

TALITA SARAH MAZZONI

“Formação do epitélio germinativo e diferenciação das estruturas gonadais: uma análise comparativa entre os grupos mais basais (Ostariophysi) e mais derivados (Atherinomorpha e Percomorpha) dentro de Teleostei”

Campinas, 2013

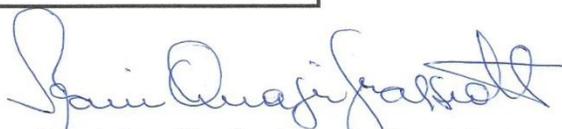
**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
INSTITUTO DE BIOLOGIA**

TALITA SARAH MAZZONI

**“Formação do epitélio germinativo e diferenciação das
estruturas gonadais: uma análise comparativa entre os grupos
mais basais (Ostariophysi) e mais derivados
(Atherinomorpha e Percomorpha) dentro de Teleostei”**

Este exemplar corresponde à redação final
da Tese defendida pela candidata
Talita Sarah Mazzoni
e aprovada pela Comissão Julgadora.

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



Orientadora: Dra. Irani Quagio Grassiotto

Campinas, 2013

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca do Instituto de Biologia
Mara Janaina de Oliveira - CRB 8/6972

M459f Mazzone, Talita Sarah, 1981-
Formação do epitélio germinativo e diferenciação das estruturas gonadais :
uma análise comparativa entre grupos mais basais (Ostariophysi) e mais
derivados (Atherinomorpha e Percomorpha) dentro de Teleostei / Talita Sarah
Mazzone. – Campinas, SP : [s.n.], 2013.

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

1. Diferenciação gonadal. 2. Epitélio germinativo feminino. 3. Epitélio
germinativo masculino. 4. Teleosteos. I. Quagio-Grassiotto, Irani. II. Universidade
Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Formation of the germinal epithelium and gonadal structures
differentiation : comparative analysis between groups more basal (Ostariophysi) and more
derivative (Atherinomorpha and Percomorpha) within Teleostei

Palavras-chave em inglês:

Gonadal differentiation
Female germinal epithelium
Male germinal epithelium
Teleostei

Área de concentração: Biologia Celular

Titulação: Doutora em Biologia Celular e Estrutural

Banca examinadora:

Irani Quagio Grassiotto [Orientador]
Fabiana Laura Lo Nostro
Denise Vizziano Cantonnet
Luis Antonio Violin Dias Pereira
Estela Sasso Cerri

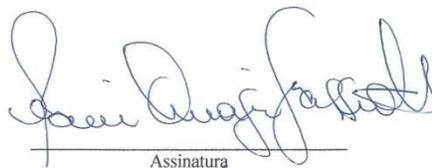
Data de defesa: 29-08-2013

Programa de Pós-Graduação: Biologia Celular e Estrutural

Campinas, 29 de agosto de 2013

BANCA EXAMINADORA

Dra. Irani Quagio Grassiotto (Orientadora)



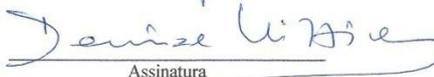
Assinatura

Dra. Fabiana Laura Lo Nostro



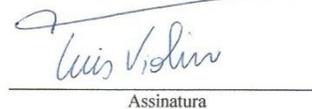
Assinatura

Dra. Denise Vizziano Cantonnet



Assinatura

Dr. Luis Antonio Violin Dias Pereira



Assinatura

Dra. Estela Sasso Cerri



Assinatura

Profa. Dra. Mary Anne Heidi Dolder

Assinatura

Profa. Dra. Renata Guimarães Moreira

Assinatura

Profa. Dra. Laura Satiko Okada Nakaghi

Assinatura

“E, tomando a mão da menina, disse-lhe: Talita cumi; que, traduzido, é: Menina, a ti te digo, levanta-te”.
(Jesus Cristo – Marcos, 5:41)

“Não permita que o comportamento dos outros tire a sua paz”.
(Dalai Lama)

“A única maneira de fazer um excelente trabalho é amar o que você faz”.
(Steve Jobs)

“Nunca ande pelo caminho traçado, pois ele conduz somente até onde os outros foram”.
(Alexandre Graham Bell)

“Aquilo que o coração ama fica eterno”.
(Rubem Alves)

*Dê sempre o melhor...
E o melhor virá.
Às vezes as pessoas são egocêntricas,
Ilógicas e insensatas...
Perdoe-as assim mesmo.
Se você é gentil, as pessoas podem
Acusá-lo de egoísta e interesseiro...
Seja gentil assim mesmo.
Se você é um vencedor, terá alguns
Falsos amigos e alguns inimigos verdadeiros...
Vença assim mesmo.
Se você é honesto e franco,
As pessoas podem enganá-lo...
Seja honesto e franco assim mesmo.
O que você levou anos para construir,
Alguém pode destruir de uma hora para outra...
Construa assim mesmo.
Se você tem paz e é feliz,
As pessoas podem sentir inveja...
Seja feliz assim mesmo.
O bem que você faz hoje
Pode ser esquecido amanhã...
Faça o bem assim mesmo.
Dê ao mundo o melhor de você,
Mas isso pode nunca ser o bastante...
Dê o melhor assim mesmo.
E veja você que, no final das contas,
É entre você e Deus...
Nunca será entre você e eles!*

(Madre Tereza de Calcutá)

*Mas é claro que o sol vai voltar amanhã
Mais uma vez, eu sei
Escuridão já vi pior, de endoidecer gente sã
Espera que o sol já vem.*

*Tem gente que está do mesmo lado que você
Mas deveria estar do lado de lá
Tem gente que machuca os outros
Tem gente que não sabe amar
Tem gente enganando a gente
Veja a nossa vida como está
Mas eu sei que um dia a gente aprende
Se você quiser alguém em quem confiar
Confie em si mesmo
Quem acredita sempre alcança!*

*Nunca deixe que lhe digam que não vale a pena
Acreditar no sonho que se tem
Ou que seus planos nunca vão dar certo
Ou que você nunca vai ser alguém
Tem gente que machuca os outros
Tem gente que não sabe amar
Mas eu sei que um dia a gente aprende
Se você quiser alguém em quem confiar
Confie em si mesmo
Quem acredita sempre alcança!*

(Renato Russo)

À minha mãe Almerinda, a quem dedico este trabalho,

“Ela tem a capacidade de ouvir o silêncio. Adivinhar sentimentos. Encontrar a palavra certa nos momentos incertos. Fortalecer-nos quando tudo ao nosso redor parece ruir. Sabedoria emprestada dos deuses para nos proteger e amparar. Sua existência é em si um ato de amor. Gerar, cuidar, nutrir. Amar, amar, amar... Amar com um amor incondicional que nada espera em troca. Afeto desmedido e incontido, Mãe é um ser infinito.”

Como diria Abraham Lincoln “Tudo aquilo que sou, ou pretendo ser, devo a um anjo - minha Mãe.”

Minha mãe, amo-te eternamente!!!!

À Professora Irani Quagio Grassiotto, o meu maior exemplo,

Professora, eu lhe conheci há 12 anos, no primeiro dia de aula da minha graduação e em pouco tempo percebi o quanto a senhora me fazia tremer de medo. Durante toda a graduação, a despeito de utilizar seu laboratório para realizar algumas técnicas, eu nunca soube por onde andaria meu futuro, mas eu sempre tive uma absoluta certeza: eu nunca, jamais, trabalharia com a Profa. Irani, por se tratar de uma temível Professora de Biologia Celular, a quem atribuo a minha nota mais baixa durante a graduação. O tempo passou e no meu último ano de faculdade, comecei a trabalhar com a senhora, meio contra minha vontade, a pedido da minha então orientadora, que me convenceu de que seria algo bom a se fazer para o meu futuro profissional. Neste tempo, trilhei muitos caminhos em busca de um professor da área de Embriologia que pudesse me orientar no mestrado. Porém, em pouco tempo, eu já não sabia mais o porquê estava tão difícil ir embora do seu laboratório. De repente descobri que eu estava diante da melhor profissional que eu já havia conhecido. E que nada tinha em comum com aquela professora de Biologia Celular que me causava um inexplicável terror. Em um ano de muitas dúvidas, resolvi que o melhor era ser sua orientada na pós-graduação. E com certeza, esta foi a melhor escolha que fiz na vida!!!

Apaixonei-me pela profissional, pela professora, pela pessoa Irani! E não sabia mais ficar longe... Mas ainda assim, em três momentos (um na graduação, um no mestrado e um no doutorado) eu resolvi desistir de tudo e ir embora, sendo que na última vez, eu estava realmente decidida... mas nas três vezes, eu recebi um não como resposta. Foi a melhor coisa que a senhora fez por mim!!! Obrigada por nunca ter me deixado desistir!!!

Professora Irani, alguém com alma de mãe, mas que por isso mesmo sabe puxar a orelha como ninguém. Quando o assunto é trabalho, nunca passou a mão na cabeça, muito pelo contrário... a cobrança sempre foi intensa e rigorosa! Porém, é essa pessoa que me encanta... é essa pessoa que tantas vezes me fez chorar de alegria, de emoção e até de saudades! Ninguém melhor do que a senhora para saber o quanto eu lhe admiro, tanto, tanto, tanto que chega até a lhe irritar! Mas eu sou assim, eternamente apaixonada pela minha orientadora, alguém que eu jurei jamais trabalhar e, hoje, tudo o que eu queria era continuar trabalhando eternamente!

Obrigada por tudo o que me ensinou, por ser alguém tão fascinante no seu modo de viver. Alguém que sabe tudo sobre todos os aspectos da vida, alguém possuidora de um conhecimento infundável e uma sabedoria encantadora. Enfim, Professora, embora tenhamos tido muitas discussões ao longo do meu doutorado, guardo com todo carinho cada minuto em

que convivi com a senhora. Cada segundo diante da sua presença sempre é um grande aprendizado e entre tantos momentos bons que vivemos e outros não tão bons assim, a lição sempre foi grandiosa. É uma honra imensa ter sido sua aluna. E num futuro próximo, vai ser muito difícil seguir o meu próprio caminho.

Obrigada por ser tão especial, enérgica e tão afável ao mesmo tempo, por ter essa energia contagiante que só a senhora tem. Obrigada por ter me ensinado a ser a pessoa mais forte desse mundo. Obrigada por tudo o que vivemos, por todos os conselhos, orientações e ensinamentos. Eu sempre serei sua eterna aprendiz, com muita honra e satisfação!!!

Agradeço a Deus, todos os dias, por nossos caminhos terem se cruzado!!! Deixando o profissionalismo de lado, e eu sei que a senhora odeia isso e que eu vou receber um belo puxão de orelha, tenho que dizer que a senhora é alguém que eu amo para sempre, incondicionalmente!!!! Por tudo o que vivemos, hoje eu tenho a plena certeza disso... de que quando um sentimento bom é forte e verdadeiro, ele é também indestrutível! Eu amo a senhora, Professora!!! Tenha a plena certeza de que não houve um único dia sequer nesses anos de convivência em que este meu sentimento de amor, admiração e respeito pela senhora foi abalado!

Obrigada por tudo!!!!!!!!!!!!!! Eu nunca vou te esquecer.. Simplesmente porque a senhora foi responsável por grande parte do que sou hoje. Seus ensinamentos e atitudes me fortalecem, me encantam, me emocionam e seguirão comigo, SEMPRE!!!!

Obrigada por tudo, minha querida Professora Irani!!!!!!!!!!!!!!

AGRADECIMENTOS

Agradeço em primeiro lugar a Deus, por toda força, fé e esperança que nunca deixaram de estar na minha essência. E que por maior que possam ser as dificuldades, que a força do bem e do esforço sempre vencem!!! Que a gente pode alcançar o que quiser, se realmente desejar! Obrigada meu Pai, por toda fé e força que aprendi a ter diante das dificuldades.

Agradeço imensamente o dom da vida e as conquistas que alcancei, especialmente na minha vida profissional. Durante meu doutorado, tive que vencer incansáveis barreiras, que me faziam, por vezes, desanimar, como inúmeras tentativas frustradas durante a criação dos peixes, incidentes lamentáveis nos processamentos dos materiais, enfim, momentos desesperadores, que sempre estão presentes na vida de qualquer pós-graduando. Porém, com muita persistência e determinação, consegui alcançar metas que nunca pensei conseguir. Com muita força de vontade, consegui finalizar o trabalho que me propus a fazer há 4 anos, no início do meu doutorado. E tudo o que tenho a dizer é agradecer a Deus por todas estas conquistas. E dizer, novamente, repetindo as palavras do meu mestrado, que mesmo que isso signifique muito trabalho e esforço, incontáveis horas no micrótomo – meu “brinquedo” favorito – e mais de 9.000 lâminas de cortes seriados analisadas “com honra e satisfação, só posso dizer que faria tudo de novo... quantas vezes fossem necessárias”. Por isso, eu sempre irei insistir na caminhada. Concordando com Caio Fernando de Abreu “se amanhã o que eu sonhei não for bem aquilo, eu tiro um arco-íris da cartola. E refaço. Colo. Pinto e bordo. Porque a força de dentro é maior. Maior que todo mal que existe no mundo. Maior que todos os ventos contrários. É maior porque é do bem. E nisso, sim, acredito até o fim. O destino da felicidade me foi traçado no berço”.

Obrigada, Deus, por toda felicidade que sinto, frente ao meu trabalho!!!! Como diria Izabella Neshich, “sou cientista... não desisto do meu plano. Eu sofro, reclamo, conclamo, mas eu faço o que amo”!

Em segundo lugar, gostaria de agradecer a todas as pessoas que direta ou indiretamente contribuíram para a minha formação profissional e pessoal, especialmente:

- À minha família, especialmente à minha mãe Almerinda Virginio S Jorge Mazzoni, coração da minha família. Ao meu irmão Cesar Augustus Mazzoni (e ao bebê que está a caminho). A vocês, obrigada por tudo o que fazem por mim! Eu aprendi que, por mais complicada que uma família seja, é nela que você sempre vai encontrar as pessoas que realmente lhe apoiam - o verdadeiro porto seguro. Ao meu avô Arcênio S Jorge (*in memorian*) pelos ensinamentos deixados, os quais eu continuo a seguir...

- À minha mãe novamente, por tudo o que fez por mim durante o meu doutorado, auxiliando-me todos os dias com a minha “sala de peixes”. Obrigada por ter permitido que eu transformasse parte da nossa casa em um verdadeiro biotério, e parte do quintal em “restaurante”, espaço este em que criei os alimentos vivos, entre eles, larvas de insetos, artêmias e microvermes para os peixes. Obrigada por todas as vezes que cuidou de tudo quando precisei viajar, por alimentá-los todos os dias que eu ficava 24h no laboratório, pelas companhias nas madrugadas monitorando os cortejos, reproduções, desovas e nascimentos! Por estar ao meu lado e consolar minha tristeza quando os filhotes ou adultos morriam, ou quando algum desastre ocorria com os aquários! Muito obrigada por toda colaboração nesta parte do meu trabalho!!! Sem a sua ajuda, com certeza, eu não teria conseguido tantos resultados.

- À minha querida avó Dodô. Dô, não há um único dia que a sua música não toque dentro do meu coração. Obrigada por tudo o que fez por mim a vida toda até o último dia da sua vida. Ao meu “vodrasto” Léo (Leonas Urbanavicius) que também partiu deixando muitas saudades. Obrigada pelo

tempo que morei com vocês durante toda minha graduação e parte da pós... Com certeza, os melhores dias familiares da minha vida!

- À toda minha família “Virginio dos Santos” e “SJorge”, aos meus primos queridos, especialmente à Marise Scarpelini e Maria Cristina Potiens. À minha tia-avó Walkyria Cardoso e às crianças mais lindas desse mundo: Isabelle Potiens e Henrique Cardoso.

- Ao Dr. Harry Grier (Florida Fish and Wildlife Research Institute – Florida/USA) por me orientar na criação dos peixes, e mais do que isso, por fazer a reprodução dos *Gymnocorymbus ternetzi* e *Poecilia reticulata* em seu país, contribuindo com uma amostragem ainda maior para os meus estudos! Muito obrigada por tudo o que fez, Harry!!! Apesar de não estar no papel, com certeza eu lhe considero um co-orientador. Obrigada pelos valiosos ensinamentos, pelas conversas via email sobre criação e outras histórias de peixes. É uma honra para mim receber os seus ensinamentos!!! Minha admiração por você é enorme!!!

- To Dr. Harry Grier (Florida Fish and Wildlife Research Institute - Florida/ USA) for advising me in raising fish, and more than that, for doing the reproduction of *Gymnocorymbus ternetzi* and *Poecilia reticulata* in your country, contributing with a sample which was even bigger to my studies! Thank you very much for everything you have done, Harry!! Although not officially I consider you as a co-advisor. Thank you for your valuable teachings, for the talks by e-mail about the raising and other fish histories. It is an honor for me receiving your teaching!!! I have a great respect and admiration for you!!!

- À Profa. Maíra Stefanini, minha prima querida, por todo apoio ao longo do meu doutorado! Muitíssimo obrigada, Maíra, por estar ao meu lado nos momentos em que eu mais precisei. Deus sabe o quanto sou grata a você! Sou eternamente grata por tudo o que faz por mim!!!

- Às amigas Rosângela Rossi e Denise Valio. Ex-professoras, do tempo da matemática, hoje minhas melhores amigas. Mais do que isso, verdadeiras mães para mim! Vocês que me conheceram quando eu ainda era uma criança de 10 anos de idade, e que naquele tempo eu já não sabia se faria faculdade de matemática ou ciências, muito obrigada por tudo o que me ensinaram, por estarem presentes constantemente na minha vida, por me apoiarem quando resolvi mudar de área e seguir o que amava mais do que a matemática – a biologia. Obrigada por todos esses anos de amizade e por estarem diariamente presentes no meu caminho! Amo vocês!

- À Profa. Selma Michelin Matheus, por toda amizade, apoio e por ser um pouco mãe nos momentos em que precisei. Momentos difíceis com a saúde de minha mãe Almerinda, em que tudo o que eu precisava era de um colo de uma outra mãe! Muito obrigada, Selma, por todas as conversas, por toda força que me deu, nesta e em outras ocasiões. Você, além de ter sido uma professora muito querida, é hoje uma grande amiga! Te adoro demais!!!

- À Zeina Eandar, irmã de coração da minha mãe Almerinda, e ao seu esposo Prof. Francisco Assis de Mello. Zeina, você sabe que é uma verdadeira tia para mim. Obrigada por todas as vezes que me apoiou e me consolou. Por todo amor e carinho, por estar tão presente em dias críticos da vida da minha mãe! Por me tratar como filha e por toda preocupação que tem conosco. Sou eternamente grata, por você fazer parte da nossa família de coração!!!

- Ao Nelson Sônego, alguém para sempre especial! Alguém que eu sempre vou admirar e nunca vou ser capaz de esquecer. Obrigada por tudo o que me ensinou e pela amizade que se tornou eterna!

- Aos amigos de longa data: Ana Laura Oliveira, Angélica Campos (*in memoriam*), Carla Migliatti, Cláudia Camargo Barros, Lilian Sales, Luiz Fernando Antunes, Márcio Akyama, Maressa Carvalho, Maria Carolina Costa, Priscila Freire e Renata Roentgën. O tempo já nos provou que nossa amizade é verdadeira. Mesmo com a atual distância, nossa amizade é tão forte quanto sempre.

- A um amigo especial, Renato Honji, por todo companheirismo, cumplicidade, pelos momentos divertidos em congressos e cursos, pelas conversas infindáveis sobre “o que é que estamos fazendo aqui” e por ter tanta paciência com esta sua eterna fã!

- A alguém especial, Danilo Massashi, pelos longos anos de amizade e pelo que você representa atualmente em minha vida. Obrigada também por ter feito o impossível para que conseguíssemos reproduzir seus peixes, até então de estimação - os Corydoras utilizados neste trabalho.

- Aos amigos de graduação da Trigésima Sétima Turma de Ciências Biológicas, especialmente Danielle Fernandes, Clivia Fiorilo, Alexandre Leite, Gorete Teixeira, Érika Graner e Julio Sérgio dos Santos.

- Aos amigos de pós-graduação Andréa de Aro, Débora Sobreira e Ricardo Fochi, por todo companheirismo e pela amizade que se perpetuou. Especialmente a você Andréa, minha amiga querida, sempre tão presente, tão especial na minha vida!

- Aos colegas do Departamento de Morfologia (IBB-UNESP), especialmente à Flávia Delella, Juliana Perobelli, Elton Scudeler e Ana Sílvia Garcia por toda amizade. Aos amigos do laboratório vizinho “LGI”, especialmente Sárah Gomes de Oliveira, Bruno Fantinatti, Rafael Takahiro, Guilherme Valente, Érica Ramos, Marielly Campos, Marcos Dias e Diego Marques, por todos os momentos hiper divertidos.

- À querida amiga Sárah Gomes de Oliveira. Dona Sárah, muito obrigada pela companhia nas noites em que passávamos em claro trabalhando, amenizando o cansaço e tornando esses dias tão divertidos. Obrigada pelos nossos eventos especiais, a qualquer momento, especialmente as “sexta-feiras”, em que sempre havia um motivo para comemoração. Obrigada, enfim, por toda amizade e pelas longas e engraçadas conversas. A vida ao seu lado é muito mais divertida!!!

- Aos colegas do Laboratório de Biologia da Reprodução de Peixes Neotropicais (IBB-UNESP): Clarianna Martins, Daniel Wildner, Lucélia Tessaro, Rinaldo Ortiz e Emanuel Martinez. Especialmente ao Júlio César de Oliveira Santana, pelo companheirismo nas viagens e nos trabalhos seja durante a semana, nos finais de semana, nos feriados da semana, nas noites da semana, enfim, por todas as horas-extras que se tornaram tão divertidas no lab. Por toda amizade que existe entre nós! Nunca se esqueça do quanto você é especial para mim. Que nossa amizade nunca se deixe abalar, mesmo quando o poder dos “horcruxes” fizer-nos cair em tentação! E que os nossos finais de semana continuem sempre tão divertidos quanto sempre, dentro e fora do lab!!!

- Aos amigos e ex-integrantes do Laboratório de Biologia da Reprodução de Peixes Neotropicais (IBB-UNESP): Laura Migliorini por toda a admiração que sempre teve por mim e pelo meu trabalho, e por acreditar que eu sou a pessoa mais forte desse mundo, o que, às vezes, até me fazia acreditar nisso. Muito obrigada por tudo, Laura! À Mariana Spinardi pela amizade dentro e fora do lab e pelos momentos divertidos! Ao grande amigo Marco Azevedo pelos momentos filosóficos, culturais, divertidos e pela grande amizade que há entre nós. À Ayesha Ribeiro Pedrozo pela amizade, por todos os momentos de apoio e por toda ajuda laboratorial no início da minha pós-graduação.

- À amiga Gisleine Fernanda França, ex-integrante do laboratório da Profa. Irani. Gi, sou eternamente grata por tudo o que me ensinou dentro do laboratório. Tudo o que sei hoje sobre técnicas laboratoriais, devo a você. Obrigada por ter me ensinado como cuidar dos equipamentos, como fazer imuno, como trabalhar no laboratório e especialmente, como dissecar os peixes que escolhi para trabalhar – os imaturos – os quais, no início do meu mestrado, só você era capaz de enxergar a gônada! Gônada esta que aprendi a dissecar e a enxergar, mesmo que o mundo ainda não enxergue nada dentro de um frasquinho com fixador! Se consegui fazer todo este trabalho que aqui se encontra, devo muito a você que me ajudou nos meus primeiros passos da pós-graduação e me ensinou a trabalhar rigorosamente. Além disso tudo, você é uma das minhas melhores amigas, com certeza a melhor amiga que encontrei no mundo universitário. Espero que nossa amizade continue sempre assim! Você sabe o quanto lhe admiro!!!

- Às meninas da Iniciação Científica que tanto me ajudaram no início deste trabalho: Paula Nehring e Laura Migliorini. A vocês, o que posso dizer? Somente agradecer por estarem no lab, auxiliando-me com as técnicas de rotina, mas principalmente, permitindo meu treinamento junto à orientação de vocês. Podem ter certeza de que foi um grande aprendizado para mim. Além disso, agradeço por tudo o que fizeram, porque somente nós sabemos, de fato, o quão exaustivo é trabalhar com cortes seriados, que resultaram em centenas de lâminas histológicas, multiplicando infinitamente o número de lâminas a ser coradas, montadas, analisadas, enfim... Muito obrigada!

- À Paula Nehring. Uma vez eu disse que eu lhe considerava como uma irmã e que nada seria capaz de destruir a amizade que eu sentia por você. Infelizmente, no decorrer do caminho, eu cometi um erro grave e lhe julguei indevidamente. Coisas da vida, que nos levam a cometer erros que a gente se arrepende pelo resto da vida. Graças a Deus, temos a mesma forma de pensar e acabamos por entender que, às vezes, a inveja é capaz de destruir amizades verdadeiras. Mas eu ainda prefiro acreditar que se a amizade é verdadeira, nada é capaz de destruí-la. Por isso, nossa amizade continuou intacta e, por tudo o que passamos, por toda dor que sentimos, hoje eu tenho a mais plena certeza de que nossa amizade é sincera e verdadeira. Não importa o julgamento de ninguém. Para mim, o que importa é a nossa amizade! Obrigada por tudo o que fez por mim, antes e depois!

- Ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural (IB-UNICAMP) pela oportunidade de crescimento profissional, aos meus professores e à secretária do Programa de Pós-Graduação Liliam Alves Senne Panagio por todos os serviços prestados.

- Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq - processo nº 143197/2009-6 e 142281/2012-3) e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - (CAPES/PROAP) pelo apoio financeiro, possibilitando a realização desse trabalho.

- Ao Centro de Microscopia Eletrônica (IBB-UNESP) e aos seus funcionários, pela colaboração no processamento dos materiais, permitindo que pudéssemos realizar as análises ultraestruturais deste trabalho.

- Ao Departamento de Morfologia (IBB-UNESP) por todas as oportunidades de estágios, ao longo desses anos, que significaram extremo aprendizado. Aos funcionários do Departamento, por toda presteza e amizade, em especial à secretária Luciana Cristina Montes e às senhoras D. Terezinha Biondo Sauer e D. Iolanda Teixeira Augostinho.

- Aos Professores do Depto de Morfologia (IBB-UNESP), com os quais pude conviver durante 12 anos, desde meu primeiro ano de graduação quando fui procurar um estágio em Embriologia. Muito obrigada a todos vocês, por todos os ensinamentos!!!!

- À Profa. Dra. Maria Dalva Cesario (IBB-UNESP), minha primeira orientadora, por tudo o que me ensinou nos meus primeiros anos de graduação. Obrigada por toda paciência e por ter guiado meus passos no meu primeiro contato com o mundo científico. Agradeço por ter sido minha professora de Embriologia, disciplina esta que me apaixonei incondicionalmente pela excelente professora que tive, e que acabou por me levar ao Depto de Morfologia, em busca de um estágio, ainda no meu primeiro ano de faculdade. Obrigada também por ter me direcionado a trabalhar com a Profa. Irani na pós-graduação. E, principalmente, por ter se tornado alguém tão especial. Apesar de termos nos distanciado por um tempo, hoje eu sei que sempre que se fizer necessário, eu sempre vou poder contar com você. Obrigada pela amizade durante todos esses anos. E por todas as oportunidades de estágios, trabalhos, aulas, enfim, por ter aproximado ainda mais minha relação com a Embriologia.

- À Profa. Dra. Wilma de Grava Kempinas (IBB-UNESP) por todo aprendizado em estágios em sala de aula, por todas as oportunidades que me ofereceu e pela amizade que se fez!

- Ao Prof. Dr. Cesar Martins (IBB-UNESP) por todos os aquários concedidos no início dos experimentos deste trabalho. E pelas orientações durante uma oportunidade de Bolsa Didática, a qual me trouxe uma imensa experiência em sala de aula.

- Ao Prof. Jorge Jim (*in memoriam*), meu ex-orientador de zoologia durante a graduação, por todos os lindos ensinamentos e especialmente pelas intermináveis conversas em minhas visitas repentinas durante o período da minha pós-graduação. Conversas estas cheias de lições de vida, de histórias fantásticas e conselhos sobre a pós-graduação. Ao senhor, Professor, minha eterna gratidão, admiração e saudades.

- Ao técnico do Laboratório de Biologia da Reprodução de Peixes Neotropicais (IBB-UNESP) Sr. Antônio Vicente Salvador pela presteza durante os trabalhos. Aos técnicos Renato Devidé e Ricardo Teixeira pelo apoio e amizade em momentos difíceis junto à saúde de minha mãe.

- À nova técnica do Laboratório de Biologia da Reprodução de Peixes Neotropicais (IBB-UNESP) Keila Emílio, pela amizade que se fez em tão pouco tempo de convivência, por momentos tão divertidos e descontraídos.

- Ao técnico do Laboratório de Embriologia José Eduardo Bozano, por tudo o que me ensinou ao longo desses anos todos. Se hoje sei trabalhar bem no laboratório e fazer quaisquer adaptações que se façam necessárias, devo isso a você Zé - a arte de inventar, criar, adaptar, fuçar. E se nada disso der certo, sei que sempre posso contar com sua mente mirabolante para resolver os problemas técnicos! Muito obrigada por toda amizade, conversas e apoio! Você sabe o quanto admiro a sua forma de trabalhar!

- Aos membros que compuseram a banca examinadora prévia durante minha qualificação Profa. Dra. Mary Anne Heidi Dolder, Profa. Dra. Renata Guimarães Moreira e Prof. Dra. Laurecir Gomes, pela disponibilidade de participação, pelas correções, sugestões e orientações na análise do trabalho.

- Aos membros titulares da minha banca examinadora, Profa. Dra. Fabiana Laura Lo Nostro, Profa. Dra. Denise Vizziano Cantonnet, Prof. Dr. Luis Antonio Violin Dias Pereira, Profa. Dra. Estela Sasso Cerri e aos membros suplentes Profa. Dra. Mary Anne Heidi Dolder, Profa. Dra. Renata Guimarães

Moreira e Profa. Dra. Laura Satiko Okada Nakaghi pela disponibilidade de participação e paciência em ler este trabalho.

- À Profa. Dra. Denise Vizziano Cantonnet (Universidad de la República, Uruguai) pela oportunidade de estar em seu laboratório, pela oportunidade de parcerias no trabalho com esturjão e por toda ajuda que me ofereceu quando estive em Montevideo. É uma honra poder trabalhar com você. Muito obrigada por aceitar vir ao Brasil para minha defesa!!!

- À amiga Anabel Martinez, por tudo, tudo e tudo o que fez por mim quando estive em Montevideo, não me deixando sozinha nem um único segundo!!! Obrigada por toda companhia, por se preocupar 24h comigo e especialmente por ter nos tornado tão amigas logo no primeiro dia em que nos conhecemos, como se nossa amizade já existisse há anos!!! Ao seu namorado Agustin Campanella, que conseqüentemente fez muito por mim também! Ao Santi, Santiago Di Landro, pelos divertidos momentos no laboratório da Profa. Denise, pelos passeios e companhia. E à Emily Riley, pela companhia nas noites e finais de semana na residência onde me hospedei, pelas conversas e risadas. Obrigada a todos vocês de Montevideo, pela receptividade surpreendente e feliz amizade!!!

- À Profa. Dra. Fabiana Laura Lo Nostro (Universidad de Buenos Aires, Argentina) pela amizade e por todas as conversas e orientações a respeito de diferenciação gonadal durante as vezes em que estive no Brasil. Agora sim sei que “Lo Nostro *et al.*” e “Fabiana” são a mesma pessoa, e é uma honra para mim ter lhe conhecido – alguém com uma alegria tão contagiante!!! Você sabe o quanto lhe admiro!!!

- Ao Prof. Dr. Luis Antonio Violin (IB-UNICAMP), com certeza o professor mais fantástico que já conheci, com suas aulas sempre tão fascinantes e insuperáveis!!! Eu sempre vou lhe admirar e, mais uma vez, afirmo: um excelente profissional; certamente um grande exemplo a ser seguido! Professor, o senhor é alguém simplesmente genial!!!

- Aos amigos e mestres que sempre orientaram meu caminho com as mais belas lições de vida, de amor e de uma força maior, Sra. Guiomar Cardoso, Sra. Maria Amélia Varalta Arioso e especialmente à Dra. Marlene Nobre e amigos do Grupo Espírita Cairbar Schutel. É uma imensa honra conviver com vocês durante todos esses 20 anos. Mesmo que muitas vezes distante, especialmente durante minha pós-graduação, meu pensamento sempre está ligado a vocês!

- Aos meus cães tão queridos, que me acompanharam durante toda graduação e pós-graduação: Sarah, Luna e Bethoven, por todo amor incondicional, pelos momentos de relaxamento, descontração, brincadeiras e por trazerem tantas alegrias. Infelizmente vocês partiram recentemente, deixando uma enorme saudade.... Ainda bem que o filhotão Jorge chegou rápido, trazendo de volta uma imensa bagunça e enorme alegria!!!

- E a você, Albert Kelvin, um amigo mais que especial, um verdadeiro anjo em minha vida, por toda força e apoio diário e pela presença constante nas batalhas da minha vida!!! Obrigada por sempre estar presente, principalmente em momentos como este, de mais uma conquista!!!

A todos vocês, muitíssimo obrigada!!!!!!!!!!!!!!

SUMÁRIO

1. Resumo	01
2. Abstract	03
3. Introdução	05
3.1. A temática de interesse	05
3.2. Revisão Bibliográfica	07
4. Objetivos	23
5. Material e Métodos	25
6. Resultados	37
6.1. Fecundação e o Período Embrionário	37
6.2. Morfogênese Gonadal	38
6.3. Diferenciação Gonadal	42
6.4. Diferenciação Ovariana	44
6.5. Diferenciação Testicular	59
6.6. Detecção de proteínas por Imunohistoquímica durante a Diferenciação Gonadal Feminina e Masculina	80
6.7. Estrutura Testicular dos adultos após a reprodução	83
6.8. Cronologia da diferenciação gonadal	83
6.9. Documentação Fotográfica	84
6.10. Esquemas da Diferenciação Gonadal Masculina	256
7. Discussão	273
8. Conclusões	301
9. Referências Bibliográficas	305
10. Anexo I - Colorações	313
11. Anexo II – Trabalho submetido à Revista Científica	315
12. Anexo III - Protocolo de Comitê de Ética	317

RESUMO

Considerando o status atual de conhecimento da morfogênese e diferenciação gonadal nos Teleostei frente à restrição de informações, especialmente em aspectos tangentes ao estabelecimento do epitélio germinativo e sua relação com a formação da estrutura gonadal tomou-se aqui como modelos biológicos *Tanichthys albonubes*, *Gymnocorymbus ternetzi*, *Corydoras schwartzi*, *Amatitlania nigrofasciata* e *Poecilia reticulata*, representando as séries Otophysi, Percomorpha e Atherinomorpha, visando estabelecer uma análise comparativa da diferenciação gonadal entre as espécies, considerando suas posições na escala filogenética. A proliferação e diferenciação de células germinativas e somáticas a partir do primórdio gonadal em *T. albonubes*, *G. ternetzi*, *C. schwartzi*, *A. nigrofasciata* e *P. reticulata* levam à formação das diferentes estruturas ovarianas e testiculares e à constituição do epitélio germinativo que margeia as lamelas ovígeras e os túbulos/lóbulos testiculares. Nesses animais, o primórdio gonadal é formado por células germinativas primordiais (CGPs) rodeadas por células somáticas. Após sucessivas divisões mitóticas das células somáticas, o tecido gonadal aumenta, originando uma gônada indiferenciada, com as mesmas características morfológicas entre machos e fêmeas de *T. albonubes* e *C. schwartzi*. Em *A. nigrofasciata* e *P. reticulata* grupos de células germinativas e somáticas organizam-se de maneira distintas em machos e fêmeas. Nas gônadas femininas, as CGPs estão distribuídas por todo o tecido gonadal, enquanto que nas masculinas, as CGPs localizam-se na periferia. Na região dorsal das gônadas masculinas de *A. nigrofasciata* e *P. reticulata*, células somáticas organizam-se formando o ducto testicular, enquanto que em *T. albonubes*, *G. ternetzi* e *C. schwartzi* esse é a última estrutura a se formar. Nas gônadas femininas das cinco espécies, os processos envolvidos na diferenciação gonadal, como a foliculogênese, o estabelecimento do epitélio germinativo e a formação da cavidade ovariana são bastante semelhantes. Nas gônadas masculinas, as células somáticas, pré-Sertoli, associam-se às CGPs, formando cistos de espermatogônias; estas proliferam formando conjuntos celulares. Em *T. albonubes* e *A. nigrofasciata* os cistos de espermatogônias que constituem um mesmo conjunto, afastam-se uns dos outros, criando um espaço central, que se torna maior, originando um compartimento luminal, delimitado por cistos de espermatogônias. Formam-se os túbulos e lóbulos testiculares e o epitélio

germinativo masculino é estabelecido. Em *G. ternetzi* o tecido gonadal masculino é estabelecido e organizado em túbulos após a diferenciação gonadal feminina, sobre um ovário previamente desenvolvido, constituindo uma diferenciação gonocorística do tipo indireta. *C. schwartzi* apresenta um tecido gonadal masculino compacto, que sofre degenerações no interior de estruturas acinares compostas por cistos, para constituir os túbulos testiculares. Em *P. reticulata*, os conjuntos de espermatogônias conectam-se ao ducto em formação, originando os primeiros lóbulos testiculares. Ao final da diferenciação gonadal, os testículos de *T. albonubes*, *G. ternetzi* e *C. schwartzi* apresentam espermatogônias distribuídas aleatoriamente no túbulo. Estes anastomosam-se, caracterizando o testículo como tubular anastomosado. Em *P. reticulata*, as espermatogônias ficam restritas na região periférica dos lóbulos, os quais não apresentam lúmen testicular, características estas de um testículo lobular restrito. A mesma distribuição aleatória de cistos nos túbulos dos Otophysi ocorre nos lóbulos testiculares de *A. nigrofasciata*, caracterizando um testículo com organização lobular do tipo irrestrita.

ABSTRACT

Considering the lack of information about the gonadal morphogenesis and differentiation in Teleostei, especially in tangent aspects concerning the establishment of the germinal epithelium and its relation with the formation of the gonadal structure, in the present study, it was taken *Tanichthys albonubes*, *Gymnocorymbus ternetzi*, *Corydoras schwartzi*, *Amatitlania nigrofasciata* and *Poecilia reticulata* as biological models, representing the series Otophysi, Percomorpha and Atherinomorpha, to establish a comparative analysis of the gonadal differentiation among the species, taking into account their position in the phylogenetic scale. The proliferation and differentiation of germ and somatic cells from the gonadal primordium of the *T. albonubes*, *G. ternetzi*, *C. schwartzi*, *A. nigrofasciata* and *P. reticulata* lead to the formation of different testicular and ovarian structures and to the formation of the germinal epithelium of the ovigerous lamellae and the testicular lobules/tubules. In these animals, the gonadal primordium is formed by primordial germ cells (PGCs) surrounded by somatic cell. After successive mitotic divisions of the somatic cells, the gonadal tissue increases, resulting in a undifferentiated gonad, with the same morphological characteristics between males and females of *T. albonubes* and *C. schwartzi*. In *A. nigrofasciata* and *P. reticulata* groups of germ and somatic cells organize distinctly in males and females. In the female gonads, the PGCs are distributed throughout the gonadal tissue. In the male, the PGCs are located in the periphery. In the dorsal region of the male gonads of *A. nigrofasciata* and *P. reticulata* somatic cells are organized forming the testicular duct, whereas at *T. albonubes*, *G. ternetzi* and *C. schwartzi* this is the last structure formed. In female gonads of the five species, the processes involved in gonadal differentiation, such as folliculogenesis, the establishment of the germinal epithelium and the formation of the ovarian cavity are quite similar. In male gonads, the somatic cells, pre-Sertoli, associate to the PGCs forming cysts of spermatogonia; these proliferate and form clusters. In *T. albonubes* and *A. Nigrofasciata*, the cysts of the spermatogonia, which form a single cluster, move away from each other, creating a central space, which becomes greater, originating a luminal compartment, delimited by cysts of spermatogonia. Thus, testicular tubules and lobules are formed and male germinal epithelium is established. In *G. Ternetzi*, the male gonadal tissue is established and organized in tubules after the female gonadal

differentiation on an ovary previously developed, constituting an indirect gonochoristic differentiation. *C. schwartzi* presents a compact male gonadal tissue, which undergoes degeneration within acinar structures composed of cysts, forming the testicular tubules. In *P. reticulata*, the clusters of spermatogonia connect to the duct in formation, originating the first testicular lobules. At the end of gonadal differentiation, the testis from *T. albonubes*, *G. ternetzi* and *C. schwartzi* present spermatogonia, distributed along the tubule. These anastomose, characterizing the testis as anastomosing tubular. In *P. reticulata*, the spermatogonia are restricted at the periphery of the lobules, which do not have lumen, features of a restricted lobular testis. The same random distribution of cysts in the tubules of the Otophysi occurs in testicular lobules of *A. nigrofasciata*, featuring a testis with unrestricted lobular organization.

INTRODUÇÃO

I. A TEMÁTICA DE INTERESSE

A transição evolutiva entre os Teleostei mais basais e mais derivados é marcada por inúmeras modificações morfo-fisiológicas entre os diversos grupos de animais. Com base nessas mudanças, Fink, em 1981, considerou que a evolução entre os Teleostei poderia envolver diversas condições pedomórficas ao longo do processo evolutivo, uma vez que adultos de Teleostei mais derivados apresentam caracteres presentes em estágios iniciais do desenvolvimento de Teleostei basais. Assim, considerando essa condição pedomórfica, Parenti e Grier (2004) descrevem uma hipótese propondo que a ocorrência de mudanças morfológicas no epitélio germinativo das gônadas de peixes mais basais, durante o seu ciclo reprodutivo anual, teriam levado à formação de tipos distintos de gônadas hoje existentes em animais mais derivados.

O conceito de epitélio germinativo foi desenvolvido a partir de estudos realizados com Perciformes, considerado mais derivados dentre os Teleostei (Grier e Lo Nostro, 2000; Grier, 2000; 2002) e pouco a pouco vem sendo aplicado aos Teleostei mais basais, como os Ostariophysi. O epitélio germinativo, fonte de renovação celular, assegura e mantém a continuidade da gametogênese em peixes, tornando-se permanentemente ativo a partir da finalização do processo de diferenciação gonadal. Nas últimas décadas os estudos de Grier e colaboradores sobre a dinâmica do epitélio germinativo propiciaram um novo entendimento dos eventos cíclicos de desenvolvimento gonadal pelos quais os machos (Grier e Taylor, 1998; Grier e Lo Nostro, 2000; Grier, 2002) e as fêmeas (Grier, 2000, 2002; Grier *et al.*, 2005; 2007) dos Teleostei passam ao longo da vida reprodutiva. Esses estudos vêm sendo realizados com animais sexualmente adultos em diferentes grupos de Teleostei mais basais ou mais derivados, dentro de uma escala evolutiva. Porém, deixam uma lacuna no que se refere ao conhecimento da formação do próprio epitélio nesses diferentes grupos de Teleostei, que apresentam padrões de organização gonadal tão diferentes entre si e que aqui foram estudados.

O desenvolvimento gonadal e a diferenciação sexual vêm sendo bastante estudados nas últimas décadas, principalmente em representantes dos Acanthopterygii especialmente em Perciformes (Meijide *et al.*, 2005). Entre os Ostariophysi, os estudos mais detalhados sobre a

morfogênese e diferenciação gonadal referem-se aos Cypriniformes (Parmentier e Timmermans, 1985; Winkoop e Timmermans, 1992; Winkoop *et al.*, 1992), porém, em ambos os grupos, em sua maioria, são anteriores à apreensão do significado do estabelecimento do epitélio germinativo durante o processo de diferenciação gonadal.

Neste sentido, seguindo como modelo os relatos já existentes da formação do epitélio germinativo no Otophysi, *Cyprinus carpio* (Cypriniformes), durante a diferenciação gonadal (Mazzoni, 2009; Mazzoni *et al.*, 2010), o presente estudo acompanhou através de secções histológicas seriadas transversais, longitudinais e parassagittais, a formação do primórdio gonadal e da gônada em diferenciação em três grupos distintos de Teleostei (Otophysi, Atherinomorpha e Percomorpha), visando a construção de modelos sobre a diferenciação gonadal, a partir de uma análise comparativa sobre o estabelecimento do epitélio germinativo durante a morfogênese e diferenciação gonadal em diferentes grupos de Teleostei, bem como traçar um paralelo entre estas relações e os padrões evolutivos, dados estes, até então, inexistentes na literatura.

Posto isso, o presente estudo é de suma importância para o entendimento da biologia reprodutiva de peixes, uma vez que os dados obtidos para os grupos aqui representados podem ser extrapolados para inúmeras espécies de Teleostei, visto que cada qual representa um padrão gonadal, sendo este característico de espécies mais basais ou mais derivadas. O estudo básico e o conhecimento morfológico da diferenciação gonadal, em condições normais de desenvolvimento permitem sua aplicabilidade tanto no controle e manipulação da reprodução, importantes economicamente na aquicultura, como na experimentação animal, seja na experimentação de modelos biológicos ou em estudos de ordem ecotoxicológica, fisiológica, farmacológica, genética e molecular. Os estudos e experimentação utilizando os peixes como modelo biológico vem crescendo nos últimos anos dada a facilidade de manipulação seja de ovos, embriões, larvas ou adultos, os quais vêm apresentando excelentes resultados, constituindo uma ferramenta bastante promissora em diversas áreas da biologia. Portanto, o conhecimento básico para sua aplicabilidade torna-se um elemento indispensável nestes novos estudos.

II. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1. *Os Teleostei*

Os peixes representam aproximadamente 50% dos vertebrados, ocupando os mais diversos ambientes aquáticos, sendo que, destes, 96% correspondem aos Teleostei (Vazzoler, 1996). Os Teleostei ocorrem em uma grande diversidade de habitat, estando submetidos às diferentes condições ambientais, constituindo, assim, um grupo extremamente heterogêneo em termos de anatomia, comportamento e ecologia (Nakatani *et al.* 2001).

Dentre os Teleostei, os Euteleostei compreendem os Ostariophysii, Protacanthopterygii e Neoteleostei (Fig. I). A superordem Ostariophysii, considerada mais basal entre os Euteleostei, representa cerca de três quartos dos peixes de água doce do mundo, sendo a segunda maior superordem de peixes (Nelson, 2006). É constituída pelas séries Anatophysii (Gonorynchiformes) e Otophysii, a qual reúne as ordens Cypriniformes, Characiformes, Siluriformes, Gymnotiformes e (Fink e Fink, 1981; Nelson, 2006) (Figs. I,II).

Já os Neoteleostei dividem-se em Stenopterygii, Scopelomorpha, Paracanthopterygii e Acanthopterygii, sendo os dois últimos grupos, os mais derivados. Entre estes, destaca-se a superordem Acanthopterygii com mais da metade de todas as famílias de peixes. Esta superordem é dividida nas séries Atherinomorpha, Mugilomorpha e Percomorpha (Nelson, 2006). Enquanto os Atherinomorpha distribuem-se em três ordens - Beloniformes, Cyprinodontiformes e Atheriniformes, sendo Cyprinodontiformes a maior delas, os Percomorpha dividem-se em Tetraodontiformes, Pleuronectiformes, Perciformes, Scorpaeniformes, Synbranchiformes, Gasterosteiformes, Zeiformes, Beryciformes e Stephanoberyciformes. Dentre estas, destacam-se os Perciformes com a maior diversidade entre todas as ordens de peixes, sendo também a maior ordem entre os vertebrados (Nelson, 2006) (Fig. I).

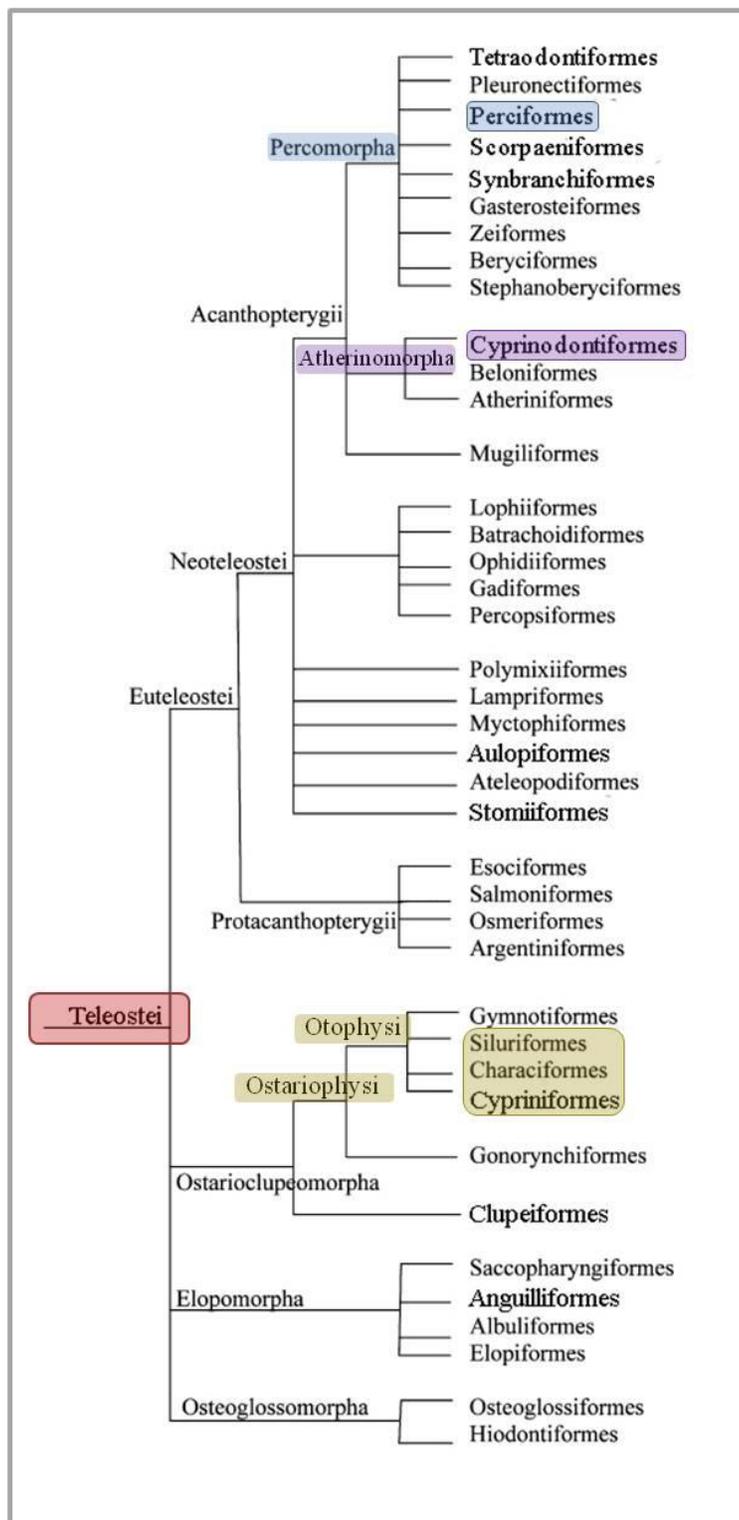


Fig. I: Filogenia dos Teleostei, mostrando, em destaque, os grupos analisados neste trabalho (modificado de Nelson, 2006).

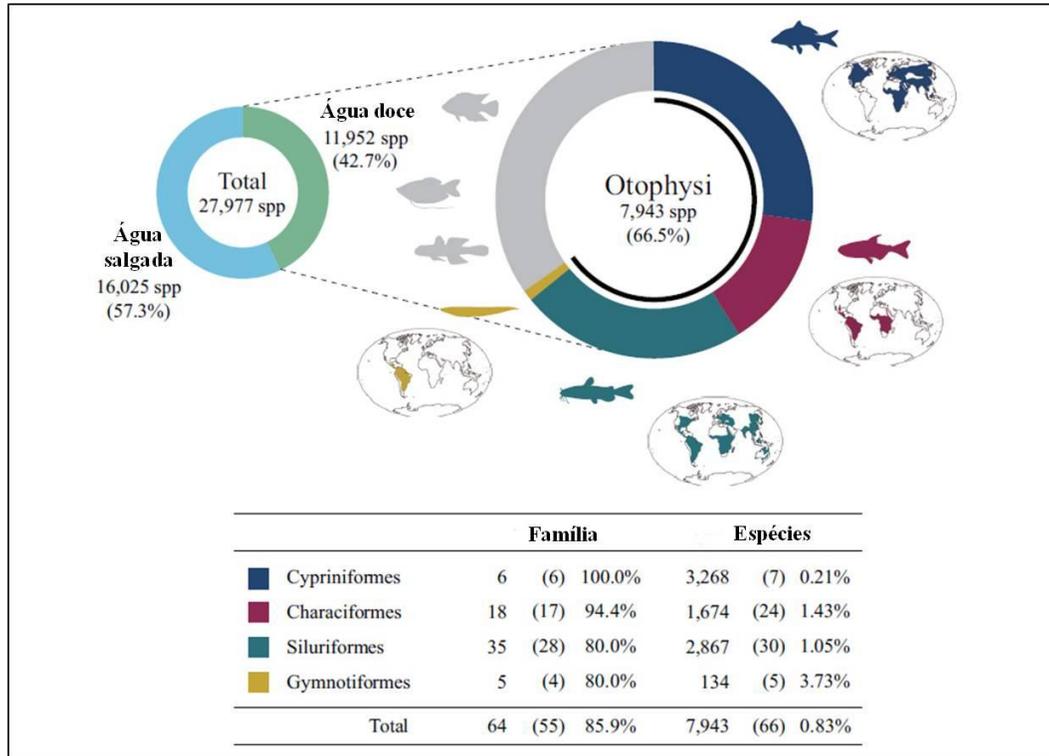


Fig. II: Diversidade de espécies e distribuição geográfica dos Otophysi (Nelson, 2006): número de famílias e espécies para as quatro ordens (traduzido de Nakatani *et al.*, 2011).

2. Aspectos da Biologia Reprodutiva dos Teleostei

Os Teleostei, em sua maioria, são predominantemente dióicos (Nagahama, 1983), porém em algumas famílias como Serranidae, Sparidae, Labridae e Synbranchidae o hermafroditismo e a reversão sexual podem ser frequentes (Hoar, 1969; Redding e Patiño, 1993; Le Gac e Loir, 1999; Lo Nostro, 2000; Sadovy de Mitcheson e Liu, 2008).

Na maioria das espécies, a reprodução é cíclica e sazonal, determinando uma série de modificações morfo-fisiológicas em suas gônadas (Nagahama, 1983). Seu ciclo reprodutivo ocorre em função da variação das condições ambientais, sendo a temperatura e o fotoperíodo considerados os mais potentes moduladores da atividade reprodutiva (Billard, 1986).

Os Teleostei apresentam diversas estratégias reprodutivas (Nagahama, 1983; Vazzoler, 1996; Nakatani *et al.*, 2001). Dentre estas, incluem-se mecanismos como a liberação dos gametas no ambiente aquático para a fertilização externa até estratégias mais complexas, como

o desenvolvimento de órgãos especializados para a fertilização interna, seguida da liberação dos ovos fertilizados ou ainda gestação interna dos embriões (Le Gac e Loir, 1999, Moreira *et al.*, 2001).

Certas espécies apresentam cuidado parental com a prole (ver Blumer, 1982) levando à redução da predação e aumento da sobrevivência de seus descendentes (Baylis, 1981). *Betta splendens*, *Colisa lalia* e outras espécies da família Anabantidae (Perciformes) constroem ninhos de bolhas, nos quais os ovos são depositados após a fertilização (Riehl e Baensch, 1991). Outras espécies não possuem cuidado parental e apenas liberam seus milhares de ovos no ambiente. Estes só terão sucesso em seu desenvolvimento caso haja condições favoráveis à sua sobrevivência.

Em algumas espécies, como em *Cyprinus carpio*, os ovos produzidos apresentam proteínas específicas associadas a sua camada externa, que em contato com a água torna-os adesivos, podendo fixar-se em diferentes substratos (Mansour *et al.*, 2009). Outras espécies produzem ovos pelágicos, sem adesividade que são levados pela correnteza (Moreira *et al.*, 2001). A densidade desses ovos é bastante variável entre as espécies. *Danio rerio*, por exemplo, produz ovos densos que caem e se depositam junto ao substrato (ovos demersais); outras espécies produzem ovos de baixa densidade que flutuam ou na coluna d'água (Labeos - Cyprinidae) ou próximos à superfície, como os ovos de *Ctenopharyngodon idella* (Kunz, 2004).

3. Determinação Sexual

Nos Teleostei a determinação sexual e a diferenciação gonadal são controladas por fatores genéticos, fisiológicos e comportamentais (Baroiller e D'Cotta, 2001; Devlin e Nagahama, 2002; Munoz e Warner, 2003; Perry e Grober, 2003; Frisch, 2004). O sexo genético do embrião é determinado no momento da fertilização pela combinação dos cromossomos provenientes dos gametas feminino e masculino, sendo a determinação sexual definida como a soma dos genes responsáveis pela formação das gônadas e de suas características (Piferrer, 2001). Esses genes estão espalhados pelo genoma ou concentrados em cromossomos responsáveis pela determinação do sexo - XX/XY, ZZ/ZW, X₁X₁X₂X₂/X₁X₂Y, XX/XY₁Y₂, ZZ/ZW₁W₂ (Devlin e Nagahama, 2002). A determinação e diferenciação sexual

resultam, portanto, de uma complexa rede de interconexões entre esses genes, ainda não bem esclarecida, podendo haver interações antagônicas, regulações positivas ou negativas e ainda acentuações ou atenuações da expressão gênica. Neste aspecto, o controle genético é um dos principais determinantes do sexo, mas fatores ambientais, como temperatura, fotoperíodo, salinidade, também possuem grande influência no processo, determinando o sexo fisiológico dos peixes (Strüssmann *et al.*, 1996; Cesar *et al.*, 2005).

A maioria dos Teleostei é dióica ou gonocorística, ou seja, apresenta indivíduos com sexos separados. Estes peixes podem apresentar dois tipos de desenvolvimento gonadal, sendo classificados como gonocorísticos indiferenciados ou diferenciados. Nos gonocorísticos indiferenciados, a gônada indiferenciada inicia seu desenvolvimento assemelhando-se a um ovário e, posteriormente, parte dos indivíduos torna-se macho enquanto a outra se mantém como fêmea. Já nos gonocorísticos diferenciados, a gônada diferencia-se diretamente em um testículo ou em um ovário (Yamamoto, 1969). As espécies gonocorísticas que apresentam intersexo são, na maior parte, gonocorísticos indiferenciados, enquanto que, dentre os gonocorísticos diferenciados, a taxa de intersexo é quase nula (Yamamoto, 1969; Sadovy de Mitcheson e Liu, 2008). Portanto, no início da embriogênese, o sexo dos peixes não está definido morfológicamente, já que não possui gônadas diferenciadas em testículos ou ovários, nem nenhuma outra característica associada ao sistema reprodutor desenvolvida. Possui apenas precursores embriológicos que darão origem aos ovários e testículos: as células germinativas primordiais e as células somáticas. Neste estágio de desenvolvimento, estas células são pluripotentes, podendo dar origem a gônadas masculinas ou femininas. Em determinado momento durante o desenvolvimento gonadal, através de sinalização química hormonal, a gônada diferencia-se em ovário ou testículo. Uma vez que isso ocorra e o tecido gonadal complete sua diferenciação, o peixe torna-se fisiologicamente macho ou fêmea (Cesar *et al.*, 2005).

4. Morfogênese e Diferenciação Gonadal

Nos Teleostei, assim como nos outros vertebrados, as células germinativas primordiais diferenciam-se a partir de células do saco vitelino, partindo de regiões extragonadais, e migram para a crista genital durante o desenvolvimento embrionário (Nakamura *et al.*, 1974;

Foyle, 1993; Braat *et al.*, 1999a; Molyneaux e Wylie, 2004; Otani *et al.*, 2005). A crista genital é formada por um espessamento da mesoderme intermediária, que se projeta ventralmente para a cavidade celomática do embrião sendo delimitada por um mesotélio (Devlin e Nagahama, 2002; Otani *et al.*, 2005).

De origem embriológica ainda incerta, as células germinativas primordiais já foram descritas como tendo procedência mesodérmica em *Barbus conchoni* (Gevers *et al.*, 1992), e também endodérmica em *Oryzias latipes* (Hamaguchi, 1982), ambas oriundas do saco vitelino. Identificações recentes do gene *vasa* em algumas espécies de peixes como em *Danio rerio* (Yoon *et al.*, 1997), entretanto, permitem sua localização exata no tecido embrionário, bem como o acompanhamento do processo de migração das células germinativas (Braat *et al.*, 1999b). O gene *vasa* codifica uma RNA helicase ATP-dependente que pertence à família de proteínas DEAD-box (Asp-Glu-Ala-Asp) e é expressa especificamente nas células germinativas, seja em vertebrados ou invertebrados (ver Jia *et al.*, 2009 para revisão). Dessa forma, *vasa* constitui o principal marcador genético para células germinativas (Braat *et al.*, 1999b).

Ao migrarem para a crista genital, as células germinativas primordiais dispõem-se entre as células somáticas e proliferam por mitose constituindo o primórdio gonadal (Patiño e Takashima, 1995; Braat *et al.*, 1999a; Kobayashi *et al.*, 2000). Durante o período de morfogênese, portanto, o primórdio gonadal é formado; aumenta em comprimento por proliferação mitótica de suas células e origina uma gônada indiferenciada (Strüssmann *et al.*, 1996; Lin *et al.*, 1997; Meijide *et al.*, 2005; Mazzoni *et al.*, 2010). Esta por sua vez, passa por uma série de modificações estruturais determinando a formação de uma gônada feminina ou masculina. Assim, a diferenciação gonadal nos Teleostei inclui mudanças tanto nas células somáticas, quanto nas células germinativas (Strüssmann e Nakamura, 2002), como divisões mitóticas de oogônias ou espermatogônias a partir das células germinativas primordiais (García-Alonso *et al.*, 2009), até mudanças estruturais, incluindo proliferação mitótica das células somáticas. Como resultado, tem-se a formação da cavidade ovariana, e de ductos espermáticos e lóbulos testiculares que darão origem aos ovários e testículos, respectivamente (Patiño e Takashima, 1995; Nakamura *et al.*, 1998; Strüssmann e Nakamura, 2002).

Algumas características histológicas como intensa proliferação mitótica das células germinativas, entrada das células germinativas em meiose (Mazzoni *et al.*, 2010) e reorganização das células somáticas formando uma cavidade ovariana indicam o início da diferenciação gonadal feminina (Nakamura *et al.*, 1998; Strüssmann e Nakamura, 2002; García-Alonso *et al.*, 2009).

Já nos pressupostos testículos, um dos primeiros sinais histológicos da diferenciação gonadal é o início da formação do ducto espermático (Nakamura *et al.*, 1998; Strüssmann e Nakamura, 2002), seguido pelo aparecimento de vasos sanguíneos e formação dos lóbulos testiculares (Patiño e Takashima, 1995; Nakamura *et al.*, 1998; Strüssmann e Nakamura, 2002). Em animais que apresentam, entretanto, testículos com organização do tipo tubular anastomosada, como *Cyprinus carpio*, o ducto espermático é a última estrutura a se formar, sendo o início da diferenciação gonadal marcada por uma reorganização das células germinativas e somáticas, culminando com o estabelecimento do epitélio germinativo (Mazzoni, 2009).

Em estágios mais avançados da diferenciação ovariana, com a entrada em meiose, as oogônias originam os oócitos e células somáticas presentes nas gônadas diferenciam-se em células pré-foliculares (Nakamura *et al.*, 2006; Saito *et al.*, 2007; Nakamura *et al.*, 2008). Do estroma ovariano, células mesenquimais diferenciam-se em células tecais (Wallace e Selman 1990; Grier, 2000; Grier *et al.*, 2007; Grier *et al.*, 2009; Mazzoni *et al.*, 2010). No testículo, as células somáticas que envolvem as espermatogônias diferenciam-se em células de Sertoli (Grier *et al.*, 2005; Meijide *et al.*, 2005, Grier e Uribe, 2009; Mazzoni, 2009). No interstício notam-se fibroblastos, células mióides, fibrilas de colágeno, granulócitos e capilares sanguíneos (Meijide *et al.*, 2005).

5. O Epitélio Germinativo

O epitélio germinativo é definido a partir das mesmas características histológicas que determinam qualquer outro tipo de epitélio somático (Grier, 2000, 2002; Grier e Lo Nostro, 2000), ou seja, deve delimitar uma cavidade ou superfície do corpo estando, obrigatoriamente, voltado para uma luz; apresentar complexos juncionais, que conectem lateralmente uma célula epitelial à outra; estar apoiado sobre uma membrana basal e ser avascular (Grier, 2000, 2002;

Grier e Lo Nostro, 2000). Porém o epitélio germinativo apresenta uma característica única que o diferencia dos demais epitélios: a presença de células germinativas, garantindo a produção contínua dos gametas (Grier, 2000, 2002; Grier e Lo Nostro, 2000). Deste modo, o epitélio germinativo nos Teleostei é constituído por células somáticas e células germinativas, que revestem os túbulos testiculares e as lamelas ovígeras nas gônadas masculina e feminina, respectivamente, delimitando o lúmen testicular e ovariano (Grier e Taylor, 1998; Grier e Lo Nostro, 2000; Grier, 2000, 2002; Parenti e Grier, 2004; Grier *et al.*, 2007; Grier e Uribe, 2009).

6. Estrutura Ovariana

Na maioria dos Teleostei, os ovários são órgãos pares, saculiformes, localizados no sentido longitudinal e dorsalmente à cavidade celomática, na qual estão presos através do mesovário. Porém, em alguns grupos, durante o desenvolvimento gonadal, os ovários podem fundir-se em um órgão único (Strüssmann e Nakamura 2002), como na maioria dos Teleostei vivíparos, por exemplo, os Poecilídeos (Grier *et al.*, 2009), ou ainda, um dos ovários pode degenerar. Em ambos os casos somente um ovário torna-se funcional (Nagahama, 1983).

Há dois tipos de organização ovariana: Cisto-ovariana e Gymno-ovariana. Na organização do tipo Cisto-ovariana (Hoar, 1969), os ovários são órgãos cavitários e apresentam o compartimento germinativo em forma de lamelas, que se projetam a partir da cápsula em direção à luz do órgão. Neste caso, a cavidade ovariana é contínua com os gonoductos (Grier *et al.*, 2007) que se unem caudalmente e desembocam na papila urogenital (Nagahama, 1983; Selman e Wallace, 1986; Connaughton e Aida, 1998; Helfman *et al.*, 2000; Grier *et al.*, 2007). Já na organização do tipo Gymno-ovariana, como nos Anguiliformes (Colombo *et al.* 1984) e Salmoniformes (Grier *et al.*, 2007) os ovários apresentam lamelas ovígeras expostas diretamente para cavidade celomática. Dessa forma, durante a oocitação, os oócitos maduros são liberados diretamente na cavidade celomática (Helfman *et al.*, 2000).

6.1. O Epitélio Germinativo Feminino e a Foliculogênese

O epitélio germinativo feminino é composto por dois tipos celulares: as células somáticas epiteliais e as células germinativas. As células epiteliais, unidas por desmossomos e

junções de oclusão, estão apoiadas sobre uma membrana basal e espalhadas entre elas encontram-se as células germinativas (Grier, 2000).

Após a diferenciação sexual e no início de cada ciclo reprodutivo, as células-tronco presentes no epitélio germinativo feminino dividem-se várias vezes por mitose (Saito *et al.*, 2007; Nakamura *et al.*, 2008). Assim se auto-renovam e/ou diferenciam-se em oogônias que se reúnem em conjuntos ou ninhos. Nos ninhos, as oogônias que se comprometem com a foliculogênese entram em meiose dando origem aos oócitos que avançam para a prófase da primeira divisão (Grier, 2000; Le Menn *et al.*, 2007; Grier *et al.*, 2009; Lubzens *et al.*, 2010), formando um cisto de oócitos profásicos (Mazzoni *et al.*, 2010; Nakamura *et al.*, 2010; Quagio-Grassiotto *et al.*, 2011). No interior do cisto, observam-se pontes citoplasmáticas entre os oócitos (Le Menn *et al.*, 2007; Saito *et al.*, 2007; Mazzoni *et al.*, 2010; Quagio-Grassiotto *et al.*, 2011), resultantes de uma citocinese incompleta. Com a entrada e permanência em diplóteno, os oócitos podem agora se desenvolver. O desenvolvimento oocitário que tem início ainda nos cistos continua no interior dos folículos ovarianos. Na formação dos folículos ovarianos as células pré-foliculares progressivamente interpenetram nos cistos e envolvem cada oócito individualizando-os (Le Menn *et al.*, 2007; Grier *et al.*, 2009; Mazzoni *et al.*, 2010). Nesta fase, os cromossomos plumosos tornam-se visíveis (Nagahama, 1983; Selman e Wallace, 1989; Mazzoni *et al.*, 2010).

Células epiteliais oriundas do epitélio germinativo associam-se aos oócitos em diplóteno. Agora como células pré-foliculares, envolvem, numa camada única, cada oócito em particular e constituem o epitélio folicular. Sintetizam a membrana basal que progressivamente envolve o folículo em formação o qual permanece unido ao epitélio germinativo (Grier, 2000, 2002; Le Menn *et al.*, 2007; Grier *et al.*, 2009; Lubzens *et al.*, 2010; Mazzoni *et al.*, 2010). As células pré-foliculares assentadas em parte na membrana basal do próprio epitélio germinativo mantêm no folículo ovariano uma região de contato e a membrana basal é compartilhada com o epitélio germinativo (Grier *et al.*, 2007; Grier *et al.*, 2009; Mazzoni *et al.*, 2010; Quagio-Grassiotto *et al.*, 2011). A partir do conjuntivo circundante, células pré-tecais dispõem-se ao redor do folículo em formação, sobre a membrana basal recém-sintetizada, e dão origem às células da teca (Le Menn *et al.*, 2007; Grier *et al.*, 2009; Lubzens *et al.*, 2010; Mazzoni *et al.*, 2010). Completa-se, assim a formação

do complexo folicular, constituído pelo oócito diplotênico, envolto sequencialmente pelo epitélio folicular apoiado na membrana basal e pelas células da teca (Grier, 2000, 2002; Grier e Lo Nostro, 2000; Grier *et al.*, 2009). Uma vez que o folículo ovariano esteja formado, ou seja, que o processo de foliculogênese se complete, o oócito inicia efetivamente o crescimento primário (Patiño e Sullivan, 2002; Grier *et al.*, 2009; Lubzens *et al.*, 2010) e a partir daqui, os oócitos estarão prontos para responder aos estímulos que conduzem à incorporação de vitelo, maturação e posterior ovulação (Le Menn *et al.*, 2007; Grier *et al.*, 2009; Lubzens *et al.*, 2010).

7. Estrutura Testicular

Na maioria dos Teleostei, os testículos são órgãos pares, alongados, localizados longitudinal e dorsalmente à cavidade celomática. Podem variar de simples bolsas alongadas que convergem para a papila urogenital, a órgãos foliáceos com função predominantemente espermatogênica, contendo regiões diferenciadas com função secretora ou armazenadora de esperma (Loir *et al.*, 1989; Burns *et al.*, 1995; Le Gac e Loir, 1999; Javonillo *et al.*, 2007).

A estrutura testicular nos Teleostei é classificada de acordo com a forma e organização do compartimento germinativo (Grier, 1993; Parenti e Grier, 2004). Há, portanto, dois tipos de organização testicular: Tubular Anastomosado e Lobular (Grier, 1993; Parenti e Grier, 2004).

No testículo tubular anastomosado (Fig. III), o compartimento germinativo é formado por alças e túbulos que se interconectam, formando anastomoses, desde a periferia até a região do ducto testicular (Grier, 1993; Grier e Uribe, 2009). Neste, as espermatogônias encontram-se distribuídas por todo testículo. Esse padrão testicular ocorre principalmente nos Teleostei mais basais, como por exemplo, nos Ostariophysii (Grier, 1993; Parenti e Grier, 2004).

Já no testículo lobular (Fig. IV), o compartimento germinativo, em formato digitiforme, termina em fundo cego na periferia testicular, ocorrendo nos Acanthopterygii (Percomorpha e Atherinomorpha) (Grier, 1993; Parenti e Grier, 2004; Grier e Uribe, 2009). Neste padrão é possível distinguir dois tipos de organização, de acordo com a distribuição das espermatogônias ao longo dos lóbulos – lobular irrestrito (Fig. IV a, c) e lobular restrito (Fig. IV b, d) (Grier, 1993; Parenti e Grier, 2004; Grier e Uribe, 2009). No testículo lobular irrestrito, presente nos Percomorpha, as espermatogônias estão distribuídas ao longo de todo

lóbulo (Grier, 1993; Parenti e Grier, 2004; Grier e Uribe, 2009). No testículo lobular restrito, característico dos Atherinomorpha, as espermatogônias estão confinadas na porção distal dos lóbulos, formando cistos. Durante a espermatogênese, os cistos de células germinativas em diferenciação são deslocados ao longo dos lóbulos. Ao final da espermiogênese, os cistos se abrem e os espermatozóides são liberados no ducto eferente (Grier *et al.*, 1980; Grier, 1993; Loir *et al.*, 1995; Pudney, 1995; Grier e Uribe, 2009).

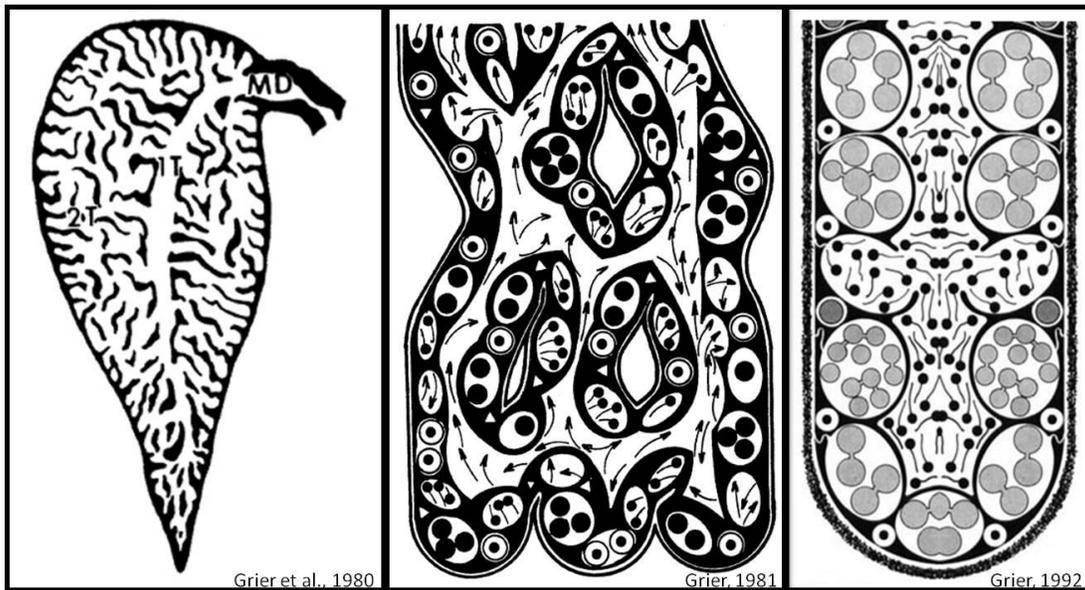


Fig. III: Testículo tubular anastomosado, mostrando detalhes da distribuição das células germinativas no epitélio germinativo.

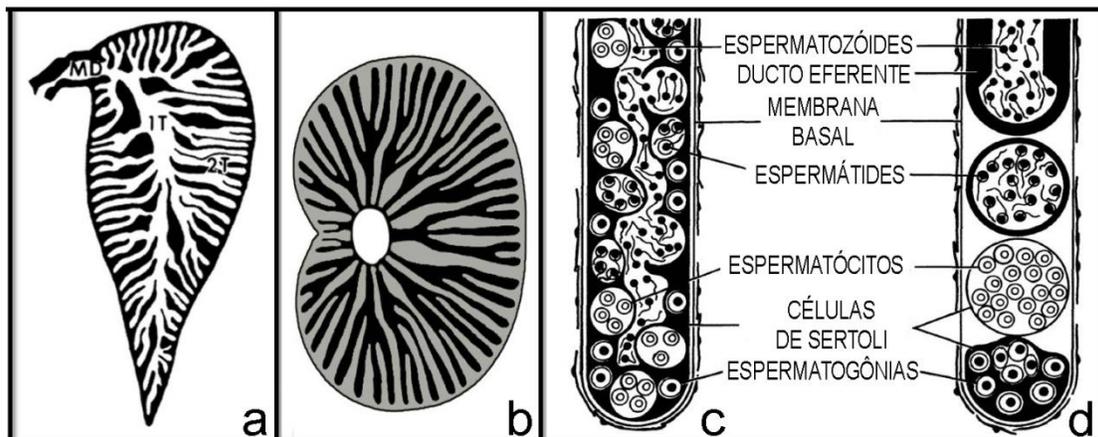


Fig. IV: Testículo lobular irrestrito (a,c) e restrito (b,d), mostrando detalhes da distribuição das células germinativas no epitélio germinativo (adaptado de Grier *et al.*, 1980).

7.1. O Epitélio Germinativo Masculino e a Espermatogênese

O epitélio germinativo masculino é composto, assim como o epitélio germinativo feminino, por dois tipos celulares: as células germinativas e as células somáticas (células de Sertoli), as quais estão unidas por complexos juncionais e apoiadas sobre a membrana basal (Grier, 2000).

Células-tronco da linhagem espermatogonial, presentes nos testículos, dividem-se, e auto renovam-se, dando origem às espermatogônias destinadas à espermatogênese (Schulz e Miura, 2002; Schulz, 2003; Schulz *et al.*, 2010). Cada espermatogônia é envolvida individualmente por processos citoplasmáticos das células de Sertoli formando um cisto. Em um mesmo cisto, o desenvolvimento celular é sincrônico. Dessa forma, a produção dos gametas masculinos ocorre, em geral, no interior dos cistos, no epitélio germinativo que reveste o compartimento seminífero testicular (Grier, 1981; 2002; Billard, 1986; Pudney, 1995; Guraya, 2001; Grier e Uribe, 2009; Schulz *et al.*, 2010). No interior de cada cisto, as espermatogônias A-indiferenciadas proliferam, originando espermatogônias B-diferenciadas (Schulz *et al.*, 2010). Estas entram em meiose e dão origem aos espermatócitos primários. A meiose progride originando os espermatócitos secundários. Com o término da meiose ocorre formação das espermatídes e através da espermiogênese, ainda no interior dos cistos, as espermatídes haplóides completam sua diferenciação (Grier, 1981, 1992; Billard, 1986; Selman e Wallace, 1986; Grier e Uribe, 2009; Schulz *et al.*, 2010). Durante as subseqüentes divisões celulares as citocineses são incompletas e as células germinativas permanecem interligadas por pontes citoplasmáticas. Ao final da espermiogênese as pontes citoplasmáticas e o citoplasma residual são eliminados. Os cistos abrem-se e os espermatozóides são liberados para o lúmen testicular (Grier, 1981; Billard, 1986; Selman e Wallace, 1986; Schulz *et al.*, 2010). Menos comum é a espermatogênese semi-cística. Presente em alguns grupos de peixes, esta é caracterizada pela abertura dos cistos logo após o término da meiose com a diferenciação das espermatídes ocorrendo na luz dos túbulos seminíferos (Mattei *et al.*, 1993; Grier e Uribe, 2009; Schulz *et al.*, 2010 para revisão).

No epitélio germinativo, as células de Sertoli unem-se através de complexos juncionais, inúmeros desmossomos e formam a barreira hemato-testicular, propiciando, assim, um ambiente estrutural e molecular favorável para o desenvolvimento da espermatogênese

(Grier, 1993; Pudney, 1993; Loir *et al.*, 1995; Schulz *et al.*, 2010), sendo responsáveis pela secreção de vários fatores de crescimento que atuam na proliferação e/ou diferenciação das células germinativas (Miura, 1998; Le Gac e Loir, 1999; Schulz *et al.*, 2010).

8. A expressão da Aromatase nos Teleostei

A enzima aromatase participa da biossíntese de esteróides nos Teleostei, sendo responsável pela conversão da testosterona em 17 β -estradiol (Nagahama, 1994; Devlin e Nagahama, 2002). A expressão da aromatase nos peixes não se restringe apenas às gônadas femininas (Devlin e Nagahama, 2002). Os Teleostei apresentam duas cópias do gene *Cyp19*, sendo uma expressa essencialmente nas gônadas (*Cyp19a*) e a outra no cérebro (*Cyp19b*) (ver Blázquez e Somoza, 2010 para revisão). Embora possa influenciar na diferenciação sexual, os dados ainda são controversos, variando entre as espécies. Porém, estudos realizados a partir da inibição da expressão do gene *Cyp19a1* (Vizziano, *et al.* 2008), durante a diferenciação sexual, mostram a ocorrência da masculinização dos indivíduos, sugerindo que a aromatase possa estar correlacionada com a diferenciação gonadal feminina, uma vez que está envolvida na produção de estrógeno, sendo este crucial para a formação dos ovários (Devlin e Nagahama, 2002; Blázquez e Somoza, 2010).

9. As Células Esteroidogênicas

Nos testículos dos Teleostei, o compartimento intersticial é constituído por elementos de tecido conjuntivo, vasos sanguíneos, células sanguíneas, fibroblastos, nervos, células mióides e células de Leydig (Grier *et al.*, 1989; Loir, 1990; Cauty e Loir, 1995; Loir *et al.*, 1995; Pudney, 1996, 1998; Schulz *et al.*, 2010). As células de Leydig, encontradas próximas aos vasos sanguíneos, na periferia do compartimento germinativo ou próximo à parede testicular podem estar isoladas ou em grupos (Pudney, 1996, 1998; Schulz *et al.*, 2010-para revisão) e constituem a principal fonte de hormônios esteróides (Loir *et al.*, 1989; Loir, 1990; Pudney, 1996,1998; Callard, 1996; Nóbrega e Quagio-Grassiotto, 2007; Schulz *et al.*, 2010). São identificadas por suas características ultraestruturais e bioquímicas, como retículo endoplasmático liso bem desenvolvido e mitocôndrias com cristas tubulares e a presença de enzimas esteroidogênicas ativas (Billard *et al.*, 1982; Nagahama, 1983; Loir *et al.*, 1989; Loir,

1990; Grier, 1981; Grier *et al.*, 1989; Pudney, 1996, 1998; Kobayashi *et al.* 1996, 1998; Ijiri *et al.* 2006; Nóbrega e Quagio-Grassiotto, 2007; Schulz *et al.*, 2010).

Nos ovários, as células foliculares e tecais estão envolvidas com a síntese de hormônios esteróides (Le Menn *et al.*, 2007; Lubzens *et al.*, 2010). Porém, parece haver atividade esteroidogênica também entre algumas das células intersticiais, as quais, em associação às células foliculares e tecais, secretariam os hormônios esteróides necessários ao crescimento, diferenciação e maturação dos folículos ovarianos (Guraya, 1986; Lubzens *et al.*, 2010).

10. Os Modelos Biológicos

Considerando o status atual de conhecimento da morfogênese e diferenciação gonadal frente à restrição de informações, especialmente em aspectos tangentes ao estabelecimento do epitélio germinativo e sua relação com a formação da estrutura gonadal em grupos mais basais e mais derivados entre os Teleostei, tomou-se aqui como modelos biológicos cinco representantes de diferentes ordens de Teleostei: *Tanichthys albonubes* (Otophysi: Cypriniformes); *Gymnocorymbus ternetzi* (Otophysi: Characiformes); *Corydoras schwanzi* (Otophysi: Siluriformes); *Amatitlania nigrofasciata* (Percomorpha: Perciformes) e *Poecilia reticulata* (Atherinomorpha: Cyprinodontiformes) (Fig. V). Todos os cinco representantes foram escolhidos por serem espécies ornamentais de pequeno porte, bastante resistentes e conhecidas na aquarofilia, o que permitiu a sua reprodução em aquários domésticos.

- ***Tanichthys albonubes***: conhecida como Tanicts ou Néon Chinês é um dos menores Cypriniformes conhecidos, atingindo sua maturidade sexual com três a quatro meses de idade. Originários da China preferem temperaturas baixas de $18,0 \pm 2,0^{\circ}\text{C}$ (fonte: FishBase). As fêmeas desovam entre 30 a 60 ovos, os quais são demersais e pouco adesivos. Estes eclodem em 24h pós-fertilização (observação pessoal).

- ***Gymnocorymbus ternetzi***: é um peixe bastante conhecido como Black Tetra, Tetra Negro, Viuvinha ou Freirinha. Atingem a maturidade sexual após seis meses de idade. Originários do Brasil, Paraguai e Bolívia são bastante resistentes e pouco exigentes quanto às condições da água. Preferem temperaturas tropicais e pH ácido, porém desovam somente

durante um período do ano, entre primavera e verão (fonte: FishBase). As fêmeas desovam entre 200 a 300 ovos, os quais são demersais e pouco adesivos. Estes eclodem em 24h pós-fertilização (observação pessoal).

- *Corydoras schwartzi*: é um peixe tropical, de fundo, originário do Brasil e América do Sul, porém sua reprodução é ainda pouco conhecida (fonte: FishBase). Em cativeiro, necessita de um aquário grande para seu crescimento, já que os adultos podem atingir até 6 cm. É uma espécie pacífica e resistente. Prefere temperaturas de $26,5 \pm 1,5^{\circ}\text{C}$ e pH entre 6,5 e 7,5. Seus ovos são resistentes, demersais, porém bastante susceptíveis a fungos (observação pessoal).

- *Amatitlania nigrofasciata*: conhecida popularmente como Acará do Congo é uma espécie de comportamento agressivo e territorialista especialmente na época de reprodução. O dimorfismo sexual é bem aparente, após a maturação sexual do animal. Originários da América Central, preferem águas alcalinas e temperatura de $29,0 \pm 1,0^{\circ}\text{C}$ (fonte: FishBase). As fêmeas podem desovar a cada 15 dias, dependendo das condições ambientais. Em cada desova, coloca em torno de 100 a 200 ovos, os quais são adesivos. Os pais têm cuidado parental duradouro e a taxa de sobrevivência é bastante alta (observação pessoal).

- *Poecilia reticulata*: conhecida popularmente como Lebiste ou Guppy, é uma espécie vivípara, apresentando fertilização interna, com desenvolvimento gestacional intra-folicular (Potter e Kramer, 2000), que dura em torno de 30 dias. Após fertilização pelo macho, a fêmea pode guardar os espermatozóides, por vários meses havendo diversas gestações consecutivas. A cada gestação nascem em torno de 20 a 50 filhotes (fonte: FishBase).

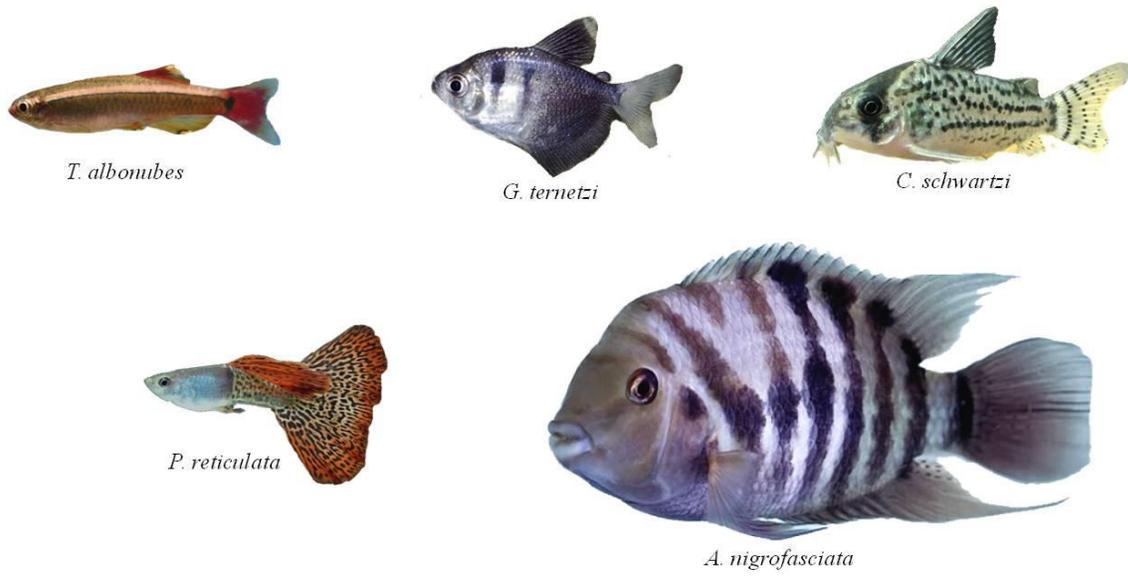


Fig. V: os modelos biológicos - cinco representantes de diferentes ordens de Teleostei.

OBJETIVOS

Trabalhando com embriões, larvas e juvenis das espécies *Tanichthys albonubes*, *Gymnocorymbus ternetzi*, *Corydoras schwartzi*, *Amatitlania nigrofasciata* e *Poecilia reticulata* representando as séries Otophysi, Percomorpha e Atherinomorpha, estudou-se as alterações estruturais durante a morfogênese e diferenciação gonadal, com especial atenção à formação do epitélio germinativo, considerando o desenvolvimento e diferenciação das células germinativas e somáticas entre os grupos de Teleostei. Utilizando-se os dados obtidos, correlacionou-se a formação do epitélio germinativo nas diferentes espécies com suas posições filogenéticas em uma escala evolutiva, tendo por base uma hipótese sobre uma possível evolução pedomórfica entre os grupos mais basais (Otophysi) e mais derivados (Percomorpha e Atherinomorpha) dentre os Teleostei.

Assim, analisou-se especificamente:

(1) à Microscopia de Luz, o desenvolvimento e formação da estrutura gonadal durante as fases embrionária e larval entre as cinco espécies estudadas;

(2) à Microscopia de Luz, a formação de estruturas gonadais tais como formação do compartimento intersticial, túbulos seminíferos e ductos espermáticos nas gônadas masculinas, e formação das lamelas ovígeras, estroma e lúmen ovariano nas gônadas femininas;

(3) à Microscopia de Luz e à Microscopia Eletrônica de Transmissão, o desenvolvimento e diferenciação das células germinativas e somáticas epiteliais, bem como das células mesenquimais, durante o período de morfogênese e diferenciação gonadal;

(4) à Microscopia de Luz, através do Método de Reticulina, e à Microscopia Eletrônica de Transmissão a formação e estabelecimento do epitélio germinativo masculino e feminino, com especial atenção à formação da membrana basal;

(5) a localização e distribuição das células germinativas primordiais, nos tecidos gonadais das espécies em questão, através da detecção da Proteína Vasa por Imunohistoquímica para vasa;

(6) os processos de proliferação celular no primórdio gonadal e nas gônadas, até o completo período de diferenciação gonadal através de técnicas de Imunohistoquímica (PCNA);

(7) a expressão da enzima aromatase gonadal Cyp19a1a nos tecidos gonadais em processo de diferenciação, através de técnicas de Imunohistoquímica;

(8) a presença de células endócrinas ativas, correlacionando o início de sua atividade esteroidogênica com as alterações ocorridas no tecido gonadal durante o processo de diferenciação através de Imunohistoquímica para 3 beta-hidroxiesteróide desidrogenase (3 β -HSD).

