 0.80\%$) e janeiro/08 (3.08 ± 0.93) (Fig.9). Analisando a frequência das fases reprodutivas por mês de coleta tem-se que no período de outubro a março foram coletadas fêmeas nas fases de oócitos aptos à desova e desova ativa (Fig.10), logo o período que as fêmeas de *Gymnotus* sp. possui gametas prontos para a fertilização.

6.1.8. Esteróides plasmáticos

Dentre todos os esteróides dosados, estradiol, testosterona e 11 ceto testosterona, somente alguns perfis apresentaram diferenças significativas nas concentrações durante o ciclo reprodutivo (Fig.11). A concentração plasmática de estradiol variou sutilmente nas fases reprodutivas, possuindo o maior valor na fase regredida (177.53 pg/ml) e o menor valor na fase de regressão (111.76 pg/ml) (Fig.11). Na fase de desenvolvimento oocitário (142.09 pg/ml) houve tendência a queda em relação a fase anterior. Seguindo a ordem das fases reprodutivas, há uma tendência à elevação na fase de oócitos aptos a desova (173.88 pg/ml) seguida de queda gradual na fase de desova ativa (153.92 pg/ml) e regressão (Fig.11). O perfil hormonal obtido pela 11-ceto testosterona foi muito semelhante ao perfil do estradiol (Fig.12). Assim como para o estradiol, a concentração de 11-cetotestosterona na fase de oócitos apto a desova (19.76 pg/ml) foi elevada em

relação as outras fases (Fig.12). As concentrações menores de 11-cetotestosterona foram observadas nas fases de desenvolvimento (14.65 pg/ml) e regressão ovariana (Fig.12). Analisando-se o perfil hormonal da testosterona observa-se uma tendência a elevação gradual da concentração acompanhando o desenvolvimento ovariano (Fig.13), iniciando-se na fase regredida (66.90 pg/ml), desenvolvimento (78.22 pg/ml), apto à desova (91.73 pg/ml), com pico em desova ativa (108.99 pg/ml), com declínio acentuado para a fase seguinte, regressão (40.66 pg/ml).

6.2. Machos

Os testículos de *Gymnotus* sp. são órgãos pares de formato oval, localizados ventralmente na cavidade celomática, na região compreendida entre a extremidade cranial da bexiga natatória e a caudal do conjunto visceral (Fig.1B). De ambos os testículos emergem ductos independentes, com cerca de 6 vezes o comprimento do testículo, que os comunicam à papila urogenital (Fig.1D). A papila urogenital situa-se anteriormente, na região ventral próxima a base do opérculo.

Os testículos são cobertos por uma cápsula de tecido conjuntivo, a qual adentra o órgão emitindo septos, que se ramificam. Quanto à estrutura interna, os testículos são do tipo tubular anastomosado e formados por dois compartimentos: intersticial e germinativo. No compartimento intersticial encontram-se, entre outras células, vasos sanguíneos, células mióides e células de Leydig. O compartimento germinativo é formado pelas células germinativas e células de Sertoli, as quais compõem o epitélio germinativo dos túbulos seminíferos. A membrana basal do epitélio separa o compartimento germinativo do intersticial. Os túbulos seminíferos com luz mais dilatada ocorrem em maior frequência na região cortical do órgão (Fig.1F). Os gonodutos, ductos intratesticulares, confluem na saída do testículo formando ductos mais calibrosos, os quais formam o ducto principal, que une o testículo à papila urogenital.

6.2.1. Caracterização morfológica das fases reprodutivas

Fase regredida

Nos testículos regredidos a luz dos túbulos encontra-se inicialmente dilatada, contém espermatozóides residuais e o epitélio germinativo ainda é descontínuo (Figs 14A-C). Os únicos tipos celulares presentes no epitélio dos túbulos seminíferos são as células de Sertoli e cistos de espermatogônias. No interstício encontram-se alguns granulócitos e grupos de células com citoplasma claro e abundante, os macrófagos, células restantes da fase anterior (Fig.14D). As espermatogônias primárias dividem-se por mitose, e o epitélio torna-se contínuo, e a luz do compartimento germinativo diminui. A diminuição da luz do compartimento germinativo é mais evidente na região medular do testículo do que na região cortical (Figs 14E e F). Neste momento o epitélio do túbulo seminífero é do tipo simples, com as células de Sertoli e germinativas, organizadas em cistos que formam uma monocamada contínua sobre a membrana basal. No final da fase regredida ainda pode haver espermatozóides residuais na luz do compartimento germinativo.

Fase de maturação inicial

Nesta fase reprodutiva a quantidade de cistos de espermatogônias e cistos de espermatócitos é grande, com um aumento considerável deste último conforme o testículo progride na maturação inicial. A luz do compartimento germinativo diminui progressivamente, devido à intensa proliferação das espermatogônias, e a diferenciação de parte destas em espermatócitos (Figs 15A-C). O epitélio germinativo é rapidamente re-povoado pelas espermatogônias e torna-se contínuo. No epitélio, os cistos assumem uma organização pseudoestratificada, com aqueles que contêm os espermatócitos projetando-se na camada apical, enquanto os contendo espermatogônias situam-se na camada basal (Figs 15D-F). No interstício além dos componentes gerais, das células de Leydig e vasos sanguíneos, são encontrados alguns macrófagos e granulócitos.

Fase de maturação intermediária

O testículo em maturação intermediária é caracterizado por apresentar cistos de espermatogônias, em quantidade menor que a fase anterior, maior frequência de cistos contendo espermatócitos e espermátides, e poucos espermatozóides (Figs 16A-D). Nesta fase o epitélio dos túbulos seminíferos é contínuo, e o

compartimento luminal apresenta alguns espermatozóides. Dada sua organização pseudoestratificada, mesmo com a abertura de alguns dos cistos liberando os espermatozóides para o compartimento luminal, o epitélio germinativo permanece contínuo e é formado por cistos contendo células germinativa em meiose e/ou ainda não totalmente diferenciadas (Fig.16E). A proliferação das espermatogônias primárias diminui, enquanto que as espermatogônias secundárias continuam a proliferar. A luz dos túbulos nesta fase é mais dilatada que a anterior e contém poucos espermatozóides (Fig. 16F).

Fase de maturação final

Os testículos em maturação final mostram duas regiões estruturalmente distintas (Fig.17A). Os túbulos da região cortical anastomosam-se com maior frequência e formam os gonoductos (Fig.17B). Estes últimos confluem para o ducto que deixa o testículo. Na região cortical os túbulos são mais dilatados. Na maturação final o epitélio germinativo encontra-se predominantemente descontínuo. Os cistos de espermatogônias encontram-se em menor quantidade, assim como os de espermatócitos. Os cistos de espermatídes localizados mais basalmente no epitélio germinativo, e sua maturação e conseqüente abertura, culmina com a descontinuidade do epitélio germinativo (Figs 17C-F). A ocorrência da descontinuidade do epitélio e a crescente quantidade de espermatozóides, caracterizam esta fase reprodutiva. No interstício são encontradas células de Leydig, macrófagos e granulócitos.

Fase de regressão

No início da regressão, macrófagos formam aglomerados no interstício testicular (Fig.18A). Parte destes macrófagos atravessa a membrana basal e chega a luz do túbulo seminífero, para fagocitar os espermatozóides residuais (Fig.18B). Além da atividade fagocítica das células de Sertoli, as células epiteliais dos ductos também fagocitam espermatozóides residuais, como demonstrado pela presença da atividade fosfatase ácida, indicativo de enzimas digestivas nestas células (Figs 18C e D). O epitélio germinativo mostra extensas regiões de descontinuidade intercaladas por cistos contendo espermatogônias. No epitélio germinativo algumas células geminativas apresentam vacúolos no citoplasma.

Durante a regressão a quantidade expressiva de macrófagos e granulócitos é indicada pela forte reação PAS positiva, tanto no interstício quanto no epitélio do túbulo, entre as células germinativas. No interstício é possível visualizar granulócitos, macrófagos (Fig.18E) e melanomacrófagos, com a presença deste último tipo celular ocorrendo ao final da regressão (Fig.18F). Ao final desta fase, no epitélio germinativo, as regiões de descontinuidade diminuem progressivamente, e predominam os cistos contendo espermatogônias, responsáveis pelo re-povoamento do testículo, e no interstício restam ainda alguns melanomacrófagos.

6.2.2. Proliferação celular

As contagens dos números de células imunomarcadas pelo PCNA revelou diferenças nos eventos proliferativos entre as fases reprodutiva. Para esta quantificação as espermatogônias foram divididas em dois grupos, as espermatogônias primárias e as secundárias. Considerou-se espermatogônias primárias aquelas encontradas isoladas, isto é, o cisto formado somente por uma célula de Sertoli e uma espermatogônia. Já a espermatogônia secundária foi considerada aquela inserida em um cisto com mais de uma espermatogônia e células de Sertoli. Os maiores valores para a relação espermatogônia primária marcada por área testicular ocorreu nas fases regredida ($1340.64/\text{nm}^2$) (Fig.19A) e maturação inicial ($1231.68/\text{nm}^2$) (Fig.19B e C), enquanto que nas fases de maturação intermediária ($582.11/\text{nm}^2$) (Fig.19D), final ($551.72/\text{nm}^2$) (Fig.19E) e regressão ($363.64/\text{nm}^2$) (Fig. 20F) este número declinou gradualmente, resultando em valores menores (Fig.20). A relação de espermatogônias secundárias imunomarcadas por área teve maiores valores nas fases regredida ($2671.69/\text{nm}^2$) (Fig.19A) e de maturação inicial ($4627.96/\text{nm}^2$) (Fig.19B e C), com os valores declinando gradualmente nas fases de maturação intermediária ($2086.58/\text{nm}^2$) (Fig.19D), maturação final ($1339.40/\text{nm}^2$) (Fig.19E), regressão ($259.74/\text{nm}^2$) (Fig. 20F). Estatisticamente as fases regredida e de maturação inicial não apresentaram diferenças, no entanto a quantidade de células imunomarcadas é menor no início do ciclo, em relação a fase seguinte, que é quando ocorre o pico no valor da relação célula imunomarcada por área testicular (Fig. 21).

6.2.3. Detecção de apoptose

A técnica de detecção de morte celular por apoptose não resultou em marcações positivas expressivas nos cortes de testículo em qualquer das fases reprodutivas (Dados não mostrados).

6.2.4. Tecido endócrino testicular

O tecido endócrino testicular é formado por grupos de células de Leydig. Os conjuntos localizam-se somente em algumas porções dos testículos, podendo estar na cápsula e interstício, no entanto sua localização é um tanto limitada devido ao seu agrupamento e baixa frequência no órgão. São células com núcleo arredondado e citoplasma pouco corado (Fig.15E). À microscopia eletrônica é possível visualizar um retículo endoplasmático liso bastante desenvolvido, típico de célula esteroidogênica (Fig.22B). As mitocôndrias são um tanto atípicas para o tipo celular, por não possuírem tantas cristas tubulares quanto uma célula esteroidogênica típica. As análises morfológicas e de atividade da 3β hidroxisteróide desidrogenase (3β HSD) sofreram alterações com o decorrer do ciclo reprodutivo. Nos testículos em fase regredida e maturação inicial, as células de Leydig apresentaram maior atividade esteroidogênica (Fig.22A). Analisando a morfologia à microscopia eletrônica é possível observar a grande quantidade de retículo endoplasmático liso (Fig.22B), e quando da utilização tanto a técnica de detecção enzimática (Fig.22A-detalhe) quanto da imunocitoquímica da 3β HSD, observou-se reação, que no caso da imuno-detecção foi a mais intensa em comparação com as outras fases do ciclo reprodutivo (Fig.22A). Conforme o testículo evolui para as fases seguintes, para as fases de maturação intermediária e final, no citoplasma das células de Leydig a quantidade de retículo endoplasmático liso diminui (Fig.22D), assim como a resposta aos métodos de detecção da enzima, apresentando uma coloração menos intensa, sugerindo uma queda na conversão de colesterol em esteróides (Fig.22C). Além das reações demonstrarem menor atividade das células de Leydig nestas fases, alguns grupos respondem positivamente enquanto outros não mostram marcação alguma. Na fase de regressão as células de Leydig apresentam mitocôndrias lesionadas e aspecto geral de reabsorção celular (Fig.22F). No que diz respeito à atividade

enzimática da 3β HSD, não houveram respostas positivas da técnica onde se observa atividade enzimática nem da imuno-localização da mesma (Fig.22E).

6.2.5. Índice gonadossomático

Os dados de índice gonadossomático revelam que o aumento do índice está diretamente relacionado com a progressão da espermatogênese, assim quanto mais avançada é a fase reprodutiva maior o índice (Fig.23). As fases regredidas e maturação inicial possuem, ambas, os menores valores do índice gonadossomático ($0.04\pm 0.003\%$) (Fig.23). Nos indivíduos em maturação intermediária observamos valores crescentes do índice ($0.07\pm 0.008\%$), sendo que o maior valor ocorre na maturação final ($0.10\pm 0.005\%$). Após esta fase os valores declinam na fase de regressão ($0.07\pm 0.012\%$) (Fig.23). Distribuindo-se os valores dos índices gonadossomáticos por meses de coleta tem-se menores valores de índice gonadossomático ocorrendo nos meses de setembro/06 ($0.05\pm 0.009\%$), maio/07 ($0.05\pm 0.004\%$), junho/07 ($0.03\pm 0.003\%$), agosto/07 ($0.04\pm 0.006\%$), outubro/07 ($0.04\pm 0.006\%$) e novembro ($0.05\pm 0.005\%$) (Fig.24). Neste meses de coleta predominaram testículos em fase de regressão, regredida e maturação inicial (Fig.25). Nos meses onde há o predomínio das fases de maturação final também há os maiores valores de índice gonadossomático, que ocorreram nos meses de dezembro/06 ($0.12\pm 0.01\%$), janeiro/07 ($0.11\pm 0.01\%$), dezembro/07 ($0.11\pm 0.01\%$) e fevereiro/08 ($0.15\pm 0.02\%$).

6.2.6. Esteróides plasmáticos

As dosagens dos esteróides plasmáticos de machos de *Gymnotus* sp. revelaram que o estradiol, a testosterona e a 11 cetotestosterona comportaram-se de forma diferente. Os níveis de estradiol permaneceram praticamente constantes durante todo o ciclo reprodutivo, e os valores flutuaram de 118.25 pg/ml até 149,97 pg/ml (Fig.26). A maior tendência à queda foi observada durante a fase de maturação final (118.25 pg/ml). Observando o comportamento da 11-cetotestosterona percebe-se que no início do ciclo (133.67 pg/ml) a concentração do andrógeno tem tendência a elevação, seguido de queda gradual nas fases de maturação inicial (85.87 pg/ml) e maturação intermediária (60.70 pg/ml) (Fig.27).

Na fase seguinte, de maturação final, há uma nova tendência à elevação da concentração (109.31 pg/ml), sendo que alguns animais constituintes desta fase não puderam ter suas concentrações de 11-cetotestosterona mensurados, devido a alta quantidade do andrógeno no plasma. Na fase seguinte, na regressão testicular, as concentrações do andrógeno apresentam tendência a queda em relação a fase anterior (53.85 pg/ml) (Fig.27). Já os níveis de testosterona foram bastante variáveis, com o menor valor ocorrendo nas fases regredidas (26.91 pg/ml), maturação final (62.45 pg/ml) e regressão (41.55 pg/ml) (Fig.28). Nas fases de maturação inicial (178.76 pg/ml) e maturação intermediária (104.40 pg/ml) foram observadas as maiores concentrações de testosterona plasmática (Fig.28). Comparando-se os valores das concentrações do andrógeno entre as fases reprodutivas, temos o maior valor ocorrendo na fase de maturação inicial, com tendência gradual a queda em todas as outras até a fase regredida.

Figura 1 – As gônadas

A e B: Secção ventral da cavidade celomática de *Gymnotus* sp. com exposição das gônadas. **A:** Fêmea e **B:** Macho. **C:** Ovários de *Gymnotus* sp. retirados da cavidade celomática, evidenciando os ovários direito (OD) e esquerdo (OE) e o ducto (D). **D:** Testículos retirados da cavidade celomática, mostrando ambos os testículos (T) e os longos ductos (D). **E:** Corte histológico transversal do ovário mostrando a túnica albugínea (TA), as lamelas ovígeras (L), e a luz ovariana (LO). **F:** Corte histológico longitudinal do testículo mostrando secções dos túbulos seminíferos (TS), que se anastomosam com maior frequência na região periférica (RP). **v:** Vaso sanguíneo. **E e F:** Coloração PAS+Hematoxilina Férrica+Metanil Yellow.

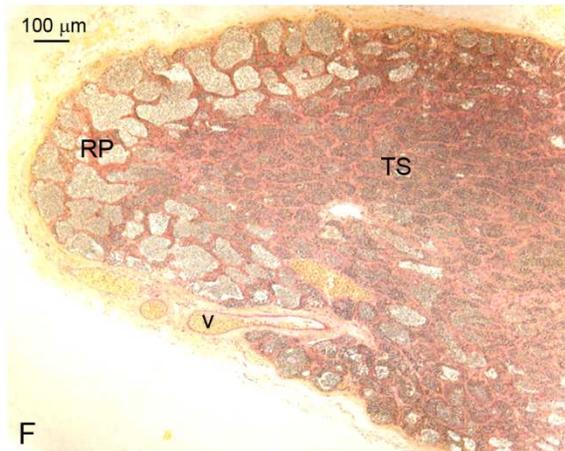
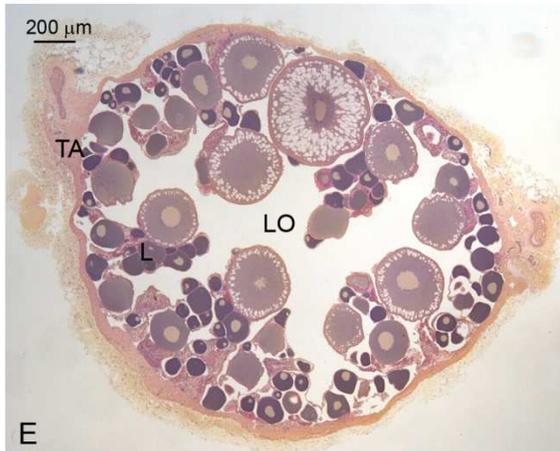
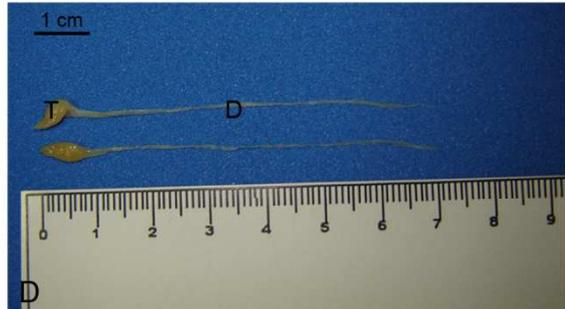
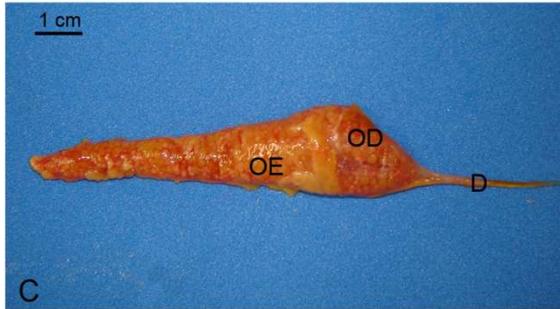
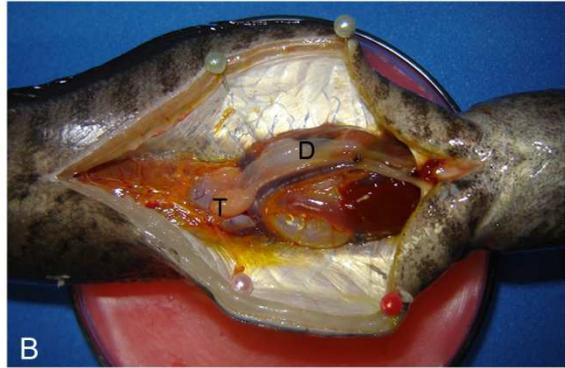
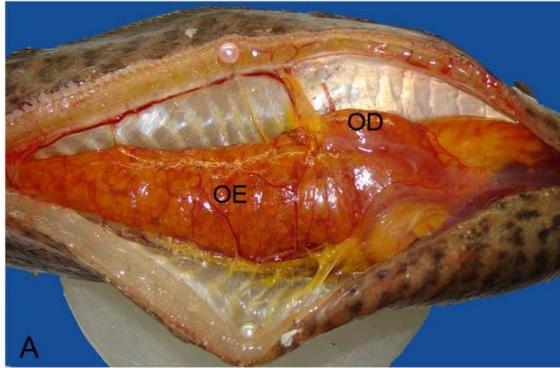


Figura 2 – Folliculogênese

A: Epitélio da lamela ovígera contendo uma oogônia (g) e células epiteliais pavimentosas. Na região abaixo do epitélio observa-se um oócito pré-vitelogênico (o). **B e C:** Após divisões mitóticas, as oogônias (g) formam grupos acompanhados perifericamente por células pré-foliculares (seta). **D:** As oogônias (g) iniciam a divisão meiótica e originam grupos de oócitos (o). **E e F:** Aos poucos os oócitos (o) começam a ser envolvidos separadamente por células foliculares (cabeça de seta), a ao mesmo tempo tem-se o início do crescimento primário. **A-F:** Coloração PAS+Hematoxilina Férrica+Metanil Yellow.

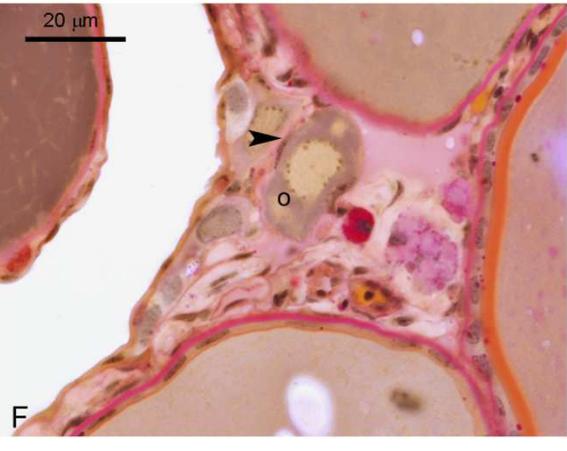
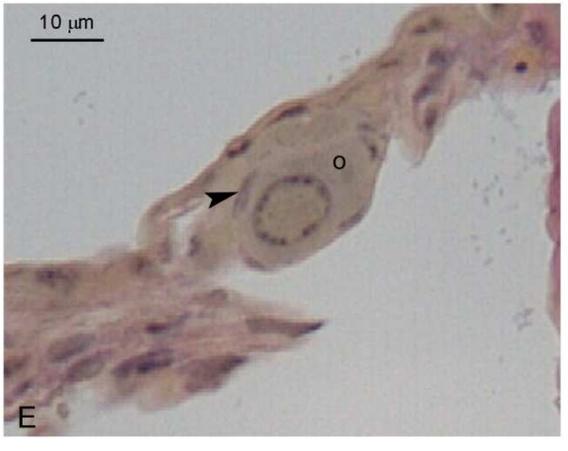
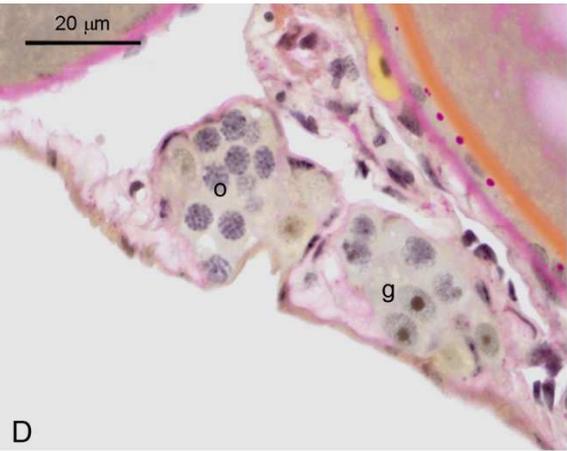
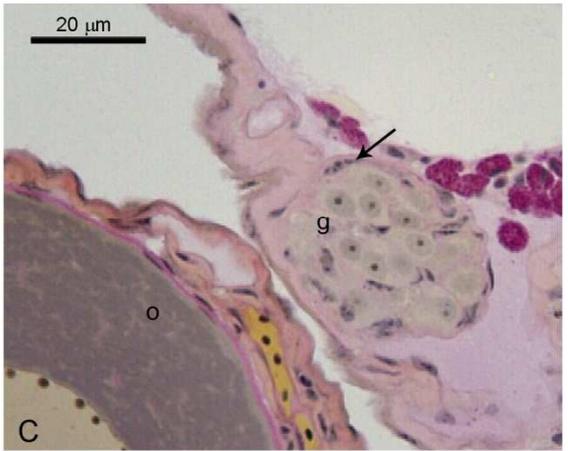
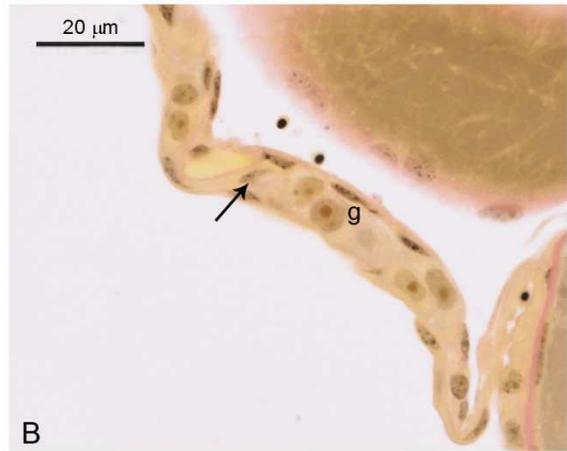
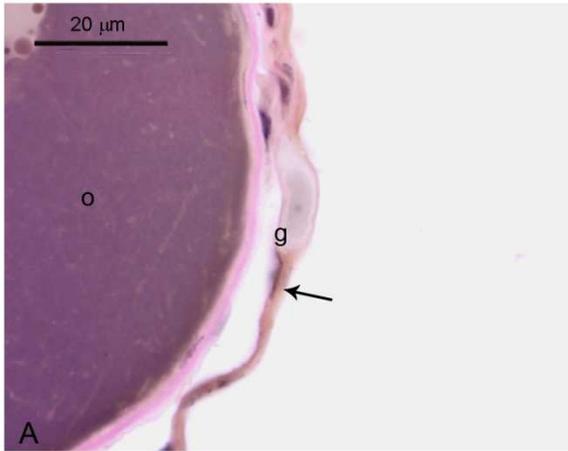


Figura 3 – Desenvolvimento Folicular

A: Oócitos (o) em diferentes estágios de crescimento primário com citoplasma contendo ranhuras. Oogônia (g), núcleo (n). **B:** Oócitos em crescimento primário, com citoplasma com regiões menos coradas, indicando o início da formação dos alvéolos corticais (a). **Detalhe:** célula micropilar (estrela), células foliculares (f), zona pelúcida (zp) e membrana basal (seta). **C e D:** Oócito em crescimento secundário em diferentes estágios da vitelogênese. Núcleo (n), grânulos de vitelo (v), alvéolos corticais (a), zona pelúcida (zp). **E:** Oócito maduro com o núcleo (n) totalmente excêntrico, deposição total de vitelo (v), alvéolos corticais (a) periféricos e zona pelúcida (zp) bem desenvolvida. **Detalhe:** alvéolos corticais (a) metacromáticos ao Azul de Toluidina. Núcleo (n), grânulos de vitelo (v), zona pelúcida (zp). **F:** Oócito coletado no ducto mostrando a fusão parcial dos grânulos de vitelo (v). **A a F:** Coloração PAS+Hematoxilina Férrica+Metanil Yellow. **E-Detalhe:** Azul de Toluidina.

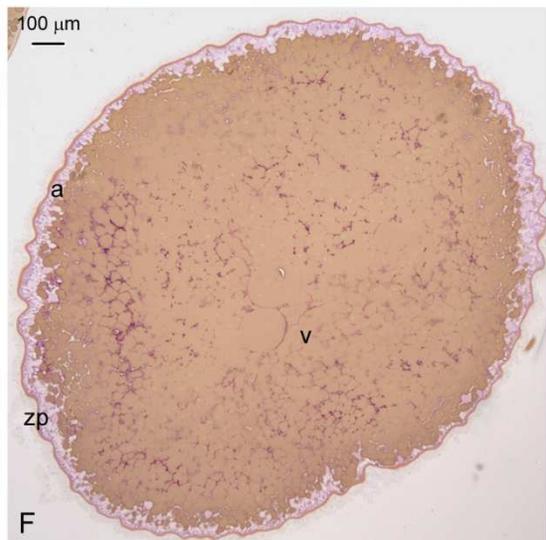
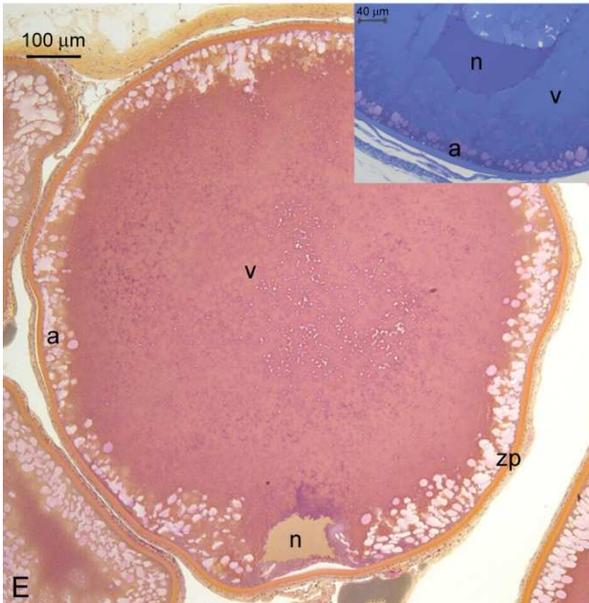
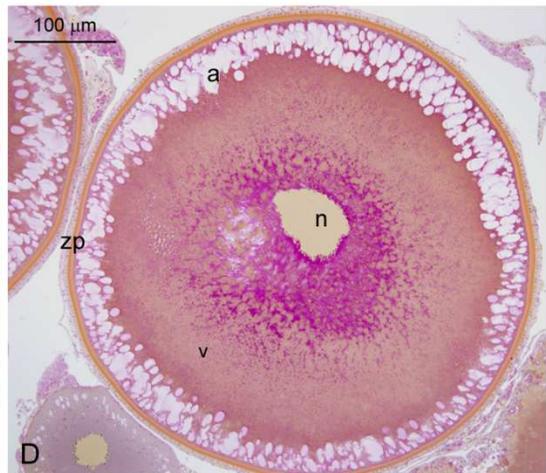
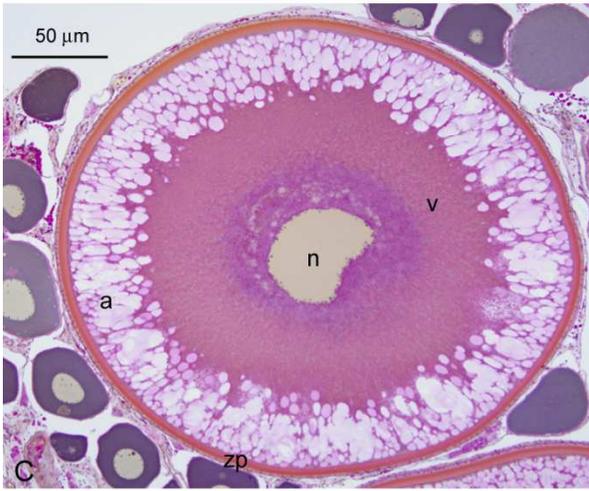
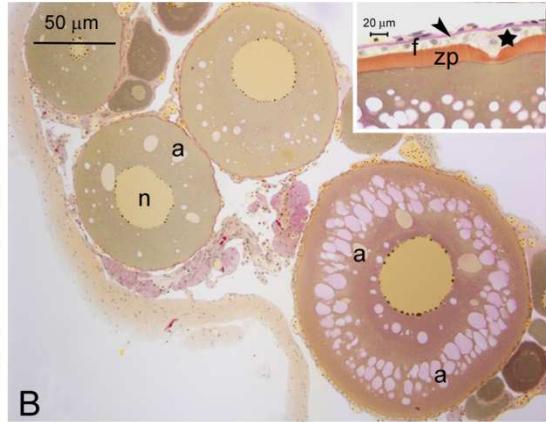
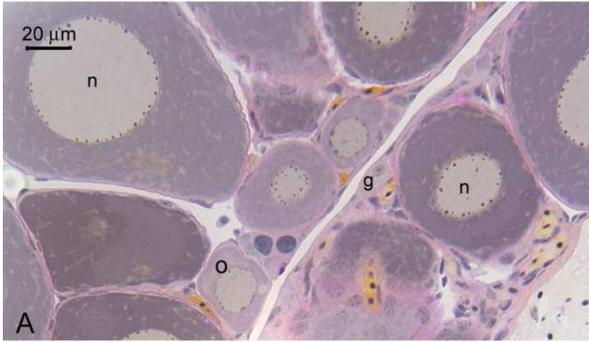


Figura 4 – Microscopia Eletrônica de Transmissão

A - E: Secções de folículos em vários estágios de desenvolvimento. Inicialmente pode se observar a interação entre oócito (o) e célula folicular (f) na região onde a zona pelúcida será depositada (zp). A deposição de membrana basal (b) é feita em camadas, sendo que em folículos mais iniciais esta apresenta um menor número de camadas. Com o desenvolvimento do folículo surgem especializações de membrana e deposição de material eletrondenso entre o oócito e a célula folicular, constituindo a zona pelúcida (zp). Ao mesmo tempo a membrana basal espessa-se devido ao aumento no número de camadas. **F:** Célula esteroidogênica (e) localizada na camada de células de teca. As mitocôndrias (m) são arredondadas e possuem muitas cristas, morfologia típica deste tipo celular.

