

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

INSTITUTO DE BIOLOGIA

Daniel Dantas Wildner

**“DINÂMICA DE RENOVAÇÃO DAS CÉLULAS GERMINATIVAS
FEMININAS EM DUAS ESPÉCIES DE OSTARIOPHYSI COM
DIFERENTES CICLOS REPRODUTIVOS: *SERRASALMUS MACULATUS*
(CHARACIFORMES) E *PIMELODUS MACULATUS* (SILURIFORMES)”**

Este exemplar corresponde à redação final
da tese defendida pelo(a) candidato (a)
Daniel Dantas Wildner
Irani Quagio Grassiotto
e aprovada pela Comissão Julgadora.

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

Orientadora: Profa. Dra. Irani Quagio Grassiotto

Campinas, 2012

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA POR
ROBERTA CRISTINA DAL' EVEDOVE TARTAROTTI – CRB8/7430
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA - UNICAMP

W646d Wildner, Daniel Dantas, 1985-
Dinâmica de renovação das células germinativas femininas em duas espécies de Otariophysi com diferentes ciclos reprodutivos: *Serrasalmus maculatus* (Characiformes) e *Pimelodus maculatus* (Siluriformes) / Daniel Dantas Wildner. – Campinas, SP: [s.n.], 2012.

Orientador: Irani Quagio Grassiotto.
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.

1. Peixe. 2. Ciclo reprodutivo. 3. Fêmea. 4. Células germinativas - Renovação. I. Quagio-Grassiotto, Irani. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em Inglês: Dynamics of female germ cells renew in two species of Otariophysi with different reproductive cycles: *Serrasalmus maculatus* (Characiformes) and *Pimelodus maculatus* (Siluriformes)

Palavras-chave em Inglês:

Fishes
Reproductive cycle
Female
Germ cells renew

Área de concentração: Biologia Celular

Titulação: Mestre em Biologia Celular e Estrutural

Banca examinadora:

Irani Quagio Grassiotto [Orientador]
Susan Lowerre-Barbieri
Sidinéia Aparecida Amadio

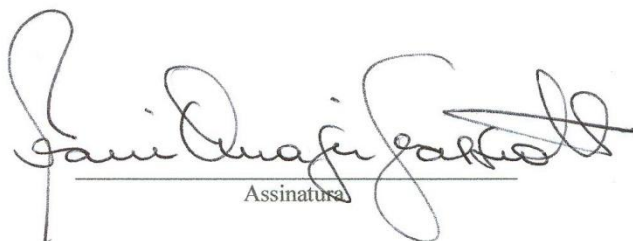
Data da defesa: 24-02-2012

Programa de Pós Graduação: Biologia Celular e Estrutural

Campinas, 24 de fevereiro de 2012.

BANCA EXAMINADORA

Dra. Irani Quagio Grassiotto (Orientadora)



Assinatura

Dra. Susan Katherine Lowerre-Barbieri



Assinatura

Dra. Sidineia Aparecida Amadio



Assinatura

Dr. Sergio Ricardo Batlouni

Assinatura

Dr. Edmir Daniel Carvalho

Assinatura

"Cada pessoa que passa em nossa vida, passa sozinha, é porque cada pessoa é única e nenhuma substitui a outra. Cada pessoa que passa em nossa vida passa sozinha, e não nos deixa só, porque deixa um pouco de si e leva um pouquinho de nós. Essa é a mais bela responsabilidade da vida e a prova de que as pessoas não se encontram por acaso." Charles Chaplin

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar agradeço a Deus, por mostrar o caminho a seguir, por sempre estar à frente das minhas decisões, pela saúde e discernimento fornecidos, e permitir a concretização deste trabalho.

À prof^a. Dr^a. Irani Quagio Grassioto, a quem sou muito grato, pela oportunidade de aprendizado, experiência profissional e ensinamentos transmitidos (que não foram poucos). A concretização deste trabalho deve-se a suas cobranças e presença diária, a sua imensa paciência em orientar e, principalmente, pela sábia maneira como me conduziu ao raciocínio, do básico até aqui.

Ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural, pela oportunidade de crescimento profissional. Também ao auxílio financeiro recebido da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Programa de Excelência Acadêmica (CAPES/PROEX), Programa de Apoio à Pós-Graduação (CAPES/PROAP) e da bolsa FAPESP (nº. processo: 2010/02014-0), que tornaram possível a realização deste trabalho.

À prof^a. Dr^a. Priscila Gusmão Pompiani, orientadora na iniciação científica (UEMS), pela indicação ao Departamento de Morfologia (IBB-UNESP), por ter acreditado no meu potencial, muito mais que eu próprio. Registro aqui minha dedicação a este trabalho e eterna gratidão... Dessa mesma maneira aos seus pais, Luiz Antônio Gusmão e Nair Lopes Gusmão, pela acolhida em Botucatu-SP e por fornecer muito mais que pudesse retribuir.

Aos meus pais, Danilo José Wildner e Maria Dantas Wildner, a quem também dedico este trabalho, com muito orgulho. Apesar de pouco estudo, souberam instruir, com muita sabedoria e diligência, as doutrinas da vida. Incentivaram e respeitaram minhas decisões, muitas vezes, renunciando de si mesmos para beneficiar aos filhos. Com certeza tenho muito a agradecer. Também aos meus irmãos, Thais D. Wildner e Tiago D. Wildner, que de certa maneira estiveram comigo, mesmo a distância, na realização deste trabalho.

À secretária do Programa de Pós-Graduação, Lília Alves Senne Panagio, pelo zelo e pelos auxílios. Seria necessária uma página para agradecer seu empenho, prestatividade, inúmeros favores e informações, desempenhando muito mais que seu papel de secretária... Dessa mesma maneira, à secretária do Departamento de Morfologia (IBB-UNESP), Luciana Cristina Montes, por todas as informações transmitidas sempre com muita paciência e simpatia.

Ao Marcelo Armelin, por todo apoio e dedicação nestes últimos anos, pela acolhida, cuidados e preocupações. Sua companhia foi fundamental para a realização deste trabalho e sou eternamente grato

por tudo o que fez. Da mesma forma, também agradeço a todos os seus familiares que estiveram mais próximos, seus pais e sua irmã.

Aos técnicos do Departamento de Morfologia, em especial pelo Sr. Antônio Vicente Salvador, por todos os ensinamentos, dicas e correções, sendo a pessoa responsável pelo meu aperfeiçoamento técnico. A ti tenho muito a agradecer pela sua amizade, de sua esposa Sônia Maria Salvador e filhos.

Aos colegas do Laboratório de Biologia da Reprodução de Peixes Neotropicais (IBB-UNESP), que de certa forma, contribuíram para meu amadurecimento profissional, Júlio Cesar, Talita Mazzone, Gisleine França, Marco Azevedo, aos ICs Guilherme Gomes, Rafaela Aguilhar, Mariana Spinardi, Laura Migliorine, Paula Nehering, Ayesha Ribeiro e Marcela Agudo. Um agradecimento especial para Rinaldo Ortiz (Cléo e Sabrina), Lucélia Tessaro e Rafael Nóbrega, por todas as dicas, auxílios e agradável companhia; Renata Ishiba por conviver e favorecer grande parte das atividades do meu treinamento técnico e do mestrado, sempre de maneira agradável; e Clarianna Baicere Silva por inúmeros auxílios, esclarecimentos e correções, pela companhia em disciplinas, viagens e por muito cooperar com o desenvolvimento deste trabalho.

Aos professores do IB-UNICAMP pelos ensinamentos transmitidos com muita seriedade e cobrança frente ao aprendizado, em especial aos profs. Drs. Heide Dolder, Cristina P. Vicente e Edson R. Pimentel, pela análise e apreciação do exame de qualificação. Também aos professores do IBB-UNESP, em especial aos profs. Drs. César Martins e Claudio Oliveira pela paciência e oportunidade no estágio de docência; à prof^a. Dr^a. Cláudia Pellizzon pelas informações adicionais; à prof^a. Dr^a. Maeli Dal Pai Silva pela indicação ao programa; e à prof^a. Dr^a. Mirtes Costa pelos esclarecimentos de estatística.

Às pesquisadoras Susan Lowerre-Barbieri (Fish and Wildlife Marine Research Institute – Flórida/EUA) e Sidineia A. Amadio (Instituto Nacional de Pesquisa da Amazônia – Manaus/AM) que aceitaram o convite para compor a banca de defesa e pela disponibilidade de se deslocarem de muito longe para avaliar este trabalho.

Aos amigos, Cláudia Furlan e Rogério Azevedo Mattos pelas valiosas dicas com a Língua Inglesa; Maria Flávia da Silva por todas as informações adicionais e experiência transmitida; José Consorti Filho, Silvio Mário Neto, Romivaldo Laurindo, Marcelo Pazzetto, Cristina Cury, Martha De Leo, Fabiana Ferreira e Felipe, Márcia Cavallini e filhas, Dalva Cury e Lenice Amaral, que vivenciaram, incentivaram e proporcionaram momentos de descontração. Com um carinho muito especial, também agradeço a Jéssica Ruiz Silva, minha parceira nesta jornada, pela convivência e amizade. Para mim é uma satisfação tê-la ao meu lado. A todos, muito obrigado.

SUMÁRIO

| | |
|---|----|
| 1. Resumo..... | 1 |
| 2. Abstract | 3 |
| 3. Introdução | 5 |
| 3.1. Foliculogênese, Desenvolvimento, Maturação e Liberação dos Oócitos..... | 6 |
| 3.2. As Classes Reprodutivas das Fêmeas..... | 9 |
| 4. Objetivos e os Modelos Biológicos Utilizados | 11 |
| 5. Materiais e Métodos..... | 13 |
| 5.1. Os espécimes a serem analisados | 13 |
| 5.2. Obtenção de dados biométricos..... | 13 |
| 5.3. Morfometria | 14 |
| 5.4. Classificação morfológica | 15 |
| 5.5. Preparação do material para Microscopia de Luz | 16 |
| 6. Resultados | 18 |
| 6.1. <i>Serrasalmus maculatus</i> | 18 |
| 6.1.1. Foliculogênese e Caracterização das Células Germinativas | 18 |
| 6.1.2. Desenvolvimento Oocitário | 19 |
| 6.1.3. Caracterização Histológica das Fases do Ciclo Reprodutivo..... | 20 |
| 6.1.4. Índice Gonadossomático, Fator de Condição e Período reprodutivo..... | 22 |
| 6.1.5. Fases Reprodutivas vs Foliculogênese | 25 |
| 6.2. <i>Pimelodus maculatus</i> | 27 |
| 6.2.1. Caracterização Histológica das Fases do Ciclo Reprodutivo..... | 27 |
| 6.2.2. Índice Gonadossomático, Fator de Condição e Período Reprodutivo | 28 |
| 6.2.3. Fases Reprodutivas vs Foliculogênese..... | 30 |
| 6.3. Tabela 1: Descrições macro e microscópicas das fases ao longo do ciclo reprodutivo das fêmeas dos peixes, adicionada a atividade do epitélio germinativo | 32 |
| 6.4. Figuras: <i>Serrasalmus maculatus</i> | 33 |
| 6.5. Figuras: <i>Pimelodus maculatus</i> | 57 |
| 7. Discussão | 75 |
| 8. Conclusão..... | 80 |
| 9. Referências Bibliográficas | 81 |
| 10. Anexo I: Protocolo para Colorações (metacrilato glicol) | 87 |
| 11. Anexo II: Declaração da Comissão de Ética em Experimentação Animal | 90 |

LISTA DE FIGURAS

| | |
|---|----|
| Figura1: Foliculogênese e caracterização das células germinativas (<i>S. maculatus</i>) | 35 |
| Figura2: Fase em Regeneração (<i>S. maculatus</i>)..... | 37 |
| Figura3: Subfase Início de Desenvolvimento (<i>S. maculatus</i>) | 39 |
| Figura4: Fase em Desenvolvimento (<i>S. maculatus</i>) | 41 |
| Figura5: Fase Apto à Desova (<i>S. maculatus</i>)..... | 43 |
| Figura6: Subfase Desova Ativa (<i>S. maculatus</i>) | 45 |
| Figura7: Fase em Regressão (<i>S. maculatus</i>) | 47 |
| Figura8: Características Macroscópicas dos Ovários (<i>S. maculatus</i>) | 49 |
| Figura9: Índice Gonadossomático de <i>S. maculatus</i> por Fase do Ciclo Reprodutivo | 50 |
| Figura10: Fator de Condição de <i>S. maculatus</i> por Fase do Ciclo Reprodutivo | 50 |
| Figura11: Índice Gonadossomático de <i>S. maculatus</i> durante as estações do ano | 51 |
| Figura12: Fator de Condição de <i>S. maculatus</i> durante as estações do ano | 51 |
| Figura13: Frequência das fases do ciclo reprodutivo nas estações do ano (<i>S. maculatus</i>) .. | 52 |
| Figura14: Relação do Número de Ninhos em Cada Fase do Ciclo (<i>S. maculatus</i>)..... | 53 |
| Figura15: Relação dos ninhos contendo oogônias/oogônia isolada e ninhos contendo oócito iniciais/oogônia isolada (<i>S. maculatus</i>) | 55 |
| Figura16: Fase em Regeneração (<i>P. maculatus</i>) | 59 |
| Figura17: Fase em Desenvolvimento (<i>P. maculatus</i>)..... | 61 |
| Figura18: Fase Apto à Desova (<i>P. maculatus</i>) | 63 |
| Figura19: Fase em Regressão (<i>P. maculatus</i>)..... | 65 |
| Figura20: Características Macroscópicas dos Ovários (<i>P. maculatus</i>) | 67 |
| Figura21: Índice Gonadossomático de <i>P. maculatus</i> por Fase do Ciclo Reprodutivo..... | 68 |
| Figura22: Fator de Condição de <i>P. maculatus</i> por Fase do Ciclo Reprodutivo | 68 |
| Figura23: Índice Gonadossomático de <i>P. maculatus</i> durante as estações do ano..... | 69 |
| Figura24: Fator de Condição de <i>P. maculatus</i> durante as estações do ano..... | 69 |
| Figura25: Frequência das fases do ciclo reprodutivo nas estações do ano (<i>P. maculatus</i>).. | 70 |
| Figura26: Relação do Número de Ninhos em Cada Fase do Ciclo (<i>P. maculatus</i>) | 71 |
| Figura27: Relação dos ninhos contendo oogônia/oogônia isolada e ninhos contendo oócito iniciais/oogônia isolada (<i>P. maculatus</i>)..... | 73 |

1. RESUMO

Na maioria dos Teleostei o desenvolvimento gonadal é periódico e acompanha as estações reprodutivas anuais. Ao longo da vida reprodutiva feminina a renovação das células germinativas é constante e responde pela produção ilimitada dos folículos ovarianos. Aqui a dinâmica de renovação das células germinativas femininas, que resulta na formação dos folículos ovarianos, foi estudada em duas diferentes espécies de Ostariophysi com distintos comportamentos reprodutivos: o *Serrasalmus maculatus* (Characiformes) e o *Pimelodus maculatus* (Siluriformes). O estudo teve por base dados biométricos, morfométricos e a análise histológica das gônadas, interpretado segundo novas propostas de classificação dos estágios do desenvolvimento oocitário e das fases do ciclo reprodutivo. Adicionalmente, a formação dos folículos ovarianos a partir das oogônias isoladas presentes no epitélio das lamelas, sua proliferação formando ninhos e entrada em meiose dando origem aos oócitos, é descrita tendo como modelo *S. maculatus*. Os estágios do desenvolvimento oocitário são caracterizados para ambas as espécies. *S. maculatus* com período reprodutivo longo compreendido principalmente entre os meses de inverno e primavera (hemisfério sul), tem fecundidade indeterminada. Em *S. maculatus* a foliculogênese é mais intensa nos ovários em **Regeneração**, reconhecidos por conterem apenas oócitos pré-vitelogênicos, alguns já com alvéolos corticais. No epitélio das lamelas os ninhos contendo oogônias em proliferação são proporcionalmente mais numerosos do que as oogônias isoladas. Nas gônadas em **Desenvolvimento**, os ninhos contendo oogônias e aqueles contendo oócitos profásicos iniciais, predominam em relação às oogônias isoladas. Nelas, parte dos oócitos pré-vitelogênicos entram e avançam na vitelogênese. Nas gônadas consideradas **Aptas à Desova**, a quantidade de ninhos de oogônias e oócitos profásicos iniciais é menor relativamente às demais fases e as oogônias isoladas aparecem com maior frequência. Os oócitos vitelogênicos tardios e completamente desenvolvidos convivem com os oócitos pré-vitelogênicos. Resultantes da liberação dos oócitos maduros aparecem os complexos foliculares vazios. Nos ovários em **Regressão**, a retomada da proliferação das oogônias é detectada pelo aumento do número de ninhos, alguns deles já contendo oócitos profásicos iniciais. A atresia dos folículos contendo oócitos não liberados convive com os oócitos pré-vitelogênicos. *Pimelodus maculatus* com período reprodutivo

nos meses de verão (hemisfério sul), tem fecundidade determinada. Também nessa espécie, os eventos iniciais da foliculogênese são mais intensos nos ovários em **Regeneração**, nos quais os únicos oócitos presentes são os pré-vitelogênicos. No epitélio das lamelas, os ninhos contendo oogônias em proliferação são proporcionalmente mais frequentes que as oogônias isoladas e ninhos contendo oócitos profásicos iniciais. Nas gônadas em **Desenvolvimento**, a frequência do número de ninhos contendo oogônia difere estatisticamente da frequência de ninhos de oócitos e as oogônias isoladas no epitélio. Nessas gônadas parte dos oócitos pré-vitelogênicos entram em vitelogênese. Nos ovários **Aptos à Desova**, os ninhos de oogônias e oócitos profásicos iniciais aparecem em menor quantidade relativamente às oogônias isoladas. Neles, os oócitos completamente desenvolvidos predominam sobre aqueles vitelogênicos e pré-vitelogênicos. Nos ovários em **Regressão**, a retomada da proliferação das oogônias é detectada pelo aumento do número de ninhos, alguns deles contendo oócitos profásicos iniciais. A atresia dos folículos contendo oócitos não liberados convive com os oócitos pré-vitelogênicos.

2. ABSTRACT

In most Teleostei the gonadal development is cyclical and follows the annual reproductive seasons. Throughout the female reproductive life the germ cell renewal is constant, and accounts for the unlimited production of ovarian follicles. Here the dynamics of female germ cell renewal, resulting in the formation of ovarian follicles was studied in two different species of Ostariophysi with different reproductive strategies: *Serrasalmus maculatus* (Characiformes) and *Pimelodus maculatus* (Siluriformes). The study was based on biometrics, morphometric and histological analysis of gonads, interpreted according to new proposals for the classification of the phases of the reproductive cycle and for the stages of the oocytes development. Additionally, using *S. maculatus* as a model, we describe the formation of ovarian follicles from the isolated oogonia present in the lamellar epithelium, their proliferation forming cell nests and entrance into meiosis giving rise to the oocytes. The stages of the oocyte development are characterized for both species. *S. maculatus* with long reproductive period comprising the months of winter and spring (southern hemisphere) has an indeterminate fecundity. In *S. maculatus* the folliculogenesis is more intense in the **Regenerating** ovaries, recognized by containing only pre-vitellogenic oocytes, some of them with cortical alveoli. At this time, in the lamellar epithelium the nests with proliferating oogonia are proportionally more numerous than the isolated oogonia. In the **Developing** ovaries, the nests containing oogonia and those with the early prophase oocytes, are predominate over the isolated oogonia. In them, the part of the pre-vitellogenic oocytes enters and advances in vitellogenesis. In the **Spawning Capable** ovaries, the number of nests of oogonia and early prophase oocytes is lower compared with other reproductive phases as the isolated oogonia appear more frequently. In these, the late vitellogenic and full-grown oocytes co-occur with pre-vitellogenic ones. The postovulatory follicle complex appear resulting from the release of mature oocytes. In the **Regressing** ovaries, the resumption of oogonia proliferation is detected by an increase in the number of nests, some of them already containing early prophase oocytes. Atresia of follicles, containing oocytes that were not released, co-occurs with the pre-vitellogenic oocytes. *Pimelodus maculatus* with a reproductive period concentrated in the summer (southern hemisphere), has a determinate fecundity. Also in this species, the initial events of

folliculogenesis in the ovaries are more intense in *Regenerating* phase, in which only oocytes present are the pre-vitellogenic ones. In the lamellar epithelium the nests containing proliferating oogonia are proportionally more frequent than the isolated oogonia and than the nests containing early prophase oocytes. In the *Developing* ovaries, the frequency of the number of nests containing oogonia differs statistically from the frequency of nests with oocytes and from the isolated oogonia and in the epithelium. In these gonads of the pre-vitellogenic oocytes enter in vitellogenesis. In the *Spawning Capable* ovaries, the nests of oogonia and early prophase oocytes appear in a lower number than the isolated oogonia. In them, the full-grown oocytes predominate over those pre-vitellogenic and vitellogenic. In the *Regressing* ovaries, the resumption of the oogonia proliferation is detected by an increase in the number of nests, some containing early prophase oocytes. Atresia of follicles, containing oocytes that were not released, co-occurs with the pre-vitellogenic.

3. INTRODUÇÃO

Na maioria dos Teleostei, com exceção dos semélparos, o desenvolvimento gonadal é cíclico e acompanha as estações do ano. A renovação das células germinativas é constante e novos oócitos são recrutados a cada estação reprodutiva. A fonte dos oócitos que permite que as fêmeas dos teleósteos produzam folículos continuamente durante a sua vida reprodutiva encontra-se no epitélio que margeia as lamelas ovarianas (Grier, 2000; Grier *et al.*, 2009).

Se a fonte dos oócitos situa-se no epitélio das lamelas, deve ser, portanto, no epitélio que se encontram as células tronco da linhagem germinativa feminina. De fato, as oogônias presentes no epitélio das lamelas são morfológicamente distintas e aquelas solitárias e escuras supostamente abrigam as candidatas a células tronco (Quagio-Grassiotto *et al.*, 2011).

É no epitélio das lamelas que as oogônias proliferam, entram em meiose dando origem aos oócitos. A proliferação e diferenciação das oogônias formam agregados celulares no epitélio lamelar, conhecidos como ninhos (Selman & Wallace, 1989). Os estudos realizados por Nakamura e colaboradores (2010), detectam e caracterizam molecularmente estes locais no epitélio das lamelas nos quais as oôgonias proliferam e os denominam berços.

A proliferação mitótica das oôgonias leva à formação de cistos de células germinativas (Nakamura *et al.*, 2011; Quagio-Grassiotto *et al.*, 2011). Por definição, um cisto de células germinativas é formado por um conjunto de células germinativas interconectadas, derivadas de uma única célula germinativa primordial. O conjunto das células germinativas interconectadas é totalmente envolto pelas células somáticas precursoras das células foliculares (Pepling & Spradling, 2001; Choi & Rajkovic, 2006). É na forma de cisto que as oogônias entram em meiose. A individualização dos oócitos envolve a quebra das pontes citoplasmática e do rearranjo das células somáticas que circundam o cisto. Estas últimas são as precursoras das células foliculares, ou seja, as células pré-foliculares. A quebra dos cistos germinativos ocorre no paquíteno tardio na prófase I da meiose (para revisão ver Matova & Cooley, 2001). Entre os vertebrados, a quebra dos cistos germinativos, e subsequente formação dos folículos ovarianos (os

folículos ovarianos contém um único oócito envolto por uma camada de células foliculares), encontra-se relatada em mamíferos (Pepling & Spradling, 2001), em anfíbios (Kloc *et al.*, 2004) e nos peixes teleósteos (Nakamura *et al.*, 2011; Quagio-Grassiotto *et al.*, 2011).

3.1. Foliculogênese, Desenvolvimento, Maturação e Liberação dos Oócitos

Durante a invasão dos cistos, as células pré-foliculares sintetizam a membrana basal que as suporta (França *et al.*, 2010) e que é contínua com a membrana basal do epitélio (Quagio-Grassiotto *et al.*, 2011). Conforme a membrana basal é sintetizada, os folículos ovarianos em formação deixam os ninhos (Mazzoni *et al.*, 2010; Quagio-Grassiotto *et al.*, 2011). O folículo permanece conectado ao epitélio germinativo, uma vez que ambos compartilham uma porção comum da membrana basal. Ao término da foliculogênese, o folículo ovariano recém formado é constituído pelo oócito circundado pelas células foliculares que se apóiam na membrana basal. Células oriundas do estroma circundam o folículo ovariano, exceto na região de compartilhamento da membrana basal, formando a teca. O oócito envolto pelas células foliculares, a membrana basal e a teca formam o complexo folicular (Grier *et al.*, 2009; Mazzoni *et al.*, 2010; Quagio-Grassiotto *et al.*, 2011). Estes eventos em seu conjunto compreendem a foliculogênese (veja revisão em Le Menn *et al.*, 2007; Grier *et al.*, 2009).

O desenvolvimento do oócito ocorre dentro do complexo folicular e compreende os estágios de crescimento primário e secundário, maturação e ovulação (Grier *et al.*, 2009). Os crescimentos, primário e secundário, são também conhecidos como estágios pré-vitelogênico e vitelogênico (Tyler & Sumpter, 1996; Patiño & Sullivan, 2002; Grier *et al.*, 2009). Durante o período pré-vitelogênico, uma grande quantidade de RNA acumula-se no citoplasma, as organelas membranosas proliferam e a zona pelúcida é formada. Em muitas espécies, principalmente nas marinhas, aparecem gotas de lipídio ao redor do núcleo. Os precursores dos alvéolos corticais iniciam sua formação (Selman & Wallace, 1989) que pode ou não estar completa ao final do período pré-vitelogênico (França *et al.*, 2010; Quagio-Grassiotto *et al.*, 2011).

A progressiva deposição de vitelo e o espessamento da zona pelúcida caracterizam a vitelogênese ou crescimento secundário (Wallace & Selman, 1990; Selman & Wallace, 1989). Durante o crescimento secundário, a vitelogenina incorporada pelo oócito dá origem aos glóbulos de vitelo. A vitelogênese progride até que o oócito esteja completamente desenvolvido e o ooplasma preenchido pelos glóbulos de vitelo. Uma vez finalizada a vitelogênese, o oócito poderá ser recrutado para a maturação. A maturação é caracterizada pela migração do núcleo, ou vesícula germinativa, em direção ao polo animal onde a micrúpila está localizada, pela fragmentação do envoltório nuclear, ou seja, pela quebra da vesícula germinativa e retomada da meiose (para revisão ver Patiño & Sullivan, 2002; Le Menn *et al.*, 2007; Grier *et al.*, 2009).

Durante a maturação, nas espécies em que os oócitos acumulam lipídios, as gotas de lipídio formadas durante os crescimentos primário e secundário fundem-se progressivamente em um único e grande glóbulo. Nas espécies com ovos pelágicos, precedendo a ovulação, os glóbulos de vitelo também se fundem. O vitelo é hidrolisado e devido à força osmótica dos aminoácidos ou peptídeos livres, hidrata (Patiño & Sullivan, 2002; Le Menn *et al.*, 2007; Grier *et al.*, 2009, para revisão). Nas espécies com ovos bentônicos, a hidrólise do vitelo é limitada e conseqüentemente a hidratação do vitelo é mais discreta (LaFleur *et al.*, 2005).

Nos peixes ovíparos, uma vez que os oócitos estejam maduros, a ovulação ou oocitação pode ocorrer, com o oócito sendo liberado do interior do complexo folicular para o lúmen ovariano (ver Patiño & Sullivan, 2002; Grier *et al.*, 2009, para revisão).

No que diz respeito à oogênese nos teleósteos, as informações mais divulgadas são, principalmente, oriundas dos estudos com Perciformes marinhos. Estudos recentes, no entanto, têm exposto diferenças significativas no padrão de desenvolvimento oocitário entre espécies marinhas e as de água doce (ver Le Menn *et al.*, 2007; Grier *et al.*, 2009; Lowerre-Barbieri *et al.*, 2011a - para revisão), ou entre os taxa mais basais como os Ostariophysi em relação àqueles mais derivados, caso dos Perciformes (ver Figura 1 adaptada de Quagio-Grassiotto *et al.*, 2009). O esquema abaixo sumariza as principais diferenças do desenvolvimento oocitário nesses grupos de peixes.