MATERIAL e MÉTODOS

1. Amostragem dos animais

Entre 20 e 100 adultos de cada espécie, sendo estas *Tanichthys albonubes*, *Gymnocorymbus ternetzi*, *Corydoras schwartzi*, *Amatitlania nigrofasciata* e *Poecilia reticulata* foram adquiridos em lojas de aquário e mantidos em aquários comunitários de 300 litros com temperatura, pH e oxigênio dissolvido, ideal para cada espécie.

Após o estabelecimento dos casais, machos e fêmeas foram transferidos para aquários menores de 30, 60 e 100 litros para a reprodução. Após desova e fertilização *Tanichthys albonubes*, *Gymnocorymbus ternetzi*, *Corydoras schwartzi* e *Amatitlania nigrofasciata*, e inseminação das fêmeas de *Poecilia reticulata* os ovos, embriões, larvas e juvenis foram coletados periodicamente desde o momento da fertilização até os animais apresentarem diferenciação gonadal completa.

Nos três primeiros dias pós-fertilização, as coletas foram realizadas em intervalos que obedecem a uma escala em progressão geométrica, com constante igual a dois, a partir dos 15 minutos pós-fertilização, até completar 24h. Após este período, as coletas foram realizadas diariamente no primeiro mês, a cada 2 e 3 dias durante o segundo e terceiro mês, respectivamente, passando a serem semanais nos meses seguintes (tabela I e II).

Tabela I: número de animais coletados

espécies	<i>T. albonubes</i>	<i>G. ternetzi</i>	<i>C. schwartzi</i>	<i>A. nigrofasciata</i>	<i>P. reticulata</i>	TOTAL
número de coletas	76	76	76	76	76	380
número de animais por coleta	30	30	30	30	30	150
número de animais coletados	2280	2280	2280	2280	2280	11400

O número elevado de espécimens coletados se deve ao fato de que as amostras foram fixadas em soluções distintas (1/3 em Bouin e 2/3 em Karnovsky), sendo que para cada metodologia fez-se necessário a inclusão do material em diferentes orientações: transversal, longitudinal e sagital.

Tabela II: número e período de coletas realizadas para cada uma única espécie

número de animais coletados	1-3 dia	1o mês	2o mês	3o mês	4o mês	5o mês	6o mês	total de animais coletados
30	0h	4d	32d	63d	97d	127d	157d	210
30	1/4h	5d	34d	66d	104d	135d	164d	210
30	1/2h	6d	38d	69d	110d	141d	171d	210
30	1h	7d	40d	72d	116d	150d	180d	210
30	2h	8d	42d	75d	120d			150
30	4h	9d	44d	78d				120
30	8h	10d	46d	81d				120
30	16h	11d	48d	84d				120
30	24h	12d	50d	87d				120
30	32h	13d	52d	90				120
30	48h	14d	54d					90
30	72h	15d	56d					90
30		16d	58d					60
30		17d	60d					60
30		18d						30
30		19d						30
30		20d						30
30		21d						30
30		22d						30
30		23d						30
30		24d						30
30		25d						30
30		26d						30
30		27d						30
30		28d						30
30		29d						30
30		30d						30
número de coletas por período	12	27	14	10	5	4	4	2280
número total de coletas	76							

Para determinar o momento exato da fertilização, a observação visual fez-se necessária em tempo integral após transferência dos casais para os aquários de reprodução. Os espécimes coletados (ovos, larvas, embriões e juvenis) foram anestesiados por imersão em solução aquosa de benzocaína, dissolvida em álcool absoluto na dose de 1mg/L, sacrificados de acordo com as normas da Comissão de Ética em Experimentação Animal do Instituto de

Biociências de Botucatu (protocolo nº 175/2009 - CEEA -IBB/UNESP) e transferidos para diferentes soluções fixadoras, específicas para cada metodologia. Após o período juvenil, os jovens sexualmente imaturos foram coletados periodicamente até apresentarem gônadas totalmente desenvolvidas (Fig. VI).

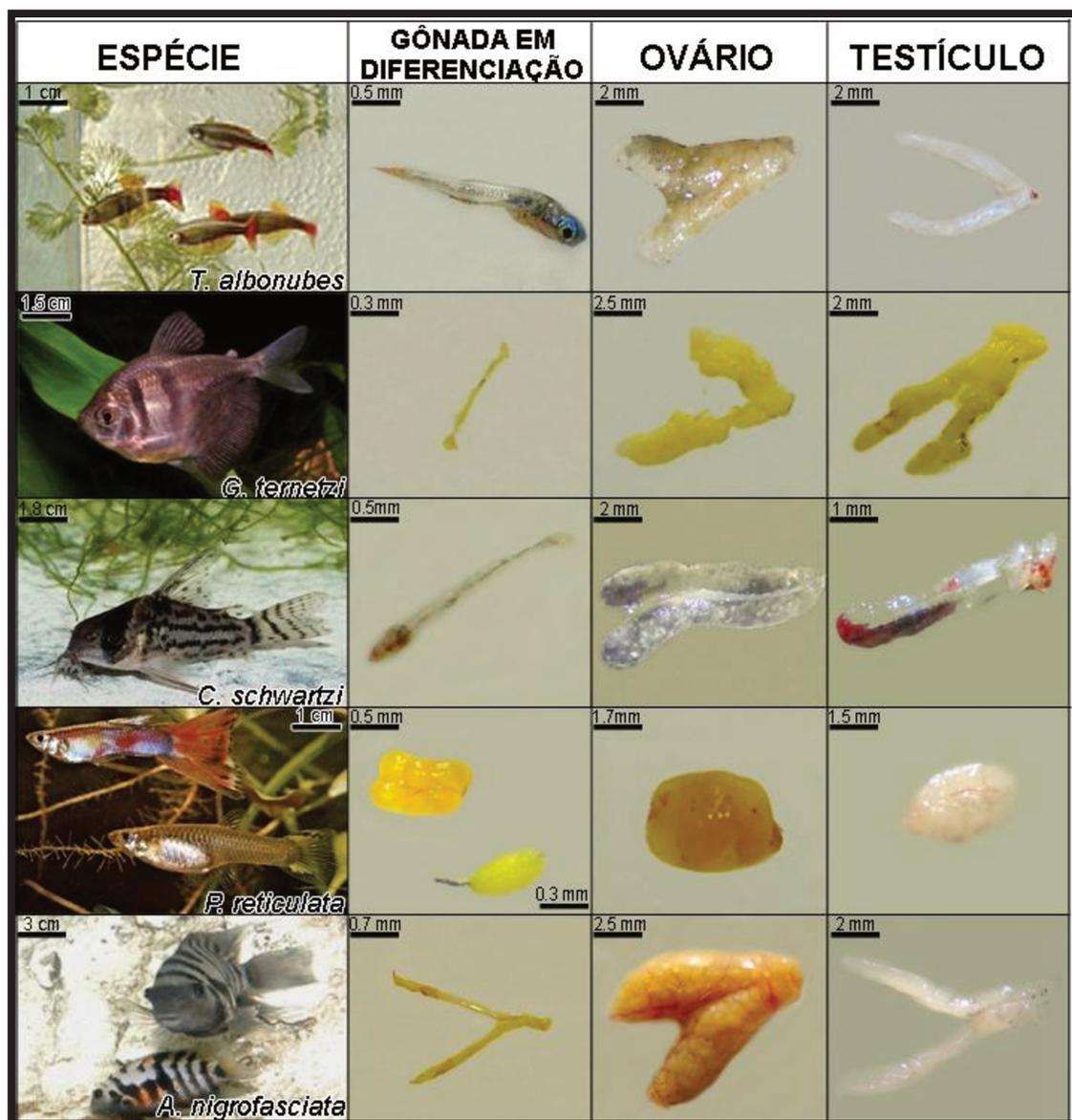


Fig. VI: representantes das cinco espécies estudadas e suas respectivas gônadas em processo de diferenciação, e seus ovários e testículos, ambos, totalmente diferenciados.

Os juvenis foram anestesiados por imersão em solução aquosa de benzocaína, dissolvida em álcool absoluto na dose de 1mgL^{-1} , e seu peso e comprimento mensurados. Os órgãos presentes na cavidade celomática foram expostos através de uma secção ventral do corpo do animal e suas gônadas removidas, pesadas e imersas em solução de fixação apropriada para cada metodologia.

Os adultos foram alimentados com rações comerciais para peixes ornamentais “Alcon Basic” em flocos, “Tetra Color Tropical Granules”, rações de mosquitos naturais “Tetra BloodWorms”, e patês de gema de ovo e fígado cozidos, além de uma grande variedade de alimentos vivos como larvas de mosquitos, larvas de besouros, artêmias, tubifex, dáfnias e besouros do amendoim, todos para estímulo da reprodução.

As larvas, após consumo do saco vitelínico, foram alimentadas de acordo com seu tamanho. Dentre os alimentos utilizados estão: infusório (zooplâncton e fitoplâncton), ovos de artêmia sem casca (Maramar®), náuplios de artêmia recém-eclodidos, espirulina em pó (Spirulina Tetra®), gema de ovo cozida, microvermes e verme do vinagre.

Não foi utilizado nenhum tipo de alimento com hormônios, tampouco a aplicação de hormônios nos animais ou na água dos aquários para estimular a reprodução.

2. Reprodução dos espécimens

2.1. Reprodução de *Tanichthys albonubes*

Para a reprodução de *Tanichthys albonubes*, foram selecionados para cada aquário 3 machos para 1 fêmea. Estes foram transferidos para aquários menores, de 30 litros, no final do dia anterior à desova. Os aquários foram ornamentados com plantas aquáticas submersas como Elódeas (*Elodea densa*) e Cabombas (*Cabomba aquática*) e substrato de pedra. Manteve-se a água levemente acidificada e temperatura em torno de 18° a 20°C . Após 1h, os machos iniciam o cortejo e disputam a fêmea entre si. No dia seguinte, as desovas ocorreram geralmente antes do amanhecer, entre 4h e 5h da manhã. Cada desova ocorre em intervalos de 10 minutos e em cada uma delas foram liberados pela fêmea em torno de 10 ovos. A desova total durava por volta de 1 hora e os ovos eram dispersos por todo substrato do aquário e entre a vegetação. Após a desova, os adultos foram retirados do aquário a fim de não devorarem os próprios

ovos. Esta espécie foi reproduzida diversas vezes, durante todas as estações do ano, especialmente no inverno.

2.2. Reprodução de *Gymnocorymbus ternetzi*

Adultos de *Gymnocorymbus ternetzi* foram mantidos em aquários comunitários de 300 litros com temperatura em torno de 26 a 28°C e pH entre 6,5 e 6,8.

Após a entrada no período reprodutivo (entre o final da primavera e início do verão), machos e fêmeas foram transferidos para aquários menores de 30 litros, com nível da água reduzido a 07 cm. Em cada aquário, colocou-se um único casal, que já se encontrava em cortejo nos aquários comunitários. Manteve-se a temperatura da água em torno de 28°C. O aquário foi mantido desprovido de substrato e com grande quantidade de plantas aquáticas flutuantes, como a alface d'água *Pistia stratiotes* que apresentam grande quantidade de raiz, utilizada para a desova. Durante uma semana, diariamente, o nível da água foi aumentado em 05 cm/dia com água gelada de 04 a 10°C, no final da tarde, simulando chuvas de verão. Concomitantemente, dia a dia, o pH da água foi gradativamente reduzido, sendo que ao final de uma semana, encontrava-se em torno de 6,0. Alimentos vivos, como larvas de insetos e artêmias, foram oferecidos em grande quantidade aos casais, pelo menos 20 dias antes à desova.

As desovas de *Gymnocorymbus ternetzi* ocorreram geralmente antes do amanhecer entre 4h e 5h da manhã. Após um cortejo prolongado, a fêmea liberava os ovos em meio às raízes das plantas aquáticas, que foram imediatamente fecundados pelo macho. A desova total durava em torno de 30 min. Os ovos, em torno de 200 a 300, eram dispersos por todo o fundo do aquário. Após a desova, os adultos foram retirados do aquário a fim de que não devorassem os próprios ovos.

2.3. Reprodução de *Corydoras schwartzi*

Adultos de *Corydoras schwartzi* foram mantidos em aquários comunitários de 300 litros com temperatura em torno de 26 a 28°C pelo período de 3 anos.

Após um longo período de adaptação, alguns indivíduos entraram em período reprodutivo, no início da primavera, e a desova ocorreu naturalmente, sendo o único estímulo

utilizado, uma alimentação rica em proteína, como alimentos vivos, e a construção de uma queda d'água no interior do aquário, simulando uma corrente d'água. O aquário apresentava substrato de pedras e alguns esconderijos feitos com pedras e galhos. Junto ao substrato, uma grande quantidade da planta Musgo de Java (*Taxiphyllum barbieri*) foi deixado para a futura nutrição das larvas.

Dentre os indivíduos presentes no aquário, um casal *Corydoras schwartzi* apto à reprodução entra em cortejo e logo assumem uma posição-T. A fêmea depositou os ovos nas nadadeiras ventrais e periodicamente transportou seus ovos para um ninho construído sobre um substrato liso, seja no próprio vidro do aquário, em pedras grandes lisas ou folhas, sempre em locais próximos à queda d'água.

As desovas ocorreram sempre no final da tarde, entre 16 e 18h, antes do anoitecer. Após a desova, os adultos foram retirados do aquário a fim de que não devorassem os próprios ovos.

2.4. Reprodução de *Poecilia reticulata*

Para se determinar com maior precisão o momento exato da fertilização de *Poecilia reticulata*, machos e fêmeas jovens, oriundos de diversas reproduções, foram criados separadamente até que atingissem a maturação sexual. A partir disso, as fêmeas foram selecionadas para a reprodução, tendo-se a certeza de que nunca haviam sido inseminadas. Para a reprodução, 2 machos para 1 fêmea foram separados em aquários individuais de 30 litros, com temperatura de 28°C. Após a inseminação, os machos foram retirados do aquário, evitando novas inseminações durante o período de gestação. A contar da data de inseminação, os embriões foram coletados periodicamente, a partir da dissecação dos ovários maternos.

Os ovos e embriões coletados do ovário materno foram classificados em estágios, de acordo com o desenvolvimento ovariano e embrionário intrafolicular (Tabela III). Após 30 dias de gestação e nascimento dos animais, os juvenis foram também coletados periodicamente.

Tabela III: estágios de desenvolvimento ovariano e embrionário para Poecilídeos vivíparos (*sensu* Meffe, 1985)

ESTÁGIOS	DESENVOLVIMENTO OVARIANO
Estágio 0	ovário regredido ou não reproduzindo; todos os oócitos são pequenos e esbranquiçados
Estágio 1	presença de oócitos em vitelogênese; oócitos amarelados com diferentes tamanhos no ovário
Estágio 2	presença de oócitos plenamente desenvolvidos e início da embriogênese; oócitos uniformes com tamanho máximo; blastodiscos e embriões podem estar presentes, mas considera-se somente aqueles que podem ser vistos macroscopicamente
Estágio 3	embriões com olhos pigmentados e corpo não pigmentado
Estágio 4	embriões com olhos e corpo pigmentados
Estágio 5	pré-nascimento; saco vitelínico todo ou quase todo absorvido

2.5. Reprodução de *Amatitlania nigrofasciata*

Para a reprodução de *Amatitlania nigrofasciata*, alguns indivíduos foram transferidos para o aquário de reprodução, a fim de que ocorresse a formação de casais e estabelecimento de territórios pelo casal dominante. As atividades pré-desova iniciaram-se com mudança da coloração da fêmea e escolha de um substrato para a desova. Após remoção de cascalhos e plantas do local escolhido, o cortejo tornou-se intenso e a desova ocorreu sempre em uma superfície lisa, sobre uma pedra ou folha. Os ovos adesivos foram depositados em fileiras uniformes pela fêmea, através de uma papila urogenital bastante desenvolvida. Após a desova, o macho iniciou a espermição, resultando na fertilização dos ovos. O processo de extrusão durava em torno de uma hora, e após esse período, os pais passaram a apresentar cuidado parental. Durante todo o período pré-larval, os pais batiam vigorosamente as nadadeiras peitorais, abanando os ovos e removendo ovos mortos e atacados por fungos.

3. Preparação do Material para a Microscopia de Luz

Para a microscopia de luz, as gônadas dos animais, bem como os embriões, larvas e juvenis das cinco espécies aqui analisadas, foram fixadas em solução de glutaraldeído 2% e

paraformaldeído 4% em tampão Sorensen (0,1M a pH 7,2) por pelo menos 24 horas. Após fixação, as amostras foram fotografadas e o material desidratado em uma série crescente de álcool etanol (70% por 4 horas; 95% por 4 horas), infiltrados e incluídos em historesina (metacrilato glicol) – Leica historesin. Os cortes seriados dos exemplares em período de desenvolvimento embrionário, larval e juvenil, e cortes histológicos seriados com 3µm de espessura, das gônadas dos juvenis, obtidos em micrótomo equipado com navalhas de vidro receberam diferentes colorações. As colorações Hematoxilina Férrica/Eosina; Azul de Toluidina-Bórax; Método de Coello; e Ácido Periódico de Schiff + Hematoxilina Férrica + Amarelo Metanil (Quintero-Hunter *et al.*, 1991) foram utilizadas para análises histológicas, bem como para detecção de substâncias de diferentes composições químicas (anexo I). A documentação do material foi realizada a partir de um microscópio BX61 Olympus através de um sistema de fotodocumentação digital, pertencente ao Departamento de Morfologia do Instituto de Biociências, UNESP, Campus de Botucatu-SP.

3.1. 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 (Alberts *et al.*, 2008). As fibras reticulares são argirófilas, apresentando alta afinidade por sais de prata (Junqueira e Carneiro, 1999). Dessa forma, o Método de Reticulina, que envolve impregnação por prata, foi empregado para o acompanhamento da formação da membrana basal ao longo do desenvolvimento gonadal, conforme proposto por Mazzoni e colaboradores (2010), bem como para descrever os diferentes tipos de organização gonadal em machos adultos.

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 e 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 tratou-se o material com formol 10% por 3 minutos, lavando em água destilada. Após desidratação em estufa, as lâminas foram montadas.

4. Detecção de Proteínas por Imunohistoquímica:

Para detecção da Proteína-Vasa, do PCNA (antígeno nuclear de proliferação celular), da enzima Aromatase Cyp19a1a e da enzima 3 β HSD (3beta-hidroxiesteróide desidrogenase), os embriões, larvas, juvenis e as gônadas das cinco espécies estudadas foram fixados em líquido de Bouin por 24h e mantidas em álcool (etanol) 70%. As gônadas foram desidratadas em álcool, clareadas em xilol, embebidas em parafina e seccionadas com 5 μ m de espessura. O material foi desparafinado com xilol e hidratado com tampão TBS (tampão fosfato, 5mM, pH 7.6), seguindo o protocolo de cada técnica.

As técnicas de Imunohistoquímica para os embriões, larvas e juvenis foram realizadas *in totum*, não sendo desidratadas em álcool (etanol). As amostras foram lavadas em tampão fosfato Sorensen (0,1M a pH 7,2) por 1h antes do início das técnicas.

4.1. Detecção da Proteína-Vasa por Imunohistoquímica:

Para detecção da Proteína-Vasa, foi realizado um bloqueio da peroxidase endógena com 3% de peróxido de hidrogênio/tampão fosfato TBS (pH 7,6) (Tris + tampão fosfato) por 15 minutos. A recuperação antigênica foi realizada em microondas, com tampão citrato (0,01M; pH 6,0) durante 5 minutos em potência máxima por três vezes. Após a recuperação antigênica, os cortes foram lavados em tampão TBS e o bloqueio inespecífico realizado com soro bloqueador (5% de leite Mólico desnatado, em tampão TBS) por 15 minutos. O material foi incubado com o anticorpo primário policlonal (1:300) (Rhea Biotech – IM-0338) por 1 hora e meia a temperatura ambiente (em câmara úmida). As lâminas foram lavadas, incubadas com anticorpo secundário biotilado diluído, por 30 minutos, lavadas novamente e incubadas com o reagente Super ABC (complexo avidina-biotina) por 30 minutos. O material foi

revelado com DAB (3',3'-diaminobenzidina, dissolvido em TBS) e 0,03% H₂O₂ e contrastado com hematoxilina de Harris. Como controles negativo, em algumas lâminas, o anticorpo primário foi omitido ou substituído por TBS.

4.2. Investigação da Proliferação Celular através da Imunohistoquímica do PCNA (“proliferating cell nuclear antigen”)

O antígeno nuclear de proliferação celular (PCNA) atua em diversos processos no ciclo celular, incluindo replicação, alongamento e reparo do DNA (ver Chieffi *et al.*, 2001). É uma proteína nuclear não histônica, com aparente ponto isoelétrico entre 4,8-4,9 e de massa molecular de 36KDa (ver Miura *et al.*, 2002). Atua como uma proteína auxiliar da DNA polimerase δ e ϵ (Chieffi *et al.*, 2001; Miura *et al.*, 2002). Também é utilizada no controle do ciclo celular, interagindo diretamente com ciclinas / complexos cdk, permitindo a passagem de G1 para S (ver Chieffi *et al.*, 2001). O PCNA é altamente conservado e tem sido identificado em uma grande quantidade de eucariotos (ver Chieffi *et al.*, 2001). Para avaliar a expressão do PCNA, foi realizado um bloqueio da peroxidase endógena com 3% de peróxido de hidrogênio/tampão fostato TBS (pH 7,6) (Tris + tampão fosfato) por 15 minutos. A recuperação antigênica foi realizada em microondas, com tampão citrato (0,01M; pH 6,0) durante 5 minutos em potência máxima por três vezes. Após a recuperação antigênica, os cortes foram lavados em tampão TBS e o bloqueio inespecífico realizado com soro bloqueador (5% de leite Mólico desnatado, em tampão TBS) por 15 minutos. O material foi incubado com o anticorpo primário monoclonal (1:300) (Novacastra – NCL-PCNA) por 1 hora e meia a temperatura ambiente (em câmara úmida). As lâminas foram lavadas, incubadas com anticorpo secundário biotilado diluído, por 30 minutos, lavadas novamente e incubadas com o reagente Super ABC (complexo avidina-biotina) por 30 minutos. O material foi revelado com DAB (3',3'-diaminobenzidina, dissolvido em TBS) e 0,03% H₂O₂ e contrastado com hematoxilina de Harris. Como controles negativo, em algumas lâminas, o anticorpo primário foi omitido ou substituído por TBS.

4.3. Detecção da Enzima CYP19a1a e 3 β -HSD e por Imunohistoquímica:

Para detecção das enzimas CYP19a1a e 3 β -HSD, foi realizado um bloqueio da peroxidase endógena com 3% de peróxido de hidrogênio/tampão fosfato TBS (pH 7,6) (Tris + tampão fosfato) por 15 minutos. A recuperação antigênica foi realizada em microondas, com tampão citrato (0,01M; pH 6,0) durante 5 minutos em potência máxima por três vezes. Após a recuperação antigênica, os cortes foram lavados em tampão TBS e o bloqueio inespecífico realizado com soro bloqueador (5% de leite Mólico desnatado, em tampão TBS) por 15 minutos. O material foi incubado com o anticorpo primário policlonal (1:50) (Santa Cruz - SC-130733) para detecção de CYP19a1a ou com anticorpo primário monoclonal (1:100) (Santa Cruz - SC-100466) para detecção de 3 β -HSD por 1 hora e meia a temperatura ambiente (em câmara úmida). As lâminas foram lavadas e incubadas com o polímero MR HRP-Polymer (MACH4 Universal HRP Polymer Kit) por 30 minutos. O material foi revelado com DAB (3,3'-diaminobenzidina, dissolvido em TBS) e 0,03% H₂O₂ e contrastado com hematoxilina de Harris. Como controles negativo, em algumas lâminas, o anticorpo primário foi omitido ou substituído por TBS.

5. Preparação do Material para a Microscopia Eletrônica de Transmissão

Larvas, juvenis e fragmentos das gônadas dos juvenis foram fixados em solução de glutaraldeído 2% e paraformaldeído 4% em tampão Sorensen (0,1M a pH 7,2) por pelo menos 24 horas. O material foi pós-fixado por 2h no escuro em 1% de tetróxido de ósmio no mesmo tampão, contrastado em bloco com solução aquosa de 5% de uranila por 2 horas, desidratado em acetona e embebido em araldite. O material foi seccionado em ultramicrótomo equipado com navalha de diamante, contrastado com solução saturada de acetato de uranila em 50% de álcool e citrato de chumbo e documentado em Microscópio Eletrônico de Transmissão Tecnai Spirit da Fei Company. Esta metodologia foi realizada no Centro de Microscopia Eletrônica do Instituto de Biociências da Unesp – Botucatu.

RESULTADOS

I. FECUNDAÇÃO E O PERÍODO EMBRIONÁRIO

As cinco espécies estudadas apresentam desenvolvimento embrionário e larval diferentes entre si (Fig. 1), de acordo com o tipo de reprodução apresentado por cada espécie. *Tanichthys albonubes*, *Gymnocorymbus ternetzi*, *Corydoras schwartzi* e *Amatitlania nigrofasciata* apresentam fertilização externa. Já *Poecilia reticulata* apresenta fertilização interna.

Os ovos de *Tanichthys albonubes* e *Gymnocorymbus ternetzi* são menores, medindo cerca de 0,5 mm, translúcidos e demersais, sendo os de *Tanichthys albonubes* pouco adesivos e os de *Gymnocorymbus ternetzi* não adesivos, sendo que estes últimos sofrem pequena hidratação pós-fertilização (Fig. 1). Em ambas as espécies, 12 horas pós-fertilização o embrião torna-se visível no interior do ovo, envolvido pelo córion. O desenvolvimento embrionário é rápido e 24h pós-fertilização, as larvas com pouco mais de 1,0mm eclodem, permanecendo aderidas ao substrato por mais 24h, quando se tornam livre-natantes, após o saco vitelínico ser totalmente consumido. Mesmo após a diferenciação larval, o juvenil com cerca de 20 dias ainda apresenta apenas o primórdio gonadal em processo de diferenciação.

Os ovos de *Corydoras schwartzi* são extremamente grandes, medindo em torno de 2,5 mm, são esbranquiçados, opacos e bastante adesivos (Fig. 1). Apresentam córion bastante resistente. Os ovos são depositados em uma superfície lisa, como uma pedra ou planta, e imersos em uma secreção que rapidamente solidifica-se prendendo fortemente o ovo ao substrato. Não sofrem hidratação e eclodem em torno de 4 a 5 dias. As larvas não aderem à superfície e permanecem no fundo, junto ao substrato. Após 3 a 4 dias o saco vitelínico diminui e as larvas tornam-se livre-natantes.

Os ovos de *Amatitlania nigrofasciata* medem em torno de 1,5 mm, são fortemente amarelados pela presença de vitelo, translúcidos, demersais e bastante adesivos (Fig. 1). Não sofrem hidratação e entre 6 e 8 horas pós-fertilização é possível observar a formação de um disco embrionário no pólo animal. A clivagem é meroblástica, resultando na formação de uma blastoderme sobre o saco vitelino. No 3º dia pós-fertilização, após o período de organogênese,

a vesícula óptica torna-se evidente. Os somitos diferenciam-se e o embrião torna-se cada vez maior.

Ao final da primeira semana pós-fertilização, o saco vitelino torna-se menor e as larvas deixam de se ligar ao substrato. Estas passam a apresentar movimentos vigorosos da cauda até se tornarem livre-natantes.

Após desenvolvimento e diferenciação larval, ao final da quarta semana pós-fertilização, o animal juvenil adquire padrão corpóreo semelhante ao adulto. Nesse período, o juvenil apresenta cerca de 0,5 cm e, diferente de outros órgãos, suas gônadas ainda não estão formadas. Nos cortes histológicos detectou-se a presença apenas do primórdio gonadal em desenvolvimento.

A fertilização dos ovos de *Poecilia reticulata* ocorre no meio interno, sendo intrafolicular, após a inseminação da fêmea pelo macho. O desenvolvimento embrionário é interno e totalmente intrafolicular. Após um período gestacional de 30 dias, os juvenis nascem com tamanho em torno de 0,8 cm de comprimento (Fig. 1). Os animais recém-nascidos já apresentam todos os órgãos diferenciados, incluindo as gônadas, sejam elas masculinas ou femininas. Dessa forma, a morfogênese gonadal, que envolve o desenvolvimento do tecido gonadal a partir de um primórdio gonadal, ocorre completamente durante o período gestacional, no interior do ovário materno, originando uma gônada diferenciada no animal recém-nascido.

Durante o desenvolvimento embrionário de *Poecilia reticulata*, as gônadas femininas em diferenciação fundem-se originando um ovário único. Já os machos apresentam uma fusão parcial das gônadas masculinas, originando um par de testículos que confluem na porção medial, região correspondente a um ducto espermático único.

II. MORFOGÊNESE GONADAL

1. O PRIMÓRDIO GONADAL

Os primórdios gonadais das cinco espécies estudadas *Tanichthys albonubes*, *Gymnocorymbus ternetzi*, *Corydoras schwartzi*, *Poecilia reticulata* e *Amatitlania nigrofasciata* são inicialmente bastante semelhantes (Fig. 2). Apresentam-se aos pares sobre o peritônio ao longo da cavidade celomática, presos por uma fina camada de mesentério

gonadal. Cada primórdio gonadal localiza-se ventralmente ao rim e dorsalmente à bexiga natatória. Em *Tanichthys albonubes* (Fig. 2A-C), *Gymnocorymbus ternetzi* (Fig. 2D-E), *Corydoras schwartzi* (Fig. 2G-I) e *Amatitlania nigrofasciata* (Fig. 2M-O), o primórdio gonadal se estende ao longo de toda cavidade celomática, desde a região posterior até a região anterior. Em *Poecilia reticulata* (Fig. 2J-L), o primórdio gonadal ocupa uma área menor, ficando restrito à porção final (região posterior) da cavidade celomática.

Histologicamente, os primórdios gonadais são semelhantes, formados por apenas células germinativas primordiais (CGPs) e células somáticas. As células somáticas apresentam forma variada, sendo predominantemente pavimentosas, com núcleo basófilo e citoplasma escasso (Fig. 2). Já as CGPs são grandes células arredondadas com núcleo descondensado e volumoso (Fig. 2). Apresentam um nucléolo bastante evidente e citoplasma escasso, rico em nüage, a qual apresenta resposta positiva ao Amarelo Metanil, indicando a presença de proteínas na sua constituição.

As células germinativas primordiais (CGPs) distribuem-se ao longo de todo o primórdio gonadal, que se apresenta filiforme, longo e delgado, composto apenas por uma ou duas camadas de CGPs. Ocasionalmente pode-se encontrar atividade mitótica das CGPs.

Neste estágio, em qualquer uma das espécies, não há diferenças morfológicas que sugiram tratar-se de uma gônada masculina ou feminina. O número de células germinativas e somáticas aumenta gradualmente ao longo do desenvolvimento gonadal. Como resultado, tem-se um aumento do tamanho do tecido gonadal, que passa a constituir uma gônada indiferenciada. Esta apresenta abundante quantidade de CGPs e intensa atividade mitótica. A gônada indiferenciada passa a apresentar pequenas mudanças estruturais que constituem os primeiros indícios da formação de uma gônada masculina ou feminina. A partir daí, o tecido gonadal entre as cinco diferentes espécies passa a apresentar diferenças significativas.

2. A GÔNADA INDIFERENCIADA NOS OTOPHYSI

As gônadas indiferenciadas de *Tanichthys albonubes* e *Gymnocorymbus ternetzi* foram observadas em animais medindo entre 0,5 e 0,7 cm com até 30 e 35 dias pós-fertilização, respectivamente (Fig. 3A-E).

Em *Corydoras schwartzi* as gônadas permanecem indiferenciadas (Fig. 3F-G) por um longo período, até 120 dias pós-fertilização, quando os animais já apresentavam 2,5 cm de comprimento.

Nas três espécies, as gônadas indiferenciadas são pares, longas e delgadas, ocupando 2/3 da cavidade celomática a partir da papila urogenital. São formadas por células germinativas primordiais (CGPs) dispersas por entre células somáticas (Fig. 3). Neste período não há qualquer diferença que indique um tecido gonadal supostamente masculino ou feminino.

Nas secções parassagitais, as gônadas indiferenciadas são mais espessas quando comparadas ao primórdio gonadal, principalmente pela maior quantidade de células somáticas, que apresentam formatos irregulares e pavimentosos (Fig. 3).

As células germinativas primordiais (CGPs), com formato ovalado e nucléolo evidente, mantêm-se em número reduzido e encontram-se inicialmente isoladas entre as células somáticas ao longo de toda a gônada (Fig. 3).

3. A GÔNADA INDIFERENCIADA NO PERCOMORPHA

Em *Amatitlania nigrofasciata*, as gônadas indiferenciadas foram observadas em animais com até 30 dias pós-fertilização, em indivíduos supostamente femininos. Entretanto, em torno de 50% dos indivíduos, supostamente masculinos, permaneceram indiferenciados até 80 dias pós-fertilização. Macroscopicamente, quando passível de dissecação, as gônadas indiferenciadas são extremamente longas e delgadas, percorrendo toda cavidade celomática desde a papila urogenital.

Histologicamente, o tecido gonadal masculino e feminino diferem-se no que se refere à disposição das células germinativas primordiais (CGPs) (Fig. 4). Este fato pode ser confirmado associando-se o tamanho da gônada em processo de diferenciação com o tamanho e idade do animal. A diferenciação ovariana em *Amatitlania nigrofasciata* precede a diferenciação testicular, sendo este intervalo bastante significativo. Nas fêmeas, os primeiros indícios da diferenciação gonadal ocorrem por volta de 35 dias pós-fertilização, quando os animais apresentam em torno de 0,7 cm de comprimento, enquanto que nos machos, o período

é bastante longo e os primeiros indícios manifestam-se somente após 90 dias pós-fertilização, em animais com tamanho entre 1,5 e 2,0 cm de comprimento.

Assim, nos cortes histológicos pode-se detectar dois tipos de gônadas indiferenciadas – gônada indiferenciada supostamente feminina (Fig. 4A-B) e gônada indiferenciada supostamente masculina (Fig. 4C-D).

Nas secções parassagittais do pressuposto ovário, o tecido gonadal é extremamente delgado, apresentando uma ou duas camadas de células germinativas primordiais (CGPs) enfileiradas e delimitadas perifericamente por células somáticas (Fig. 4A-B). No pressuposto testículo, as CGPs permanecem concentradas próximas à periferia do tecido gonadal, na região ventral. Na região dorsal, há um acúmulo de grande quantidade de células somáticas (Fig. 4C-D).

As células germinativas primordiais (CGPs) são mais esféricas no tecido gonadal supostamente feminino e inicialmente ovais na gônada indiferenciada supostamente masculina (Fig. 4). Ambas tem núcleo volumoso, basofílico, um nucléolo bastante evidente e grande quantidade de nüage em seu citoplasma.

4. A GÔNADA INDIFERENCIADA NO *ATHERINOMORPHA*

As gônadas indiferenciadas foram observadas nos cortes histológicos em animais nos estágios 3 e 4, correspondente ao período entre 13 e 24 dias pós-fertilização. São estruturas ovaladas e/ou alongadas, que ocupam a porção posterior da cavidade celomática.

O tecido gonadal, agora mais espesso, é formado por células somáticas dispostas entre as células germinativas primordiais (CGPs), que ainda mostram-se como células indiferenciadas. Essas, são células ovaladas com núcleo irregular e fortemente basofílico, apresentando um ou dois nucléolos evidentes.

Nos cortes histológicos pode-se detectar dois tipos de gônadas indiferenciadas – gônada indiferenciada supostamente feminina (Fig. 5) e gônada indiferenciada supostamente masculina (Fig. 6). Nas secções longitudinais e parassagittais do pressuposto testículo, notam-se duas porções distintas no tecido gonadal: a primeira, na região caudal, próxima à papila urogenital é formada apenas por células somáticas, enquanto que o restante da gônada apresenta células germinativas primordiais e células somáticas (Fig. 6). No pressuposto ovário,

o tecido gonadal não apresenta concentração de células somáticas na porção caudal, como nos machos, e as células germinativas primordiais distribuem-se por todo tecido gonadal (Fig. 5).

III. DIFERENCIAÇÃO GONADAL

I. A DIFERENCIAÇÃO GONADAL NOS OTOPHYSI

As gônadas de *Tanichthys albonubes* e *Corydoras schwartzi* diferenciam-se diretamente em um ovário ou testículo, apresentando, portanto, desenvolvimento gonocorístico direto.

Em ambas as espécies, gradualmente e próximo ao período que antecede a diferenciação gonadal, parece haver uma pequena diferença na distribuição das células germinativas primordiais (CGPs) ao longo do tecido gonadal, entre as gônadas supostamente femininas e as gônadas supostamente masculinas.

Em *Tanichthys albonubes*, a diferenciação ovariana precede a diferenciação testicular e ocorre por volta de 37 dias pós-fertilização, em animais que apresentam pouco mais de 1,0 cm de comprimento. A diferenciação testicular ocorre em animais com mais de 50 dias pós-fertilização, quando estes já apresentam entre 1,5 e 2,0 cm. Isso faz com que suas gônadas tenham um tamanho maior, proporcionalmente ao tamanho do animal. Porém, essas gônadas ainda mostram-se totalmente indiferenciadas até 50 dias pós-fertilização. Fêmeas com esse mesmo tamanho e idade já apresentam um ovário totalmente diferenciado.

Dessa forma, pode-se antecipar por comparação, que as células germinativas primordiais (CGPs) apresentam uma organização que distingue gônadas supostamente femininas de gônadas supostamente masculinas.

A gônada supostamente feminina tem um menor tamanho em relação à gônada supostamente masculina. A proporção entre células germinativas primordiais (CGPs) e células somáticas é mais equilibrada nas fêmeas, enquanto que nas gônadas supostamente masculinas, as CGPs são escassas e encontram-se dispersas por entre inúmeras células somáticas que faz da gônada masculina, um órgão mais espesso do que a gônada feminina. Além disso, nas gônadas supostamente femininas, por apresentarem uma espessura menor, geralmente há uma única fileira de CGPs delimitadas periféricamente por células somáticas. As células

somáticas, em ambas as gônadas, são geralmente pavimentosas, têm núcleo basófilo e citoplasma escasso, podendo apresentar também diferentes formatos nucleares desde fusiformes até sinuosos.

Em *Corydoras schwartzi*, a diferenciação ovariana e a diferenciação testicular ocorrem simultaneamente por volta de 130 a 150 dias pós-fertilização, em animais que apresentam entre 3,0 e 4,0 cm de comprimento. O primeiro indício da diferenciação gonadal, refere-se à organização das células germinativas, em gônadas supostamente masculinas e femininas. Nas gônadas femininas, as oogônias formam pequenos cistos germinativos, separados por um tecido intersticial bastante desenvolvido. Nas gônadas masculinas, os cistos desenvolvem-se rapidamente, enquanto que o tecido intersticial é ainda reduzido.

Já *Gymnocorymbus ternetzi* apresenta desenvolvimento gonocorístico indireto, ou seja, em todos os indivíduos desta espécie, o tecido gonadal desenvolve-se inicialmente em ovário, independente do sexo genotípico. Entre 37 e 42 dias pós-fertilização, todos os indivíduos apresentam desenvolvimento de um tecido ovariano. Entre 42 e 50 dias pós-fertilização, 50% dos indivíduos apresentam degeneração do tecido ovariano e remodelação em um tecido testicular. O restante dos indivíduos, supostamente femininos, apresenta uma contínua progressão no desenvolvimento do tecido ovariano. Assim, metade da população tem gônadas totalmente desenvolvidas em um ovário e gônadas em transição com características masculinas e femininas.

2. A DIFERENCIAÇÃO GONADAL NO PERCOMORPHA

As gônadas de *Amatitlania nigrofasciata* diferenciam-se diretamente em um ovário ou testículo, apresentando, portanto, desenvolvimento gonocorístico direto, com precedência da diferenciação ovariana sobre a testicular. Macroscopicamente, os ovários são ligeiramente mais achatados e o tecido gonadal inicialmente é extremamente delgado. Já os testículos são mais cilíndricos em toda sua extensão. Ambas as gônadas são órgãos pares, alongados que percorrem longitudinalmente toda cavidade celomática desde a papila urogenital, na região dorsal. Estão presos à parede dorsal desta cavidade por uma fina membrana de tecido conjuntivo, colocando-se ventro-lateralmente à bexiga natatória.

As fêmeas analisadas atingiram os primeiros sinais de maturidade sexual aos 120 dias pós-fertilização, com 3,0 cm de comprimento, enquanto que os machos aos 150 dias, apresentando em torno de 4,0 cm de comprimento. O adiantamento da maturidade sexual masculina é possível, quando induzida pela presença de uma fêmea apta a desovar.

Em ambos os sexos, somente após as características gonadais estarem totalmente definidas e suas gônadas apresentarem produção contínua de gametas, é que os animais passam a exibir características sexuais morfológicas secundárias e dimorfismo sexual.

3. A DIFERENCIAÇÃO GONADAL NO ATHERINOMORPHA

As gônadas de *Poecilia reticulata* diferenciam-se diretamente em um ovário ou testículo, apresentando, portanto, desenvolvimento gonocorístico direto, com precedência da diferenciação ovariana sobre a testicular.

Na gônada indiferenciada, as células germinativas primordiais (CGPs) iniciam sua diferenciação, tornando-se maiores; são esféricas, possuem um núcleo volumoso, ovalado e pouco basofílico com um nucléolo evidente. Essas células são recrutadas para meiose originando futuramente os gametas masculinos (espermatozóides) e femininos (oócitos).

A diferenciação gonadal parece ocorrer nos estágios 4 e 5, correspondente aos 10 últimos dias de gestação intrafolicular. Ao nascerem, as fêmeas apresentam uma gônada ainda compacta, mas com a presença de oócitos pré-vitelogênicos, enquanto que nos machos, as células germinativas ainda não entraram em meiose.

As fêmeas analisadas atingiram os primeiros sinais de maturidade sexual aos 90 dias pós-fertilização, enquanto que os machos aos 70 dias. Assim, apesar da diferenciação gonadal feminina preceder a masculina, o processo completo de espermatogênese antecede a oogênese.

IV. DIFERENCIAÇÃO OVARIANA

Nos três grupos analisados, Otophysi, Percomorpha e Atherinomorpha, os eventos envolvidos na diferenciação ovariana são bastante semelhantes, distinguindo-se entre as espécies apenas a cronologia e a forma como os processos ocorrem para se chegar a um mesmo resultado final – a formação de um órgão cavitário delimitado por um epitélio germinativo. Assim, as primeiras etapas da diferenciação ovariana, caracterizadas pela entrada

das células germinativas em meiose e início do processo de foliculogênese, não apresentam diferenças significativas entre as espécies.

1. A FOLICULOGÊNESE NOS OTOPHYSI, PERCOMORPHA E ATHERINOMORPHA

O tecido gonadal das cinco espécies analisadas é delgado, alongado e formado por células germinativas primordiais (CGPs), agora diferenciadas em oogônias, e células somáticas (Fig. 7A, 8A-E).

As oogônias, imersas no tecido gonadal, podem estar associadas ou não às células somáticas. Oogônias isoladas proliferam por mitose dando origem a novas oogônias (Fig. 7B,C).

Quando associadas às células somáticas formam um cisto de oogônias, que ao entrar em meiose originam os oócitos profásicos iniciais (Fig. 7D-H, 8). Durante as sucessivas divisões celulares, no interior do cisto, a citocinese é incompleta, podendo observar-se pontes citoplasmáticas entre as células germinativas, sejam estas oogônias (Fig. 8E,F) ou oócitos profásicos iniciais.

Uma vez que cada oogônia dá origem a um cisto e tendo início as divisões celulares, formam-se diferentes cistos próximos um do outro, originando grupamentos (conjuntos celulares), delimitados gradativamente por uma mesma membrana basal em formação (Fig. 8C). Assim, ao longo de toda gônada, observam-se oogônias isoladas individualmente entre células somáticas, e cistos delimitados por células somáticas derivadas do epitélio, contendo oogônias e/ou oócitos profásicos iniciais.

As oogônias são células arredondadas que apresentam citoplasma escasso com granulações correspondentes às “nüages”, e núcleo grande, esférico com um ou mais nucléolos bem evidentes (Fig. 7). Seu citoplasma apresenta mitocôndrias esféricas com cristas tubulares, frequentemente associadas às “nüages” (Fig. 8).

Os oócitos, presentes nos cistos são também arredondados, com núcleo contendo cromatina em distintas formas de organização de acordo com a etapa da prófase em que se encontram, porém seus citoplasmas não os diferem, mantendo-se sempre ligeiramente acidófilo e escasso (Fig. 7).

Os oócitos profásicos apresentam inicialmente núcleo mais basófilo do que as oogônias e há uma diminuição na quantidade de núcleo no citoplasma. O oócito leptotênico apresenta núcleo fortemente basófilo, com ao menos um nucléolo bastante evidente. Com a progressão da prófase, ocorre perda gradual da basofilia nuclear do oócito (Fig. 7). O oócito em zigóteno apresenta maior condensação cromossômica, dando um aspecto granular ao núcleo. Os complexos sinaptonêmicos começam a ser formados permitindo o pareamento dos cromossomos homólogos (Fig. 8J). Em paquíteno, os complexos sinaptonêmicos estão totalmente formados e no núcleo do oócito percebe-se uma forte basofilia próxima ao envoltório nuclear.