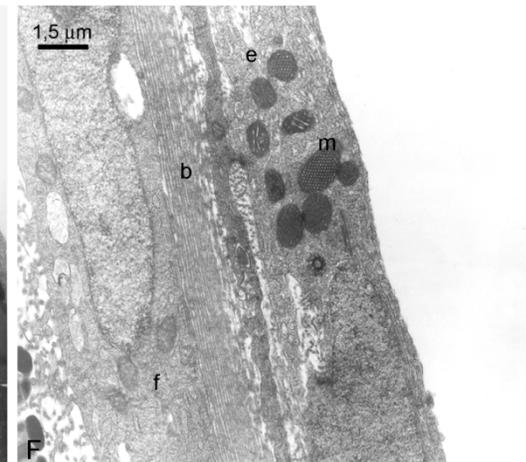
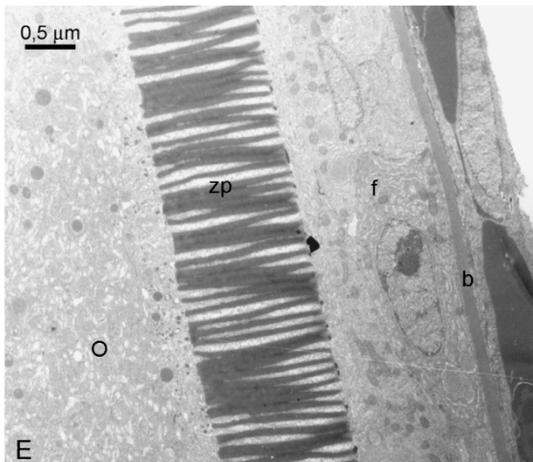
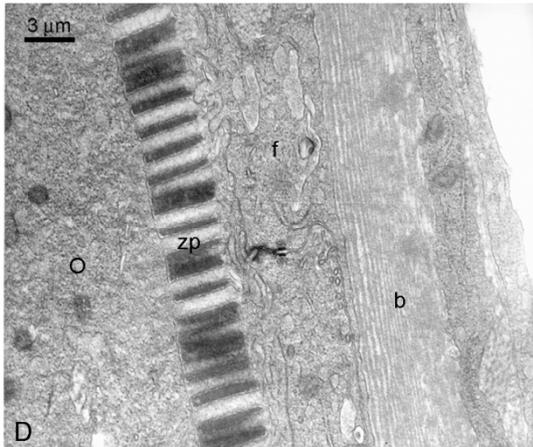
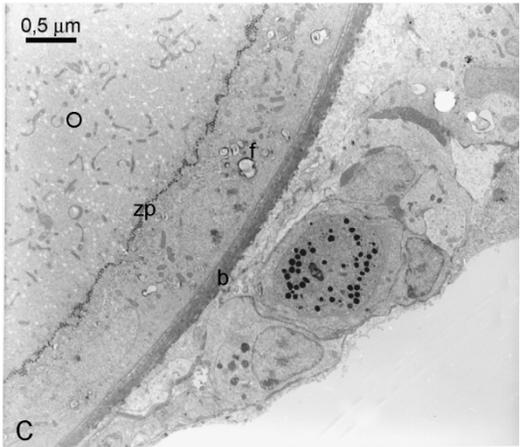
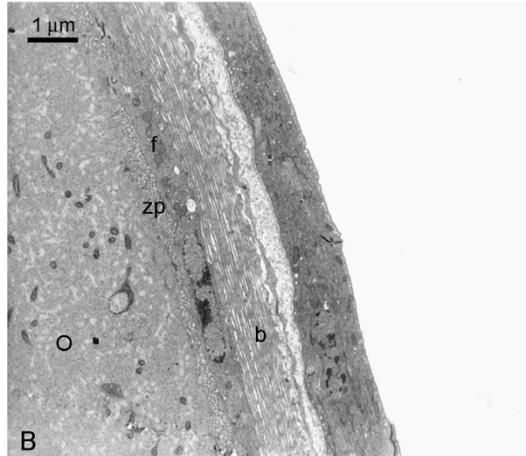
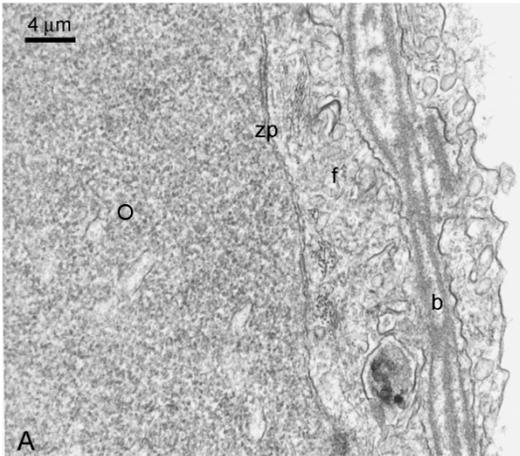


Figura 5 – Ciclo reprodutivo em fêmeas

A: No início da fase regredida o estroma da lamela apresenta-se desenvolvido, repleto de macrófagos (m). **B:** Fase regredida contendo em sua maioria oócitos pré-vitelogênicos (op). **C:** Fase de desenvolvimento ovariano, pode se observar a grande quantidade de oócitos em fase de alvéolo cortical (oi) e vitelogênicos (ov). **D:** Fase de oócitos aptos à desova, com a maioria dos oócitos em maturação ou maduros (om), contendo também oócitos vitelogênicos (ov) e em crescimento primário (op). **E:** Ovário em desova ativa, com a presença de complexos pós-ovulatório (poc), oócitos vitelogênicos (ov), oócitos em final (oi) e início (op) de crescimento primário. **F:** Na fase de regressão as lamelas possuem oócitos atresícos (oa) e células relacionadas com a reabsorção celular (m). **A a F:** Coloração PAS+Hematoxilina Férrica+Metanil Yellow.

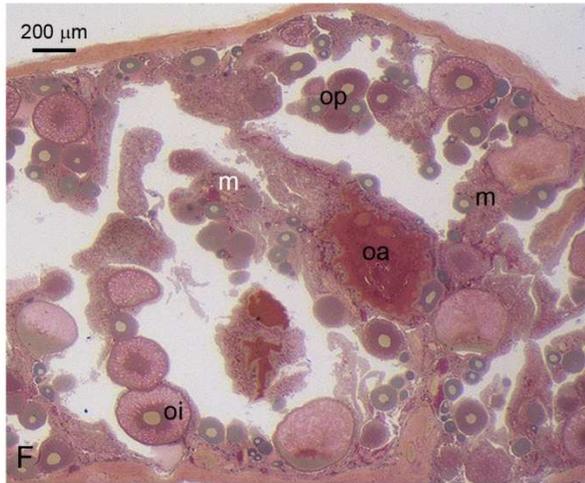
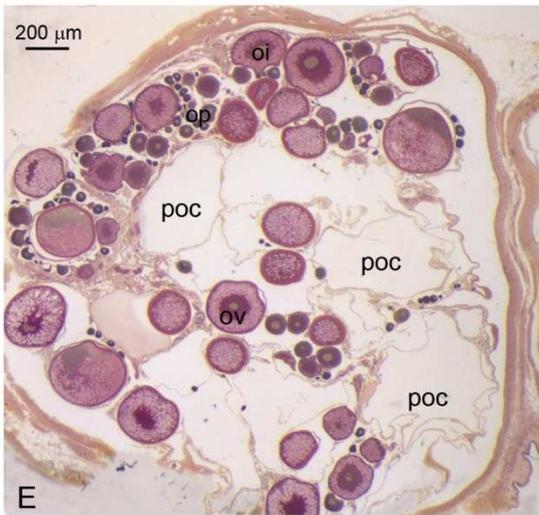
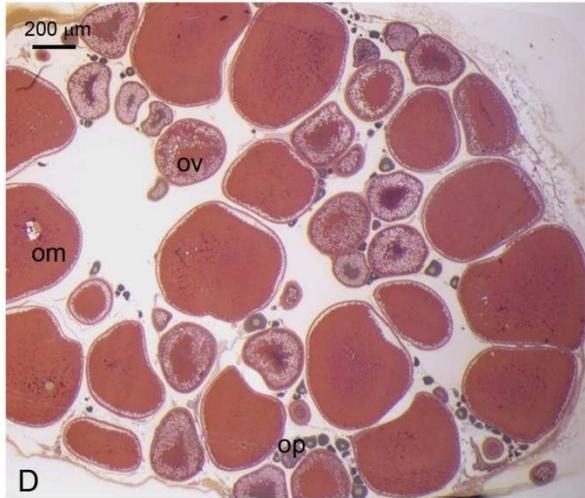
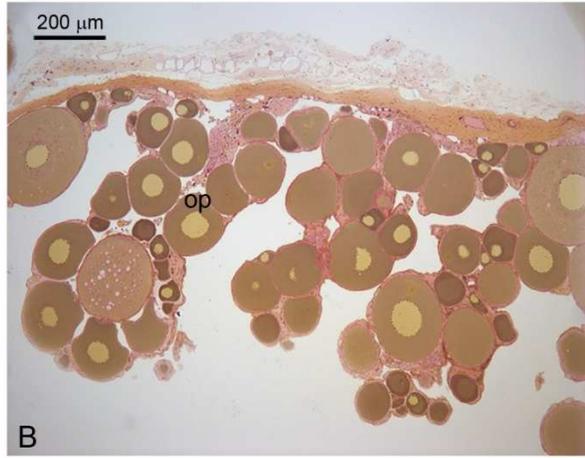
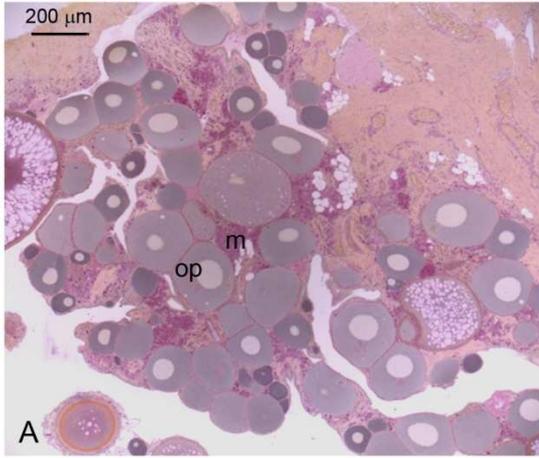


Figura 6 – Atresia Folicular

A: No início da atresia folicular ocorre hipertrofia das células foliculares (f), **B:** seguida da liquefação do vitelo, rompimento da zona pelúcida (zp). **C:** Em etapas seguintes células do sistema imune, como macrófagos (m) e granulócitos (gr), chegam ao oócito em atresia (oa). **D:** O potencial fagocítico de células como macrófagos (m) e células foliculares (f) é evidenciado pela reação de fosfatase ácida. **E:** Ao final da atresia, os restos da atresia folicular (oa) formam estruturas que dobram-se sobre si mesmas, e ainda é possível observar a presença de granulócitos (gr). **F:** No estroma da lamela são observados grupos de granulócitos (gr) e macrófagos (m), estes últimos contendo pigmento castanho (seta), resultado da digestão celular. **A-C, E e F:** Coloração PAS+Hematoxilina Férrica+Metanil Yellow. **D:** Reação de fosfatase ácida.

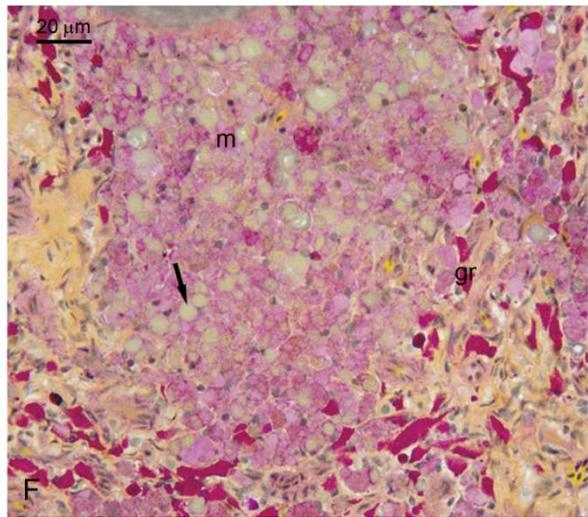
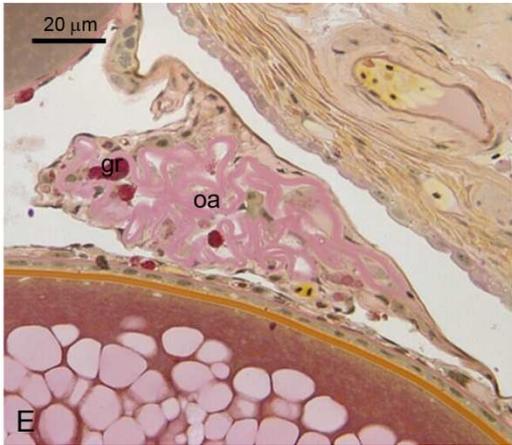
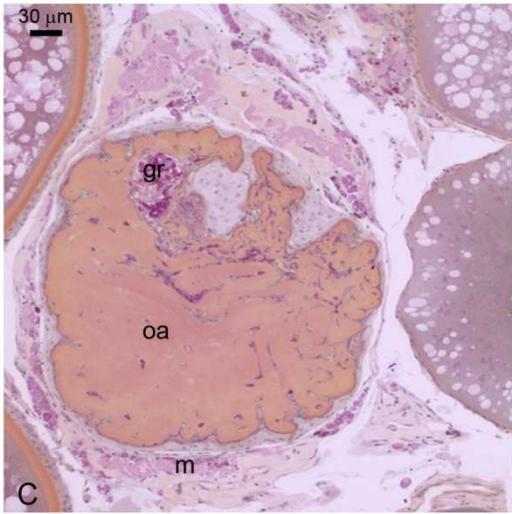
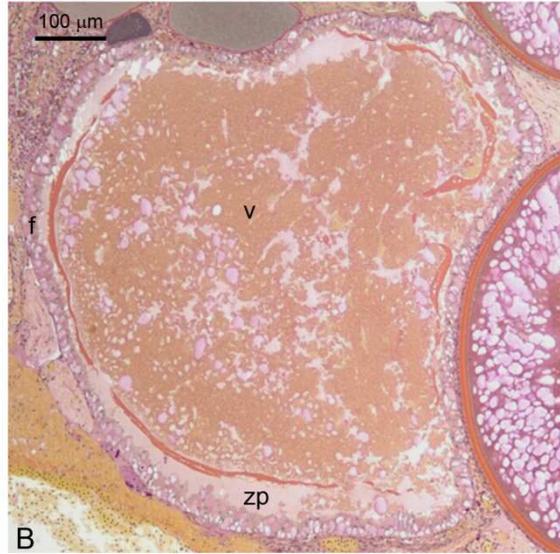
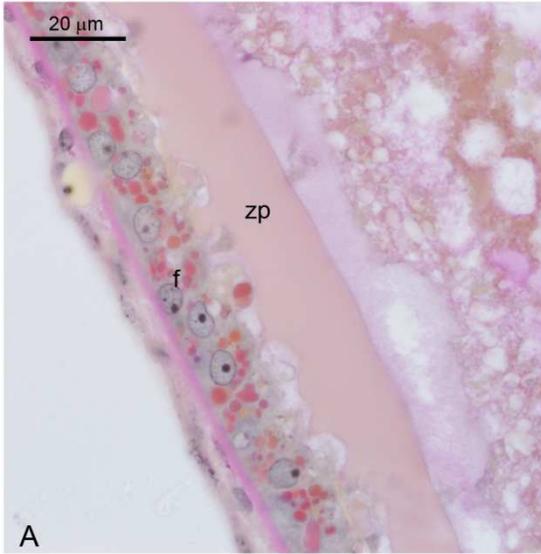
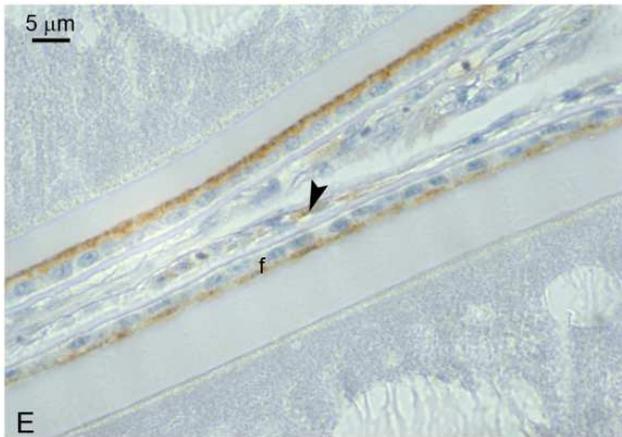
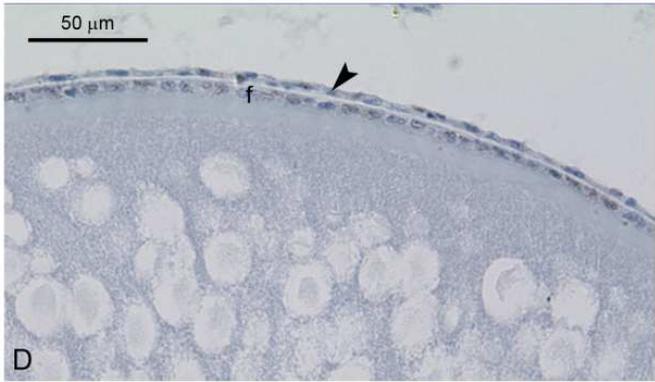
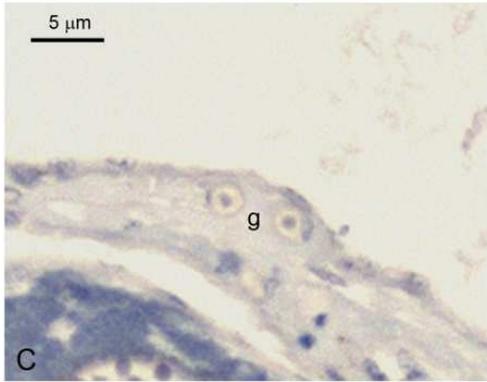
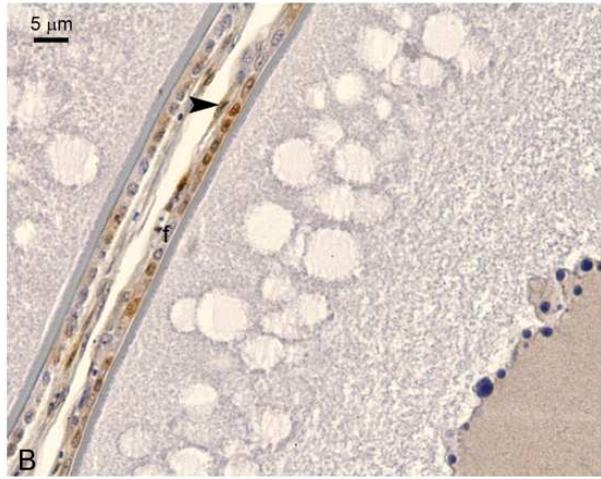
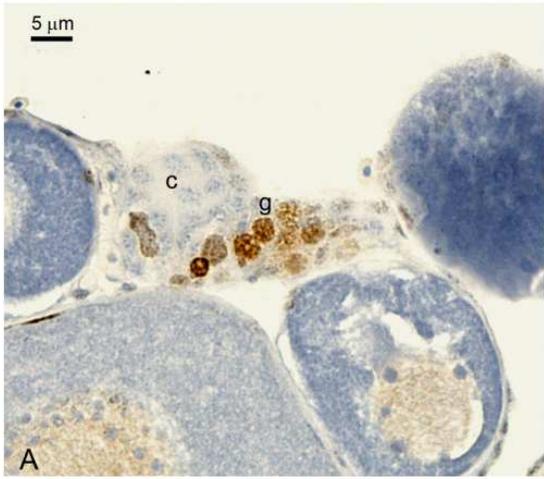


Figura 7 – Detecção de proliferação celular e da enzima 3 β HSD

A e B: Detecção de proliferação celular pela técnica de PCNA, mostrando marcação em oogônias (g), células foliculares (f) e células da teca (cabeça de seta). Oócitos (c). **C e D:** Fase de regressão ovariana com, praticamente, ausência de proliferação celular. **E:** Detecção da enzima 3 β HSD por imunocitoquímica, notar a marcação das células foliculares (f) e teca (cabeça de seta). **F:** Atividade da enzima 3 β HSD, com resultados positivos em células foliculares (f) e teca (cabeça de seta).



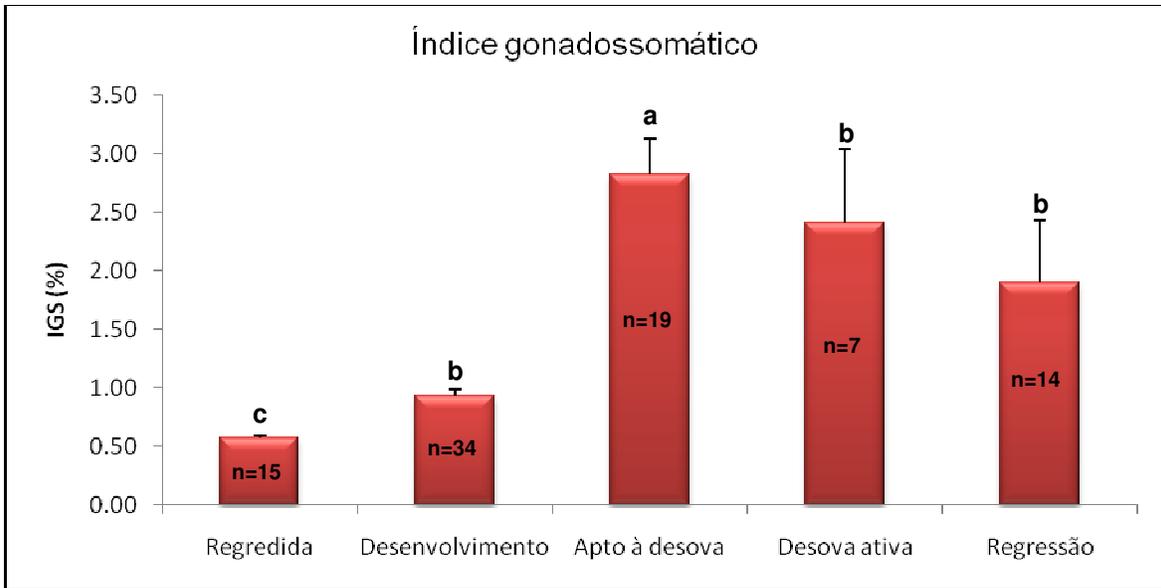


Figura 8 - Índice gonadossomático (média e erro padrão) das fêmeas por fase reprodutiva. Letras diferentes significam diferenças estatísticas $p < 0,05$.

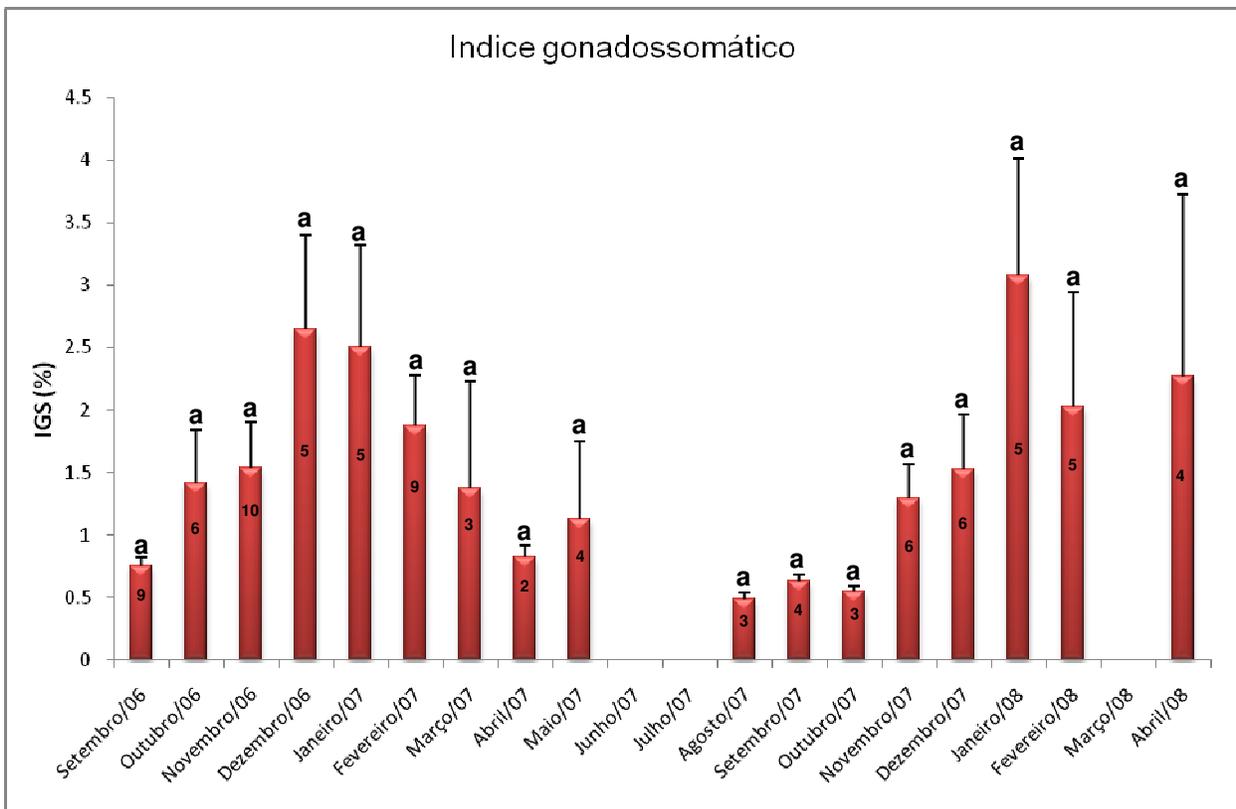


Figura 9 - Índice gonadossomático (médias e erro padrão) das fêmeas por mês de coleta. Letras diferentes significam diferenças estatísticas $p < 0,05$.

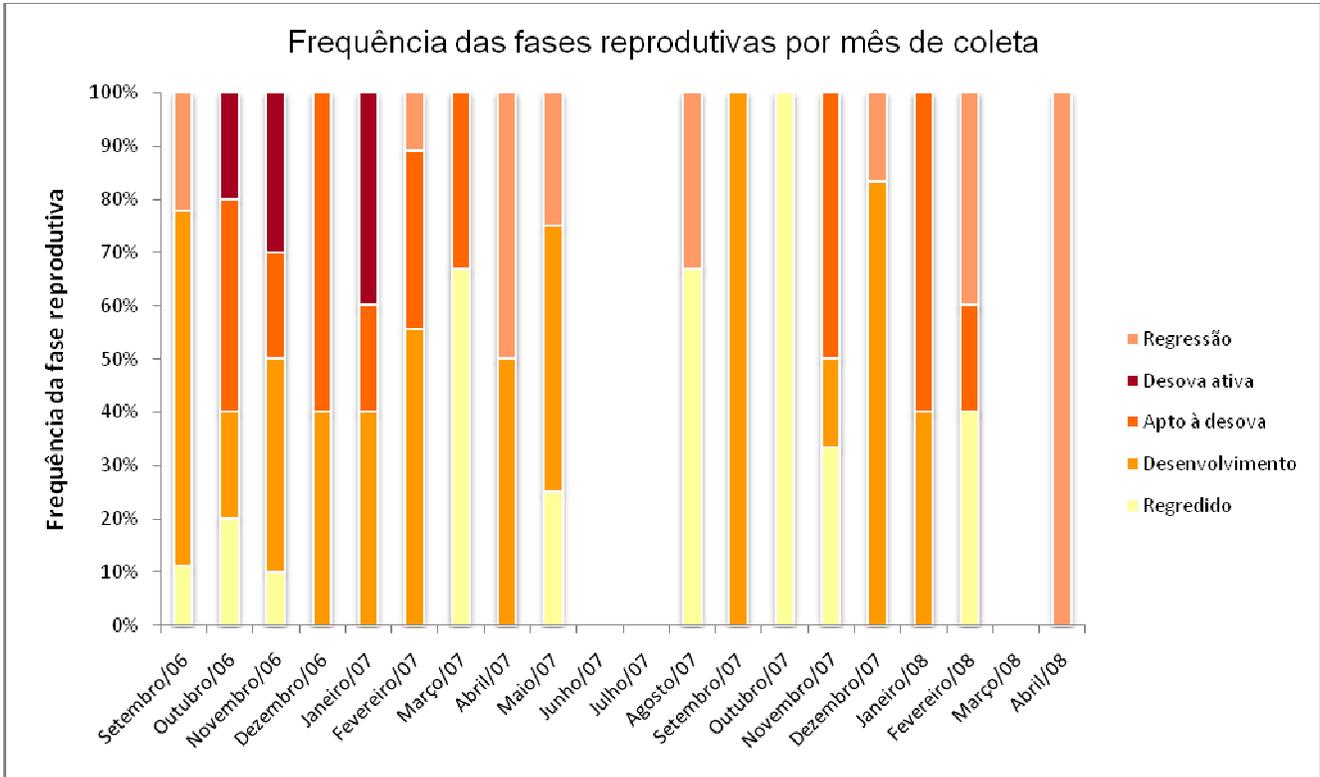


Figura 10 – Frequência das fases reprodutivas das fêmeas por mês de coleta realizada.

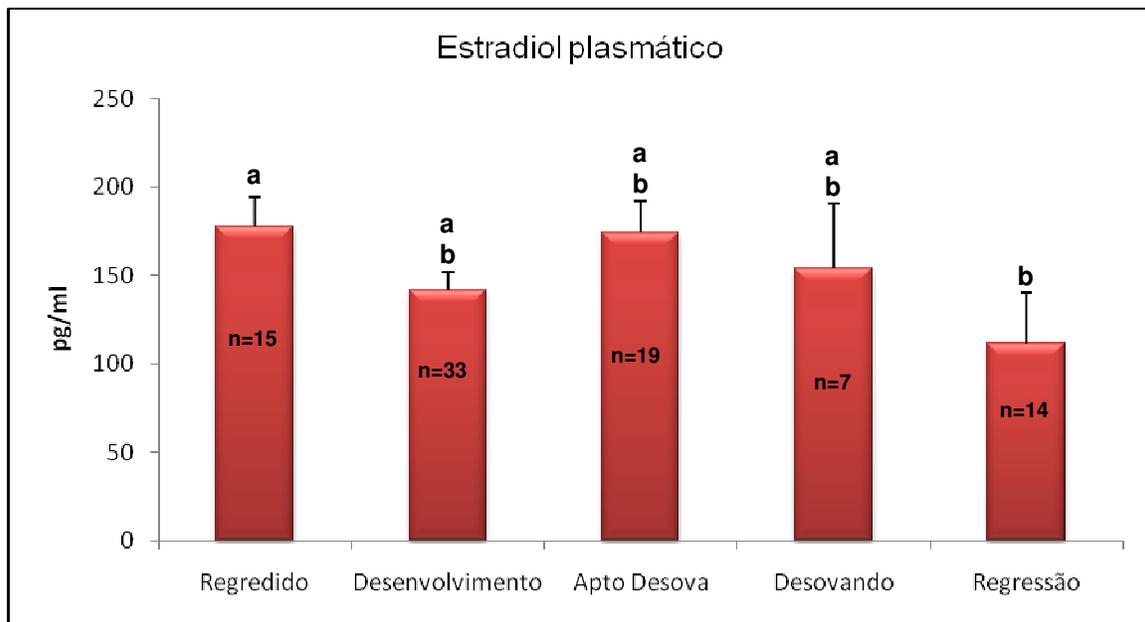


Figura 11 - Concentração de estradiol plasmático (média e erro padrão) das fêmeas por fase reprodutiva. Letras diferentes significam diferenças estatísticas $p < 0,05$.

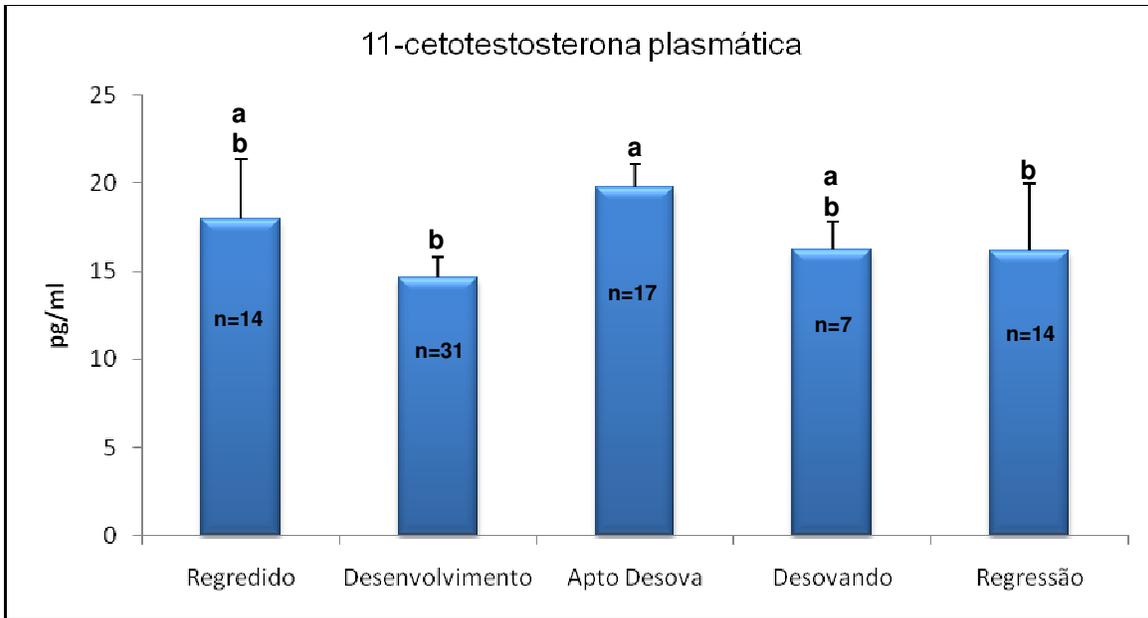


Figura 12 - Concentração de 11-cetotestosterona plasmática (média e erro padrão) das fêmeas por fase reprodutiva. Letras diferentes significam diferenças estatísticas $p < 0,05$.

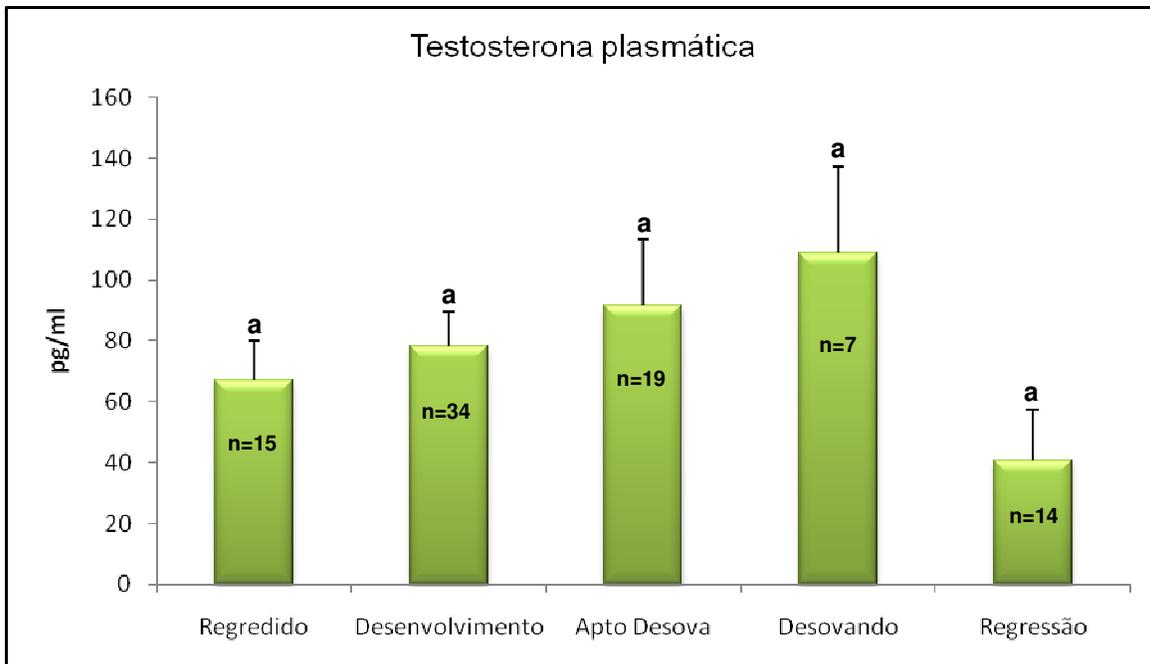


Figura 13 – Concentração de testosterona plasmática (média e erro padrão) das fêmeas por fase reprodutiva. Letras diferentes significam diferenças estatísticas $p < 0,05$.