DESENVOLVIMENTO OOCITÁRIO

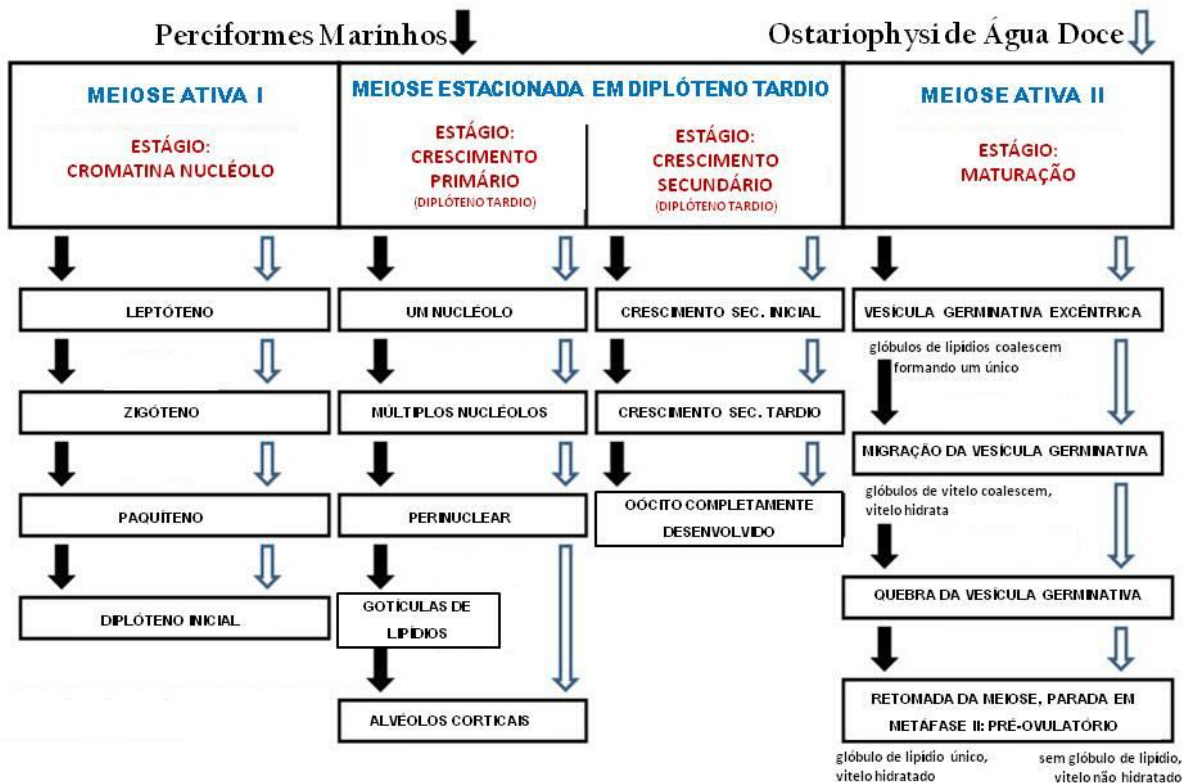


FIGURA1: Esquema comparando o desenvolvimento oocitário de Perciformes marinhos e Ostariophysys de água doce. Adaptado de Quagio-Grassiotto *et al.*, 2009. Seta cheia: Perciformes marinhos; Seta vazia: Ostariophysys de água doce.

A renovação das células germinativas femininas, o desenvolvimento oocitário e o consequente desenvolvimento gonadal que ocorre ao longo das estações do ano, constituem, portanto, a base da caracterização das fases reprodutivas durante a história de vida das fêmeas dos Teleostei. A compreensão da dinâmica de renovação das células germinativas ao longo dos ciclos reprodutivos anuais depende consequentemente da compreensão, primeira, das fases reprodutivas em si.

3.2. *As Classes Reprodutivas das Fêmeas*

O desenvolvimento gonadal das fêmeas pode ser verificado macroscopicamente e as alterações de forma, de tamanho, de cor e de textura das gônadas têm sido utilizadas como parâmetros para a classificação do estado de maturação em que se encontram. Nos estudos sobre a biologia reprodutiva dos peixes neotropicais, a classificação do desenvolvimento gonadal tradicionalmente utilizada, com algumas adaptações ou não, é a proposta por Vazzoler (1996). Nela, de modo geral, as gônadas dos animais sexualmente maduros são classificadas em 5 estádios de maturidade: Em *Repouso*, os ovários apresentam tamanho reduzido, são translúcidos, com pouca vascularização e não são observados oócitos a olho nu; Em *Maturação*, os ovários são maiores, são intensamente vascularizados e são observados pequenos oócitos a olho nu; Os ovários *Maduros* ocupam grande parte da cavidade celomática, são túrgidos e a olho nu observam-se oócitos grandes, opacos ou translúcidos; Quando *Esgotados* ou *Semi-Esgotados*, os ovários apresentam-se em diferentes graus de flacidez, com aspecto hemorrágico, de tamanho relativamente grande mas não volumoso e são observados poucos oócitos (em absorção) com aspectos de grumos. A verificação histológica destes estados tem mostrado, no entanto, que o desenvolvimento das células germinativas em si, nem sempre é consoante com a classificação macroscópica da própria gônada.

A recente revisão por Brown-Peterson e colaboradores (2011) traz uma proposta de compatibilização que se pretende seja aplicável às fêmeas dos teleósteos em geral. Nela, os aspectos macro e microscópicos apresentados pelas gônadas ao longo do ciclo reprodutivo são reunidos e uma correspondência entre as denominações, até então utilizadas, é apresentada. Estes autores reconhecem ao longo do ciclo reprodutivo dos indivíduos aptos à reprodução, fases que se iniciam com a gônada em *Desenvolvimento*, progride para *Apto à Desova/Extrusão*, entra em *Regressão* e progride para *Regeneração*. Gônadas *Imaturas* seriam, conforme esses critérios, aquelas dos indivíduos que ainda não estão aptos para a reprodução, isto é, ainda fora do ciclo reprodutivo porque jovens. As correspondências dessas denominações para as anteriores e a caracterização histológica das mesmas, estão contidas na tabela aqui traduzida e transcrita.

| Fase | Terminologia Anterior | Caracterização Macroscópica e Histológica |
|---|---|--|
| Imaturo Nunca desovado | Imaturo, Virgem | Ovários pequenos, muitas vezes claros, vasos sanguíneos não distintos. Apenas oogônias e oócitos em crescimento primário estão presentes. Sem atresia ou feixes musculares. Parede do ovário fina e pouco espaço entre os oócitos.. |
| Desenvolvimento Gônadas em início de desenvolvimento. Ainda não estão prontas para desovar. | Maturando, desenvolvimento inicial, maturação inicial, maturação intermediária, amadurecimento, pré-vitelogênese. | Ovários um pouco maiores, vasos sanguíneos distintos. Oócitos em crescimento primário, com alvéolos corticais, vitelogênese primária e secundária estão presentes. Sem indício de POF ou oócitos em vitelogênese terciária. Alguns oócitos atrésicos podem estar presentes. <i>Subfase: Início de Desenvolvimento</i> —apenas oócitos em crescimento primário e alvéolos corticais estão presentes. |
| Apto à Desova/extrusão Os peixes estão aptos a desovar neste ciclo. | Maduro, desenvolvimento tardio, maturação tardia, totalmente maduro, grávida, vitelogênese, totalmente desenvolvido, parcialmente esvaziado, pré-desova, desovando. | Ovários grandes, vasos sanguíneos proeminentes. Oócitos individuais visíveis macroscopicamente. Presença de oócitos em vitelogênese terciária. Oócitos com alvéolos corticais, vitelogênese primária e secundária ou POF estão presentes em espécies com fecundidade indeterminada. Pode apresentar oócitos em atresia e/ou oócitos hidratados. Estágios iniciais de maturação podem estar presentes. <i>Subfase: Desova ativa</i> —Oócitos com migração da vesícula germinativa, quebra da vesícula germinativa, hidratação ou ovulação. |
| Regressão Cessa a desova. | Regressão, pós desova, recuperando. | Ovários flácidos, vasos sanguíneos proeminentes. Atresias (em qualquer estágio) e POF presentes. Alguns oócitos com alvéolos corticais e/ou oócitos vitelogênicos podem estar presentes. |
| Regeneração Sexualmente maduro, reprodutivamente inativo. | Repouso, descansando, regredido, recuperando, inativo. | Ovários pequenos, vasos sanguíneos reduzidos, mas ainda presentes. Presença apenas de oogônias e oócitos em crescimento primário. Feixes musculares, vasos sanguíneos grandes, parede ovariana espessa, atresia delta ou gama. POF em estágio tardio de absorção pode estar presente. |

LEGENDA: Descrições macroscópicas e microscópicas das fases ao longo do ciclo reprodutivo das fêmeas dos peixes. O tempo de cada fase é espécie-dependente. Alguns critérios listados para as fases podem variar dependendo da espécie, estratégia reprodutiva ou temperatura da água. Sub fases que se aplicam a todos os peixes estão listada, subfases adicionais podem se definidas por pesquisadores individuais (Tabela2 traduzida para o português a partir da publicação por Nancy J. Brown-Peterson, David M. Wyanski, Fran Saborido-Rey, Beverly J. Macewicz & Susan K. Lowerre-Barbieri (2011). *Marine and Coastal Fisheries: Dynamics, Management, and Ecosystem Science* 3:52–70).

4. OBJETIVOS GERAIS E OS MODELOS BIOLÓGICOS UTILIZADOS

Considerando o exposto, a dinâmica de renovação das células germinativas femininas que resulta na formação dos folículos ovarianos, foi aqui estudada ao longo do ciclo reprodutivo anual em duas espécies de Ostariophysi com distintas estratégias reprodutivas: o *Serrasalmus maculatus* (Ordem Characiformes) e o *Pimelodus maculatus* (Ordem Siluriformes). Os Ostariophysi constituem um grupo basal em Teleostei e compreendem as ordens Cypriniformes, Siluriformes, Characiformes, e Gymnotiformes. Este grupo de peixes, com cerca de 4.500 espécies válidas e com alguns poucos representantes marinhos, predomina nas águas continentais das regiões centro e sul-americanas (Reis *et al.* 2003).

Serrasalmus maculatus, popularmente conhecida como pirambeba, é uma piranha menos agressiva que se adaptada bem aos ambientes lênticos. *S. maculatus* tem período reprodutivo longo, com desova múltiplas e desenvolvimento oocitário assincrônico (Paiva, 1958; Lamas & Godinho, 1996; Teles & Godinho, 1997). *Pimelodus. maculatus*, popularmente conhecido como mandiúva, é um bagre de hábito migratório com período reprodutivo curto. Em *P. maculatus* os ovários das fêmeas caracterizam-se por apresentarem oócitos cujo desenvolvimento ocorre em consonância com as estações climáticas anuais, com os oócitos vitelogênicos, completamente desenvolvidos e em maturação sendo encontrados apenas durante a estação chuvosa, na qual se dá a reprodução (Godinho *et al.*, 1974, 1977; Bazzoli *et al.*, 1997).

Para determinar, ao longo do ciclo reprodutivo, a fase em que a proliferação das células germinativas e, conseqüentemente, quando a foliculogênese é mais intensa, procedeu-se para ambas as espécies:

- à coleta dos dados biométricos de forma a permitir a obtenção do Índice Gonadossomático e do Fator de Condição ao longo das estações do ano;

- à análise macro e microscópica das gônadas e a caracterização das fases reprodutivas, bem como a sua relação com o Índice Gonadossomático e com o Fator de Condição;

-à análise morfométrica, ou seja, a caracterização e contagem dos sítios de proliferação das células germinativas (oogônias e oócitos profásicos iniciais) ao longo do epitélio das lamelas ovígeras, bem como a sua frequência em relação às fases reprodutivas;

-adicionalmente, a foliculogênese e o desenvolvimento oocitário são apresentados utilizando-se como modelo *Serrasalmus maculatus*.

4.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Comparar os indicadores histológicos, proposto para Perciformes marinhos para identificar as fases reprodutivas, em duas espécies de Ostariophysii;
- Descrever a dinâmica de renovação das células germinativas femininas durante o ciclo reprodutivo;
- Determinar a fases do ciclo que a proliferação das células germinativas é mais intensa.

5. MATERIAIS E MÉTODOS

5.1. *Os espécimes analisados*

Um total de 55 fêmeas, todas adultas, de *Serrasalmus maculatus* foram coletadas mensalmente no reservatório de Jurumirim, Alto Rio Paranapanema, Estado de São Paulo, Brasil, no período compreendido entre janeiro de 1996 e dezembro de 1997. No mesmo reservatório e no mesmo período foram coletadas 50 fêmeas, também todas adultas, de *Pimelodus maculatus*. Todos os espécimes foram anestesiados por imersão em solução de benzocaina a 0,1% e eutanasiados segundo os protocolos aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (protocolo nº. 204-CEUA). Os dados biométricos foram registrados e os ovários de todas as fêmeas coletadas, uma vez macroscopicamente analisados, foram rapidamente removidos, transferidos para solução fixadora e processados para análise histológica e morfométrica.

Adicionalmente, 38 fêmeas adultas de *S. maculatus* e 82 de *P. maculatus* foram coletadas no Rio Piracicaba, Estado de São Paulo, Brasil no período compreendido entre janeiro de 2004 e dezembro de 2005, utilizadas para o registro fotográfico e contagem das células germinativas.

Fragmentos das gônadas de todos os exemplares aqui utilizados encontram-se depositados no acervo de réplicas do Laboratório de Biologia da Reprodução de Peixes Neotropicais do Departamento de Morfologia do Instituto de Biociências de Botucatu/UNESP.

5.2. *Obtenção de dados biométricos*

Índice Gonadossomático:

Para os animais coletados entre 1996 e 1997 foram registrados o comprimento-total (L_t), que é a distância, em centímetros, entre o focinho e os últimos filamentos da nadadeira caudal, o peso total (W_t), e o peso da gônada (W_g) em gramas. O comprimento-total, em centímetros, foi obtido com auxílio de ictiômetro. O peso foi determinado em balança de precisão com sensibilidade de 0,01g. O índice gonadossomático (percentagem que as gônadas representam do peso total do indivíduo) é utilizado como um indicador do estado funcional das gônadas (Vazzoler, 1996).

O índice gonadossomático foi calculado pela fórmula $IGS = W_g / W_t \times 100$, onde:

IGS= índice gonadossomático; W_g = peso da gônada; W_t = peso total.

As médias e erro padrão, agrupadas por fases do ciclo e estações do ano, foram analisados pelo método de ANOVA *one-way*, e as comparações multipareadas pelo teste de Tukey.

Fator de Condição:

Também para os animais coletados entre o período de 1996 e 1997, o Fator de Condição foi calculado pelo método alométrico, a partir da expressão $K_n = (W_t - W_o) / L_t^b$, onde:

K_n = fator de condição somático; W_t =peso total; W_o =peso dos ovários; L_t =comprimento total; b =coeficiente angular da regressão entre peso-comprimento.

Para estimar o valor de do coeficiente b , ajustou-se a uma única equação de relação peso-comprimento $W = aL^b$ (LeCren, 1951) a partir do conjunto de todos os indivíduos coletados, conforme metodologia discutida por Lima-Junior e colaboradores (2002).

Os resultados obtidos por fase do ciclo reprodutivo e ao longo das estações do ano foram multiplicados por 10^4 para *Serrasalmus maculatus* e *Pimelodus maculatus* para melhor representação gráfica, e analisados pelo método de ANOVA *one-way*, e as comparações multipareadas pelo teste de Tukey.

5.3. Morfometria

Contagem das Células Germinativas:

Para cada indivíduo foram analisados três cortes histológicos das gônadas de forma aleatória. Em cada corte histológico foram contadas as oogônias isoladas e os pontos de proliferação, como ninhos contendo apenas oogônias e ninhos contendo oócitos profásicos iniciais. Em cada corte histológico, os valores contabilizados para os ninhos de oogônias e ninhos de oócitos iniciais, separadamente, foram divididos pelo número de oogônias isoladas encontradas no epitélio germinativo.

Para verificar a total distribuição dos dados, a média de cada animal obtida por esta razão foi representada de forma gráfica (boxplot) em cada fase do ciclo reprodutivo.

Nestes, constam a mediana, primeiro e terceiro quartil (1Q e 3Q), valor mínimo e máximo (Fig2).

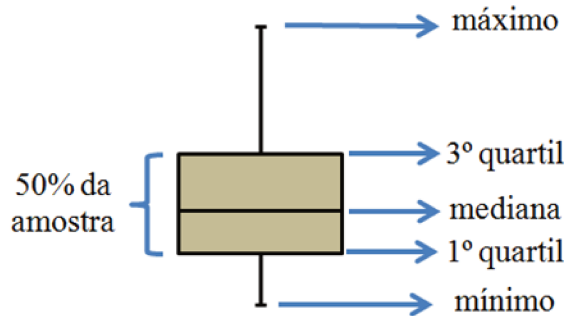


Figura2: Representação gráfica em boxplot

Como referencial gráfico, a razão oogônia isolada/oogônia isolada também foi representada. Os resultados foram analisados e testados pela Análise de Variância (ANOVA) Não-Paramétrica de Kruskal-Wallis e Teste de Dunn *a posteriori*.

5.4. *Classificação morfológica*

Foliculogênese:

A descrição da foliculogênese segue as propostas de Grier e colaboradores (2009) e Quagio-Grassiotto e colaboradores (2011).

Desenvolvimento oocitário:

O desenvolvimento oocitário foi classificado conforme nomenclatura proposta por Grier e colaboradores (2009). A caracterização dos oócitos, segundo o estágio de desenvolvimento, em *Pimelodus maculatus* segue Quagio-Grassiotto e colaboradores (2011).

Atresia:

A classificação das etapas da atresia segue o padrão de Hunter e Macwics (1985).

Tipo de fecundidade:

A classificação do tipo de fecundidade foi feita conforme proposta por Hunter e colaboradores (1992) e adotada por Murua e Saborino-Rey (2003) e Lowerre-Barbieri e colaboradores (2011a).

Fases reprodutivas:

A classificação das fases reprodutivas foi feita com base na proposta de Brown-Peterson e colaboradores (2011).

5.5. Preparação do material para a Microscopia de Luz

Para microscopia de luz, 93 ovários de *Serrasalmus maculatus* e 132 de *Pimelodus maculatus* fixados em solução de glutaraldeído 2% e paraformaldeído 4% em tampão Sorensen (0,1M a pH 7,2) por pelo menos 24 horas foram desidratados em uma série crescente de álcool (70% por 2 dias; 95% por no máximo 4 horas), infiltrados em solução de resina+álcool 95% (1:1) por vários dias e incluídos em Histoiresina Leica (metacrilato glicol). Cortes longitudinais com 3µm de espessura, obtidos com navalhas de vidro foram corados com PAS+Hematoxilina Férrica+Metanil Yellow (Quintero-Hunter *et al.*, 1991). Toda a documentação histológica foi feita em sistema computadorizado (Olympus BX61 e Leica MZ12) para análise de imagens.

Método de Reticulina

A reticulina ou fibra reticular é um tipo de fibra colágena composta de colágeno tipo III (Strum *et al.*, 2007). Essas fibras, juntas com a lâmina basal, formam a membrana basal, na qual o epitélio encontra-se apoiado (Junqueira & Carneiro, 1999). As fibras reticulares são argirófilas, apresentando alta afinidade por sais de prata (Junqueira & Carneiro, 1999). Dessa forma, o Método de Reticulina, que envolve impregnação por prata, foi empregado para delinear a membrana basal ao longo do epitélio que margeia as lamelas ovígeras.

A técnica se dá pela sensibilização do tecido através de um agente oxidante, o permanganato de potássio, que causa redução dos grupos aldeídos associados à reticulina. Posteriormente ocorre deposição de íons de prata carregados positivamente sobre os grupos aldeídos e finalmente redução de íons de prata pela ação do formol (Puchtler & Waldrop, 1978; Vidal, 1988), resultando numa coloração escura (preto-acastanhado). Como resultado, regiões que apresentam reticulina coram-se em preto acastanhado.

Os cortes histológicos foram tratados com permanganato de potássio 1% por 3 minutos e lavados rapidamente em água destilada, colocando-se na sequência ácido oxálico

por 2 minutos. Após nova lavagem em água destilada, tratou-se o material com alúmen de ferro 1% por 3 minutos e realizou-se uma nova lavagem. O material foi então submetido ao tratamento com prata amoniacal por 3 minutos e lavado com água destilada em abundância para retirar todo o excesso de prata. Finalmente o material foi tratado com formol 10% por 3 minutos e lavado em água destilada. Após desidratação em estufa, as lâminas foram montadas.

6. RESULTADOS

6.1. *Serrasalmus maculatus*

6.1.1. *Foliculogênese e Caracterização das Células Germinativas*

O epitélio germinativo ao longo das lamelas é formado por células pavimentosas (células somáticas) e entre elas encontram-se as oogônias (células germinativas) (Fig1A) numa distribuição descontínua. A cada ciclo reprodutivo, as oogônias residentes no epitélio dividem-se por mitose constituindo os ninhos (Fig1B-C).

As oogônias que não são solicitadas para a reprodução, e que permanecem quiescentes, são denominadas de oogônias indiferenciadas (Fig1A-B). Estas apresentam forma ovaladas, de pequenas dimensões, com citoplasma escasso. Tem núcleo basofílico, de forma irregular, com um único nucléolo evidente (Fig1A-B). As que são recrutadas para a reprodução são denominadas de oogônias diferenciadas (Fig1C) e possuem forma mais volumosa e arredondada, com citoplasma bem claro. Tem núcleo pouco basofílico, de forma bem regular e esférico, com um único nucléolo evidente (Fig1C). Todo o conjunto de células permanece sempre acima da membrana basal do epitélio lamelar (Figs1D, H; 2G). Próximos aos ninhos, na região do estroma, são encontrados vasos sanguíneos (Figs1B, C, J, L, N; 4H).

As oogônias indiferenciadas e as diferenciadas podem conviver num mesmo ninho (Fig1E-F). Cada oogônia é envolta e individualizada pelas células pré-foliculares (Fig1F). Estas oogônias continuam a dividir-se por mitose (Figs1F, G; 2H), formando cistos germinativos, que são delimitados pelas células pré-foliculares (Fig1F, G, I). Este conjunto projeta-se em direção ao estroma, mas permanece sempre acima da membrana basal (Figs1H; 2G). Apoptose das oogônias no interior dos cistos pode ocorrer. É detectada pela presença de estruturas circulares fortemente basofílicas no citoplasma e ausência do núcleo (Fig1G, L; 3D).

As oogônias diferenciadas presentes nos cistos germinativos (Fig1I) entram em meiose originando os oócitos (Fig1J-N). Cistos contendo oogônias e cistos contendo oócitos, em geral co-ocorrem num mesmo ninho (Figs1J-M; 2H; 3E; 4F-H; 7H). Nos cistos germinativos, o padrão de cromatina caracteriza as diferentes etapas da prófase I. Em

Leptóteno (Figs1J; 2H; 3E; 4F; 7H), o núcleo é pouco basófilo, com cromatina pouco granular e citoplasma mais claro. A basofilia do núcleo aumenta progressivamente com o avanço da prófase. Em Zigóteno (Figs1K; 4G), a cromatina torna-se mais granular e em Paquíteno (Figs1M-N; 4H) mostra um aspecto filamentososo devido o pareamento dos cromossomos homólogos. O Diplóteno (Figs1N; 4I) é detectado pelo reaparecimento do nucléolo e pela condensação perinuclear da cromatina formando um anel basofílico internamente ao envoltório nuclear. Os oócitos em Diplóteno apresentam núcleo redondo e citoplasma levemente basofílico devido ao início do acúmulo de RNA. Surgem múltiplos nucléolos que se dispõem perifericamente, junto ao envoltório nuclear e quiasmas passam a ser visualizados (Fig4I).

Ao final de Paquíteno e início de Diplóteno os oócitos são individualizados pelas células pré-foliculares (Figs1N; 4H), que sintetizam sua membrana basal e rompem os cistos formando os folículos ovarianos (Figs1O-P; 4I; 6F), que por sua vez, permanecem em Diplóteno até a maturação. Células mesenquimais do estroma ovariano circundam os folículos dando origem a teca e, conseqüentemente, aos complexos foliculares. Estes últimos, sempre compartilham com o epitélio germinativo certa extensão de membrana basal (Fig1P), durante todo o crescimento oocitário. É por essa região que o oócito maduro faz passagem para o lúmen na desova (Fig6E).

6.1.2. *Desenvolvimento Oocitário*

No início do crescimento primário, com a alta síntese e conseqüente deposição de RNA no citoplasma, os folículos ovarianos tornam-se intensamente basofílicos (Fig5E). À medida que o oócito cresce, as organelas membranosas aumentam em número e extensão, o que, na microscopia ótica, é detectado como ranhuras não coradas no citoplasma (Fig2D). A formação dos alvéolos corticais ocorre bem cedo, nos folículos ainda pequenos (Fig1O). Aparecem como vesículas pequenas dispersas pelo citoplasma e que se deslocam para a periferia do oócito (Fig2E). Com o desenvolvimento dos oócitos, estas vesículas aumentam em número e tamanho. Na microscopia de luz, o contorno nuclear inicialmente regular, ao final do crescimento primário torna-se irregular com inúmeras reentrâncias (Fig2E, 3C). A zona pelúcida que aparece com uma única camada já nos oócitos menores (Fig2D), nos

oócitos pré-vitelogênicos maiores apresenta claramente duas camadas que respondem ao PAS (Fig2E).

O desenvolvimento secundário caracteriza-se pela contínua deposição do vitelo. É detectado, inicialmente, pelo aparecimento de um pontilhado PAS positivo ao redor do núcleo (Fig3C). Esses pontos, aparentemente, fundem-se entre si para formar pequenas vesículas que, posteriormente, fundem-se aos glóbulos de vitelo (Fig4C). Os glóbulos de vitelo surgem na periferia do oócito e gradualmente preenchem o citoplasma do oócito (Fig4D). As irregularidades do contorno nuclear tornam-se mais evidentes (Fig4D). Os alvéolos corticais continuam sendo formados ao longo de todo o crescimento secundário (Figs4D; 5C), são cada vez maiores e dispõem-se em camadas junto ao oolema (Fig5C). A zona pelúcida torna-se mais espessa e uma terceira camada, que responde ao Metanil Yellow, é depositada (Figs3C; 4C-D). Células foliculares continuam a se dividir por mitose, acompanhando o crescimento oocitário (Fig4C-inset). No oócito completamente desenvolvido, o citoplasma fica repleto de glóbulos de vitelo que são visivelmente maiores (Fig5C).

Com o desencadear da maturação, o núcleo migra em direção à micrópila (Fig6C). Com a liberação do oócito para o lúmen, o complexo folicular pós-ovulatório (Fig6D) permanece conectado ao epitélio germinativo (Fig6E). O complexo folicular pós-ovulatório é constituído pelas células foliculares, juntamente com a membrana basal e células da teca. Oócitos não liberados na desova entram em atresia (Fig7D) e são totalmente absorvidos.

6.1.3. Caracterização Histológica das fases do Ciclo Reprodutivo

Ovários em Regeneração: Os ovários das fêmeas, nesta fase, apresentam apenas oócitos em crescimento primário (Fig2A-B), que podem ter uma ou duas camadas na zona pelúcida (Fig2D-E). Nas lamelas ovígeras, uma grande quantidade de ninhos contendo oogônias em proliferação (Fig2F, H) é encontrada no epitélio, acima da membrana basal (Fig2G). Oogônias isoladas e ninhos contendo oócitos profásicos iniciais também estão presentes. Nos folículos ovarianos, a basofilia do ooplasma diminui conforme os oócitos crescem e avançam no desenvolvimento. O aparecimento dos alvéolos corticais ocorre mesmo nos oócitos de pequenas dimensões. Durante todo o desenvolvimento o oócito

permanece conectado ao epitélio lamelar através da membrana basal (Fig2C). Em alguns casos, é possível visualizar restos de absorção de oócitos não desovados, ou que não completaram seu total desenvolvimento, já num processo tardio de absorção. Esses ovários caracterizam-se, ainda, pela presença de numerosos vasos sanguíneos e cápsula espessa (Fig2B).

Ovários em Desenvolvimento: Nos ovários, com o avanço no ciclo reprodutivo, parte dos folículos entra em vitelogênese (Fig4A-B). Nos oócitos, uma nova camada é depositada externamente na zona pelúcida e os glóbulos de vitelo começam a ser visualizados em alguns oócitos (Fig4C-D). Conforme os oócitos desenvolvem-se, as camadas da zona pelúcida aumentam em espessura e os alvéolos corticais tornam-se mais numerosos e maiores (Fig4C-D). As células foliculares continuam proliferando, de forma a poderem acompanhar o crescimento dos oócitos (Fig4C-inset). Como a vitelogênese não ocorre de forma sincrônica, diferentes grupos de oócitos, com diferentes tamanhos, convivem na lamela (Fig4B). Assim, numa mesma lamela, além dos oócitos em vitelogênese, são encontrados oócitos pré-vitelogênicos, ninhos contendo pequena quantidade de oogônias (Fig4E) e ninhos contendo oócitos profásicos iniciais (Fig4F-H). Oogônias isoladas no epitélio também continuam presentes, porém, numa menor proporção em relação aos pontos de proliferação. A *Subfase Início de Desenvolvimento* (Fig3) é caracterizada pela presença de oócitos: cuja terceira camada na zona pelúcida ainda é pouco espessa (Fig3C-inset); com uma quantidade e tamanho visivelmente maior de alvéolos corticais, comparado aos oócitos pré-vitelogênicos (Fig3B-C); pelo pontilhado PAS positivo ao redor do núcleo e alguns poucos e pequenos glóbulos de vitelo (Fig3C). Nas lamelas dessa subfase, o que chama a atenção são os ninhos contendo oócitos profásicos iniciais com grande quantidade de células (Fig3E), que não se observa nas demais fases do ciclo reprodutivo. Também são observados ninhos de oogônias em divisão e, em alguns casos, oogônias em apoptose (Fig3D).