Os cistos agora contendo oócitos diplotênicos são invadidos pelas células somáticas epiteliais – as agora células pré-foliculares. As células pré-foliculares, unidas fortemente por inúmeros desmossomos envolvem total e gradativamente cada oócito que se separa do cisto, dando origem a um folículo ovariano. Durante esse processo conhecido como foliculogênese, as células pré-foliculares, após se diferenciarem em células foliculares, iniciam a formação da membrana basal. Gradativamente, a membrana basal é sintetizada individualizando cada folículo ovariano.

Com a entrada e permanência do oócito em diplóteno, os cromossomos plumosos tornam-se visíveis. O citoplasma dos oócitos aumenta em volume tornando-se gradualmente mais basófilo, dando início ao crescimento primário, ainda no interior dos cistos (Fig. 7). O oócito diplotênico agora isolado no folículo ovariano, e em crescimento primário apresenta núcleo com um número variável de nucléolos, os quais inicialmente localizados na região central do núcleo (oócitos com múltiplos nucléolos) tornam-se posteriormente periféricos (oócitos perinucleolares).

Nessa etapa da diferenciação ovariana, a gônada mostra-se ainda compacta em todas as espécies.

1.1. O tecido gonadal nos *Otophysi* durante a Foliculogênese

Os primeiros indícios da diferenciação ovariana nos *Otophysi* foram observados em animais com 37 dias pós-fertilização em *Tanichthys albonubes*, 42 dias pós-fertilização em *Gymnocorymbus ternetzi* e 130 dias pós-fertilização em *Corydoras schwartzi*.

Durante todo o período de diferenciação ovariana, os ovários dos *Otophysi* mantêm-se como órgãos pares, alongados e difusos, localizados longitudinalmente na região dorsal da cavidade celomática. Estão presos à parede dorsal desta cavidade por uma fina membrana de tecido conjuntivo – o mesovário. Macroscopicamente, esse padrão estrutural é mantido até a completa diferenciação da gônada, variando apenas na coloração do tecido gonadal conforme os diferentes graus de desenvolvimento, sendo mais translúcido inicialmente, tornando-se mais esbranquiçado e/ou amarelado e vascularizado, conforme a progressão do desenvolvimento oocitário.

Em *Tanichthys albonubes* e *Gymnocorymbus ternetzi* a etapa que compreende a primeira foliculogênese é bastante rápida. Assim, com apenas 44 e 50 dias pós-fertilização, respectivamente, a gônada apresenta uma espessura ainda delgada quando os oócitos diplotênicos iniciais, já individualizados pelas células foliculares, entram em crescimento primário (Fig. 9, 10).

Em *Corydoras schwartzi* este processo mostra-se mais lento. A gônada permanece por um longo período, de 130 a 150 dias pós-fertilização, apresentando apenas cistos de oogônias (Fig. 11A,B) e de oócitos profásicos (Fig. 11C,D). Estes cistos, espaçados entre si por um tecido intersticial desenvolvido que responde positivamente ao PAS, aumentam em número, aumentando a espessura e volume da gônada (Fig. 11A-E). Com 160 dias pós-fertilização, os oócitos diplotênicos entram em crescimento primário, porém ainda há predominância dos cistos germinativos e a gônada ainda é compacta (Fig. 11F,G).

1.2. O tecido gonadal no Percomorpha durante a Foliculogênese

Os primeiros indícios da diferenciação ovariana nos *Percomorpha* foram observados em animais com 30 dias pós-fertilização.

Durante todo o período de diferenciação ovariana, os ovários de *Amatitlania nigrofasciata* mantêm-se como órgãos pares, alongados, levemente achatados, localizados longitudinalmente na região dorsal da cavidade celomática. Estão presos à parede dorsal desta cavidade pelo mesovário. Macroscopicamente, esse padrão estrutural é mantido até a completa diferenciação da gônada, variando apenas na coloração do tecido gonadal conforme os

diferentes graus de desenvolvimento, sendo mais translúcido inicialmente, tornando-se mais amarelado e vascularizado, conforme se dá a progressão do desenvolvimento oocitário.

Nos cortes histológicos, o tecido gonadal feminino, em animais com 30 dias pós-fertilização, é uma estrutura filiforme, delgada e compacta, formada por oogônias dispersas por toda a gônada entre células somáticas (Fig. 12, 13A). Não há nenhuma cavidade ovariana formada nesta fase (Fig. 12). Na região posterior, próxima à papila urogenital, o tecido gonadal desemboca no ducto renal (Fig. 12).

As oogônias que se comprometem com a gametogênese são envolvidas por processos citoplasmáticos das células somáticas formando um cisto. As oogônias no interior do cisto proliferam e entram em prófase meiótica, originando os primeiros oócitos leptotênicos (Fig. 13A,B).

Em animais com 37 dias pós-fertilização, os cistos de oócitos aumentam em quantidade, bem como a espessura e comprimento da gônada. As oogônias apresentam-se em menor quantidade e oócitos leptotênicos, zigotênicos, paquitênicos e diplotênicos iniciais são facilmente identificáveis (Fig. 13C-G).

A gônada ainda compacta passa a apresentar uma grande quantidade de oócitos em crescimento primário e se mantém com as mesmas características histológicas, até o animal completar 90 dias pós-fertilização (Fig. 14).

1.3.O tecido gonadal no *Atherinomorpha* durante a *Foliculogênese*

Os primeiros indícios da diferenciação ovariana em *Poecilia reticulata* foram observados em animais no estágio 4, entre 18 e 24 dias pós-fertilização, nos quais as gônadas, compostas apenas por oogônias distribuídas de forma homogênea por todo tecido gonadal, mantêm-se ainda como órgãos pares (Fig. 15A,B).

O tecido gonadal é alongado e retilíneo na regiões periféricas, sendo delimitado por células somáticas. Ao final do estágio 4, em cortes histológicos transversais, as gônadas pares sofrem fusão parcial, tendo início pela região posterior, próxima à papila urogenital (Fig. 15C,D). Na porção anterior, nota-se ainda duas gônadas separadas (Fig.15F,G). A entrada das oogônias em meiose coincide com o início da fusão das gônadas em desenvolvimento (Fig. 15H-K).

No estágio 5, durante a última semana de gestação, as gônadas ainda parcialmente separadas sofrem fusão total nos últimos dias antes do nascimento. Nas gônadas ainda separadas notam-se um aumento do número de oócitos diplotênicos iniciais em relação ao estágio anterior (Fig. 16).

A fêmea, ao nascer, 30 dias pós-fertilização, apresenta um ovário único, alongado, maior, formado por oogônias indiferenciadas, oogônias diferenciadas, cistos de oócitos profásicos, e oócitos em crescimento primário nos folículos ovarianos (Fig. 17). A gônada ainda é uma estrutura compacta, não apresentando lúmen, tampouco epitélio germinativo definido (Fig. 17).

2. FORMAÇÃO DO CISTO-OVÁRIO

A constituição do ovário como um órgão cavitário e, portanto, a formação do lúmen ovariano é anterior à formação completa das lamelas ovígeras em todas as espécies analisadas. Porém, dependendo da espécie, pode ser concomitante à constituição do epitélio germinativo. Em todos os casos, o fechamento do órgão é gradual e pode ser acompanhado através de secções transversais, apresentando variações dos eventos envolvidos, de acordo com a espécie estudada.

2.1. Formação da cavidade ovariana nos *Otophysi*

Em *Tanichthys albonubes* e *Gymnocorymbus ternetzi*, 44 e 50 dias pós-fertilização, respectivamente, concomitante ao início da entrada do oócito em crescimento primário, o tecido gonadal, até então compacto, passa a apresentar projeções teciduais laterais a partir da proliferação de células somáticas na periferia do tecido gonadal.

Em *Tanichthys albonubes*, através dos cortes transversais, pode-se acompanhar o crescimento de lâminas teciduais, em ambos os lados do ovário, em direção à porção dorsal da gônada (Fig 18). Durante o crescimento das lâminas teciduais, estas acabam por encontrar o epitélio do mesentério, na região dorsal, no qual a gônada encontra-se apoiada (Fig. 18A-D). Dessa forma, as lâminas teciduais fundem-se ao mesotélio e encerram o ovário em um espaço – antes cavidade celomática – agora, cavidade ovariana. Nesta etapa, nota-se que as oogônias e os cistos germinativos imersos no tecido gonadal ainda compacto, concentram-se na periferia, junto à cavidade ovariana recém-formada, enquanto que os oócitos em crescimento primário

ocupam a região oposta (Fig. 18E-L). Este é o primeiro indício da formação do epitélio germinativo em *Tanichthys albonubes*.

Em *Gymnocorymbus ternetzi*, as lâminas teciduais crescem a partir de um único lado da gônada (Fig. 18M-P). Assim, ocorre proliferação das células somáticas formando uma lâmina tecidual que cresce ventralmente até encontrar o outro lado da gônada, fechando parte da cavidade celomática e delimitando agora uma cavidade ovariana.

Em *Corydoras schwartzi*, a formação da cavidade ovariana é resultado de uma reorganização de componentes somáticos no interior do tecido gonadal, durante a formação das lamelas ovígeras. Dessa forma, nesta espécie, a formação da cavidade ovariana é concomitante à formação das lamelas ovígeras e ocorre aos 180 dias pós-fertilização.

2.2. Formação da cavidade ovariana no Percomorpha

Em *Amatitlania nigrofasciatus*, aos 90 dias pós-fertilização, nota-se em cortes transversais, o início da formação do lúmen ovariano (Fig. 19). Células somáticas epiteliais acumulam-se e projetam-se lateralmente em ambos os lados do ovário, formando lâminas que gradativamente aumentam em comprimento em direção à região ventral do ovário. Esses apêndices laterais na periferia do tecido gonadal, ao se contatarem, fundem-se e encerram parte da cavidade celomática, agora, a cavidade ou lúmen ovariano (Fig. 19).

2.3. Formação da cavidade ovariana no Atherinomorpha

No período entre 1 e 12 dias pós-nascimento, que antecede a formação da cavidade ovariana o ovário aumenta significativamente em tamanho. Torna-se uma estrutura ovalada e pouco alongada. A proliferação de oogônias é intensa, assim como a entrada das células germinativas em meiose. Os cistos germinativos aumentam consideravelmente e os oócitos em crescimento primário atingem seu tamanho máximo.

Há uma reorganização estrutural das células no interior da gônada. Os oócitos em crescimento primário se estabelecem na região periférica e ventral do ovário, enquanto que as oogônias e cistos germinativos concentram-se na porção central, voltadas para a região dorsal (Fig. 20A,B).

Aos 12 dias pós-nascimento, inicia-se a formação da cavidade ovariana em *Poecilia reticulata* e consequentemente o epitélio germinativo começa a ser definido (Fig. 20). Em cortes transversais, nota-se a proliferação de células somáticas em ambos os lados periféricos do tecido gonadal, formando lâminas teciduais que crescem para a região dorsal do ovário (Fig. 20A,B), em direção à bexiga natatória, encerrando parte da cavidade celomática (Fig. 20). Na região dorsal, uma das lâminas teciduais de células somáticas fecha-se sobre a metade do ovário, originando uma cavidade ovariana (Fig. 20C,D). A lâmina tecidual do lado oposto continua seu crescimento, fechando-se dorsalmente até encontrar a outra lâmina tecidual (Fig. 20E,F). Com isso, formam-se duas cavidades ovarianas, as quais correspondem aos dois ductos ovarianos, um esquerdo e um direito, correspondente aos ovários que se fusionaram durante a morfogênese gonadal e que agora encontram-se fundidos em uma única estrutura (Fig. 20F).

Este septo de células somáticas que divide as duas cavidades ovarianas rompe-se na região caudal do ovário, dando origem a um ducto ovariano único (Fig. 20G-J). O ducto ovariano torna-se contínuo até a papila urogenital, porém apresenta duas porções com formações distintas. A primeira, no interior da gônada, forma-se a partir das lâminas teciduais do ovário, e a segunda, externa à gônada, forma-se também por fechamento de lâminas teciduais, porém, a partir da proliferação de células do mesentério (Fig. 21).

3. FORMAÇÃO DAS LAMELAS OVÍGERAS E O ESTABELECIMENTO DO EPITÉLIO GERMINATIVO

3.1. Formação das lamelas ovígeras nos *Otophysi*

Tanto em *Tanichthys albonubes* como em *Gymnocorymbus ternetzi* a formação das lamelas ovígeras inicia-se aos 60 dias pós-fertilização. Nesta fase, em ambas as espécies, há grande quantidade de oócitos em crescimento primário, além de oogônias e cistos de oócitos profásicos. Durante a formação das lamelas ovígeras, perpendicularmente ao tecido gonadal, células somáticas na região dorsal da gônada em *Tanichthys albonubes* (Fig. 22) e da região ventral em *Gymnocorymbus ternetzi* (Fig. 23) reorganizam-se, criando fileiras paralelas entre si no interior da gônada. Estas fileiras de células, ao se afastarem, formam invaginações ao

longo do ovário, delimitando, assim, as lamelas ovíferas. Esses espaços interlamelares formados tornam-se cada vez mais profundos. Gradualmente, as lamelas aumentam em tamanho e projetam-se para a região dorsal nos *Tanichthys albonubes* e para a região ventral nos *Gymnocorymbus ternetzi*. Na região de projeção e formação das lamelas ovíferas, células somáticas periféricas ao tecido gonadal reorganizam-se formando um epitélio que margeia as lamelas recém-formadas. Este epitélio recém-formado isola as células germinativas do lúmen interlamelar. Assim, oogônias aprisionadas entre as células epiteliais constituem agora o epitélio germinativo feminino (Fig. 22, 23).

Em *Corydoras schwartzi*, 180 dias após a fertilização, os componentes somáticos, no interior do tecido gonadal, sofrem uma reorganização, originando um alinhamento das células somáticas que percorre toda a extensão longitudinal da gônada (Fig. 24A-C). Assim, em cortes longitudinais, notam-se diversas fileiras duplas paralelas entre si e longitudinais ao tecido gonadal, desde a região cranial até a região caudal da gônada. Essas fileiras afastam-se gradativamente entre si (Fig. 24D), originando um pequeno espaço que se torna cada vez mais proeminente (Fig. 24E). Com o afastamento de diversas fileiras paralelas longitudinais de células somáticas para formação do lúmen ovariano, o tecido gonadal é separado longitudinalmente em sua região centro-medial (Fig. 24F-H), tornando-se pregueado. Assim, formam-se diversas pregas paralelas longitudinais, cada qual delimitada pelas células somáticas que as originaram, compondo os primórdios das lamelas ovíferas.

No interior de cada lamela ovífera recém-formada, as oogônias e cistos germinativos reorganizam-se e migram para a periferia lamelar, associando-se às células somáticas epiteliais que compõem a borda de cada lamela ovífera, constituindo, assim, o epitélio germinativo feminino de *Corydoras schwartzi* (Fig. 24H-J).

3.2. Formação das lamelas ovíferas no *Percomorpha*

Aos 100 dias pós-fertilização as lamelas ovíferas de *Amatitlania nigrofasciatus* começam a ser definidas. Células somáticas presentes no tecido gonadal organizam-se de modo a criar espaços interlamelares entre o tecido gonadal (Fig. 25A). Inicialmente, as lamelas ovíferas têm formato pouco acentuado, porém aumentam gradativamente no tecido gonadal, formando lamelas ovíferas bastante proeminentes. Com a reorganização do tecido

gonadal, passando de uma gônada compacta para uma gônada provida de lamelas ovígeras, o epitélio germinativo feminino é estabelecido. Entre células somáticas epiteliais, aprisionam-se oogônias que irão compor o epitélio germinativo (Fig. 25B). A partir daí, novos nichos de proliferação celular encontram-se definidos.

3.3. Formação das lamelas ovígeras no *Atherinomorpha*

Em *Poecilia reticulata* não ocorre o desenvolvimento de lamelas ovígeras como nos demais Teleostei aqui estudados.

As células somáticas que delimitam o lúmen ovariano são, inicialmente, pavimentosas, mas tornam-se gradativamente cúbicas e posteriormente cilíndricas (Fig. 26A-D). No tecido gonadal voltado para a cavidade ovariana, a reorganização que se segue faz com que oogônias se associem às células somáticas pavimentosas – pré-foliculares – que se interpõem entre as células somáticas cilíndricas do epitélio do ducto ovariano. Como consequência dessa reorganização, o epitélio germinativo feminino em *Poecilia reticulata* está estabelecido.

A cavidade ovariana, revestida por um epitélio simples prismático, até então retilínea, passa gradualmente a apresentar criptas ao longo de todo ovário. Essas criptas formam inúmeras invaginações e reentrâncias que terminam em fundo cego e que se projetam em direção aos ninhos de células germinativas. Assim, o epitélio germinativo passa a margear a cavidade e ducto ovariano (Fig. 26E-H, 27).

4. FORMAÇÃO DO ESTROMA OVARIANO

Em todas as espécies, o estroma ovariano inicia sua diferenciação após a entrada dos oócitos em meiose e início do crescimento primário, portanto, após a formação do lúmen ovariano e concomitante à formação das lamelas ovígeras (Fig. 28). Embora algumas espécies como *Corydoras schwanzi* e *Gymnocorymbus ternetzi* apresentem componentes intersticiais já bastante desenvolvidos em etapas iniciais do processo de diferenciação, ainda assim o estroma ovariano só é estabelecido posteriormente.

O tecido gonadal, nesta etapa, é formado por oogônias isoladas, cistos de oogônias e oócitos, folículos ovarianos e uma grande quantidade de células somáticas.

As células somáticas com aspecto fusiforme, núcleo basófilo e citoplasma escasso, localizam-se em duas regiões específicas: na periferia do tecido gonadal, delimitando-o, e no interior do tecido gonadal, dispersas entre as células germinativas. As células somáticas dispersas no interior das lamelas afastam-se gradativamente uma das outras resultando na formação de espaços extravasculares (Fig. 28C,D), preenchidos por uma substância que responde levemente ao PAS e ao Azul de Toluidina, portanto, de natureza polissacarídica. Forma-se assim o estroma ovariano, constituído por um tecido conjuntivo frouxo, no qual além das células somáticas inicialmente presentes, são encontradas células mesenquimais indiferenciadas, fibrilas de colágeno e vasos sanguíneos. As células mesenquimais de formato estrelado conectam-se uma às outras por prolongamentos citoplasmáticos formando uma rede no interior do tecido gonadal.

Estas células, após a formação da membrana basal, projetam-se em direção aos folículos recém-formados até os contatarem, circundando-os e dando origem às células pretecais, formando a teca ao redor de cada folículo (Fig. 28E,F; 29), exceto na região em que a membrana basal das células foliculares e do epitélio germinativo estão unidas. Dessa forma, entre as células foliculares e a teca encontra-se a membrana basal (Fig. 29).

5. O COMPARTIMENTO INTERSTICIAL E O COMPARTIMENTO GERMINATIVO

Nas cinco espécies analisadas, o compartimento germinativo é separado do compartimento intersticial desde as primeiras etapas da diferenciação gonadal feminina. Em *Tanichthys albonubes* (Fig. 30), *Gymnocorymbus ternetzi* (Fig. 31) e *Amatitlania nigrofasciatus* (Fig. 33) uma membrana basal circunda os componentes germinativos, constituídos por oogônias e oócitos profásicos de forma contínua.

Em *Corydoras schwartzi*, as oogônias e cistos de oócitos profásicos, circundados por células somáticas, são individualizados pela membrana basal em vários conjuntos distintos ao longo do tecido gonadal (Fig. 32).

Em todas as espécies, durante a formação do folículo ovariano, a membrana basal é sintetizada gradativamente individualizando cada folículo. Observa-se com frequência uma membrana basal única sendo compartilhada por dois folículos ovarianos (Fig. 32J, 33F).

Em *Tanichthys albonubes*, as células foliculares do oócito em crescimento primário iniciam a deposição da membrana basal de forma pontual. Assim, sob cada célula folicular, nota-se a formação de pequenos segmentos de membrana basal, que, posteriormente, ao se unirem, circundam completamente o oócito (Fig. 30A-G).

Em todas as espécies, após a formação do lúmen ovariano e das lamelas ovígeras, células somáticas periféricas ao tecido gonadal reorganizam-se formando um epitélio que margeia as lamelas recém-formadas. Este epitélio recém-formado, agora apoiado sobre uma membrana basal, isola as células germinativas do lúmen interlamelar e as separa do estroma ovariano. Assim, oogônias aprisionadas entre as células epiteliais constituem agora o epitélio germinativo feminino (Fig. 30I, 31F, 32H,I, 33F, 35D). Oogônias em proliferação formam aglomerados celulares que são invadidos por células derivadas do epitélio. Nestes aglomerados celulares as oogônias são circundadas pelas células epiteliais formando cistos. Nos cistos, as oogônias dividem-se por mitose e entram em meiose dando origem aos oócitos. Estes sítios de proliferação e diferenciação celular e posterior formação dos folículos ovarianos constituem ninhos de células germinativas.

Neste período de diferenciação ovariana, a membrana basal torna-se contínua ao longo do epitélio, sendo compartilhada em uma pequena extensão entre os folículos ovarianos recém-formados e o epitélio germinativo propriamente dito recém-formado. Os folículos ovarianos projetam-se gradativamente para o estroma ovariano, abandonando os cistos. Abaixo do epitélio, dispõem-se os componentes do estroma ovariano como células mesenquimais, fibroblastos e vasos sanguíneos. Dessa forma, a membrana basal separa os dois compartimentos ovarianos: o germinativo, composto pelas células somáticas epiteliais e células germinativas; e o intersticial, formado pelos componentes do estroma ovariano.

Já na gônada compacta de *Poecilia reticulata*, inicialmente uma membrana basal circunda os primeiros cistos germinativos de forma incompleta (Fig. 34A-F). Com o avanço da diferenciação gonadal, os cistos, circundados por células somáticas, são individualizados em vários conjuntos ao longo do tecido gonadal. Com a entrada em crescimento primário, os oócitos deixam os cistos, mas ainda continuam envoltos pela mesma membrana basal que ora circundava seu cisto de origem (Fig. 34). Gradativamente, cada oócito envolto pelas células foliculares, é circundado individualmente por uma membrana basal (Fig. 34, 35).

6. A ESTRUTURA OVARIANA APÓS A DIFERENCIAÇÃO GONADAL: O EPITÉLIO GERMINATIVO PERMANENTEMENTE ATIVO E DESENVOLVIMENTO OOCITÁRIO

Após a diferenciação gonadal, o epitélio germinativo feminino é encontrado margeando tanto as lamelas ovígeras nos *Otophysi* e *Percomorpha*, como o ducto ovariano no *Atherinomorpha*. Apoiado sobre uma membrana basal, o epitélio germinativo, em todas as espécies, é formado por células somáticas epiteliais, com núcleo basófilo e as células germinativas femininas, as oogônias. Estas estão localizadas, ao longo do epitélio germinativo, isoladas ou formando aglomerados celulares, resultantes da proliferação celular. As oogônias são circundadas pelas células epiteliais formando cistos. Nos cistos, as oogônias dividem-se por mitose e entram em meiose dando origem aos oócitos. Nestes sítios de proliferação e diferenciação celular dar-se-á a formação dos folículos ovarianos, em um epitélio, agora, permanentemente ativo.

Ao fim do crescimento primário, a zona pelúcida é sintetizada entre o oócito e as células foliculares. O oócito encontra-se agora envolto pela zona pelúcida, células foliculares, membrana basal e células da teca, oriundas do estroma ovariano. Assim, o complexo folicular está totalmente formado. A zona pelúcida é uma camada acelular, glicoproteica que responde positivamente ao PAS em todas as espécies.

6.1. Desenvolvimento Oocitário nos *Otophysi*

Nos animais totalmente diferenciados, os ovários dos *Otophysi* estudados mantêm-se como órgãos pares, alongados, localizados longitudinalmente na região dorsal da cavidade celomática, presos à parede dorsal da cavidade, pelo mesovário.

Cada um dos ovários apresenta uma cavidade ovariana, a qual é contínua com os gonoductos. Estes se unem caudalmente e desembocam na papila urogenital, caracterizando um ovário do tipo cisto-ovário. Os ovários apresentam externamente uma cápsula de tecido conjuntivo – a túnica albugínea – que se projeta em direção à cavidade ovariana, sendo delimitado pelas lamelas ovígeras.

Em cortes transversais, *Tanichthys albonubes* apresenta lamelas ovígeras apenas em um dos lados do ovário, na região ventral, voltadas para a região dorsal do animal.

Em *Gymnocorymbus ternetzi* e *Corydoras schwartzi* as lamelas ovíferas ocupam toda a extensão circular do ovário, mostrando-se mais proeminentes em *Gymnocorymbus ternetzi*.

Durante o desenvolvimento oocitário dos Otophysi (Fig. 36, 37, 38) pequenas vesículas começam a ser formadas no citoplasma, junto à membrana do oócitos, constituindo os alvéolos corticais. Os alvéolos corticais, inicialmente dispersos pelo citoplasma dos oócitos, ocupam posição periférica quando o oócito atinge seu crescimento secundário. Em *Tanichthys albonubes* e *Corydoras schwartzi* os alvéolos corticais apresentam resposta bastante intensa ao PAS, devido à sua natureza polissacarídica. Ao entrar em crescimento secundário, o núcleo do oócito apresenta contorno irregular e nucléolos junto às chanfraduras do envoltório nuclear (Fig. 36E-H, 37J-K). Gradualmente inicia-se a deposição de grânulos de vitelo (Fig. 36F-H, 37J-K).

Em *Tanichthys albonubes* e *Gymnocorymbus ternetzi* durante todo o desenvolvimento oocitário, as células foliculares permanecem pavimentosas, enquanto que em *Corydoras schwartzi* tornam-se cúbicas e colunares. Ao final do crescimento secundário, o oócito aumenta drasticamente seu tamanho pelo crescente acúmulo de grânulos de vitelo, especialmente em *Corydoras schwartzi*. O núcleo torna-se excêntrico, posicionando-se sob a micrópila. Ao final da maturação, o oócito é liberado do complexo folicular. As células foliculares e tecais permanecem conectadas ao epitélio germinativo, constituindo o complexo pós-ovulatório (ver Fig. 36, 37, 38).

As fêmeas de *Tanichthys albonubes* e *Gymnocorymbus ternetzi* estão aptas a desovar após 180 dias pós-fertilização. Porém, a desova em *Gymnocorymbus ternetzi* é altamente influenciada pelas condições ambientais. Já para *Corydoras schwartzi* não foi possível detectar com que idade este se torna apto a desovar.

6.2. Desenvolvimento Oocitário no Percomorpha

Os ovários de *Amatitlania nigrofasciata* de animais com mais de 120 dias pós-fertilização mantêm-se como órgãos pares, alongados e cilíndricos, sendo levemente achatados dorso-ventralmente. Cada um dos ovários apresenta uma cavidade ovariana, a qual é contínua com os gonoductos. Estes se unem caudalmente e desembocam na papila urogenital. Os ovários apresentam externamente uma cápsula de tecido conjuntivo – a túnica albugínea –

bastante espessa e resistente que se projeta em direção à cavidade ovariana, sendo delimitados pelas lamelas ovígeras.

Durante o desenvolvimento oocitário (Fig. 39, 40), pequenas vesículas começam a ser formadas no citoplasma, junto à membrana do oócitos de *Amatitlania nigrofasciata*, constituindo os alvéolos corticais, PAS positivos (Fig. 39B). Após o aparecimento de alvéolos corticais, ocorre um acúmulo de gotículas de lipídeos no oócito em crescimento secundário que se sucede, posteriormente, junto à deposição de vitelo (Fig. 40C), distribuindo-se por todo o citoplasma do oócito, por entre os grânulos de vitelo (Fig. 40D-F).

Ao entrar em crescimento secundário, o núcleo do oócito apresenta contorno irregular e nucléolos periféricos (Fig. 40D-F). Gradualmente inicia-se a deposição de grânulos de vitelo (Fig. 40D-F). O epitélio germinativo, como nas outras espécies, é permanentemente ativo, e a foliculogênese ocorre à semelhança a que ocorre na gônada em diferenciação (Fig. 39).

Com 150 dias pós-fertilização, as fêmeas de *Amatitlania nigrofasciata* estão aptas a desovar.

6.3. Desenvolvimento Oocitário no Atherinomorpha

Os ovários de adultos de *Poecilia reticulata* são órgãos únicos (Fig. 41A-C), arredondados, localizados longitudinalmente na região dorsal da cavidade celomática, ocupando, principalmente a região caudal. Um ovário único apresenta duas cavidades ovarianas, as quais tornam-se únicas na porção caudal e contínua com o gonoduto.

Nesta espécie, os oócitos em crescimento primário iniciam a deposição de gotículas de lipídeo (Fig. 41D). Vesículas citoplasmáticas com resposta negativa ao PAS – os alvéolos corticais – também se formam na periferia do oócito. Em contrapartida, os grânulos de vitelo respondem fortemente ao PAS e à eosina, devido à sua natureza glicoprotéica; estes se acumulam gradativamente no citoplasma do oócito (Fig. 41). Ao final da maturação oocitária, os grânulos de vitelo de *Poecilia reticulata* fundem-se e se tornam fluidos, formando uma massa homogênea de vitelo (Fig. 41N). Ao final do crescimento secundário do oócito, as gotas de lipídeos que ora espalhavam-se por entre os grânulos de vitelo, concentram-se agora ao redor do núcleo (Fig. 41M), unindo-se, posteriormente em gotas maiores, porém, individualizadas (Fig. 41N).

Com 90 dias pós-fertilização, as fêmeas estão aptas a desovar. Em fêmeas fecundadas, os embriões desenvolvem-se no interior dos folículos ovarianos e o lúmen ovariano torna-se temporariamente obliterado (Fig. 41C) até o nascimento dos filhotes.

V. DIFERENCIAÇÃO TESTICULAR

I. ASPECTOS ESTRUTURAIS E ULTRAESTRUTURAS DAS CÉLULAS TESTICULARES

Nos três grupos analisados, Otophysi, Percomorpha e Atherinomorpha, os processos envolvidos na diferenciação testicular são bastante distintos entre si quando se considera os mecanismos que levam à formação dos diferentes tipos de organização testicular. Porém, os tipos celulares envolvidos em qualquer um dos processos, bem como suas características morfológicas e interações célula-célula, são bastante semelhantes. Assim, as características morfológicas que distinguem os tipos celulares presentes no tecido gonadal nas cinco espécies estudadas são:

Espermatogônias Primárias: são células esféricas ou ovaladas, extremamente grandes sendo as maiores células da linhagem germinativa masculina. Seu citoplasma é acidófilo apresentando mitocôndrias esféricas com cristas tubulares, frequentemente associadas às granulações eletron-densas correspondentes às “núages”. Têm núcleo grande, esférico, volumoso com cromatina finamente granulada, geralmente com um único nucléolo bem evidente. Apresentam também uma grande quantidade de retículo endoplasmático e vesículas dispersas em seu citoplasma (Fig. 42A,B).

Espermatogônias Secundárias: são células menores do que as espermatogônias primárias e ocorrem em grupos de número variável no interior dos cistos, resultantes da divisão mitótica da espermatogônia primária. Possuem núcleo esférico com cromatina difusa também finamente granulada, com dois ou mais nucléolos (Fig. 42A,C).

Células Pré-Sertoli: apresentam núcleo basófilo, triangular, citoplasma escasso e estão fortemente unidas umas às outras por inúmeros desmossomos. Apresentam projeções citoplasmáticas que se interpõem gradativamente entre as espermatogônias. Dessa forma, as espermatogônias são gradual e individualmente envolvidas por expansões citoplasmáticas das

agora células de Sertoli, formando cistos delimitados, portanto, pelos prolongamentos citoplasmáticos das células de Sertoli.

Células de Sertoli: apresentam as mesmas características nucleares da célula pré-Sertoli. São as responsáveis pela formação e sustentação do cisto germinativo. Seus prolongamentos citoplasmáticos conectam-se através de complexos juncionais, principalmente desmossomos, formando gradativamente uma barreira hemato-testicular. Possuem sistema de endomembranas desenvolvido e mitocôndrias eletron-densas alongadas (Fig. 42A,D).

Células de Leydig: são células intersticiais (Fig. 42A-inset) que apresentam heterocromatina difusa, nucléolo evidente e retículo endoplasmático desenvolvido. São identificadas por suas mitocôndrias características com grande quantidade de cristas tubulares, lembrando o formato de favo de mel (Fig. 42E).

Espermatócitos: são ainda menores que as espermatogônias secundárias, têm núcleo basofílico com cromatina caracteristicamente compactada e não possuem nucléolo. Podem ser identificados pelas figuras de divisão celular. Encontram-se geralmente em zigóteno e paquíteno da prófase I, ou em metáfase I da meiose. Seu citoplasma escasso apresenta mitocôndrias alongadas e bastante eletron-densas, retículo endoplasmático e complexo de Golgi. Os espermatócitos em zigóteno possuem núcleo central, cromatina heterogênea e observam-se a formação de elementos laterais do complexo sinaptonêmico junto ao envoltório nuclear. Nos espermatócitos em paquíteno, notam-se os complexos sinaptonêmicos já formados e os cromossomos tornam-se mais compactados (Fig. 42A,F).

Espermátides: são pequenas células esféricas com citoplasma bastante reduzido e flagelo em formação. Seu núcleo, com cromatina em compactação, decresce gradualmente em diâmetro ao longo da espermatogênese, sendo encontradas em diferentes etapas da espermiogênese (Fig. 42A,G).

Espermatozóides: são as menores células da linhagem germinativa. Caracterizam-se por apresentar um longo flagelo e núcleo arredondado nos Otophysis e Percomorpha (Fig. 42A), e núcleo alongado no Atherinomorpha todos com cromatina altamente compactada, a qual se cora intensamente pela hematoxilina.

2. A DIFERENCIAÇÃO TESTICULAR NOS OTOPHYSI

As três espécies analisadas apresentam diferenciação gonadal bastante distintas, sendo *Tanichthys albonubes* e *Corydoras schwartzi* gonocorísticos diretos, enquanto que *Gymnocorymbus ternetzi* é gonocorístico indireto do tipo protogínico.

Durante o início da diferenciação gonadal, os testículos de *Tanichthys albonubes*, *Corydoras schwartzi* e *Gymnocorymbus ternetzi* são órgãos pares, bastante delgados, alongados e filiformes. Têm o formato de um tubo e localizam-se longitudinalmente na região dorsal da cavidade celomática. Estão presos à parede dorsal desta cavidade por uma fina membrana de tecido conjuntivo – o mesórquio.

Ao longo do processo de diferenciação, os testículos de *Tanichthys albonubes* e *Gymnocorymbus ternetzi* apresentam pequenas mudanças na morfologia e coloração. Tornam-se mais achatados com pequenas reentrâncias ao longo dos testículos, as quais se acentuam gradativamente com o desenvolvimento gonadal. Sua coloração passa de um tecido transparente para uma coloração homogênea esbranquiçada. Na extremidade caudal os testículos unem-se em um gonoducto único o qual desemboca na papila urogenital.

Já os testículos de *Corydoras schwartzi* mantêm uma morfologia tubular, ao longo da diferenciação gonadal, passando a um formato saculiforme, livre de reentrâncias, no final da diferenciação gonadal. Apresenta uma coloração esbranquiçada e opaca. Na porção caudal, próximo à papila urogenital, surge gradualmente uma dilatação, de coloração translúcida, correspondendo a um par de vesículas seminais conectadas ao restante do tecido gonadal.

2.1. Formação do Túbulo Testicular e o Epitélio Germinativo em Tanichthys albonubes

Os primeiros indícios da diferenciação testicular em *Tanichthys albonubes* foram observados em animais com 60 dias pós-fertilização.

Nos cortes histológicos, a gônada indiferenciada (Fig. 43), ainda filiforme, aumenta gradualmente em espessura e comprimento. Com o processo de diferenciação gonadal, as células germinativas primordiais (CGPs), bem como as células somáticas, proliferam e se diferenciam em espermatogônias e células pré-Sertoli, respectivamente (Fig. 43A-D).

Apresentando uma intensa atividade mitótica nesta fase, as espermatogônias aumentam em quantidade e se reorganizam no tecido gonadal, formando grupamentos celulares de espermatogônias (Fig 43E-G).

As células pré-Sertoli apresentam projeções citoplasmáticas que se interpõem gradativamente entre as espermatogônias. Assim, as espermatogônias são gradual e individualmente envolvidas por expansões citoplasmáticas das agora células de Sertoli, formando cistos, delimitados, portanto, pelos prolongamentos citoplasmáticos das células de Sertoli. As células de Sertoli podem participar da formação de mais de um cisto, ou ainda, um único cisto pode ser envolvido por mais de uma célula de Sertoli, que prolifera conforme este aumenta em volume.

Aos 70 dias pós-fertilização, os cistos recém-formados agrupam-se em inúmeros conjuntos de células que se distribuem ao longo da gônada, interpostos por células somáticas. Gradativamente, os cistos de espermatogônias que constituem um mesmo conjunto, afastam-se uns dos outros, criando um pequeno espaço central entre eles, formando assim os primeiros túbulos testiculares (Fig. 44). Pequenos túbulos testiculares, formados por cistos de espermatogônias podem se anastomosar com túbulos testiculares adjacentes, formando um espaço único e pouco maior, denominado agora de compartimento luminal. O compartimento luminal, portanto, passa agora a ser delimitado por cistos de espermatogônias, apoiados em uma membrana basal. Conseqüentemente, o epitélio germinativo masculino é estabelecido (Fig. 44).

2.2. Espermatogênese em Tanichthys albonubes

As espermatogônias encontram-se agora localizadas no epitélio germinativo já estabelecido. Assim, após essa organização das células espermatogênicas em cistos no epitélio germinativo, inicia-se a espermatogênese, em animais com 73 dias pós-fertilização.

No início da espermatogênese, nota-se a presença de cistos contendo apenas espermatogônias e espermatócitos (Fig. 44). Não há ainda a formação de espermatozóides e os túbulos testiculares encontram-se vazios.

Nos animais com 75 dias pós-fertilização o número de cistos contendo diversas células germinativas em uma mesma etapa de desenvolvimento (espermatogônias, espermatócitos e

espermátides) aumenta consideravelmente, em razão de uma atividade meiótica intensa. A espermiogênese completa-se. Esta etapa é extremamente rápida e o início da produção de espermatozóides é bastante precoce, sendo os espermatozóides liberados para o lúmen testicular (Fig. 45).

Em animais com mais de 80 dias pós-fertilização, os testículos apresentam um maior tamanho em comprimento, porém sua espessura ainda é reduzida. Notam-se cistos em diferentes fases da espermatogênese. As espermatogônias, espermatócitos e espermátides ocorrem em quantidade moderada. O lúmen dos túbulos testiculares passa a ser totalmente preenchido por espermatozóides, porém o epitélio germinativo é contínuo (Fig. 46, 47A-D).

Aos 90 dias pós-fertilização, após intensa espermiogênese, gradativamente os cistos se rompem; o epitélio germinativo torna-se descontínuo e o compartimento luminal é totalmente preenchido por espermatozóides. Os túbulos testiculares tornam-se anastomosados principalmente na região dorsal do testículo, formando o ducto espermático (Fig. 47E-G). Nesses testículos, o compartimento intersticial é ainda bastante reduzido e pouco desenvolvido, porém o animal já se encontra apto à reprodução.

2.3. Formação do Túbulo Testicular e o Epitélio Germinativo em *Gymnocorymbus ternetzi*

Gymnocorymbus ternetzi apresenta diferenciação gonadal gonocórica indireta do tipo protogínica, ou seja, todos os indivíduos, inicialmente, apresentam desenvolvimento de um tecido ovariano.

Nesta etapa, entre 37 e 42 dias pós-fertilização, observam-se dois tipos de tecidos ovarianos: o primeiro, caracteristicamente feminino, e o segundo, com uma grande quantidade de granulócitos no tecido intersticial (Fig. 48A,B). Nestas gônadas, progressivamente, entre 42 e 50 dias pós-fertilização, em torno de 50% dos indivíduos apresentaram remodelação do tecido gonadal, caracterizado pela redução do número de oócitos, oócitos irregulares e oócitos em degeneração (Fig. 48D-G). Nestas gônadas, as células somáticas aumentam consideravelmente, fazendo com que os oócitos tornem-se cada vez mais distantes uns dos outros (Fig 48D).

Em animais com 50 dias pós-fertilização, os primeiros sinais de apoptose aparecem ao longo de todo tecido gonadal e células fagocíticas infiltram-se cada vez mais por entre as

células estromais (Fig. 48). O restante dos indivíduos da população apresenta ovários com desenvolvimento gonadal sem sinais de alterações, com número crescente de oócitos, crescimento oocitário normal e aumento da gônada. Dessa forma, o tecido gonadal supostamente masculino mostra-se com um tamanho menor, quando comparado aos ovários claramente femininos de indivíduos com uma mesma idade.

Após 55 dias pós-fertilização, foram observadas gônadas em transição, com características femininas e masculinas, em um mesmo tecido gonadal (Fig. 49). Cistos de oócitos leptotênicos misturam-se aos primeiros cistos de espermatogônias. Os oócitos diplotênicos diminuem cada vez mais e surgem pequenos espaços intra-teciduals (Fig. 49). Esses espaços são originados pela ação dos granulócitos, que depletam o tecido causando uma remodelação gonadal (Fig. 49C-G), na qual os oócitos sofrem degeneração e as células somáticas adjacentes reorganizam-se delimitando o espaço formado (Fig. 49G). Próximo aos espaços recém-formados, espermatogônias encistadas ficam aprisionadas e são posteriormente incorporadas ao epitélio, entre células somáticas, formando o epitélio germinativo masculino (Fig. 50). O espaço formado é o primórdio de um compartimento luminal e, muitas vezes, está preenchido por uma substância acelular PAS positiva (Fig. 50C,D). Este compartimento, aos 60 dias pós-fertilização, passa agora a ser delimitado por cistos de espermatogônias. As espermatogônias proliferam ao longo do epitélio germinativo e os cistos de espermatogônias primárias e secundárias aumentam significativamente, resultando em um aumento considerável do comprimento e espessura do tecido gonadal (Fig. 51A-C). Como resultado da proliferação celular, o epitélio germinativo torna-se totalmente contínuo e, portanto, o epitélio germinativo masculino está totalmente estabelecido, conseqüentemente, os túbulos testiculares também (Fig. 51A-C). No epitélio germinativo dos túbulos, os primeiros cistos de espermatócitos são identificados. Esta é a primeira etapa em que a gônada apresenta características específicas de um testículo.

Entre 60 e 65 dias pós-fertilização, células somáticas, possivelmente pré-Sertoli, proliferam consideravelmente entre os cistos no epitélio germinativo, aumentando o seu perímetro (Fig. 51D-G). Essas células somáticas formam um epitélio que varia de cúbico a colunar e apresentam núcleos com formatos variáveis, muitas vezes, em formato de “U” (Fig. 51G). Uma vez que o aumento dos cistos, inicialmente, não acompanha este aumento da extensão

dos túbulos testiculares, em algumas regiões testiculares, o epitélio germinativo torna-se descontínuo (Fig. 51F,G). Como consequência, o compartimento luminal torna-se bastante amplo e desprovido de qualquer tipo celular (Fig. 51D-G), porém pode apresentar ainda uma substância amorfa, PAS positiva. Os túbulos testiculares tornam-se bastante anastomosados (Fig. 51D).

2.4. Espermatogênese em Gymnocorymbus ternetzi

A partir de 65 dias pós-fertilização, as espermatogônias proliferam, tornando o epitélio germinativo novamente contínuo (Fig. 51H-J). A espermatogênese ocorre continuamente, aumentando a quantidade de cistos nos túbulos testiculares e inicia-se a produção de pequena quantidade de espermatozóides (Fig. 51K-M, 52A-C).

Com 70 dias pós-fertilização, novamente o tecido gonadal apresenta um aumento considerável, pelo aumento da quantidade de cistos germinativos. Os espermatozóides começam a ser produzidos em grande quantidade e preenchem todo o lúmen testicular (Fig. 52D-H).

A remodelação e diferenciação testicular parecem ocorrer de forma gradual no tecido gonadal, começando pela porção caudal e se estendendo à porção cranial.

Durante todo o processo de diferenciação gonadal masculina, pode-se observar alguns oócitos no epitélio germinativo masculino (Fig. 52D-H, 53A-D). Estes oócitos remanescentes chegam a entrar em crescimento primário, porém não atingem seu crescimento secundário. Observou-se também notável quantidade de filamentos basofílicos no tecido gonadal, durante o processo de remodelação gonadal. Após a primeira maturação sexual e entrada no ciclo reprodutivo, não se observou mais a presença de oócitos remanescentes nestes animais (Fig. 53E).

2.5. Formação do Túbulo Testicular e o Epitélio Germinativo em Corydoras schwartzi

Os primeiros indícios da diferenciação testicular em *Corydoras schwartzi* foram observados entre 130 a 150 dias pós-fertilização. A gônada indiferenciada, ainda filiforme, aumenta gradualmente em espessura e comprimento (Fig. 54). É formada por células germinativas primordiais e células somáticas, que, com a progressão do processo de

diferenciação gonadal, proliferam e se diferenciam em espermatogônias e células pré-Sertoli, respectivamente. As espermatogônias, aqui denominadas de espermatogônias-tronco, são ovaladas e apresentam grande quantidade de “nügés” em seu citoplasma. Têm núcleo grande, irregular, bastante basofílico com um nucléolo bem evidente (Fig. 54).

As células pré-Sertoli apresentam núcleo basófilo, variando de pavimentoso a triangular e citoplasma escasso. Apresentam projeções citoplasmáticas que se interpõem gradativamente entre as espermatogônias-tronco, envolvendo-as individualmente, formando cistos (Fig. 54).

A primeira e principal característica gonadal que distingue pressupostos machos e fêmeas, neste período, refere-se ao compartimento intersticial, sendo pouco desenvolvido nas gônadas supostamente masculinas, quando comparado ao compartimento intersticial das gônadas femininas.