Figura 14 – Ciclo reprodutivo em machos - Fase Regredida

A: Aspecto geral do testículo com diferenciação das duas regiões, cortical (rc) e medular (rm). **B e C:** Na transição entre regressão e regredido, o testículo ainda possui muitos espermatozóides residuais (z), macrófagos (m) e granulócitos (gr). Há algumas espermatogônias (g), mas a quantidade destas não é suficiente, nesta etapa, para tornar o epitélio contínuo. **D:** Em uma etapa seguinte as espermatogônias (g) tornam-se mais numerosas e o epitélio fica contínuo. Mas ainda é possível visualizar aglomerados de macrófagos (m) e poucos granulócitos (gr). **E:** A região medular do testículo com características típicas da fase regredida, grande número de espermatogônias (g), luz tubular reduzida, às vezes com alguns espermatozóides residuais (z). **F:** A região cortical da classe regredida possui espermatogônias e predomínio de epitélio contínuo, porém nesta região a diminuição da luz tubular (t) é menor, contendo também espermatozóides residuais (z). **B-D:** Coloração PAS+Hematoxilina Férrica+Metanil Yellow. **A, E, F:** Coloração Azul de Toluidina.

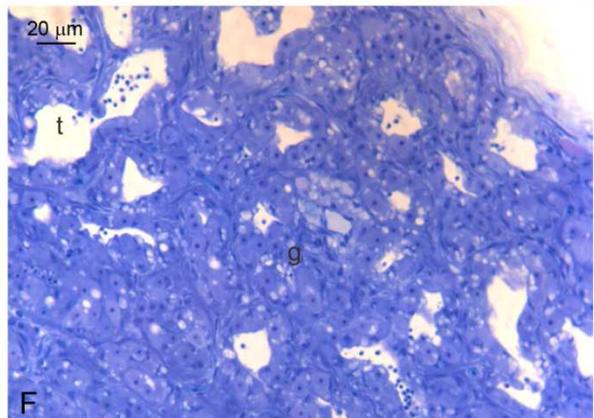
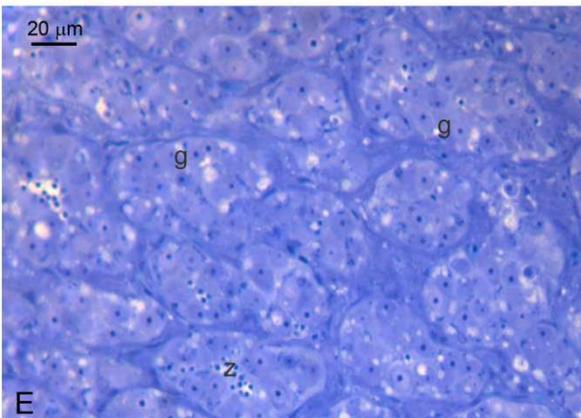
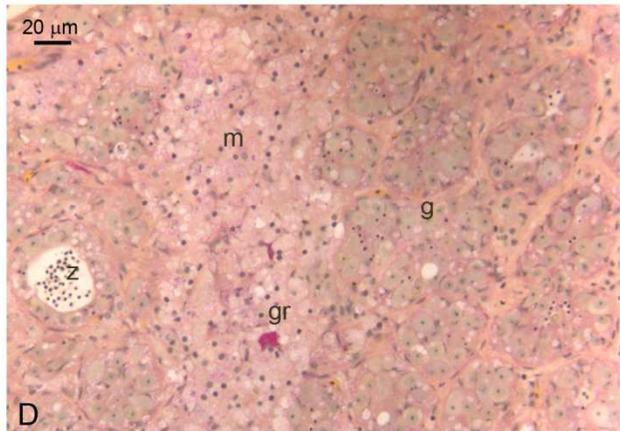
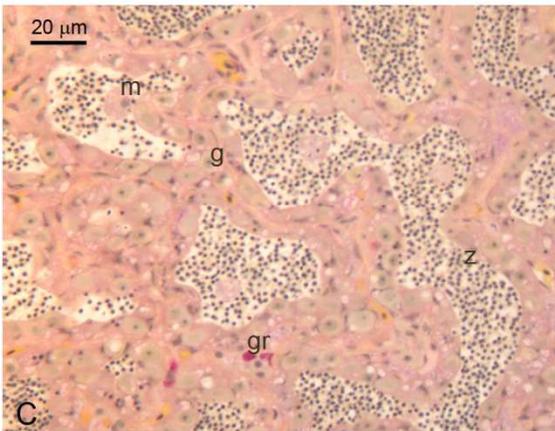
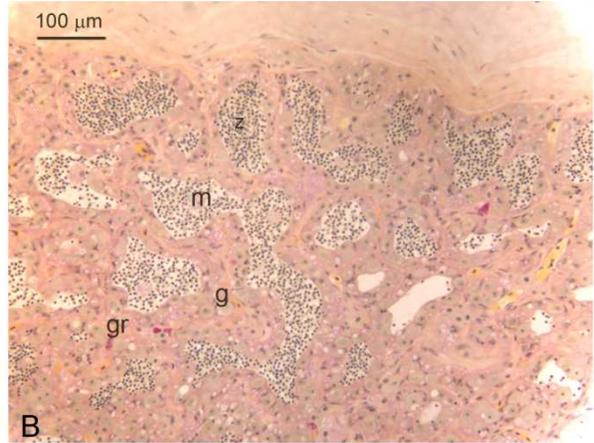
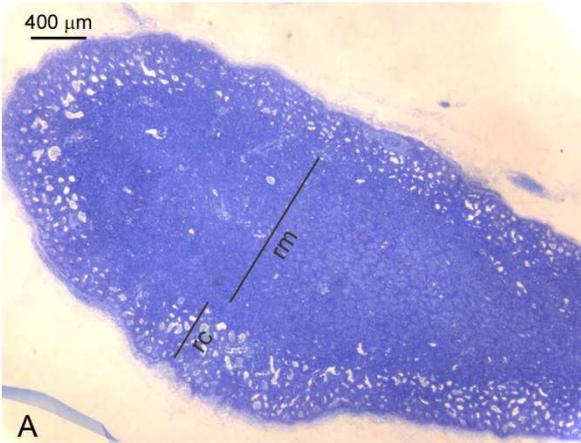


Figura 15 – Fase de Maturação Inicial

A e B: No início da classe de maturação inicial há predominância de cistos de espermatogônias (g), e poucos cistos de espermatócitos (c). Na região periférica (rc) os túbulos possuem luz (t) mais dilatada que a região central (rm). No interstício há vasos sanguíneos (v) e células de Leydig (l). **C e D:** As espermatogônias (g) proliferam (estrela) originando outras e diferenciam-se, aumentando assim o número de cistos de espermatócitos (c). Na região cortical a luz tubular (t) diminui gradativamente devido ao aumento de cistos, no entanto permanece mais dilatada se comparada à região medular (rm). **E e F:** A grande proliferação de espermatogônias (g) promove uma pseudoestratificação do epitélio germinativo. Os cistos contendo espermatócitos (c) encontram-se mais apicais no epitélio, e praticamente obliteram a luz do túbulo seminífero. Algumas divisões celulares podem ser visualizadas (estrela). No interstício há grupos de células de Leydig (l). **A-F:** Coloração PAS+Hematoxilina Férrica+Metanil Yellow.

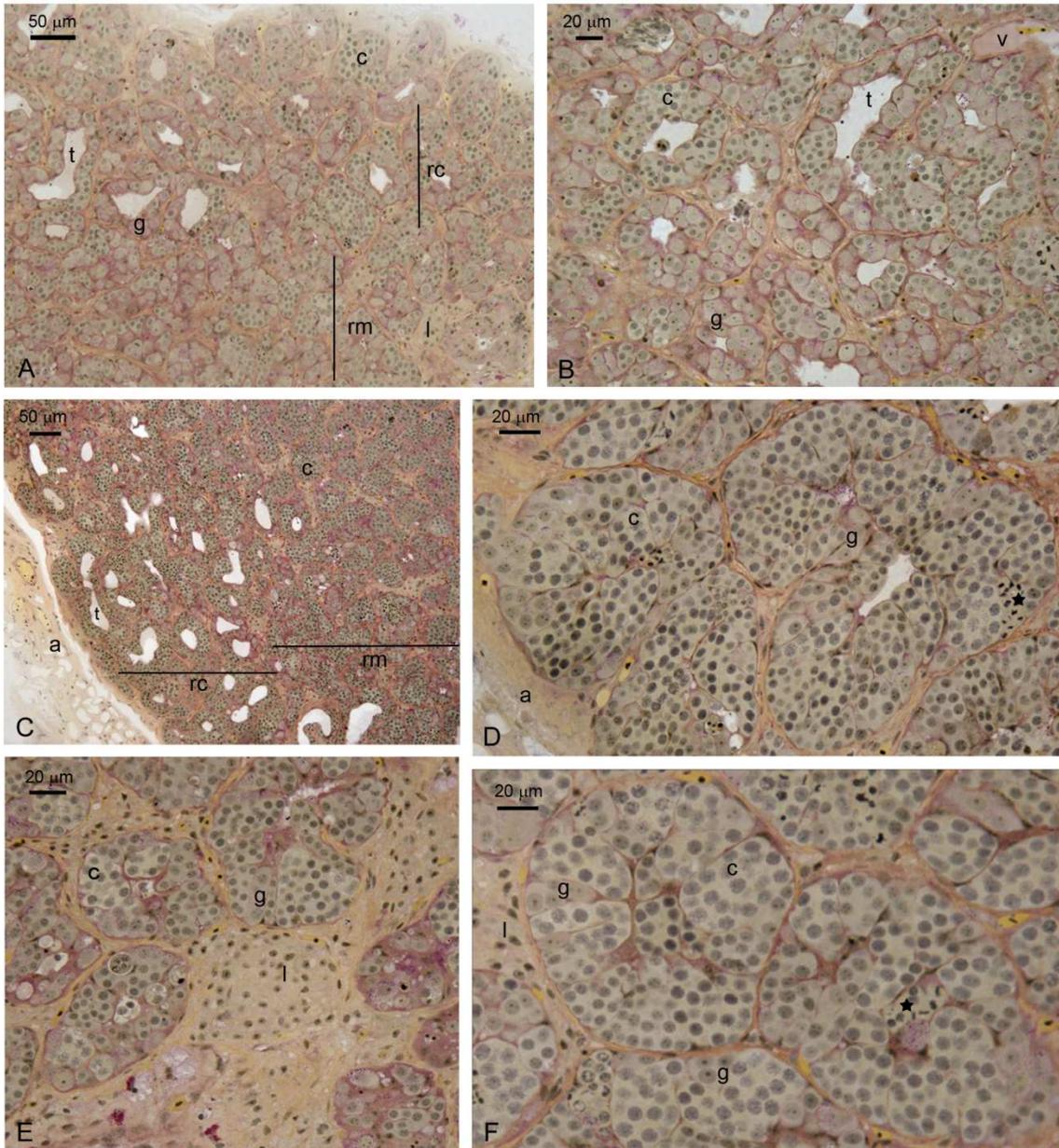


Figura 16 – Fase de Maturação Intermediária

A e B: Aspecto geral do testículo em maturação intermediária. Nesta fase há maior presença de cistos de espermatócitos (c) e espermatozóides (z) na luz. **C – F:** Apesar da intensa atividade espermática do testículo, o epitélio germinativo permanece contínuo. Isto se deve ao fato de que enquanto cistos de espermatócitos (c), localizados mais apicais no epitélio, progridem (estrela) para espermatíde (d), e estes para espermatozóides (z); os cistos de espermatogônias (g), localizados basalmente, impedem que o epitélio se descontinue. A estratificação do epitélio germinativo ocorrida na classe anterior favorece, mesmo como o início da produção de espermatozóides, a permanência do epitélio germinativo contínuo. Nesta classe as células de Leydig são melhores visualizadas em regiões corticais, próximas à túnica albugínea (a), juntamente com alguns vasos sanguíneos (v). **A-F:** Coloração PAS+Hematoxilina Férrica+Metanil Yellow.

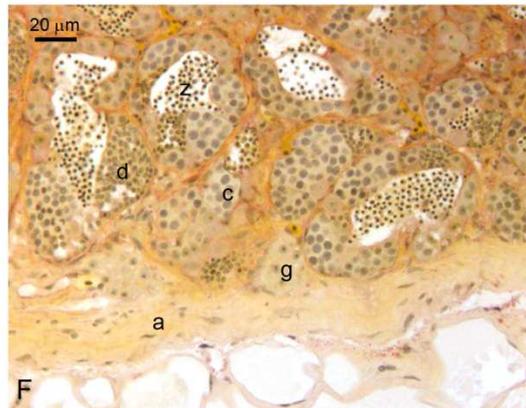
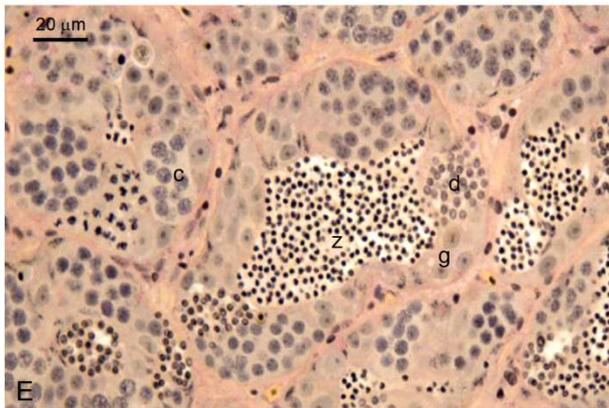
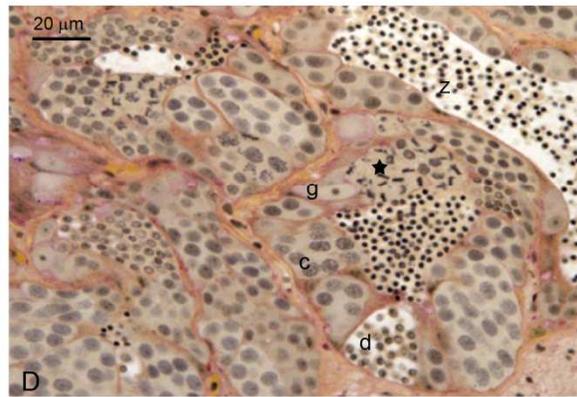
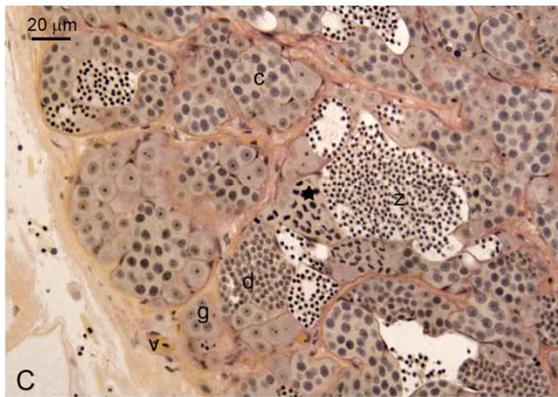
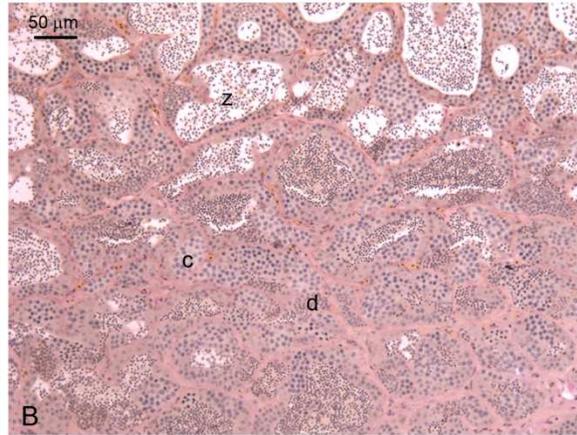
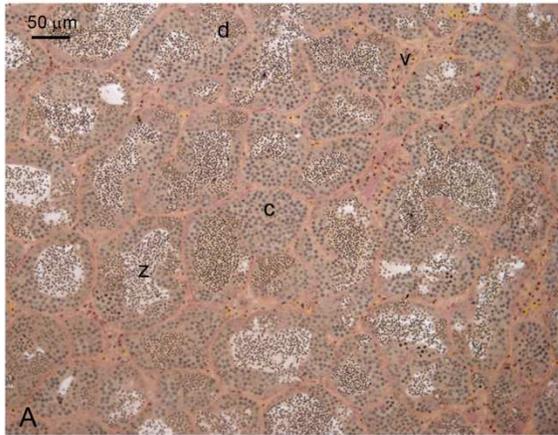


Figura 17 – Fase de Maturação Final

A: No testículo em maturação final fica evidente que a diferença entre as duas regiões do testículo, região cortical (rc) e medular (rm), é uma questão de área de luz tubular devido à maior anastomose entre os túbulos na periferia. **B:** Na porção terminal do testículo os túbulos anastomosados se unem, formando grandes gonoductos (gd), e entre estes podem ser visualizados vasos sanguíneos (v). **C:** Em detalhe é possível visualizar o epitélio dos gonoductos, onde há raros cistos de espermatogônias (g). Há muitos espermatozóides (z) na luz. As células de Leydig (l) encontram-se no interstício e no tecido conjuntivo próximo a cápsula. **D-F:** Em decorrência da alta produção de espermatozóides (z) e não reposição das espermatogônias (g), nesta etapa, o epitélio torna-se descontínuo (seta). Nesta classe ainda há cistos de espermatócitos (c) e espermátides (d). No interstício há aglomerados de células de Leydig e vasos sanguíneos (v), e já é possível encontrar macrófagos (m) e granulócitos (gr). Ao final da classe de maturação final, os granulócitos (gr) aparecem em maior quantidade na túnica albugínea (a). **A-F:** Coloração PAS+Hematoxilina Férrica+Metanil Yellow.

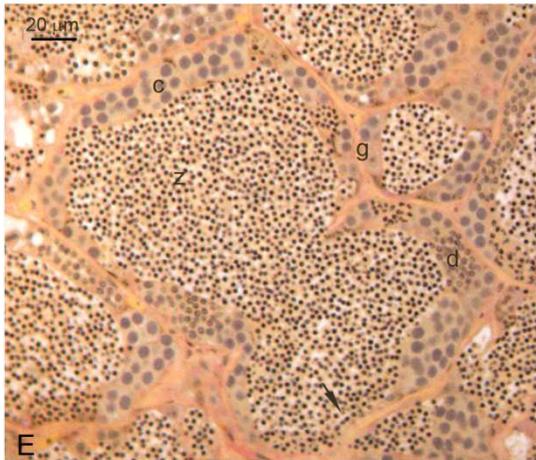
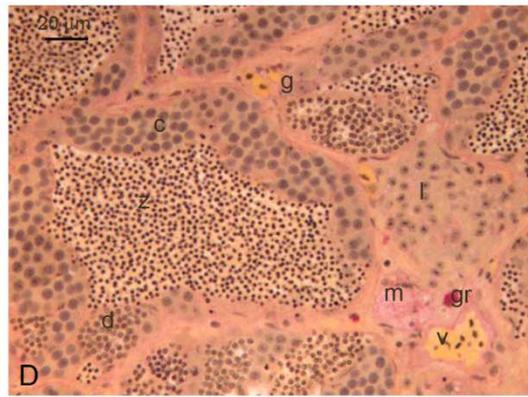
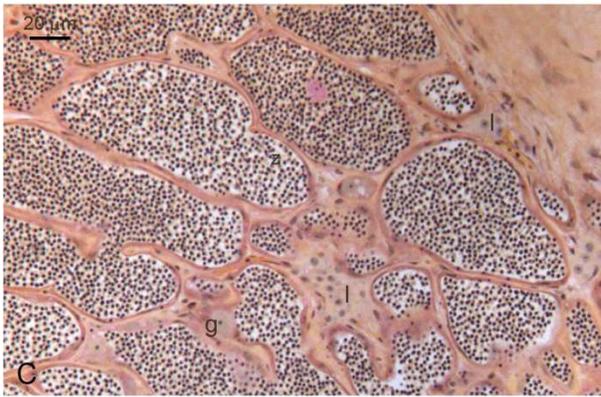
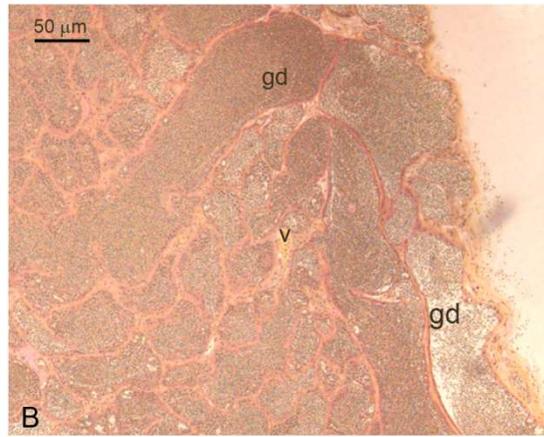
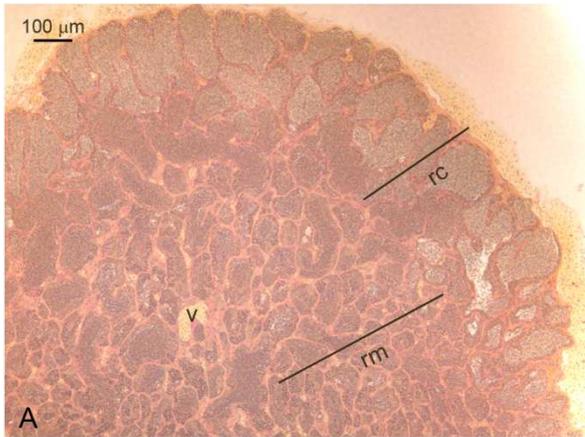


Figura 18 – Fase de regressão

A: No início da regressão, o testículo pode conter cistos de espermatogônias (g), espermatócitos (c) e espermatídes (d). Na luz tubular pode haver grande quantidade de espermatozóides (z). O interstício fica ocupado com grandes aglomerados de macrófagos (m), os quais auxiliarão na regressão testicular. **B:** Em etapas seguintes os macrófagos (m) atingem a luz dos túbulos seminíferos. As espermatogônias (g) permanecem no epitélio germinativo. **C:** Na região de gonoducto é possível visualizar as células epiteliais (cd) fagocitando (seta) espermatozóides (z). **D:** Através da reação enzimática para Fosfatase ácida comprova-se a presença de enzimas digestivas nas células epiteliais dos ductos. **E:** É frequente a presença de células germinativas com vacúolos (cv) nesta classe. Grupos de macrófagos (m) também ocupam regiões adjacentes à túnica albugínea (a). **F:** Ao final da regressão, há espermatogônias (g) no epitélio germinativo, no entanto a quantidade destes cistos ainda não é suficiente para tornar o epitélio contínuo. Há espermatozóides residuais (z) na luz do túbulo. Além de granulócitos (gr), no interstício encontram-se melanomacrófagos (ml), indicando que a classe de regressão está em seu término. **A-F:** Coloração PAS+Hematoxilina Férrica+Metanil Yellow.

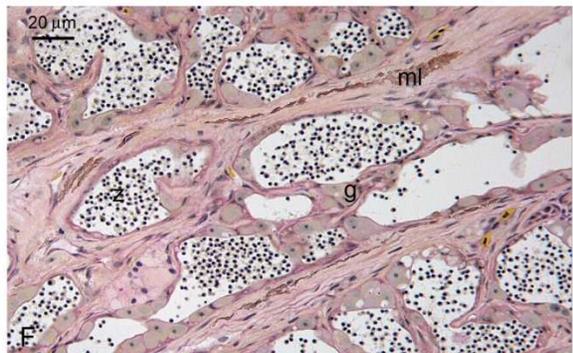
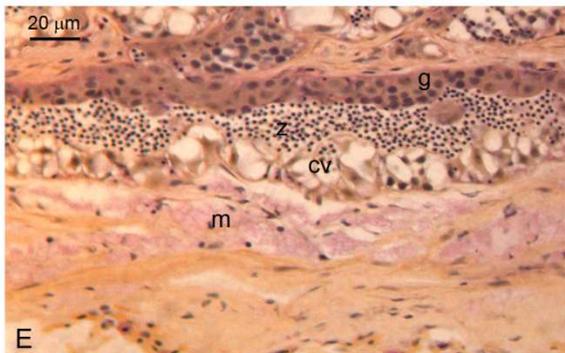
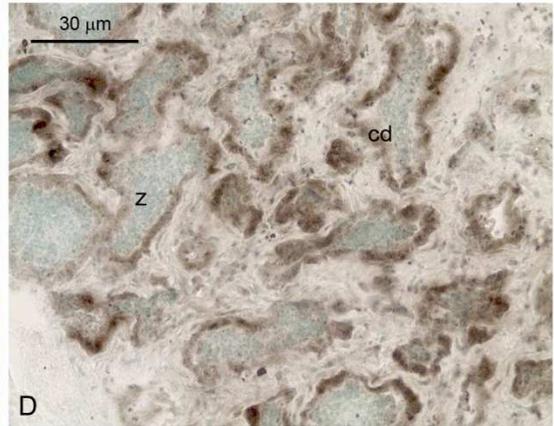
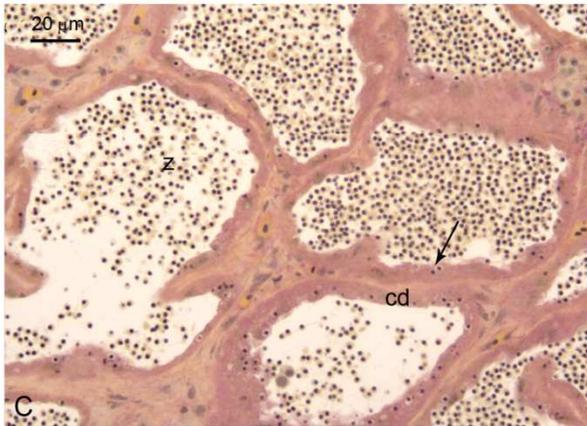
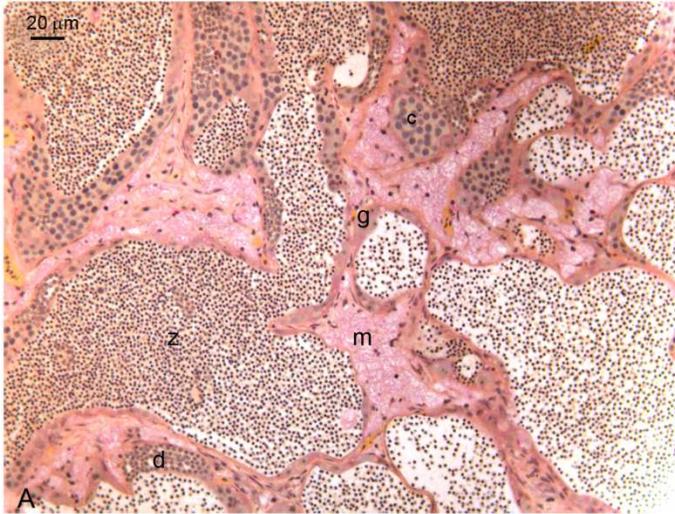
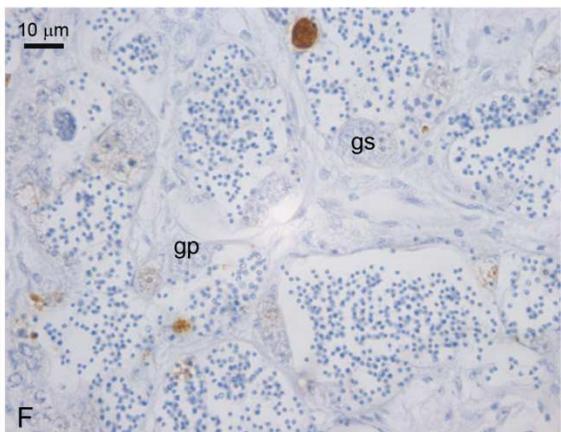
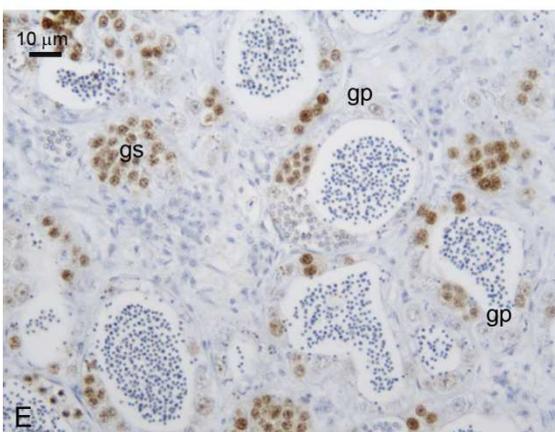
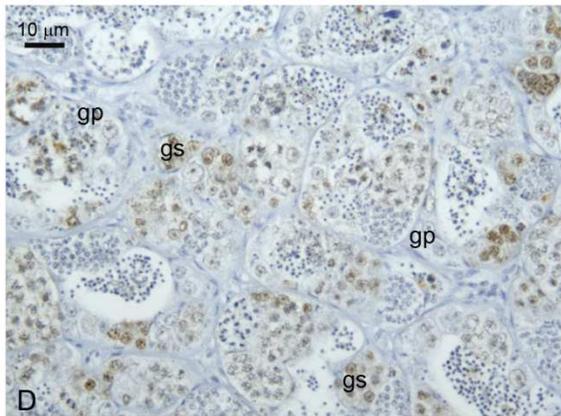
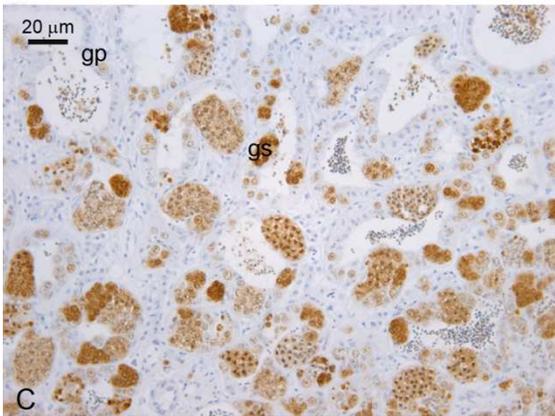
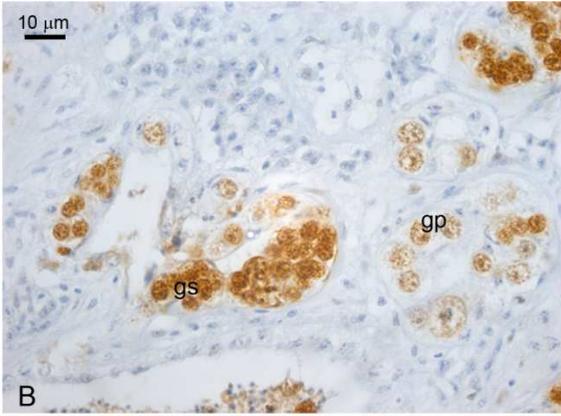
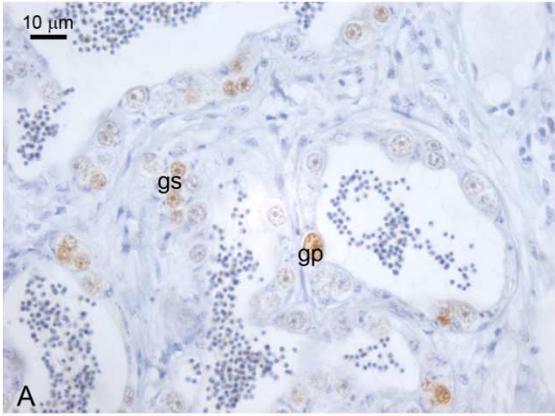


Figura 19 – Detecção de proliferação celular

A: Proliferação de espermatogônias primárias (gp) e secundárias (gs) na fase regredida. **B e C:** Na maturação inicial a marcação é intensa devido à grande proliferação de espermatogônias secundárias (gs). **D e F:** Nas fases seguintes de **(D)** maturação intermediária e **(E)** final, a mitose de espermatogônias primárias e secundárias diminui, chegando a menores índices na **(F)** regressão.



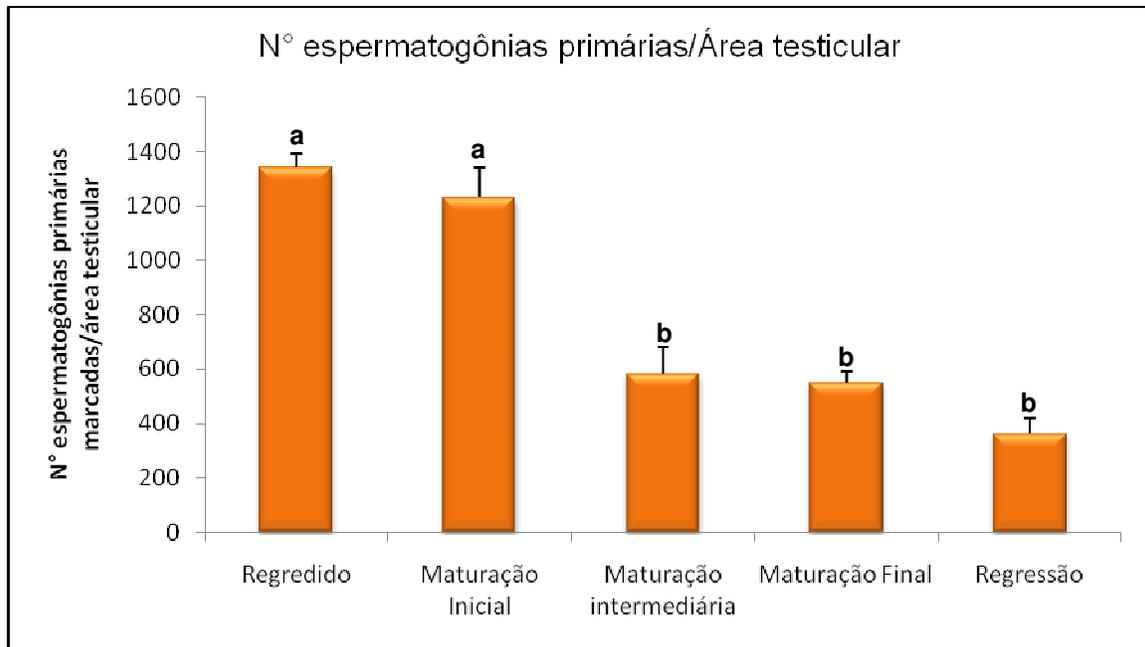


Figura 20 – Número de espermatogônias primárias imunomarcadas pelo PCNA por área testicular (média e erro padrão) por fase reprodutiva. Letras diferentes significam diferenças estatísticas $p < 0,05$.