Ovários Aptos à Desova: Nestes, os oócitos plenamente desenvolvidos ocupam a maior parte das lamelas (Fig5A-B). O citoplasma desses oócitos fica repleto de glóbulos de vitelo que se fundem entre si, tornando-os maiores (Fig5C). Os alvéolos corticais concentram-se na periferia dos oócitos. Outros oócitos, com deposição inicial de vitelo e

que ainda não completaram o seu desenvolvimento, também estão presentes, assim como os pré-vitelogênicos (Fig5B). No epitélio das lamelas, prevalece a quantidade de oogônias isoladas (Fig5E) e, em alguns ovários, ninhos contendo uma pequena quantidade de oogônias (Fig5D). Na *Subfase Desova Ativa*, observa-se a migração do núcleo ao pólo animal da célula, caracterizando a maturação dos oócitos (Fig6A-C). Complexos foliculares pós-ovulatórios, recém desovados, convivem com os oócitos que estão iniciando a maturação e com os completamente desenvolvidos (Fig6A). A presença de oócitos pré-vitelogênicos e oócitos em vitelogênese inicial indica o recrutamento de oócitos para o crescimento secundário concomitante com a desova (Fig6D-E), característica das espécies com fecundidade indeterminada. De todas as fases reprodutivas esta é a que contém maior variação, pois possui a maior variedade de oócitos em diferentes estágios de desenvolvimento. Na lamela desta subfase, o que chama a atenção é a grande quantidade de oogônias isoladas no epitélio (Fig6F), comparada a quantidade de ninhos contendo oogônias em proliferação e ninhos contendo oócitos profásicos iniciais.

Ovários em Regressão: A atresia dos folículos, cujos oócitos não foram liberados, convive com os oócitos pré-vitelogênicos e oócitos em crescimento secundário (Fig7A-C). No início do processo de atresia (atresia alfa), as células foliculares tornam-se hipertróficas e invadem o oócito (Fig7E-F) provocando ruptura na zona pelúcida, tornando-a descontínua (Fig7E). Os glóbulos de vitelos perdem sua integridade estrutural, apresentando uma área homogênea e liquefeita (Fig7D-E). Conforme o processo avança (atresia beta), o folículo aparece como estrutura compacta, composta pelas células foliculares desorganizadas contendo grandes vacúolos no citoplasma. No epitélio germinativo, a retomada da proliferação mitótica é observada pelo aumento do número de ninhos contendo oogônias (Fig7G), porém, menos intenso que na *Fase em Regeneração*. Ninhos contendo oócitos profásicos iniciais também são observados (Fig7H) e a quantidade de células presentes no interior dos ninhos é menor daquela encontrada na *Subfase Início de Desenvolvimento*.

6.1.4. Índice Gonadossomático, Fator de Condição e Período Reprodutivo

Os dados de Índice Gonadossomático de *Serrasalmus maculatus* revelam que estes valores estão diretamente relacionados com o desenvolvimento do ovário durante o ciclo

reprodutivo. O menor valor do IGS (Fig9) é observado na *Fase em Regeneração* ($0,51\pm 0,06$), na qual o ovário, visto a olho nu, é mais delgado e translúcido (Fig8A-B).. Este baixo valor corresponde à presença apenas de oócitos pré-vitelogênicos nas lamelas ovígeras (Fig2A-B), os quais não são macroscopicamente observáveis.

Com a entrada dos oócitos em vitelogênese, característica da *Fase em Desenvolvimento* (Figs3 e 4), o valor do IGS aumenta para $0,95\pm 0,10$ (Fig9). Estes dados mostram que o volume ocupado pela gônada na cavidade abdominal torna-se um pouco maior, porém sem apresentar diferenças estatísticas em relação à *Fase em Regeneração*. Resultante da não sincronia do processo de vitelogênese (Fig4A-B), oócitos ainda pequenos, mas de dimensões variadas, são agora macroscopicamente observáveis (Fig8E-F). A olho nu, ovários em *Início de Desenvolvimento* (Fig8C-D) podem ser facilmente confundidos com aqueles em *Fase em Regeneração*, diferindo destes apenas quanto a dimensão dos oócitos.

O valor máximo de IGS ($4,46\pm 0,33$) (Fig9) é atingido nos ovários *Aptos à Desova*, fase que é caracterizada pela presença dos oócitos completamente desenvolvidos (Fig5), ou em maturação (Fig6). Estes ovários apresentam maior dimensão (Fig8G-J) e ocupam maior volume na cavidade abdominal e, conseqüentemente, valores de IGS que diferem estatisticamente das demais fases do ciclo reprodutivo (Figs9). Nessa fase, os oócitos completamente desenvolvidos (Fig5C) e oócitos em maturação (Fig6C) são claramente observados a olho nu como oócitos maiores (Fig8G-J). Os oócitos em maturação são facilmente expelidos do ovário se pressionado. Estes convivem nas lamelas com oócitos pré-vitelogênicos e oócitos em vitelogênese inicial, ou que não completaram totalmente seu desenvolvimento (Fig6B), detectáveis macroscopicamente como oócitos menores de dimensões variadas (Fig8I-J).

Após a desova, durante a *Fase em Regressão*, o valor do IGS diminui para $0,78\pm 0,06$ (Fig9), porém não atingem médias inferiores àquelas encontradas durante a *Fase em Regeneração*. Macroscopicamente alguns oócitos pequenos ainda são observados e os ovários apresentam certa flacidez (Fig8K-L). A luz do ovário torna-se evidente a olho nu (Fig8L). Com uso da histologia, observam-se complexos foliculares pós-ovulatórios, resultado da liberação dos oócitos maduros, e atresias foliculares em diferentes estágios de

absorção convivendo com oócitos pré-vitelogênicos e oócitos em crescimento secundário (Fig7).

Os dados do Fator de Condição corpóreo (Fig10) revelam que é na *Fase em Regressão* do ovário que se observa o menor valor ($58,85 \pm 2,82$). As *Fases de Regeneração* e *Desenvolvimento* ovariano marcam um pequeno aumento no bem estar desses indivíduos ($61,86 \pm 2,04$ e $63,30 \pm 2,70$, respectivamente), que atinge médias mais elevadas na *Fase Apto à Desova* ($66,10 \pm 3,65$). Estes valores do Fator de Condição não apresentaram diferenças estatísticas.

Ao analisar o Índice Gonadossomático durante as estações do ano (Fig11), observa-se uma redução do valor de IGS de verão ($1,13 \pm 0,24$) para outono ($0,69 \pm 0,07$), porém não apresentando diferenças estatísticas entre si. Os maiores valores de IGS são encontrados nos meses correspondentes ao inverno ($3,19 \pm 0,56$) e primavera ($3,43 \pm 0,63$) (Fig11) que diferem estatisticamente das demais estações do ano. Estes dados indicam que o período de desova ocorre entre os meses de inverno e primavera.

Os valores obtidos para o Fator de Condição (Fig12) mostram um aumento do “bem estar” dessas fêmeas de verão ($60,50 \pm 3,01$) para outono ($61,78 \pm 2,49$). As maiores médias são observadas no inverno ($66,12 \pm 3,90$) e primavera ($66,52 \pm 4,19$). Os valores apresentados nestas estações não apresentaram diferenças estatísticas.

A frequência das fases do ciclo reprodutivo (Fig13) no período do verão mostra uma ocorrência maior de indivíduos em *Desenvolvimento* (53%). Os demais indivíduos nesta estação apresentaram ovários em *Regeneração* (23,5%), *Aptos à Desova* (17,6%) e em *Regressão* (5,9%). No outono, a maior frequência encontrada é, também, de indivíduos em *Desenvolvimento* (54,5%). Os demais indivíduos coletados apresentaram ovário em *Regeneração* (36,4%) e em *Regressão* (9,1%). Não foram encontrados indivíduos *Aptos à Desova* no outono. A frequência aqui registrada confirma a redução dos valores atribuídos ao IGS (Fig11) de verão para outono.

Nos meses de inverno, predominam os indivíduos *Aptos à Desova* (66,7%) (Fig13). Os demais indivíduos coletados no inverno apresentaram ovário em *Desenvolvimento* (25%) e uma pequena porcentagem em *Regeneração* (8,3%). De modo semelhante, na primavera predominam os indivíduos *Aptos à Desova* (60%), enquanto os demais

encontram-se em *Desenvolvimento* (13,3%), *Regeneração* (20%) ou *Regressão* (6,7%). Estes dados coincidem com os maiores valores atribuídos ao IGS (Fig11) indicando o período reprodutivo de *S. maculatus* compreendido entre os meses de inverno e primavera.

6.1.5. Fases Reprodutivas vs Foliculogênese

A análise da dinâmica da renovação das células germinativas ao longo do ciclo reprodutivo (Fig14) mostra que na *Fase em Desenvolvimento* o número de ninhos contendo oogônias em proliferação e ninhos contendo oócitos profásicos iniciais é maior que o número de oogônias isoladas no epitélio lamelar (Fig14A-B). No epitélio germinativo destes ovários, a maior frequência encontrada é de 1 a 3 ninhos contendo oogônias para cada oogônia isolada (Fig14A), sendo observado um único indivíduo com até 6,5 ninhos contendo oogônias em proliferação/oogônia isolada (Fig14A). Também para cada oogônia isolada são encontrados, no máximo, 13 ninhos contendo oócitos profásicos iniciais (Fig14B). Estes ninhos são mais frequentes em proporções de 1 a 3 ninhos contendo oócitos/oogônia isolada. Desta mesma maneira, a Figura 14C-D, que considera apenas os indivíduos que apresentam ovários em *Início de Desenvolvimento*, chama a atenção pela grande dispersão dos números de ninhos contendo oócitos iniciais/oogônias isoladas.

Já nos ovários *Aptos à Desova*, a quantidade de ninhos contendo oogônias em proliferação aproxima-se do número de oogônias isoladas (Fig14E). A frequência registrada na Figura 14E revela que, em alguns indivíduos, um maior número de ninhos contendo oogônias é observado. Já a quantidade de ninhos contendo oócitos profásicos iniciais é menor, ou equivalente ao número de oogônias isoladas (Fig14F), evento que chama a atenção nesta fase do ciclo reprodutivo. Considerando apenas os indivíduos com *Desova Ativa* (ou ‘desovando’) (Fig14G-H), tem-se que, tanto os ninhos contendo oogônias em proliferação, quanto ninhos contendo oócitos iniciais, são mais frequentes entre 0 e 1 (Fig14G-H). Estes dados mostram que na *Subfase Desova Ativa* o número de oogônias isoladas é maior que o número de ninhos contendo oogônias e ninhos contendo oócitos iniciais.

Após a desova, nos ovários que entram em *Regressão* (Fig14I-J), ocorre um aumento de ninhos contendo oogônias, que varia de 2 a 4 ninhos para cada oogônia isolada

(Fig14I). No entanto, o mesmo não acontece com o número de ninhos contendo oócitos iniciais que são observados em quantidades equivalentes ao de oogônias isoladas (Fig14J).

Na *Fase em Regeneração*, a proliferação das oogônias é detectada pelo aumento do número de ninhos contendo oogônias em relação às oogônias isoladas. A Figura 14K revela uma quantidade que varia de 1 até 8 ninhos contendo oogônias em proliferação para cada oogônia isolada. A quantidade de ninhos contendo oócitos profásicos iniciais (Fig14L) não ultrapassa os valores observados na *Fase de Desenvolvimento* (Fig14B) e *Subfase Início de Desenvolvimento* (Fig14D).

A Figura 15 compara a dinâmica dos ninhos contendo oogônias e ninhos contendo oócitos iniciais ao longo das fases do ciclo reprodutivo. A Figura 15A mostra que o número de ninhos contendo oogônias por oogônia isolada não difere, estatisticamente, entre *Subfase Início de Desenvolvimento*, *Fase em Desenvolvimento*, *Fase de Regressão*, *Fase em Regeneração*. Contudo, é nos ovários em *Regeneração* em que se encontram os valores mais elevados. Estes dados revelam que nestas fases ocorre intensa atividade mitótica das oogônias. No entanto, no *Desenvolvimento* há uma redução da quantidade de ninhos contendo oogônias em proliferação. A *Fase Apto à Desova* e a *Subfase Desova Ativa* apresentam os menores valores quanto ao número de ninhos contendo oogônias, revelando que nesta fase e subfase ocorre uma redução da atividade mitótica das oogônias. De modo que, na *Subfase Desova Ativa*, estas oogônias isoladas possivelmente permanecem quiescentes. Após a desova, na *Regressão*, o aumento do número de ninhos sinaliza a retomada da proliferação das oogônias.

Por fim, a Figura 15B mostra que o número de ninhos contendo oócitos iniciais não difere, estatisticamente, entre *Subfase Início de Desenvolvimento*, *Fase em Desenvolvimento*, *Fase de Regressão* e *Fase em Regeneração*. Contudo, na *Fase em Desenvolvimento* e *Subfase Início de Desenvolvimento* encontram-se os valores mais elevados destes ninhos. Estes dados revelam que nestas fases ocorre maior incidência da entrada na meiose. Na *Fase Apto à Desova* e *Subfase Desova Ativa* a quantidade destes ninhos é menor que o número de oogônias isoladas, sugerindo que estas se encontram quiescentes no epitélio. Após a desova, na *Fase em Regressão*, a quantidade de ninhos contendo oócitos aumenta, demonstrando que nesta fase a entrada da meiose é retomada.

A **Tabela1** adapta e adiciona à tabela de Brown-Peterson e colaboradores (2011) a dinâmica de renovação das células germinativas ao longo do ciclo reprodutivo em *Serrasalmus maculatus*.

6.2. *Pimelodus maculatus*

6.2.1. *Caracterização Histológica das fases do Ciclo Reprodutivo*

Ovários em Regeneração: Os ovários das fêmeas, nesta fase do ciclo reprodutivo, apresentam cápsula espessa (Fig16A-B), feixes musculares no interior das lamelas (Fig16C) e oócitos em crescimento primário (Fig16D). Ao contrário de *Serrasalmus maculatus*, estes oócitos não apresentam alvéolos corticais e a zona pelúcida é formada por uma única camada responsiva ao PAS (Fig16D-inset). Alguns oócitos em atresia podem estar presentes nesta fase (Fig16E). No epitélio das lamelas, a foliculogênese é intensa, apresentando grande quantidade de ninhos contendo oogônias em proliferação (Fig16F-G), assim como ninhos contendo oócitos nas fases iniciais da meiose (Fig16H-K). Oogônias isoladas também estão presentes numa pequena proporção em relação aos ninhos.

Ovários em Desenvolvimento: Conforme progride o ciclo reprodutivo, parte dos folículos entra em vitelogênese (Fig17A-B). Com o avanço da vitelogênese, os glóbulos de vitelo vão sendo continuamente formados (Fig17C-E). Os oócitos pré-vitelogênicos continuam presentes. Em geral, no epitélio predominam os ninhos contendo oogônias em proliferação (Fig17G), porém com menor quantidade à semelhança do que ocorre nos ovários em *Regeneração*. Oogônias isoladas e ninhos contendo oócitos profásicos iniciais aparecem em proporções semelhantes (Fig17F, H).

Ovários Aptos à Desova: Nestes, oócitos plenamente desenvolvidos ocupam a maior parte das lamelas (Fig18A-C). O recrutamento dos oócitos em crescimento primário para o secundário só ocorre antes da desova, característica das espécies com fecundidade determinada. Oócitos pré-vitelogênicos também estão presentes. No epitélio das lamelas, a quantidade de oogônias isoladas (Fig18D) é proporcionalmente equivalente à quantidade de

ninhos contendo oogônias em proliferação (Fig18E). Ninhos contendo oócitos profásicos iniciais são escassos (Fig18F).

Ovários em Regressão: Nas lamelas, a atresia folicular dos oócitos não liberados convive com os oócitos pré-vitelogênicos, tanto para as fêmeas que desovaram (Fig19A-B), quanto para àquelas com desova ignorada (Fig19C-D). A atresia folicular é detectada: pela presença de células foliculares hipertróficas, fagocíticas e que se projetam para o interior dos oócitos; zona pelúcida fragmentada ou já removida pelas células foliculares; e fusão e liquefação dos glóbulos de vitelos (Fig19E, E-inset). Estágios mais avançados de atresia (atresia beta) também estão presentes (Fig19F). Não são observados oócitos em vitelogênese inicial, característica das espécies com fecundidade determinada. No epitélio das lamelas, a retomada da proliferação mitótica é observada pelo aumento do número de ninhos contendo oogônias (Fig19G), porém, em menor intensidade se comparada à *Regeneração*. Ninhos contendo oócitos iniciais (Fig19H) e as oogônias isoladas ocorrem em quantidades aproximadamente iguais.

6.2.2. Índice Gonadossomático, Fator de Condição e Período Reprodutivo

Os dados de Índice Gonadossomático mostram a evolução dos ovários de *Pimelodus maculatus* ao longo do ciclo reprodutivo. Com o menor valor do IGS (Fig21) sendo observado durante a *Regeneração* do ovário ($0,81 \pm 0,05$), demonstrando o pequeno volume ocupado pela gônada na cavidade abdominal. Este baixo valor corresponde, na histologia, à presença dos oócitos em crescimento primário que predominam o interior das lamelas (Fig18). Macroscopicamente, estes ovários caracterizam-se pela firme consistência, não sendo possível, neles, a detecção (a olho nu) dos oócitos pré-vitelogênicos (Fig20A-B).

Com o início e avanço da vitelogênese, característicos da *Fase em Desenvolvimento* (Fig17), o valor de IGS aumenta para $1,08 \pm 0,03$ (Fig21). Macroscopicamente, os ovários em *Desenvolvimento* tornam-se ligeiramente maiores, comparados aos ovários em *Regeneração*. Neles, oócitos pequenos e opacos passam a ser observáveis a olho nu (Fig20C-D).

O valor máximo do IGS ($4,03 \pm 1,11$) é atingido na *Fase Apto à Desova*. Esta é única fase em que estes índices apresentam diferença estatística em relação às demais fases do

ciclo reprodutivo (Fig21). Na histologia, estes ovários são caracterizados pela presença dos oócitos completamente desenvolvidos (Fig18), que convivem com oócitos pré-vitelogênicos e aqueles que não completaram seu desenvolvimento. Os oócitos completamente desenvolvidos têm coloração amarelada quando observados a olho nu e são maiores do que aqueles que ainda não completaram seu desenvolvimento (Fig20E-F). Os oócitos em crescimento primário não são detectados a olho nu. Os ovários aumentam em tamanho, ocupando maior volume na cavidade abdominal. Conseqüentemente, o valor de IGS difere estatisticamente das demais fases do ciclo reprodutivo.

Com o término da desova, os ovários entram em *Regressão* e o valor de IGS diminui para $1,42 \pm 0,33$. Estas gônadas assemelham-se às gônadas em *Regeneração* quanto às dimensões macroscópicas. Entretanto as gônadas em *Regressão* apresentam certa flacidez, vasos sanguíneos grandes e, em alguns casos, alguns oócitos observáveis a olho nu. Na histologia, estes oócitos correspondem àqueles em atresia (Fig19) que convivem nas lamelas com os oócitos em crescimento primário.

Os dados do Fator de Condição corpóreo (Fig22) revelam que na *Fase em Regressão* do ovário que se observa o menor valor ($45,14 \pm 2,94$). As *Fases de Regeneração* e *Apto à Desova* marcam um pequeno aumento no grau de hígidez desses indivíduos ($49,03 \pm 0,97$ e $51,08 \pm 3,99$, respectivamente), que atinge médias mais elevadas na *Fase em Desenvolvimento* ($66,34 \pm 5,11$).

A análise do Índice Gonadossomático durante as estações do ano (Fig23) mostra uma grande redução nos valores de IGS de verão ($2,32 \pm 0,59$) para outono ($0,62 \pm 0,10$), que diferem estatisticamente entre si. No inverno, um sutil aumento nos valores de IGS ($0,88 \pm 0,07$) é registrado, prosseguindo até a primavera, com $1,26 \pm 0,20$. Os valores obtidos para IGS, na Figura 23, dão a idéia da contínua produção e acúmulo de oócitos ao longo das estações do ano e que se refletem nesses índices.

Os valores obtidos para o Fator de Condição (Fig24) mostram uma sutil diminuição do grau de hígidez destas fêmeas de verão ($48,19 \pm 2,25$) para outono ($46,36 \pm 1,31$). As maiores médias são observadas no inverno ($51,81 \pm 1,57$) e primavera ($51,44 \pm 3,00$). Os valores apresentados nestas estações não apresentaram diferenças estatísticas.

A frequência das fases em que se encontram os ovários ao longo do ciclo reprodutivo (Fig 25) comprova os dados de IGS. Apenas no verão têm-se indivíduos *Aptos à Desova* (40%) indicando que esta espécie apresenta uma desova sazonal. Nesta estação, no verão, também são encontrados indivíduos em *Fase em Regeneração* (20%) e *Fase em Regressão* (40%).

Para as estações que apresentaram os menores valores de IGS (outono e inverno), foi registrada uma frequência de 100% de indivíduos em *Regeneração* (Fig25). Na primavera, período que antecede o período de desova, tem-se indivíduos em *Fase em Desenvolvimento* (20%) e *Regressão* (20%), justificando o aumento nos valores de IGS nesta estação. Os dados acima indicam que o período de desova ocorre durante os meses de verão.

6.2.3. Fases Reprodutivas vs Foliculogênese

A análise da dinâmica da renovação das células germinativas ao longo do ciclo reprodutivo mostra que, nos ovários em *Fase em Desenvolvimento*, o número de ninhos contendo oogônias em proliferação difere do número de oogônias isoladas no epitélio. Conforme a Figura 26A, ovários nesta fase do ciclo apresentaram 2 a 4 ninhos contendo oogônias em proliferação para cada oogônia isolada. Já o número de ninhos contendo oócitos profásicos iniciais, ao contrário de *Serrasalmus maculatus*, não apresenta elevadas quantidades de ninhos contendo oócitos (Fig26B).

Nos ovários *Aptos à Desova*, a quantidade de ninhos contendo oogônias em proliferação é equivalente ao número de oogônias isoladas. A Figura 26C demonstra que o número de ninhos contendo oogônias em proliferação não ultrapassa a quantidade de oogônias isoladas que permanecem quiescentes no epitélio germinativo. O que chama a atenção, na *Fase Apto à Desova*, é a escassez do número de ninhos contendo oócitos nas fases iniciais da meiose (Fig26D). Estes dados demonstram que a quantidade de oogônias isoladas, nesta fase, é superior ao número de ninhos em atividade mitótica ou meiótica.

Após a desova, nos ovários em *Regressão* (Fig26E-F) ocorre um aumento no número de ninhos contendo oogônias em proliferação e dos ninhos contendo oócitos profásicos iniciais em relação às oogônias isoladas.

Na *Regeneração*, a proliferação das oogônias é detectada pelo aumento dos ninhos contendo oogônias. A Figura 26G revela grande quantidade destes ninhos, que chegam até 12 ninhos contendo oogônias em proliferação para cada oogônia isolada no epitélio germinativo. A entrada em meiose também é detectada pela grande quantidade de ninhos contendo oócitos profásicos iniciais que chegam até 12 ninhos contendo oócitos para cada oogônia isolada (Fig 26H). Dados que indicam a intensa atividade mitótica e entrada em meiose nesta fase do ciclo reprodutivo.

A Figura 27 compara a dinâmica dos ninhos contendo oogônias e ninhos contendo oócitos iniciais ao longo das fases do ciclo reprodutivo. Na Figura 27A, tem-se que o número de ninhos contendo oogônias em proliferação não difere estatisticamente entre as fases em *Desenvolvimento*, *Regressão* e *Regeneração*. Contudo, é na *Regeneração* que se encontram os valores mais elevados que não são registrados nas demais fases do ciclo reprodutivo. A análise estatística mostra ainda que os ovários *Aptos à Desova* diferem dos demais quanto ao número de ninhos contendo oogônias se comparados à todas as demais fases do ciclo. Nos *Aptos à Desova*, a quantidade de ninhos contendo oogônias aproxima-se da quantidade de oogônias isoladas, indicando que nesta fase ocorre redução da atividade mitótica, com a maioria das oogônias isoladas permanecendo quiescentes. Após a desova, na *Regressão*, a proliferação das oogônias é retomada, contudo, não mais intensa como a que ocorre na *Regeneração*.

Por fim, na Figura 27B tem-se que o número de ninhos contendo oócitos profásicos iniciais não difere, estatisticamente, entre as fases de *Desenvolvimento*, *Regressão* e *Regeneração*. Já a *Fase Apto à Desova*, o número ninhos de oócitos é muito pequeno diferindo estatisticamente em relação a todas as demais fases do ciclo reprodutivo.

A **Tabela 1** adapta e adiciona à tabela de Brown-Peterson e colaboradores (2011) a dinâmica de renovação das células germinativas ao longo do ciclo reprodutivo em *Pimelodus maculatus*.

6.3. Tabela1: Descrições macroscópicas e microscópicas das fases ao longo do ciclo reprodutivo das fêmeas dos peixes, adicionada a atividade do epitélio germinativo. Adaptado de Brown-Peterson *et al.*(2011) para utilização também nos Ostariophysii.

| FASE | TERMINOLOGIA ANTERIOR | CARACTERIZAÇÃO MACROSCÓPICA (C.M.) E HISTOLÓGICA (C.H.) | ATIVIDADE DO EPITÉLIO GERMINATIVO |
|--|---|---|---|
| DESENVOLVIMENTO Gônadas em início de desenvolvimento. Ainda não estão prontas para desovar | Maturando, maturação inicial, desenvolvimento inicial, amadurecimento maturação intermediária, pré-vitelogênese. | C.M.: Ovários um pouco maiores, vasos sanguíneos cada vez mais distintos. C.H.: Oócitos em crescimento primário, com alvéolos corticais, vitelogênese primária e secundária estão presentes. Oócitos completamente desenvolvido ou complexo folicular pós-ovulatório ausentes. Alguns oócitos atrésicos podem estar presentes. Subfase: Início de Desenvolvimento: apenas oócitos em crescimento primário e alvéolos corticais estão presentes. | Número de ninhos contendo oogônias maior que o número de oogônias isoladas, porém em menor quantidade que na <i>Regeneração</i> . <u>Período Reprodutivo Longo:</u> ninhos contendo oócitos iniciais em maior quantidade que os ninhos contendo oogônias. <u>Período Reprodutivo Curto:</u> ninhos contendo oócitos iniciais em menor quantidade que os ninhos contendo oogônias. |
| APTO À DESOVA Os peixes estão aptos a desovar neste ciclo. | Maduro, desenvolvimento tardio, maturação tardia, totalmente desenvolvido, grávida, parcialmente esvaziado, vitelogênese, desovando, pré-desova, totalmente maduro. | C.M.: Ovários grandes, vasos sanguíneos proeminentes. Oócitos individuais visíveis macroscopicamente. C.H.: Presença de oócitos completamente desenvolvidos. Pode apresentar oócitos em atresia e/ou oócitos hidratados. Estágios iniciais de maturação podem estar presentes. Oócitos com alvéolos corticais, vitelogênese primária e secundária ou complexo folicular pós-ovulatório estão presentes em espécies com <i>fecundidade indeterminada</i> . Subfase: Desova Ativa: Oócitos com migração da vesícula germinativa, quebra da vesícula germinativa, hidratação ou ovulação. | Número de ninhos contendo oogônia é equivalente ao número de oogônias isoladas. Ninhos contendo oócitos iniciais são raros. <u>Período Reprodutivo Longo:</u> podem apresentar maior quantidade de ninhos contendo oogônias, porém, em menor proporção às demais fases do ciclo. Na subfase Desova Ativa, grande quantidade de oogônias isoladas estão presentes. |
| REGRESSÃO Cessa a desova. | Regressão, pós desova, recuperando. | C.M.: Ovários flácidos, vasos sanguíneos proeminentes. C.H.: Atresias (em qualquer estágio) e complexo folicular pós-ovulatório presentes. Alguns oócitos com alvéolos corticais e/ou oócitos vitelogênicos podem estar presentes. | Ainda que pouco intensa, é detectada a retomada da proliferação das oogônias e entrada na meiose pelo aumento no número de ninhos contendo oogônias e ninhos contendo oócitos, respectivamente. |
| REGENERAÇÃO Sexualmente maduro, reprodutivamente inativo. | Repouso, descansando, regredido, recuperando, inativo. | C.M.: Ovários pequenos, vasos sanguíneos reduzidos, mas ainda presentes. C.H.: Presença oócitos em crescimento primário, podendo ou não, apresentar alvéolos corticais. Parede do ovário espessa, atresia delta ou gama e complexo folicular pós-ovulatório em estágio tardio de absorção podem estar presentes. | A proliferação das oogônias é a mais intensa que nas fases anteriores, com inúmeros ninhos no epitélio lamelar. Oogônias isoladas em pequena quantidade. <u>Período Reprodutivo Longo:</u> grande quantidade de ninhos contendo oogônias. <u>Período Reprodutivo Curto:</u> grande quantidade de ninhos contendo oogônias e ninhos contendo oócitos iniciais. |

6.4. FIGURAS: *Serrasalmus maculatus*

FIGURA 1: FOLICULOGÊNESE E CARACTERIZAÇÃO DAS CÉLULAS GERMINATIVAS EM *Serrasalmus maculatus*: **A)** Oogônia indiferenciada isolada no epitélio germinativo. **B)** Ninho de oogônias indiferenciadas. **C)** Ninho de oogônias diferenciadas. Note o vaso sanguíneo próximo ao ninho. **D)** Técnica de reticulina mostrando a membrana basal abaixo das oogônias e das células pré-foliculares. **E)** Oogônia indiferenciada e oogônia diferenciada convivendo num mesmo ninho. **F)** Ninho contendo oogônia indiferenciada e oogônias diferenciadas sendo individualizadas pelas células pré-foliculares. **G)** Cistos germinativos (em colchete) contendo oogônias diferenciadas dentro de um ninho. Células pré-foliculares delimitam o cisto germinativo. Note a oogônia em divisão mitótica (asterisco preto) e uma apoptose (asterisco branco). **H)** Técnica de reticulina mostrando a projeção do ninho para o estroma e a continuidade da membrana basal. **I)** Cisto germinativo de oogônias (em colchete) que serão recrutadas para a meiose. **J)** Ninho contendo cisto germinativo de oócitos em leptóteno, juntamente com oogônias indiferenciadas. Note o vaso sanguíneo próximo ao ninho. **K)** Cisto germinativo contendo oócitos em zigóteno. **L)** Oogônias em apoptose (asterisco branco) e presença de grandes vasos próximos ao ninho. **M)** Cisto germinativo contendo oócitos em paquíteno inicial, juntamente com oogônia indiferenciada. **N)** Oócitos em paquíteno tardio sendo individualizados pelas células pré-foliculares. Cabeça de seta representa o cisto germinativo sendo desfeito. Oócito estacionado em diplóteno fora do cisto germinativo. **O)** Folículo ovariano ao lado de oogônia isolada. **P)** Técnica de reticulina mostrando a conexão do folículo ovariano ao epitélio germinativo pela membrana basal. ac=alvéolo cortical; F=célula folicular; FO=folículo ovariano; L=luz do ovário; MB=membrana basal; OD=oócito em diplóteno; OGd=oogônia diferenciada; OGi=oogônia indiferenciada; OL=oócito em leptóteno; OPi=oócito em paquíteno inicial; OPt=oócito em paquíteno tardio; OZ=oócito em zigóteno; PF=célula pré-folicular; VS=vaso sanguíneo; ASTERISCO BRANCO=apoptose; ASTERISCO PRETO=divisão mitótica; CABEÇA DE SETA=pré-folicular individualizando o oócito; colchete=cistos germinativos. Coloração: PAS+Hematoxilina Férrica+Metanil Yellow.