Neste período, as espermatogônias encistadas e distribuídas isoladamente ao longo do tecido gonadal passam a apresentar uma intensa atividade mitótica, aumentando em quantidade e formando cordões celulares no tecido gonadal (Fig. 54F,G). Esses cordões são separados entre si por um tecido intersticial e constituídos por grupamentos de espermatogônias. Em cada grupamento, há um número variável de espermatogônias-tronco, entre 3 e 6 células germinativas, as quais estão todas encistadas individualmente.

Com as divisões celulares, aos 160 dias pós-fertilização, o número de espermatogônias aumenta e os grupamentos celulares passam a ter um formato mais esférico (Fig. 54H,I), sendo circundados pelas próprias células de Sertoli que o compõem e, externamente, por um tecido intersticial.

Em cada grupamento celular, nota-se a presença de dois tipos de espermatogônias, originárias da espermatogônia-tronco: espermatogônias primárias, que permanecem encistadas individualmente, junto à periferia do grupamento celular e neste momento não entram em divisão celular, e espermatogônias secundárias, que se multiplicam no interior deste grupamento, originando uma grande quantidade de células (Fig. 55).

Uma vez que as espermatogônias secundárias são originadas de uma única espermatogônia encistada, após a divisão celular, as espermatogônias secundárias acabam por preencher todo o grupamento celular, estando ainda no interior de um único cisto (Fig. 55).

Dessa forma, cada grupamento celular passa agora a apresentar cistos na periferia, com uma única espermatogônia primária, e um cisto com muitas espermatogônias secundárias (Fig. 55F).

As espermatogônias primárias são esféricas e maiores do que as espermatogônias-tronco. Têm núcleo grande, esférico e basofílico com um nucléolo bastante evidente e permanecem quiescentes nesta etapa. As espermatogônias secundárias são menores e arredondadas. Seu núcleo é arredondado, fortemente basofílico e pode apresentar um ou mais nucléolos, os quais são pequenos e pouco evidentes (Fig. 55).

Com 180 dias pós-fertilização, os grupamentos celulares aumentam de tamanho no interior do tecido gonadal e as espermatogônias secundárias entram em divisão celular, originando, no centro dos cistos, células com núcleos apoptóticos e/ou identificados pelas figuras de divisão celular (Fig. 56A-D). Essas células, ao entrar em apoptose, afastam-se umas das outras, apresentando citoplasma com formato irregular, vacuolizado e cromatina fragmentada, formando, frequentemente, corpos apoptóticos (Fig. 56C-F).

Uma substância amorfa PAS positiva começa a surgir por entre estas células, e aumenta progressivamente sua quantidade. Concomitantemente, o tecido gonadal aumenta em comprimento e espessura, devido ao aumento de cistos em seu interior (Fig. 57A,B).

Os grupamentos celulares, que apresentam degeneração, perdem progressivamente todas as células que compõem os cistos de espermatogônias secundárias (Fig. 57C,D). O espaço ocupado anteriormente pelo cisto de espermatogônias secundárias, agora é ocupado por pela substância amorfa PAS positiva (Fig. 57E-I). Este espaço é delimitado pelas células somáticas que agora compõem um epitélio simples pavimentoso. Concomitante a este processo, as células somáticas, pavimentosas e delgadas, que delimitam o grupamento celular, sofrem modificações estruturais, passando a apresentar núcleo mais espesso e basofílico, tornando-se gradualmente cúbicas (Fig. 57C-F). Essas células são células de Sertoli, que constituem agora um epitélio que delimita um compartimento luminal, antes ocupado por espermatogônias secundárias.

A partir daí, dois eventos são identificados aos 200 dias pós-fertilização: o primeiro que dará origem aos túbulos testiculares, e o segundo que originará porções secretoras no tecido testicular.

Formação dos túbulos testiculares: o epitélio que delimita o compartimento luminal é formado por células de Sertoli e por espermatogônias primárias remanescentes, que não sofreram degeneração no interior dos grupamentos celulares. Essas espermatogônias, entrepostas às células de Sertoli, formam agora um epitélio germinativo, que delimita um lúmen testicular. Desta forma, estão formados os túbulos testiculares e o epitélio germinativo masculino em *Corydoras schwartzi* está estabelecido (Fig. 58A,B).

Formação de porções secretoras: na porção caudal do tecido gonadal, observam-se alguns grupamentos celulares, nos quais o epitélio germinativo que os delimita é totalmente depletado, incluindo as espermatogônias primárias. Dessa forma, o compartimento luminal passa a ser delimitado apenas e somente por células de Sertoli, que se tornam secretoras. Inicialmente, a secreção é rica em proteína, dando uma resposta positiva a eosina e ao Amarelo Metanil (Fig. 58C), e posteriormente, após o início da espermatogênese, torna-se rica em polissacarídeos neutros e ácidos, respondendo positivamente ao PAS e ao azul de toluidina. Essas porções passam a ser de agora em diante estritamente secretoras, sendo constituídas agora por um epitélio secretor e não mais germinativo (Fig. 58D-F).

2.6. Espermatogênese em *Corydoras schwartzi*

Nos túbulos testiculares, as espermatogônias primárias proliferam, originando novas espermatogônias, tornando o epitélio germinativo totalmente contínuo, formado agora por inúmeros cistos (Fig. 59A-C). Com o início da espermatogênese, aos 210 dias pós-fertilização, as espermatogônias entram em meiose no interior dos cistos, dando origem a cistos de espermatócitos, os quais apresentam cromatina granulada (Fig. 59D-K). A espermatogênese prossegue, porém, diferente dos outros Otophysis aqui descritos, em *Corydoras schwartzi*, o processo não ocorre completamente no interior dos cistos. Dessa forma, os espermatócitos secundários, ao originar as espermátides, são liberados para o lúmen testicular, pelo rompimento do cisto germinativo. Assim, a espermiogênese se dá no lúmen testicular, caracterizando uma espermatogênese do tipo semi-cística. Com isso, observam-se na luz dos túbulos testiculares células esféricas, com núcleo basofílico e citoplasma evidente, caracterizando as espermátides. Apresentam núcleo com cromatina em compactação, que decresce gradualmente em diâmetro ao longo do processo de espermiogênese.

Dentre as espermatídes, nota-se a presença de poucos espermatozóides, originados pelo término da espermiogênese.

Na porção caudal do testículo, as porções constituídas agora por túbulos estritamente secretores tornam-se mais definidas, formando câmaras totalmente preenchidas por uma secreção rica em polissacarídeos neutros e ácidos. Essas câmaras passam a constituir uma vesícula seminal. Apresentam epitélio secretor e ductos que se conectam ao gonoduto testicular. Dessa forma, o esperma é incorporado a esta secreção durante a extrusão dos espermatozóides.

2.7. O Compartimento Intersticial e o Compartimento Germinativo nos *Otophysi*

Os testículos de *Tanichthys albonubes*, *Gymnocorymbus ternetzi* e *Corydoras schwartzi* são formados, desde as primeiras etapas da diferenciação gonadal, por dois compartimentos: o intersticial e o germinativo, separados entre si por uma membrana basal, detectada pelo método de Reticulina.

O compartimento intersticial é formado por células do tecido conjuntivo, fibroblastos, fibras colágenas, vasos sanguíneos e células de Leydig.

O compartimento germinativo organiza-se em túbulos que sofrem anastomoses em diferentes regiões do testículo, logo após o estabelecimento do epitélio germinativo.

Em *Tanichthys albonubes*, a gônada indiferenciada apresenta cordões de espermatogônias parcialmente delimitados por uma membrana basal, extremamente delgada (Fig. 60A-C). Com a progressão da diferenciação gonadal, a membrana basal mantém-se ao redor dos conjuntos de espermatogônias, que se distribuem ao longo da gônada, porém esta não circunda todo o grupamento celular (Fig. 60D-I). Dessa forma, vários grupamentos celulares que originarão os túbulos testiculares apresentam-se circundados por uma mesma membrana basal contínua, fazendo com que as regiões que futuramente sofrerão anastomoses, sejam previamente desprovidas da membrana basal (Fig. 60E-M). Assim, a membrana basal, nos animais totalmente diferenciados, contorna o túbulo anastomosado como um todo (Fig. 61).

Em *Gymnocorymbus ternetzi* a membrana basal está ausente nos tecidos gonadais que apresentam características morfológicas femininas, bem como durante a remodelação gonadal

para uma gônada masculina (Fig. 62A,B). A membrana basal forma-se gradualmente e é estabelecida somente após a diferenciação testicular ocorrer e o epitélio germinativo masculino estar totalmente estabelecido (Fig. 62C-E).

A membrana basal é sintetizada ao redor dos túbulos testiculares já estabelecidos, podendo ser contínua ou incompleta nas regiões em que ocorrerão anastomoses (Fig. 62F-H), como em *Tanichthys albonubes*. Ao redor dos oócitos remanescentes, em qualquer etapa da diferenciação gonadal, a membrana basal está ausente, sendo, portanto uma importante ferramenta que pode contribuir para a distinção de gônadas supostamente masculinas e femininas (Fig. 62I-L).

Nos animais totalmente diferenciados, a membrana basal contorna o túbulo anastomosado como um todo.

Em *Corydoras schwartzi* nas primeiras etapas da diferenciação gonadal, o compartimento germinativo, formado por cordões de espermatogônias e células de Sertoli, encontra-se já totalmente separado das demais células somáticas por uma membrana basal (Fig. 63A).

Com a reorganização que se segue das espermatogônias, formando conjuntos esféricos ao longo do tecido gonadal, a membrana basal passa a contornar por completo estes conjuntos celulares (Fig. 63B-D). Após a degeneração dos cistos de espermatogônias secundárias, as células somáticas remanescentes no túbulo testicular recém-formado permanecem apoiados sobre a membrana basal já existente, assim como espermatogônias primárias, que irão povoar o epitélio germinativo recém-formado (Fig. 63E,F). Como nos outros Otophysis aqui estudados, a membrana basal mostra-se ausentes entre alguns túbulos adjacentes, regiões correspondentes às anastomoses. Dessa forma, a membrana basal contorna o túbulo anastomosado como um todo (Fig. 63H,I,K,L).

Assim, a organização testicular de *Tanichthys albonubes*, *Gymnocorymbus ternetzi* e *Corydoras schwartzi* é classificada como tubular anastomosada.

3. A DIFERENCIAÇÃO TESTICULAR NO PERCOMORPHA

Durante todo o período de diferenciação testicular, os testículos de *Amatitlania nigrofasciata* mantêm-se como órgãos pares, alongados, cilíndricos, localizados

longitudinalmente na região dorsal da cavidade celomática. Estão presos à parede dorsal desta cavidade por uma fina membrana de tecido conjuntivo – o mesórquio. No início da diferenciação testicular, ambos os testículos repousam sobre a bexiga natatória, dispostos paralelamente e próximos um ao outro. Macroscopicamente, esse padrão estrutural é mantido até a completa diferenciação da gônada, apresentando pequena variação apenas na espessura do tecido gonadal. Porém, durante este período de diferenciação gonadal, os testículos apresentam mudanças histológicas bastante significativas.

3.1. Formação do Lóbulo Testicular e o Epitélio Germinativo em Amatitlania nigrofasciata

Os primeiros indícios da diferenciação testicular em *Amatitlania nigrofasciata* foram observados em animais com 90 dias pós-fertilização.

Em animais com 90 dias pós-fertilização, o pressuposto testículo, ainda filiforme, aumenta em espessura (Fig. 64). Em cortes parassagitais, o tecido gonadal em processo de diferenciação, apresenta células germinativas primordiais, diferenciadas agora em espermatogônias, predominantemente na região ventral da gônada (Fig. 64B,C). Na região dorsal, inicialmente encontram-se somente células somáticas pavimentosas formando algumas poucas camadas (Fig. 64B,C).

Em animais com 100 dias pós-fertilização, a gônada, até então compacta, apresenta as mesmas características de distribuição de células germinativas e células somáticas que ao etapa anterior, porém este padrão mostra-se agora mais acentuado (Fig. 65). O número de camadas compostas por células somáticas aumenta na porção dorsal da gônada. As células somáticas que compõem duas camadas adjacentes adquirem formato pavimentoso, reorganizam-se e se afastam, criando um pequeno espaço na região dorsal da gônada. É o início da formação do ducto testicular, reconhecível como um primórdio do gonoducto (Fig. 65B,C,F,G).

As espermatogônias, na porção ventral do testículo, têm formato ovalado e estão sempre associadas às células somáticas (células pré-Sertoli), formando grupamentos em cordões de espermatogônias na região periférica do tecido gonadal (Fig. 65A-C, 67A,B). As células pré-Sertoli apresentam núcleo basófilo, triangular e citoplasma escasso. Apresentam

projeções citoplasmáticas que se envolvem gradualmente cada uma das espermatogônias, formando os cistos (Fig. 67A,B), compostos, portanto, por uma espermatogônia e células de Sertoli. As espermatogônias são células extremamente grandes, e globulosas. Têm núcleo grande, esférico, com um único nucléolo bem evidente (Fig. 65, 67A,B).

Entre 110 e 120 dias pós-fertilização, nota-se intensa proliferação mitótica de espermatogônias e os vasos sanguíneos tornam-se mais evidentes na região dorsal do testículo. Os cistos de espermatogônias recém-formados agrupam-se em inúmeros conjuntos celulares que se distribuem ao longo da gônada, nas regiões periféricas (porção ventro-lateral), formando estruturas semelhantes à ácinos (Fig. 66A-C, 67C-E).

As espermatogônias proliferam a partir da região periférica da gônada, seguindo para a região central. Agora, nesta porção testicular, formam-se também novos grupamentos celulares de espermatogônias. Os grupamentos de espermatogônias aumentam consideravelmente, distribuindo-se por toda a gônada, exceto numa delgada região periférica, na porção dorsal, região na qual se encontra o ducto testicular.

No tecido gonadal, gradativamente, os cistos de espermatogônias que constituem um mesmo conjunto afastam-se uns dos outros no interior do ácino, criando um pequeno espaço central entre os cistos (Fig. 65H). Este espaço torna-se maior, formando um compartimento luminal (Fig. 67F). Este compartimento passa agora a ser delimitado por cistos de espermatogônias apoiados em uma membrana basal. Como consequência do processo de formação de um compartimento luminal, formam-se os primeiros primórdios de um lóbulo testicular, e o epitélio germinativo masculino em *Amatitlania nigrofasciata* é estabelecido.

Os grupamentos celulares de espermatogônias, que agora compõem o primórdio do lóbulo testicular, deixam de ter um formato arredondado e tornam-se mais ovalados. Com isso, o compartimento luminal, antes menor e esférico, torna-se agora longo e ovalado. Tem-se, assim, a formação dos lóbulos testiculares (Fig. 66D,F).

Na região dorsal do testículo, os lóbulos testiculares conectam-se ao ducto testicular e percorrem todo o tecido gonadal em direção à região ventral da gônada, terminando em fundo cego na periferia testicular. Dessa forma, os lóbulos testiculares passam a ter um formato digitiforme (Fig. 68A,B,E,F). As espermatogônias distribuem-se por todo o lóbulo, porém, na

região periférica, os cistos de espermatogônias mantêm-se ainda agrupados em estruturas semelhantes à ácinos (Fig. 68B).

3.2. Espermatogênese em Amatitlania nigrofasciata

As espermatogônias agora no epitélio germinativo já estabelecido continuam se multiplicando e entram em meiose, iniciando a espermatogênese (Fig. 68). O processo ocorre no interior de cada cisto de forma sincrônica, ou seja, em cada cisto, as células germinativas encontram-se em uma mesma fase de desenvolvimento.

Nas gônadas de animais com 120 a 130 dias pós-fertilização, os espermátócitos em estágios iniciais da prófase meiótica tornam-se numerosos no testículo, agora, diferenciado. Nos cortes histológicos, nota-se que a espermatogênese e formação dos primeiros cistos de espermátócitos inicia-se na região medial do testículo (Fig. 68A).

O processo de espermatogênese torna-se contínuo. Entre 130 e 150 dias pós-fertilização, o testículo aumenta em tamanho, pela grande quantidade de cistos germinativos. Ao longo do lóbulo, no epitélio germinativo, surgem os primeiros cistos de espermátides. Como consequência do aumento de cistos, ocorre um aumento no comprimento do lóbulos (Fig. 69). As espermatogônias encontram-se agora distribuídas ao longo de todo o lóbulo testicular por entre os cistos de outras células germinativas, como espermátócitos e espermátides, caracterizando a organização testicular como do tipo lobular irrestrita (Fig. 69). Os lóbulos testiculares adjacentes são separados uns dos outros por tecido intersticial ainda pouco diferenciado.

Animais com 150 dias pós-fertilização apresentam um lúmen testicular, preenchido agora por espermatozóides. Estes lóbulos acabam por desembocar no ducto testicular (Fig. 70A). Cada testículo apresenta um ducto testicular que confluem na porção caudal, formando um gonoducto único, o qual se comunica com a papila urogenital. A partir de 150 dias pós-fertilização, todas as características de um testículo sexualmente maduro estão agora estabelecidas nestes animais, que se encontram aptos à reprodução (Fig. 70).

Durante a diferenciação testicular, células somáticas, isoladas do compartimento germinativo, diferenciam-se dando origem ao compartimento intersticial. O compartimento intersticial é bastante reduzido em todo o período de diferenciação gonadal, tornando-se mais

evidente após o total desenvolvimento da gônada. É composto principalmente por fibras de colágeno, fibroblastos e vasos sanguíneos. As células de Leydig não foram identificadas na microscopia de luz, somente na Microscopia Eletrônica de Transmissão, durante a diferenciação, mas foram facilmente identificáveis após o desenvolvimento da gônada (ver Fig. 42A-inset).

3.3. O Compartimento Intersticial e o Compartimento Germinativo em Amatitlania nigrofasciata

As análises histológicas mostram que as gônadas coradas com o método de Reticulina, apresentam um compartimento germinativo - formado pelas espermatogônias e células de Sertoli - separado das demais células somáticas, por uma membrana basal (Fig. 71). Porém esta membrana basal estabelece-se somente após o aparecimento dos primeiros indícios da diferenciação testicular, quando a gônada indiferenciada apresenta uma segregação entre as células somáticas que irão compor o ducto espermático e as espermatogônias. Assim, a membrana basal é sintetizada inicialmente na região dorsal da gônada, correspondente à região do ducto testicular (Fig. 71A,B).

Posteriormente, a membrana basal passa a ser sintetizada de forma discreta ao redor dos conjuntos de espermatogônias que formam estruturas acinares (Fig. 71C,D).

Conforme se dá a formação dos primeiros lóbulos testiculares, a membrana basal conflui na porção dorsal do testículo, tornando-se contínua entre os lóbulos e o ducto testicular (Fig 71C,D). Após a formação dos lóbulos recém-formados, a membrana basal mostra-se mais intensamente corada nas regiões dos lóbulos próximas ao ducto testicular, sendo ainda bastante discreta nas regiões periféricas do testículo (Fig. 71E). Nestas regiões, as espermatogônias ainda se organizam em ácidos.

Nos testículos totalmente diferenciados, a membrana basal permanece ao redor de cada lóbulo testicular, contornando-o e separando o compartimento germinativo do compartimento intersticial (Fig. 71F,G). Essa disposição mantém-se durante todo o processo de diferenciação gonadal, bem como nas gônadas de peixes aptos à reprodução.

4. A DIFERENCIAÇÃO TESTICULAR NO ATHERINOMORPHA

Durante o início da diferenciação gonadal, os testículos de *Poecilia reticulata*, são órgãos pares, alongados e filiformes. Localizam-se longitudinal e caudalmente na região dorsal da cavidade celomática. Estão presos à parede dorsal desta cavidade por uma fina membrana de tecido conjuntivo – o mesórquio.

Ao longo do processo de diferenciação, os testículos de *Poecilia reticulata* aumentam consideravelmente, especialmente em sua espessura. Deixam de ser uma estrutura alongada e passa a ser ovalada. Com esta mudança morfológica, os dois testículos aproximam-se e se unem a partir da região medial até a porção caudal. Na extremidade caudal os testículos confluem em um gonoducto único o qual desemboca na papila urogenital.

4.1. Formação Primária do Lóbulo Testicular e o Epitélio Germinativo em Poecilia reticulata

Os primeiros indícios da diferenciação testicular em *Poecilia reticulata* foram observados em animais no estágio 5, correspondente à última semana de gestação.

As gônias indiferenciadas multiplicam-se e ao se diferenciarem, dão origem às espermatogônias. Estas são envoltas por processos citoplasmáticos das células somáticas que compõem o tecido gonadal – as células de Sertoli – ainda em processo de diferenciação.

Durante o período de diferenciação testicular, os testículos de *Poecilia reticulata* mantêm-se como órgãos pares totalmente separados até o nascimento (Fig. 72A).

Durante a última semana de gestação, o tecido gonadal masculino, inicialmente ovalado, formado por espermatogônias e células somáticas, muda seu formato, conforme aumenta em tamanho, adquirindo um aspecto de cachos (Fig. 72), diferentemente da fêmea, que apresenta um tecido gonadal retilíneo.

A gônada passa por uma reorganização estrutural e as espermatogônias já encistadas formam conjuntos celulares semelhantes à ácinos ao longo de toda a gônada (Fig. 72F). Na região dorsal da gônada, junto ao peritônio, ocorre proliferação de células somáticas (Fig. 72D-F).

No período entre 01 e 12 dias pós-nascimento, o testículo aumenta significativamente em comprimento, tornando-se mais alongado. A proliferação de espermatogônias e é intensa, assim como das células somáticas na região dorsal da gônada.

Aos 12 dias pós-nascimento, essas células somáticas da região dorsal atingem um número significativamente maior do que no estágio anterior e sofrem diferenciação celular. Deixam de ser irregulares e/ou pavimentosas e assumem um formato cilíndrico (Fig. 73A). Ao se reorganizarem em fileiras duplas, afastam-se formando um espaço entre duas fileiras de células cilíndricas, dando origem ao ducto testicular principal, na porção dorsal, que percorre todo testículo. Estes ductos se interconectam com as células somáticas acumuladas sobre os ácinos de espermatogônias, criando, pela mesma forma de reorganização, intensas ramificações de ductos secundários curtos, interconectados agora entre si, pelo ducto testicular principal (Fig. 73). Ao adquirirem essa organização, as células somáticas acabam por definir os primeiros lóbulos testiculares, sendo formado inicialmente por um ducto testicular secundário e um conjunto de espermatogônias (Fig. 73C,D). Os lóbulos não apresentam um lúmen, portanto, o epitélio germinativo constitui, na verdade, um tecido epitelióide, apoiado em uma membrana basal.

Os dois testículos com seus ductos testiculares principais já formados fundem-se pela região dorsal, originando um testículo alongado, porém mais ovalado, formado agora por conjuntos de espermatogônias na periferia de todo o testículo, e ductos testiculares principais na porção central da gônada (Fig. 73F,G). Estes ductos principais confluem, formando um gonoducto único que se comunica com a papila urogenital.

4.2. Formação Secundária do Lóbulo Testicular e Espermatogênese em Poecilia reticulata

Após a formação dos ductos e estabelecimento dos lóbulos testiculares, inicia-se a espermatogênese em animais com 14 dias pós-nascimento.

Nos lóbulos testiculares recém-formados, as espermatogônias primárias, encistadas pelas células de Sertoli, entram em mitose, originando um cisto de espermatogônias secundárias (Fig. 74A,B). Este cisto é delimitado por células de Sertoli que agora ocupam somente a região periférica de cada cisto, delimitando a parede lobular.

As células de Sertoli que apresentavam núcleo até então triangular, tornam-se agora pavimentosas e proliferam conforme o tamanho do cisto aumenta, de acordo com sua capacidade suporte. As espermatogônias diferenciadas no interior do cisto entram em meiose dando origem a um cisto único de espermatócitos que ocupa toda a largura do lóbulo testicular (Fig. 74C,D). O cisto de espermatogônias que permanecem como células-tronco para a proliferação contínua de novas espermatogônias é agora empurrado pelo cisto de espermatócitos, ocupando, portanto, a região mais periférica da gônada (Fig. 74E,F). Dessa forma, os cistos de espermatogônias deixam de estar adjacentes aos ductos secundários, sendo que estes agora se conectam com os cistos de espermatócitos (Fig. 74D).

Envolvendo os cistos de espermatócitos, as projeções citoplasmáticas das células de Sertoli continuam se estendendo por todo o lóbulo, formando um cisto único que ocupa toda a largura dos lóbulos, não havendo, portanto, em momento algum, luz em seu interior.

A espermatogênese prossegue, ocorrendo de forma centrípeta. Como consequência, os cistos de espermatogônias sofrem um movimento antagônico – centrífugo. Assim, entre 14 e 18 dias pós-nascimento, os cistos de espermatócitos aumentam em número, empurrando cada vez mais os cistos de espermatogônias que ficam restritos a porção periférica da gônada. Com esse aumento dos cistos, o testículo aumenta radialmente, tornando-se cada vez mais arredondado, e menos alongado (Fig. 75A,B).

Após 18 dias pós-nascimento, observam-se os primeiros cistos de espermatídes, resultantes da divisão meiótica dos espermatócitos. Agora, os cistos de espermatídes é que fazem contato com os ductos secundários, enquanto que os cistos de espermatócitos ocupam uma posição intermediária no testículo, colocando-se entre cistos de espermatídes e cistos de espermatogônias na periferia da gônada (Fig. 75C-E).

Essa disposição celular ao longo da gônada masculina de *Poecilia reticulata* faz com que o compartimento germinativo nestes animais apresente uma organização do tipo lobular. Ou seja, os lóbulos, dispostos de forma radial por todo o testículo, tornam-se digitiformes, terminando em fundo cego na região periférica testicular (Fig. 75C-E). Além disso, o testículo de *Poecilia reticulata* é classificado como lobular restrito, uma vez que essa organização celular mantém-se no animal sexualmente maduro, sendo caracterizado por cistos de espermatogônias restritos na região periférica dos lóbulos testiculares (Fig. 75D).

Concomitante ao aumento dos cistos de espermatídes, aos 26 dias pós-fecundação, os ductos testiculares começam a produzir uma secreção de natureza glicoprotéica, que responde positivamente ao PAS e à eosina (Fig. 76A,B). Esse produto de secreção passa a ocupar toda a luz da rede de ductos testiculares.

No período que se segue, entre 30 e 80 dias, o testículo permanece com as mesmas características e, a partir de 90 dias pós-nascimento, a espermiogênese é concluída, originando os primeiros espermatozóides e o animal encontra-se apto à reprodução (Fig. 76C,D).

Na espermição, os cistos contendo os espermatozóides maduros agora se tornam contínuos com o ducto espermático (Fig. 77A). Os espermatozóides organizam-se em pacotes esféricos constituindo os espermatozeugmatas (Fig. 77B,H). Nestes, os núcleos dos espermatozóides encontram-se voltados para a região externa, constituindo a região periférica do espermatozeugmata. Diferente das outras espécies aqui estudadas, os espermatozóides de *Poecilia reticulata* apresentam núcleo alongado.

Os cistos contendo espermatozóides, na região proximal dos lóbulos, confluem para os ductos espermáticos. Assim, as células de Sertoli, até então pavimentosas, que compunham o cisto tornam-se também colunares e passam a integrar o epitélio dos ductos testiculares (Fig. 77I).

No ducto espermático, há uma grande quantidade de secreção glicoprotéica que envolve os espermatozeugmatas (Fig. 77I).

Agora, ao longo do testículo, são encontradas espermatogônias na região basal do lóbulo, seguidas de espermatócitos, espermatídes e espermatozóides no interior do ducto testicular (Fig. 77A,B). Anatomicamente, o testículo agora arredondado pelo crescimento radial dos lóbulos, apresenta-se como uma estrutura única, parcialmente segmentada somente nas porções periféricas anteriores e ventrais.

Na porção caudal do testículo, o gonoducto formado pelos ductos principais, desemboca na papila urogenital, junto à nadadeira anal. Os machos dessa espécie apresentam nadadeira anal modificada em um órgão copulatório, o gonopódio, utilizado durante a cópula para inseminação da fêmea.

4.3. O Compartimento Intersticial e o Compartimento Germinativo em Poecilia reticulata

Através do método de Reticulina, pode-se acompanhar a formação da membrana basal e a segregação dos componentes intersticiais e germinativos, desde o início da diferenciação gonadal (Fig. 78).

Em gônadas masculinas ainda indiferenciadas, que apresentam somente espermatogônias e células somáticas que compõem o futuro ducto testicular, a membrana basal está presente sob as células somáticas, portanto o epitélio do ducto testicular já se encontra estabelecido (Fig. 78A-G).

Gradativamente, nesta etapa, a membrana basal é sintetizada pelas células de Sertoli que estão em contato com a região periférica do primórdio do lóbulo testicular, desenhando uma estrutura saculiforme (Fig. 78A-G). Ao longo da gônada, vários conjuntos de espermatogônias vão esboçando os primeiros lóbulos testiculares. Estes lóbulos passam a ser delimitados individualmente por uma membrana basal (Fig. 78G). A membrana basal que contorna cada lóbulo é contínua com a membrana basal do ducto secundário. Este, por sua vez, também apresenta uma membrana basal contínua ao ducto espermático (Fig. 78H-Q). Essa disposição mantém-se durante todo o processo de diferenciação gonadal (Fig. 78H-Q), bem como nas gônadas de peixes aptos à reprodução.

Assim, a membrana basal permanece ao redor de cada lóbulo testicular, contornando-o e separando o compartimento germinativo do compartimento intersticial (Fig. 79). Entre um cisto germinativo e outro, dentro de um mesmo lóbulo, a membrana basal está ausente (Fig. 79C-I). Assim, cada cisto é sustentado apenas pelos prolongamentos citoplasmáticos das células de Sertoli, que se apoiam na membrana basal da parede do lóbulo. Estes dados foram confirmados pela Microscopia Eletrônica de Transmissão (Fig. 80).

Durante a espermatogênese e produção de espermatozóides, na região de confluência do lóbulo com o ducto testicular, a membrana basal mantém-se única, contornando os lóbulos.

VI. DETECÇÃO DE PROTEÍNAS POR IMUNOHISTOQUÍMICA DURANTE A DIFERENCIAÇÃO GONADAL FEMININA E MASCULINA

1. DETECÇÃO DA PROTEÍNA VASA

A presença da proteína Vasa foi observada exclusivamente nas células germinativas durante todas as etapas da diferenciação gonadal, bem como nas gônadas já diferenciadas (Fig. 81A-D, 82A-C, 83A-D, 85A,G,K). Durante a morfogênese, as células germinativas primordiais apresentavam marcação para proteína Vasa, durante o estabelecimento do primórdio gonadal. Em todas as espécies, as células germinativas primordiais foram detectadas, apresentando uma reação Vasa-positiva, nas etapas de gônada indiferenciada.

A partir da diferenciação gonadal, houve diferenças na intensidade das respostas à proteína-Vasa. As células ainda indiferenciadas, como as células germinativas primordiais, e também oogônias e espermatogônias apresentavam uma resposta mais intensa. Conforme ocorreu a diferenciação das células germinativas e entrada em meiose, a marcação foi gradualmente decrescendo. Dessa forma, os oócitos profásicos iniciais nos ovários, e espermatócitos nos testículos apresentaram uma expressão inferior em comparação as etapas celulares anteriores, de oogônia e espermatogônia, respectivamente. Da mesma forma, a resposta à marcação foi ainda menor nos oócitos em crescimento primário e nas espermatídes. Os espermatozoides não apresentaram marcação (Fig. 81C,D, 82C).

Células somáticas indiferenciadas, bem como células foliculares e células de Sertoli, não apresentaram nenhuma resposta à proteína-Vasa durante qualquer uma das fases da diferenciação gonadal feminina e masculina (Fig. 81A-D, 82A-C, 83A-D, 85A,G,K).

2. PROLIFERAÇÃO CELULAR

Em todas as espécies analisadas, as células germinativas primordiais localizadas nos primórdios gonadais não apresentaram resposta ao PCNA. Porém, esporadicamente, observou-se células somáticas marcadas.

Nas gônadas indiferenciadas, as células germinativas primordiais (Fig. 81E, 82F, 83F,G, 84A,P) apresentam uma intensa marcação, bem como as células somáticas (Fig. 81E, 82D,E, 83E, 84J,P).

Após a associação entre célula germinativa e célula somática, nota-se uma proliferação celular em momentos distintos, de modo que quando uma célula germinativa está marcada, as células somáticas a ela associadas não estão, e vice-versa.

Nas gônadas indiferenciadas, supostamente masculinas de *Percomorpha* e *Atherinomorpha*, as células somáticas na região dorsal, correspondente à região do futuro ducto testicular, apresenta uma grande resposta ao PCNA, enquanto o restante da gônada apresenta esporadicamente (Fig. 82D,E, 83E).

O mesmo ocorre no tecido gonadal masculino de todas as espécies: os grupamentos de espermatogônias mostram-se marcados, porém as células de Sertoli a elas associadas não tem resposta. Sua proliferação celular ocorre em momentos diferentes, intercalados.

Nas fêmeas, as células somáticas, pré-foliculares que envolvem um cisto de oogônias proliferam alternada ou concomitantemente às oogônias. A proliferação das células somáticas também é intensa durante a entrada em meiose das células germinativas. Assim, nota-se com frequência a marcação de células pré-foliculares durante o período de foliculogênese (Fig. 84). Após a entrada em crescimento primário dos oócitos, as células foliculares continuam proliferando, acompanhando o crescimento do folículo ovariano, bem como as oogônias, nos nichos de proliferação (Fig. 84).

Nas gônadas, masculinas, femininas ou indiferenciadas, observou-se também uma proliferação celular das células somáticas no epitélio que delimita a gônada. Células mesenquimais também apresentaram resposta ao PCNA.

3. DETECÇÃO DA ENZIMA *CYP19A1A* (AROMATASE)

A enzima *Cyp19a1a* foi detectada em células somáticas de todas as gônadas supostamente femininas nas cinco espécies analisadas (Fig. 85).

A intensidade da área de resposta diminui progressivamente conforme ocorreu a diferenciação ovariana. No início da diferenciação, tanto células somáticas como o citoplasma de células germinativas apresentaram resposta positiva. Com o progresso da diferenciação, a detecção foi localizada em células somáticas, tanto foliculares, quanto células intersticiais. Além disso, alguns oócitos apresentaram marcação em seu citoplasma (Fig. 85B-F, H-J).

Em *Poecilia reticulata*, após a diferenciação e desenvolvimento gonadal, detectou-se a presença da enzima Cyp19a1a em células somáticas abaixo do epitélio germinativo, bem como no citoplasma de alguns oócitos em crescimento primário, em células foliculares e nas células da teca (Fig. 85L-P).

Nas gônadas supostamente masculinas, não foi detectada reação positiva. Após a diferenciação testicular, posterior à entrada em meiose e início da espermiogênese, detectou-se uma reação positiva. As células somáticas marcadas positivamente estavam localizadas no interstício gonadal, entre lóbulos e túbulos testiculares que já apresentavam espermátides, espermátides e/ou espermatozóides.

Em *Gymnocorymbus ternetzi* todas as gônadas, femininas, masculinas e de transição, apresentaram resposta positiva a enzima CYP19a1a (dados não mostrados).

4. DETECÇÃO DA ENZIMA 3 β -HSD

Durante as primeiras etapas da morfogênese gonadal, não houve resposta positiva para a detecção da enzima 3 β -HSD. Assim, o primórdio gonadal não apresentou nenhuma marcação, tampouco as gônadas indiferenciadas (Fig. 81I, 82N).

Nas fêmeas, as primeiras marcações de 3 β -HSD foram fracamente detectadas em gônadas que já apresentavam seu epitélio germinativo estabelecido e meiose ativa, em algumas células do tecido estromal. A marcação tornou-se mais intensa somente após a diferenciação completa da gônada, em ovários de animais que apresentavam oócitos em crescimento secundário em células foliculares e células da teca (dados não mostrados).

Nos machos, a marcação foi observada durante todas as etapas após o início da diferenciação gonadal, iniciando-se durante o estabelecimento do epitélio germinativo, ou seja, concomitante à formação de túbulos ou lóbulos testiculares, porém antecedendo a espermatogênese (Fig. 81J, 82O, 83M,N).

Em todas as espécies, as gônadas masculinas mostraram as primeiras marcações em células somáticas intersticiais, próximas aos vasos sanguíneos, de gônadas contendo apenas espermatogônias, porém já encistadas e organizadas em grupamentos, conforme o padrão de cada espécie. Esse padrão manteve-se durante todo o processo de diferenciação gonadal, tornando-se mais intenso em gônadas masculinas após o início da espermatogênese (Fig. 81K-

N, 82O,P, 83O,P). Em *Tanichthys albonubes*, após a espermatogênese tornar-se intensa, grande parte do interstício mostrou-se marcada, sendo esta intensificada conforme o desenvolvimento testicular (Fig. 81M,N).

VII. ESTRUTURA TESTICULAR DOS ADULTOS APÓS A REPRODUÇÃO

Os testículos de *Tanichthys albonubes*, *Gymnocorymbus ternetzi*, *Corydoras schwartzi*, *Amatitlania nigrofasciata* e *Poecilia reticulata* pertencentes a animais recém-extrusados (24h pós-reprodução) apresentam túbulos e lóbulos com grande quantidade de espermatozóides, porém com lúmen reduzido (Fig. 86), quando comparado com animais em desova ativa (dados não mostrados).

Em *Tanichthys albonubes* e *Gymnocorymbus ternetzi* os túbulos apresentam-se com espermatozóides, porém seu interstício mostra-se bastante espesso e com grande quantidade de granulócitos (Fig. 86A-F). Já *Corydoras schwartzi* apresenta túbulos com espermátides e espermatozóides residuais e lúmen amplo (Fig. 86G-I).

Amatitlania nigrofasciata apresenta espermatozóides residuais nos lóbulos testiculares e grande concentração de espermatogônias em estruturas acinares na porção final dos lóbulos, por toda a periferia testicular (Fig. 86J-L).

Poecilia reticulata apresenta uma estrutura testicular mais desorganizada, especialmente na região do ducto testicular, no qual se encontram espermatozeugmatas residuais (Fig. 86M,N). A secreção dos ductos, caracteristicamente PAS positiva durante a fase de desova ativa, mostra-se gradativamente positiva ao Amarelo Metanil (Fig. 86N). Nesta fase, os lóbulos testiculares apresentam uma extensão menor do comprimento, havendo um menor número de cistos no interior de cada lóbulo (Fig. 86N,O).

A diferenciação gonadal masculina até o desenvolvimento completo do testículo de *Tanichthys albonubes*, *Amatitlania nigrofasciata* e *Poecilia reticulata* foi sumarizada nas Figuras 87, 88 e 89.

VIII. CRONOLOGIA DA DIFERENCIAÇÃO GONADAL

Os principais eventos da diferenciação gonadal feminina e masculina das cinco espécies estudadas foram sumarizados nas Figuras 90, 91, 92, 93 e 94.

Figura 1: Ovos, embriões, larvas e juvenis de *Tanichthys albonubes*, *Gymnocorymbus ternetzi*, *Corydoras schwartzi*, *Amatitlania nigrofasciata* e *Poecilia reticulata*.

Figura 1

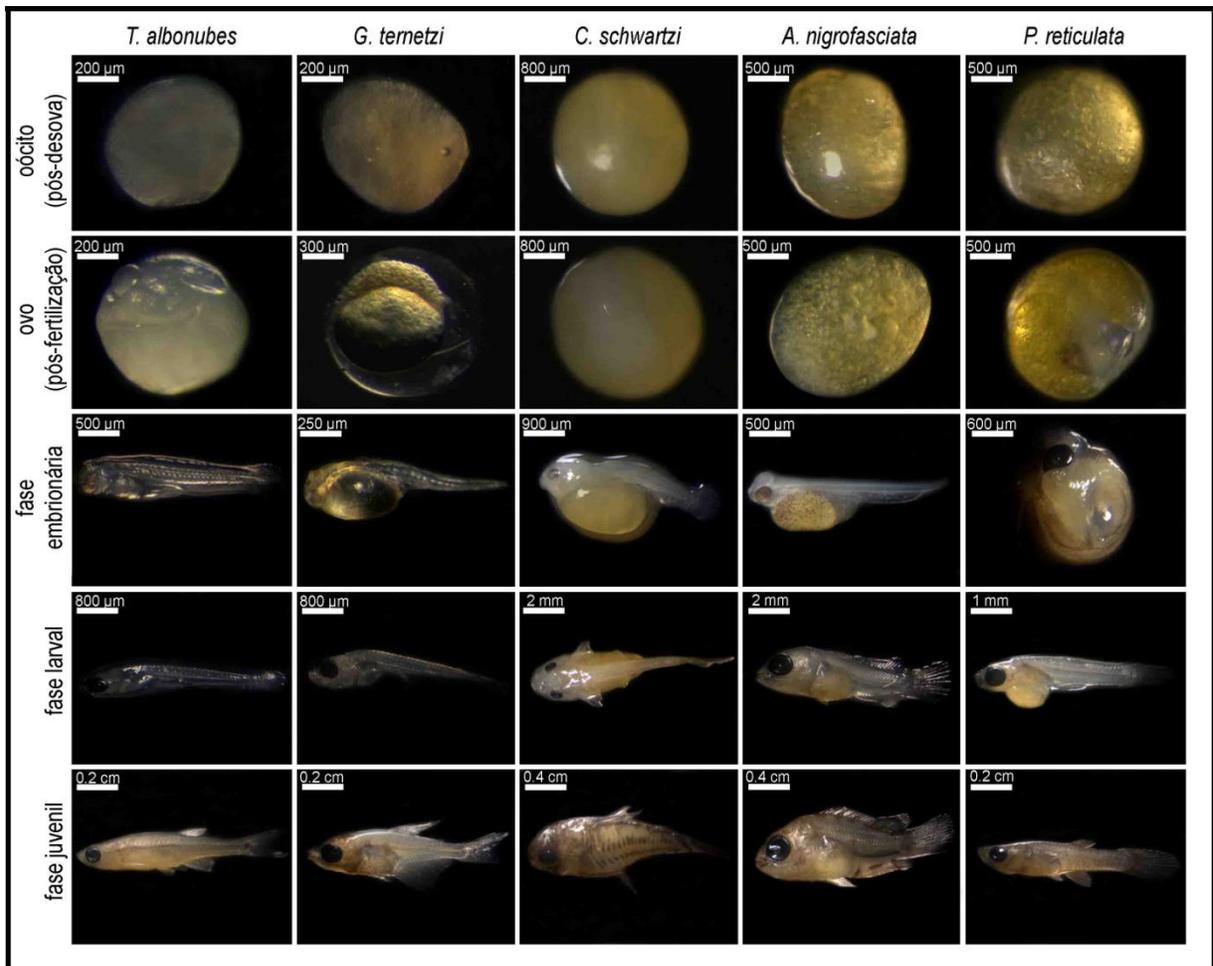


Figura 2: Desenvolvimento do primórdio gonadal. Corte histológico parassagital de *Tanichthys albonubes* (A-C), *Gymnocorymbus ternetzi* (D-E), *Corydoras schwartzi* (G-I), *Poecilia reticulata* (J-L) e *Amatitlania nigrofasciata* (M-O). Os primórdios gonadais são formados por poucas células germinativas primordiais, circundadas por células somáticas em um cordão bastante delgado de células somáticas. Em todas as espécies o primórdio gonadal encontra-se apoiado sobre um mesentério gonadal, ventralmente ao rim. Notar a ausência de vasos sanguíneos nos primórdios gonadais de todas as espécies. *Legenda:* CGP: célula germinativa primordial, seta: indicação do primórdio gonadal, S: célula somática, cabeça de seta: divisão celular de células somáticas. *Coloração:* Amarelo Metanil.