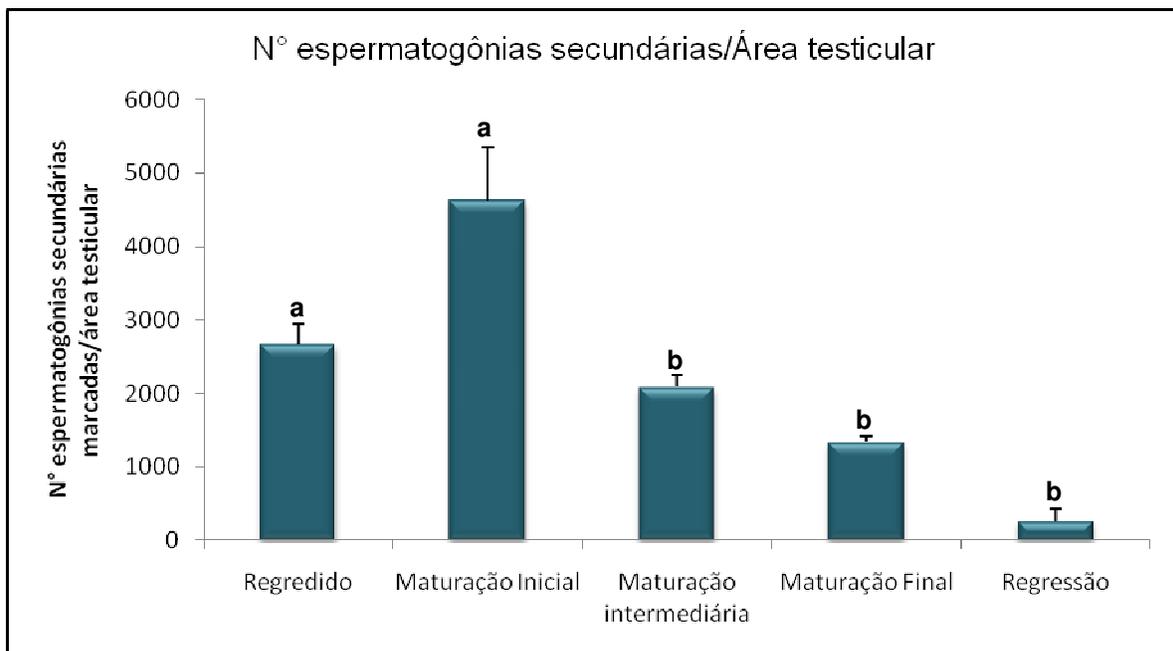
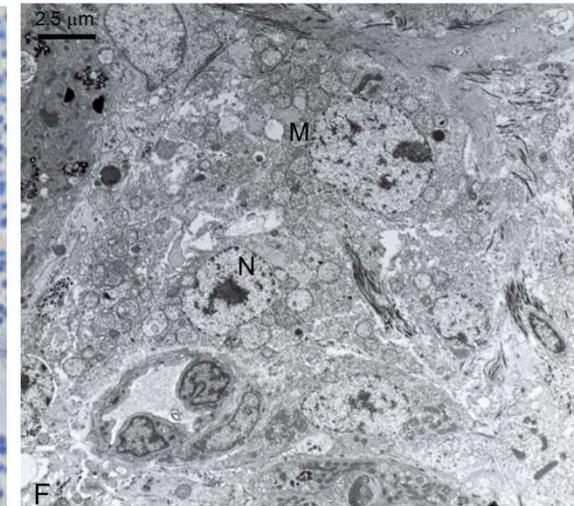
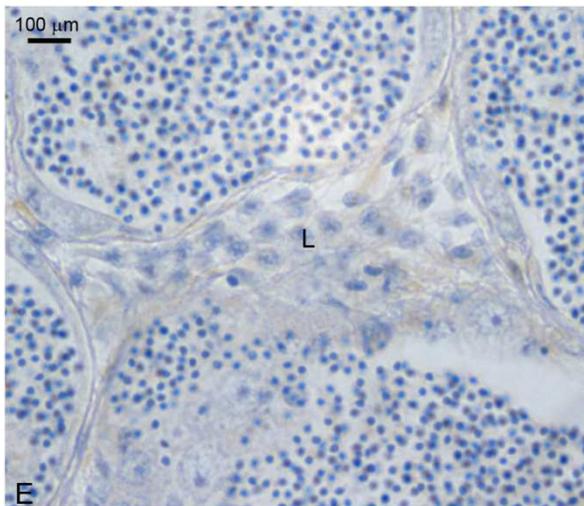
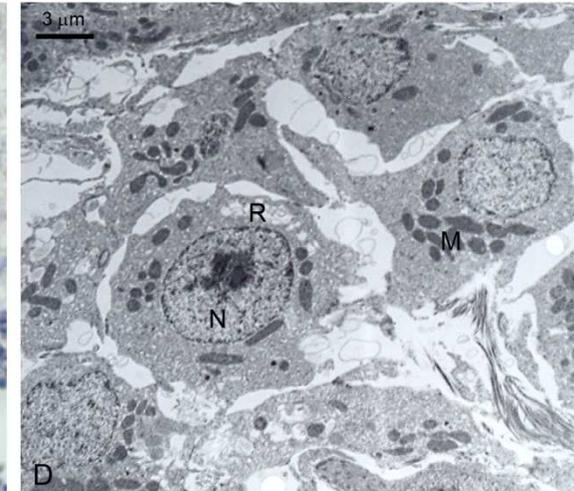
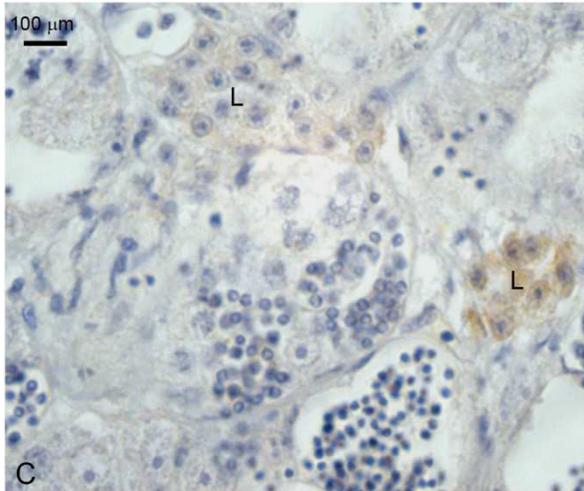
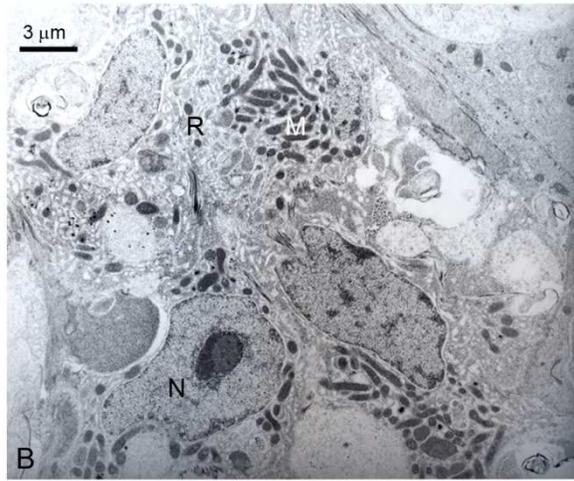
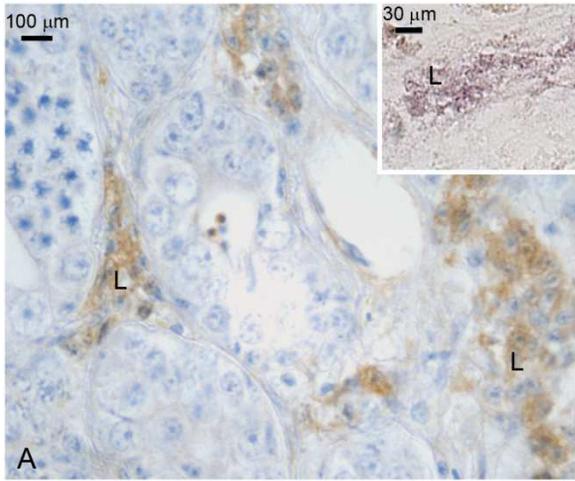


Figura 21 - Número de espermatogônias secundárias imunomarcadas pelo PCNA por área testicular (média e erro padrão) por fase reprodutiva. Letras diferentes significam diferenças estatísticas $p < 0,05$.

Figura 22 – Detecção da enzima 3 β HSD e ultraestrutura da célula de Leydig

A, C e E: Detecção imunocitoquímica da 3 β HSD em testículos com **(A)** grande quantidade da enzima nas células de Leydig (L), **(C)** quantidade mediana e **(E)** presença não detectável. **Detalhe:** Atividade enzimática da 3 β HSD. **B, D e F:** Ultraestrutura da células de Leydig mostrando as alterações ocorridas no decorrer ciclo reprodutivo. No início do ciclo a célula possui **(B)** retículo endoplasmático liso bem desenvolvido (R), o qual reduz nas fases de **(D)** maturação intermediária e final. Na **(F)** fase de regressão a célula de Leydig possui mitocôndrias lesionadas (M) e aspecto geral de reabsorção. Núcleo (N).



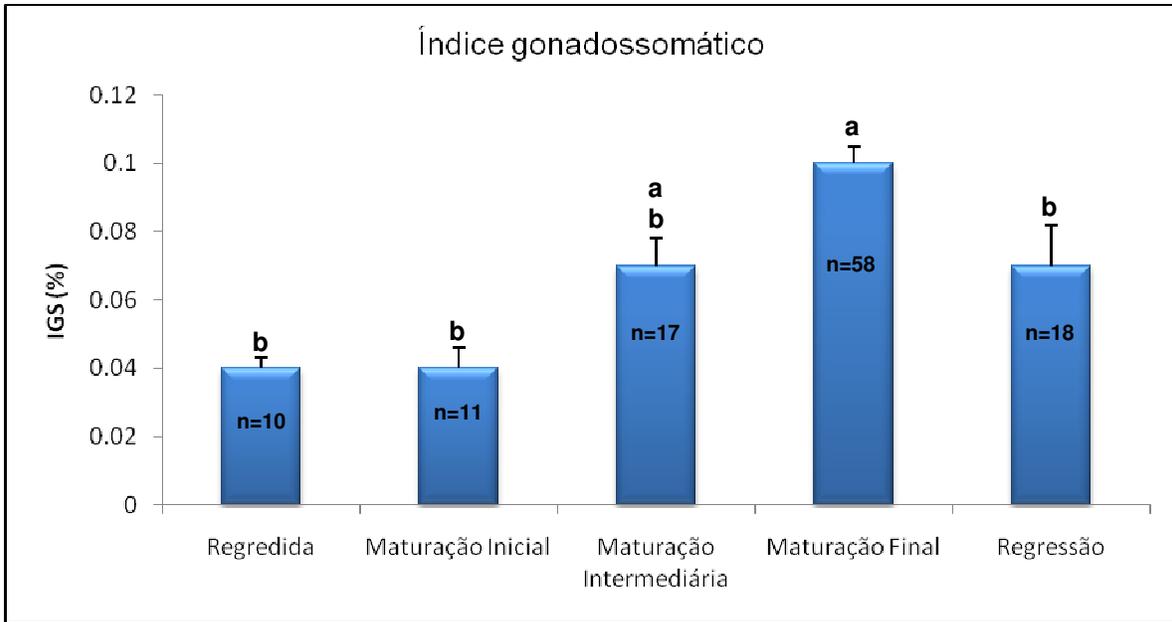


Figura 23 - Índice gonadossomático (média e erro padrão) dos machos por fase reprodutiva. Letras diferentes significam diferenças estatísticas $p < 0,05$.

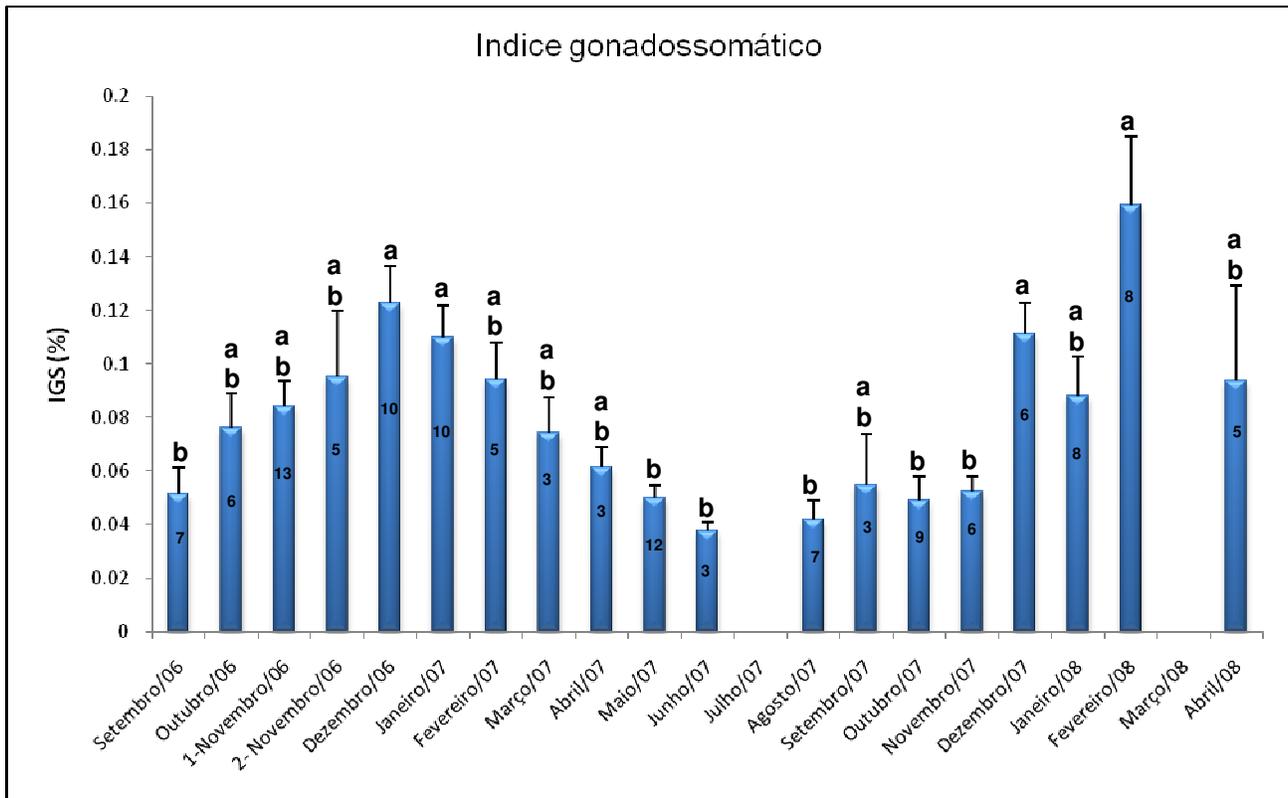


Figura 24 - Índice gonadossomático (média e erro padrão) dos machos por mês de coleta. Letras diferentes significam diferenças estatísticas $p < 0,05$.

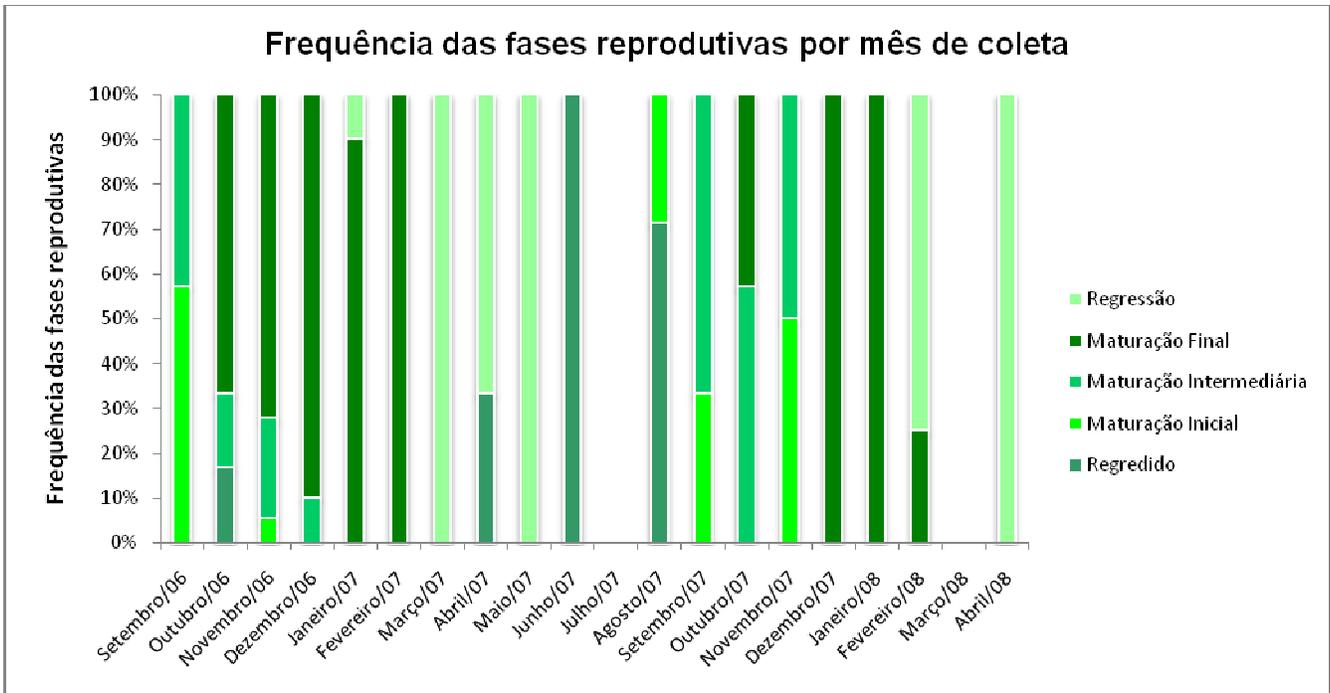


Figura 25 – Frequência das fases reprodutivas dos machos por mês de coleta realizada.

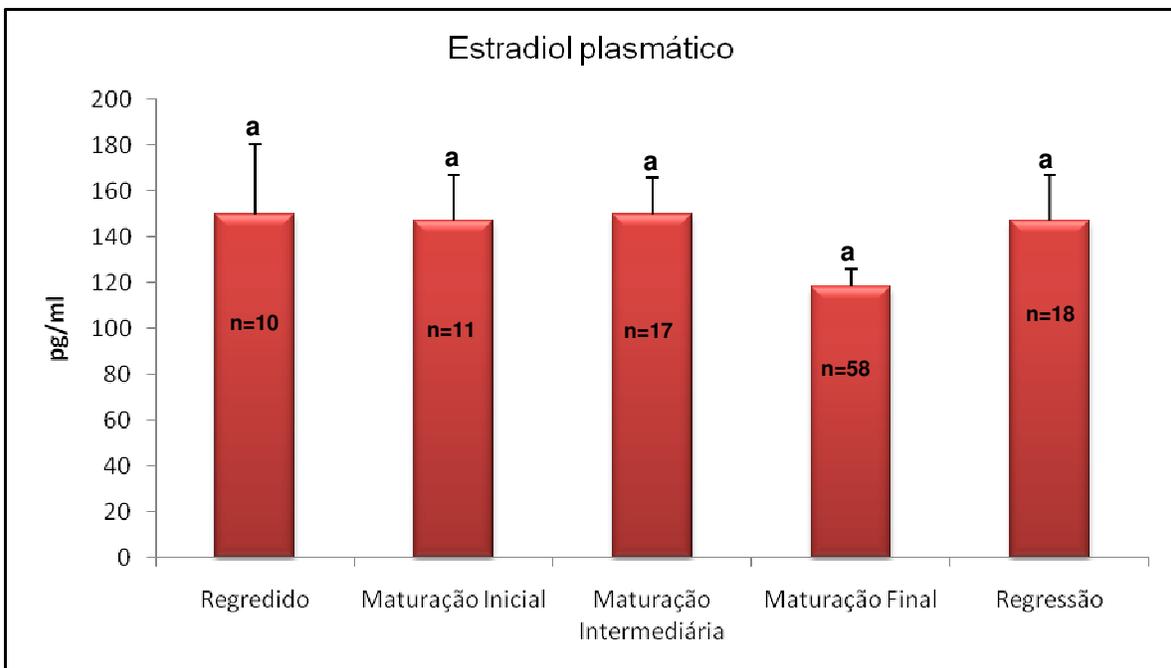


Figura 26 - Concentração de estradiol plasmático (média e erro padrão) dos machos por fase reprodutiva. Letras diferentes significam diferenças estatísticas $p < 0,05$.

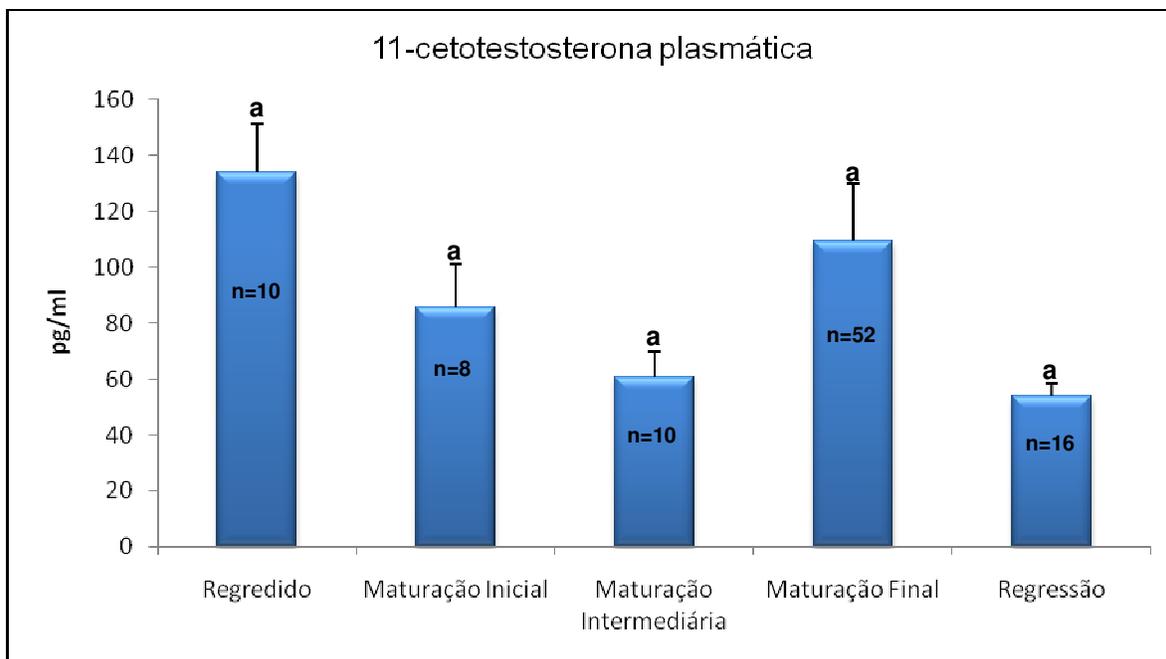


Figura 27 - Concentração de 11-cetotestosterona plasmática (média e erro padrão) dos machos por fase reprodutiva. Letras diferentes significam diferenças estatísticas $p < 0,05$.

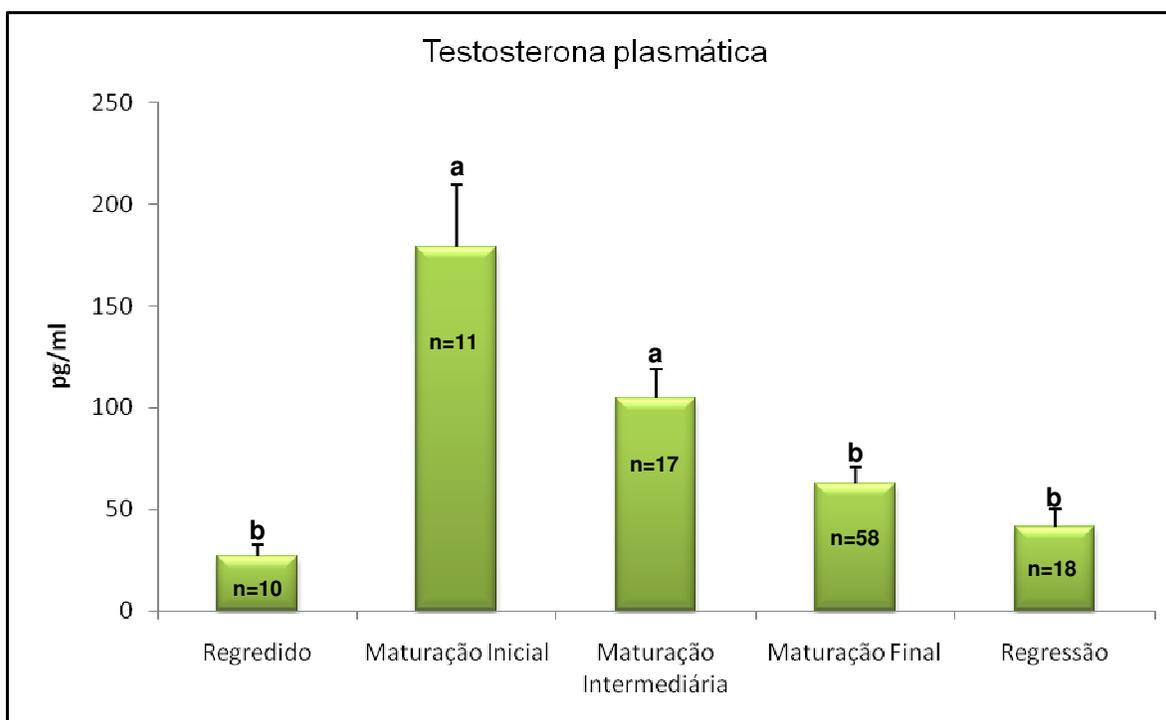


Figura 28 - Concentração de testosterona plasmática (média e erro padrão) dos machos por fase reprodutiva. Letras diferentes significam diferenças estatísticas $p < 0,05$.

8. Discussão

8.1. Gônadas de *Gymnotus* sp.

Para a maioria dos Teleostei, as gônadas são órgãos pares localizados longitudinal e dorsalmente à cavidade celomática, presos à parede do corpo pelo mesovário. A orientação das gônadas de *Gymnotus* sp. na cavidade celomática difere daquela encontrada para a maioria dos Teleostei, sendo encontrada situação semelhante no Pleuronectiformes *Solea senegalensis*, o qual também possui a papila urogenital na região anterior (Garcia-Lopez *et al.*, 2005).

Para as fêmeas de teleósteos o padrão mais comumente observado são ovários pares, saculiformes, localizados longitudinal e dorsalmente à cavidade celomática, presos à parede do corpo pelo mesovário. À diferença dos mamíferos, são cavitários com o compartimento germinativo em forma de lamelas que se projetam a partir da cápsula em direção à luz do órgão. A cavidade ovariana é contínua com os oviductos que se unem caudalmente, e desembocam na papila urogenital (Nagahama, 1983; Selman & Wallace, 1986; Connaughton & Aida, 1998).

Internamente ambos os ovários de *Gymnotus* sp. possuem as mesmas características, são órgãos cavitários, cobertos externamente pela túnica albugínea, a qual emite septos para dentro do órgão constituindo a sustentação das lamelas ovígeras. Este tipo de organização ovariana comum a maioria dos Teleostei é conhecida como cisto-ovarica (Nagahama, 1983).

Os testículos de *Gymnotus* sp. são arredondados e bastante diminutos, com um longo ducto que os liga à papila urogenital. Tal padrão é encontrado em membros de Gymnotiformes, com algumas pequenas variações, sendo desde mais alongados e chatos em *Eigenmannia* a mais arredondados e compactos em *Gymnotus* (França, observação pessoal). Novamente padrão morfológico semelhante é encontrado em *Solea senegalense* (Garcia-Lopez *et al.* 2006). Os testículos maduros dos peixes teleósteos são usualmente alongados, e podem

variar de simples bolsas alongadas a órgãos foliáceos (Loir *et al.*, 1989a; Le Gac & Loir, 1999).

Internamente os testículos de *Gymnotus* sp. são preenchidos por túbulos que sofrem anastomoses, que ocorrem com maior frequência na região periférica. Em Teleostei o padrão tubular anastomosado é observado em espécies pertencentes aos grupos mais basais na escala evolutiva (Parenti & Grier, 2004).

8.2. Foliculogênese e desenvolvimento folicular

Em *Gymnotus* sp. o epitélio da lamela ovígera é formado pelas células epiteliais e pelas oogônias, as quais proliferam por mitose. Grier (2000), quando descreveu o epitélio germinativo feminino de *Centropomus undecimalis* (Teleostei: Centropomidae), observou que a produção ilimitada de oócitos nas fêmeas dos Teleostei deve-se à constante proliferação das oogônias situadas de forma descontínua entre as células epiteliais da lamela ovariana. As oogônias podem individualmente evoluir para meiose, ou em grupos podem a um só tempo entrar em meiose formando ninhos de oócitos (Grier, 2000; Grier *et al.*, 2007).

As oogônias isoladas ou em grupos nunca fazem contato direto com o lúmen ovariano, isto é, estão sempre envoltas pelas células epiteliais. Quando não envoltas totalmente, as oogônias assentam-se diretamente sobre a membrana basal, e em proliferação formam agregados celulares acima da membrana basal (Quagio-Grassiotto, dados não publicados). Células derivadas do epitélio, cuja movimentação gera um intenso polimorfismo, invadem esses agregados, emitem processos citoplasmáticos os quais envolvem e individualizam as oogônias, formando grupos menores. A partir do estroma circundante originam-se as células da teca, as quais resultam da diferenciação das células mesenquimais presentes no estroma (Grier, 2002; Grier *et al.*, 2007), e que circundam o folículo, à exceção da região que compartilha com o epitélio (Grier *et al.*, 2005).

Em *Ilyodon whitei*, um Cyprinodontiformes vivíparo, pertencente à família Goodeidae (Grier *et al.*, 2005), é possível observar que na realidade os ninhos de oócitos e posteriormente os oócitos individuais permanecem conectados ao epitélio, com o qual compartilham certa extensão da membrana basal. A região de compartilhamento mantém-se ao longo de todo o desenvolvimento oocitário, e no

caso dos peixes ovíparos, corresponde ao local de saída do oócito no momento da desova.

Em *Gymnotus* sp. o desenvolvimento oocitário em si, como recentemente proposto por Grier e colaboradores (2009), foi dividido em três estágios: crescimento primário, crescimento secundário e maturação. Durante o desenvolvimento dos oócitos dos Perciformes, ordem esta que tem sido referência para a determinação das etapas de desenvolvimento oocitário em Teleostei, no crescimento primário ocorre deposição de gotas de lipídeos ao redor do núcleo, e na maturação as gotas de lipídeo coalescem numa gota única, os grânulos de vitelo fundem-se e as proteínas vitelínicas são hidrolisadas, e devido a força osmótica dos aminoácidos o vitelo hidrata tornando-se liquefeito (Patiño & Sullivan, 2002; Le Menn *et al.*, 2007; Grier *et al.*, 2007; 2009). Diferentemente das espécies de Perciformes marinhos, nenhuma das características acima mencionadas foram observadas nos oócitos de *Gymnotus* sp., exceto pelo fato de que há uma fusão parcial dos grânulos de vitelo provavelmente ocorrida durante a maturação.

Com base na redefinição do epitélio germinativo, a foliculogênese e o desenvolvimento folicular em *Gymnotus* sp., em linhas gerais, transcorre como descrita pelos autores supra citados. No entanto, o processo ainda que de aparente aplicação universal, pode ter suas particularidades nos diversos grupos de peixes teleósteos.

8.3. Fases Reprodutivas

Os estudos sobre o desenvolvimento gonadal nos teleósteos, tradicionalmente, utilizam o aspecto macroscópico dos ovários e dos testículos, e os estágios de desenvolvimento das células germinativas presentes nos compartimentos germinativos, para descrever os estágios de maturação gonadal (Vazzoler, 1996).

A caracterização dos ovários de *Gymnotus* em fases reprodutivas teve por base a proposta de Brown-Peterson e colaboradores (2009). Esta classificação utiliza o estágio de desenvolvimento dos oócitos, bem como sua predominância para o estabelecimento de fases do ciclo reprodutivo. A nomenclatura utilizada por esta proposta descreve de forma clara o estado funcional do ovário como um todo.

Para *Gymnotus* sp. a divisão do ciclo reprodutivo em fases reprodutivas já havia sido realizado (Barbieri & Barbieri, 1985) porém a determinação das fases foi realizada enfatizando aspectos macroscópicos dos ovários e o tipo de oócitos presentes. Decorrente do tipo de preparação histológica em parafina, os autores não consideram os dados de proliferação celular na discriminação das fases reprodutivas.

Para os machos foram utilizados critérios recentes de análise dos testículos na definição das classes reprodutivas (Grier & Taylor, 1998; Brown-Peterson *et al.*, 2002) as alterações anuais do epitélio germinativo, de contínuo a descontínuo, além dos estágios de desenvolvimento das células germinativas que estão presentes.

Barbieri e Barbieri (1984) ao estudarem o ciclo reprodutivo de *Gymnotus carapo* descrevem, com base no tipo de células germinativas presentes, apenas três estádios de maturação. Aplicando-se ao ciclo reprodutivo de *Gymnotus* sp. os conceitos de epitélio germinativo difundidos por Grier e Lo Nostro (2000), e das classes reprodutivas caracterizadas Grier (2002), têm-se para este *Gymnotiformes* não 3 mas 5 distintas fases reprodutivas. Sejam elas: regressão, regredida, maturação inicial, maturação intermediária e maturação final.

No entanto a aplicação da alternância do epitélio de contínuo a descontínuo utilizada por Grier (2002) ao desenvolvimento gonadal durante o ciclo reprodutivo de *Gymnotus* sp. pede algumas adaptações. Para o autor na maturação intermediária o epitélio germinativo já apresenta-se descontínuo. Em *Gymnotus* sp. durante a fase de maturação intermediária o epitélio não se torna descontínuo, devido a organização dos cistos, que ocorre de modo a formar uma camada pseudoestratificada. Como descrito, neste tipo de organização do epitélio os cistos contendo as células germinativas nas etapas mais avançadas de desenvolvimento projetam-se para a camada apical enquanto aqueles que contém as células mais iniciais têm uma localização mais basal. Portanto a abertura dos primeiros não implica necessariamente na descontinuidade do epitélio.