FIGURA1:

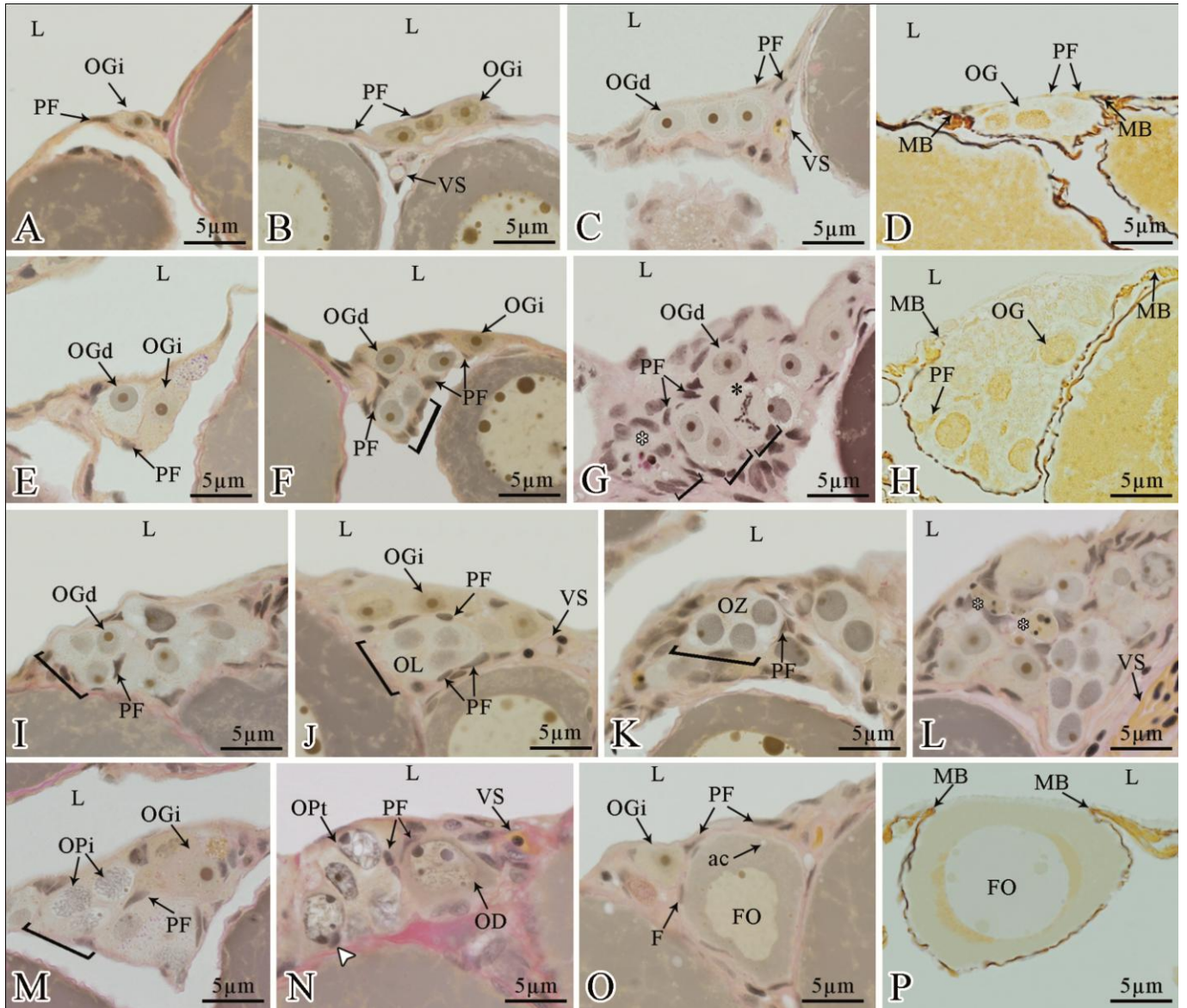


FIGURA 2: FASE EM REGENERAÇÃO: *Serrasalmus maculatus*. A) Ovário em *Regeneração*. **B)** Detalhe da lamela contendo oócitos em crescimento primário. Note o ninho contendo oogônia no epitélio germinativo (cabeça de seta preta). **C)** Técnica de reticulina mostrando a continuidade da membrana basal do folículo ovariano com o epitélio germinativo (seta branca ondulada). **D)** Oócito em crescimento primário. **Inset:** zona pelúcida delgada, composta por uma camada. **E)** Oócito em crescimento primário. **Inset:** zona pelúcida mais espessa, composta por duas camadas. **F)** Ninho contendo oogônias. **G)** Técnica de reticulina mostrando o ninho no epitélio lamelar situado acima da membrana basal. **H)** Ninho contendo oogônias e oócitos em leptóteno. Note a divisão mitótica das oogônias (asterisco preto). AC=alvéolo cortical; C=cápsula; FO=folículo ovariano; L=luz do ovário; LA=lamela ovígera; MB=membrana basal; Ocp=oócito em crescimento primário; OG=oogônia; OL=oócito em leptóteno; PF=célula pré-folicular; ZP=zona pelúcida; ASTERISCO PRETO=divisão mitótica; CABEÇA DE SETA PRETA=ninho contendo oogônias; SETA BRANCA ONDULADA=conexão do oócito ao epitélio germinativo. Coloração: PAS+Hematoxilina Férrica+Metanil Yellow.

FIGURA 2:

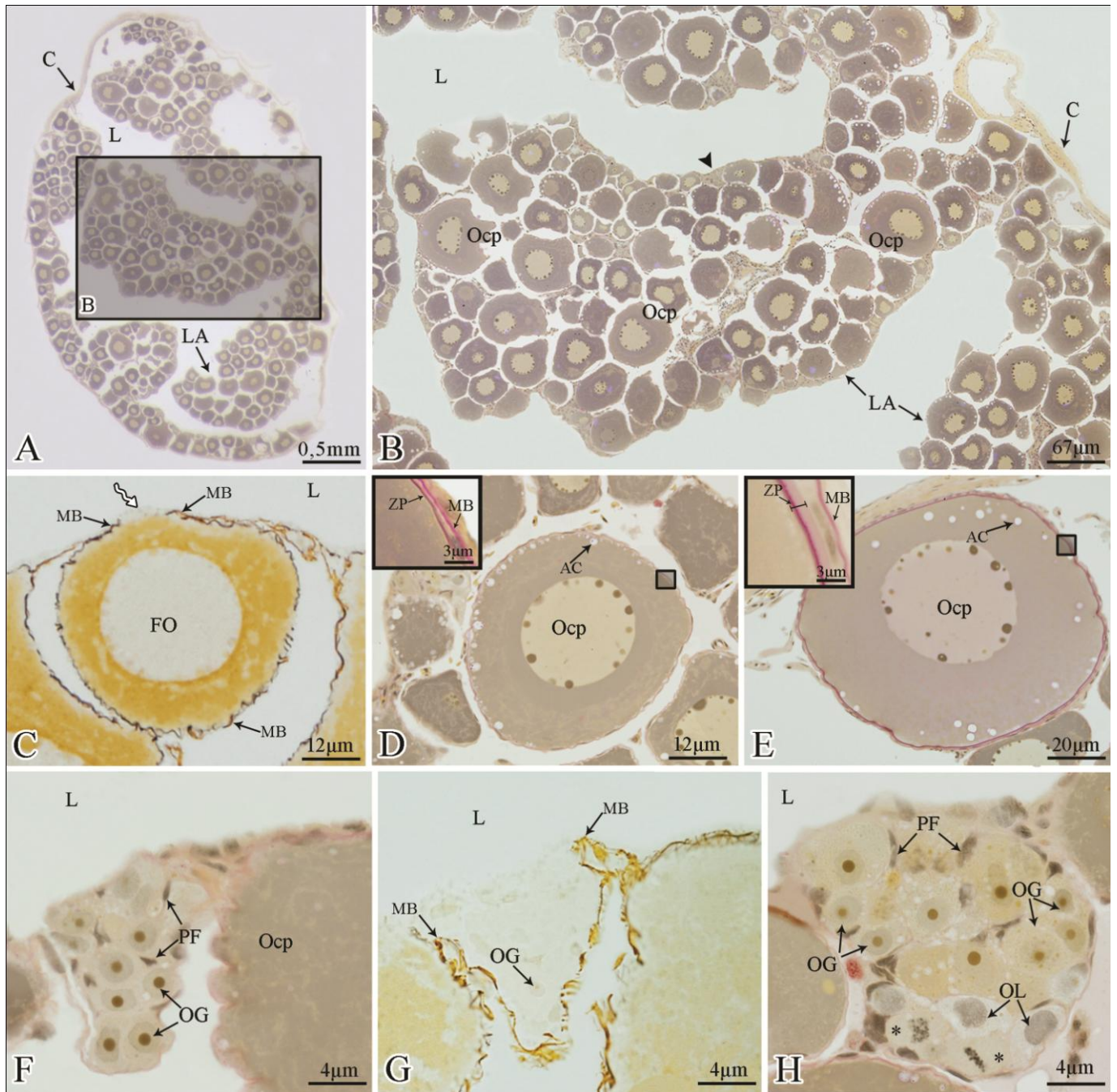


FIGURA 3: INÍCIO DE DESENVOLVIMENTO: *Serrasalmus maculatus* (SUBFASE DE DESENVOLVIMENTO). **A)** Ovário em *Início de Desenvolvimento*. **B)** Detalhe da lamela contendo oócitos em crescimento primário e oócitos em vitelogênese. Note a presença de ninho contendo oogônias (cabeça de seta preta) e ninho contendo oócitos profásicos iniciais (cabeça de seta branca) no epitélio germinativo. **C)** Oócitos em vitelogênese apresentando alvéolo cortical em maior quantidade. Note a presença de ninho contendo oócitos profásicos iniciais (cabeça de seta branca). **Inset:** Detalhe da zona pelúcida com três camadas. **D)** Ninho contendo grande quantidade de oogônias. Apoptoses também estão presentes (asterisco branco). **E)** Ninhos contendo grande quantidade de oócitos profásicos iniciais. AC=alvéolo cortical; C=cápsula; L=luz do ovário; LA=lamela ovígera; Ocp=oócito em crescimento primário; OG=oogônia; OL=oócito em leptóteno; Ovt=oócito em vitelogênese; PF=célula pré-folicular; ZP=zona pelúcida; ASTERISCO BRANCO=apoptose; CABEÇA DE SETA BRANCA=ninho contendo oócitos profásicos iniciais; CABEÇA DE SETA PRETA=ninho contendo oogônias. Coloração: PAS+Hematoxilina Férrica+Metanil Yellow.

FIGURA 3:

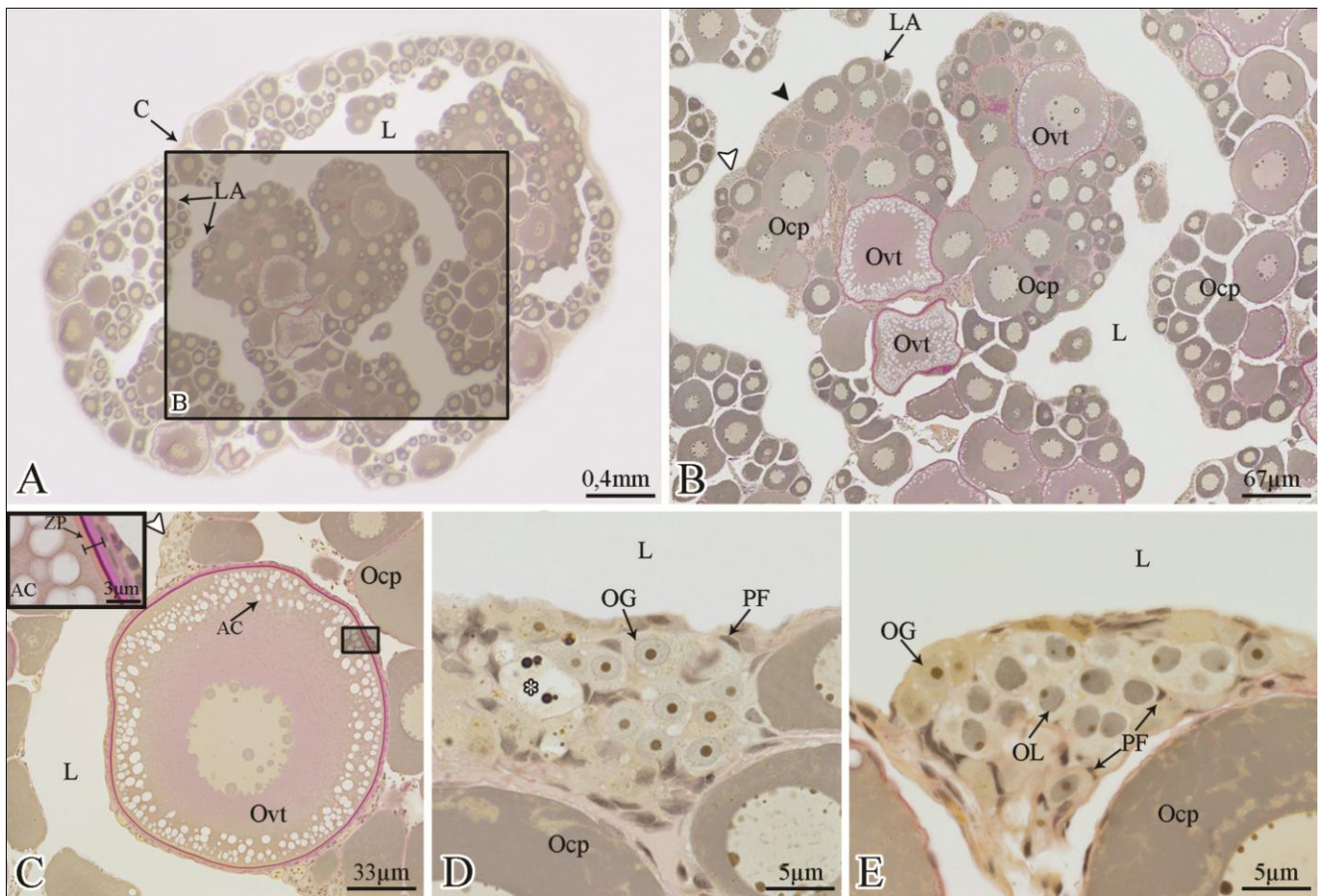


FIGURA 4: FASE EM DESENVOLVIMENTO: *Serrasalmus maculatus*. **A)** Ovário em *Desenvolvimento*. **B)** Detalhe da lamela contendo oócitos em crescimento primário e oócitos em vitelogênese. Note a presença de ninho contendo oócitos profásicos iniciais no epitélio germinativo (cabeça de seta branca). **C)** Oócito em vitelogênese acumulando glóbulos de vitelo e alvéolo cortical. Note a presença de ninho contendo oócitos profásicos iniciais (cabeça de seta branca) e ninho contendo oogônias (cabeça de seta preta) no epitélio germinativo. **Inset:** Detalhe da zona pelúcida mais espessa composta por três camadas. Note a célula folicular em divisão mitótica (asterisco preto). **D)** Oócito em vitelogênese acumulando glóbulos de vitelo e alvéolo cortical. **E)** Ninho contendo pouca quantidade de oogônias **F)** Cisto germinativo contendo oócitos em leptóteno. **G)** Cisto germinativo contendo oócitos em zigóteno. **H)** Cisto germinativo contendo oócitos em paquíteno. Note oócito em paquíteno tardio (avanzando para diplóteno) sendo individualizado pelas células pré-foliculares. **I)** Folículo ovariano retido em diplóteno. Note os quiasmas, característicos do diplóteno. AC=alvéolo cortical; C=cápsula; F=célula folicular; FO=folículo ovariano; GV=glóbulos de vitelo; L=luz do ovário; LA=lamela ovígera; MB=membrana basal; Ocp=oócito em crescimento primário; OG=oogônia; OL=oócito em leptóteno; OP=oócito em paquíteno; OPt=oócito em paquíteno tardio; Ovt=oócito em vitelogênese; OZ=oócito em zigóteno; PF=célula pré-folicular; Q=quiasmas; VS=vaso sanguíneo; ZP=zona pelúcida; ASTERISCO PRETO=divisão mitótica; CABEÇA DE SETA BRANCA=ninho contendo oócitos profásicos iniciais; CABEÇA DE SETA PRETA=ninho contendo oogônias; Coloração: PAS+Hematoxilina Férrica+Metanil Yellow.

FIGURA 4:

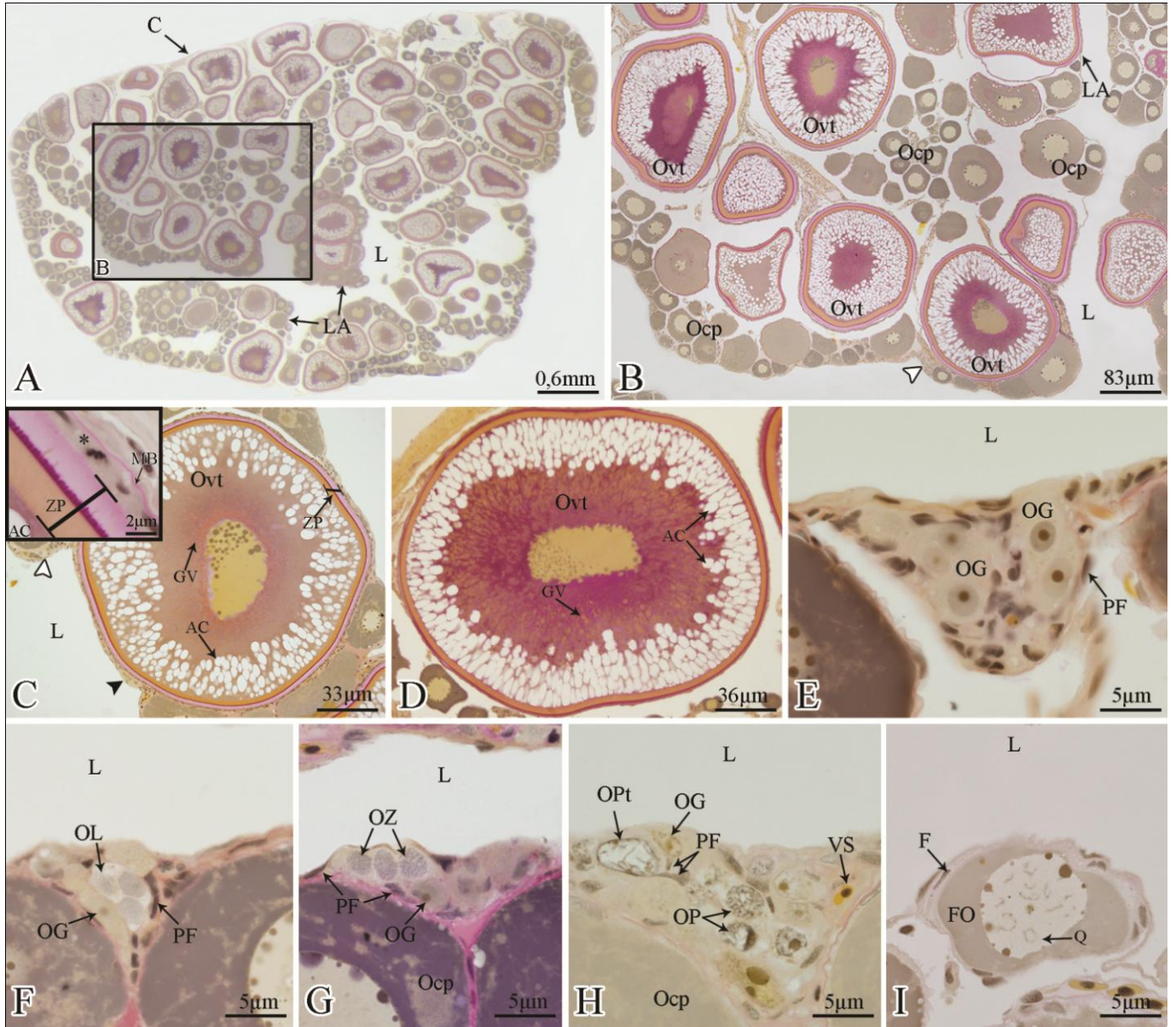


FIGURA 5: FASE APTO À DESOVA: *Serrasalmus maculatus*. **A)** Ovário *Apto à Desova*. **B)** Detalhe da lamela contendo oócitos completamente desenvolvidos. Note a presença de oócitos em vitelogênese e oócitos em crescimento primário. **C)** Oócito completamente desenvolvido. **D)** Ninho contendo oogônias. **E)** Oogônia isolada no epitélio germinativo. AC=alvéolo cortical; C=cápsula; GV=glóbulo de vitelo; L=luz do ovário; LA=lamela ovígera; Oat=oócito em atresia; Ocd=oócito completamente desenvolvido; Ocp=oócito em crescimento primário; OG=oogônia; Ovt=oócito em vitelogênese; PF=célula pré-folicular; VS=vaso sanguíneo. Coloração: PAS+Hematoxilina Férrica+Metanil Yellow.

FIGURA 5:

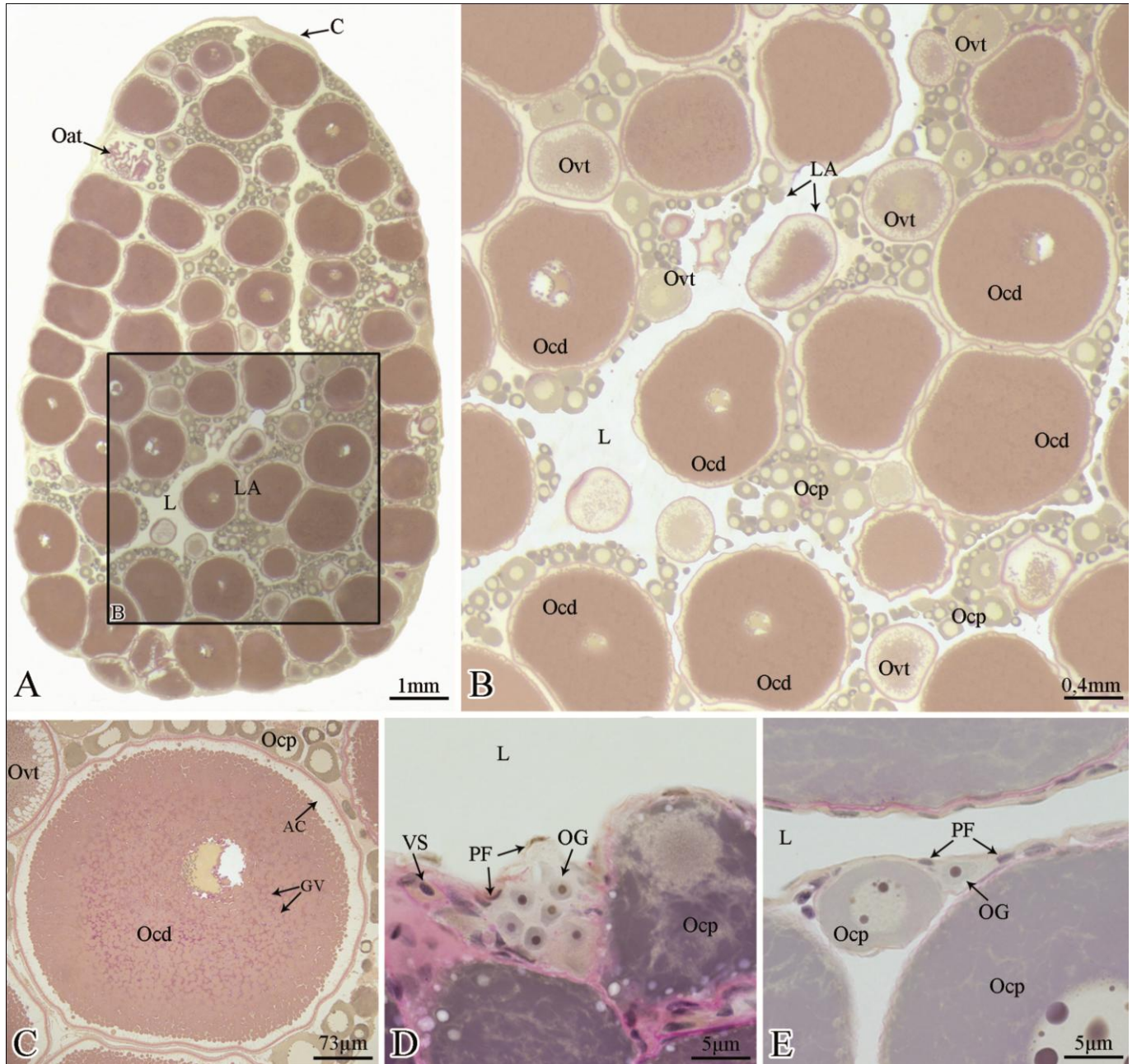


FIGURA 6: DESOVA ATIVA: *Serrasalmus maculatus* (SUBFASE DE APTO À DESOVA). A) Ovário com *Desova Ativa*. **B)** Detalhe da lamela contendo oócitos em maturação e oócitos em crescimento primário. Note os complexos foliculares pós-ovulatórios. **C)** Oócito em maturação. Note o núcleo migrando em direção à micrópila. **Inset:** Detalhe da micrópila. **D)** Complexo folicular pós-ovulatório. Note a presença de oócitos em vitelogênese inicial. **E)** Técnica de reticulina mostrando a continuidade da membrana basal do complexo folicular pós-ovulatório e do epitélio germinativo. **F)** Oogônia isolada no epitélio germinativo. AC=alvéolo cortical; C=cápsula; CFP=complexo folicular pós-ovulatório; EG=epitélio germinativo; L=luz do ovário; LA=lamela ovígera; MB=membrana basal; MI=micrópila; Ocp=oócito em crescimento primário; OG=oogônia; Omt=oócito em maturação; Ovt=oócito em vitelogênese; PF=célula pré-folicular. Coloração: PAS+Hematoxilina Férrica+Metanil Yellow.