Figura 2

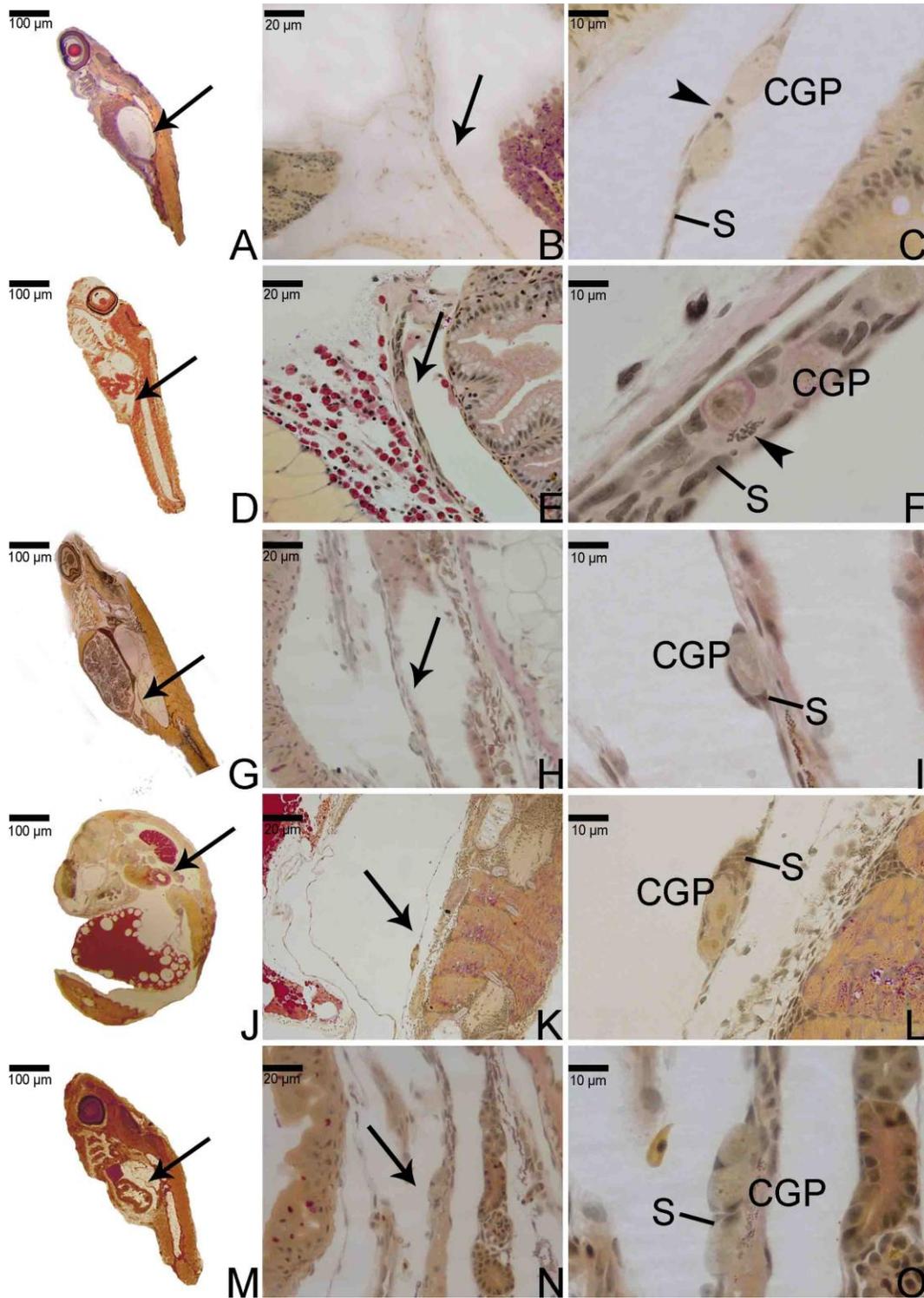


Figura 3: Corte histológico parassagital da gônada indiferenciada nos Otophysi *Tanichthys albonubes* (A-B), *Gymnocorymbus ternetzi* (C-E) e *Corydoras schwartzi* (F-G) formada por células germinativas primordiais e células somáticas em constante proliferação (D). *Legenda:* CGP: célula germinativa primordial, S: célula somática, cabeça de seta: divisão celular de células somáticas. *Coloração:* Amarelo Metanil.

Figura 3

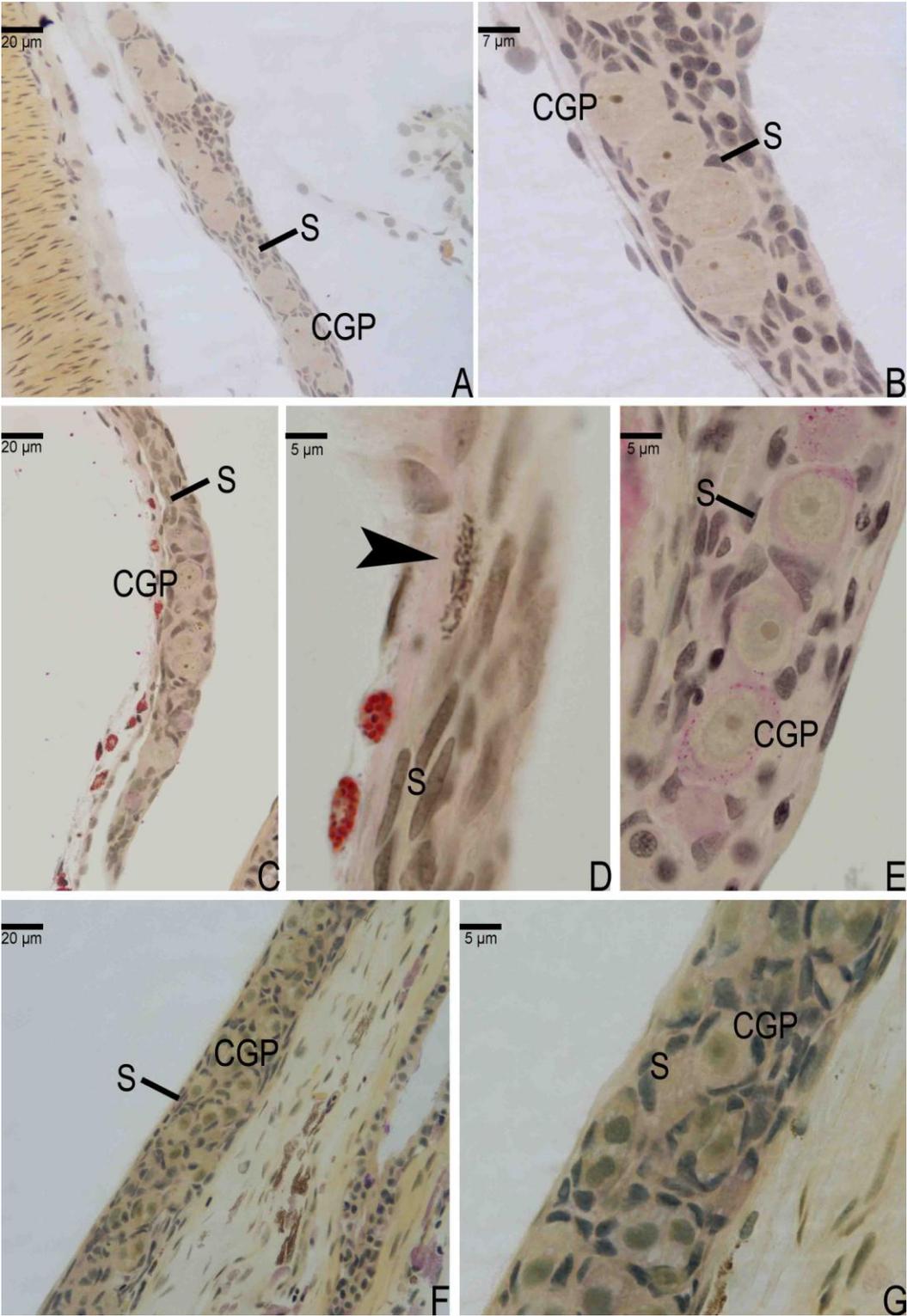


Figura 4: Corte histológico parassagital da gônada indiferenciada supostamente feminina (A-B) e masculina (C-D) de *Amatitlania nigrofasciata*. Notar a distinção da organização em ambas as gônadas. Na gônada indiferenciada supostamente feminina (A-B), as células germinativas primordiais (CGPs) distribuem-se de forma homogênea por todo o tecido, enquanto que na gônada indiferenciada supostamente masculina (C-D), as CGPs concentram-se na região ventral da gônada. *Legenda:* CGP: célula germinativa primordial, S: célula somática, VS: vaso sanguíneo, V: região ventral. *Coloração:* Amarelo Metanil.

Figura 4

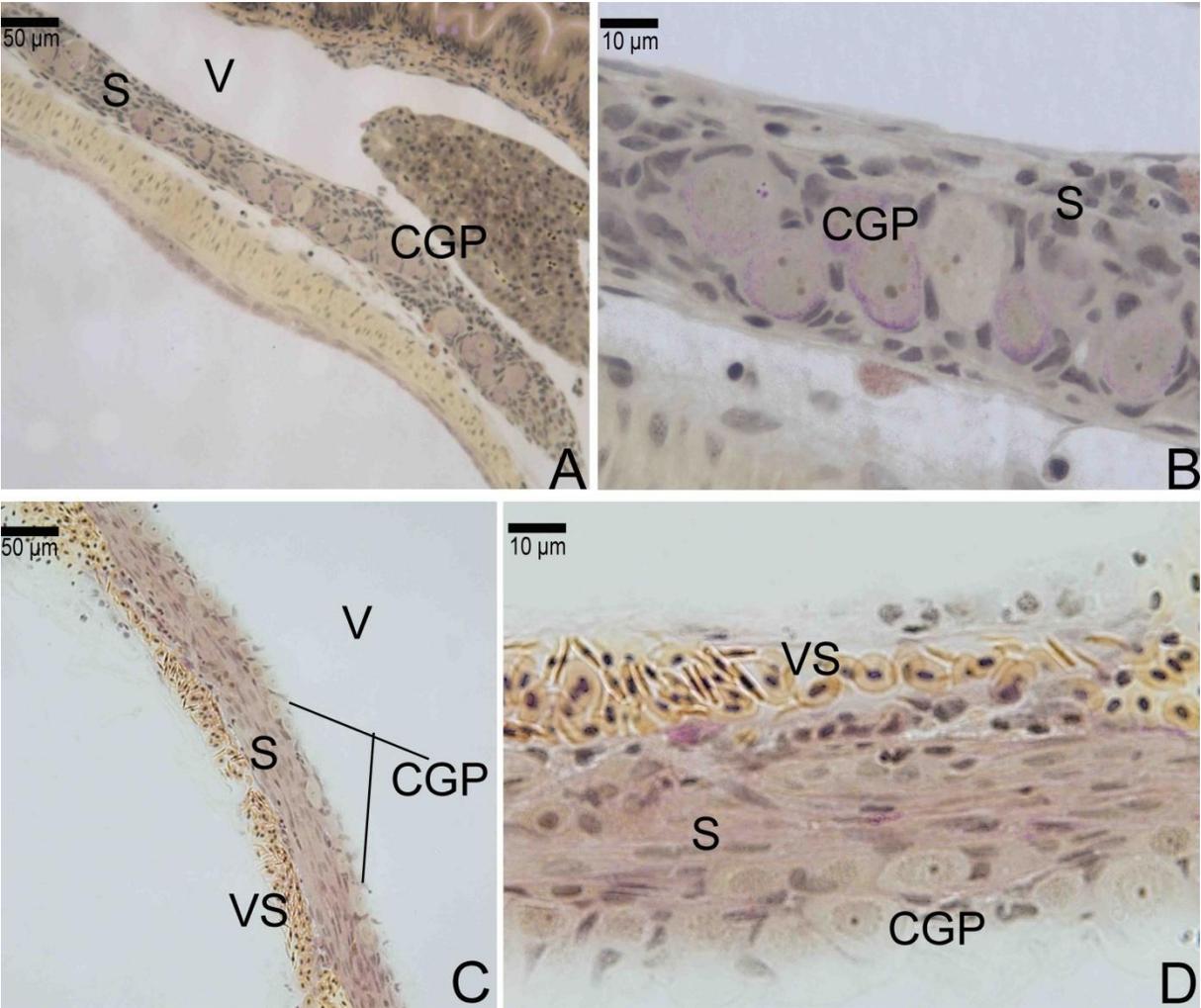


Figura 5: Corte histológico parassagital da gônada indiferenciada supostamente feminina de *Poecilia reticulata* (A-C). Notar a organização de células germinativas primordiais (CGPs) distribuídas por todo o tecido gonadal e divisão celular das CGPs (C). *Legenda:* CGP: célula germinativa primordial, S: célula somática, cabeça de seta: divisão celular de células somáticas, i: intestino, V: região ventral. *Coloração:* Amarelo Metanil.

Figura 5

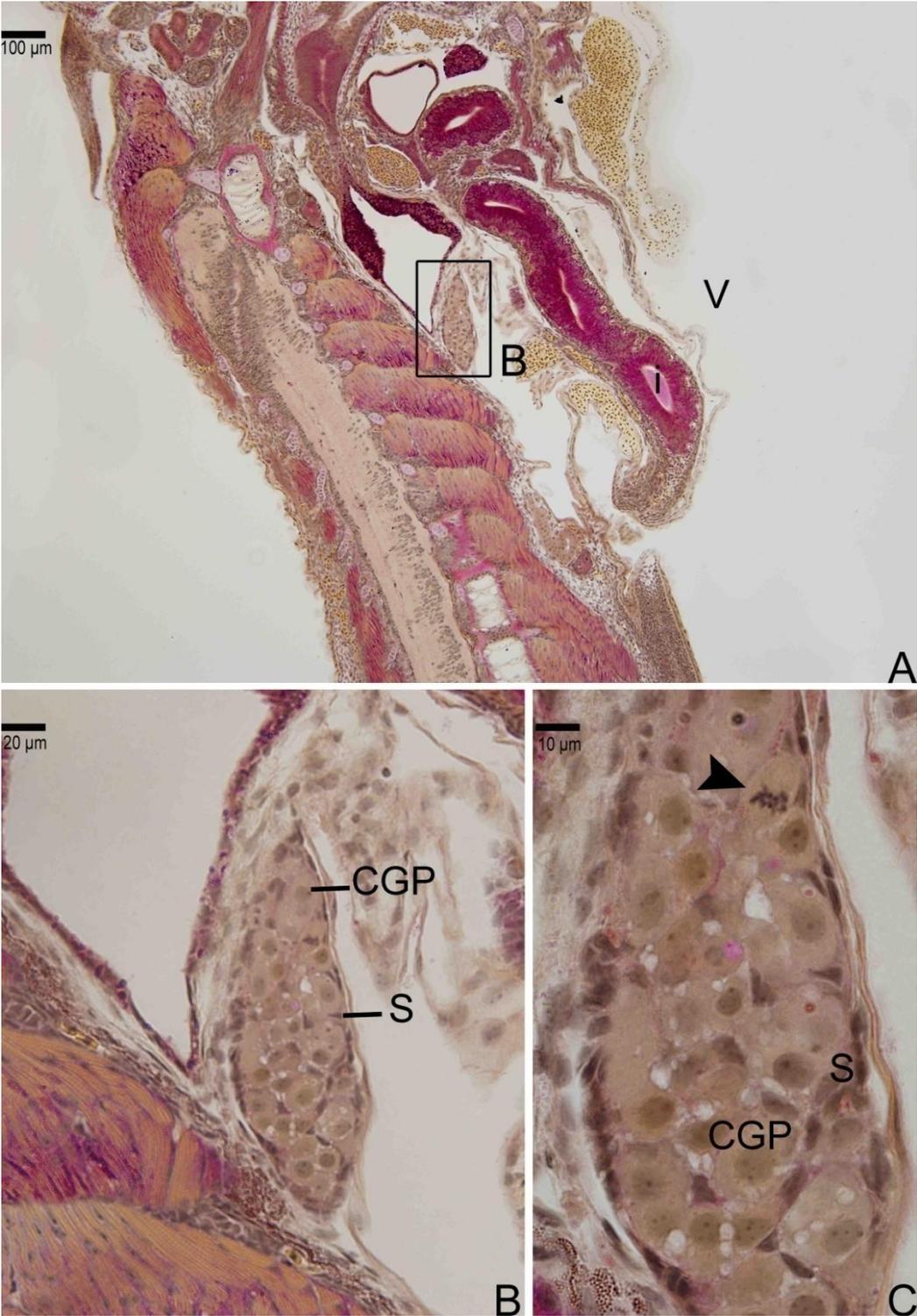


Figura 6: Corte histológico longitudinal da gônada indiferenciada supostamente masculina de *Poecilia reticulata* na cavidade celomática do animal (gônadas em destaque). Notar a organização de células na gônada. As células germinativas primordiais (CGPs) localizam-se na região ventro-cranial, enquanto que na região dorso-caudal há um acúmulo de células somáticas (A-D). Notar a intensa proliferação de CGPs (C-D). *Legenda:* CGP: célula germinativa primordial, S: célula somática, cabeça de seta: divisão celular de células somáticas, seta: gônadas, i: intestino, r: rim. *Coloração:* Amarelo Metanil.

Figura 6

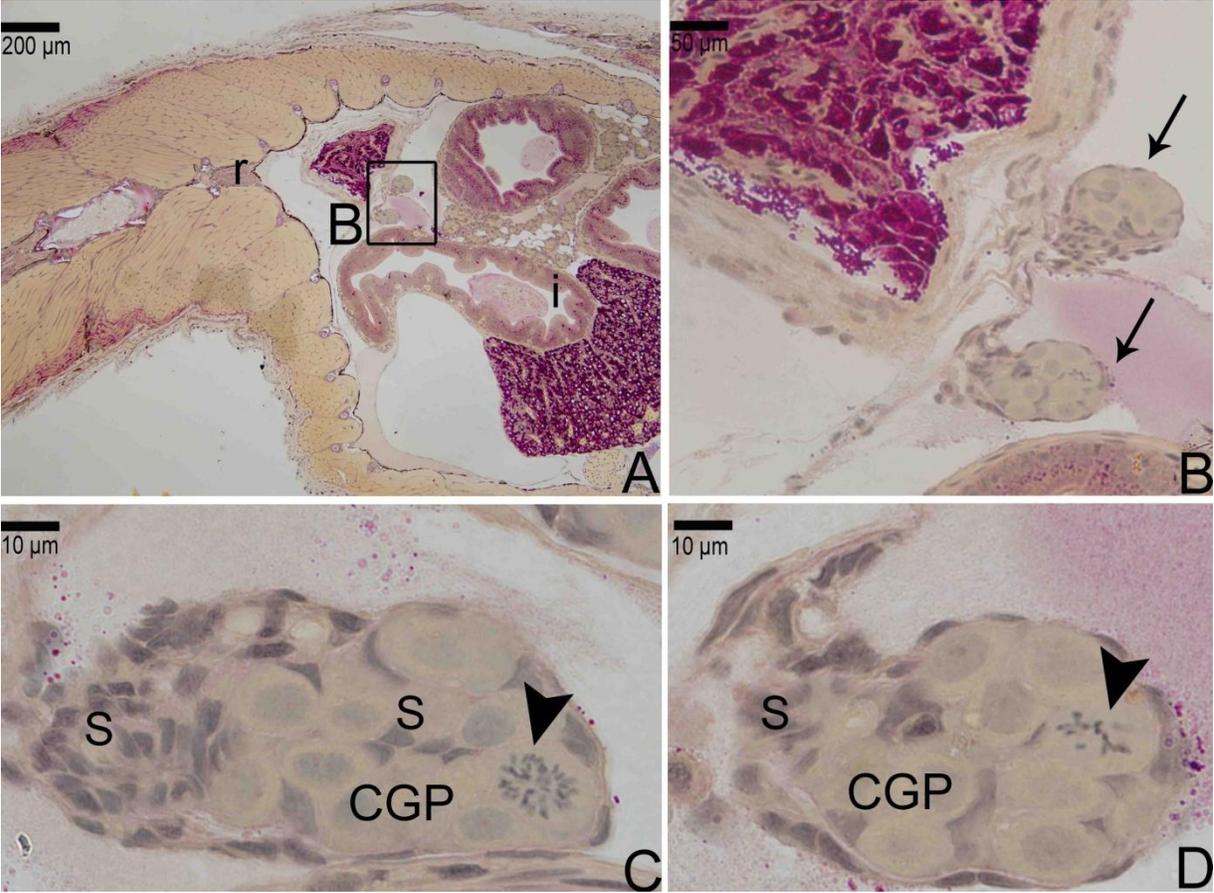


Figura 7: Corte histológico parassagital de ovários dos *Otophysi* e *Neoteleostei*, mostrando diferentes etapas da primeira foliculogênese durante a diferenciação gonadal. As oogônias proliferam no tecido gonadal (A-C) formando cistos de oogônias que entram em meiose, originando oócitos profásicos (D-H), que deixam os cistos, porém continuam imersos no tecido gonadal (F-H). Estes, agora envoltos pelas células foliculares, entram em crescimento primário (I-K). A profileração das oogônias é bastante intensa nesta etapa da diferenciação gonadal (I-K). *Legenda:* cabeça de seta: divisão celular, pf: célula pré-folicular, o: oócitos profásicos, g: oogônias, op: oócito em crescimento primário, n: núcleo, nu: nucléolo. *Coloração:* Amarelo Metanil.

Figura 7

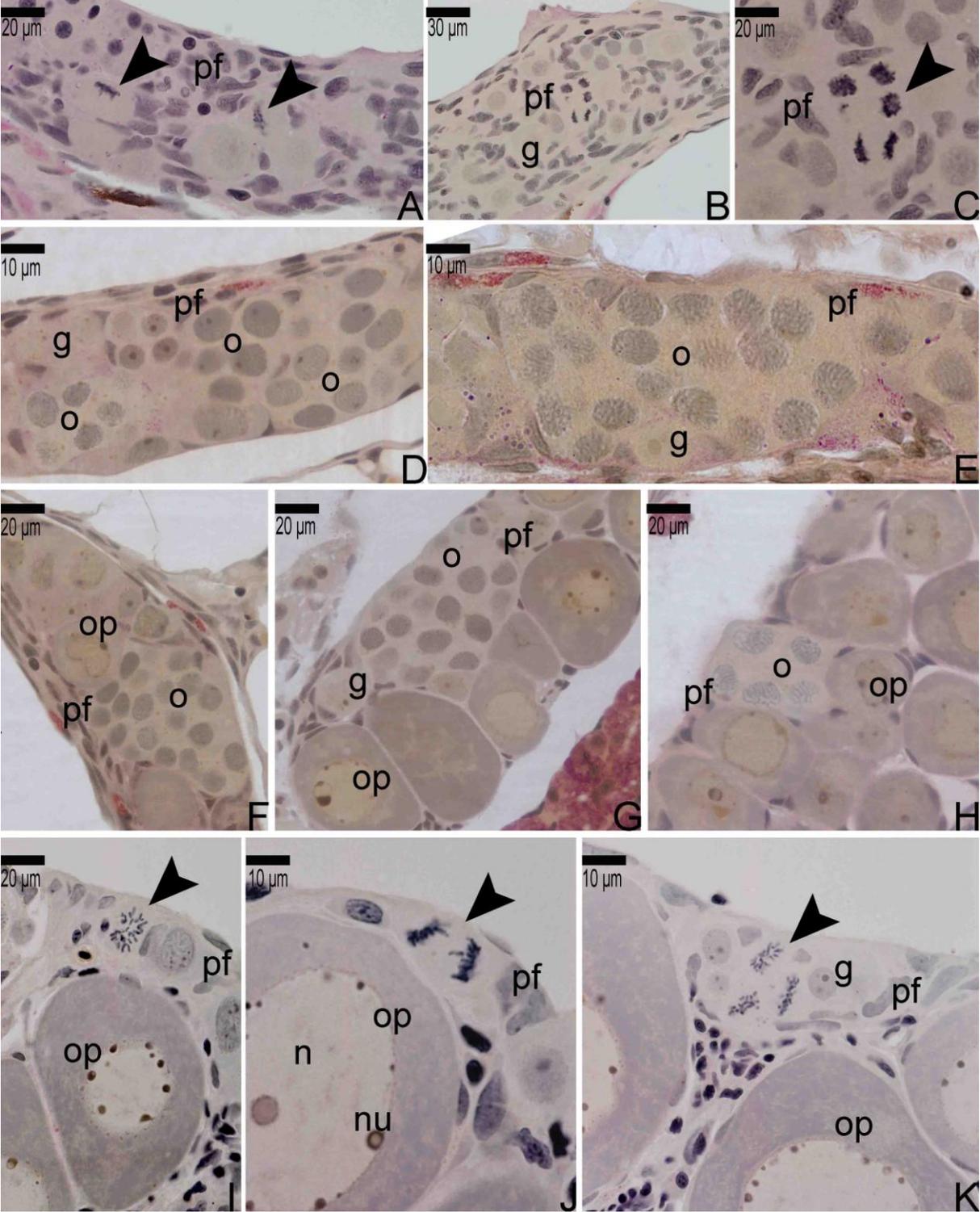


Figura 8: Eletromicrografia de ovários de *Amatitlania nigrofasciata*. Detalhes do processo de foliculogênese. No tecido gonadal, as oogônias encontram-se envolvidas pelas células somáticas, pré-foliculares, formando cistos (A-C), delimitados por uma membrana basal (C-D). No interior dos cistos, as oogônias estão interligadas por pontes citoplasmáticas (E-F). Os cistos de oogônias, oócitos e oogônias isoladas encontram-se imersos no tecido gonadal, separados dos demais componentes somáticos por uma membrana basal em formação (G-K). Após a foliculogênese se completar, os oócitos em crescimento primário completam a formação do complexo folicular (L-N). *Legenda:* pf: célula pré-folicular, o: oócitos profásicos, g: oogônias, op: oócito em crescimento primário, n: núcleo, nu: nucléolo, VS: vaso sanguíneo, m: mitocôndria, MB: membrana basal, pc: ponte citoplasmática, f: célula folicular, cabeça de seta: complexos sinaptonêmicos, seta: nüage.

Figura 8

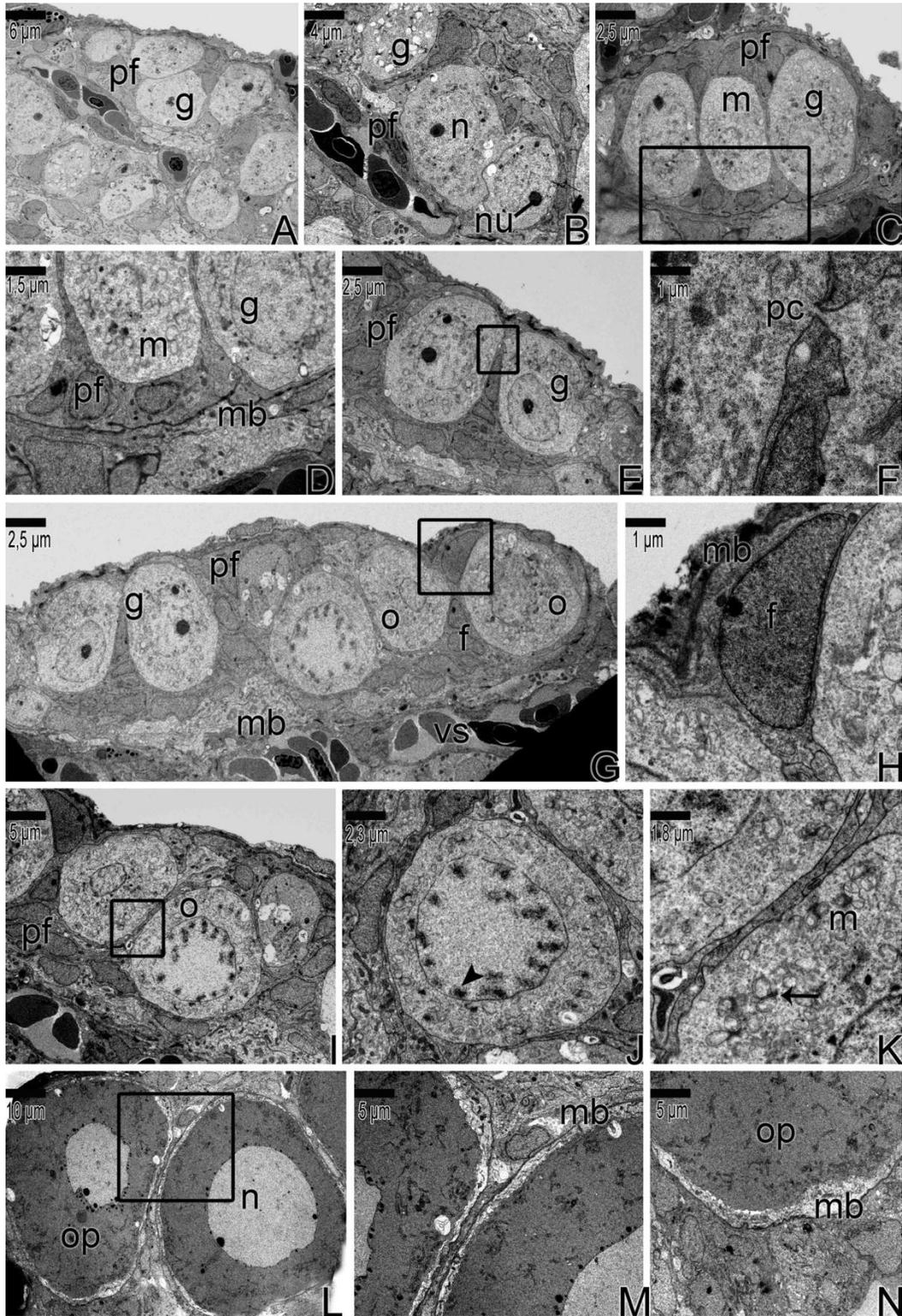


Figura 9: Corte histológico parassagital das gônadas femininas de *Tanichthys albonubes* mostrando o desenvolvimento da gônada ainda compacta, formada por oogônias e oócitos profásicos em diferentes etapas da foliculogênese, até a entrada dos oócitos em crescimento primário. *Legenda:* célula pré-folicular, o: oócitos profásicos, g: oogônias, op: oócito em crescimento primário, V: região ventral, me: mesentério, f: fígado, i: intestino, pa: pâncreas, bx: bexiga natatória. *Coloração:* Amarelo Metanil.

Figura 9

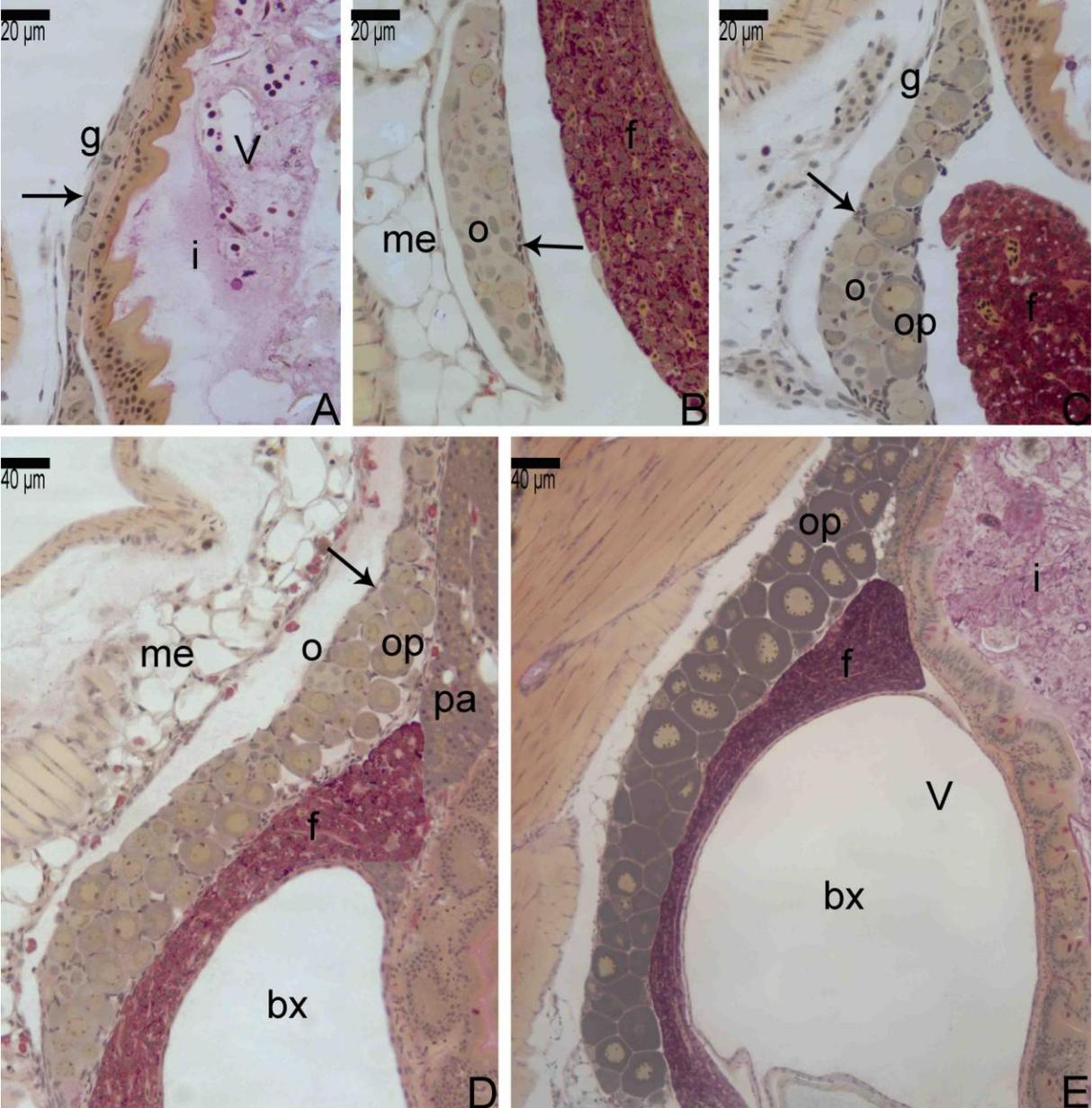


Figura 10: Corte histológico parassagital das gônadas femininas de *Gymnocorymbus ternetzi* mostrando o desenvolvimento da gônada ainda compacta, formada por oogônias e oócitos profásicos em diferentes etapas da foliculogênese, até a entrada dos oócitos em crescimento primário. *Legenda:* seta: célula pré-folicular, o: oócitos profásicos, g: oogônias, op: oócito em crescimento primário, gr: granulócito, e: estroma, f: célula folicular, VS: vaso sanguíneo. *Coloração:* Amarelo Metanil.

Figura 10

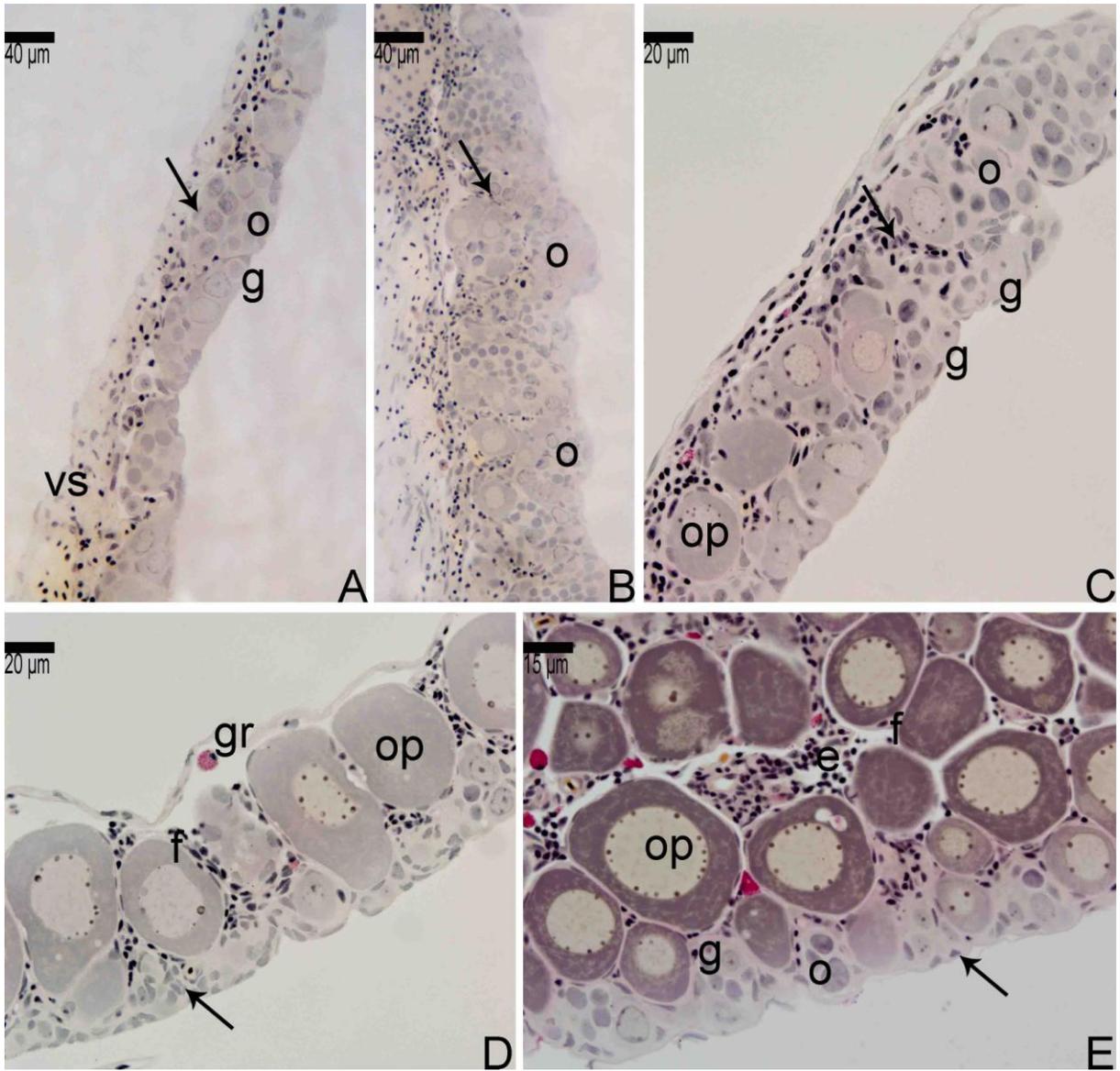


Figura 11: Corte histológico parassagital das gônadas femininas de *Corydoras schwartzi* mostrando o desenvolvimento da gônada ainda compacta, formada por oogônias e oócitos profásicos em diferentes etapas da foliculogênese, até a entrada dos oócitos em crescimento primário. Notar o tecido intersticial bastante desenvolvido nas primeiras etapas da diferenciação gonadal (A-F) e atividade mitótica das oogônias (E,F). *Legenda:* G: gônada, r: rim, V: região ventral, seta: célula pré-folicular, o: oócitos profásicos, g: oogônias, op: oócito em crescimento primário, e: estroma (tecido intersticial), f: célula folicular, cabeça de seta: divisão celular de oogônias. *Coloração:* Amarelo Metanil.

Figura 11

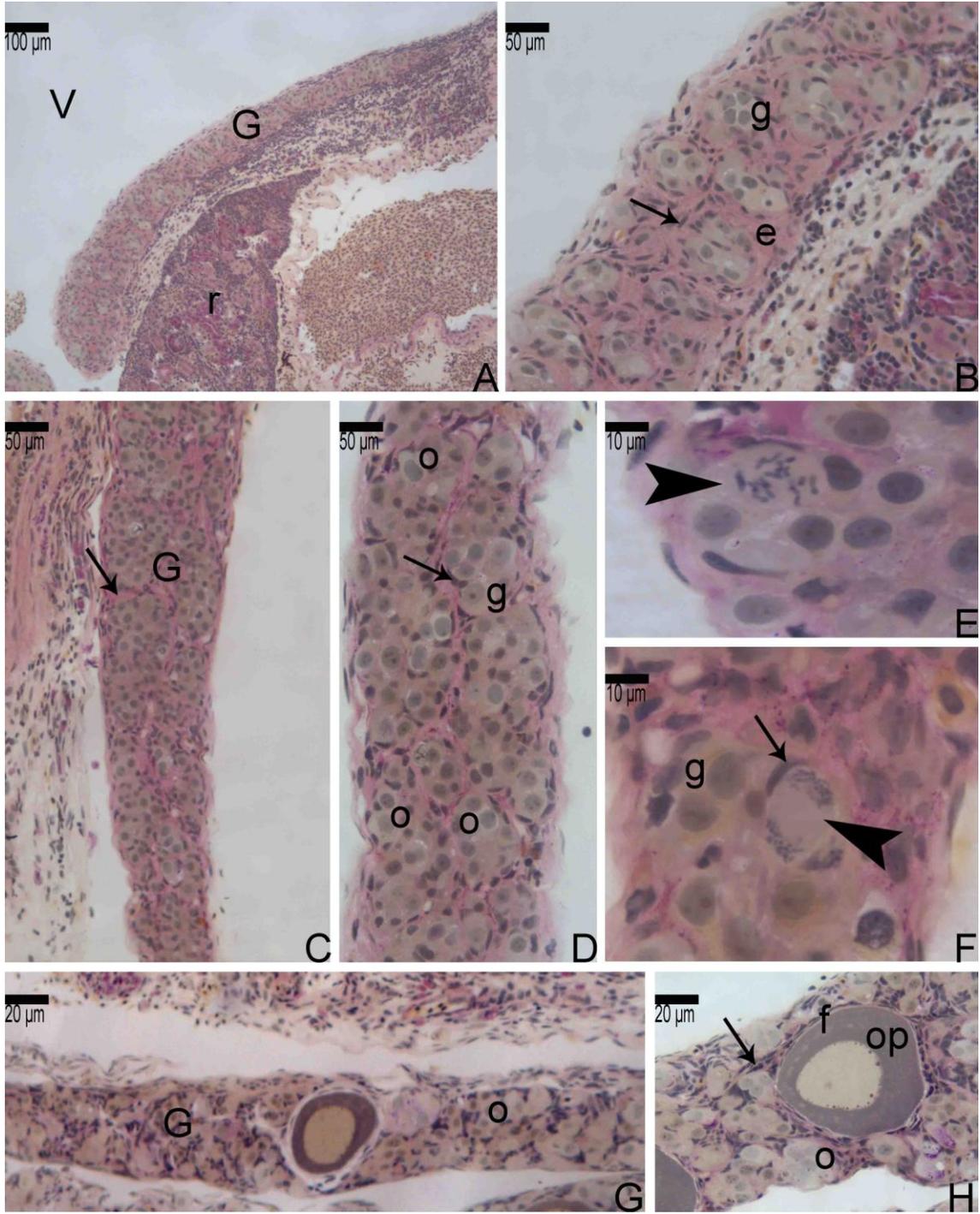


Figura 12: Corte histológico parassagital das gônadas femininas de *Amatitlania nigrofasciata* em início de diferenciação gonadal, mostrando a gônada feminina com grande quantidade de oogônias e ainda baixa atividade meiótica. C-D) Porção caudal da gônada funde-se ao ducto renal, os quais desembocam na papila urogenital. *Legenda:* seta: região de conexão entre a gônada e o rim, g: oogônia, RV: região ventral, s: célula somática, i: intestino, ol: oócito leptotênico, oz: oócito zigotênico, dr: ducto renal, pf: células pré-foliculares, a: anáfase. *Coloração:* Amarelo Metanil.

Figura 12

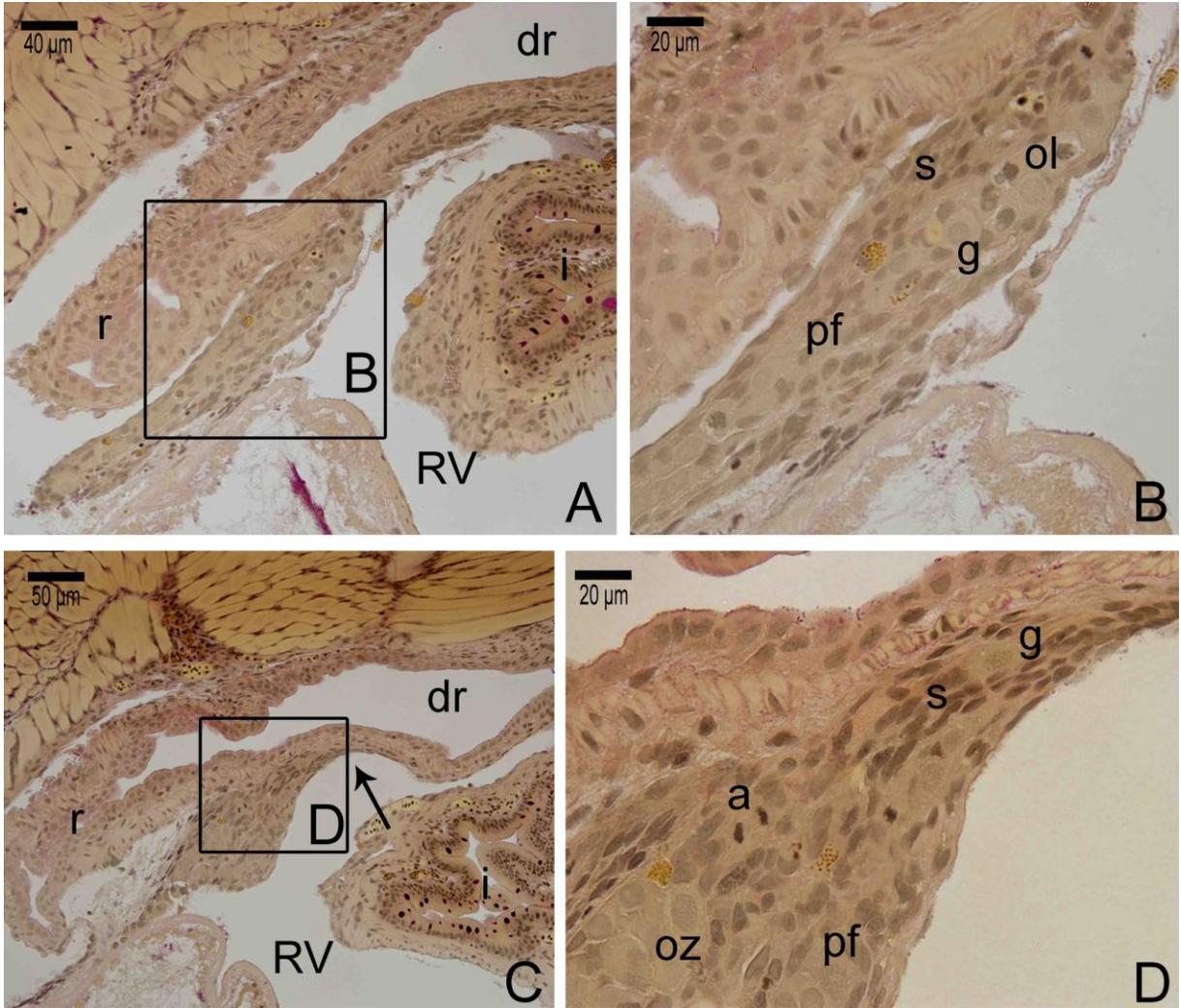


Figura 13: Corte histológico parassagital das gônadas femininas de *Amatitlania nigrofasciata* em início de diferenciação gonadal, mostrando oócitos profásicos iniciais. *Legenda:* pf: célula pré-folicular, s: célula somática, od: oócito diplotênico, ol: oócito leptotênico, oz: oócito zigotênico, opq: oócito paquitênico, V: região ventral, G: gônada, i: intestino. *Coloração:* Amarelo Metanil.