8.3.1. Fase de regressão gonadal

Uma das características do tecido gonadal de *Gymnotus* sp. é a presença bastante expressiva de células do sistema imune, como macrófagos e granulócitos. A presença destes componentes é perceptível em quase todas as fases do ciclo reprodutivo, tanto em fêmeas quanto machos, no entanto é mais abundante nas fases de intensa reabsorção celular, nas fases de regressão.

Em fêmeas de *Gymnotus* sp. estas células parecem ter um papel crucial na reabsorção de oócitos atrésicos, pois estão presentes macrófagos e granulócitos durante todo o processo, que envolve liquefação do vitelo, rompimento da zona pelúcida, entre outros eventos. Sequência semelhante de eventos é observada no Characiformes *Leporinus taeniatus* (Santos *et al.*, 2005), exceto pelo fato de que em *Gymnotus*, presente trabalho, não ocorre marcação positiva para morte por apoptose nas células foliculares.

Na fase regredida dos machos observou-se uma grande quantidade de células do sistema imune, como macrófagos e granulócitos, no entanto, foi possível constatar somente a ação direta dos macrófagos, fagocitando os restos celulares, e quanto aos granulócitos, estes permaneceram no órgão durante todo o processo de reabsorção celular. Apesar de não terem um papel aparente, podem estar envolvidos nos processos de sinalização química. Sabe-se que granulócitos ácidos acumulam interleucina 1beta (IL β), que é um fator de crescimento tanto para espermatogônias quanto para as células de Leydig, e ao mesmo tempo age inibindo a produção de andrógenos por este último tipo celular (Chaves-Pozzo *et al.*, 2003), além de inibir a proliferação pré-meiótica das células germinativas em *Squalus acanthias* (Miura *et al.*, 1999). Durante o processo de “degeneração” de *Spaurus aurata*, apoptose de espermatogônias e fagocitose de espermatozoides pela célula de Sertoli são uma constante no período pós-espermição (Chaves-Pozzo *et al.*, 2005). A infiltração de granulócitos ácido coincide com o aumento da proliferação espermatogonial, isto sugere que os granulócitos podem estar envolvidos mais com a regulação do ciclo reprodutivo do que com a eliminação de células em degeneração (Chaves-Pozzo *et al.*, 2005). Ao mesmo tempo tem-se uma regulação na incorporação de interleucina pelo granulócito, efetuada pelos esteróides 11-cetotestosterona e estradiol.

Além das células do sistema imune, as foliculares nas fêmeas, as de Sertoli e epiteliais do ducto espermático nos machos contribuem para a reabsorção dos restos celulares. A presença de enzimas digestivas neste tipos celulares foi evidenciado pela técnica de fosfatase ácida.

8.4. Índice gonadossomático

Os dados de índice gonadossomático, dos ovários e testículos, confrontados com as fases reprodutivas são condizentes com o desenvolvimento das gônadas durante todo o ciclo reprodutivo, isto é, o aumento do percentual das gônadas no corpo do animal ocorre concomitantemente ao desenvolvimento dos ovários e testículos, nas fases reprodutivas.

No entanto, para os machos, a relação do percentual do peso dos testículos no corpo do animal é bastante reduzida durante todo o ciclo reprodutivo, devido ao tamanho diminuto da gônada masculina, representando cerca de 0.15% da massa corpórea do animal na época reprodutiva, período de elevados índices gonadossomáticos. Tais condições observadas também para *Solea senegalensis* (Garcia-López *et al.*, 2005) são raras em outros Teleostei, em que o percentual dos testículos no corpo do animal apresentam maiores valores e também maiores variações, em peixes de reprodução sazonal, no decorrer da fases reprodutivas. Um exemplo é o que ocorre em Salmonidae, em que o índice gonadossomático varia de 0.05% a 10% (Billard, 1986).

Em relação ao período reprodutivo, há dados histológicos obtidos para *Gymnotus carapo* que mostraram fêmeas maduras no período de setembro à fevereiro (Barbieri & Barbieri, 1985), e machos com alta atividade espermatogênica nos meses de setembro à janeiro (Barbieri & Barbieri, 1984). Utilizando o mesmo tipo de dado para *Gymnotus aff. carapo*, Cognato & Fialho (2006) encontraram gônadas maduras no período de novembro à março. No presente trabalho quando se analisa os índices gonadossomáticos por mês de coleta tem-se os maiores valores ocorrendo nos meses de dezembro à fevereiro, para ambos os sexos. Unindo estes dados aos da frequência das fases nos meses de coleta, encontra-se gônadas aptas à reprodução ocorrendo no período de outubro à fevereiro, semelhantemente aos trabalhos realizados anteriormente.

8.5. Fases reprodutivas

As alterações ocorridas no epitélio germinativo feminino e masculino podem ser aplicadas na caracterização das fases reprodutivas em um grande número de peixes teleósteos, sendo encontradas grandes alterações naquelas espécies de reprodução sazonal. Sua correlação com outros parâmetros (índice gonadossomático, dosagens hormonais, imunocitoquímicos) podem auxiliar na compreensão da biologia reprodutiva desses animais. Estudos que associam as alterações do epitélio germinativo com os mecanismos endócrinos das gônadas são pouco frequentes, e inexistentes em Ostariophysi.

Mudanças fisiológicas reprodutivas em peixes estão associadas com alterações nos níveis plasmáticos de esteróides durante o ciclo reprodutivo. As gonadotropinas, secretadas pela hipófise, estimulam a produção dos esteróides gonadais nos folículos ovarianos e nas células de Leydig nos testículos (Borg, 1994; Peter & Yu, 1997; Weltzien *et al.*, 2004). Esses esteróides possuem papel fisiológico fundamental no desenvolvimento, crescimento, maturação gonadal e no controle de alguns processos reprodutivo em fêmeas e machos de teleósteos (Peter & Yu, 1997; Martyniuk *et al.*, 2006), assim como nos demais vertebrados.

8.5.1. Fêmeas

Há uma correlação entre as concentrações dos esteróides e substâncias produzidas, essenciais para o desenvolvimento do folículo, e conseqüentemente do ovário. Um destes componentes é a vitelogenina, que é o precursor do vitelo e de certa forma responsável pelo crescimento do oócito (Patiño & Sullivan, 2002). Estudos apontam que a vitelogenina tem sua produção mediada pelas concentrações de estradiol (Tyler & Sumpter, 1991). Experimentos *in vitro* com folículos de truta arco íris, *Oncorhynchus mykiss*, demonstram que a administração de estradiol aumenta a absorção de vitelogenina pelo folículo (Tyler & Sumpter, 1991). Dados do perfil hormonal de estradiol em *Gymnotus* revelam uma tendência ao aumento da concentração de estradiol na fase em que os oócitos vitelogênicos são predominantes.

A ação dos estrógenos está relacionada à síntese hepática de vitelogenina, uma glicolipofosfoproteína que é precursora do vitelo do oócito (Patiño & Sullivan, 2002). Durante a vitelogênese tem-se um aumento das concentrações plasmáticas de estrógenos, principalmente do estradiol, que está correlacionado com o crescimento do oócito, devido à incorporação de vitelogenina (Patiño & Sullivan, 2002).

Contudo há outra fase em que as concentrações de estradiol são elevadas, a fase regredida, caracterizada por modificações morfofisiológicas necessárias para que o ovário possa iniciar novo ciclo. Apesar dos mecanismos de controle da proliferação de oogônias e recrutamento de oócitos não serem bem compreendidos para alguns vertebrados (Lubzens *et al.*, 2009), tem-se uma relação direta dos hormônios hipofisários na proliferação das oogônias. Em experimentos com fêmeas de peixes que tiveram a hipófise retirada, observou-se uma diminuição da proliferação de oogônias (Tokarz, 1978), e o restabelecimento da atividade proliferativa foi devido a injeções de extrato de hipófise purificada nestes animais (Yamazaki, 1965 *apud* Lubzens *et al.* 2009). Pesquisas com o *Hucho perryi* e *Cyprinus carpio* sugerem que a progressão das células germinativas na oogênese envolve o estradiol, que age diretamente na proliferação das oogônias, no entanto não foram encontradas diferenças significativas nos níveis de estradiol destes mesmos animais (Miura *et al.*, 2007).

Dados obtidos para *Gymnotus*, presente trabalho, refletem uma possível interação entre estradiol e proliferação das oogonias, assim como com a incorporação de vitelo. Contudo não foi possível detectar, estatisticamente, diferenças nas concentrações entre as fases reprodutivas, exceto pela fase regredida e regressão. Esta não observância pode ser devido à baixa fecundidade da espécie (Barbieri & Barbieri, 1982) e grande diâmetro dos oócitos, pois o número de folículos reflete diretamente na produção de esteróides pelos ovários, devido à atividade endócrina dos mesmos.

O andrógeno 11-cetotestosterona tradicionalmente considerado específico dos machos de teleósteos tem sido também encontrado em várias fêmeas de peixes (Lokman *et al.*, 2002). No entanto, permanece desconhecida sua função

fisiológica em fêmeas. Os andrógenos, além de serem substrato para a síntese de estradiol, realizam “feedback” com o eixo encefálico-hipofisário-gonadal (Lokman *et al.*, 2002). *In vitro* foi observado que os ovários possuem capacidade de produzir 11-cetotestosterona (Matsubara *et al.*, 2004), e o tratamento de ovários de *Anguilla* com este andrógeno aumenta a quantidade de gotas de óleo em oócitos, sugerindo seu importante papel no crescimento primário (Matsubara *et al.*, 2004). Os níveis hormonais de 11-cetotestosterona em fêmeas de *Anguilla* aumentam com o desenvolvimento ovariano (Matsubara *et al.*, 2004).

No presente estudo o perfil hormonal da 11-cetotestosterona variou de forma semelhante ao do estradiol, com a concentração seguindo uma tendência à elevação na fase regredida e com maior valor na fase de oócitos apto à desova. Novamente não houve diferença estatística entre algumas das fases, provavelmente devido à pequena quantidade de oócitos produzidas pela espécie.

Em estágios iniciais da foliculogênese, os andrógenos parecem promover crescimento folicular. Em ratos a administração de testosterona diminui o número de folículos primordiais e aumenta o de folículos nos demais estágios de desenvolvimento, indicando que a testosterona tem influência no recrutamento de oócitos (Drummond, 2006). As concentrações de testosterona em fêmeas de *Gymnotus* sp. revelaram tendência à elevação gradual conforme o ovário seguiu seu desenvolvimento nas fases reprodutivas até a desova ativa, sugerindo um envolvimento da testosterona no desenvolvimento dos folículos.

A atividade da 3β hidroxisteróide desidrogenase em fêmeas está relacionada com a síntese dos esteróides pelos folículos (Young *et al.*, 2002 *apud* Lubzens *et al.*, 2009, Nakamura *et al.*, 2003). O hormônio folículo estimulante liberado pela adeno-hipófise chega às camadas foliculares e tecais dos oócitos, e estimula a conversão do colesterol em testosterona pelas células da teca (Young *et al.*, 2002 *apud* Lubzens *et al.* 2009, Nakamura *et al.*, 2003). A testosterona é transportada para a camada de células foliculares, e aromatizada a estradiol, que é liberada para a corrente sanguínea, estimulando o fígado a produzir a vitelogenina.

No presente estudo é possível relacionar a atividade da 3 β hidroxisteróide desidrogenase de forma direta com os níveis de testosterona, pois é o único com aparente variação nas fases reprodutivas. Esta situação também condiz com o comportamento proliferativo de células foliculares e tecais, pois quanto mais folículos tornam-se maduros, maior é a proliferação acompanhando o crescimento do folículo. Com o aumento no número destas células conseqüentemente há aumento de células esteroidogênicas, já que a detecção da 3 β hidroxisteróide desidrogenase mostrou atividade tanto nas células tecais quanto nas células foliculares.

A reatividade das células foliculares à 3 β hidroxisteróide desidrogenase confirmou-se tanto pela técnica de detecção enzimática quanto pela imunohistoquímica. Não há dados na literatura que indicam as células foliculares de Teleostei como esteroidogênicas. O único registro encontrado foi em folículos de truta arco íris, *Oncorhynchus mykiss*, tratadas com gonadotropina (Young *et al.*, dados não publicados, *apud* Lubzens *et al.* 2009).

8.5.2. Machos

Gonadotropinas e esteróides são os principais reguladores da espermatogênese. O hormônio folículo estimulante (FSH) é essencial para a proliferação de células de Sertoli, e pela produção de fatores de crescimento por estas células (Lejeune *et al.*, 1996). O hormônio luteinizante estimula as células de Leydig, sitio endócrino do testículo, a produzirem andrógenos.

O papel principal dos andrógenos controlando a reprodução em machos de teleósteos é bem documentado e tem sido visto em detalhes (Borg, 1994). Os andrógenos estão envolvidos na regulação da espermatogênese, como demonstrado em *Anguilla japonica* (Miura *et al.*, 1991); desenvolvimento de características sexuais secundárias, como a mudança de coloração em *Gasterosteus aculeatus* na época reprodutiva (Mayer *et al.*, 1990); e modulando o comportamento sexual em *Carassius auratus* (Kobayashi & Nakanishi, 1999).

Os mecanismos exatos da produção espermática não são ainda totalmente compreendidos, apesar da grande quantidade de resultados obtidos para *Anguilla*, que é o teleósteo pesquisado em maiores detalhes no que diz respeito à

espermatogênese. Neste representante de Teleostei, andrógenos como a 11-cetotestosterona se ligam a receptores nucleares nas células de Sertoli e estimulam o desenvolvimento das células espermáticas (Miura *et al.*, 1991, 1996). No estágio inicial da espermatogênese, no qual a mitose é predominante, a 11-cetotestosterona estimula a produção de activina B pelas células de Sertoli, substância com potencial indutor da mitose em células germinativas, provavelmente por ação direta na célula espermatogênica (Miura *et al.*, 1995; Nagahama *et al.*, 1997; Nagahama, 2000). Em estágios mais avançados da espermatogênese não foi observado ação da activina B na meiose (Miura *et al.*, 1997). Contudo os mecanismo que regulam a espermatogênese podem variar de espécie para espécie, como por exemplo, em truta arco íris em que a 11-cetotestosterona não estimula a espermatogênese (Loir, 1999).

Em *Gymnotus* sp., a concentração de 11-cetotestosterona apresentou tendência a queda até a fase de maturação intermediária. Este acontecimento é acompanhado pela maior incidência de proliferação de espermatogônias primárias em fases iniciais, e que decaem gradualmente junto com o desenvolvimento do testículo no ciclo reprodutivo. Assim as concentrações de 11-cetotestosterona parecem estar relacionadas com a proliferação das espermatogônias, ditas, primárias.

Os dados das contagens de células imunomarcadas pelo PCNA revelam comportamento diferente entre os tipos de espermatogônias. Enquanto as espermatogônias primárias possuem valores elevados no início do ciclo que decaem até a fase de regressão, as espermatogônias secundárias apresentaram maior proliferação na fase de maturação inicial, com queda dos valores nas fases seguintes até a fase regredida. Isto deve-se ao fato de que em um primeiro momento as espermatogônias primárias são estimuladas a dividerem-se, seja para auto-renovar-se ou originar células germinativas para progredir no ciclo espermatogênico. As espermatogônias destinadas à espermatogênese, na fase regredida, continuam a proliferar, originando posteriormente espermatogônias secundárias, logo o pico de marcação destas células na fase seguinte. Evento semelhante ocorre em *Sparus aurata* onde as espermatogônias tronco proliferam

com maior incidência na fase de repouso, fase análoga à regredida, com tendência ao declínio com a progressão do testículo no ciclo espermatogênico, enquanto que as espermatogônias primárias proliferam em maior intensidade no início do ciclo espermatogênico com declínio até o período pós espermição (Chaves-Pozzo *et al.*, 2005). Fazendo um paralelo pode-se dizer que as espermatogônias, ditas primárias de *Gymnotus* comportaram-se como as espermatogônias tronco de *Sparus aurata*, enquanto que as espermatogônias secundárias como as espermatogônias primárias.

A dinâmica proliferativa das espermatogônias parece ser reflexo das concentrações dos esteróides. Desta forma o comportamento proliferativo das espermatogônias primárias acompanhou, em grande parte, o perfil hormonal da 11-cetotestosterona, e o das espermatogônias secundárias o perfil hormonal da testosterona, indicando uma possível relação direta das concentrações dos andrógenos à atividade mitótica destas células. Segundo Miura e colaboradores (1999) a testosterona desempenha uma função de “feedback”, inibindo a liberação de FSH e conseqüentemente a esteroidogênese, e também teria influência na atividade mitótica após a conversão para estradiol.

Em *Xiphias gladius* a quantidade de células germinativas marcadas pelo PCNA é maior no período da espermatogênese com declínio no período reprodutivo (Corriero *et al.*, 2007). No mesmo estudo tem-se que o comportamento das células marcadas pelo PCNA acompanham o perfil da 11-cetotestosterona, enquanto que a testosterona apresenta menores concentrações durante a espermatogênese, com posterior elevação no período reprodutivo e seguido de queda no testículo esgotado (Corriero *et al.*, 2007).

Dados da literatura citam dois esteróides como sendo relacionados ao início do ciclo reprodutivo em machos, um deles é o estradiol, que tem ação na autorenovação de células tronco espermatogoniais. A 11-cetotestosterona teria ação nos eventos de proliferação de espermatogônias, meiose e espermiogênese, além de caracteres secundários (Cavaco *et al.*, 2001).

Conclusões a cerca da correlação das concentrações plasmáticas de estradiol nas fases reprodutivas não pôde ser feita para *Gymnotus*, devido aos

valores praticamente constantes do hormônio ao longo do ciclo reprodutivo. Este fato não é inédito, e ocorre na grande maioria dos Teleostei já estudados (Le Gac e Loir, 1999), o que não exclui a importância do estradiol no processo de formação de gametas pelo testículo, já que parece estar relacionada com a renovação de células primordiais (Miura *et al.*, 1999).

As concentrações de 11-cetotestosterona além de mostrarem uma relação direta com a proliferação de espermatogônias primárias, pode também estar relacionado à modulação da descarga do órgão elétrico (EOD) de *Gymnotus*. Zakon e colaboradores (1991) utilizando outro membro da ordem Gymnotiformes correlacionaram a frequência da descarga elétrica com os níveis esteroidais. Análises dos níveis de esteróides em *Sternopygus* na época reprodutiva mostram que as concentrações de testosterona são similares em ambos os sexos, e a 11-cetotestosterona possui concentrações elevadas em machos, enquanto nas fêmeas não são detectáveis (Zakon *et al.*, 1991). No mesmo estudo observou-se que em *Sternopygus* o nível de 11-cetotestosterona é inversamente proporcional à frequência de EOD, e que a baixa frequência do campo elétrico está relacionada ao comportamento reprodutivo (Zakon *et al.*, 1991). Em *Sternopygus* e *Eigenmannia* a frequência de EOD em machos maduros é menor que em fêmeas (Zakon *et al.*, 1991).

A relação entre as concentrações de testosterona e 11-cetotestosterona durante o ciclo reprodutivo são bastante variáveis em teleósteos. Há espécies onde as concentrações destes andrógenos oscilam em paralelo, como em *Hippoglossus hippoglossus* (Weltzien *et al.*, 2002). Nesta espécie o ciclo espermatogênico divide-se em três fases, uma inicial com baixos níveis de testosterona e 11-cetotestosterona, com proliferação de espermatogônias e subsequente início da meiose marcada pela presença de espermatócitos. A segunda fase com aumento de ambos os andrógenos e com presença de espermatozóides. Uma terceira fase com baixos níveis de 11-cetotestosterona e regressão testicular (Weltzien *et al.*, 2002). Em *Rhombosolea tapirina* os níveis plasmáticos de testosterona foram variáveis, enquanto que os 11-cetotestosterona não (Barnett & Pankhurst, 1999). Aumento nos níveis plasmáticos tanto de

testosterona quanto 11-cetotestosterona estão associados com aumento da massa testicular no transcorrer do ciclo reprodutivo (Weltzien *et al.*, 2004).

A quantificação de andrógenos ainda pode revelar se ocorre predominância de algum deles. Para *Xiphias gladius* o andrógeno principal é a 11-cetotestosterona, pois apresenta concentrações elevadas em relação à testosterona. A predominância do andrógeno 11-cetotestosterona foi observada também para *Hippoglossus hippoglossus* (Weltzien *et al.*, 2002) e *Solea senegalensis*, sendo que neste último os perfis de 11-cetotestosterona e testosterona foram semelhantes durante todo o ciclo reprodutivo, com concentrações plasmáticas variáveis de acordo com as diferentes fases reprodutivas (Garcia Lopez *et al.* 2006). Em *Gymnotus* sp. não se observou a predominância de qualquer dos andrógenos mensurados, já que oscilações das concentrações durante o ciclo reprodutivos ocorreram em valores aproximados.

Além da variação dos andrógenos no transcorrer do ciclo reprodutivo, estes podem variar grandemente entre machos em uma mesma fase reprodutiva. Esta variação pode ocorrer devido à posição social do indivíduo na população (Parikh *et al.*, 2006). Tal fato foi observado em *Astatotilapia burtoni*, um ciclídeo que apresenta hierarquia entre indivíduos de uma mesma população. Os níveis de testosterona e 11-cetotestosterona foram maiores em machos dominantes do que em subordinados (Parikh *et al.*, 2006). Esta pode ser uma ferramenta para identificar indivíduos dominantes em uma população, sendo de grande valia em espécies com pouco conhecimento do padrão comportamental, como é o caso de *Gymnotus*. Observações da espécie em estudo, *Gymnotus* sp., detectaram a ocorrência de um possível comportamento hierárquico. A maior parte dos indivíduos de uma população permanece lado a lado no mesmo nível da coluna d'água e uma pequena minoria em um nível acima, sobre todos os outros (França, observação pessoal).

No entanto deve-se notar que os níveis plasmáticos não necessariamente correspondem a níveis testiculares, ou os de outros potenciais andrógenos produzidos pelos tecidos (Weltzien *et al.*, 2004). A testosterona pode ser

metabolizada rapidamente e apresentar níveis plasmáticos menores que o da 11-cetotestosterona, de indivíduos em desenvolvimento inicial (Weltzien *et al.*, 2004).

Em Teleostei as células de Leydig ocorrem no interstício testicular, em regiões próximas aos vasos sanguíneos. Algumas exceções ocorrem em Teleostei, na qual a localização pode variar, como em *Poecilia reticulata* em que as células de Leydig concentram-se na periferia do testículo, em geral, ao redor do ducto testicular (Pudney, 1999). Em outros teleósteos como *Glossogobius olivaceus* as células de Leydig formam uma massa glandular central, separada do compartimento germinativo; e em *Gobius niger* as células de Leydig acumulam-se no mesórquio do testículo (Pudney, 1999). A forma e localização das células de Leydig em *Gymnotus* sp. é algo peculiar, ocorrendo em grupos pouco frequentes em regiões específicas do interstício e próximas à capsula.

A atividade esteroidogênica das células de Leydig é muitas vezes correlacionada com a atividade de enzimas hidroxilases, as quais sugerem grande atividade esteroidogênica, principalmente durante o período de espermatogênese e espermição (Cauty & Loir, 1995). Em *Gymnotus* sp. a maior atividade esteroidogênica foi observada durante a fase regredida e maturação inicial, com atividade mediana nas fases de maturação intermediária e final, e ausência de atividade na regressão. A atividade da 3β hidroxisteroide desidrogenase também teve relação com a morfologia ultraestrutural da célula de Leydig. Desta forma em períodos de maior atividade o retículo endoplasmático liso apresentou-se muito desenvolvido. As fases de menor resposta à detecção enzimática foi acompanhada por uma diminuição do retículo, seguido da fase onde não houve atividade enzimática e a célula de Leydig apresentou mitocôndrias lesionadas, característico de uma reabsorção celular.

Nos teleósteos de reprodução sazonal, a atividade da 3β -hidroxisteroide desidrogenase é baixa nos testículos regredidos, isto é, nos testículos constituídos apenas por espermatogônias e células de Sertoli (Cinquetti & Dramis, 2003). Com a espermatogênese, a enzima tem sua atividade aumentada, porém começa a diminuir após a liberação dos espermatozoides e chega a ser imperceptível durante o preparo da gônada para o próximo ciclo (Cinquetti e Dramis, 2003; Lo

Nostro *et al.*, 2004). O comportamento da 3 β -hidroxiesteróide desidrogenase está de acordo com os níveis plasmáticos de testosterona e 11-cetotestosterona durante o ciclo reprodutivo de machos de *Centropomus undecimalis* (Perciformes: Centropomidae) (Roberts *et al.*, 1999) e *Piaractus mesopotamicus* (Characiformes: Characidae) (Gazola & Borella, 1997), que possuem elevadas concentrações do andrógeno durante a maturação, com queda após a liberação dos espermatozóides e baixas concentrações durante a regressão e a classe regredida (repouso). O mesmo tipo de correlação pode ser feito para *Gymnotus* sp., pois houve correspondência da atividade esteroidogênica com os níveis hormonais plasmáticos.

9. Conclusões

Os dados histológicos, imunocitoquímicos, enzimáticos, de proliferação celular e dosagem dos esteróides plasmáticos, bem como as correlações entre estes, durante o ciclo reprodutivo de *Gymnotus* sp., permitem concluir que:

- A posição e morfologia gonadais de *Gymnotus* sp. é bastante peculiar. Apesar disto a morfologia interna é semelhante aquela encontrada para os demais Teleostei.

- Propostas existentes na literatura para as fases reprodutivas, tanto para fêmeas quanto machos, podem ser utilizadas para classificar em fases o ciclo reprodutivo de *Gymnotus*, mas com algumas adaptações.

- Os dados de índice gonadossomático concordam com as características histológicas observadas para as classes reprodutivas.

Para as fêmeas:

- As concentrações pouco variáveis de estradiol e 11-cetotestosterona podem ser devido à baixa fecundidade do animal. No entanto quando se compara as concentrações de estradiol com eventos celulares, pode-se dizer que o esteróide está envolvido com o processo de incorporação de vitelo pelo oócito.

- As concentrações de testosterona acompanham o desenvolvimento do ovário, desta forma este hormônio pode estar relacionado com o desenvolvimento dos folículos.

- A presença e atividade da 3β hidroxisteróide desidrogenase foi observada em células da teca e folicular, e quando avaliada nas fases reprodutivas apresentou dados paralelos ao das dosagens de testosterona, assim a atividade esteroidogênica do folículo está diretamente relacionada à produção de testosterona.

Para os machos:

- As concentrações plasmáticas de estradiol permanecem, praticamente, constantes durante todo o ciclo reprodutivo. O esteróide pode estar relacionado

com a renovação das células primordiais, devido a marcação de espermatogônias primárias durante todo o ciclo reprodutivo. No entanto esta proliferação é maior nas fases iniciais de desenvolvimento, coincidindo com tendência à elevação da 11-cetotestosterona.

- Na fase de maturação final, que é o período onde o animal está apto a reprodução, a concentração de 11-cetotestosterona possui tendência à elevação, indicando uma possível modulação do comportamento reprodutivo.

- O perfil hormonal da testosterona é semelhante aos dados de proliferação de espermatogônia secundária, sugerindo uma possível relação entre as concentrações hormonais e os eventos proliferativos.

- A atividade da enzima 3β hidroxisteróide desidrogenase durante o ciclo reprodutivo é tanto compatível com as modificações ultraestruturais das células de Leydig quanto as concentrações dos esteróides dosados.

A comparação de todos os parâmetros utilizados dentro das fases reprodutivas permitiu melhor entendimento do ciclo reprodutivo em *Gymnotus*.

10. Referências

- Abraham, M., Hilge, V., Lison, S., Tibika, H. The cellular envelope of oocytes in teleosts. *Cell Tissue Res.*,235: 403-410, 1984.
- Albert, J.S. Species diversity and phylogenetic systematics of American knifefishes (Gymnotiformes,Teleostei). University of Michigan, *Misc. Publ. Mus. Zool.*, 190: 1-127, 2001.
- Albert, J.S. & Campos-da-Paz, R. Phylogenetic systematics of American knifefishes: a review of the available data. In: *Phylogeny and Classification of Neotropical Fishes*. (Malabarba, L., Reis, R.E., Vari, R.P., de Lucena, C.A.S., de Lucena, Z.M.S., eds), Porto Alegre: Museu de Ciências e Tecnologia, pp. 409-438, 1998.
- Albert, J.S., Crampton, W.G.R. Diversity and phylogeny of Neotropical electric fishes (Gymnotiformes). In: *Electroreception* (Bullock, T.E., Hopkins, C.D., Popper, A.N., F.R., Fay, eds.), Cornell University Press: Ithaca, pp. 306-403, 2005.
- Ball, J.N., Baker, B.I. The pituitary gland: anatomy and histophysiology. In: *Fish physiology* (Hoar, W.S. & Randall, D.J., eds.), New York: Academic Press, v.2, 1969.
- Barbieri, G., Barbieri, M.C. Fecundidade e tipo de desova de *Gymnotus carapo* (Linnaeus, 1758) na represa do Lobo, Estado de São Paulo (Pisces, Gymnotidae). *Spectrum – J. bras. Ci.*, 2 (7): 25-29, 1982.
- Barbieri, C.B. & Barbieri, G. Reprodução de *Gymnotus carapo* (Linnaeus, 1758) na represa do Lobo (SP). Morfologia e histologia de testículo. Variação sazonal. (Pisces, Gymnotidae). *Rev. Brasil. Biol.*, 44: 141-148, 1984.
- Barbieri, C.B. & Barbieri, G. Reprodução de *Gymnotus carapo* (Linnaeus, 1758) na represa do Lobo (SP). Morfologia e histologia de ovário. Variação sazonal. (Pisces, Gymnotidae). *Rev. Brasil. Biol.*, 45: 3-12, 1985.

- Barnett, C.W., Pankhurst, N.W. Reproductive biology and endocrinology of greenback flounder *Rhombosolea tapirina* (Günther 1862). *Mar. Fresh. Res.*, 50: 35–42, 1999.
- Billard, R. La spermatogenèse de *Poecilia reticulata*. III. Ultrastructure des cellules de Sertoli. *Ann. Biol. Anim. Bioch. Biophys.*, 10: 37-50, 1970.
- Billard, R., Fostier, A., Weil, C., Breton, B. Endocrine control of spermatogenesis in teleost fish. *Can J. Fish. Aquat. Sci.*, 39: 65-79, 1982.
- Billard, R. Spermatogenesis and spermatology of some teleost fish species. *Reprod. Nutr. Dev.*, 26: 877-1024, 1986.
- Blázquez, M., Bosma, P.T., Fraser, E.J., Van Look, K.J.W., Trudeau, V.L. Fish as models for the neuroendocrine regulation of reproduction and growth. *Comp. Biochem. Physiol.* 119C: 345-364, 1998.
- Borg, B. Androgens in teleost fish. *Comp. Biochem. Physiol.* 109C:219-245, 1994.
- Borges Filho, O.F. Caracterização dos estádios de maturação e correlação com avaliações histoquímico-enzimáticas e ultraestruturais das células endócrinas testiculares, durante o ciclo reprodutivo do *Prochilodus scrofa* – Steindachner, 1881. Tese de Doutorado, Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo, São Paulo, 1987.
- Brown-Peterson, N.J., Grier, H.J., Overstreet, R.M. Annual changes in germinal epithelium determine male reproductive classes of the cobia. *J. Fish Biol.*, 60:178-202, 2002.
- Brown-Peterson, N.J., Lowerre-Barbieri, S.K., Macewicz, B.J., Saborido-Rey, F., Tomkiewicz, J., Wyanski, D.M. An improved and simplified terminology for reproductive classification in fishes. Fonte: Gulf Cost Research Laboratory – http://www.usm.edu/gcrl/research/gonadal_terminology.php. 2009.
- Busson-Mabillot, S. Endosomes transfer yolk proteins to lysosomes in the vitellogenic oocyte of the Trout. *Biol. Cell*, 51: 53-66, 1984.
- Callard, G.V. Endocrinology of Leydig cells in nonmammalian vertebrates. In: *The Leydig cell*. (Payne, A.H., Hardy, M.P., Russel, L.D. eds.), Vienna: Cache River Press. pp. 308-331, 1996.

- Callard, I.P., Callard, G.V., Lance, V., Bolaffi, J.L., Rosset, J.L., Rosset, J.S. Testicular regulation in nonmammalian vertebrates. *Biol. Reprod.*, 18: 16-43, 1978.
- Campos-da-Paz, R. Family Gymnotidae. In: *Checklist of the Freshwater Fishes of South and Central America* (Reis, R.E.; Kullander, S.O.; Ferraris, C.J. eds), Porto Alegre: Edipucrs, pp. 483-486, 2003.
- Campos-da-Paz, R. & Albert, J .S. The gymnotiform 'eels' of tropical América: a history of classification and phylogenetic studies of South American electric knifefishes (Teleostei, Ostariophysi). In: *Phylogeny and Classification of Neotropical Fishes* (Malabarba, L., Reis, R.E., Vari, R.P., de Lucena, C.A.S., de Lucena, Z.M.S., eds), Porto Alegre: Museu de Ciências e Tecnologia, pp. 401-417, 1998.
- Cauty, C. & Loir, M. The interstitial cells of the trout testis (*Oncorhynchus mykiss*): ultrastructural characterization and changes throughout the reproductive cycle. *Tissue Cell*, 27: 383-395, 1995.
- Cavaco, J.E., Bogerd, J., Goos, H., Schulz, R.W. Testosterone inhibits 11-ketotestosterone-induced spermatogenesis in African catfish (*Clarias gariepinus*). *Biology of reproduction*, 2001;65(6):1807-12.
- Chaves-Pozzo, E., Pelegrin, P., Mulero, V., Meseguer, J., Garcia-Ayala, A. A role for acidophilic granulocytes in the testis of the gilthead seabream (*Sparus aurata* L., Teleostei). *J. Endocrinol.* 179:165-174, 2003.
- Chaves-Pozzo, E., Mulero, V., Mesenguer, J., Ayala, A.G. Na overview of cell renewal in the testis throughout the reproductive cycle of a seasonal breeding teleost, the gilthead seabream (*Sparus aurata* L.). *Biol. Reproduc.* 72: 593-601, 2005.
- Cinquetti, R. & Dramis L. Histological, histochemical, enzyme histochemical and ultrastructural investigations of the testis of *Padogobius martensi* between annual breeding seasons. *J. Fish Biol.*, 63:1402-1428, 2003.
- Clérot, J.C. Les groupements mitochondriaux des cellules germinales des poissons téléostéens cyprinidés. I. Étude ultrastructurale. *J. Ultrastruct. Res.*, 54: 461-475, 1976.