FIGURA 6:

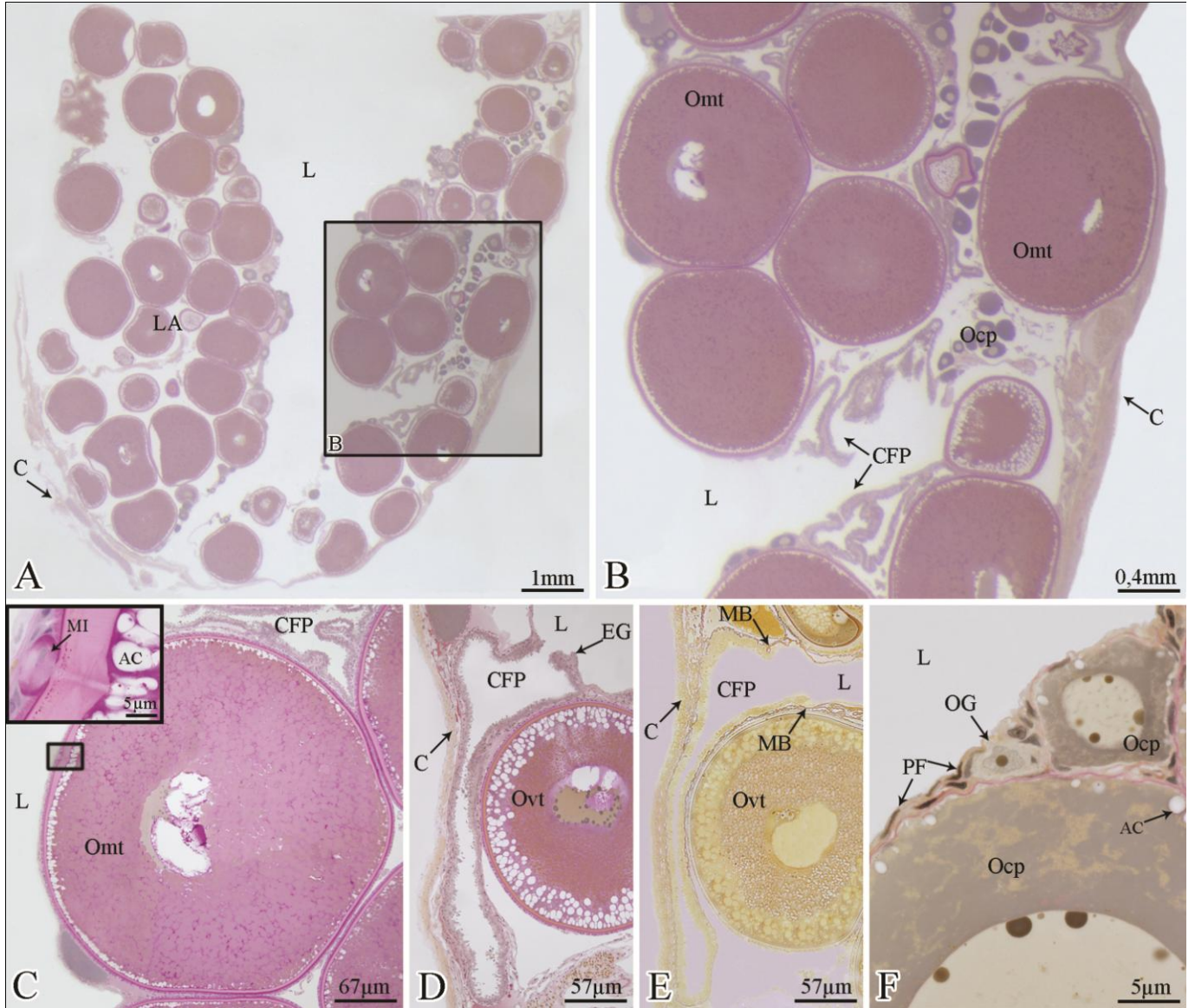


FIGURA 7: FASE EM REGRESSÃO: *Serrasalmus maculatus*. A) Ovário em *Regressão*. **B)** Detalhe da lamela contendo oócitos em atresia. **C)** Detalhe da lamela, em maior aumento, contendo oócitos recrutados para vitelogênese convivendo ao lado de oócitos em atresia e oócitos em crescimento primário. Vasos sanguíneos de grande calibre podem ser observados. Note a presença de ninho contendo oogônia (cabeça de seta preta) e ninho contendo oócitos profásicos iniciais (cabeça de seta branca) no epitélio germinativo. **D)** Oócito em atresia alfa com vitelo em liquefação. Células foliculares hipertróficas podem ser observadas. Note a presença de ninho contendo oócitos iniciais no epitélio germinativo (cabeça de seta branca). **E)** Detalhe da zona pelúcida fragmentada (seta preta ondulada) e células foliculares hipertróficas. **F)** Células foliculares hipertróficas fagocitando glóbulos de vitelo. Presença de vaso sanguíneo de grande calibre. Note o ninho contendo oogônias indicando a retomada da proliferação mitótica. **G)** Ninho contendo oogônias. **H)** Ninho contendo oócitos em leptóteno. C=cápsula; F=célula folicular; GV=glóbulo de vitelo; L=luz do ovário; LA=lamela ovígera; MB=membrana basal; N=núcleo da célula folicular; Oat α =oócito em atresia alfa; Ocp=oócito em crescimento primário; OG=oogônia; OL=oócito em leptóteno; Ovt=oócito em vitelogênese; PF=célula pré-folicular; VL=vitelo liquefeito; VS=vaso sanguíneo; ZP=zona pelúcida; CABEÇA DE SETA BRANCA=ninho contendo oócitos; CABEÇA DE SETA PRETA=ninho contendo oogônias; SETA PRETA ONDULADA=fragmentação da zona pelúcida. Coloração: PAS+Hematoxilina Férrica+Metanil Yellow.

FIGURA 7:

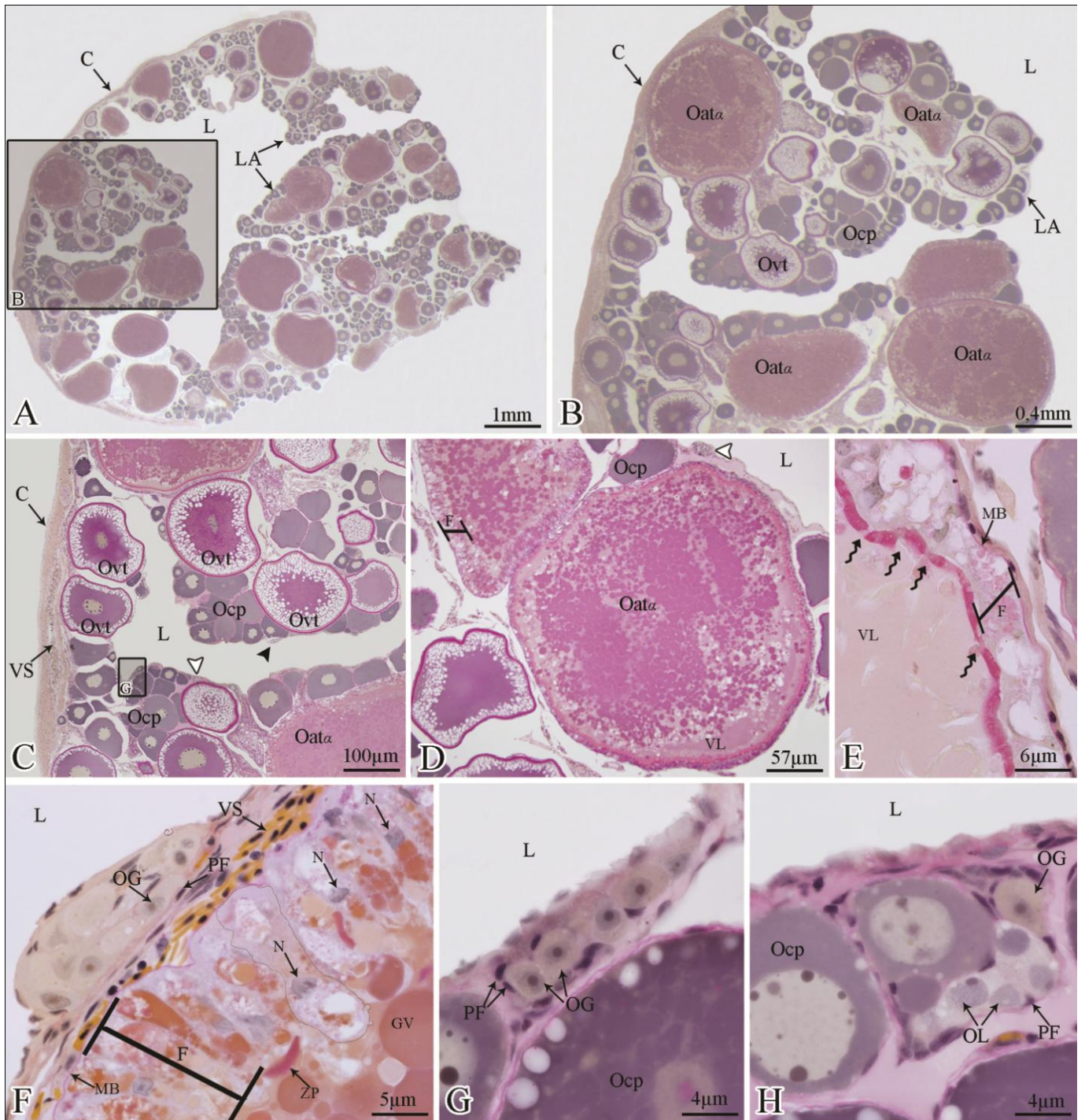
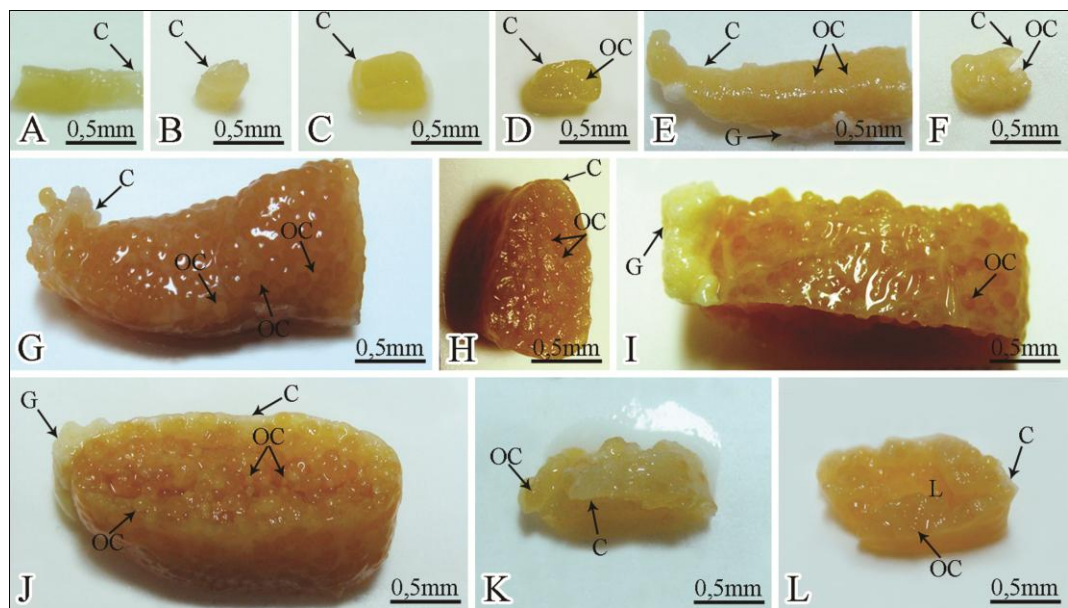


FIGURA 8: CARACTERÍSTICAS MACROSCÓPICAS DOS OVÁRIOS EM CADA FASE DO CICLO REPRODUTIVO DE *Serrasalmus maculatus*. **A-B)** Porção medial de um ovário na *Fase em Regeneração*. **C-D)** Porção medial de um ovário na *Subfase Início de Desenvolvimento*. Alguns oócitos de pequena dimensão podem ser observados. **E-F)** Porção cranial de um ovário na *Fase em Desenvolvimento*. Oócitos em vitelogênese em diferentes dimensões podem ser observados. **G-H)** Porção cranial de um ovário na *Fase Apto à Desova*. Oócitos com diferentes dimensões podem ser observados. **I-J)** Porção medial de um ovário na *Subfase Desova Ativa*. Observar a semelhança com a *Fase Apto à Desova*. Nesta subfase a luz do ovário aumenta de tamanho. **K-L)** Porção medial de um ovário na *Fase em Regressão* contendo alguns oócitos. Observar a flacidez do ovário ao comparar com as demais fases. C=cápsula do ovário; G=camada de gordura externa; L=luz do ovário; OC=oócito. Os ovários foram fixados em solução de glutaraldeído 2% e paraformoldeído 4% em tampão fosfato Sorensen (0,1M e pH7,2). As gônadas aqui registradas correspondem às mesmas gônadas representadas nas Figuras 2-7.

FIGURA 8:



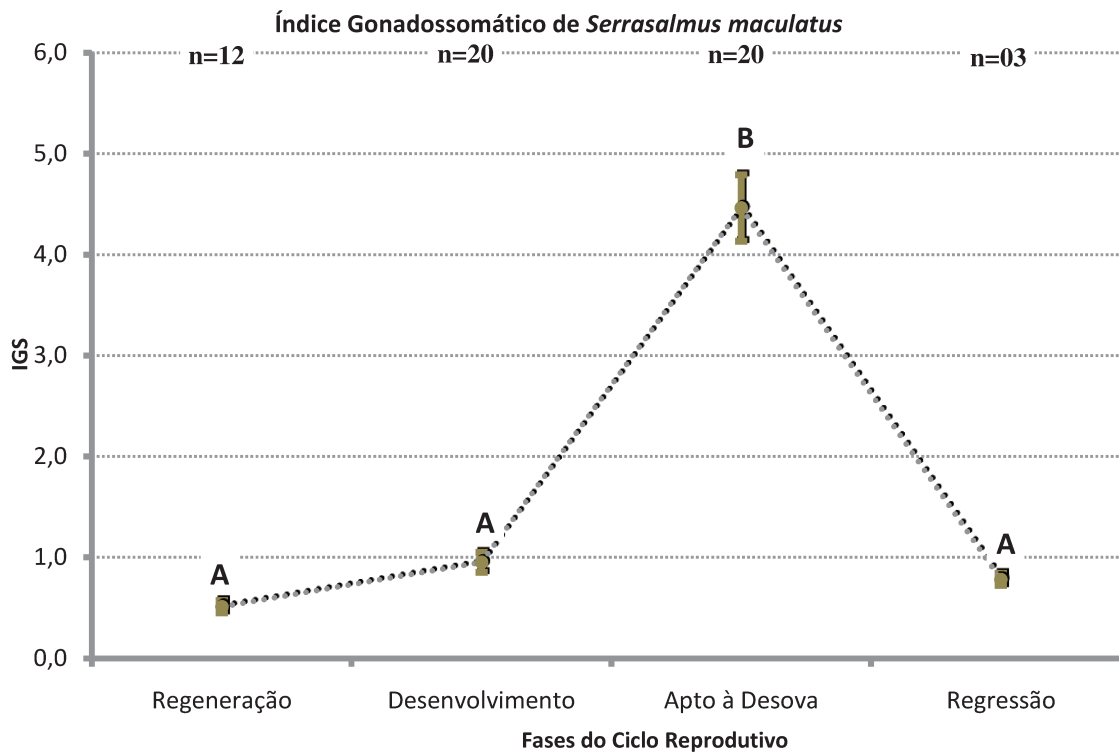


FIGURA 9: Índice Gonadossomático (média e erro padrão) das fêmeas por fase do ciclo reprodutivo (1996 e 1997). Letras diferentes representam diferenças estatísticas $p < 0,05$.

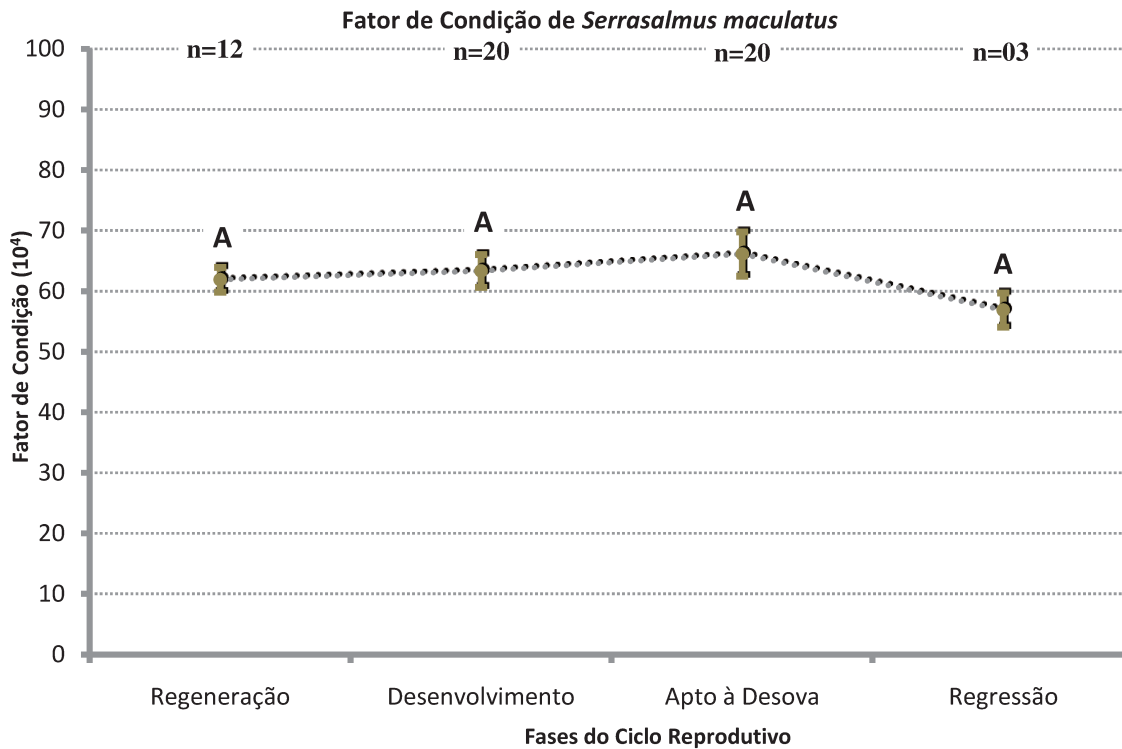


FIGURA 10: Fator de Condição (média e erro padrão) por fase do ciclo reprodutivo (1996 e 1997). Equação da relação peso-comprimento: $Wt = 0,0064L^{3,4459}$. Letras diferentes representam diferenças estatísticas $p < 0,05$.

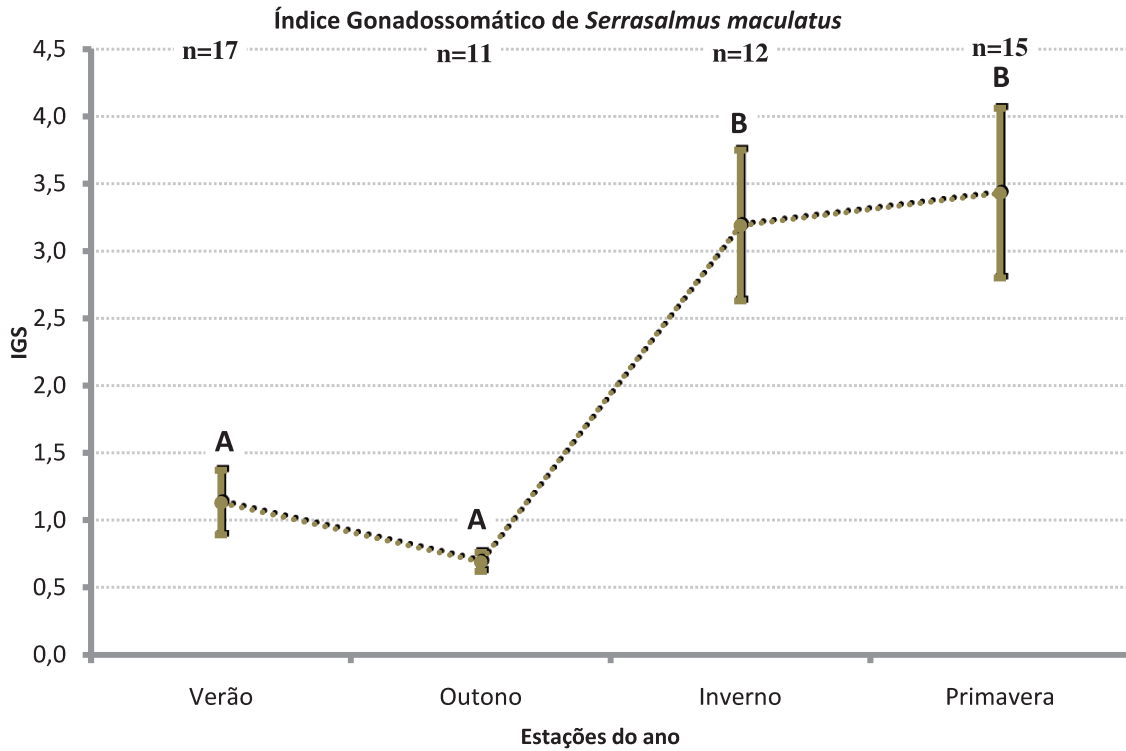


FIGURA 11: Índice Gonadosomático (média e erro padrão) das fêmeas por estações do ano (1996 e 1997 combinados). Letras diferentes representam diferenças estatísticas $p < 0,05$.

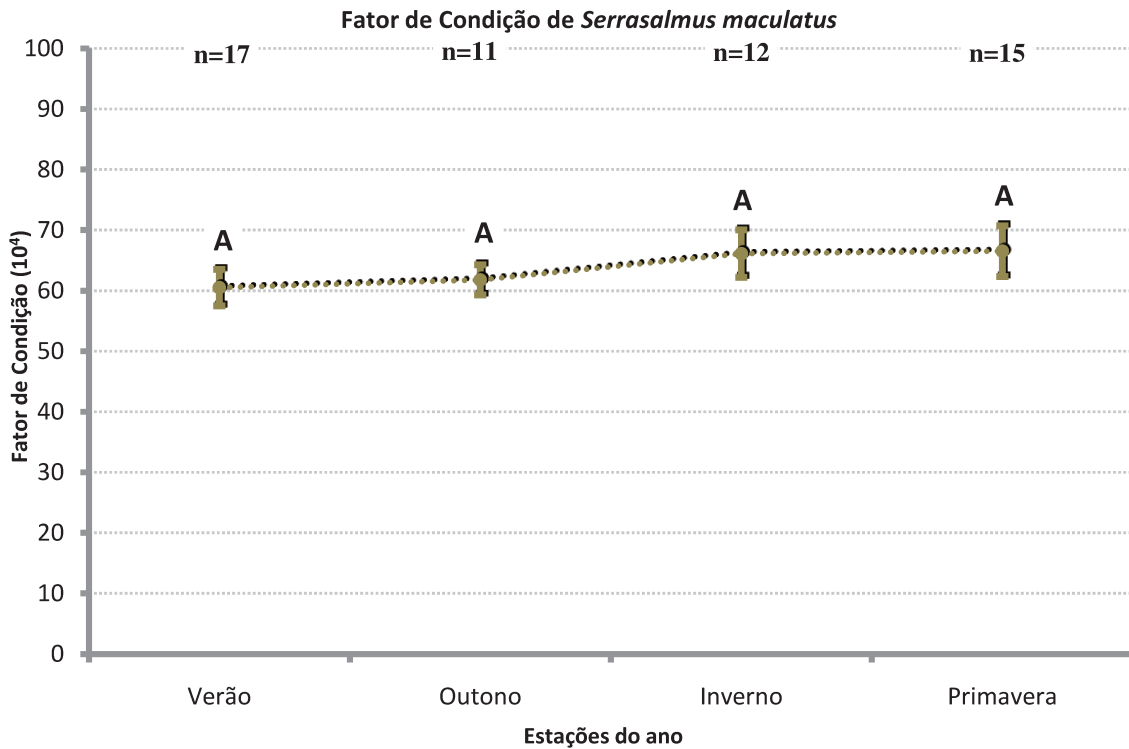


FIGURA 12: Fator de Condição (média e erro padrão) por estações do ano (1996 e 1997 combinados). Equação da relação peso-comprimento: $Wt = 0,0064Lt^{3,4459}$. Letras diferentes representam diferenças estatísticas $p < 0,05$.

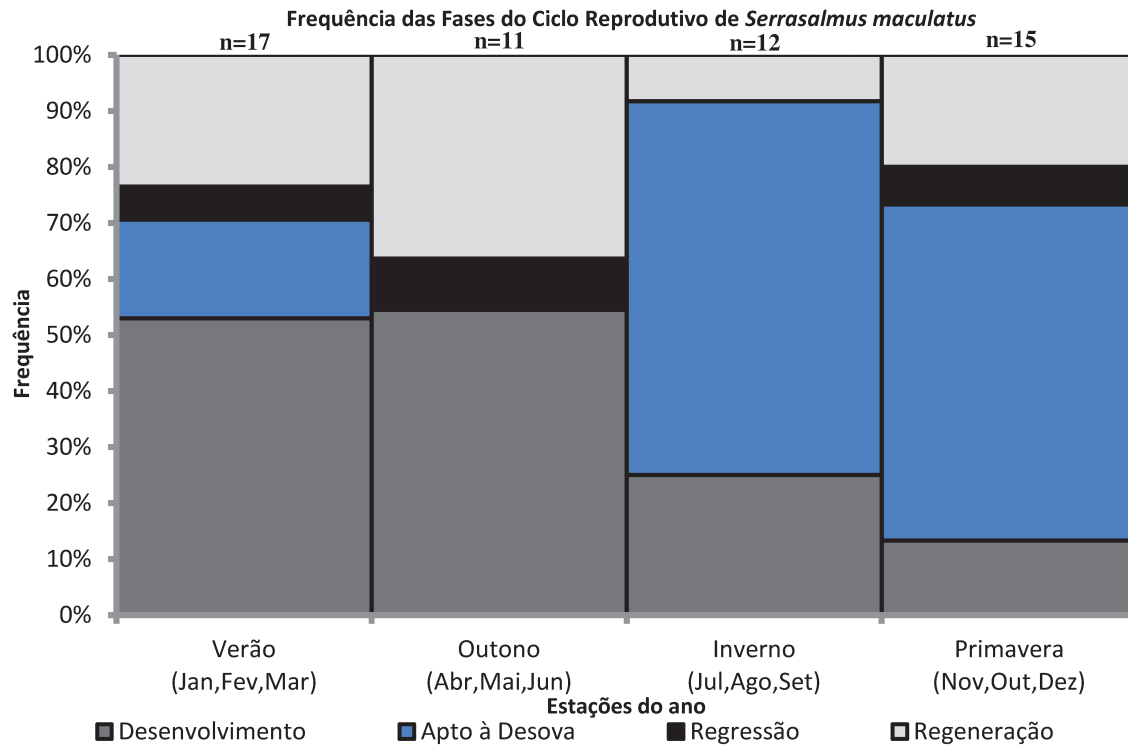


FIGURA 13: Frequência das fases do ciclo reprodutivo das fêmeas de *Serrasalmus maculatus* por estação do ano (1996 e 1997 combinados).