Figura 13

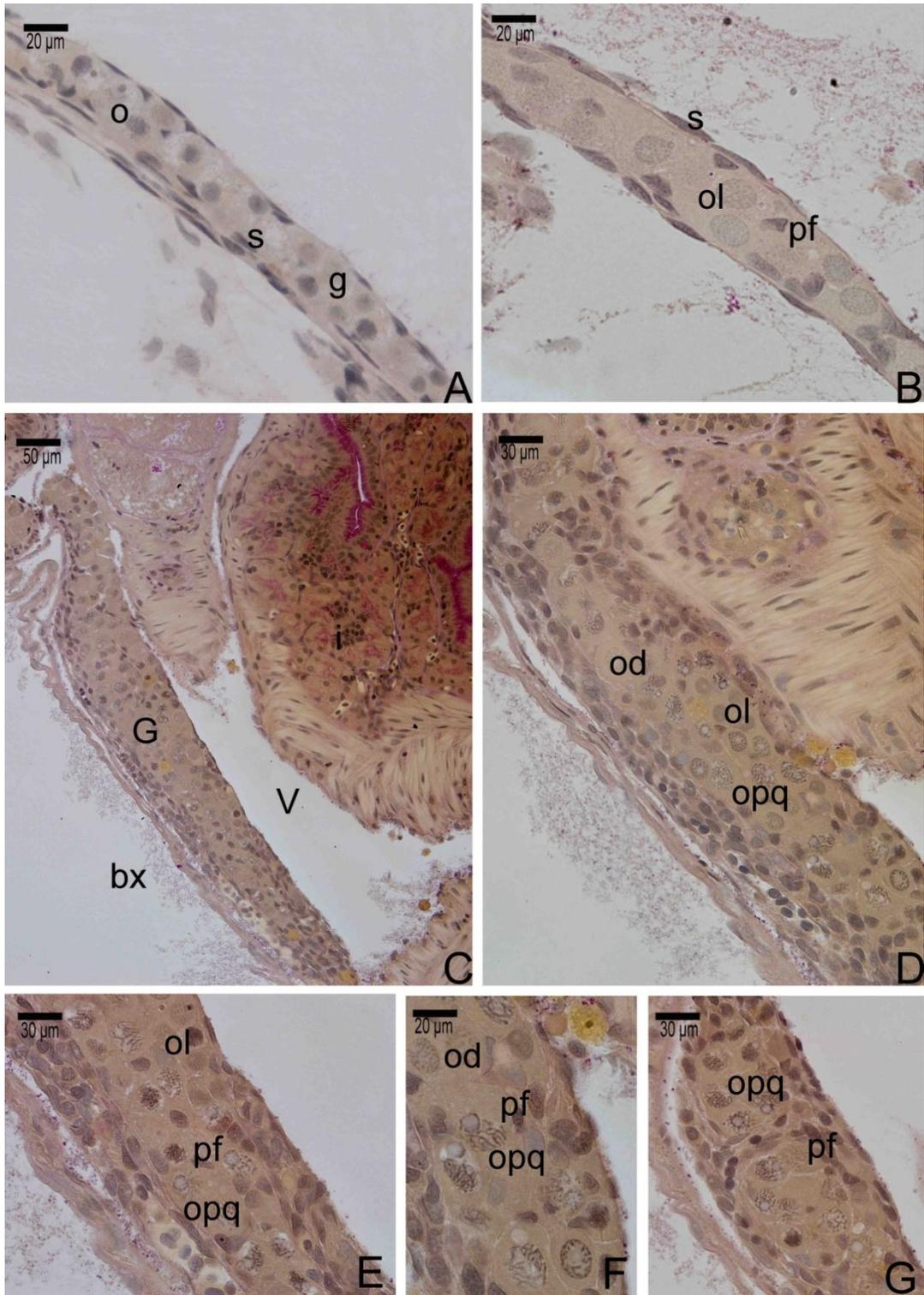


Figura 14: Corte histológico parassagital das gônadas femininas de *Amatitlania nigrofasciata* em início de diferenciação gonadal, mostrando oócitos profásicos iniciais e entrada em crescimento primário. *Legenda:* pf: célula pré-folicular, cp: oócito em crescimento primário, g: oogônias, o: oócitos profásicos, vs: vaso sanguíneo. *Coloração:* Amarelo Metanil.

Figura 14

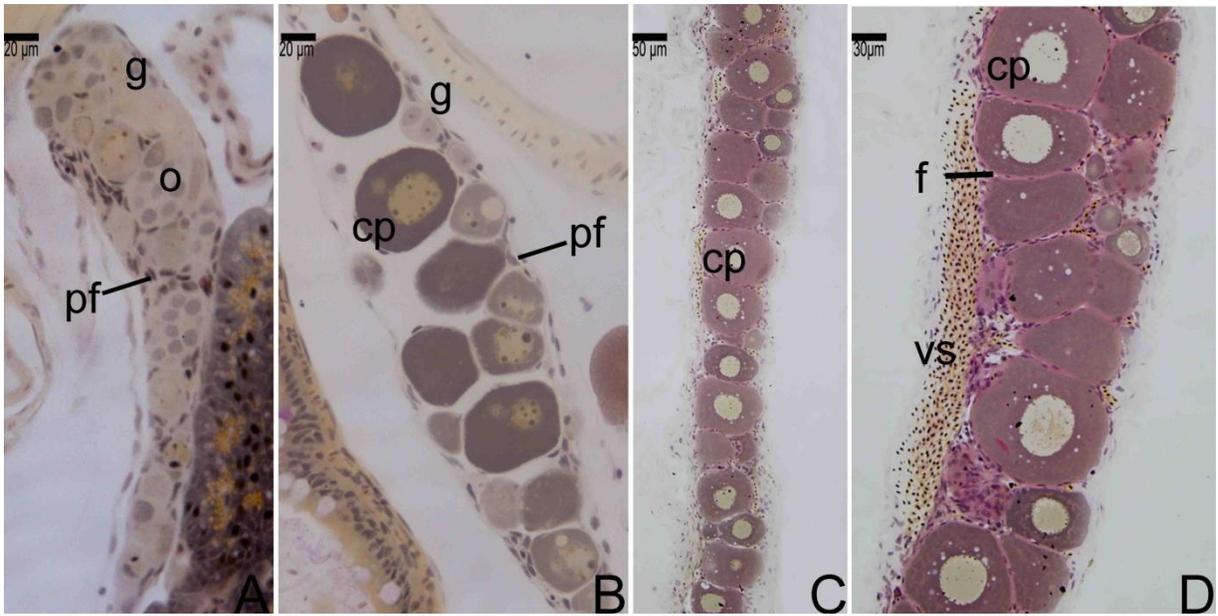


Figura 15: Corte histológico longitudinal (A-B) e transversal (C-K) das gônadas femininas de *Poecilia reticulata* em início de diferenciação gonadal, mostrando oócitos profásicos iniciais. *Legenda:* seta: gônadas, pf: célula pré-folicular, od: oócito diplotênico, ol: oócito leptotênico, oz: oócito zigotênico, opq: oócito paquitênico, s: célula somática, tn: tubo neural, V: região ventral, f: fígado, i: intestino. *Coloração:* Amarelo Metanil.

Figura 15

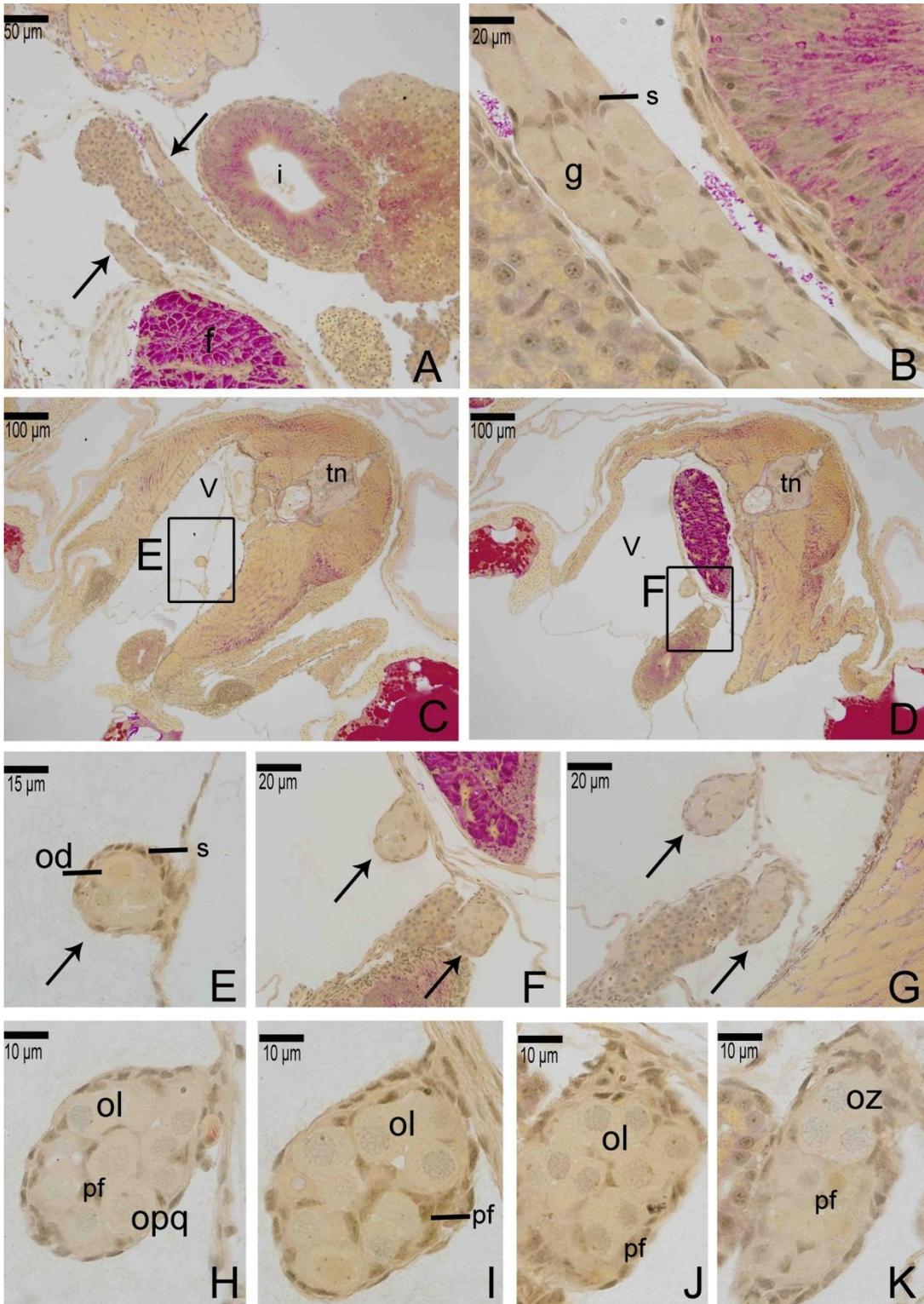


Figura 16: Corte histológico longitudinal das gônadas femininas de *Poecilia reticulata* em início de diferenciação gonadal, mostrando oócitos profásicos iniciais. Notar que a gônada ainda é um órgão par (A). *Legenda:* seta: gônadas, pf: célula pré-folicular, od: oócito diplotênico, ol: oócito leptotênico, oz: oócito zigotênico, opq: oócito paquitênico, V: região ventral, nu: nucléolo, cp: oócito em crescimento primário, f: célula folicular, g: oogônia. *Coloração:* Amarelo Metanil.

Figura 16

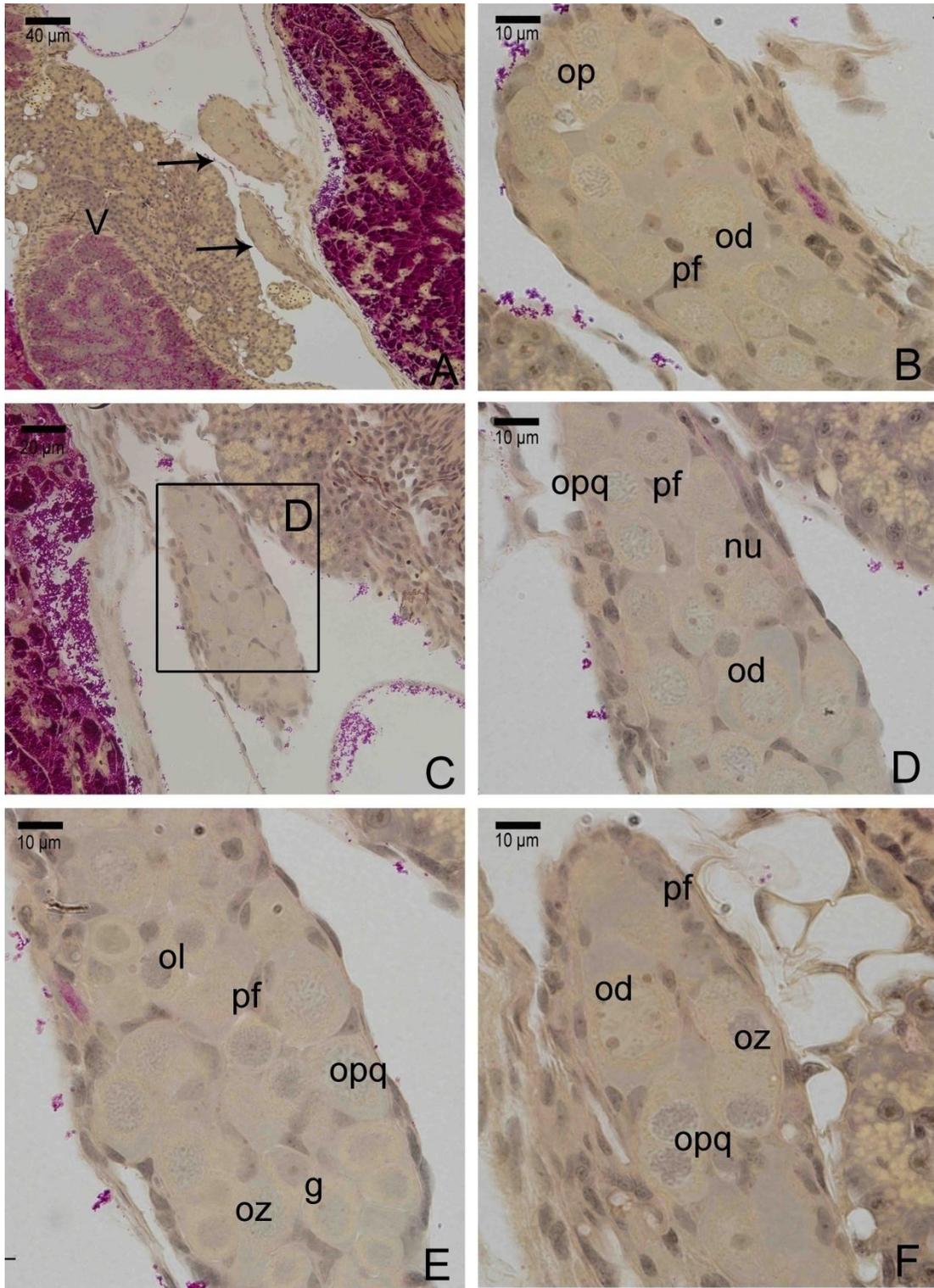


Figura 17: Corte histológico parassagital das gônadas femininas de *Poecilia reticulata* em início de diferenciação gonadal, mostrando oócitos profásicos iniciais e entrada em crescimento primário. *Legenda:* pf: célula pré-folicular, s: célula somática, od: oócito diplotênico, ol: oócito leptotênico, oz: oócito zigotênico, opq: oócito paquitênico, n: núcleo, nu: nucléolo, cp: oócito em crescimento primário, f: célula folicular, g: oogônia. *Coloração:* Amarelo Metanil.

Figura 17

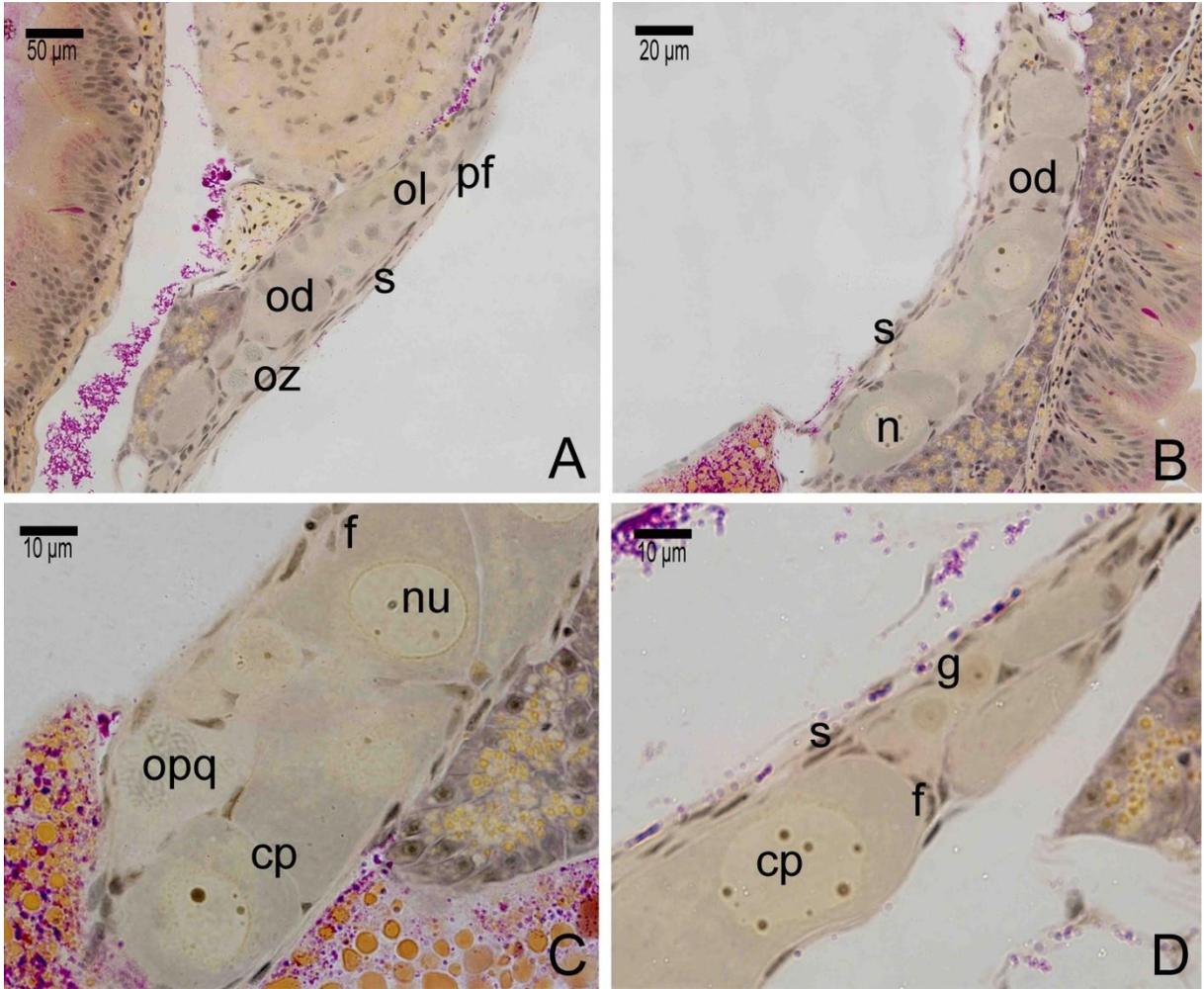


Figura 18: Corte histológico transversal das gônadas femininas de *Tanichthys albonubes*. Formação da cavidade ovariana em direção à região dorsal da gônada. Ovário ainda compacto (B) e com projeções laterais (C-D). Fechamento da cavidade ovariana (E-G). Notar a cavidade ovariana separada de cada um dos ovários (E, H), formando uma única cavidade na região caudal do animal (I-K). Gônada já diferenciada com cavidade ovariana na região dorsal (L). M: Corte histológico transversal das gônadas femininas de *Gymnocorymbus ternetzi* mostrando gônada compacta (N) e o fechamento da cavidade ovariana a partir da proliferação de células somáticas apenas em um dos lados do ovário (O,P). *Legenda:* cabeça de seta: localização dos ovários, me: mesentério, i: intestino, ov: ovário, ca: cavidade ovariana, seta: lâminas teciduais, bx: bexiga natatória, lu: lúmen ovariano, seta sinuosa: lúmen ovariano. *Coloração:* Amarelo Metanil.

Figura 18

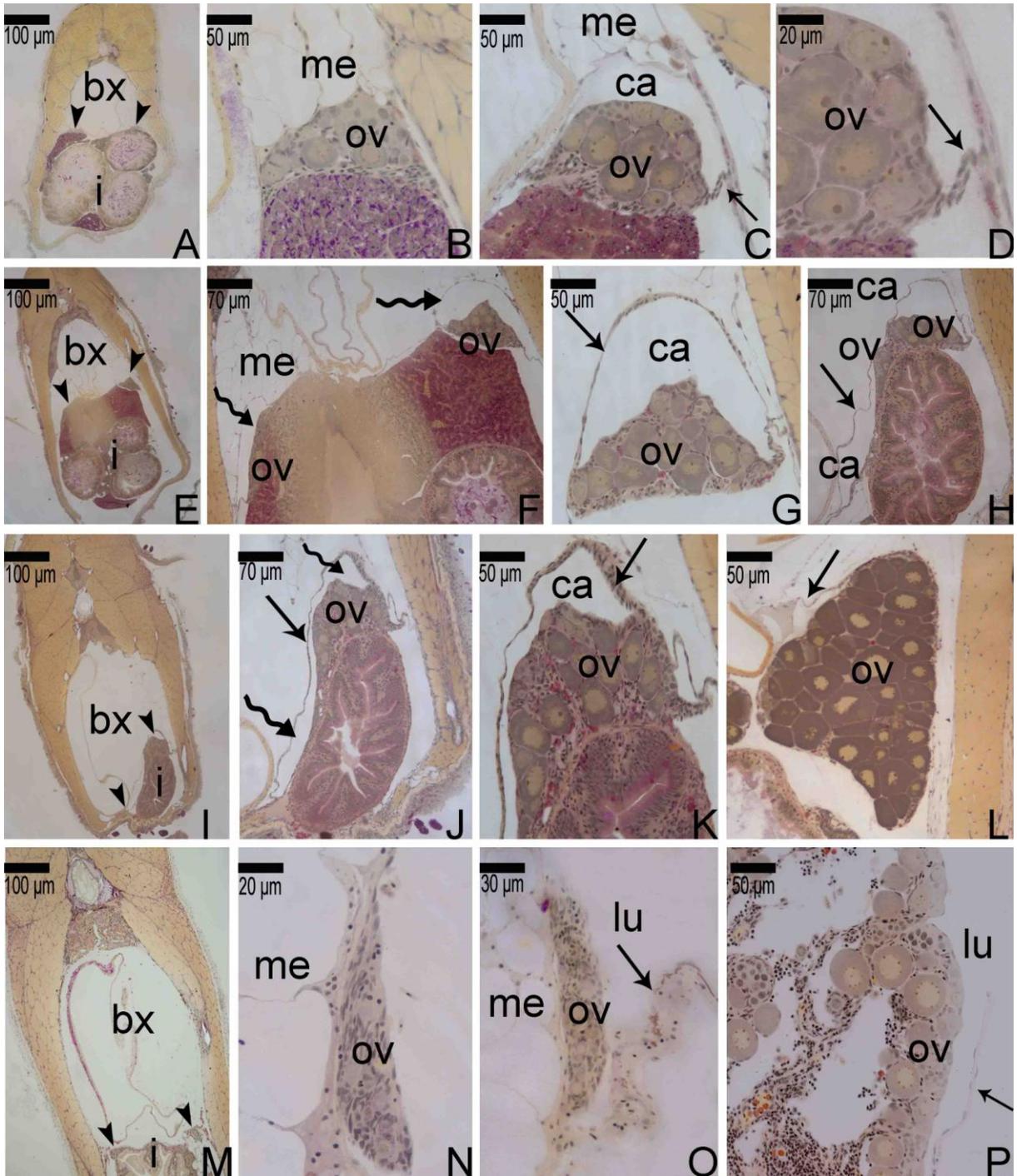


Figura 19: Corte histológico transversal das gônadas femininas de *Amatitlania nigrofasciata*. Ovário ainda compacto (B,C) e com projeções laterais (D-E). Fechamento da cavidade ovariana (F) e a estrutura na gônada já diferenciada (G), com epitélio germinativo definido (H). *Legenda:* cabeça de seta: localização dos ovários, me: mesentério, i: intestino, ca: cavidade ovariana, seta: lâminas teciduais, bx: bexiga natatória, cp: oócito em crescimento primário, op: oócigo paquitênico, g: oogônia, eg: epitélio germinativo. *Coloração:* Amarelo Metanil.

Figura 19

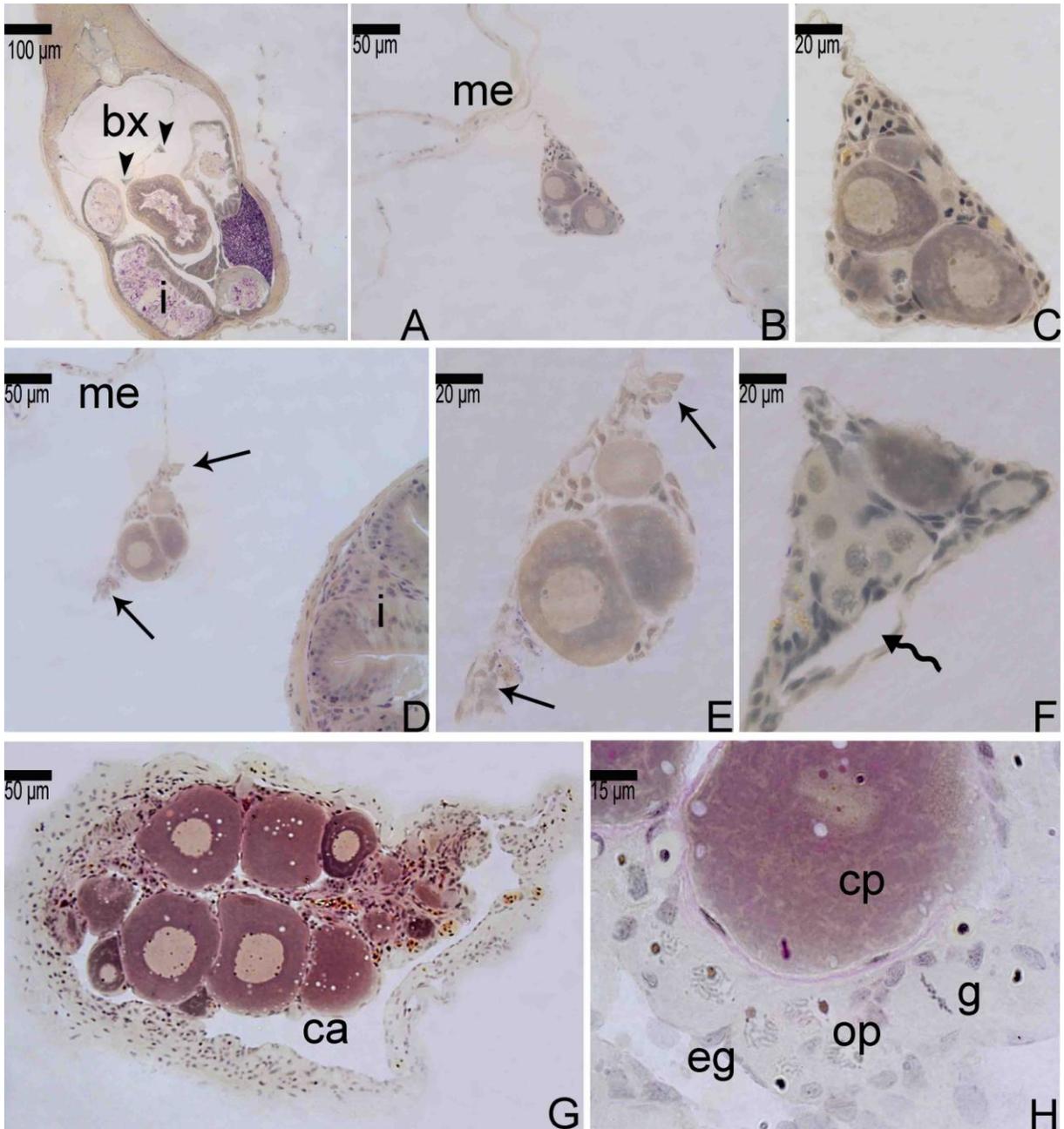


Figura 20: Corte histológico transversal das gônadas femininas de *Poecilia reticulata*. Formação da cavidade ovariana em direção à região dorsal da gônada. Ovário com projeções laterais (A-B). Fechamento da cavidade ovariana apenas em um dos lados (C-D). Fechamento da cavidade ovariana em ambos os lados (E-F). Fusão das cavidades, formando um lúmen ovariano (G-H). Porção final da gônada, próxima ao gonoducto (I-J). *Legenda:* cabeça de seta: localização dos ovários, me: mesentério, i: intestino, ov: ovário, ca: cavidade ovariana, seta: lâminas teciduais, bx: bexiga natatória, seta sinuosa: lúmen ovariano. *Coloração:* Amarelo Metanil.

Figura 20

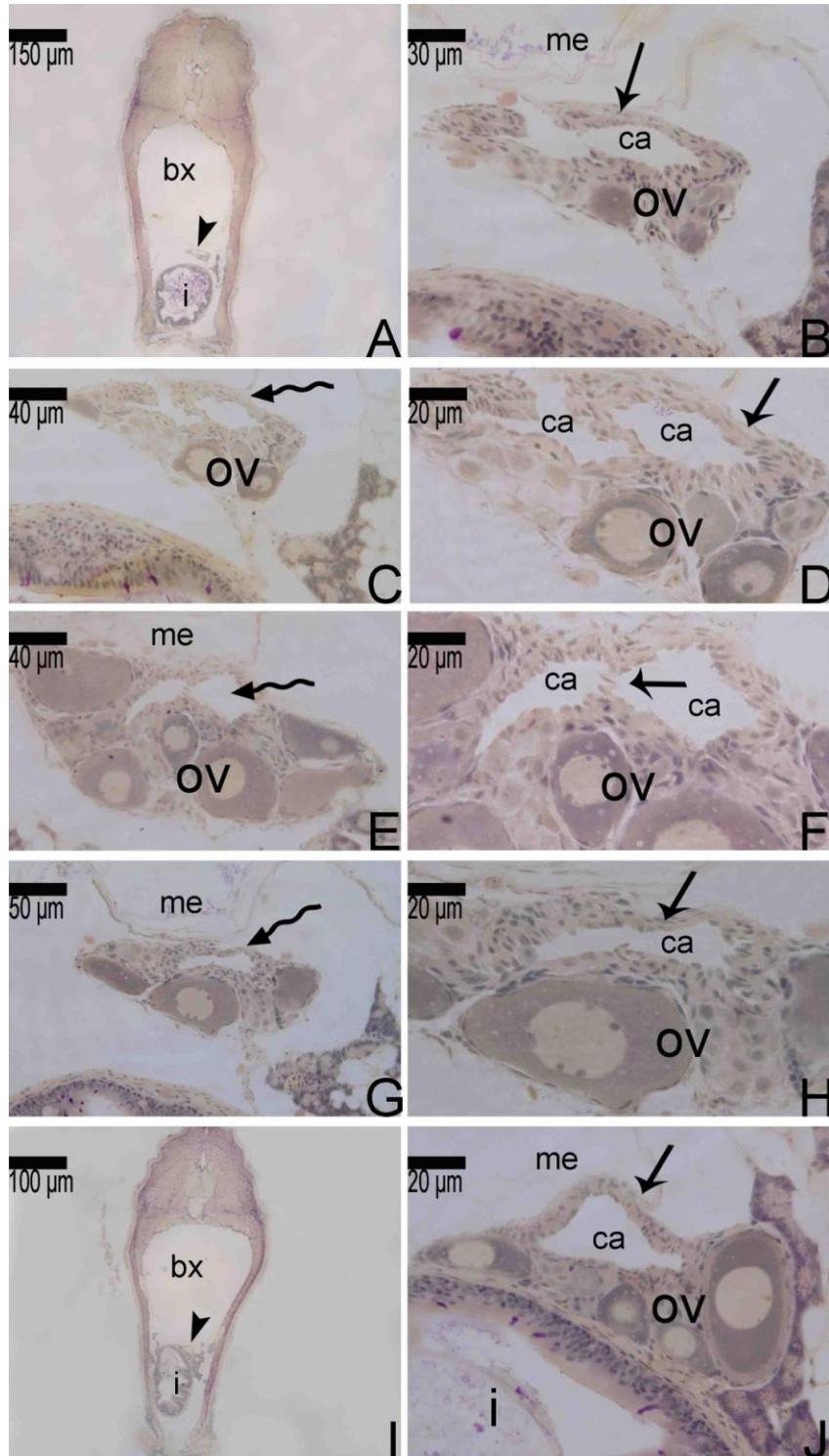


Figura 21: Corte histológico transversal (A,B) e parassagital (C-F) das gônadas femininas de *Poecilia reticulata*, mostrando a formação do gonoducto que se conecta à papila urogenital. *Legenda:* cabeça de seta: localização do gonoducto, me: mesentério, i: intestino, ov: ovário, seta: lâminas teciduais, bx: bexiga natatória, pu: papila urogenital, du: gonoducto. *Coloração:* Amarelo Metanil.

Figura 21

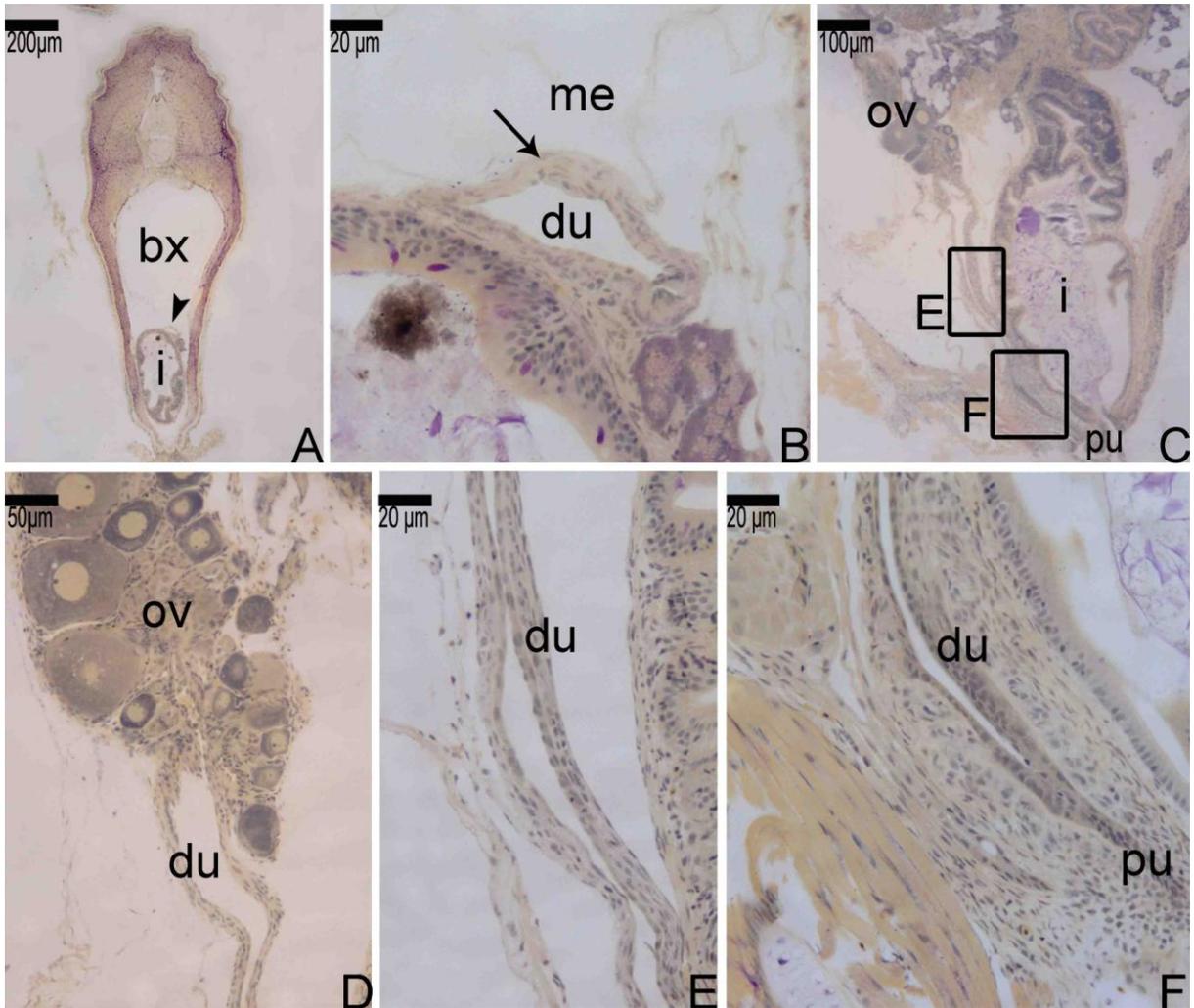


Figura 22: Corte histológico parassagital das gônadas femininas de *Tanichthys albonubes*. Formação das lamelas ovígeras (A-D) e estabelecimento do epitélio germinativo. Estrutura já diferenciada em corte transversal, mostrando região ventral livre de lamelas (E-F). *Legenda:* seta: formação das lamelas ovígeras, ci: cistos, cp: oócito em crescimento primário, seta sinuosa: delimitação da cavidade ovariana. *Coloração:* Amarelo Metanil.

Figura 22

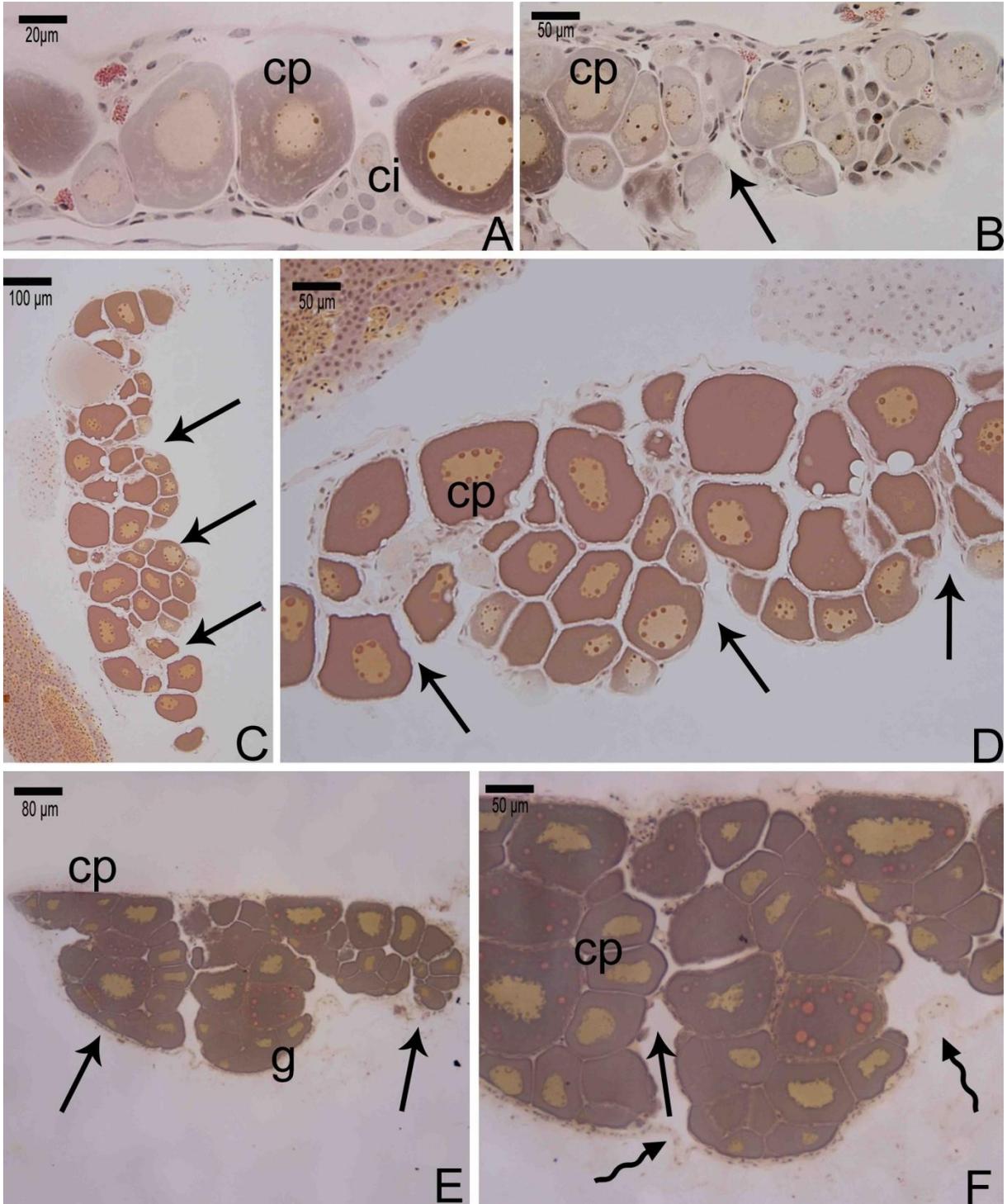


Figura 23: Corte histológico parassagital das gônadas femininas de *Gymnocorymbus ternetzi*. Formação das lamelas ovíferas mostrando a formação de invaginações no tecido gonadal, pela movimentação das células somáticas e estabelecimento do epitélio germinativo. *Legenda:* seta: região de formação das lamelas ovíferas pela invaginação das células somáticas. *Coloração:* Amarelo Metanil.

Figura 23

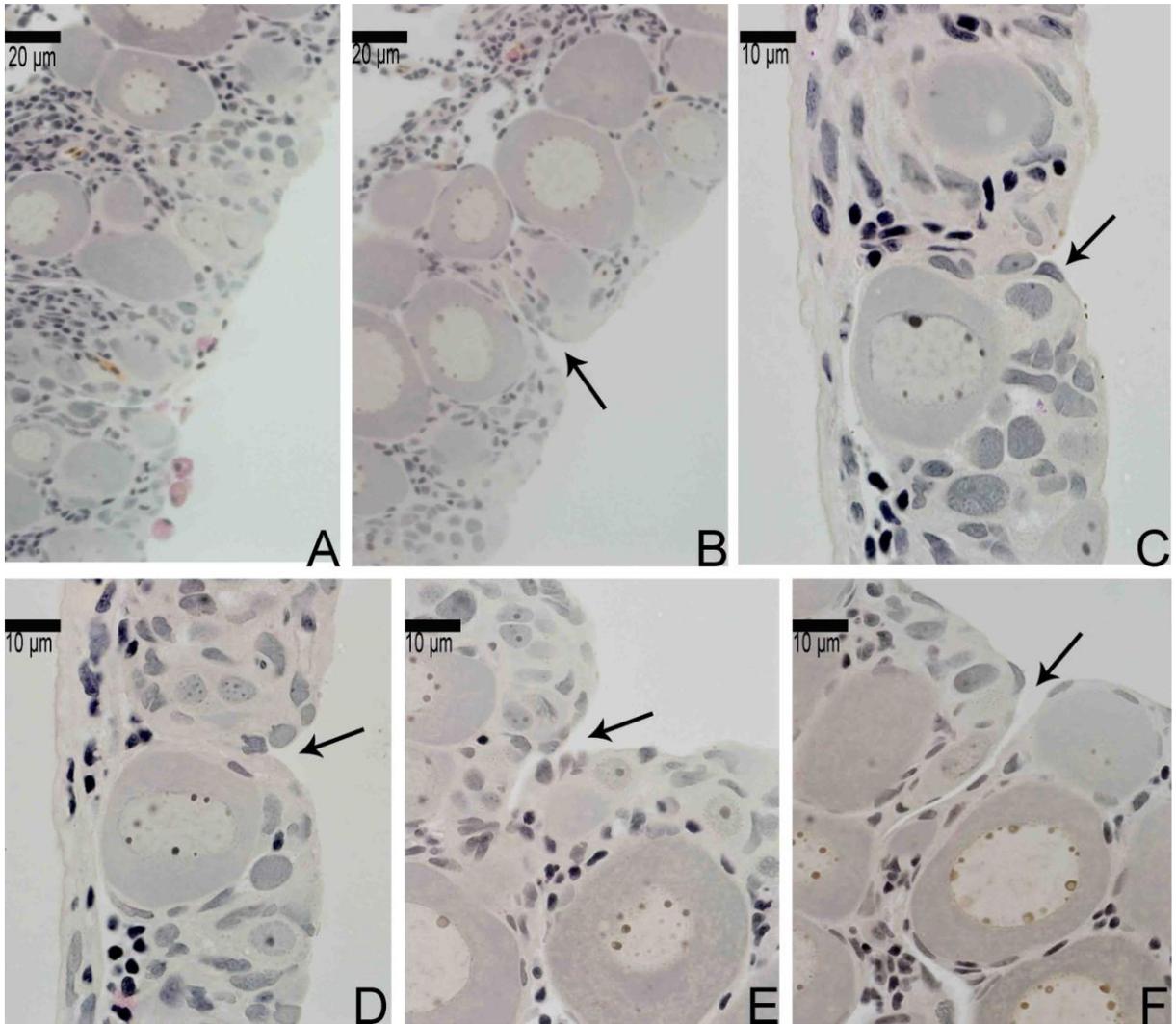


Figura 24: Corte histológico parassagital (A-H), longitudinal (I) e transversal (J) das gônadas femininas de *Corydoras schwartzi*. Formação da cavidade ovariana e primórdio das lamelas ovíferas pelo afastamento de fileiras das células somáticas longitudinalmente ao tecido gonadal. Lamelas ovíferas desenvolvidas com cavidade ovariana definida e epitélio germinativo estabelecido (I, J). *Legenda:* seta: células somáticas organizadas em fileiras paralelas no interior do ovário para formação do lúmen e lamelas ovíferas, seta sinuosa: espaçamento formado pelo afastamento das células somáticas, ca: cavidade ovariana, la: lamela ovífera, r: rim, eg: epitélio germinativo. *Coloração:* Amarelo Metanil.