- Cognato, D.P. & Fialho, C.B. (2006) Reproductive biology of a population of *Gymnotus aff. carapo* (Teleostei: Gymnotidae) from southern Brazil. *Neot. Ichthyol.*, 4: 339-348.
- Connaughton, M.A. & Aida, K. Female reproductive system, fish. In: *Encyclopedia of Reproduction*. (Knobil, E. & Neill, J.D. eds.), San Diego: Academic Press. v.2, pp. 193-205, 1998.
- Corriero, A., Desantis, S., Bridges, C.R., Kime, D.E., Megalofonous, P., Santamaria, N., Cirillo, F., Ventriglia, G., Di Summa, A., Deflorio, M., Campobasso, F., De Metrio, G. Germ cell proliferation and apoptosis during different phases of swordfish (*Xiphias gladius* L.) spermatogenetic cycle. *J. Fish Biol.* 70:83-99, 2007.
- Cruz-Höfling M.A. & Cruz-Landim C. Ultrastructural and histochemical studies on the Leydig and Sertoli cell homologues in the testis of *Triportheus elongatus* (Sardinhão) and *Mylossoma aureum* (Pacu). *Cytobios*, 41:161-174, 1984.
- Cuevas, M.E., Collins, K., Callard, G.V. Stage-related changes in steroid-converting enzyme activities in *Squalus* testis: synthesis of biologically active metabolites via 3β -hydroxysteroid dehydrogenase/isomerase and 5α -reductase. *Steroids*, 58:87-94, 1993.
- Dodd, J.M. The endocrine regulation of gametogenesis and gonad maturation in fishes. *Gen. Comp. Endocrinol.*, 3 (suppl.): 675-87, 1972.
- Dodd, J.M. & Sumpter, J.P. Fishes. In: *Marshall's physiology of reproduction*. (Churchill, G.E.L., ed.). New York: Academic Press. pp. 1-126, 1986.
- Drummond A. E. (2006) The role of steroids in follicular growth. *Reproductive Biology and Endocrinology*, 4-16.
- Eddy, E.M. Germ plasm and differentiation of the germ cell line. *Int. Rev. Cytol.*, 43: 229-280, 1975.
- Fishelson, L., Gon, O. Comparative oogenesis in cardinal fishes (Apogonidae, Perciformes), with special focus on the adaptive structures of the egg envelopes. *Environ. Biol. Fish.* 81: 397–414, 2008.

- França, G.F., Grier, H.J., Quagio-Grassiotto, I. A new vision of the origin and the oocyte development in the Ostariophysi applied to *Gymnotus* sp. (Teleostei, Gymnotiformes), artigo submetido.
- García-López, Á., Martínez-Rodríguez, G., Sarasquete, C. Male reproductive system in Senegalese sole *Solea senegalensis* (Kaup): anatomy, histology and histochemistry. *Histol. Histopathol.* 20:1179-1189, 2005.
- García-López, Á., Fernández-Pasquier, V., Couto, E., Canario, A.V.M., Sarasquete, C., Martínez-Rodríguez, G. Testicular development and plasm sex steroid levels in cultured male Senegalese sole *Solea senegalensis* Kaup. *Gen. Comp. Endocrinol.* 147:343-351, 2006.
- Gazola, R., Borella, M.I. Plasma testosterone and 11-ketotestosterone levels of male pacu *Piaractus mesopotamicus* (Cypriniformes, Characidae). *Braz. J. Med. Biol. Res.* 30(12): 1485-1487, 1997.
- González, A.O., Roux, J.P., Sanches, S. Evaluación de algunos aspectos biológicos de morena (*Gymnotus carapo*, Linnaeus 1758). Morfología e histología de ovário. *Corrientes: Universidad Nacional del Nordeste, Comunicaciones Científicas y Tecnológicas*, 2001. Disponible em: <www.unne.edu.ar/cyt/2001/4-Veterinarias/V-038.pdf>.
- Grier, H. J. Cellular organization of the testis and spermatogenesis in fishes. *Amer. Zool.*, 21: 345-357, 1981.
- Grier, H.J. Comparative organization of Sertoli cells including the Sertoli cell barrier. In: *The Sertoli cell*, (Russel, L.D. & Griswold, M.D., eds.), Clearwater: Cache River Press. pp. 704-730, 1993.
- Grier, H.J. Ovarian germinal epithelium and folliculogenesis in the Common Snook, *Centropomus undecimalis* (Teleostei: Centropomidae). *J. Morphol.*, 243: 265-281, 2000.
- Grier, H.J. The germinal epithelium: its dual role in establishing male reproductive classes and understanding the basis for indeterminate egg production in female fishes. In: *Proceedings of the fifty-third annual Gulf and Caribbean Fisheries Institute* (Creswell, R.L. ed.). Fort Pierce: Mississippi/Alabama Sea Grant Consortium. pp. 537-552, 2002.

- Grier, H.J., Taylor, R.G. Testicular maturation and regression in the common nook. *J. Fish Biol.* 53:521-542, 1998.
- Grier, H., Lo Nostro, F. The germinal epithelium in fish gonads: the unifying concept. In: Proceedings of the 6th International Symposium on the Reproductive Physiology of Fish (Norberg, B., Kjesbu, O.S., Taranger, G.L., Andersson, E., Stefansson, S.O., eds), Norway: University of Bergen. p 233-236, 2000.
- Grier, H.J.; Uribe, M.C.; Parenti, L.R., Rosa-Cruz, G. Fecundity, the germinal epithelium, and folliculogenesis in viviparous fishes. In: *Viviparous Fishes* (Uribe, M.C. & Grier, H.J., eds), New Life Publication. pp. 191-216, 2005.
- Grier, H.J., Uribe, M.C., Parenti, L. Germinal epithelium, folliculogenesis, and postovulatory follicles in ovaries of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum, 1972) (Teleostei: Protacanthopterygii, Salmoniformes). *J. Morphol.*, 268: 293-310, 2007.
- Grier H.J., Uribe M.C., Patiño R. (2009) The ovary, folliculogenesis, and oogenesis in Teleosts. In: *Reproductive Biology and Phylogeny of Fishes (Agnathans and Bony Fishes)* (B.G.M. Jamieson, ed). Enfield, New Hampshire: Science Publishers. pp. 25-84.
- Guimarães, A.C.D. & Quagio-Grassiotto, I. Ultrastructural aspects of oogenesis and oocyte primary growth in *Serrasalmus spilopleura* (Teleostei, Characiformes, Serrasalminae). *Tissue Cell*, 33: 241-248, 2001.
- Guimarães, A.C.D. & Quagio-Grassiotto, I. The ultrastructural aspects of vitellogenesis or oocyte secondary growth in *Serrasalmus Spilopleura* (Teleostei, Characiformes, Serrasalminae). *J. Submicrosc. Cytol. Pathol.*, 34: 199-206, 2002.
- Guimarães, A.C.D. & Quagio-Grassiotto, I. Cytochemical characterization of the endomembranous system during the oocyte primary growth in *Serrasalmus spilopleura* (Teleostei: Characiformes: Characidae). *Tissue Cell*, 37: 413-422, 2005.

- Guraya, S.S. Recent advances in the morphology, histochemistry and biochemistry of steroid-synthesizing cellular sites in the testes of nonmammalian vertebrates. *Int. Rev. Cytol.*, 47: 99–136, 1976.
- Guraya, S.S. *The cell and molecular biology of fish oogenesis*. Basel, Ed. Sauer, H. W. Karger. 223 p. 1986.
- Guraya, S.S. *Comparative cellular and molecular biology of testis in vertebrates. Trends in endocrine, paracrine and autocrine regulation of structure and functions*. Enfield, Science Publishers, Inc. 91p. 2001.
- van den Hurk R., Peute J. & Vermeij J.A.J. Morphological and enzyme cytochemical aspects of the testis and vas deferens of the rainbow trout, *Salmo gairdneri*. *Cell Tissue Res.*, 186:309-325, 1978.
- Iwamatsu, T., Ohta, T., Oshima, E., Sakai, N. Oogenesis in the medaka *Oryzias latipes*: Stages of oocyte development. *Zool. Sci.* 5: 353–373, 1988.
- Khan, I.A. & Thomas P. Ovarian cycle, teleost fish. In: *Encyclopedia of reproduction*. (Knobil, E. & Neill, J. D. eds.). San Diego, Academic Press. v.3, pp. 552-564, 1998.
- Kime, D.E. 'Classical' and 'non-classical' reproductive steroids in fish. *Rev. Fish. Biol. Fish.*, 3: 160-180, 1993.
- Kobayashi, T., Chang, X-T., Nakamura, M., Kajiura, H., Nagahama, Y. Fish 3 β -hydroxysteroid dehydrogenase/ Δ 5- Δ 4 isomerase: antibody production and their use for the immunohistochemical detection of fish steroidogenic tissues. *Zool. Sci.*, 13: 909-914, 1996.
- Kobayashi, T., Nakamura, M., Kajiura-Kobayashi, H., Young, G., Nagahama, Y. Immunolocalization of steroidogenic enzymes (P450scc, P450c17, P450arom, and 3 β -HSD) in immature and mature testes of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Cell Tissue Res.*, 292: 573-577, 1998.
- Kobayashi, M., Nakanishi, T. 11-ketotestosterone induces male-type sexual behavior and gonadotropin secretion in gynogenetic crucian carp, *Carassius auratus langsdorfii*. *Gen. Comp. Endocrinol.*, 115: 178–187, 1999.

- LeGac, F. & Loir, M. Male reproductive system, fish In: *Encyclopedia of reproduction*. (Knobil, E. & Neill, J. D., eds.), San Diego: Academic Press. v. 3, pp. 20-30, 1998.
- Le Menn, F., Cerdà, J., Babin, P.J. 2007. Ultrastructural aspects of the ontogeny and differentiation of ray-finned fish ovarian follicles. Pp. 1-37. In: Babin, P.J., J. Cerdà & E. Lubzens (Eds). *The Fish Oocyte: From Basic Studies to Biotechnological Applications*. Dordrecht, Springer. 508p.
- Lejeune, H., Chuzel, F., Thomas, T., Avallet, O., Habert, R., Durand, P., Saez, J. Paracrine regulation of Leydig cells. *Annals Endocrinol.* 57: 55–63, 1996.
- Loir, M. Interstitial cells from the testis of the trout (*Oncorhynchus mykiss*) in vivo and in primary culture. *Cell Tissue Res.*, 261: 133-144, 1990.
- Loir, M. Spermatogonia of rainbow trout. II In vitro study of the influence of pituitary hormones, growth factors and steroids on mitotic activity. *Mol. Reprod. Develop.*, 53:434-442, 1999.
- Loir, M., Cauty, C., Planquette, P., Le Bail, P.Y. Comparative study of the male reproductive tract in seven families of South-American catfishes. *Aquat. Living Resour.*, 2: 45-56, 1989a.
- Loir, M., Margeridon, A., Cauty, C. Leydig cells in *Myleus ternetzi* testes. *Aquat. Living Resour.*, 2: 57-61, 1989b.
- Loir, M., Sourdain, P., Mendis-Handagama, S.M.L.C., Jégou, B. Cell-cell interactions in the testis of teleosts and elasmobranchs. *Microsc. Res. Tech.*, 32: 533-552, 1995.
- Lo Nostro, F.L., Antoneli, F.N., Quagio-Grassiotto, I., Guerrero, G.A. Testicular interstitial cells, and steroidogenic detection in the protogynous fish, *Synbranchus marmoratus* (Teleostei, Synbranchidae). *Tissue Cell*, 36: 221-231, 2004.
- Lokman, P.M., Harris, B., Kusakabe, M., Kime, D.E., Schulz, R.W., S. Adachi and G. Young, 11-oxygenated androgens in female teleosts: prevalence, abundance, and life history implications. *Gen. Comp. Endocrinol.* 129: 1–12, 2002.

- Lubzens, E., Young, G., Bobe, J., Cerdà, J. Oogenesis in teleosts: How fish eggs are formed. *Gen. Comp. Endocrinol.* 165:365-389, 2010.
- Mago-Leccia, F. *Electric Fishes of the Continental Waters of America*. Biblioteca de la Academia de Ciencias Físicas, Matemáticas, y Naturales, Venezuela, 29: 1-206, 1994.
- Marshall, A. J. & Lofts, B. The Leydig-cell homologue in certain teleost fishes. *Nature*, 177: 704-705, 1956.
- Martyniuk, C.J., Gallant, N.S., Marlatt, V.L., Wiens, S.C., Woodhouse, A.J., Trudeau, V.L., Current perspectives on 17 β -estradiol (E₂) action and nuclear estrogen receptors (ER) in teleost fish. In: *Fish Endocrinology* (Reinecke, M., Zaccone, G., Kapoor, B.G., Eds), Enfield, Science Publishers. v. 2, pp. 625–663, 2006.
- Matsubara, T., Nagae, M., Ohkubo, N., Andoh, T., Sawaguchi, S., Hiramatsu, N., Sullivan, C.V., Hara, A. Multiple vitellogenins and their unique roles in marine teleosts. *Fish Physiol. Biochem.*, 28: 295-299, 2004.
- Mayer, I., Borg, B., Schulz, R., Seasonal changes in and effect of castration and androgen replacement on the plasma levels of five androgens in the male three-spined stickleback, *Gasterosteus aculeatus* L. *Gen. Comp. Endocrinol.* 79: 23–30, 1990.
- Mazzoni TS, Grier HJ, Quagio-Grassiotto I. Germline cysts and the formation of the germinal epithelium during female morphogenesis in *Cyprinus carpio* (Teleostei: Ostariophysi: Cypriniformes). *Anat Rec: in press*.
- Miura, T. Spermatogenetic cycle in fish. In: *Encyclopedia of reproduction*. (Knobil, E. & Neill, J. D. eds.), San Diego: Academic Press. v. 4, pp. 571-578, 1998.
- Miura, Y., Yamauchi, K., Takahashi, H., Nagaham, Y. Involvement of steroid hormones in gonadotropin induced testicular maturation in male Japanese eel (*Anguilla japonica*). *Biomed. Res.* 12:241-248, 1991.
- Miura, T., Miura, C., Yamauchi, K. and Nagahama, Y. Human recombinant activin induces proliferation of spermatogonia in vitro in the Japanese eel *Anguilla japonica*. *Fisheries Sci.* 63: 434–437, 1995.

- Miura, C., Miura, T., Yamashita, M., Yamauchi, K., Nagahama, Y. Hormonal induction of all stages of spermatogenesis in germ-somatic cell coculture from immature Japanese eel testis. *Develop. Growth Differ.* 38:257-262, 1996.
- Miura, T., Kawamura, S., Miura, C. and Yamauchi, K. Impaired spermatogenesis in the Japanese eel, *Anguilla japonica*: Possibility for the existence of factors that regulate entry of germ cells into meiosis. *Dev. Growth. Differ.* 39: 685–691, 1997.
- Miura, T., Miura, C., Ohta, T., Nader, M.R., Todo, T. and Yamauchi, K. Estradiol-17 β stimulates the renewal of spermatogonial stem cells in males. *Biochem. Biophys. Res. Com.* 264: 230–234, 1999.
- Miura, T. & Miura, C.I. Molecular control mechanisms of fish spermatogenesis. *Fish Physiol. Biochem.*, 28: 181-186, 2003.
- Miura, C., Higashino, T., Miura, T. A progestin and an estrogen regulate early stages of oogenesis in fish. *Biol. Reprod.*, 77(5): 822-828, 2007.
- Nagahama, Y. The functional morphology of teleost gonads. In: *Fish physiology*. (Hoar, W. S.; Randall, D. J.; Donaldson, E. M., eds.), New York: Academic Press. v. IX, chap. 6, 1983.
- Nagahama, Y., Miura, T., Kobayashi, T., Ding, J. The Role of Activin in Spermatogenesis in Fish. *Springer-Verlag*, New York, pp. 196–203, 1997.
- Nagahama, Y. Gonadal steroid hormones: major regulators of gonadal sex differentiation and gametogenesis in fish. In: *Proc. Sixth Int. Symp. Reprod. Physiol. Fish.* (Norberg, B., Kjesbu, O.S., Taranger, G.L., Anderson, E., Stefansson, S.O., eds). Univ. Bergen. pp 211–222, 2000.
- Nakamura, I., Kusakabe, M., Young, G. Regulation of steroidogenic enzyme mRNA in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) ovarian follicles in vitro. *Fish. Physiol. Biochem.*, 28:355-356, 2003.
- Nakatani, K., Agostinho, A.A, Baumgartner, G., Bialetzki, A., Sanches, P.V., Makrakis, M.C., Pavanelli, C.S. Ovos e larvas de peixes de água doce: desenvolvimento e manual de identificação. EDUEM. Maringá. 378 pp., 2001.
- Nelson, J.S. Fish of the World. 4nd. Ed. New York: Wiley-Interscience, 624pp. 2006.

- Nóbrega, R.H., Quagio-Grassiotto, I. Morphofunctional changes in Leydig cells throughout the continuous spermatogenesis of the freshwater teleost fish, *Serrasalmus spilopleura* (Characiformes, Characidae): an ultrastructural and enzyme study. *Cell Tissue Res.*, 329: 339-349, 2007.
- Nóbrega, R.H., Batlouni, S.R., França, L.R. An overview of functional and stereological evaluation of spermatogenesis nad germ cell transplantation in fish. *Fish Physiol. Biochem.*, 35: 197-206, 2009.
- van Oordt, P.G.W.J., Peute, J. The cellular origin of pituitary gonadotropins in teleosts. In: *Fish Physiology* (Hoar, W.S., Randall, D.J., Donaldson, E.M., eds). Academic Press, New York, pp 137–186, 1983.
- Parenti, L.R. & Grier, H.J. Evolution and phylogeny of gonad morphology in bony fishes. *Integr. Comp. Biol.*, 44: 333-348, 2004.
- Parikh, V.N., Clement, T.S., Fernald, R.D. Androgen level and male social status in the African cichlid, *Astatotilapia burtoni*. *Behavioural Brain Res.*, 166: 291–295, 2006.
- Patiño, R. & Sullivan, C.V. Ovarian follicle growth, maturation, and ovulation in teleost fish. *Fish Physiol. Biochem.*, 26: 57-70, 2002.
- Payne, A.H., Hardy, M.P., Russell, L.D. (1996). *The Leydig cell*. 1st Ed. Vienna: Cache River Press.
- Peter, R.E., Yu, K.L. Neuroendocrine regulation of ovulation in fishes: basic and applied aspects. *Rev. fish biol. Fish.* 7: 173-197, 1997.
- Pina, T., Esteves, E., Andrade, J.P. Gross and histological observations of ovarian development in twaite shad, *Alosa fallax fallax*, from the Rivers Mira and Guadiana (Portugal). *Sci. Mar.* 63(7):313-322, 2003.
- Pudney, J. Comparative cytology of the non-mammalian vertebrate Sertoli cell. In: *The Sertoli cell*. (Russell, L. D. & Griswold, M. D., eds.), Clearwater: Cache River Press. pp. 612-657, 1993.
- Pudney, J. Spermatogenesis in nonmammalian vertebrates. *Microsc. Res. Techn.*, 32: 459-497, 1995.

- Pudney J. Leydig and Sertoli cells, nonmammalian. In: *Encyclopedia of Reproduction* (Knobil E, Neill JD, eds) San Diego: Academic Press. v. 2., p 1008-1020, 1999.
- Pudney, J. Comparative cytology of the Leydig cell. In: *The Leydig cell*. (Payne, A. H.; Hardy, M. P.; Russel, L. D., eds.), Vienna: Cache River Press. pp. 98-142, 1996.
- Quagio-Grassiotto, I., Guimarães, A.C.D. Follicular epithelium theca and egg envelope formation in *Serrasalmus spilopleura* (Teleostei, Characiformes, Characidae). *Acta Zool.* (Stockholm), 84: 121-129, 2003.
- Quintero-Hunter, I., Grier, H.J., Muscato, M. Enhancement of histological detail using metanil yellow as counterstain in periodic acid Schiff's hemotoxylin staining of glycol methacrylate tissue sections. *Biotech. Histochem.* 66: 169–172, 1991.
- Roberts, S.B., Jackson, L.F., King, W., Taylor, R.G., Grier, H.J., Sullivan, C.V. Annual reproductive cycle of the common snook: endocrine correlates of maturation. *Trans. Amer. Fish. Soc.* 128:436-445, 1999.
- Santos, H.B., Rizzo, E., Bazzoli, N., Sato, Y., Moro, L. Ovarian regression and apoptosis in the south American teleost *Leporinus taeniatus* Lütken (Characiformes, Anostomidae) from the São Francisco Basin. *J. Fish Biol.* 67:1446-1459, 2005.
- Schulz, R.W. & Miura, T. Spermatogenesis and its endocrine regulation. *Fish Physiol. Biochem.*, 26: 43-56, 2002.
- Schulz, R.W. Endocrine regulation of spermatogenesis in teleost fish. *ARBS Ann. Rev. Biom. Sc.*, 5: 57-58, 2003.
- Schulz, R.W., França, L.R., Lareyre, J-J., LeGac, F., Chiarini-Garcia, H., Nóbrega, R.H., Miura, T. Spermatogenesis in fish. *Gen. Comp. Endocrinol.*, 165:390-411, 2010.
- Selman, K. & Wallace, R.A. Gametogenesis in *Fundulus heteroclitus*. *Am. Zool.*, 26: 73-192, 1986.
- Selman, K. & Wallace, R.A. Cellular aspects of oocyte growth in teleosts. *Zool. Sci.*, 6: 211-231, 1989.

- Shanbhag, A.B. & Nadkarni, V.B. Histological and histochemical studies on the testicular cycle of a fresh water teleost *Channa gachua* (Hamilton). *Anat. Anz.*, 146: 381-389, 1979.
- Silva, M. Morfologia ultra-estrutural do testículo, cinética da espermatogênese e barreira hemo-testicular da tilapia do nilo, *Oreochromis niloticus* (Peixe, Ciclídeo). Tese de Doutorado, Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, 1987.
- Stifani, S., Le Menn, F., Rodriguez, J.N., Scheider, W.J. Regulation of oogenesis: the piscine receptor for vitellogenin. *Biochim. Biophys.*, 1045: 271-279, 1990.
- Tokarz, R.R. Oogonial proliferation, oogenesis, and folliculogenesis in nonmammalian vertebrates. In: *The vertebrate ovary*. (Jones, R. E., ed.), New York: Plenum Press. pp.145-179, 1978.
- Toury, R., Clérot, J.C., André, J. Les groupements mitochondriaux des cellules germinales des poissons téléostéens cyprinides. IV. Analyse biochimique des constituants du "ciment" intermitochondrial isolé. *Biol. Cell*, 30: 225-232, 1977.
- Tyler, C.R., Sumpter, J.P. Oocyte growth and development in teleosts. *Rev. Fish Biol. Fisher.*, 6: 287-318, 1996.
- Vazzoler, A.E.A.M. *Biologia da reprodução de peixes teleósteos. Teoria e Prática*. EDUEM, Maringá, 169 p., 1996.
- Venkatesh, B. Evolution and diversity of fish genomes. *Curr Opin Gen. Dev.*, 13:588–592, 2003.
- van Vuren J.H.J., Soley J.T. Some ultrastructural observations of Leydig and Sertoli cells in the testis of *Tilapia rendalli* following induced testicular recrudescence. *J. Morphol.*, 206: 57-63, 1990.
- Wallace, R.A. Vitellogenesis and oocyte growth in nonmammalian vertebrates. In: *Developmental Biology*. (Browder, L. W., ed.), New York: Plenum Press. v. 1, pp.127-177, 1985.
- Wallace, R.A., Selman, K. Cellular and dynamic aspects of oocyte growth in teleosts. *Scien. Zool.*, 21: 325-343, 1981.
- Wallace, R.A., Selman, K. Ultrastructural aspects of oogenesis and oocyte growth in fish and amphibians. *J. Electron Microsc. Tech.*, 16: 175-201, 1990.

- Weltzien, F.-A., Taranger, G.L., Karlsen, Ø., Norberg, B., Testicular development and plasma androgen levels in Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus* L.). *Comp. Biochem. Physiol. A*, 132: 567–575, 2002.
- Weltzien, F.-A., Andersson, E., Andersson, Ø., Shalchian-Tabrizi, K., Norberg, B. The brain–pituitary–gonad axis in male teleosts, with special emphasis on flatfish (Pleuronectiformes). *Comp. Biochem. Physiol. A*, 137: 447-477, 2004.
- West, G. Methods of assessing ovarian development in fish: a review. *Aust. J. Mar. Freshw. Res.*, 41: 199-222, 1990.
- Yaron, Z. Demonstration of 3 β -hydroxysteroid dehydrogenase in the testis of *Tilapia mossambica* (Cichlidae, Teleostei). *J. Endocrin.*, 34:127-128, 1966.
- Zakon, H.H., Thomas, P., Yan, H.-Y. Electric organ discharge frequency and plasma sex steroid levels during gonadal recrudescence in a natural population of the weakly electric fish *Sternopygus macrurus*. *J. Comp. Physiol. A*, 169: 493-499, 1991.

13. ANEXO 1

TRABALHO SUBMETIDO À REVISTA: NEOTROPICAL ICHTHYOLOGY

A NEW VISION OF THE ORIGIN AND THE OOCYTE DEVELOPMENT IN THE OSTARIOPHYSI APPLIED TO *GYMNOTUS* SP. (TELEOSTEI, GYMNOTIFORMES)

Gisleine Fernanda França^{1,2}, Harry J. Grier³, Irani Quagio-Grassiotto^{2*}

¹Graduate Program on the Cell and Structural Biology, Institute of Biology, UNICAMP, Campinas-SP, Brazil

²Department of the Morphology, Institute of Biosciences of the Botucatu, UNESP, Botucatu-SP, Brazil

³Florida Fish and Wildlife Research Institute, St. Petersburg, FL, United States

*Correspondence to: Irani Quagio-Grassiotto, Departamento de Morfologia, Instituto de Biociências de Botucatu, IBB-UNESP. Distrito de Rubião Jn, s/n. 18618000. Botucatu-SP, Brasil. Fax 55-14-38116264. E-mail: iraniqg@ibb.unesp.br

Running title: Origin and oocyte development in *Gymnotus* sp.

ABSTRACT

A new vision on the origin of oocytes and their development in the Ostariophysi, *Gymnotus* sp. is described and compared to those of marine perciform species that scatter pelagic eggs. In both *Gymnotus* sp. and marine perciform fish, oogonia are found in the germinal epithelium that forms the surface of the ovarian lamellae. At the commencement of folliculogenesis, proliferation of oogonia and their entrance into meiosis gives rise to germ cell nests that extend into the stroma from the germinal epithelium. Both cell nests and the germinal epithelium are supported by the same basement membrane that separates them from the stroma. At the time of meiotic arrest, oocytes in a cell nest become separated one from the other as processes of prefollicle cells, these being derived from epithelial cells in the germinal epithelium, gradually encompass and individualize them while also synthesizing a basement membrane around themselves during folliculogenesis. The oocyte enters primary growth while still within the cell nest. At the completion of folliculogenesis, the oocyte and follicle cells, composing the follicle, are encompassed by a basement membrane. The follicle remains connected to the germinal epithelium as the both share a portion of common basement membrane. Cells originating from the stroma encompass the ovarian follicle, except where there is a shared basement membrane, to form the theca. The follicle, basement membrane and theca form the follicular complex. Oocyte development occurs inside the follicular complex. Development is divided into the stages primary and secondary growth, oocyte maturation and ovulation. Cortical alveoli appear in the ooplasm just prior to the beginning of secondary growth, the vitellogenic stage that begins with yolk deposition and proceeds until the oocyte is full-grown and the ooplasm is filled with yolk globules. Maturation is characterized by the germinal vesicle or nuclear migration, germinal vesicle breakdown or nuclear envelop fragmentation and the resumption of meiosis. At the ovulation the egg is released from the follicular complex into the ovarian lumen. When compared to marine

Perciformes that lay pelagic eggs, oocyte development in *Gymnotus* sp. has fewer steps within the stages of development, the three most remarkable being the absence of oil droplet formation during primary and secondary growth, the fusion of the droplets to form an oil globule during maturation and the hydrolysis of yolk preceding ovulation.

KEYWORDS: Folliculogenesis, primary and secondary growth, maturation and ovulation, oocytes of *Gymnotus* sp.

RESUMO

Numa nova abordagem, a origem e o desenvolvimento dos oócitos no Ostariophysi, *Gymnotus* sp. são aqui descritos e comparados com aqueles dos Perciformes marinhos com ovos pelágicos. Da mesma maneira que ocorre nos Perciformes em *Gymnotus* sp. as oogônias são encontradas no epitélio germinativo que margeia as lamelas ovígeras. No início da foliculogênese, a proliferação das oogônias e sua entrada em meiose dão origem a ninhos de células germinativas que se projetam em direção ao estroma ovariano, a partir do epitélio germinativo. Os ninhos e o epitélio germinativo são suportados pela mesma membrana basal que os separa do estroma. Coincidindo com a paralisação da meiose os oócitos, presentes nos ninhos, são separados uns dos outros por processos citoplasmáticos das células pré-foliculares. As células pré-foliculares derivam do epitélio germinativo sendo, portanto, inicialmente células epiteliais. Durante a foliculogênese, ao mesmo tempo em que envolvem os oócitos individualizando-os, as células pré-foliculares sintetizam a membrana basal ao seu redor. Os oócitos entram em crescimento primário ainda dentro dos ninhos. Ao término da foliculogênese, o oócito e as células foliculares que compõem o folículo são circundados pela membrana basal. O folículo permanece conectado ao epitélio germinativo uma vez que ambos compartilham uma porção comum da membrana basal. Células oriundas do estroma circundam o folículo

ovariano exceto na região de compartilhamento da membrana basal formando a teca. O folículo, a membrana basal e a teca formam o complexo folicular. O desenvolvimento do oócito ocorre dentro do complexo folicular e compreende os estágios de crescimento primário e secundário, maturação e ovulação. Os alvéolos corticais surgem no ooplasma momentos antes do início do crescimento secundário ou estágio vitelogênico que tem início com a deposição de vitelo, progride até o oócito esteja completamente desenvolvido e o ooplasma preenchido pelos glóbulos de vitelo. A maturação é caracterizada pela migração do núcleo ou vesícula germinativa, pela quebra da vesícula germinativa, ou seja, pela fragmentação do envoltório nuclear e, retomada da meiose. Na ovulação o ovo é liberado do complexo folicular para o lúmen ovariano. Em comparação com os Perciformes marinhos com ovos pelágicos, o desenvolvimento oocitário em *Gymnotus* sp. tem menos etapas dentro dos estágios de desenvolvimento, sendo as três mais notáveis delas as ausências da formação das gotas de lipídio durante os crescimentos primário e secundário, a fusão das gotas para formar um único glóbulo de lipídio durante a maturação e, a hidrólise do vitelo antecedendo a ovulação.

PALAVRAS CHAVE: Foliculogênese, crescimento primário e secundário, maturação e ovulação, oócitos de *Gymnotus* sp.

INTRODUCTION

Oocyte growth and maturation are well known processes in fish oocytes and are used to determine the phase of ovarian development during the spawning cycle. Oocyte growth can be divided into a previtellogenic stage or primary growth, and into a secondary growth stage known as vitellogenesis (Patiño & Sullivan, 2002; Grier *et al.*, 2009). During the previtellogenic period, a large amount of RNA accumulates in the cytoplasm of the oocyte, membranous organelles proliferate, and in many species, primarily those that scatter eggs in saltwater, oil droplets

appear around the nucleus. At the end of the previtellogenic stage, cortical alveoli are formed within the oocytes of many species, excepting killifish where cortical alveoli are the first significant structures to form in the ooplasm (Selman & Wallace, 1989). The deposition of yolk globules and the thickening of the zona pellucida, that begins to form during the latter part of primary growth, characterize vitellogenesis or secondary growth stage (Wallace & Selman, 1981, 1990; Selman & Wallace, 1989). During secondary growth, vitellogenin, synthesized by the hepatocytes and released into the blood, is incorporated by the oocyte via a receptor mediated process, and gives rise to yolk globules (see Patiño & Sullivan, 2002; Le Menn *et al.*, 2007; Grier *et al.*, 2009 for reviews). During the final part of oocyte development known as oocyte maturation, the germinal vesicle (the nucleus) migrates to the animal pole where the micropyle is located. During oocyte maturation in the major saltwater species of fish, the oil droplets that form during primary and secondary growth progressively fuse, becoming larger oil globules until only one large globule remains. In pelagophil species, the yolk globules also fuse preceding ovulation, resulting from a pronounced proteolysis of the vitellogenin-derived yolk proteins whose amino acids become osmotically active. Via osmosis the oocyte hydrates. In the benthophil species, yolk-protein proteolysis is limited and oocyte hydration is more modest (LaFleur *et al.*, 2005). Oocyte development occurs inside the follicular complex (Grier *et al.*, 2009) formed by the oocyte that is surrounded by the follicle cells, a basement membrane and the thecal cell layers (see Grier *et al.*, 2009 for review).

Compared to oocyte development, the origin of the oocytes and the formation of the follicles in which they develop are not well studied. Folliculogenesis occurs in cell nests within the germinal epithelium that borders the ovary lumen. The nests are composed by proliferating oogonia and early prophase oocytes (see Grier *et al.*, 2009 for review).

Despite the fact that the literature on oocyte development in fish is vast, there is no standard consensus regarding the nomenclature used to characterize the different aspects of oocyte development. The usage of non-standardized nomenclature has generated many difficulties in communication among the

scholarly. Recently, a staging schema of oogenesis in fish has been developed that could be applied to the oocyte development in many species of fish (Grier *et al.*, 2009) with appropriate modifications. The schema is based on the morphological and physiological events taking place during fish oogenesis and reflects the cellular alterations occurring in the oocyte between its differentiation from an oogonium to ovulation as an egg.

Among the Ostariophysi, the order Gymnotiformes is the least known regarding its reproductive biology. Gymnotiformes, the South American electric fish, is a fascinating assemblage of freshwater fishes that share the unusual ability to produce and sense electric fields used for electrolocation and social communication. These fishes, like the catfishes, have nocturnal habits and are found throughout the humid neotropical region in most lowland aquatic environments from the South of Mexico to the North of Argentina (Mago-Leccia, 1994; Alves-Gomes *et al.*, 1995).

Herein, the origin of and development of oocytes in the Gymnotiformes, *Gymnotus* sp, were studied using high resolution light microscopy. Additional ultrastructural information is also provided. Considering the difficulties in communication generated by the usage of non-standardized nomenclature, this study has used the staging schema of oogenesis developed by Grier *et al.* (2009).

MATERIAL AND METHODS

Sexually mature females of *Gymnotus* sp. were collected monthly in the Tiete River (S 22°41'00.9" W 48°19'58.1"), São Paulo State, Brazil, from September 2006 to April 2008. The specimens were anaesthetized with 0.1% benzocaine and killed according to the institutional animal care protocols and approval. Their ovaries were quickly removed and fixed by immersion in 2% glutaraldehyde and 4% paraformaldehyde in Sorensen's phosphate buffer (0.1 M, pH 7.2) for at least 24h.