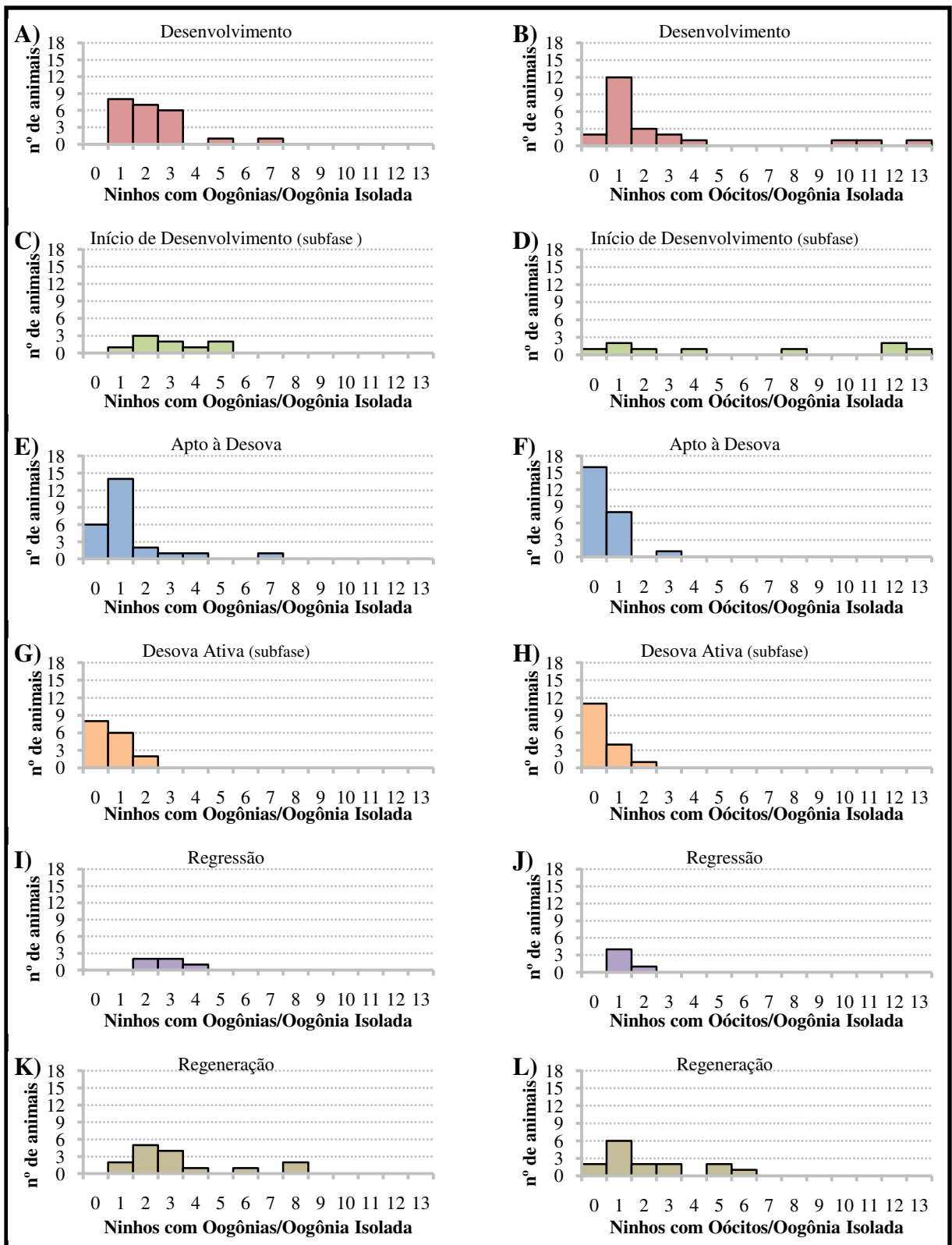


FIGURA 14: Relação entre a razão do número de ninhos contendo oogônias em proliferação

(**A, C, E, G, I e K**) e ninhos contendo oócitos profásicos iniciais (**B, D, F, H, J e L**) pelo número de oogônias isoladas presentes no epitélio germinativo de *Serrsalminus maculatus* em cada fase e subfase do ciclo reprodutivo. **A-B**) *Fase em Desenvolvimento*. n=23. **C-D**) *Subfase Início de Desenvolvimento*. n=09. **E-F**) *Fase Apto à Desova*. n=25. **G-H**) *Subfase Desova Ativa*. n=16. **I-J**) *Fase em Regressão*. n=05. **K-L**) *Fase em Regeneração*. n=15.

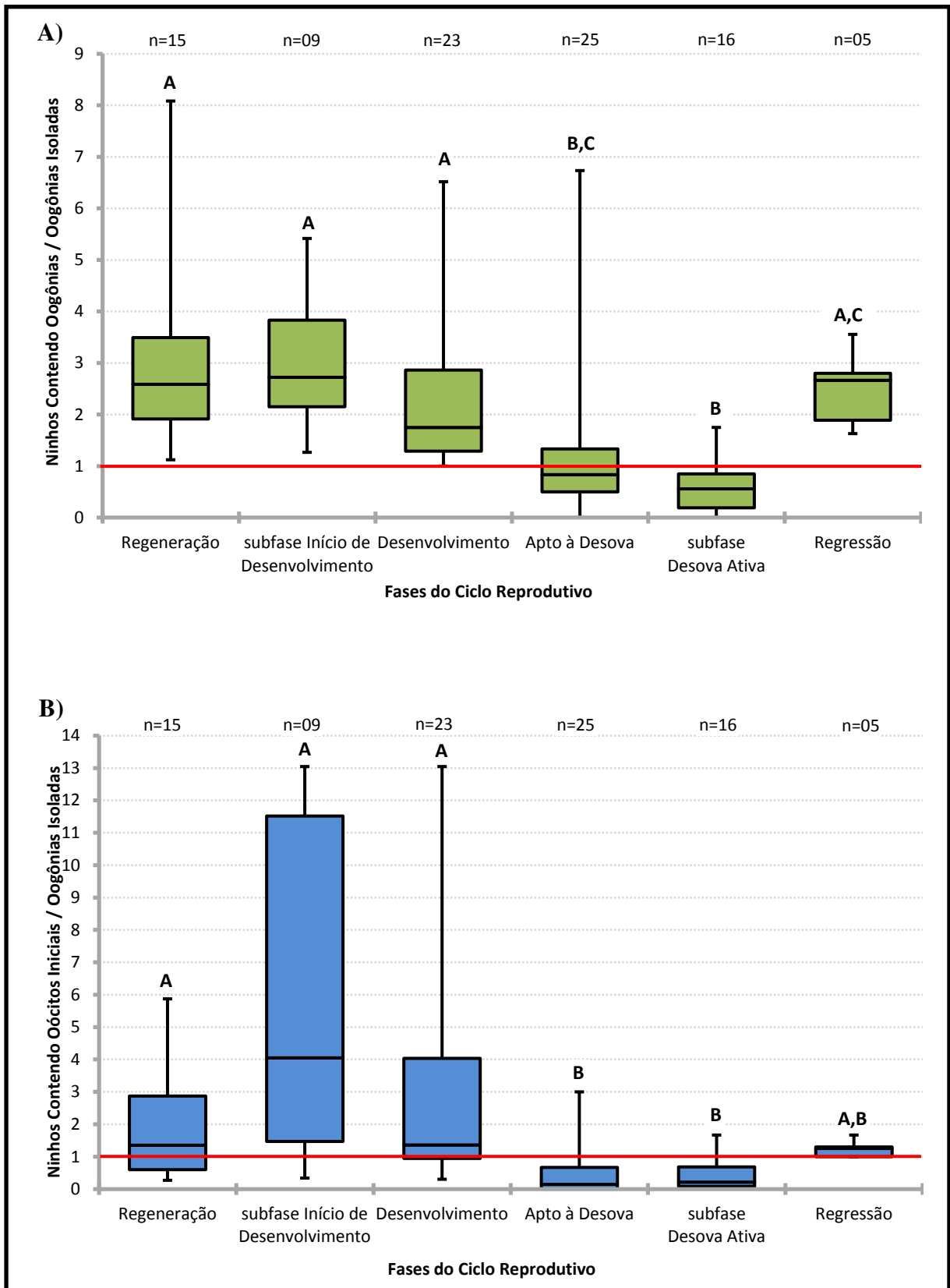


Figura 15: A) A) Relação do número de ninhos contendo oogônias em proliferação para

cada oogônia isolada. **B)** Relação do número de ninhos contendo oócitos profásicos iniciais para cada oogônia isolada presente no epitélio germinativo de *Serrasalmus maculatus* em cada fase do ciclo reprodutivo. A linha central da caixa marca a mediana do conjunto de dados. A parte inferior da caixa é delimitada pelo primeiro quartil (Q1) e a parte superior pelo terceiro quartil (Q3), demonstrando a distribuição de 50% do total da amostra. As hastes inferiores e superiores se estendem, respectivamente, do primeiro quartil até o valor mínimo e do terceiro quartil até o valor máximo. Como referencial para o aumento ou diminuição das células germinativas, a razão oogônia isolada/oogônia isolada foi representada como valor 1 (linha vermelha). Letras diferentes representam diferenças estatísticas $p < 0,05$.

6.5. FIGURAS: *Pimelodus maculatus*

FIGURA 16: FASE EM REGENERAÇÃO: *Pimelodus maculatus*. **A)** Ovário em *Regeneração*. **B)** Detalhe da lamela contendo oócitos em crescimento primário. Note a presença de ninho contendo oogônia (cabeça de seta preta) e ninho contendo oócitos iniciais (cabeça de seta branca) no epitélio germinativo. **C)** Detalhe da espessura da cápsula, vasos sanguíneos e feixes musculares. **D)** Oócito em crescimento primário. **Inset:** zona pelúcida delgada composta por uma camada. **E)** Oócito em atresia. **Inset:** Detalhe da zona pelúcida fragmentada. **F)** Ninho contendo oogônias em proliferação. Note a divisão mitótica da oogônia (asterisco preto). **G)** Ninhos contendo grande quantidade de oogônias. **H)** Cisto germinativo (colchete) contendo oócitos em leptóteno. **I)** Cisto germinativo (colchete) contendo oócitos em zigóteno. **J)** Ninho contendo oócitos em paquíteno. **K)** Folículo ovariano retido em diplóteno. C=cápsula; F=célula folicular; FM=feixe muscular; FO=folículo ovariano; L=luz do ovário; LA=lamela ovígera; MB=membrana basal; Oat=oócito em atresia; Ocp=oócito em crescimento primário; OG=oogônia; OL=oócito em leptóteno; OP=oócito em paquíteno; OZ=oócito em zigóteno; PF=célula pré-folicular; VS=vaso sanguíneo; ZP=zona pelúcida; ASTERISCO PRETO=divisão mitótica; CABEÇA DE SETA BRANCA=ninho contendo oócitos iniciais; CABEÇA DE SETA PRETA=ninho contendo oogônias; Colchete=cisto germinativo. Coloração: PAS+Hematoxilina Férrica+Metanil Yellow.

FIGURA 16:

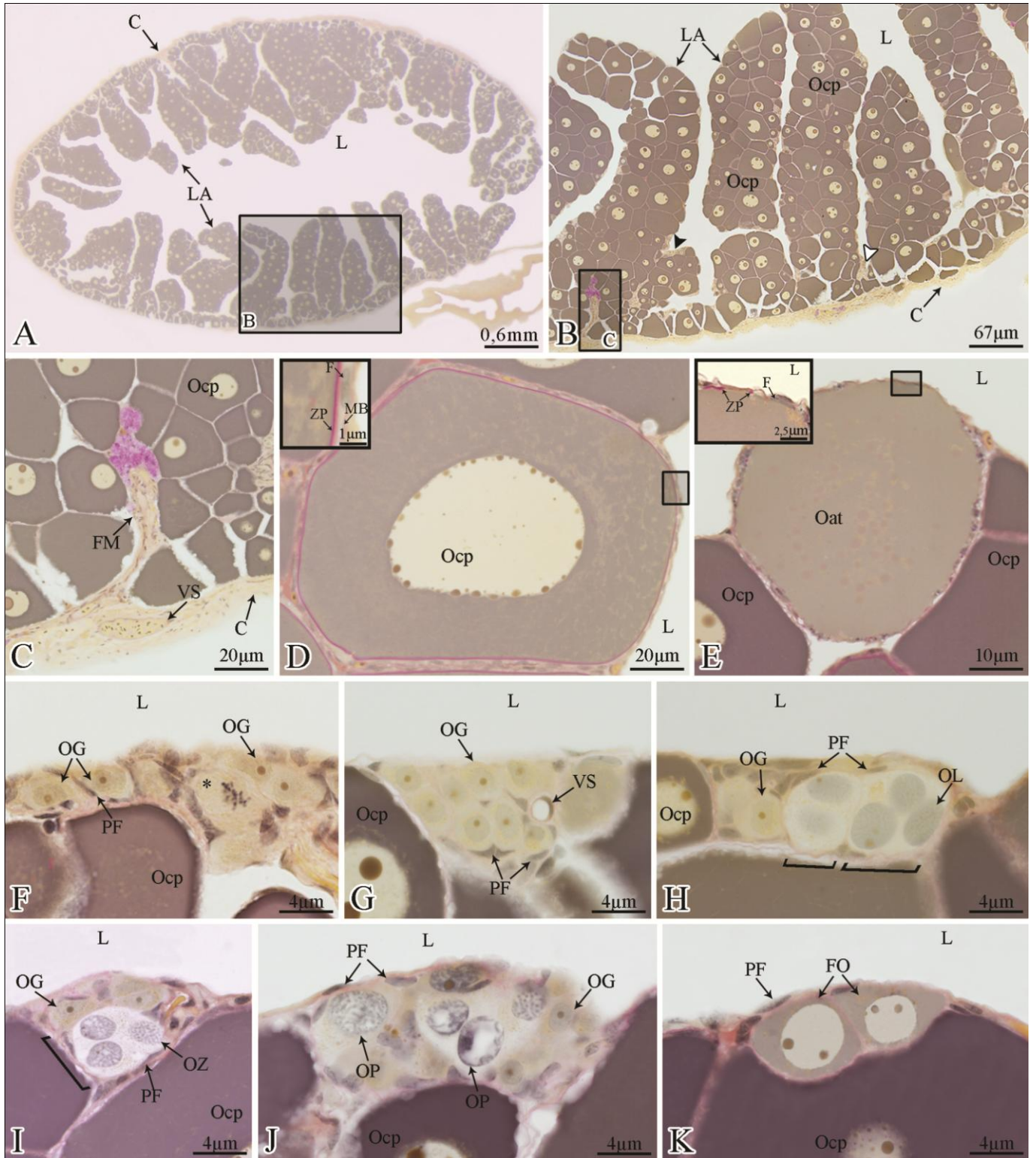


FIGURA 17: FASE EM DESENVOLVIMENTO: *Pimelodus maculatus*. A) Ovário em *Desenvolvimento*. B) Detalhe da lamela contendo oócitos em crescimento primário, oócitos em vitelogênese, cápsula espessa e feixe muscular. Note a presença de ninho contendo oogônias no epitélio germinativo (cabeça de seta preta). C) Oócito em vitelogênese inicial. **Inset:** zona pelúcida composta por duas camadas, pequenas vesículas de alvéolo cortical e glóbulos de vitelo. D-E) Oócitos em vitelogênese ao lado de oócitos em crescimento primário. Note o progresso da deposição de glóbulos de vitelo e alvéolos corticais. F) Oogônia isolada no epitélio germinativo e um folículo ovariano. G) Ninho contendo oogônias. H) Ninho contendo oócitos em leptóteno. AC=alvéolo cortical; C=cápsula; F=célula folicular; FM=feixe muscular; FO=folículo ovariano; GV=glóbulo de vitelo; L=luz do ovário; LA=lamela ovígera; Ocp=oócito em crescimento primário; OG=oogônia; OL=oócito em leptóteno; Ovt=oócito em vitelogênese; PF=célula pré-folicular; ZP=zona pelúcida; CABEÇA DE SETA PRETA=ninho contendo oogônias. Coloração: PAS+Hematoxilina Férrica+Metanil Yellow.

FIGURA 17:

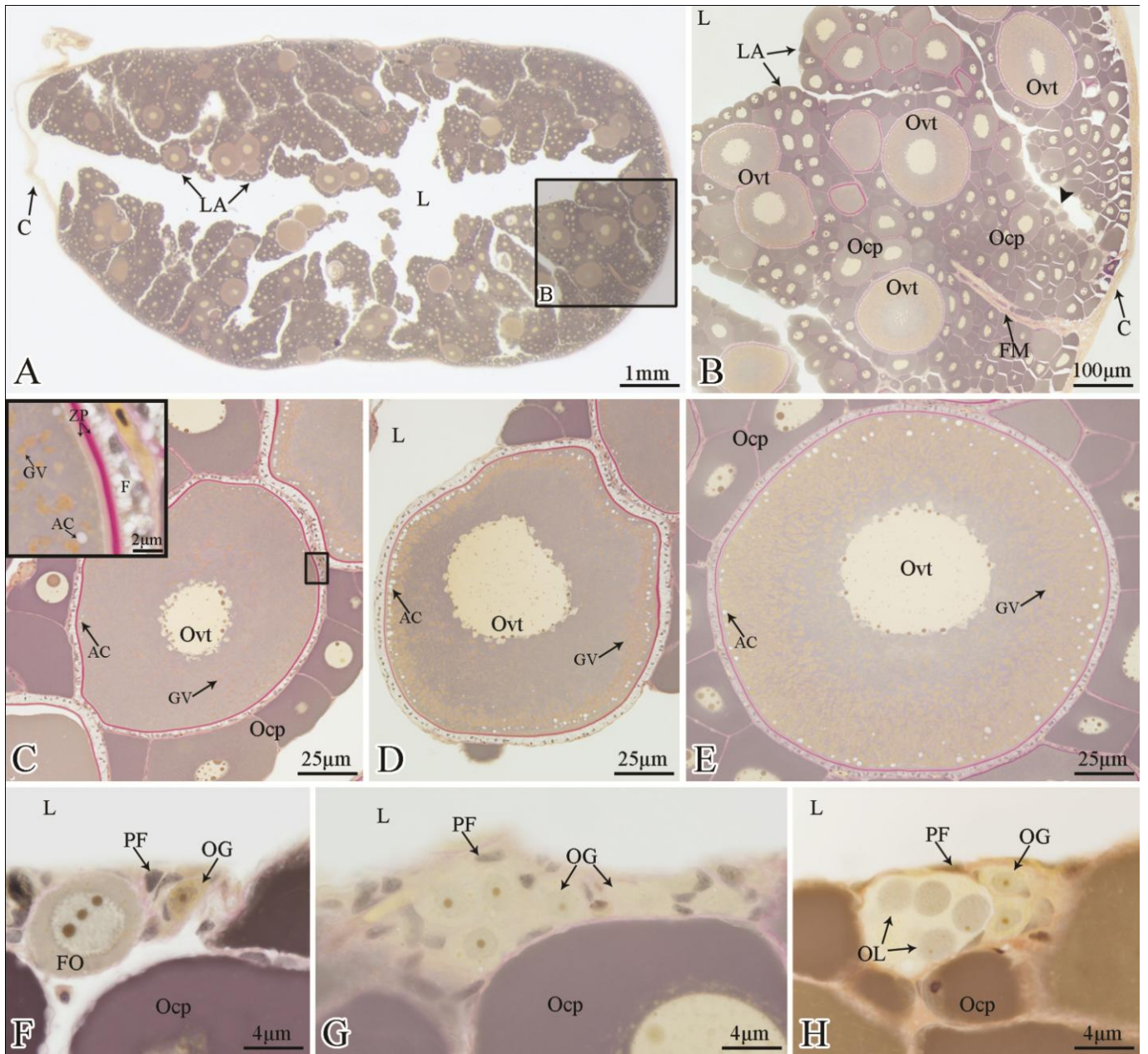


FIGURA 18: FASE APTO À DESOVA: *Pimelodus maculatus*. **A)** Ovário *Apto à Desova*. **B)** Detalhe da lamela contendo oócitos em crescimento primário, oócitos em vitelogênese, oócitos completamente desenvolvidos, cápsula espessa e vasos sanguíneos de grande calibre. Note a presença de ninho contendo oócitos profásicos iniciais no epitélio germinativo (cabeça de seta branca). **C)** Oócito completamente desenvolvido. **Inset:** zona pelúcida composta por duas camadas. Note a presença de alvéolo cortical e glóbulos de vitelo. **D)** Duas oogônias isoladas no epitélio germinativo. **E)** Ninhos contendo pequena quantidade de oogônias. **F)** Ninho contendo oócitos em paquíteno. AC=alvéolo cortical; C=cápsula; F=célula folicular; GV=glóbulo de vitelo; L=luz do ovário; LA=lamela ovígera; MB=membrana basal; Ocd=oócito completamente desenvolvido; Ocp=oócito em crescimento primário; OG=oogônia; OP=oócito em paquíteno; Ovt=oócito em vitelogênese; PF=célula pré-folicular; VS=vaso sanguíneo; ZP=zona pelúcida; CABEÇA DE SETA BRANCA=ninho contendo oócitos iniciais. Coloração: PAS+Hematoxilina Férrica+Metanil Yellow.

FIGURA 18:

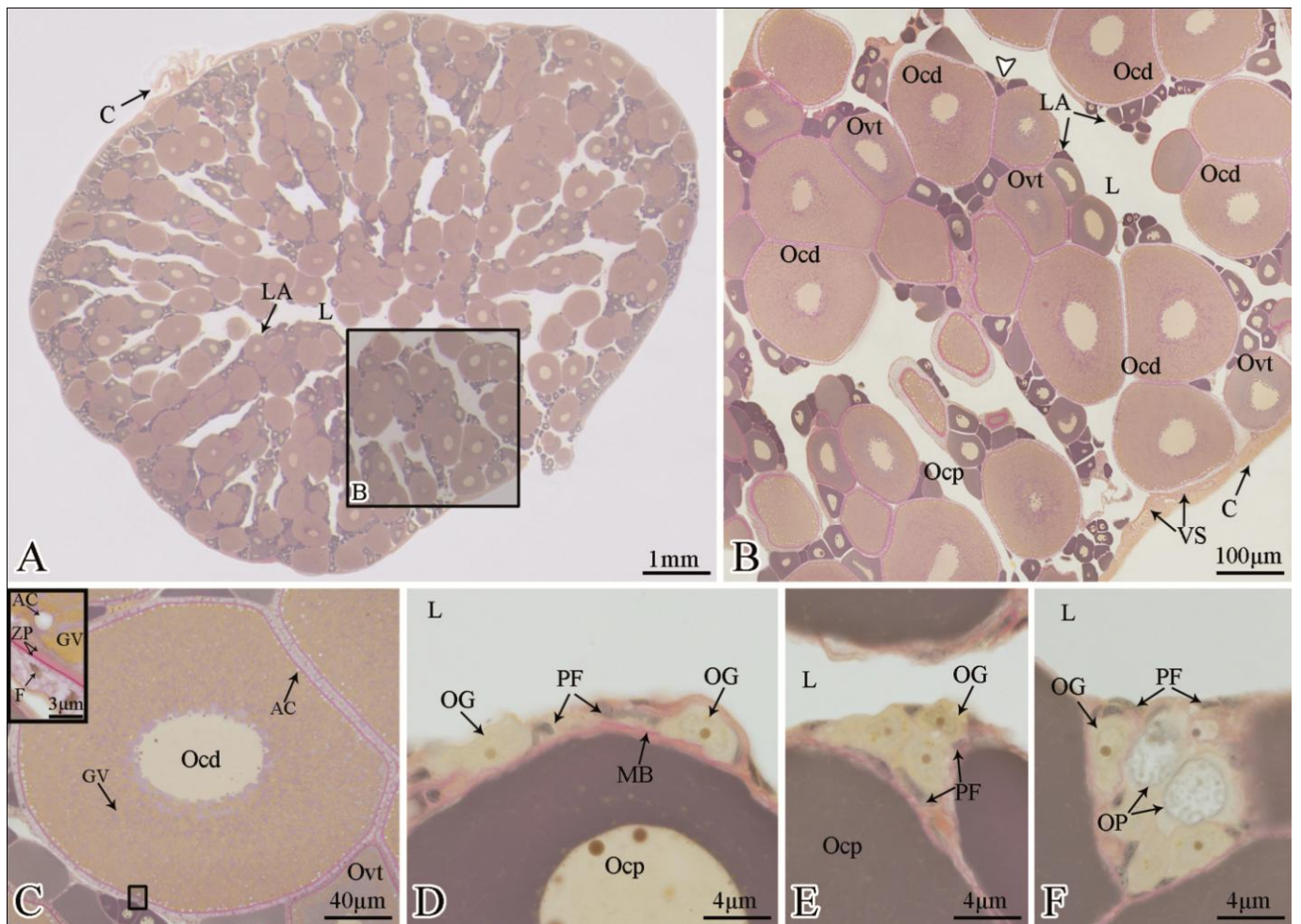


FIGURA 19: FASE EM REGRESSÃO PARA *Pimelodus maculatus*. A) Ovário em *Regressão*. **B)** Detalhe da lamela contendo oócitos em crescimento primário e oócitos em atresia. Ausência de oócitos em vitelogênese. Note a presença de ninho contendo oogônias (cabeça de seta preta) e ninho contendo oócitos iniciais (cabeça de seta branca) no epitélio germinativo. **C)** Ovário em *Regressão* com desova ignorada. **D)** Detalhe da lamela contendo oócitos em crescimento primário e oócitos em atresia. Ausência de oócitos em vitelogênese. Note a presença de grandes vasos sanguíneos e cápsula espessa. **E)** Oócito em atresia inicial (atresia alfa). Note a liquefação dos glóbulos de vitelo e a presença de ninho contendo oogônia no epitélio germinativo (cabeça de seta preta). **Inset:** detalhe da desintegração da zona pelúcida. Note a projeção das células foliculares hipertróficas para o interior do oócito incorporando glóbulos de vitelo (seta preta ondulada). **F)** Atresia beta. Note as células foliculares hipertróficas próximas a vasos sanguíneos. **G)** Ninhos contendo oogônias. Note o cisto germinativo (colchete) recém formado pela divisão mitótica de uma oogônia. **H)** Ninho contendo oócitos em zigóteno. C=cápsula; F=célula folicular; L=luz do ovário; LA=lamela ovígera; MB=membrana basal; Oat α =oócito em atresia alfa; Oat β =oócito em atresia beta; Ocp=oócito em crescimento primário; OG=oogônia; OZ=oócito em zigóteno; PF=célula pré-folicular; VL=vitelo liquefeito; VS=vaso sanguíneo; CABEÇA DE SETA BRANCA=ninho contendo oócitos iniciais; CABEÇA DE SETA PRETA=ninho contendo oogônias; COLCHETE=cisto germinativo; SETA PRETA ONDULADA=projeção das células foliculares hipertróficas para o interior do oócito. Coloração: PAS+Hematoxilina Férrica+Metanil Yellow.

FIGURA 19:

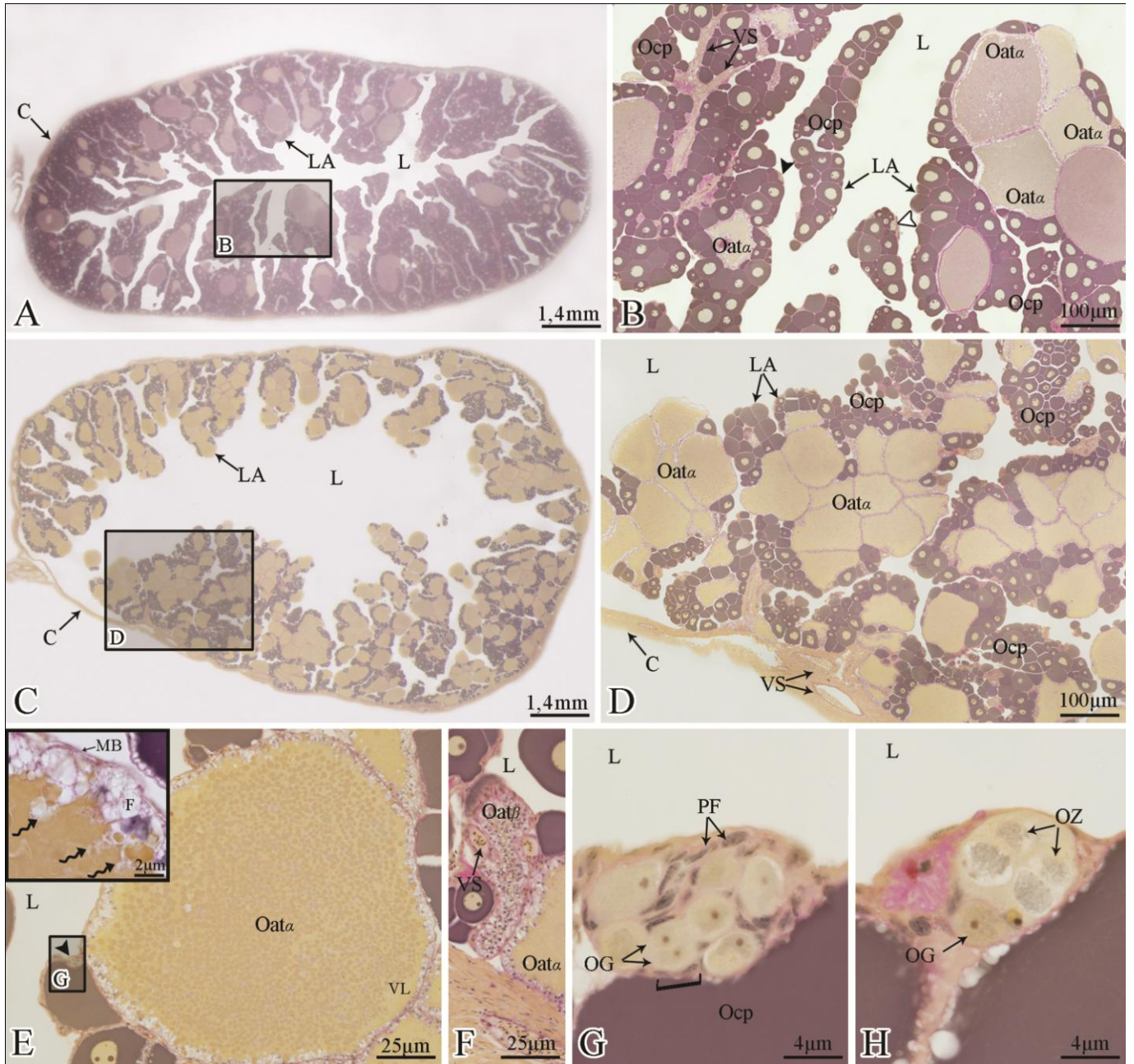
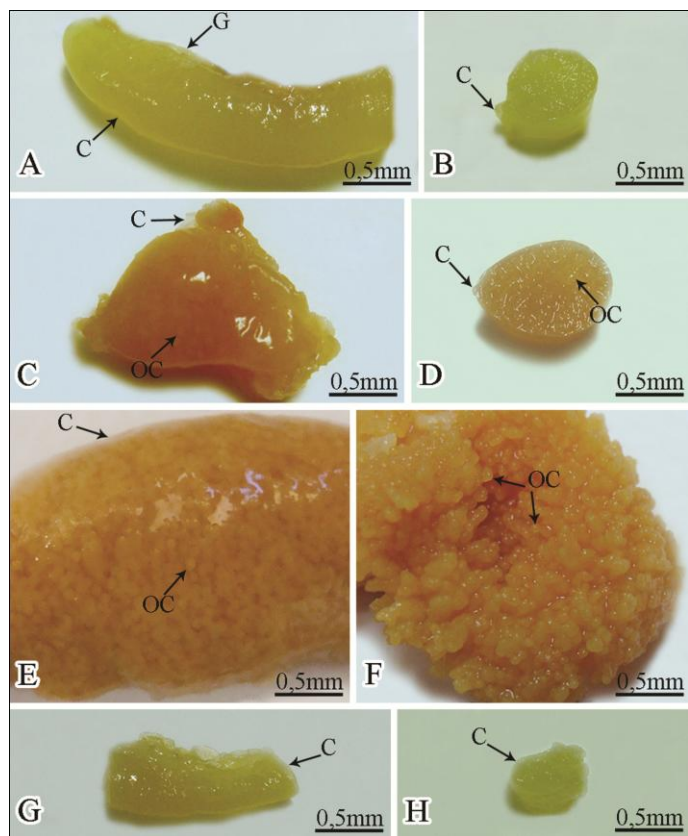


FIGURA 20: CARACTERÍSTICAS MACROSCÓPICAS DOS OVÁRIOS EM CADA FASE DO CICLO REPRODUTIVO DE *Pimelodus maculatus*. A-B) Porção cranial de um ovário na *Fase em Regeneração*. **C-D)** Porção cranial de um ovário na *Fase em Desenvolvimento*. Alguns oócitos de pequena dimensão podem ser observados. **E-F)** Porção medial de um ovário na *Fase Apto à Desova*. Oócitos com diferentes diâmetros podem ser observados. **G-H)** Porção caudal de um ovário na *Fase em Regressão*. Note a flacidez do ovário ao comparar com as demais fases. C=cápsula do ovário; G=camada de gordura externa; L=luz do ovário; OC=oócito. Os ovários foram fixados em solução de glutaraldeído 2% e paraformoldeído 4% em tampão fosfato Sorensen (0,1M e pH7,2).

FIGURA 20:



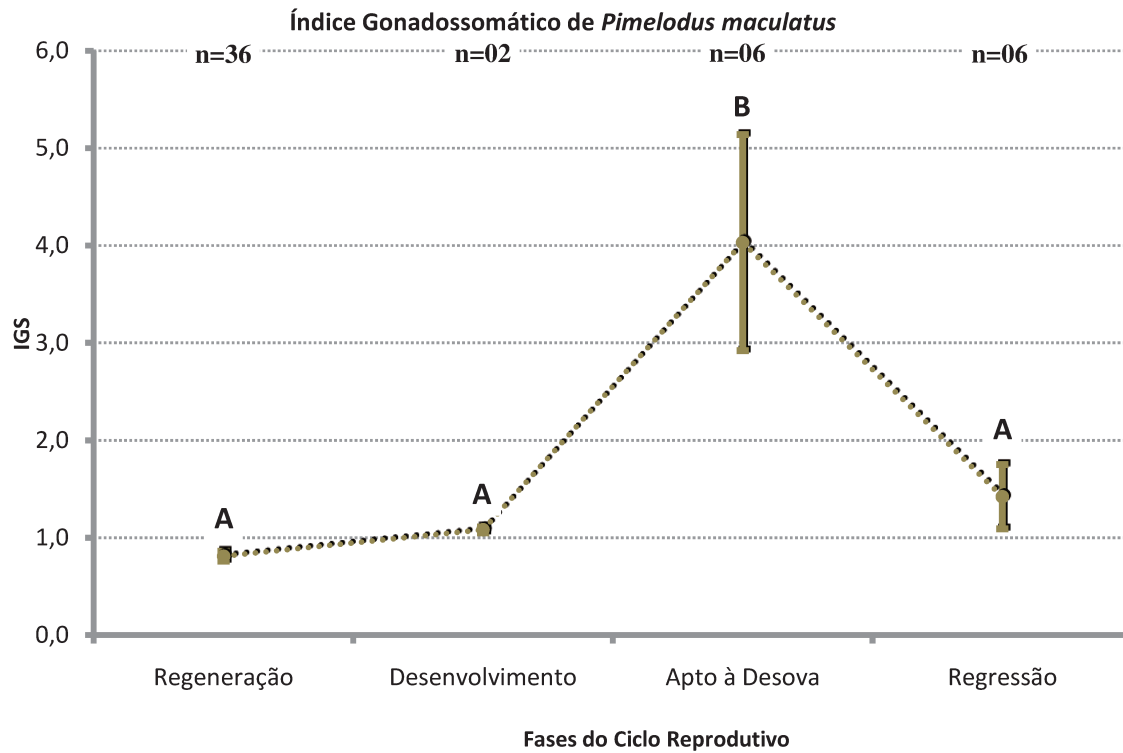


FIGURA 21: Índice Gonadosomático (média e erro padrão) das fêmeas por fase do ciclo reprodutivo (1996 e 1997). Letras diferentes representam diferenças estatísticas $p < 0,05$.

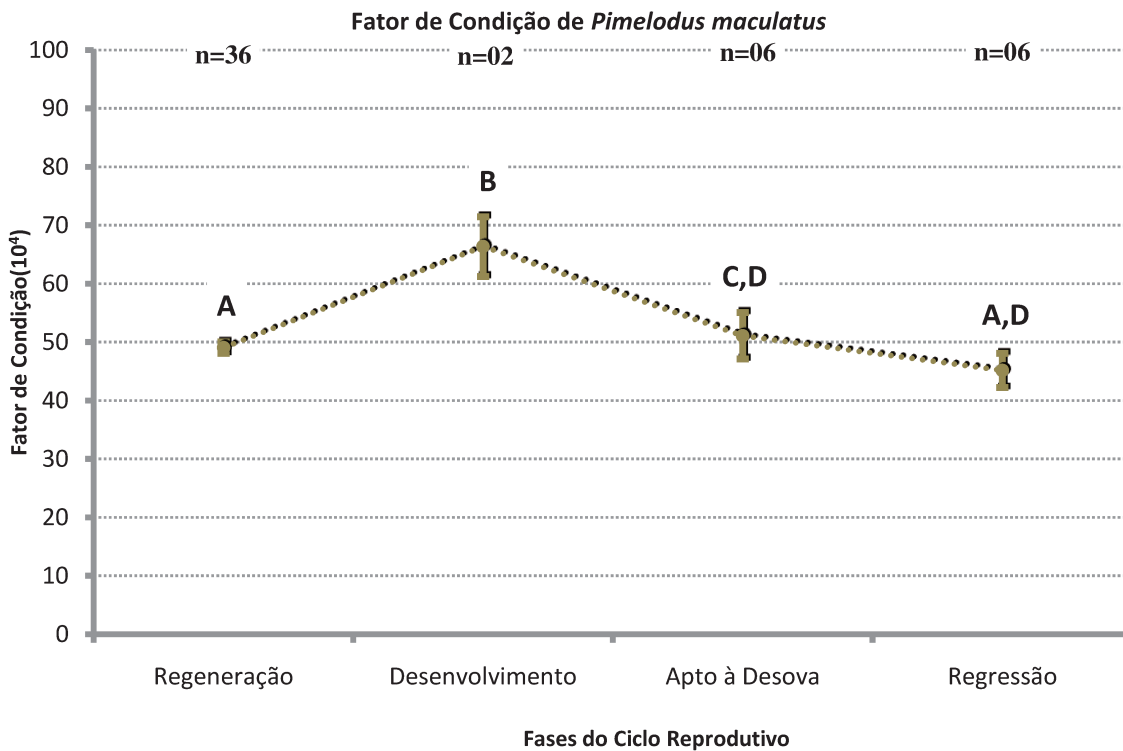


FIGURA 22: Fator de Condição (média e erro padrão) por fase do ciclo reprodutivo (1996 e 1997). Equação da relação peso-comprimento: $Wt = 0,005Lt^{3,2251}$. Letras diferentes representam diferenças estatísticas $p < 0,05$.

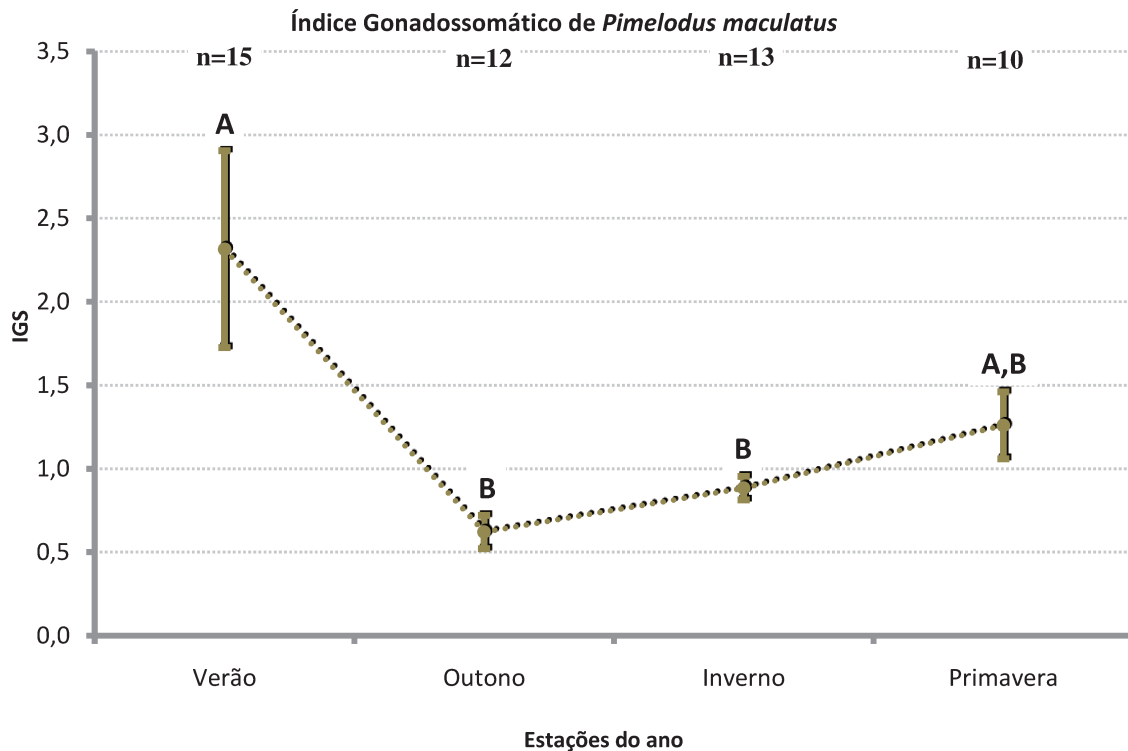


FIGURA 23: Índice Gonadosomático (média e erro padrão) das fêmeas por estações do ano (1996 e 1997 combinados). Letras diferentes representam diferenças estatísticas $p < 0,05$.

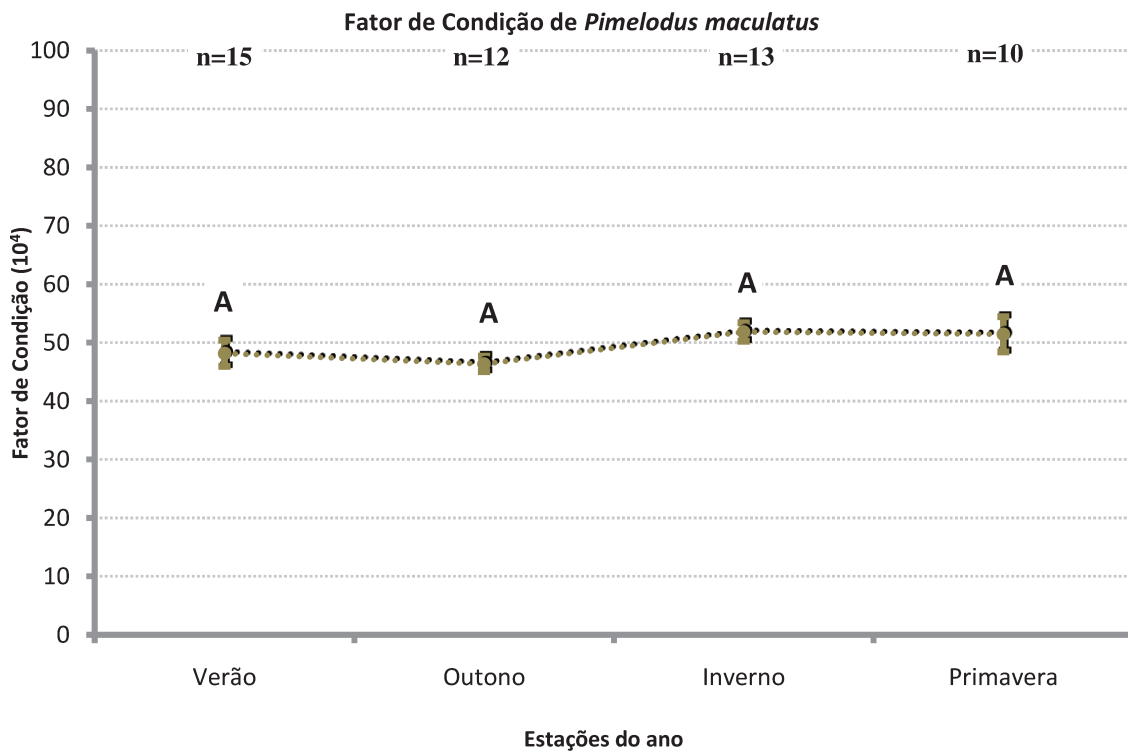


FIGURA 24: Fator de Condição (média e erro padrão) por estações do ano (1996 e 1997 combinados). Equação da relação peso-comprimento: $Wt = 0,005L^{3,2251}$. Letras diferentes representam diferenças estatísticas $p < 0,05$.

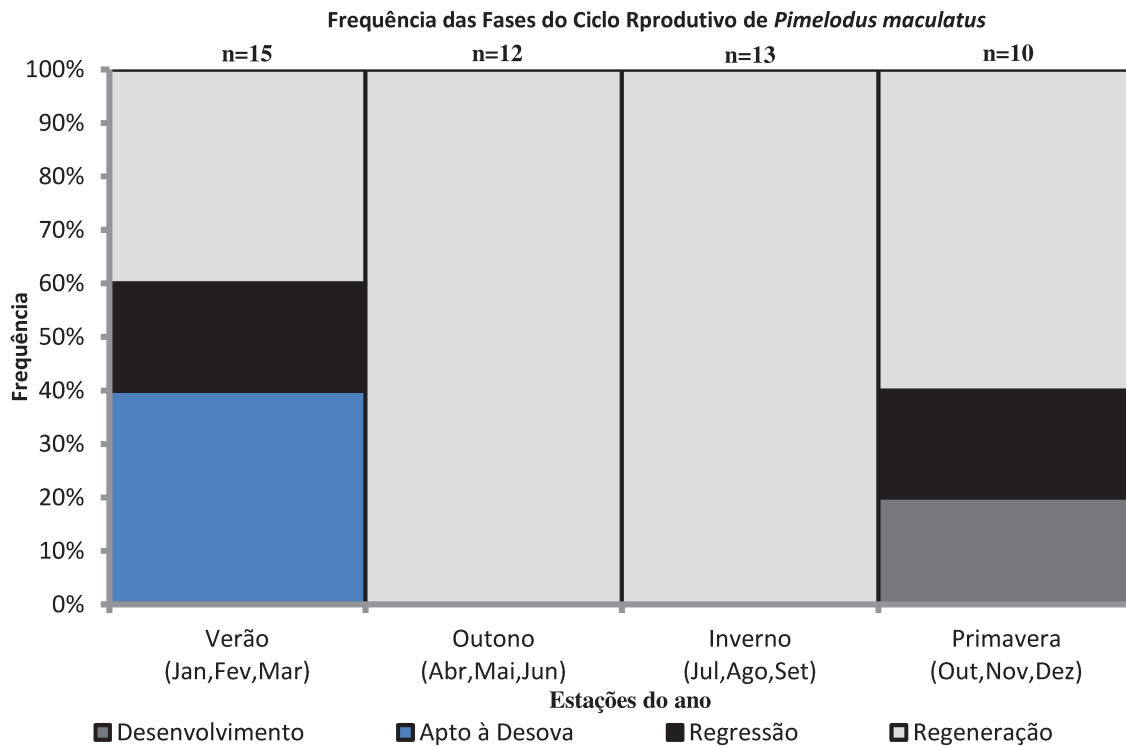


FIGURA 25: Frequência das fases do ciclo reprodutivo das fêmeas de *Pimelodus maculatus* por estação do ano (1996 e 1997 combinados).

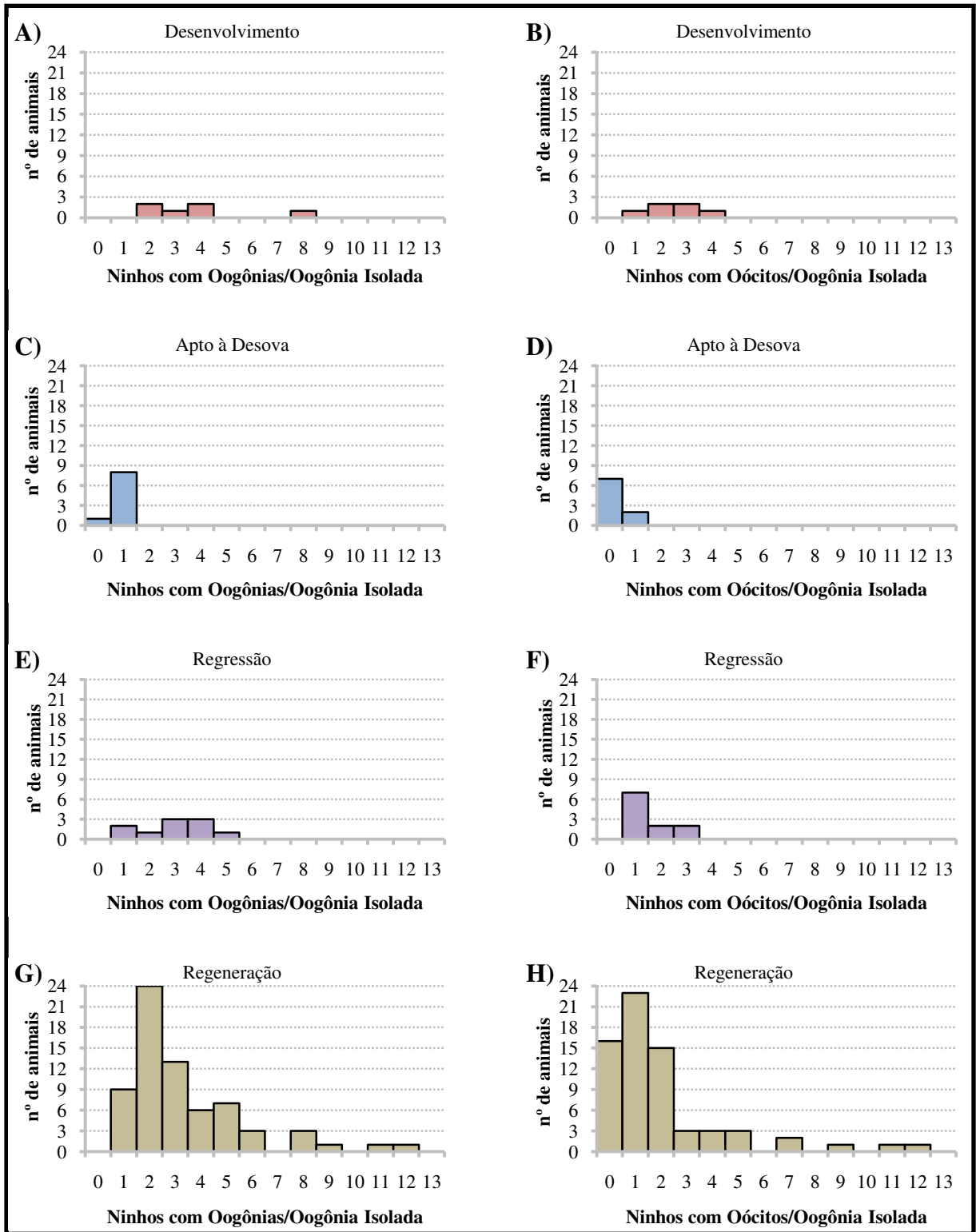


FIGURA 26: Relação entre a razão do número de ninhos contendo oogônias em proliferação (A, C, E e G) e ninhos contendo oócitos profásicos iniciais (B, D, F e H) pelo número de

oogônias isoladas presentes no epitélio germinativo de *Pimelodus maculatus* em cada fase do ciclo reprodutivo. **A-B)** *Fase em Desenvolvimento*. n=06. **C-D)** *Fase Apto à Desova*. n=09. **E-F)** *Fase em Regressão*. n=11. **G-H)** *Fase em Regeneração*. n=68.

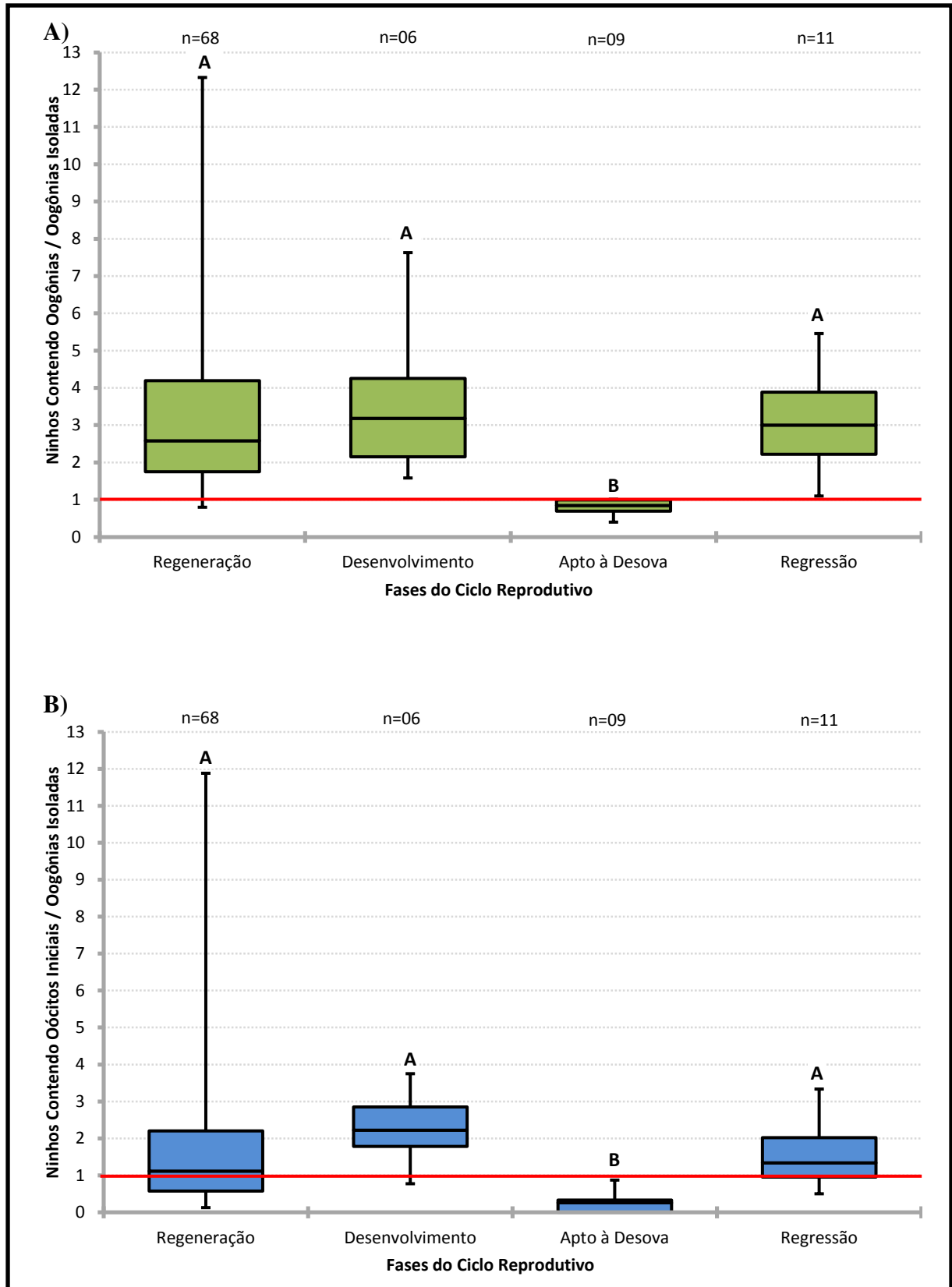


FIGURA 27: A) Relação do número de ninhos contendo oogônias em proliferação para cada

oogônia isolada. **B)** Relação do número de ninhos contendo oócitos profásicos iniciais para cada oogônia isolada presente no epitélio germinativo de *Pimelodus maculatus* em cada fase do ciclo reprodutivo. A linha central da caixa marca a mediana do conjunto de dados. A parte inferior da caixa é delimitada pelo primeiro quartil (Q1) e a parte superior pelo terceiro quartil (Q3), demonstrando a distribuição de 50% do total da amostra. As hastes inferiores e superiores se estendem, respectivamente, do primeiro quartil até o valor mínimo e do terceiro quartil até o valor máximo. Como referencial para o aumento ou diminuição das células germinativas, a razão oogônia isolada/oogônia isolada foi representada como valor 1 (linha vermelha). Letras diferentes representam diferenças estatísticas $p < 0,05$.

7. DISCUSSÃO

A análise dos ciclos reprodutivos das fêmeas de *Serrasalmus maculatus* e *Pimelodus maculatus* com base nas recentes propostas envolvendo o conceito de epitélio germinativo na formação dos folículos ovarianos (Grier 2000; 2002; Grier *et al.*, 2007; Quagio-Grassiotto *et al.*, 2011), os eventos celulares inerentes ao desenvolvimento oocitário (Grier *et al.*, 2009) e na determinação das fases reprodutivas (Brown-Peterson *et al.*, 2011) traz a luz novas e interessantes informações sobre a história de vida destas espécies.

A escala para determinação das fases reprodutivas dos teleósteos, desenvolvida pelo grupo liderado por Brown-Peterson (2011), a despeito de ter por base principalmente espécies marinhas e notadamente os Perciformes com ovos pelágicos, constitui, no momento, um dos primeiros elos entre a morfometria gonadal e seu status histológico. A proposta descreve de forma clara, simples e abrangente o estado funcional dos ovários ao longo dos ciclos reprodutivos, e como sugerido pelos autores, pode ser utilizada no estudo da história de vida de espécies ou grupos de peixes com as mais variadas estratégias reprodutivas. Particularidades inerentes às espécies podem, como também sugerido pelos autores, ser facilmente acomodadas na escala, por exemplo, na forma de sub fases. A proposta de Brown-Peterson e colaboradores (2011) representa, portanto, uma alternativa às escalas tradicionalmente utilizadas na descrição da história de vida dos teleósteos neotropicais como *Serrasalmus maculatus* e *Pimelodus maculatus* e mesmo em relação à propostas mais recentes como a de Núñez e Duponchelle (2009).

A escala de Vazzoler (1996) e suas adaptações (ver, por exemplo, Pina *et al.*, 2003; Ribeiro *et al.*, 2007; Pereira-Garcia *et al.*, 2010) utilizam, nas descrições das alterações gonadais, termos como em repouso, maturando e maduro. Estudos recentes, tendo por base a morfofisiologia gonadal (Grier, 2002; Patiño & Sullivan, 2002; Brown-Peterson *et al.*, 2011), vem questionando a aplicação de tais termos às alterações por que passam as gônadas ao longo dos ciclos reprodutivos. Grier (2002) é enfático ao afirmar que nas gônadas o epitélio germinativo que margeia as lamelas ovígeras nas fêmeas, bem como os túbulos seminíferos dos machos, é permanentemente ativo e responsável pela renovação das células germinativas a cada ciclo reprodutivo ao longo da história de vida das espécies. Colocado desta maneira, tem-se, portanto, que as gônadas, a rigor, não teriam um período

de repouso entre estações reprodutivas, o que tornaria impróprio o termo “repouso” para classificá-las. Já Patiño e Sullivan (2002) consideram como “maturação” o evento fisiológico que prepara os oócitos para a fertilização. Também se considerado dessa maneira, o termo “maturação” não se aplicaria às alterações gonadais que ocorrem ao longo dos ciclos reprodutivos das fêmeas dos teleósteos.