For light microscopy, ovaries were dehydrated in ethanol and embedded in historesin (Technovit 7100). Sections (3-5 µm) were stained with toluidine blue 0.5 % and periodic-acid-Schiff (PAS)/haematoxylin/metanil yellow (Quintero-Hunter *et al.*, 1991). Toluidine blue is a metachromatic basic dye used at different pH to detect

acid polysaccharides mainly those that are highly sulphated. Acid polysaccharides are stained lilac. As a basic dye, toluidine blue also reacts with the nucleic acids that stain in distinctive hues from blue. The PAS method by itself (Pearse, 1985) or associated with other dyes (Quintero *et al.*, 1991) is used to detect neutral polysaccharides. Neutral polysaccharides are stained in magenta.

Gonadal tissues were evaluated using a computerized image analyser (Leica Qwin 2.5).

For electron microscopy, ovaries were post-fixed for 2h in the dark in 1% osmium tetroxide (in the same buffer). In order to highlight the cellular structures, block-staining was carried out using an aqueous solution of 5% uranyl acetate for 2h. Subsequently, the specimens were dehydrated and embedded in Araldite, sectioned and post-stained with a saturated solution of uranyl acetate in 50% ethanol and 0.2% lead citrate in NaOH (1N). Electromicrographs were obtained using a Philips - CM 100 transmission electron microscope.

RESULTS

Folliculogenesis

The cystovarian ovary of *Gymnotus* sp. has numerous lamellae that project into the ovarian lumen; the lamellar surface is the germinal epithelium. The germinal epithelium is formed by squamous epithelial cells among which are single oogonia. The scattered oogonia characterize the discontinuity of the germ cell component in the epithelium. The single oogonium in the epithelium has an ovoid and slightly basophilic nucleus and a clear cytoplasm. In the epithelium, oogonia are surrounded by the flattened epithelial cells that have an elongated nucleus, rest upon the basement membrane and isolate the oogonia from the ovary lumen (Fig.1A).

Proliferation of an oogonium gives rise to cell clusters, the germ cell nests, that protrude into the stroma but remain separated from it by the basement membrane. The generations of oogonia within cell nests are large and differ from those that are quiescent in the epithelium by having a spherical and voluminous nucleus with a distinctive nucleolus (Fig.1B). These oogonia are gradually

individualized by prefollicle cells that are derived from epithelial cells in the epithelium; they surround the oogonia, separating them one of another (Fig.1B). In the nests, individualized oogonium proliferate by mitosis giving rise to cell clusters that remain together. The cell nests are in the epithelium and are limited by the basement membrane (Fig.1C). Oogonia in the same clusters simultaneously enter into meiosis, becoming prophase oocytes that are maintained in organized clusters (Figs 1D, E). Leptotene and zygotene oocytes can be distinguished by their distinctive pattern of chromatin organization (Fig.1D), and the bivalent chromosomes of pachytene oocytes are distinctly visualized (Fig.1E). In a same cell nest, oogonia may co-occur along with clusters of prophase oocytes (Fig.1E). The late pachytene oocytes are increasingly individualized by cells derived from the epithelium, the prefollicle cells, and at the time of meiotic arrest and the formation of the ovarian follicle, they become separated from nests (Figs 1F, G). While still inside the nests, the oocyte can enter in primary growth as indicated by an enhancement of cytoplasmic basophilia (Fig.1G). The ovarian follicles are forming during early diplotene when the oocyte is surrounded by the follicle cells that rest upon a thin basement membrane. Ovarian follicles that leave the nest, being separated from it by a basement membrane, remain attached to the lamellar epithelium by the basement membrane (Figs 3A, C, D, E, F, H). Both the follicle and the germinal epithelium share a common length of basement membrane. In newly individualized oocytes the synthesis of RNAs is intense and can be first detected by a basophilic ring along the nuclear envelop and by the progressive enhancement of cytoplasmic basophilia (Figs 1G, H) or electron density (Figs 4A, B, C).

The primary growth stage

During oocyte primary growth, the thecal layers become organized as the follicular complex is formed. Preceding and coincident with the formation of the thecal layers, the basement membrane continues to be synthesized. The basement membrane is a multilayered structure and is synthesized layer by layer by the follicle cells before the formation of the zona pellucida (Fig.4A, B). The initial components of the basement membrane are first deposited upon the basal plasma

membranes of the follicle cells, and then additional layers are progressively added to this first-formed basement membrane. A contribution of the epithelial cells to the building of the basement membrane in the shared regions could occur (Figs 4E, H). The just-formed follicular complex is composed of the developing oocyte that is surrounded by a layer of follicle cells. These are encompassed by the basement membrane and by the thecal layers (Figs 2A; 4A, B, D, E).

In the early primary growth or previtellogenic oocytes, nucleolar amplification results in production of multiple nucleoli that become oriented in a perinuclear position (perinuclear oocyte or perinucleolar step of primary growth). With the continuous synthesis of RNAs and their transport from the nucleus, the ooplasm becomes progressively more basophilic (Fig.1D). As the previtellogenic oocytes develop, cellular organelles proliferate and mitochondrial clusters, initially localized in the proximity of the nucleus, scatter throughout the cytoplasm and become primarily localized at the oocyte periphery (Fig.4C). The areas where the proliferating membranous organelles agglomerate correspond, using light microscopy, to the Balbiani bodies, and their dispersion (Figs 4A, C, D, F, G) throughout the oocyte gives to the ooplasm a fissured, mottled appearance (Fig.2A). During this period, oocytes increase in size and their cytoplasmic basophilia becomes intense (Fig.2A).

As the basement membrane is being formed at the beginning of primary growth, microvilli appear along the oolema and along the plasma membrane of the follicle cells that face the oocyte (Figs 5A, B, C, D). Around the microvillus, electron dense material is progressively deposited giving rise to the zona pellucida (Figs 5E, F). Using metanil-yellow staining, the zona pellucida is seen as a yellow layer surrounding the oocyte which becomes thicker during oocyte growth. A yellow hue after metanil-yellow staining is a characteristic of protein structures (Figs 2C, E, F). The micropyle, a discontinuity in the zona pellucida, is occupied by the micropylar cell (Fig. 2E-inset).

As the oocyte increases in size, there is an accompanied decrease in ooplasmic basophilia (Figs 2A, B, C), and the oocyte enters into the cortical alveolar step of primary growth (Figs 2A, B). Initially, this is marked by the

appearance of clear and large vesicles scattered throughout the ooplasm. Using electron microscopy, the vesicles that compose the cortical alveoli can be detected very early during the primary growth stage, at the time of the zona pellucida begins its formation, and the thecal layers complete their organization (Figs 5A, C, D, E). In the histological preparation stained by toluidine blue, the initial cortical alveolar vesicles are detected by their lilac hue (Fig.2B-inset) and later their contents does not change. This is a characteristic of acid polysaccharides (Fig.2D). The number of cortical alveolar vesicles increases during primary growth, and they become localized at the oocyte periphery in a multilayered structure composed of different sizes of alveoli (Figs 2D, E, F). Viewed with electron microscopy the vesicles have a low electron density and fibrillar structure that reinforces their polysaccharidic nature (Figs 6A, B). At this time, the nuclear outline becomes irregular (Fig.2E). Close to the oolema, cortical alveoli continue to be formed and fuse to one another, and the zona pellucida becomes well developed (Figs 2E; 6A).

The secondary growth or vitellogenesis stage

The start of the secondary growth is marked by the uptake of vitellogenin. Using electron microscopy, the beginning of the vitellogenic stage can be appreciated by the transport of highly electron dense particles in the intercellular space between the follicle cells and their accumulation at the external face of the zona pellucida and their appearance inside the oocyte close to the oolema. These particles fuse to one another and scatter throughout the ooplasm (Figs 6C, E). Coinciding with start of vitellogenesis, the follicle cells become cuboidal (Fig.6E). In the follicular complex, some special thecal cells are observed in which the mitochondria are similar to those found in the steroidogenic cells (Fig.6D). In histological preparations of the early vitellogenic/yolked oocytes, small yolk globules appear at the ooplasm periphery and progressively advance among the cortical alveoli. Due to their protein contents, the yolk globules stain a yellow hue with metanil-yellow (Figs 3A, B). As vitellogenesis advances, the number of the yolk globules increases greatly, as does the size of the oocyte. The yolk globules fuse to one another, have an irregular outline and are poorly defined under light microscopy. They scatter throughout the cytoplasm in late vitellogenic/ yolked

oocytes. The zona pellucida becomes thicker. At this time, some acellular component deposited around the microvilli seems to be coming from an extra oocyte source (Fig.6F).

The deposition of the yolk globules continues, and the ooplasm becomes filled with them; the oocyte becomes full-grown when it reaches its maximum diameter of three millimeters (Fig.3C). The oocyte is ready for maturation.

Oocyte maturation

The maturation stage is marked by nuclear migration into the animal pole (Fig.3D). In the mature, preovulatory oocytes, there is no discernable alteration of the yolk globules (Fig.3E) compared to those prior to the commencement of maturation (Fig.3C). Despite their irregular outline, they remain individualized and do not fuse forming a liquid mass; there is no perceptible hydrolysis and/or hydration of the yolk (Fig.3E-inset).

Ovulation

Ovulation is the stage in which the oocyte emerges from the follicle and becomes an egg. In recently ovulated eggs of *Gymnotus* sp., recovered from the oviduct, the yolk globules show some discreet fusion and, most of them keep the same characteristics observed in the full-grown and maturing oocytes. There is no notable hydrolysis and hydration of the egg even after ovulation (Fig.3F).

DISCUSSION

Most of the reports on oocyte development in Teleostei mentioned the cell nests in the border of the ovigerous lamellae as the sites of origin of the oocytes and consequently of the ovarian follicles. Although correct, the oogonia, the true source of oocytes, are rarely seen in histological preparations that utilize paraffin-embedded tissues. In *Gymnotus* sp., as first demonstrated in the higher teleost, the common snook (Grier, 2000), and also in a salmonid, the rainbow trout (Grier *et al.*, 2007), single oogonia are found scattered in the epithelium that borders the ovigerous lamellae, the germinal epithelium, and are completely wrapped by epithelial cells. In recent years, it was shown that the germinal epithelium that borders the ovigerous lamellae is the source of the germ cells in the fish ovary

(Grier, 2000, 2002; Grier & Lo Nostro, 2000; Parenti & Grier, 2004; Grier *et al.*, 2005, 2007). The proliferation of oogonia and their entrance into meiosis gives rise to clusters of oocytes and epithelial cells, forming in pockets from the epithelium that protrude into the stroma. These clusters are the cell nests (Selman *et al.*, 1993; Grier, 2000), but the “epithelial cells” are now called “prefollicle cells.” The cell nests are attached to the germinal epithelium, both are separated from the stroma by a continuous basement membrane. Around late pachytene, the prefollicle cells begin to increasingly surround the oocytes that become individualized (Grier, 2000; Matova & Cooley, 2001). Inside the nests, at the time of the meiotic arrest, the ovarian follicles begin to form. Ovarian follicles are composed of a diplotene oocyte that is surrounded by a layer of follicle cells; the follicle is encompassed by a basement membrane. Still inside the nests, the oocyte may enter primary growth designated by a basophilic ooplasm. Once the synthesis of the basement membrane is completed around the ovarian follicle, it is no longer part of the cell nest but remains connected to the germinal epithelium along a shared length of the basement membrane between them. The follicular complex is formed when the ovarian follicle is encompassed by cells derived from the stroma forming the thecal layers (Grier *et al.*, 2009). As it can be appreciated in *Gymnotus* sp. that the follicular complex remains connected to the germinal epithelium by a share basement membrane throughout its development. The development of the ovarian follicle and follicle complex is identical in both perciform (Grier, 2000; Grier *et al.*, 2009) and in gymnotiforms; it is conserved between ostariophysian and perciform fish.

Within the follicle complex, the oocyte develops during primary growth and at the appropriate time and stimulus (see Patiño & Sullivan, 2002; Lubzens *et al.*, 2009 for review), enters in secondary growth. The primary growth stage also known as the previtellogenic stage (*sensu* Grier *et al.*, 2009) involves the preparation of the oocyte for secondary growth during which vitellogenesis, and a huge increase in oocyte size, occurs. It is during primary growth that oocyte structures such as the cortical alveoli appear, the zona pellucida is formed and the basement membrane becomes thicker (see Selman *et al.*, 1988; Selman &

Wallace, 1989; Patiño & Sullivan, 2002; Grier *et al.*, 2009 for review). The zona pellucida continues its formation during secondary growth.

The zona pellucida is a multilayer, acellular structure that surrounds the eggs in which the outer layer is usually rich in polysaccharides, as the innermost is constituted by proteins, the choriogenins (see Patiño & Sullivan, 2002; Modig *et al.*, 2007 for review). The synthesis of the proteins that constitute the zona pellucida is attributed to the oocyte, to the liver or both of them depending of the species (see Modig *et al.*, 2007 for review). Considering electron microscopy images of oocyte development in *Gymnotus* sp., the synthesis of the zona pellucida appears to involve both the oocyte and an external source that according the available data on the literature must be the liver (see Modig *et al.*, 2007 for review).

The basement membrane is also an acellular structure that supports the follicle cells and surrounding them delineates the encompassed ovarian follicle. Despite the synthesis of basement membrane components that have been attributed (assigned) to the follicle cells themselves (Le Menn *et al.*, 2007), until today there is no clear evidence that this supposition has been proven. Electron micrographs of oocyte development in *Gymnotus* sp. could constitute the lacking evidence for this. As seen in *Gymnotus* sp., the basement membrane is a multilayered structure built layer by layer external to the follicle cells, not the thecal cells. The obvious conclusion is that the follicle cells are solely responsible for the formation of the multiple layers of basement membrane in *Gymnotus* sp., so far a unique phenomenon among teleosts.

Among the thecal layers in the follicular complex of *Gymnotus* sp., some special cells are observed with steroidogenic characteristics very similar to the Leydig cells (Pudney, 1995, 1996, 1998). Female cells with steroidogenic features have been reported from the more basal to the more derived Teleostei taxa (see Unal *et al.*, 2005), including the Ostariophysi (Quagio-Grassiotto & Guimarães, 2003). These findings support the hypothesis that they should be a common component of the follicular complex of teleost fish.

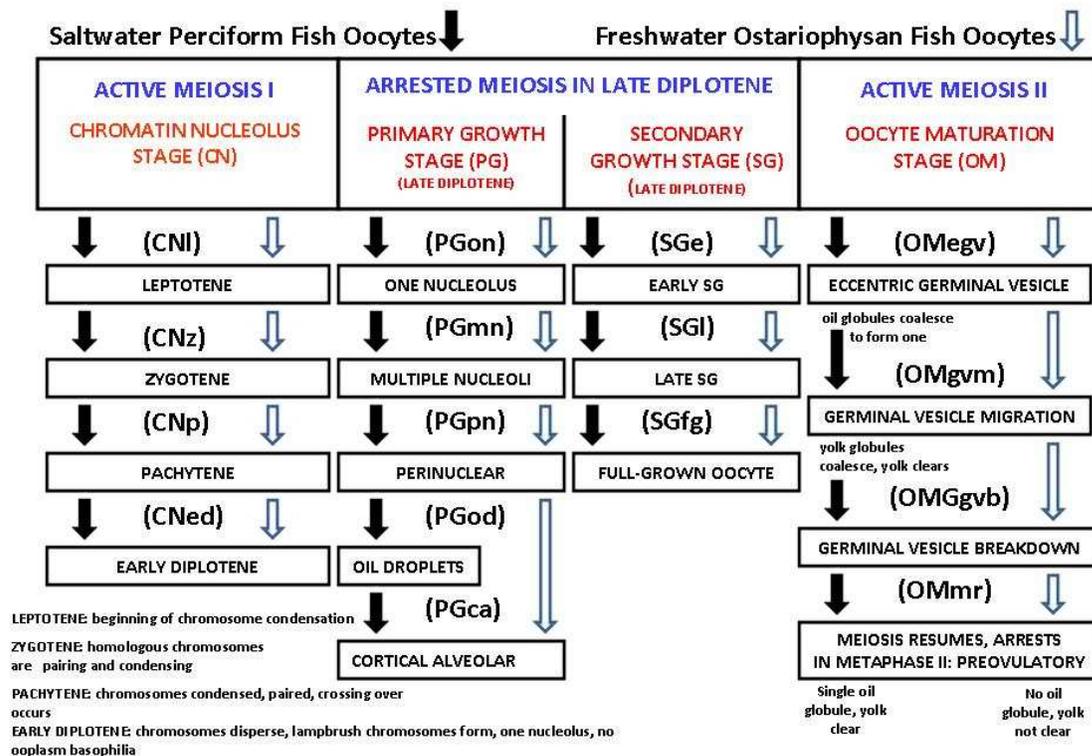
At the end of the secondary growth stage, the oocyte is full-grown and ready to enter maturation. Maturation is induced by a hormonal stimulus (see Patiño &

Sullivan, 2002; Grier *et al.*, 2009; Lubzens *et al.*, 2009 for review) and prepares the oocyte for ovulation. Besides nuclear (germinal vesicle) migration, some other morphological events reported to occur during oocyte maturation and or preceding ovulation are the fusion of the lipid droplets and the pronounced hydrolysis and hydration of the yolk. The deposition of lipids is disseminated but not an exclusive characteristic of saltwater perciform species eggs as is the pronounced hydrolysis and hydration of the yolk during maturation, also observed in pelagic eggs (Patiño and Sullivan, 2002; Cerdá *et al.*, 2007; Le Menn *et al.*, 2007; Grier *et al.*, 2009). *Gymnotus* sp. is a freshwater ostariophysian fish in which the oocyte does not possess lipid droplets. Several other species of ostariophysians also do not possess lipid droplets (Bazzoli & Rizzo, 1990; Gomes *et al.*, 2007; Martins *et al.*, 2009). Also in *Gymnotus* sp., the hydrolysis and hydration of the yolk preceding ovulation is modest as expected for fish that produce benthophil eggs (LaFleur *et al.*, 2005). The yolk globules have an irregular outline in full-grown, mature oocytes and recently ovulated eggs in *Gymnotus* sp. However, these yolk globules are still discrete, and do not become fluid as in pelagic eggs of Perciformes. The data from *Gymnotus* sp. added of that available from oocyte development, maturation and ovulation of other species of Ostariophysi suggests that the absence of lipid droplets and the lack of pronounced hydrolysis and hydration of the yolk could be a common characteristic of the oocytes in this group of fish.

Considering the call of Grier *et al.* (2009) for updating and standardizing the concepts and terminology utilized in studies on folliculogenesis and on oocyte development in fish, herein the unifying terminology proposed by these authors was only slightly modified to be applied to describe both folliculogenesis and oocyte development in *Gymnotus* sp. Despite the fact that the staging schema for oocyte development of these authors was developed from studies of higher Teleostei, primarily a few marine species (Grier *et al.*, 2009), it was easily adapted to *Gymnotus* sp., a freshwater, ostariophysian fish. The structural aspects of folliculogenesis and most of the cellular events appear to be constants throughout oocyte evolution in fish, and the origin of ovarian follicles is precisely identical between *Gymnotus* and *Centropomus* (Grier, 2000) and other fish species (Parenti

and Grier, 2004). However, the studies regarding *Gymnotus* sp., and other freshwater Ostariophysi (Bazzoli & Rizzo, 1990; Gomes *et al.*, 2007; Martins *et al.*, 2009) have shown some significant differences in egg morphology from other studied fish. In an attempt to have a schema that could also be applied to the ostariophysians, a schema from Quagio-Grassiotto *et al.* (2009) is been presented, comparing oocyte development in a saltwater perciform, *Sciaenops ocellatus* and *Gymnotus* sp., and showing the differences between them.

OOCYTE DEVELOPMENT



Acknowledgements

We would like to thank the Electron Microscopy Laboratory/IBB-UNESP for use of its facilities. This research was supported by the Brazilian Agencies: FAPESP (Fundação de Apoio à Pesquisa do Estado de São Paulo); CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico); CAPES/PROEX (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior).

REFERENCES

- Alves-Gomes, J.A., G. Ortí, M. Haygood & W. Heiligenberg. 1995. Phylogenetics analysis of the South American electric fishes (Order Gymnotiformes) and evolution of their system: a synthesis based on morphology, electrophysiology, and mitochondrial sequence data. *Molecular Biology Evolution*, 12:298-318.
- Bazzoli, N. & E. Rizzo. 1990. A comparative cytological and cytochemical study of oogenesis in ten Brazilian teleost fish species. *European Archives of Biology*, 101:399-410.
- Cerdà, J., M. Fabra & D. Raldúa. 2007. Physiological and molecular basis of fish oocyte hydration. Pp. 349-396 .In: Babin P.J., J. Cerdà & E. Lubzens (Eds). *The Fish Oocyte: From Basic Studies to Biotechnological Applications*. Dordrecht, Springer, 508p.
- Gomes, B.V.C., R.S. Scarpelli, F.P. Arantes, Y. Sato, N. Bazzoli, & E. Rizzo. 2007. Comparative oocyte morphology and early development in three species of trahiras from the São Francisco River basin, Brazil. *Journal of Fish Biology*, 70:1412-1429.
- Grier, H.J. 2000. Ovarian germinal epithelium and folliculogenesis in the Common Snook, *Centropomus undecimalis* (Teleostei: Centropomidae). *Journal of Morphology*, 243:265-281.
- Grier, H.J. 2002. The germinal epithelium: its dual role in establishing male reproductive classes and understanding the basis for indeterminate egg production in female fishes. Pp. 537-552. In: Creswell, R.L., (Ed). *Proceedings of the fifty-third annual Gulf and Caribbean Fisheries Institute*, November 2000. Fort Pierce, Mississippi/Alabama Sea Grant Consortium.
- Grier, H.J. & Lo Nostro, F.L. 2000. The germinal epithelium in fish gonads: the unifying concept. Pp. 233-236. In: Norberg, B., O.S. Kjesbu, G.L. Taranger, E. Andersson & S.O. Stefansson, (Eds). *Proceedings of the 6th International Symposium on the Reproductive Physiology of Fish*. Norway, University of Bergen.

- Grier, H.J & L.P. Parenti. 2004. Evolution and phylogeny of gonad morphology in bony fishes. *Society of Integrative and Comparative Biology*, 44:333-348.
- Grier, H.J., M.C. Uribe, L.R. Parenti & G. Rosa-Cruz. 2005. Fecundity, the Germinal, and Folliculogenesis in Viviparous fishes. Pp. 191-216. In: Uribe M.C. & H.J. Grier, (Eds). *Viviparous Fishes*. Homestead, New Life Publication.
- Grier, H.J., M.C. Uribe & L.R. Parenti. 2007. Germinal epithelium, folliculogenesis, and postovulatory follicles in ovaries of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum, 1792) (Teleostei, Protacanthopterygii, Salmoniformes). *Journal of Morphology*, 268:293-310.
- Grier, J.H., M.C. Uribe & R. Patiño. 2009. The ovary, folliculogenesis and oogenesis in teleosts. Pp. 25-84. In: Jamieson, B.J.M. (Ed). *Reproductive Biology and Phylogeny of Fishes (Agnathans and Bony Fishes) Phylogeny Reproductive System Viviparity Spermatozoa*. Science Publishers, Enfield.
- LaFleur, G.F., D. Raldúa, M. Fabra, O. Carnevali, N. Denslow, R.A. Wallace & J. Cerdà. 2005. Derivation of major yolk proteins from parental vitellogenin, and alternative processing during oocyte maturation in *Fundulus heteroclitus*. *Biology of Reproduction*, 73:815-824.
- Le Menn, F., J. Cerdà & P.J. Babin. 2007. Ultrastructural aspects of the ontogeny and differentiation of ray-finned fish ovarian follicles. Pp. 1-37. In: Babin, P.J., J. Cerdà & E. Lubzens (Eds). *The Fish Oocyte: From Basic Studies to Biotechnological Applications*. Dordrecht, Springer. 508p.
- Lubzens E., G. Young, J. Bobe & J. Cerdà. 2009. Oogenesis in teleosts: How fish eggs are formed. *General and Comparative Endocrinology*. doi:10.1016/j.ygcen.2009.05.022
- Mago-Leccia, F. 1994. *Electric Fishes of the Continental Waters of America*. Venezuela, FUDECI. 229p.
- Martins, Y.S., D.F. de Moura, G.B. Santos, E. Rizzo & N. Bazzoli. 2009. Comparative folliculogenesis and spermatogenesis of four teleost fish from a reservoir in south-eastern Brazil. *Acta Zoologica (Stockholm)* doi: 10.1111/j.1463-6395.2009.00437.x

- Matova, N. & L. Cooley. 2001. Comparative aspects of animal oogenesis. *Development Biology*, 231: 291-320.
- Modig, C., L. Westerlund & P.-E. Olsson. 2007. Oocyte zona pellucida proteins. Pp 113-140. In: Babin, P.J., J. Cerdà & E. Lubzens (Eds). *The Fish Oocyte: From Basic Studies to Biotechnological Applications*. Springer, Dordrecht, 508p.
- Parenti, L.R. & H. Grier. 2004. Evolution and phylogeny of gonad morphology in bony fishes. *Integr Comparative Biology*, 44:333-348.
- Patiño, R. & C.V. Sullivan. 2002. Ovarian follicle growth, maturation, and ovulation in teleost fish. *Fish Physiology and Biochemistry*, 26:57-70.
- Pearse, A.G.E. 1985. *Histochemistry: theoretical and applied*. Churchill Livingstone, London.
- Pudney, J. 1995. Spermatogenesis in Nonmammalian Vertebrates. *Microscopy Research Technology*, 32:459-497.
- Pudney, J. 1996. Comparative Cytology of the Leydig Cell. Pp 98-142. In: Payne, A.H., M.P. Hardy & L.D. Russel (Eds). *The Leydig Cell*. Vienna, Cache River Press.
- Pudney, J. 1998. Leydig and Sertoli Cells, Nonmammalian. Pp1008-1020. In: Knobil, E., & J.D. Neill (Eds). *Encyclopedia of Reproduction*. Academic Press: San Diego.
- Quagio-Grassiotto, I. & A.C.D. Guimarães, 2003. Follicular epithelium, theca and egg envelop formation in *Serrasalmus spilopleura* (Teleostei, Characiformes, Characidae). *Acta Zoológica (Stockolm)*, 84:121-129.
- Quagio-Grassiotto, I., G.F. França, T.S. Mazzoni & H. Grier, 2009. A new approach to oocyte development in Ostariophysi. *Animal Biology of Reproduction*, 6:269, Abstract.
- Quintero-Hunter, I., H. Grier & M. Muscato. 1991. Enhancement of histological detail using metanil yellow as counterstain in periodic acid/Schiff's hematoxylin staining of glycol methacrylate tissue sections. *Biotechnic and Histochemistry*, 66:169-172.
- Selman, K., R.A. Wallace & V. Barr. 1988. Oogenesis in *Fundulus heteroclitus*. V. The relationship of yolk vesicle and cortical alveoli. *Journal of Experimental Zoology*, 246: 42-56.

- Selman, K. & R.A. Wallace. 1989. Cellular aspects of oocyte growth in teleosts. *Zoological Science*, 6:211-231.
- Selman, K., R.A. Wallace, A. Sarka, & X. Qi. 1993. Stages of oocyte development in the zebrafish , *Brachydanio rerio*. *Journal of Morphology*, 218:203-224.
- Ünal, G., H. Karakisi & M. Elp. 2005. Ovarian Follicle Ultrastructure and Changes in evels of Ovarian Steroids during Oogenesis in *Chalcalburnus tarichiPallas*, 1811. *Turk Journal Veterinary Animal Science*, 29:645-653.
- Wallace, R.A. & K. Selman. 1981. Cellular and dynamic aspects of oocyte growth in teleosts. *American Zoologist*, 21:325-343.
- Wallace , R.A. & K. Selman. 1990. Ultrastructural aspects of oogenesis and oocyte growth in fish and amphibians. *Journal of Electron Microscopy and Technique*, 16:171-201.

LEGENDS

Figure 1. Folliculogenesis in *Gymnotus* sp. Light Microscopy.

A: Scattered in the germinal epithelium, the quiescent oogonium (g) is wrapped by the epithelial cells (arrow). Ovarian lumen: ol; Primary growth oocyte: po. **B:** Oogonia (g) proliferate and are surrounded by cells derived from the epithelium, the prefollicle cells (pf). Epithelium: arrow; Ovarian lumen: ol; Primary growth oocyte: po. **C:** Proliferation of the oogonium give rise to cell clusters, the germ cell nests (n), upon the magenta, PAS-positive basement membrane (bm) which in cross section is seen surrounding the nest. Epithelium: arrow; Ovarian lumen: ol; Secondary growth oocyte: so. **D, E:** In the nests (n), with the beginning and progress of meiosis, the prophase oocytes differentiate. In leptotene (lo) and in pachytene (po), they can be distinguished by the pattern of chromatin condensation. Proliferating oogonia (g) and prophase oocytes co-occur in a same nest (n). Epithelium: arrow; Ovarian lumen: ol; Secondary growth oocyte: so. **F, G:** Prefollicle cells increasingly surround the oocytes, separating them one from another. As basement membranes form around individual oocytes and the prefollicle cells surrounding them, they are separated from the cell cluster. Completely surrounded by and individualized by prefollicle cells, early diplotene oocytes (do) enter into primary growth and are separated from the nest (n) at the completion of folliculogenesis. Epithelium: arrow; Ovarian lumen: ol. **H:** The ovarian follicles (of) are formed when the synthesis of the basement membrane (bm) around the follicle cells (fc) is complete. Multiple nucleoli, resulting from nucleolar amplification, are observed at the nuclear periphery (perinuclear step of primary growth). Within follicles, the primary growth oocytes increase in size (pg). Epithelium: arrow; Ovarian lumen: ol. Staining: periodic-acid-Schiff (PAS)/haematoxylin/metanil yellow.

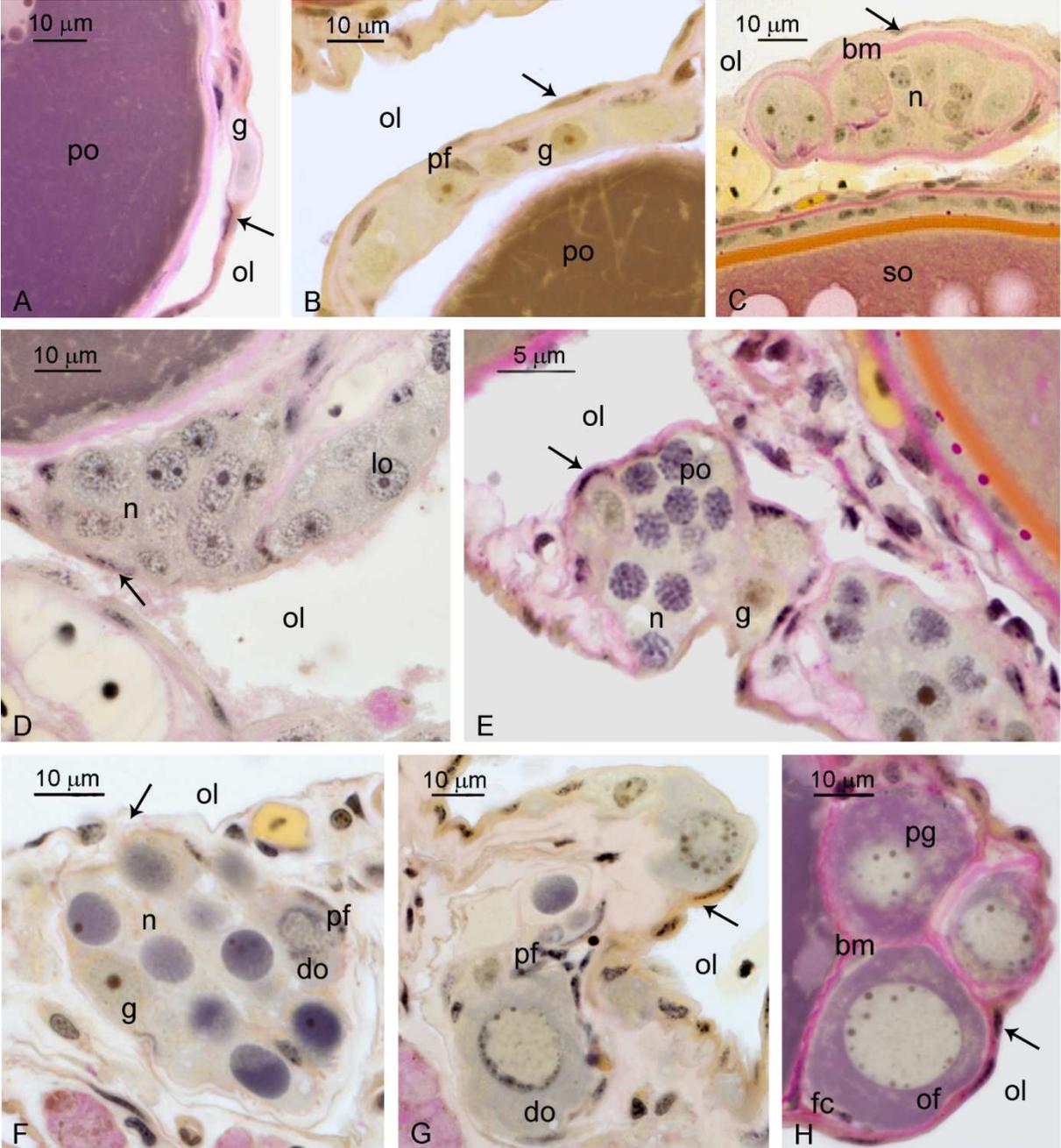


Figure 2. Oocyte primary growth stage in *Gymnotus* sp. Light Microscopy.

A: With the organization of the thecal layers (double arrow) the follicular complex is formed. Inside the follicular complex, primary oocyte growth (pg) continues, and the ooplasm becomes mottled (arrowhead). Cytoplasmic basophilia increases. Epithelium: arrow; Ovarian follicle: of; Ovarian lumen: ol. **B, C:** Clear vesicles (v) appear throughout the cytoplasm signing the entrance in the cortical alveolar step of primary growth. The vesicles are of variable sizes and become increasingly numerous. **B-inset:** The first vesicles appear (white arrow) in the ooplasm after the basement membrane (bm) is completely formed and before the zona pellucida becomes detectable. The vesicles have a lilac hue after Toluidine-blue staining. Epithelium: arrow; Ovarian lumen: ol. **D, E:** The large number of vesicles, stained lilac after toluidine blue, are localized at the ooplasm periphery where they form a multi-layered structure composed of cortical alveoli (ca). At this time the forming zona pellucida is detectable. **E-Inset:** In the oocyte outline, the micropyle (mi) can be seen as an interruption on the zona pellucida (zp). Epithelium: arrow; Ovarian lumen: ol. **F:** In a high magnification, small yolk globules are discernible in the ooplasm periphery signing the entrance of the oocyte in the secondary growth stage (early secondary growth or early yolked oocyte step). **F-Inset:** During oocyte development, the follicular complex remains connected to germinal epithelium by a sharing extension of the basement membrane. In this region the thecal layer is lacking, and the basement membrane of both the follicular complex and the epithelium are superposed. Epithelium: arrow; Ovarian lumen: ol. Staining: periodic-acid-Schiff (PAS)/haematoxylin/metanil yellow.