As diferentes escalas existentes para a classificação das alterações gonadais ao longo dos ciclos reprodutivos das fêmeas dos teleósteos, em geral, tem por base os morfotipos dos oócitos presentes, sejam eles pré-vitelogênicos, vitelogênicos ou considerados maduros. Por sua vez, o desenvolvimento oocitário tem sido dividido em estágios que variam conforme a visão dos diferentes autores. Exemplo disso é a proposição de Núñez e Duponchelle (2009) que divide e enumera o desenvolvimento oocitário em vários estágios. Este tipo de escala é, no entanto, de difícil reprodução, uma vez que depende muito da visão dos próprios autores sobre o processo, o que a torna particularmente subjetiva. Propostas recentes (Grier *et al.*, 2009; Lowerre-Barbieri *et al.*, 2009; 2011a; Brown-Peterson *et al.*, 2011), apesar de desenvolvidas primariamente com base em Perciformes marinhos com ovos pelágicos, são mais amplas e gerais, o que facilita a sua aplicação na descrição da oogênese nos teleósteos em geral. Particularmente a proposta de Grier e colaboradores (2009) tem se mostrado de fácil aplicação (ver Quagio-Grassiotto *et al.*, 2009; 2011; França *et al.*, 2010; presente estudo). A proposta por Grier e colaboradores (2009) para descrição da oogênese nos teleósteos tem por base os eventos celulares de natureza morfofisiológica que regem: a proliferação das células germinativas iniciais, sua entrada e paralisação inicial em meiose; a formação dos folículos ovarianos a partir do epitélio das lamelas (epitélio germinativo); o preparo dos oócitos para a vitelogênese; a vitelogênese em si; a maturação oocitária e retomada da meiose e, por fim, a ovulação.

As propostas mais recentes para descrição do processo de evolução dos oócitos, seja por Grier e colaboradores (2009), por Brown-Peterson e colaboradores (2011) ou por Lowerre-Barbieri e colaboradores (2011a), são bastante semelhantes entre si. Diferem ligeiramente quanto à terminologia sugerida para nomear os morfotipos de oócitos. Conflitam no diz respeito ao da presença dos alvéolos corticais para especificar um dos

estágios do desenvolvimento oocitário. Os alvéolos corticais, constituídos por um conjunto de vesículas localizadas junto ao ooplasma, liberam o seu conteúdo enzimático no espaço perivitelínico no momento da fertilização. Essas enzimas atuam nos componentes da zona pelúcida provocando uma série de alterações moleculares que previnem a polispermia (Le Menn *et al.*, 2007; Lubzens *et al.*, 2010). O extenso e exaustivo estudo por Lowerre-Barbieri e colaboradores (2011a, b), e também Brown-Peterson e colaboradores (2011), mostra que, particularmente em espécies de Perciformes marinhos com ovos pelágicos, o aparecimento dos alvéolos corticais pode ser utilizado como um indicador morfológico de que os oócitos pré-vitelogênicos iniciaram o seu desenvolvimento para o próximo período de desova. Para estes autores, o aparecimento dos alvéolos corticais caracteriza um estágio do desenvolvimento oocitário. Em *Serrasalmus maculatus*, o aparecimento dos alvéolos corticais tem início, muito cedo, em oócitos jovens de pequenas dimensões. Continuam a serem formados ao longo do crescimento primário e sua formação parece se completar somente durante o crescimento secundário. Nesta espécie, ao final do crescimento secundário os alvéolos corticais chamam a atenção pela quantidade e tamanho das vesículas pelas quais é formado. Já em *Pimelodus maculatus*, os alvéolos corticais são constituídos por vesículas pequenas e esparsas, cuja formação só consegue ser detectada ao longo do crescimento secundário. Esse tipo de evolução dos alvéolos corticais nos modelos de estudo aqui utilizados, espécies de Ostariophysi procedentes de diferentes ordens e com diferentes estratégias reprodutivas, não suporta o seu uso na caracterização de um estágio ao longo do desenvolvimento oocitário. No entanto, não se questiona aqui, o reconhecimento dos alvéolos corticais como um marcador morfológico da eminência de entrada em vitelogênese nos Perciformes marinhos com ovos pelágicos.

As recentes publicações de Lowerre-Barbieri e colaboradores (2011a, b) e Brown-Peterson e colaboradores (2011) discutem metodologias emergentes de análise do desenvolvimento gonadal e sua aplicação nos estudos dos recursos pesqueiros. Apesar de Brown-Peterson e colaboradores (2011) utilizarem a atividade do epitélio germinativo na classificação das fases do ciclo reprodutivo dos machos, o mesmo não acontece com as fêmeas.

Para estes autores, o recrutamento dos oócitos em crescimento primário para o crescimento secundário ocorre no período que antecede o período de desova, isto é, na *Fase em Desenvolvimento* (e também no início da *Fase Apto à Desova*) e pode ser claramente detectado em espécies com fecundidade determinada (ver Lowerre-Barbieri *et al.*, 2011a). Situação em que se enquadram os Siluriformes do gênero *Pimelodus* que apresentam período reprodutivo curto, concentrado nos meses de verão (Lima-Júnior & Goitein, 2006; Marcano *et al.*, 2007; presente estudo). Assim, em *P. maculatus* as gônadas em *Fase em Desenvolvimento* são encontradas apenas na primavera e verão. Ainda que as publicações de Brown-Peterson e colaboradores (2011) e Lowerre-Barbieri e colaboradores (2011a, b) não façam referência à atividade do epitélio germinativo, o estudo aqui desenvolvido mostra que, nas gônadas em *Desenvolvimento* de *P. maculatus* nesse período do ano, a proliferação mitótica das oogônias se mantém, contudo, sem apresentar valores *outlier* como os que ocorrem nas gônadas em *Regeneração*. O mesmo se dá com a entrada em meiose originando os ninhos contendo oócitos iniciais.

Nas espécies com fecundidade indeterminada, o recrutamento dos oócitos em crescimento primário para o crescimento secundário ocorre mesmo durante o período de desova (ver Lowerre-Barbieri *et al.*, 2011a). Situação em que se enquadram os Characiformes do gênero *Serrasalmus* (Paiva, 1958; Lamas & Godinho, 1996; Teles & Godinho, 1997; Honorato-Sampaio *et al.*, 2009; presente estudo) cujo período reprodutivo é longo, e abrange os meses de inverno e primavera. Em *S. maculatus*, gônadas em *Desenvolvimento* são encontradas ao longo de todo o ano, incluindo o período de desova. Nesta espécie, o epitélio germinativo comporta-se de modo diferenciado. Nas gônadas em *Desenvolvimento* a proliferação das oogônias diminui em relação à *Regeneração*, enquanto os ninhos contendo oócitos iniciais tornam-se mais numerosos.

Quando a gônada encontra-se *Apto a Desova* e principalmente durante a liberação dos gametas (*Subfase Desova Ativa*), é que ocorre, na verdade, o período de menor atividade do epitélio germinativo, independentemente do tipo de fecundidade que a espécie apresenta. Tem-se, nestas gônadas, a maior quantidade de oogônias que permanecem isoladas no epitélio. Alguns indivíduos de fecundidade indeterminada com período reprodutivo longo, como *S. maculatus*, continuam apresentando uma discreta atividade

mitótica das oogônias, mesmo quando aptos a desovar, porém, em menor intensidade se comparada a todas as demais fases do ciclo reprodutivo. A atividade mitótica das oogônias nessa fase do ciclo reprodutivo de *S. maculatus* confere um forte suporte à hipótese de Grier (2002) de que o epitélio germinativo permanece ativo ao longo dos ciclos reprodutivos. No entanto, quando estas gônadas apresentam sinais indicando a desova (*subfase Desova Ativa*), a quantidade de ninhos contendo oogônias torna-se escassa comparada à quantidade de oogônias isolada encontradas no epitélio das lamelas.

Com o término da desova, na *Regressão* ovariana, a atividade mitótica é retomada, tornando-se particularmente intensa na *Regeneração* (*sensu* Brown-Peterson *et al.*, 2011). Curiosamente, parte dos ovários em *Regressão* de *Pimelodus maculatus*, amostrados na primavera, apresentou desova ignorada. A incapacidade de desovar é detectada quando o ovário apresenta atresia massiva num período que antecede ao da desova sendo reconhecida como estratégia reprodutiva de muitas espécies, geralmente naquelas com fecundidade determinada (Lowerre-Barbieri *et al.*, 2011a; Rideout & Tomkiewicz, 2011).

Para espécies com fecundidade determinada, com período reprodutivo curto como *Pimelodus maculatus*, além da intensa atividade mitótica das oogônias na *Regeneração*, a entrada na meiose também se intensifica respondendo pela produção de milhares de oócitos, que permanecem em crescimento primário na maior parte do ano. Estes dados confirmam as suposições prévias de Taylor e Grier (1978), e expõe o possível engano a que se está submetido quando se utiliza o termo *Repouso* na designação desta fase reprodutiva. As técnicas histológicas utilizadas pelos diferentes autores nem sempre permitem a detecção das células germinativas iniciais. Assim, o termo *Repouso* presente nas escalas tradicionalmente empregadas na classificação morfométrica do desenvolvimento gonadal (ver Vazzoler, 1996), ainda que impróprio, continua se mantendo inclusive nas mais recentes proposições que se pretendem universais no que se refere à classificação do desenvolvimento gonadal (ver Núñez & Duponchelle, 2009).

8. CONCLUSÃO

A atividade do epitélio germinativo em espécies como *Pimelodus maculatus*, com desova sazonal e fecundidade determinada, reflete as fases reprodutivas anuais. Assim, após o longo período de intensa atividade mitótica, e entrada em meiose das células germinativas formando oócitos pré-vitelogênicos (*Fase em Regeneração*), o epitélio germinativo diminui discretamente esta atividade à medida que estes oócitos são recrutados para a vitelogênese (*Fase em Desenvolvimento*). O epitélio reduz bruscamente a atividade no curto período de desova (*Fase Apto à Desova*) e, volta retomá-la quando a desova se encerra (*Fase em Regressão*).

Em *Serrasalmus maculatus*, espécie com fecundidade indeterminada, a proliferação das oogônias é melhor percebida na *Fase em Regeneração* e a entrada na meiose é mais frequente na *Fase em Desenvolvimento*. Nesta última espécie, dado o longo período reprodutivo, fêmeas *Aptas a Desova*, mas que ainda não liberaram os gametas, podem manter a atividade mitótica das oogônias. No epitélio das lamelas destas fêmeas, de modo geral, atividade mitótica inferior às demais fases do ciclo reprodutivo e a entrada em meiose torna-se rara. A liberação dos gametas marca a menor atividade do epitélio germinativo, que só é retomada após a desova, na *Regressão*.

Estes dados da dinâmica do epitélio germinativo refletem diretamente o comportamento que as gônadas assumem em cada fase do ciclo reprodutivo dependendo da estratégia reprodutiva adotadas pelas diferentes espécies.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Bazzoli N, Cangassu LCV, Rizzo E, Santos GB. 1997. Reprodução e desova de mandis *Pimelodus maculatus* e *Iheringichthys labrosus* (Pisces, Pimelodidae) nos reservatórios de Furnas, Marimbondo e Itumbiara. *BIOS*; 5(5):7-15.
- Brown-Peterson NJ, Wyanski DM, Saborido-Rey F, Macewicz BJ, Lowerre-Barbieri SK. 2011. A Standardized Terminology for Describing Reproductive Development in Fishes. *Mar Coast Fish Dyn Manage Ecosyst Sci* [online serial]; 3:52-70.
- Choi Y, Rajkovic A. 2006. Characterization of NOBOX DNA binding specificity and its regulation of *Gdf9* and *Pou5f1* promoters. *J Biol Chem*; 281(47):35747-56.
- França GF, Grier HJ, Quagio-Grassiotto I. 2010. A new vision of the origin and the oocyte development in the ostariophysii applied to *Gymnotus sylvius* (Teleostei, Gymnotiformes). *Neotr Ichthyol*; 8(4):787-804.
- Godinho HM, Basile-Martins MA, Fenerich NA, Nagahara NY. 1997. Fecundidade e tipo de desova do mandi, *Pimelodus maculatus* Lacépède, 1803 (Pisces, Siluroidei). *Rev Bras Biol*; 37:737-744.
- Godinho HM, Fenerich NA, Basile-Martins MA, Barker JMB. 1974. Maturation curve of the ovary of *Pimelodus maculatus* Lac, (Siluroidei, Teleostei). *B Inst Pesca São Paulo*; 3:1-20.
- Grier HJ. 2000. Ovarian germinal epithelium and folliculogenesis in the Common Snook, *Centropomus undecimalis* (Teleostei: Centropomidae). *J Morphol*; 243:265-281.
- Grier HJ. 2002. 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.). November 2000. Fort Pierce: Mississippi/Alabama Sea Grant Consortium; pp. 537-552.

- Grier HJ, Uribe-Aranzábal MC, Parenti LR. 2007. Germinal epithelium, folliculogenesis, and postovulatory follicles in ovaries of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum,1792) (Teleostei, Protacanthopterygii, Salmoniformes). *J Morphol*; 268:293-310.
- Grier JH, Uribe-Aranzábal MC, Patiño R. 2009. The ovary, folliculogenesis and oogenesis in teleosts. In: *Jamieson BJM, editor. Reproductive Biology and Phylogeny of Fishes (Agnathans and Bony Fishes) Phylogeny Reproductive System Viviparity Spermatozoa* Enfield: Science Publishers; p.25-84.
- Honorato-Sampaio K, Santos B, Bazzoli N, Rizzo E. 2009. Observations on the seasonal breeding biology and fine structure of the egg surface in the white piranha *Serrasalmus brandtii* from the São Francisco River basin, Brazil. *J Fish Biol*; 75:1874-1882.
- Hunter JR, Macewicz BJ, Lo NC, Kimbrell CA. 1992. Fecundity, spawning, and maturity of female Dover sole *Microstomus pacificus*, with an evaluation of assumptions and precision. *Fish B- NOAA*; 90:101–128.
- Hunter JR, Macewicz BJ. 1985. Measurement of spawning frequency in multiple spawning fishes. *NOAA Technical Report NMFS*; 36:79–94.
- Junqueira LC, Carneiro J. 1999. Histologia Básica. Rio de Janeiro: *Guanabara Koogan*; 433p.
- Kloc M, Bilinski S, Dougherty MT, Brey EM, Etkin LD. 2004. Formation, architecture and polarity of female germline cyst in *Xenopus*. *Dev. Biol*; 266:43-61.
- La Fleur GF, Raldúa D, Fabra M, Carnevali O, Denslow N, Wallace RA, Cerdà, J. 2005. Derivation of major yolk proteins from parental vitellogenin, and alternative processing during oocyte maturation in *Fundulus heteroclitus*. *Biol Reprod*; 73:815-824.
- Lamas IR, Godinho AL. 1996 Reproduction in the piranha *Serrasalmus spilopleura*, a neotropical fish with an usual pattern of sexual maturity. *Environ Biol Fish*; 45:161-168.

- Le Cren ED. 1951. The length-weight relationship and seasonal cycle in gonad weight and condition factor in the perch (*Perca fluviatilis*). *J Anim Ecol*; 20:201-219.
- Le Menn F, Cerdà J, Babin PJ. 2007. Ultrastructural aspects of the ontogeny and differentiation of ray-finned fish ovarian follicles. In: Babin PJ, Cerdà J, Lubzens E. editors. *The Fish Oocyte: From Basic Studies to Biotechnological Applications*. Dordrecht: Springer; p1-37.
- Lima-Junior SE, Cardone IB, Goitein R. 2002. Determination of a method for calculation of Allometric Condition Factor of fish. *Acta Sci Biol Sci*, Maringá, 24(2):397-400.
- Lima-Junior SE, Goitein R. 2006. Fator de condição e ciclo gonadal de fêmeas de *Pimelodus maculatus* (Osteichthyes, Pimelodidae) no Rio Piracicaba (SP, Brasil). *B Inst Pesca São Paulo*; 32(1):87-94.
- Lowerre-Barbieri SK, Brown-Peterson NJ, Murua H, Tomkiewicz J, Wyanski D, Saborido-Rey F. 2011a. Emerging issues and methodological advances in fisheries reproductive biology. *Mar Coast Fish Dyn Manage Ecosyst Sci* [online serial]; 3:32–51.
- Lowerre-Barbieri SK, Ganas K, Saborido-Rey F, Murua H, Hunter JR. 2011b. Reproductive timing in marine fishes: variability, temporal scales, and methods. *Mar Coast Fish Dyn Manage Ecosyst Sci* [online serial]; 3:71–91.
- Lowerre-Barbieri SK, Henderson N, Llopiz, J, Walters S, Bickford J, Muller R. 2009. Defining a spawning population (*Cynoscion nebulosus*) over temporal, spatial, and demographic scales. *Mar Ecol Prog Ser*; 394:231–245.
- Lubzens E, Young G, Bobe J, Cerdà J. 2010. Oogenesis in teleosts: how fish eggs are formed. *Gen Comp Endocrinol*; 165:367–389.
- Marcano D, Cardillo E, Rodriguez C, Poleo G, Gago N, Guerrero HY. 2007. Seasonal reproductive biology of two species of freshwater catfish from the Venezuelan Xoodplains. *Gen Comp Endocrinol*; 153:371–377.

- Matova N, Cooley L. 2001. Comparative aspects of animal oogenesis. *Dev Biol*; 231:291-320.
- Mazzoni TS, Grier HJ, Quagio-Grassiotto I. 2010. Germline cysts and the formation of the germinal epithelium during female morphogenesis in *Cyprinus carpio* (Teleostei: Ostariophysi: Cypriniformes). *Anat Rec*; 293:1581–1606
- Murua H, Saborido-Rey F. 2003. Female reproductive strategies of marine fish species of the North Atlantic. *J Northw Atl Fish Sci*; 33:23–31.
- Nakamura S, Kobayashi K, Nishimura T, Higashijima S, Tanaka M. 2010. Identification of germline stem cells in the ovary of the teleost. *Science*; 328:1561–1563.
- Nakamura S, Kobayashi K, Nishimura T, Tanaka M. 2011. Ovarian Germline Stem Cells in the Teleost Fish, Medaka (*Oryzias latipes*). *Int J Biol Sci*; 7:403-409 .
- Núñez J, Duponchelle F. 2009. Towards a universal scale to assess sexual maturation and related life history traits in oviparous teleost fishes. *Fish Physiol Biochem*; 35:167–180.
- Paiva MP. 1958. Sobre o controle da pirambeba *Serrasalmus rhombeus* (L. 1766) Lacépède, 1803, no Açude Lima Campos (Icó, Ceará) através da pesca seletiva. *Rev Bras Biol*; 18:251-266.
- Patiño R, Sullivan CV. 2002. Ovarian follicle growth, maturation, and ovulation in teleost fish. *Fish Physiol Biochem*; 26: 57-70.
- Pepling ME, Spradling AC. 2001. Mouse ovarian germ cell cysts undergo programmed breakdown to form primordial follicles. *Dev Biol*; 234:339-351.
- Perera-García MA, Mendoza-Carranza M, Contreras-Sánchez WM, Huerta-Ortíz M, Pérez-Sánchez E. 2010. Reproductive biology of common snook *Centropomus undecimalis* (Perciformes: Centropomidae) in two tropical habitats. *Rev Biol Trop*; 59(2):669-681.

- Pina N, Esteves E, Andrade JP. 2003. Gross and Histological observations of ovarian development in twaite shad, *Alosa fallax fallax*, from the Rivers Mira and Guadiana (Portugal). *Sci Mar*; 67(3):313-322.
- Puchtler H, Waldrop FW. 1978. Silver impregnation methods for reticulum fibers and reticulin: A re-investigation of their origins and specificity, *Histochemistry*; 57(3):177.
- Quagio-Grassiotto I, França GF, Mazzoni TS, Grier H. 2009. A new approach to oocyte development in Ostariophysi. *ISABR*; 6:269.
- Quagio-Grassiotto I, Grier HJ, Mazzoni TS, Nóbrega RH, Amorim JP. 2011. Activity of the Ovarian Germinal Epithelium in the Freshwater Catfish, *Pimelodus maculatus* (Teleostei: Ostariophysi: Siluriformes): Germline Cysts, Follicle Formation and Oocyte Development. *J Morphol*; 8:1290-1306.
- Quintero-Hunter I, Grier HJ, Muscato M. 1991. Enhancement of histological detail using metanil yellow as counterstain in periodic acid/Schiff's hematoxylin staining of glycol methacrylate tissue sections. *J Biotech Histochem*; 66:169-172.
- Reis RE, Kullander SO, Ferraris CJJ. 2003. Check List of the Freshwater Fishes of South and Central America. *EDIPUCRS* Porto Alegre; p.742.
- Ribeiro VMA, Gilmar BS, Bazzoli N. 2007. Reproductive biology of *Steindachnerina insculpta* (Fernandez-Yépez) (Teleostei, Curimatidae) in Furnas reservoir, Minas Gerais, Brazil. *Rev Bras Zool*; 24(1):71-76.
- Rideout RM, Tomkiewicz J. 2011. Skipped spawning in fishes: more common than you might think. *Mar Coast Fish Dyn Manage Ecosyst Sci* [online serial]; 3:176–189.
- Selman K, Wallace RA. 1989. Cellular aspects of oocyte growth in teleosts. *Zool Sci*; 6:211-231.
- Strum JM, Gartner LP, Hiatt JL. 2007. Cell biology and histology. Hagerstwon, MD: Lippincott Williams & Wilkins; p.83.

- Taylor RG, Grier HJ, Whittington JA. 1998. Spawning rhythms of common snook in Florida. *J Fish Biol*; 53:502–520.
- Teles MEO, Godinho HP. 1997. Ciclo reprodutivo da pirambeba *Serrasalmus branditii* (Teleostei, Characidae) na Represa de Três Marias, Rio São Francisco. *Rev Bras Biol*; 57:177±184.
- Tyler CR, Sumpter JP. 1996. Oocyte growth and development in teleosts. *Rev Fish Biol Fisher*; 6:287-318.
- Vazzoler AEAM. 1996. Biologia da reprodução de peixes Teleósteos. Teoria e Prática. Maringá: *EDUEM*; 169p.
- Vidal BC. 1988. Histochemical and anisotropical properties characteristics of silver impregnation: The differentiation of reticulin fibers from the other interstitial collagens. *Zool Jb Anat*; 117:485-494
- Wallace RA, Selman K. 1990. Ultrastructural aspects of oogenesis and oocyte growth in fish and amphibians. *J Electron Micr Tech*; 16:175-201.

10. ANEXO I: PROTOCOLO PARA COLORAÇÕES (METACRILATO GLICOL)

P.A.S. + HEMATOXILINA FÉRRICA + METANIL YELLOW

- Hidratar os cortes em água destilada (ou filtrada);
- Imergir em Ácido Periódico a 1% por 10 minutos;
- Lavar em água corrente por 10 minutos;
- Imergir em Reativo de Schiff por 1 hora;
- Lavar em água corrente por 10 minutos;
- Imergir em Hematoxilina Férrica por 10 minutos;
- Lavar em água corrente por 10 minutos;
- Imergir em Metanil Yellow por 2 minutos;
- Lavar rapidamente apenas para tirar o excesso de corante;
- Desidratar em estufa 60°C por 12 horas;
- Montar em meio Permount.

SOLUÇÃO DE REATIVO DE SCHIFF

| | |
|-------------------------|--|
| Água destilada | 200ml |
| Fucsina Básica | 2g |
| Matabissulfito de Sódio | 4g |
| Ácido Clorídrico normal | 4,15ml (diluído em 50ml de água destilada) |
| Carvão Ativado | 500mg |

Aquecer os 200ml de água destilada até a ebulição. Retirar do fogo e acrescentar 2g de Fucsina Básica. Dissolver e esfriar a solução em temperatura ambiente. Aquecer novamente, sob agitação, a 60°C e filtrar. Acrescentar 4g de Metabissulfito de Sódio e esperar dissolver. Adicionar 50ml de Ácido Clorídrico normal. Acrescentar 500mg de Carvão Ativado finamente pulverizado. Agitar bem e filtrar. O resultado deverá ser uma solução incolor ou amarelo-palha. O ph deve ficar entre 1,0 e 1,25. Conservar em geladeira. Descartar quando assumir coloração rosa.

SOLUÇÃO DE HEMATOXILINA FÉRRICA

Solução A:

| | |
|--------------|-------|
| Hematoxilina | 1g |
| Álcool 96% | 100ml |

Esta solução deve ser amadurecida, por cerca de um mês, antes do uso.

Solução B:

| | |
|--|------|
| Nitrato de Ferro III em solução aquosa a 30% | 4ml |
| Água destilada | 95ml |
| Ácido clorídrico concentrado | 1ml |

Solução Corante:

50% de SoluçãoA + 50% de soluçãoB

SOLUÇÃO DE METANIL YELLOW

Solução A:

| | |
|----------------|-------|
| Metanil Yellow | 0,1g |
| Água destilada | 100ml |

Solução B:

| | |
|-----------------------|-------|
| Ácido Acético glacial | 0,5ml |
| Água destilada | 100ml |

Solução Corante:

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

TÉCNICA DE RETICULINA

- Colocar a lâmina em posição horizontal em grade metálica. Todos os corantes devem ser gotejados sobre a lâmina;
- Permanganato de Potássio a 1% durante 5 minutos;
- Lavar em água destilada;
- Ácido Oxálico a 3% durante 2 minutos;
- Lavar em água destilada;
- Alúmen de Ferro (Sulfato de Amônia e Ferro III) a 1% durante 3 minutos;
- Lavar em água destilada;
- Solução de Prata Amoniacal a 10% durante 3 minutos;
- Lavar em água destilada;
- Solução de Redução (Formol a 10%) durante 3 ou 4 minutos;
- Lavar muitas vezes com água destilada;
- Desidratar em estufa 60°C durante 12 horas;
- Montar em meio Permunt.

SOLUÇÃO DE PRATA AMONICAL A 10%

Nitrato de Prata em solução aquosa a 10% 20ml

Hidróxido de Sódio em solução aquosa a 10% 4ml

Gotas de Hidróxido de Amônio

Todo o preparo desta solução deve ser feito na capela com a luz apagada. Misturar o Nitrato de Prata com auxílio do agitador. Adicionar o Hidróxido de Sódio em solução aquosa a 10%. Sob agitação, gotejar Hidróxido de Amônio (máximo de 4ml). Duplicar o volume com água destilada. Filtrar e armazenar na geladeira.

11. ANEXO II:

DECLARAÇÃO

Declaro para os devidos fins que o conteúdo de minha **Dissertação de Mestrado** intitulada **"Dinâmica de renovação das células germinativas femininas em duas espécies de Ostariophysi com diferentes ciclos reprodutivos: *Serrasalmus maculatus* (Characiformes) e *Pimelodus maculatus* (Siluriformes).":**

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


Tem autorização da(s) seguinte(s) Comissão(ões):

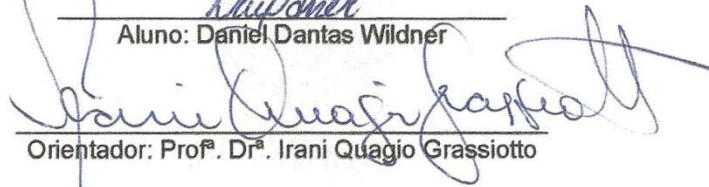
() CIBio - Comissão Interna de Biossegurança , projeto nº _____, Instituição:

(X) CEUA - Comissão de Ética no Uso de Animais , projeto nº 204-CEUA, Instituto de Biociência de Botucatu - IBB, Universidade Estadual Paulista "Julio de Mesquita Filho" - UNESP.

() CEP - Comissão de Ética em Pesquisa, protocolo nº _____, Instituição:

** Caso a Comissão seja externa ao IB/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.*

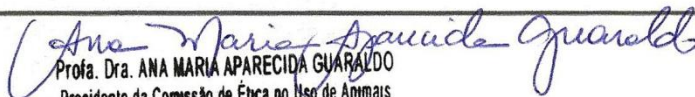

Aluno: Daniel Dantas Wildner


Orientador: Prof.ª. Dr.ª. Irani Quaggio Grassiotto

Para uso da Comissão ou Comitê pertinente:

Deferido () Indeferido

Carimbo e assinatura


Prof.ª. Dra. ANA MARIA APARECIDA GUARALDO
Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais
CEUA/UNICAMP

Para uso da Comissão ou Comitê pertinente:

() Deferido () Indeferido

Carimbo e assinatura

Certificado

Certificamos que o Protocolo nº **204-CEUA**, sobre “Uma nova abordagem do ciclo reprodutivo da fêmea e da origem e desenvolvimento dos oócitos dos *Ostariophysi*, aplicada ao *Serrasalminae*, *Serrasalmus maculatus* (Teleóstei: Characiformes)”, 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 NO USO DE ANIMAIS** (CEUA), nesta data.

Botucatu, 30 de novembro de 2011.



Prof.ª Dr.ª Patrícia Fernanda Felipe Pinheiro
Presidente da CEUA