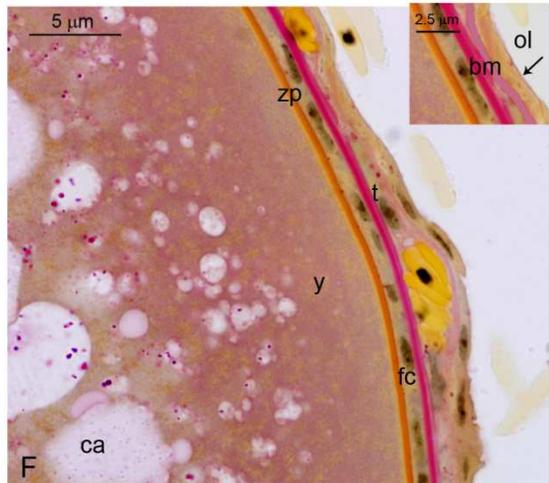
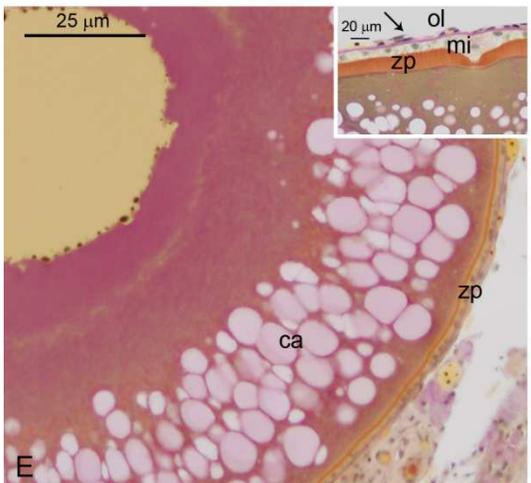
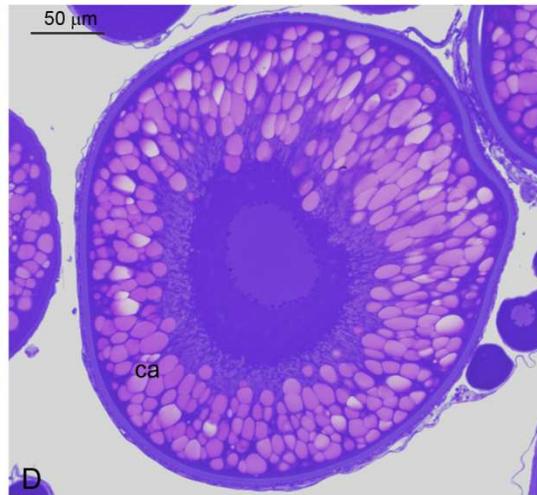
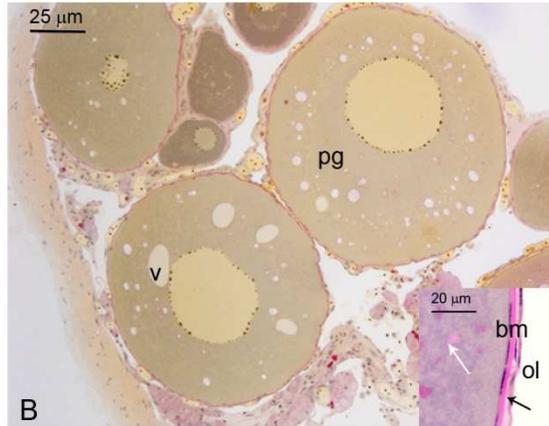
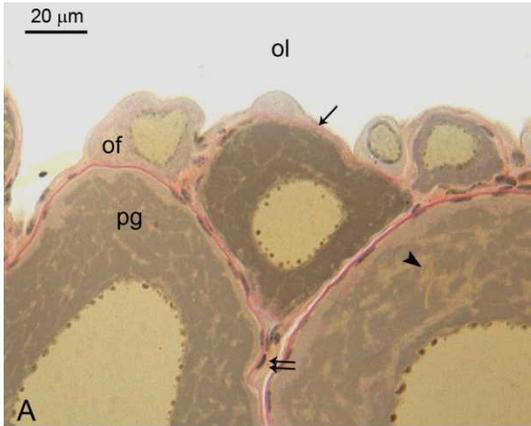


Figure 3. Oocyte secondary growth stage, maturation and ovulation in *Gymnotus* sp. Light Microscopy.

A-B: Yolk deposition: yolk globules appear and increase in number becoming scattered throughout the ooplasm (late secondary growth or late yolked oocytes step). Yolk globules are initially small and seem to fuse with one another and do not have an irregular outline. Zona pellucida: zp; Follicle cells: arrow; Ovarian lumen: ol. **C:** Oocyte continues increasing in volume during secondary growth; the cortical alveoli are displaced to the periphery as the yolk globules fill the ooplasm centrally (full-grown oocyte step). Ovarian lumen: ol. **D:** Maturation is started, and the germinal vesicle or nucleus (n) to the animal pole. Ovarian lumen: ol. **E:** Before germinal vesicle breakdown, the nucleus (n) is positioned at the cell periphery, near to the oolema. **E-inset:** In a high magnification detail of the oocyte nucleus, the yolk globules remain discernible, are large and yolk hydration is not evidenced. Ovarian lumen: ol. **F:** Even after ovulation, there is only a discreet fusion of the yolk and hydrolysis and hydration are not discernible in the eggs. Staining: periodic-acid-Schiff (PAS)/haematoxylin/metanyl yellow.

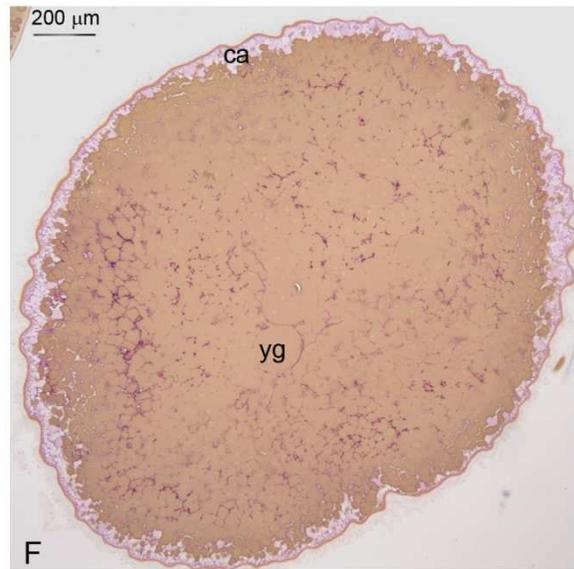
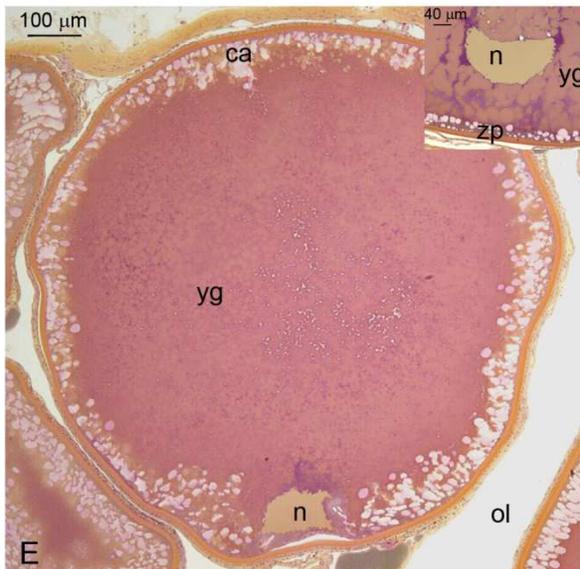
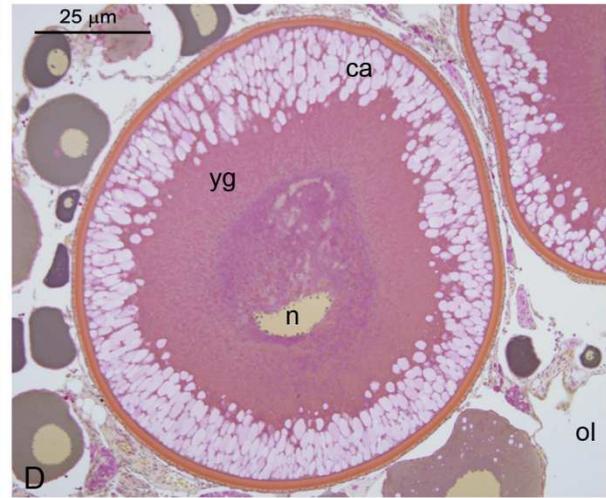
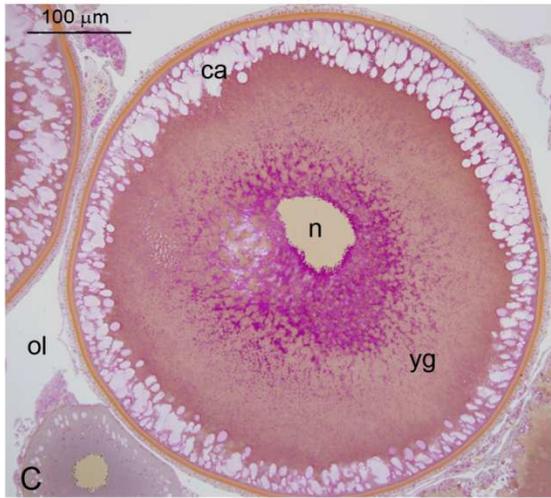
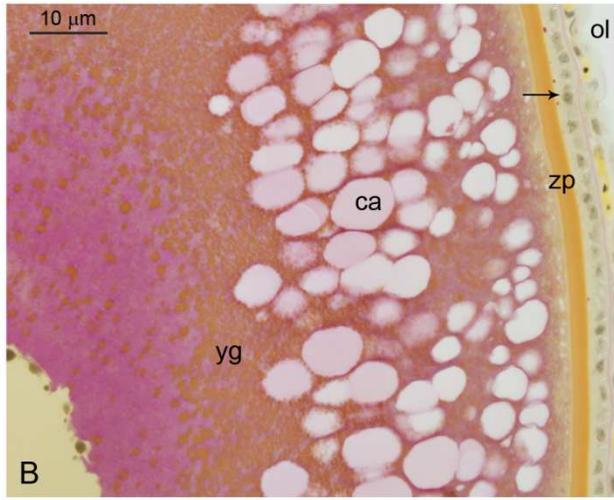
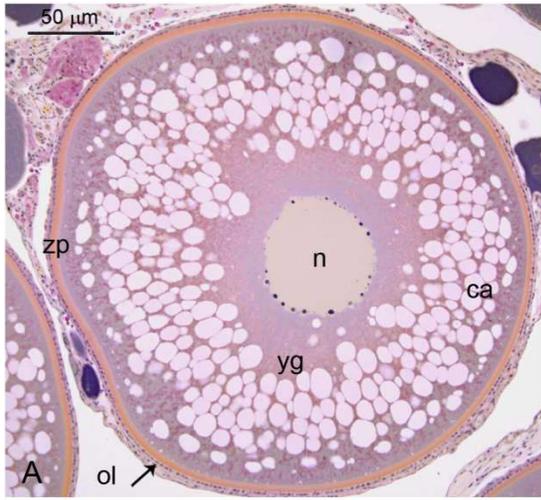


Figure 4. Early ovarian follicle development and the synthesis of the basement membrane in *Gymnotus* sp. Transmission Electron Microscopy.

A: The just-formed ovarian follicle remains connected to the germinal epithelium (ge) by sharing a common, thin basement membrane (bm) with it. Primary growth oocyte nucleus (n) with a spherical nucleolus. Ovarian lumen: ol. **B:** The ovarian follicle is composed by the early primary growth oocyte (o) surrounded by the follicle cells (fc). The follicle is surrounded by and rests upon the basement membrane. Note the multi-layered basement membrane is shared by both ovarian follicle and the germinal epithelium. **C:** Inside the ooplasm the membranous organelles, mainly the mitochondria (m), proliferate forming aggregates that when visualized with light microscopy are the Balbiani bodies. Epithelium: arrow **D:** In the oocyte, multiple nucleoli (nu) are located at the nuclear periphery; the follicle cells synthesize new layers of the basement membrane which begins to become complex as multiple layers develop. Epithelium: arrow; Ovarian lumen: ol. **E:** The single layer of basement membrane that first appears just upon the follicle cell surface is discontinuous, and step by step additional layers are added to the one that forms first. Ovarian lumen: ol. **F:** Oocyte development: within the nucleus (n), the nucleoli become flattened against the germinal vesicle membrane, and many mitochondria (m) are observed in the ooplasm (o). Epithelium: arrow. **G:** The number of mitochondria (m) increases considerably during primary oocyte growth. **H:** The synthesis of multiple, new layers to the basement membrane (bm) cause it to become thicker and complex. Ooplasm: asterisks; Follicle cells: fc; Germinal epithelium: ge. Ovarian lumen: ol.

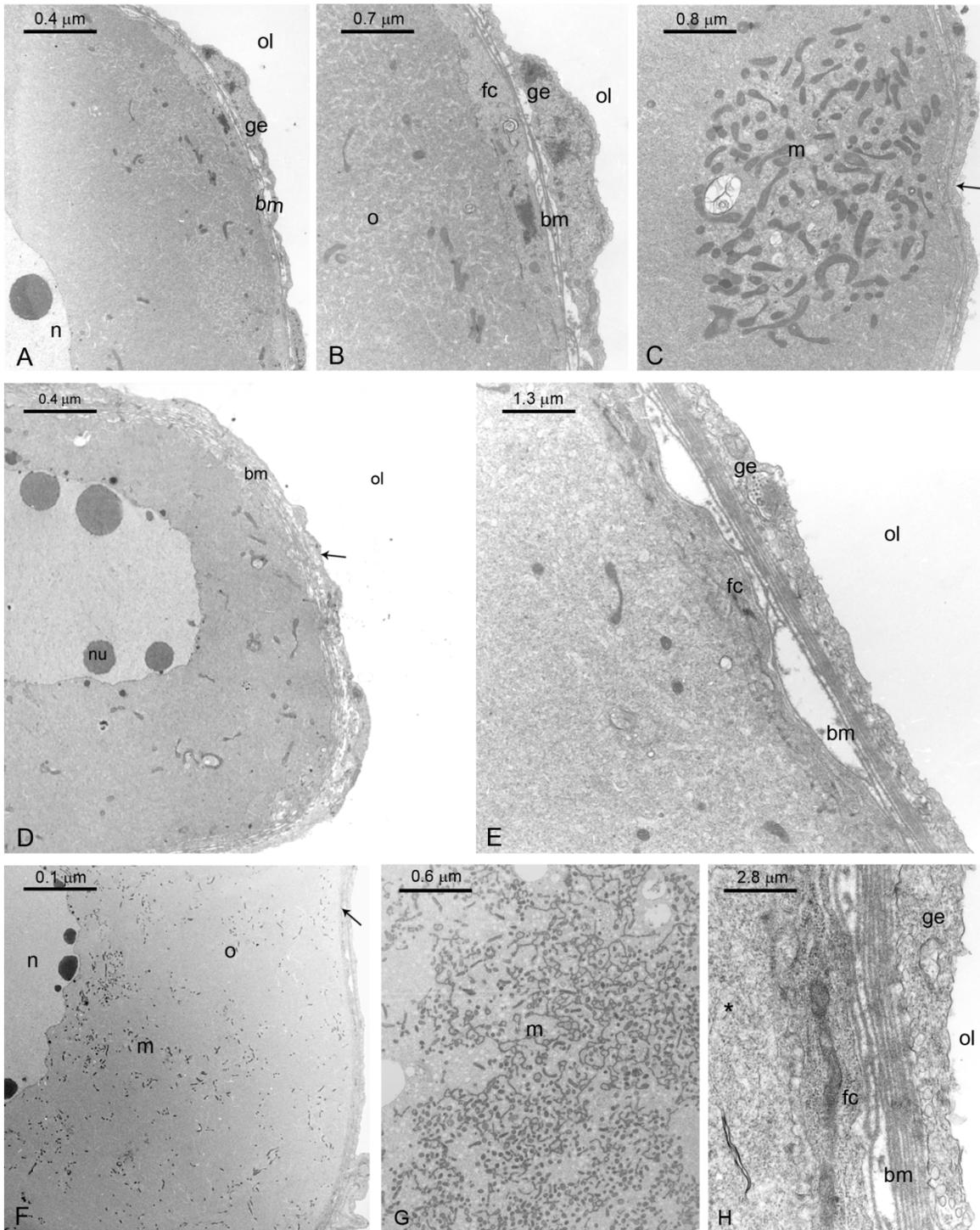


Figure 5. Early follicular complex development and the appearance of the cortical alveoli in *Gymnotus* sp. Transmission Electron Microscopy.

A: The vesicles (cav) of the forming cortical alveoli start to appear in the oocytes (o) at the same time as the first microvilli (arrow) are formed in the oolema. Ovarian lumen: ol. **B:** In these follicle complexes the follicle cells (fc) are squamous, the multilayered basement membrane (bm) is formed and **C:** the thecal layers are organized (t). Nucleus: n; Oocyte: o; Germinal epithelium: ge; Ovarian lumen: ol. **D:** The amount of vesicles of the cortical alveoli (cav) increases, they have distinctive dimensions and some electron dense material appears inside them. Basement membrane: bm; Follicle cells: fc; Mitochondria: m; Theca: t. **E:** Electron dense material begins to be deposited around the microvilli giving rise to the zona pellucida (zp). Basement membrane: bm; Follicle cells: fc; Granulocyte: gr; Theca: t. **F:** The zona pellucida (zp) becomes thicker as its electron dense material (arrow) increases in thickness; the microvilli (mi) enlarge causing it to have a radiated appearance. In the plasma membrane of the follicle cells (fc), that faces the oocyte, some microvilli (arrowhead) are also formed. Inside the follicle cells there several elongate vesicles (v) are observed which containing is similar in density to those from the basement membrane (bm). Basement membrane: bm; Desmosomes: double arrow; Germinal epithelium: ge; Ovarian lumen: ol; Vesicles: v; Theca: t.

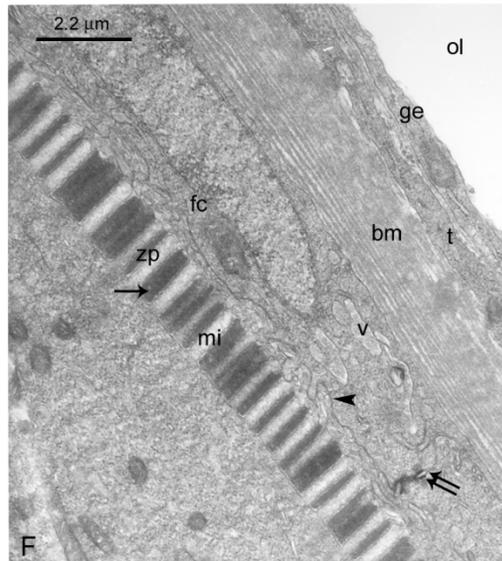
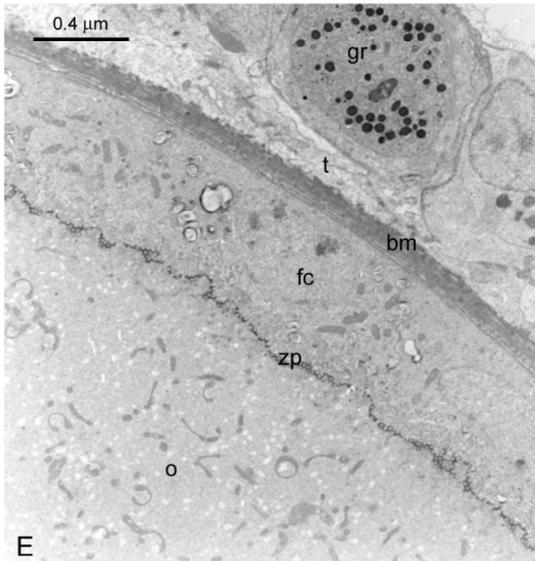
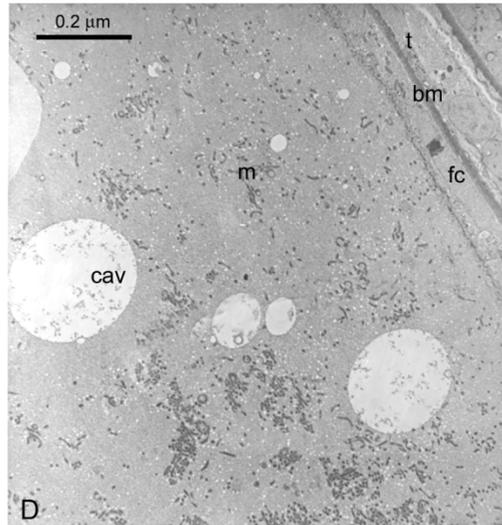
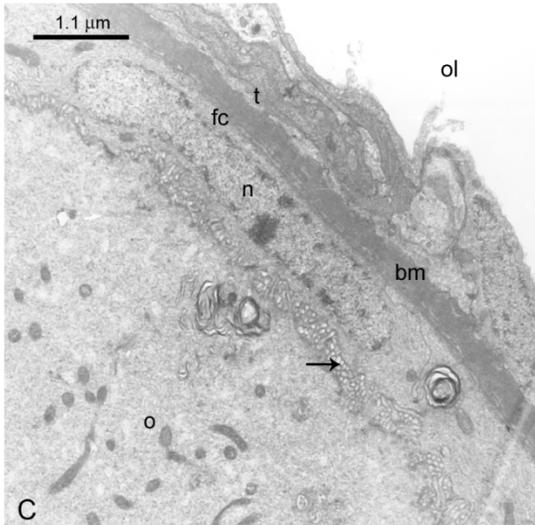
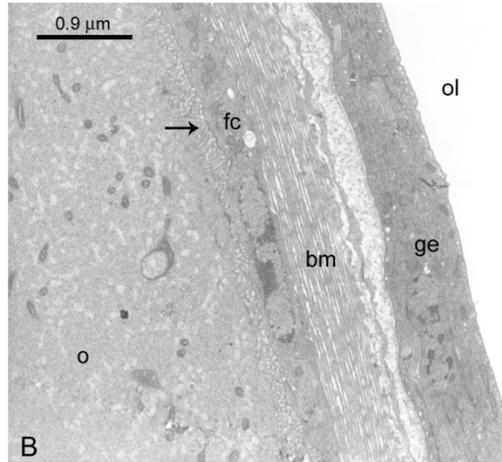
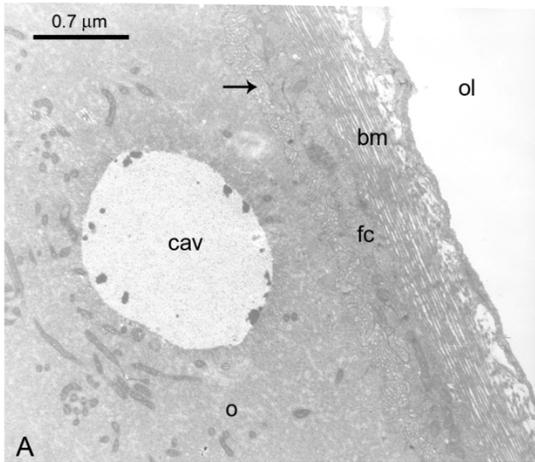
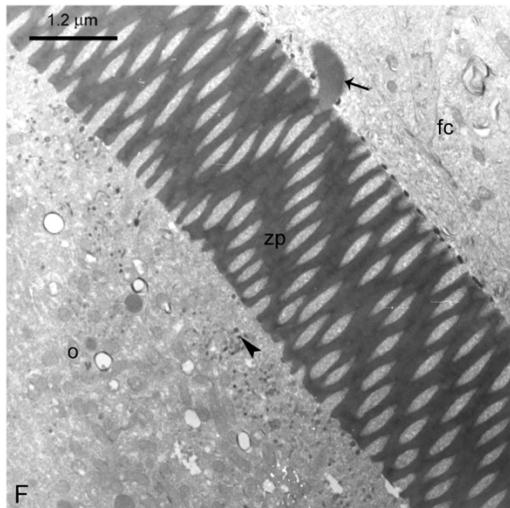
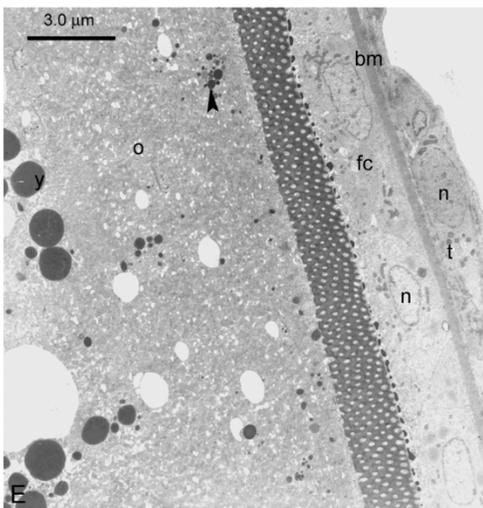
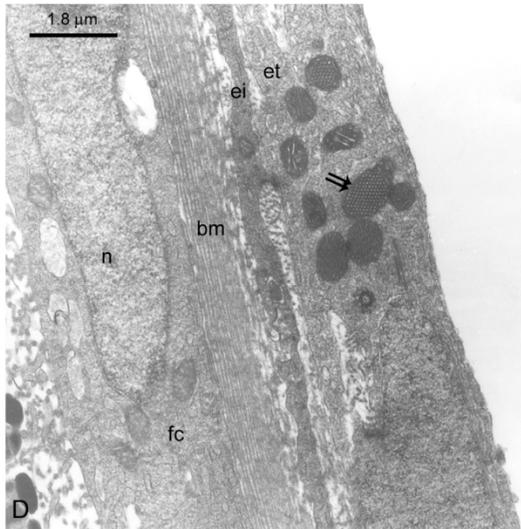
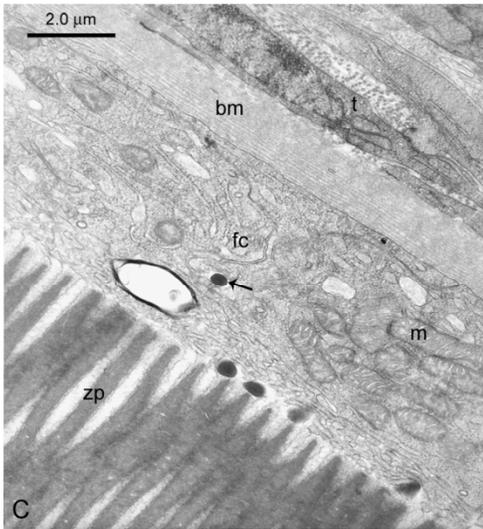
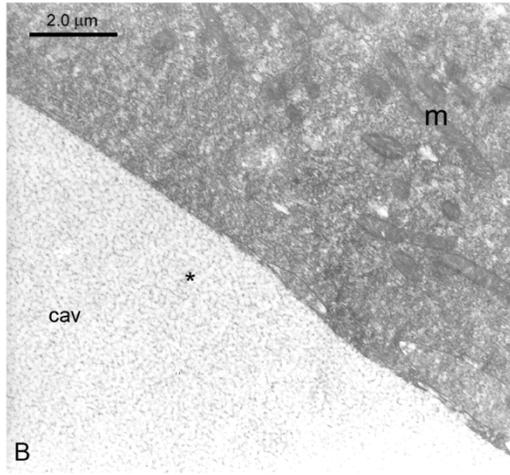
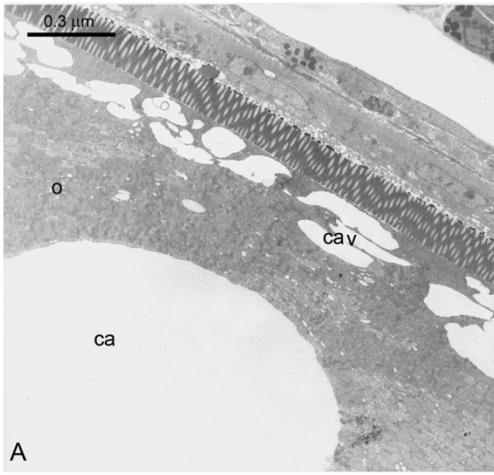


Figure 6. Follicular complex development and the entrance into secondary growth in *Gymnotus* sp. oocytes Transmission Electron Microscopy.

A: The cortical alveoli are organized (ca). In the oocyte (o) periphery vesicles (cav) continue to be formed and fuse to one another. **B:** the large vesicles of the cortical alveoli (cav) are filled up by a fibrillar material (asterisks). Basement membrane: bm; Follicle cells: fc; Mitochondria: m; Theca: t. **C:** In the intercellular space between neighboring follicles cells (fc) high electron dense particles (arrow) are seen. Similar particles accumulate between the zona pellucida (zp) and the follicles cells. Basement membrane: bm; Follicle cells: fc; Mitochondria: m; Theca: t. **D:** In the theca externa (et) there are special thecal cells (asterisks) in which the mitochondria (double arrow) are similar to those found in the steroidogenic cells. Basement membrane: bm; Follicle cells: fc; Internal theca: ic; Nucleus: n. **E:** The high electron dense particles are now seen inside the oocyte (o) at the ooplasm periphery. They fuse to one another (arrowhead) giving rise to the yolk globules (yg). The secondary growth is started. At this time the follicle cells (fc) become cuboidal. Basement membrane: bm; Theca: t; Nucleus: n. **F:** Also at this time, a large mass of a moderately electron dense material (arrow) appears to be incorporate to the zona pellucida (zp). Electron dense particles: arrowhead; Follicle cells: fc; O: oocyte.



14. ANEXO 2

COLORAÇÕES

Coloração de PAS + Hematoxilina Férrica + Metanil Yellow

Técnica de coloração:

- ✓ Hidratar os cortes em água destilada,
- ✓ Imergir em ácido periódico 1% por 10 minutos,
- ✓ Lavar em água corrente por 10 minutos,
- ✓ Imergir em reativo de Schiff durante 1 hora,
- ✓ Lavar em água corrente por 10 minutos,
- ✓ Imergir em Hematoxilina Férrica por 6 minutos,
- ✓ Lavar em água corrente por 10 minutos,
- ✓ Imergir em Metanil Yellow por 2 minutos,
- ✓ Desidratar em estufa à 60°C por 12 horas e montar em meio permount.

Soluções estoque

Solução de Metanil Yellow

Solução A

Metanil yellow	0,1g
Água destilada	100 ml

Solução B

Acido Acético Glacial	0,5 ml
Água destilada	100 ml

Solução Corante

Solução A	10 ml
Solução B	25 ml
Água destilada	15 ml

Hematoxilina Férrica

Solução A

Hematoxilina	1 g
Álcool 96%	100 ml

A solução A deve ser “amadurecida” por cerca de um mês, à luz do dia.

Solução B

Cloreto de ferro, sol. aquosa a 30 %	4 ml
Água destilada	95 ml
Ácido clorídrico concentrado	1 ml

Solução Corante

50 ml de Solução A + 50 ml de Solução B.

Coloração de Azul de Toluidina-Bórax (pH entre 7.0 e 8.0)

Técnica de coloração:

- ✓ Hidratar os cortes em água destilada,
- ✓ Corar com azul de toluidina-bórax por 3 minutos;
- ✓ Lavar rapidamente em água destilada para retirar o excesso,
- ✓ Desidratar em estufa à 60°C por 12 horas e montar em meio permount.

Solução corante

azul de toluidina	0,5g
bórax	0,5g
água destilada	100ml

Coloração de Hematoxilina Férrica e Eosina

Técnica de coloração:

- ✓ Hidratar os cortes em água destilada,
- ✓ Corar com hematoxilina por 10 minutos,

- ✓ Lavar em água corrente por 10 minutos,
- ✓ Passar rapidamente em álcool 90%,
- ✓ Imergir em Eosina por 5 minutos,
- ✓ Lavar em água destilada para retirar o excesso,
- ✓ Desidratar em estufa à 60°C por 12 horas e montar em meio permount.

Soluções estoque

Solução de Eosina 1%

Eosina	1 g
Água	100 ml

Solução de Floxina B 1%

Floxina B	1 g
Água	100 ml

Solução para o uso:

Eosina 1 %	100 ml
Floxina 1%	10 ml
Álcool 95%	780 ml
Ácido acético	4 ml

DECLARAÇÃO

Declaro para os devidos fins que o conteúdo de minha Tese de Doutorado intitulada "Caracterização do epitélio germinativo masculino, da formação e regressão folicular das fêmeas, da atividade das células esteroidogênicas e fagocíticas gonadais, e perfil hormonal durante o ciclo reprodutivo em Gymnotiformes (Teleostei, Ostariophysii)":

() não se enquadra no § 3º do Artigo 1º da Informação CCPG 01/08, referente a bioética e biossegurança.

(X) Tem autorização da(s) seguinte(s) Comissão(ões) de Bioética ou Biossegurança*:

Comissão de ética na experimentação animal, sob Protocolo(s) nº 53/07

** Caso a Comissão seja externa a UNICAMP, anexar o comprovante de autorização dada ao trabalho. Se a autorização não tiver sido dada diretamente ao trabalho de tese ou dissertação, deverá ser anexado também um comprovante do vínculo do trabalho do aluno com o que constar no documento de autorização apresentado.*


Aluna: Gisleine Fernanda França

Orientadora: Profa. Dra. Iraci Quaglio Grassioto

Para uso da Comissão ou Comitê pertinente:

Deterido, () Indeferido


Nome: _____
Função: _____

Profa. Dra. ANAMARIA A. GUARALDO
Presidente
Comissão de Ética na Experimentação Animal
CEEAI/IB - UNICAMP

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo nº **53/07-CEEA**, sobre “Caracterização do epitélio germinativo masculino, da formação e regressão folicular das fêmeas, da atividade das celular esteroidogênicas e fagocíticas gonadais, e perfil hormonal durante o ciclo reprodutivo em Gymnotiformes (Teleostei, Ostariophysa)”, sob a responsabilidade de **IRANI QUAGIO GRASSIOTTO**, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e foi aprovado “Ad referendum” da **COMISSÃO DE ÉTICA NA EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL (CEEA)**, nesta data.

Botucatu, 13 de julho de 2007.


Prof. Dr. MARCELO RAZERA BARUFFI
Presidente - CEEA


NADIA JOVÊNCIO COTRIM
Secretária - CEEA