Figura 24

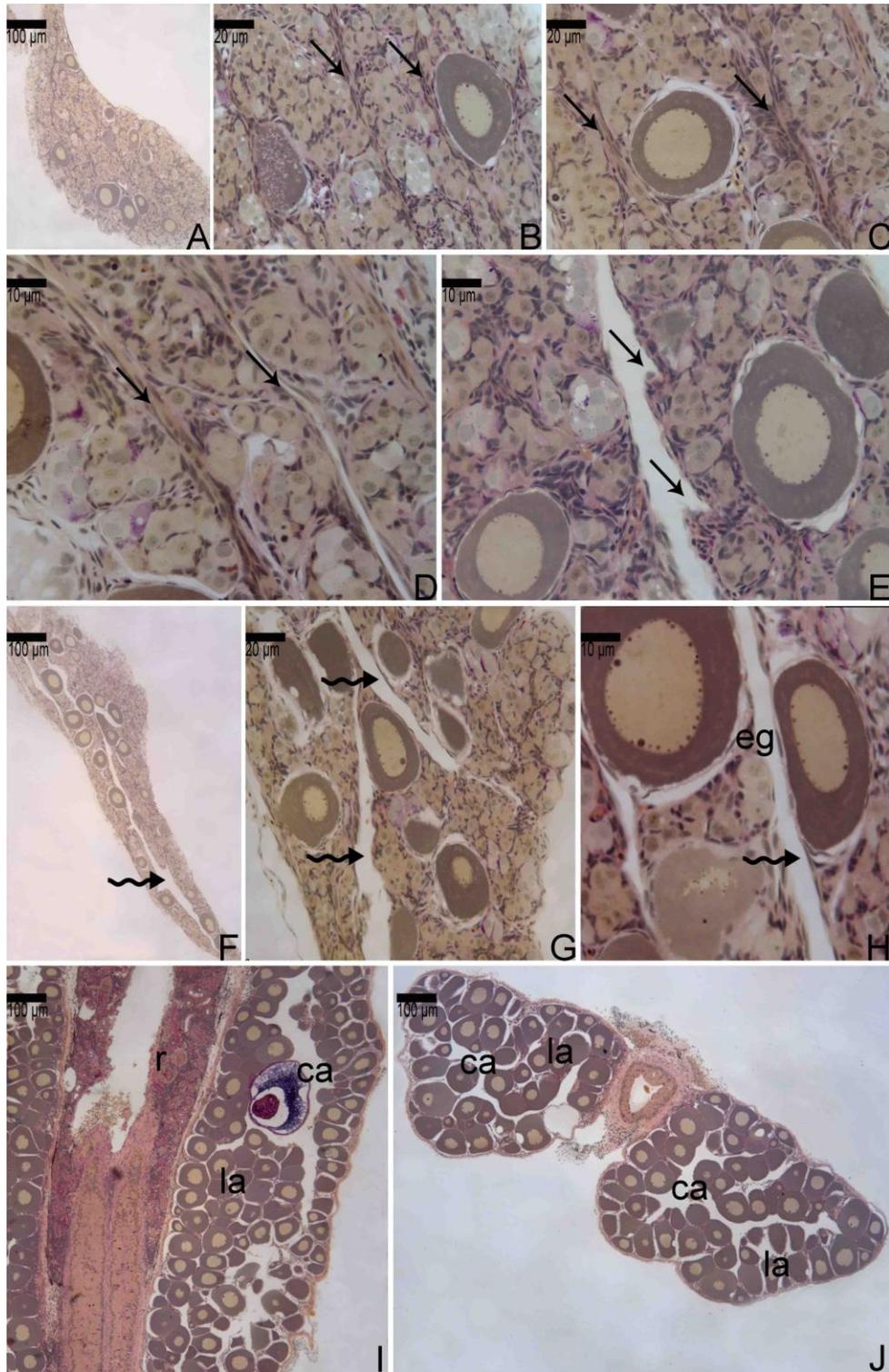


Figura 25: Corte histológico parassagital das gônadas femininas de *Amatitlania nigrofasciata*. Formação das lamelas ovígeras pela movimentação das células somáticas e estabelecimento do epitélio germinativo. *Legenda:* La: lamelas ovígeras, lu: lúmen ovariano, eg: epitélio germinativo. *Coloração:* Amarelo Metanil.

Figura 25

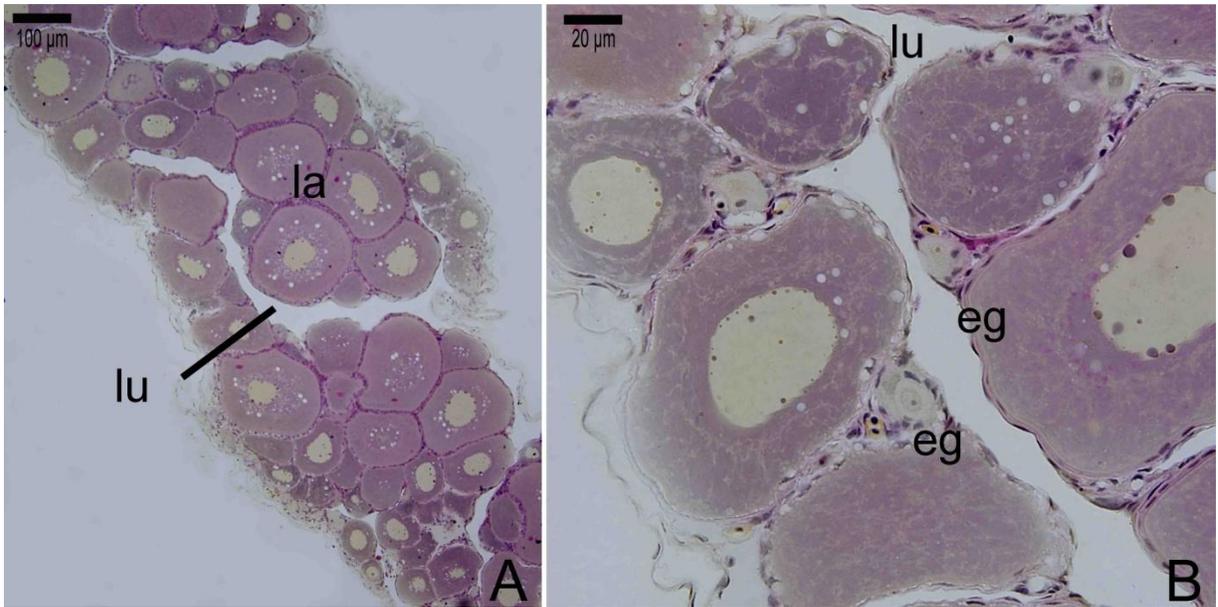


Figura 26: Corte histológico longitudinal das gônadas femininas de *Poecilia reticulata*. Formação da cavidade ovariana e estabelecimento do epitélio germinativo. *Legenda:* ca: cavidade ovariana, eg: epitélio germinativo, cp: oócito em crescimento primário, cs: oócito em crescimento secundário. *Coloração:* Amarelo Metanil.

Figura 26

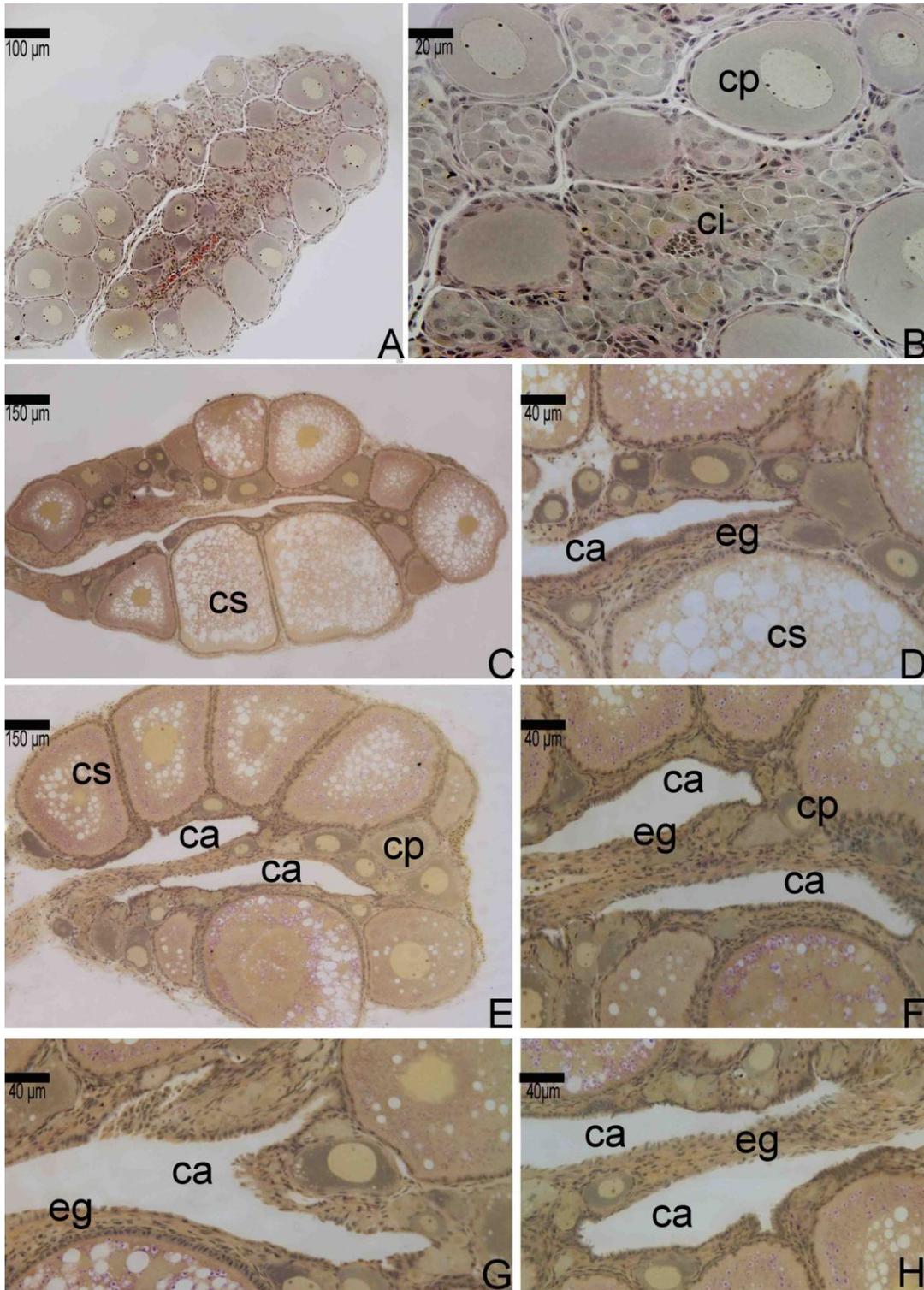


Figura 27: Cortes longitudinais de ovário de *Poecilia reticulata* com oócitos já em crescimento secundário. O epitélio germinativo encontra-se totalmente estabelecido, porém, inicialmente o epitélio do ducto ovariano é retilíneo, apresentando, posteriormente, criptas e reentrâncias que ligam a cavidade ovariana aos oócitos. *Legenda:* du: gonodúcto, eg: epitélio germinativo, cp: oócito em crescimento primário, cs: oócito em crescimento secundário, seta: criptas ovarianas, ci: cistos, g: oogônias, ce: células epiteliais. *Coloração:* Amarelo Metanil.

Figura 27

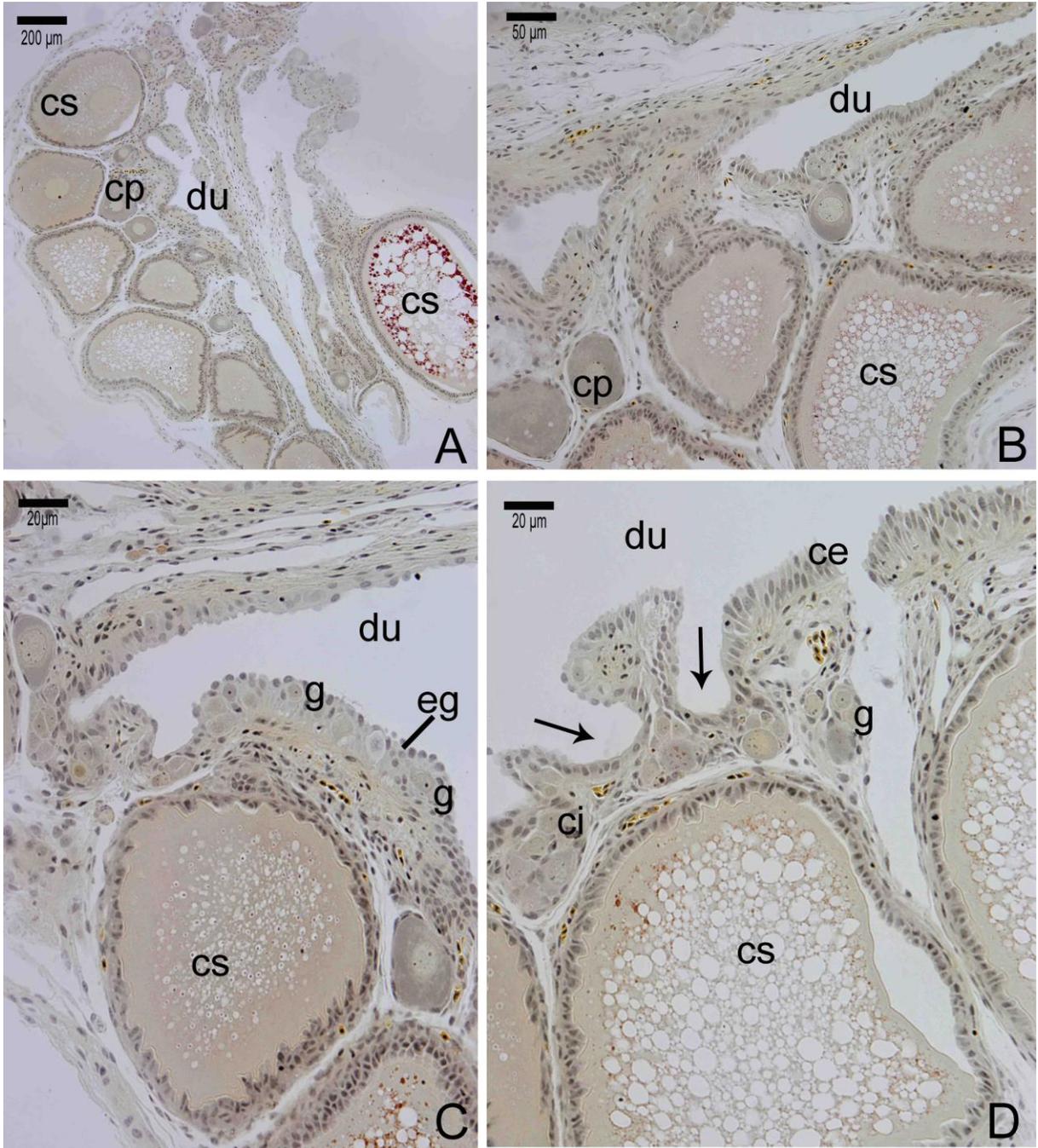


Figura 28: Corte histológico parassagital das gônadas femininas de *Otophysi* e *Neoteleostei*. Formação do estroma ovariano, pelo aparecimento de espaços extravasculares (A-D). Formação da teca, a partir de células mesenquimais do estroma ovariano (E-F). *Legenda:* seta: região do estroma ovariano, e: estroma, ex: espaço extravascular, seta sinuosa: células mesenquimais, pt: célula pré-tecal, t: teca. *Coloração:* Amarelo Metanil.

Figura 28

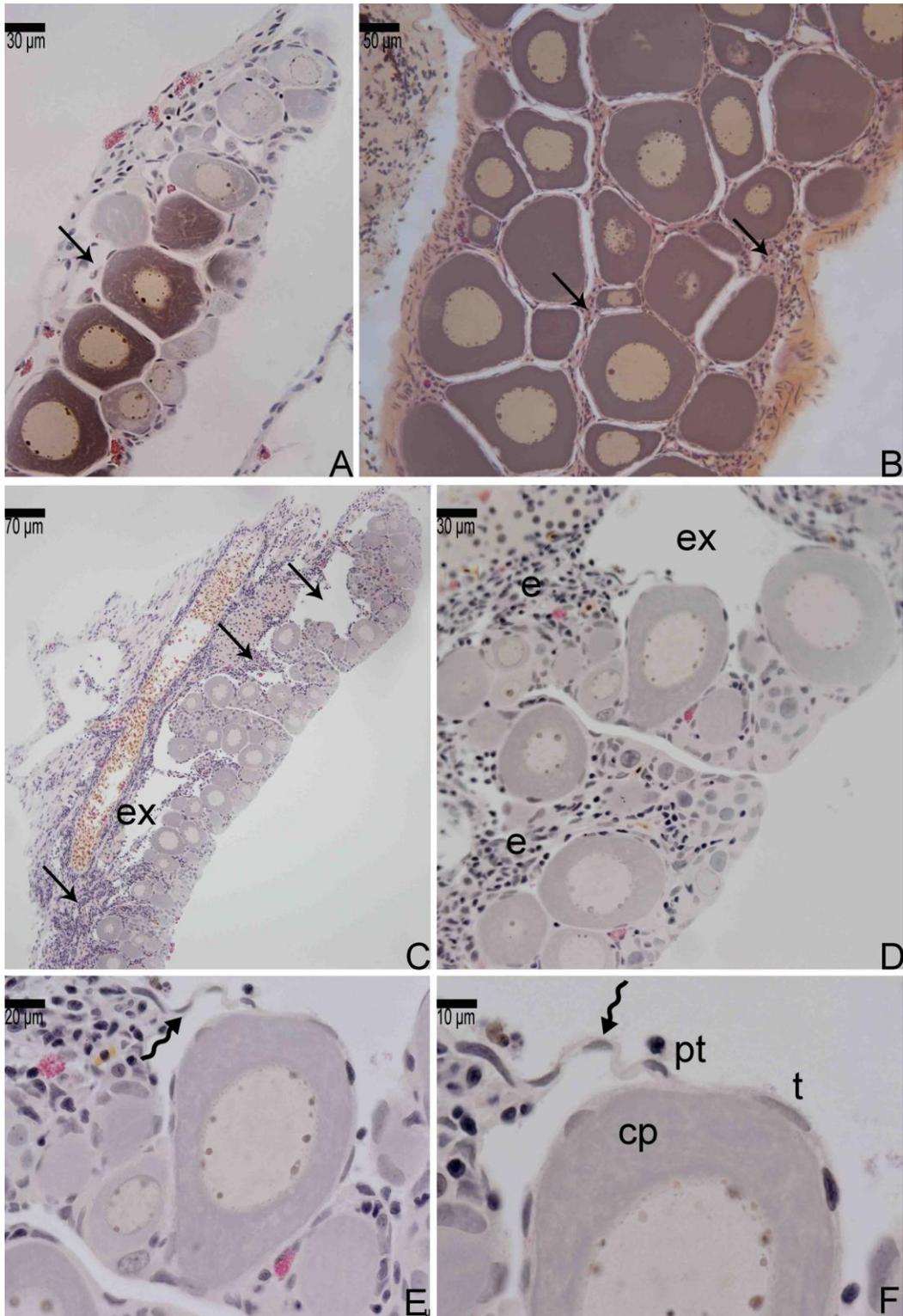


Figura 29: Corte histológico de ovário de *Corydoras schwartzi* – Método de Reticulina (A,D,G) e Eletromicrografia de *Amatitlania nigrofasciata*. Formação da teca a partir de células mesenquimais do estroma ovariano. A célula pré-tecal aproxima-se do folículo ovariano, apoia-se sobre sua membrana basal e diferencia-se em teca. *Legenda:* seta: células pré-tecais e tecais, MB: membrana basal, cp: oócito em crescimento primário, pt: célula pré-tecal, t: teca, f: célula folicular, n: núcleo, nu: nucléolo.

Figura 29

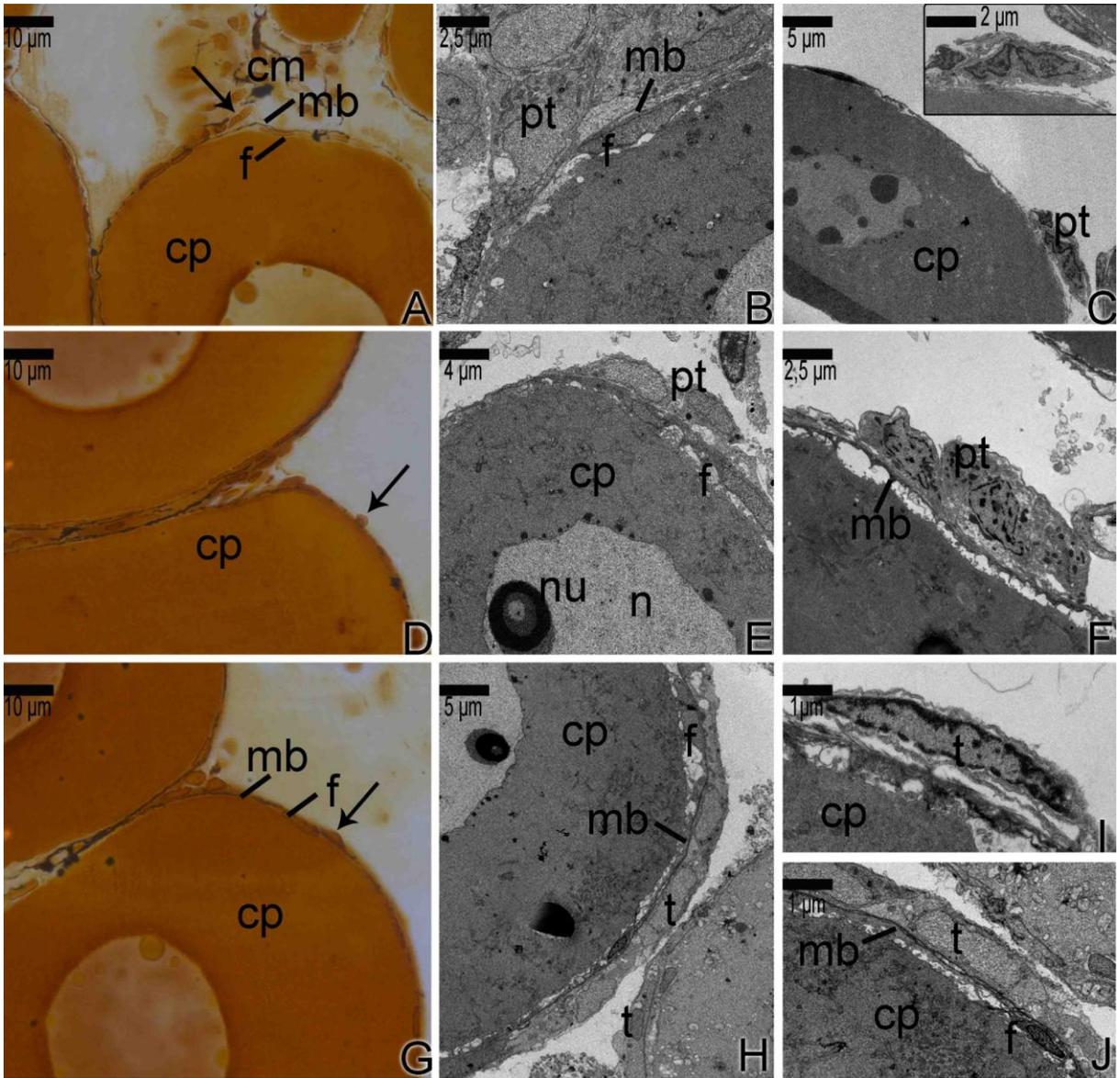


Figura 30: Corte histológico das gônadas femininas de *Tanichthys albonubes* – Método de Reticulina. Estabelecimento do epitélio germinativo a partir da formação da membrana basal. Os componentes germinativos encontram-se separados dos demais componentes somáticos que irão formar o tecido intersiticial de forma pontual, porém a membrana basal torna-se contínua ao final do processo de diferenciação gonadal. *Legenda:* seta: membrana basal, cp: oócito em crescimento primário, pf: célula pré-folicular, f: célula folicular, o: oócitos profásicos.

Figura 30

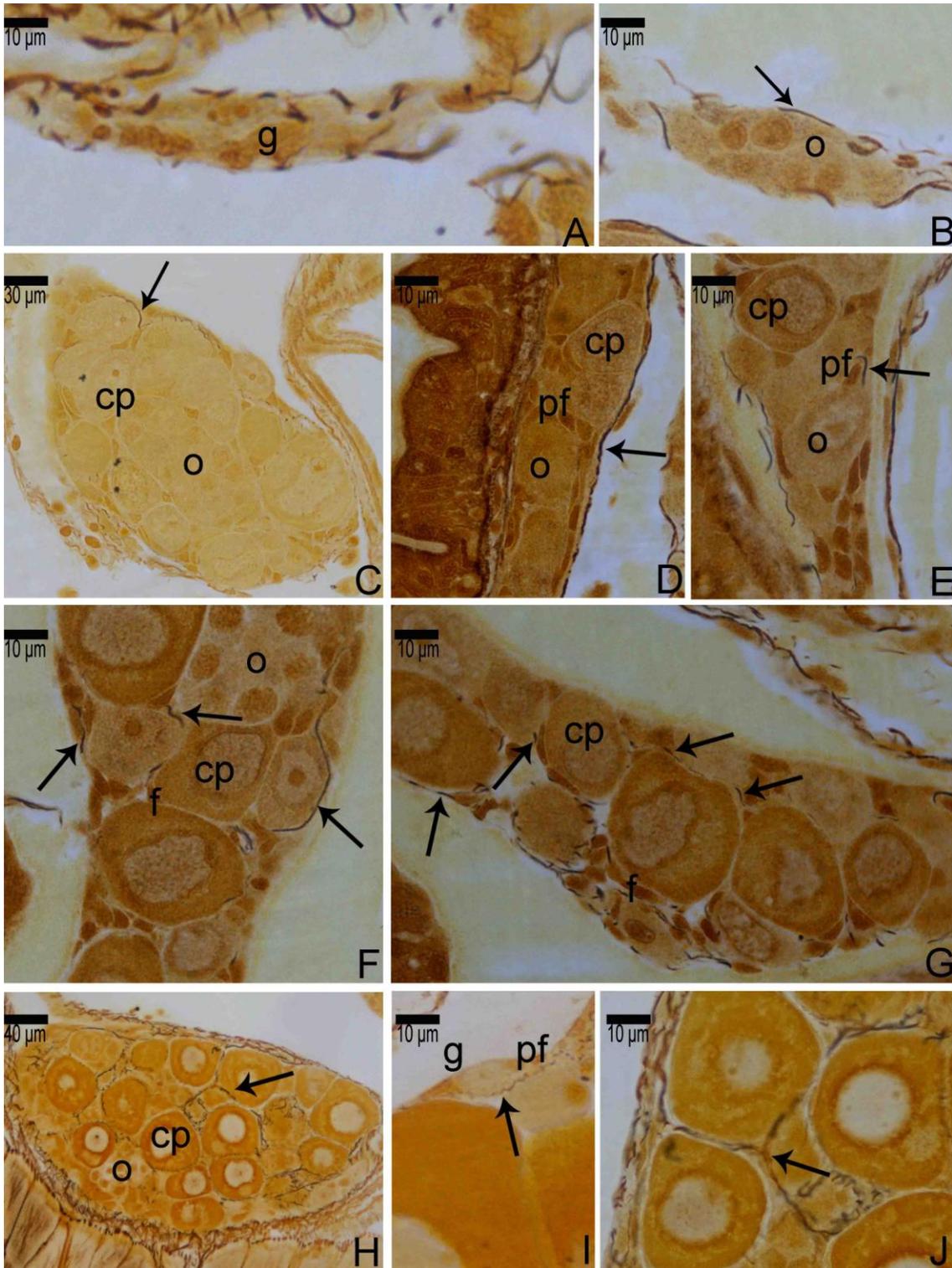


Figura 31: Corte histológico das gônadas femininas de *Gymnocorymbus ternetzi* – Método de Reticulina. Estabelecimento do epitélio germinativo a partir da formação da membrana basal. A membrana basal mostra-se bastante sutil no início da diferenciação, porém torna-se contínua ao final do processo de diferenciação gonadal. *Legenda:* seta: membrana basal, cp: oócito em crescimento primário, s: célula somática, o: oócitos profásicos, eg: epitélio germinativo.

Figura 31

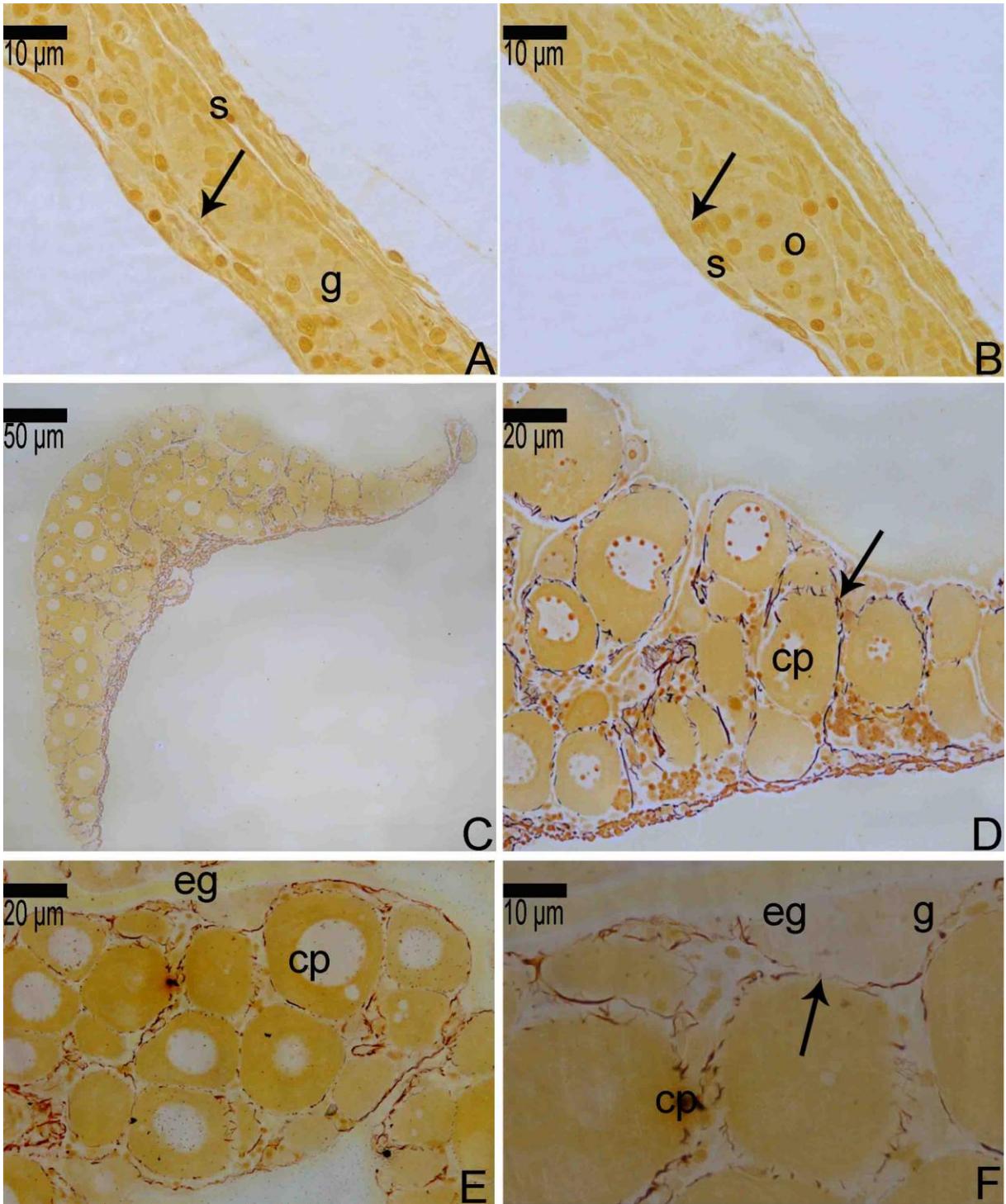


Figura 32: Corte histológico das gônadas femininas de *Corydoras schwartzi* – Método de Reticulina. Os componentes germinativos encontram-se totalmente separados dos demais componentes somáticos que irão formar o tecido intersiticial desde as primeiras etapas da diferenciação gonadal. Notar o compartilhamento da membrana basal entre dois oócitos (J).
Legenda: seta: membrana basal, cp: oócito em crescimento primário, o: oócitos profásicos, g: oogônias, eg: epitélio germinativo, pf: célula pré-folicular, f: célula folicular, ci: cistos.

Figura 32

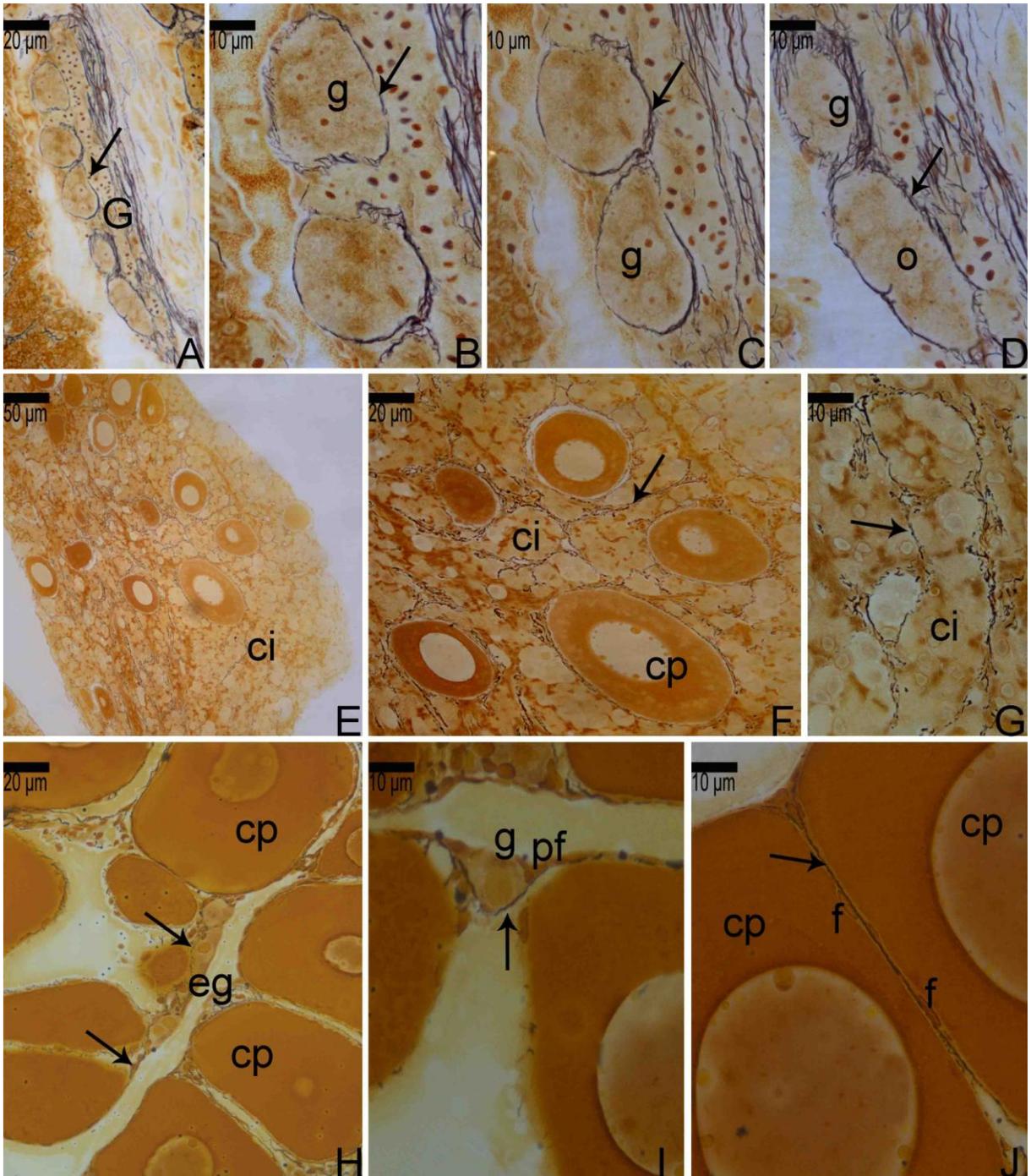


Figura 33: Corte histológico das gônadas femininas de *Amatitlania nigrofasciata* – Método de Reticulina. A membrana basal mostra-se bastante sutil no início da diferenciação, porém torna-se contínua ao final do processo de diferenciação gonadal. *Legenda:* seta: membrana basal, cp: oócito em crescimento primário, o: oócitos profásicos, g: oogônias, eg: epitélio germinativo, pf: célula pré-folicular, f: célula folicular.

Figura 33

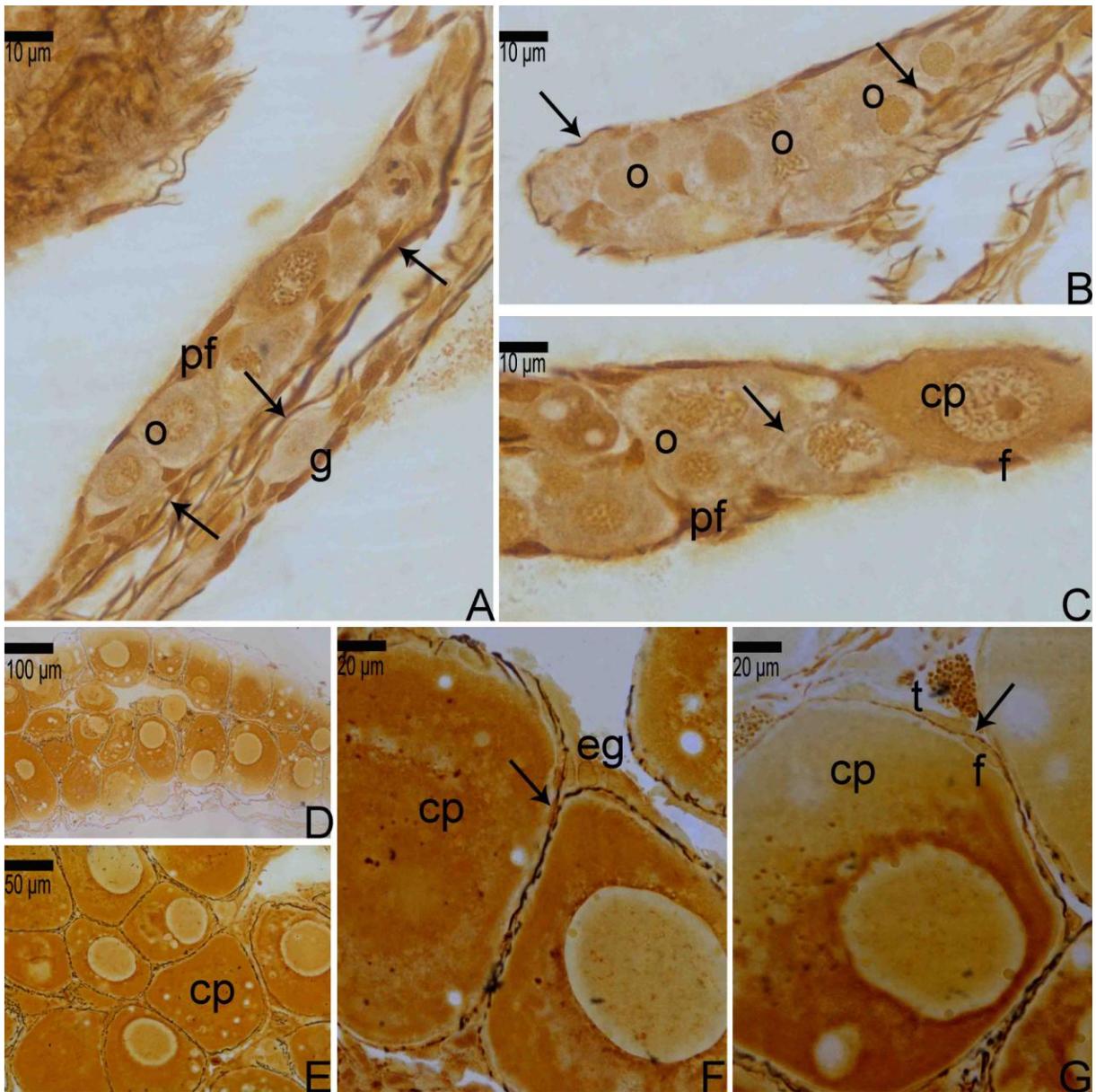


Figura 34: Corte histológico das gônadas femininas de *Poecilia reticulata* – Método de Reticulina. Estabelecimento do epitélio germinativo a partir da formação da membrana basal. Os componentes germinativos encontram-se separados dos demais componentes somáticos que irão formar o tecido intersiticial desde as primeiras etapas da diferenciação gonadal. *Legenda:* seta: membrana basal, cp: oócito em crescimento primário, g: oogônia, o: oócito profásico, ci: cistos, ca: cavidade ovariana, du: gonodúcto, eg: epitélio germinativo.

Figura 34

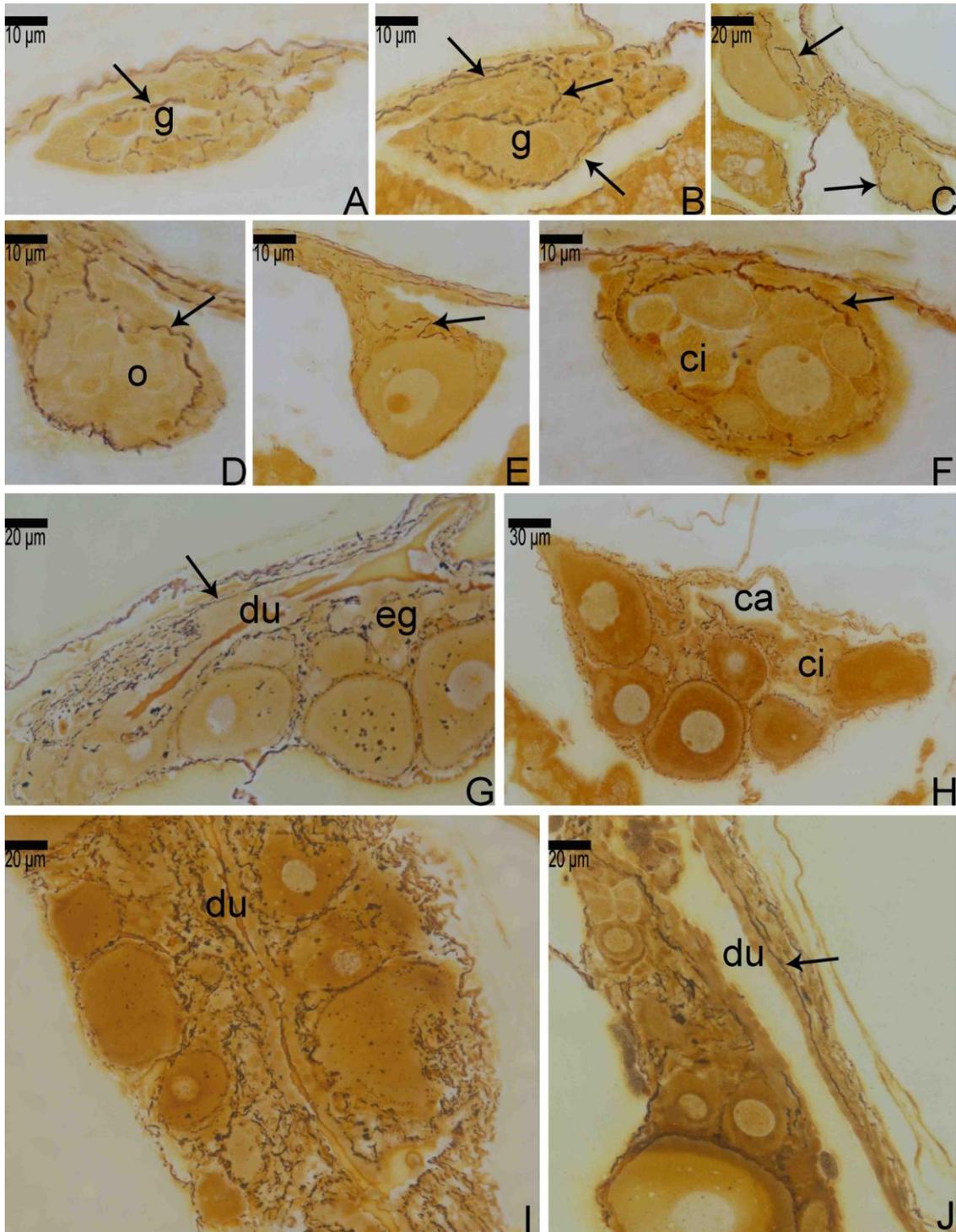


Figura 35: Corte histológico das gônadas femininas de *Poecilia reticulata* – Método de Reticulina. Epitélio germinativo totalmente estabelecido, mostrando continuidade entre o epitélio e a membrana basal dos oócitos. *Legenda:* seta: membrana basal, cp: oócito em crescimento primário, cs: oócito em crescimento secundário, ca: cavidade ovariana, eg: epitélio germinativo, cr: criptas.

Figura 35

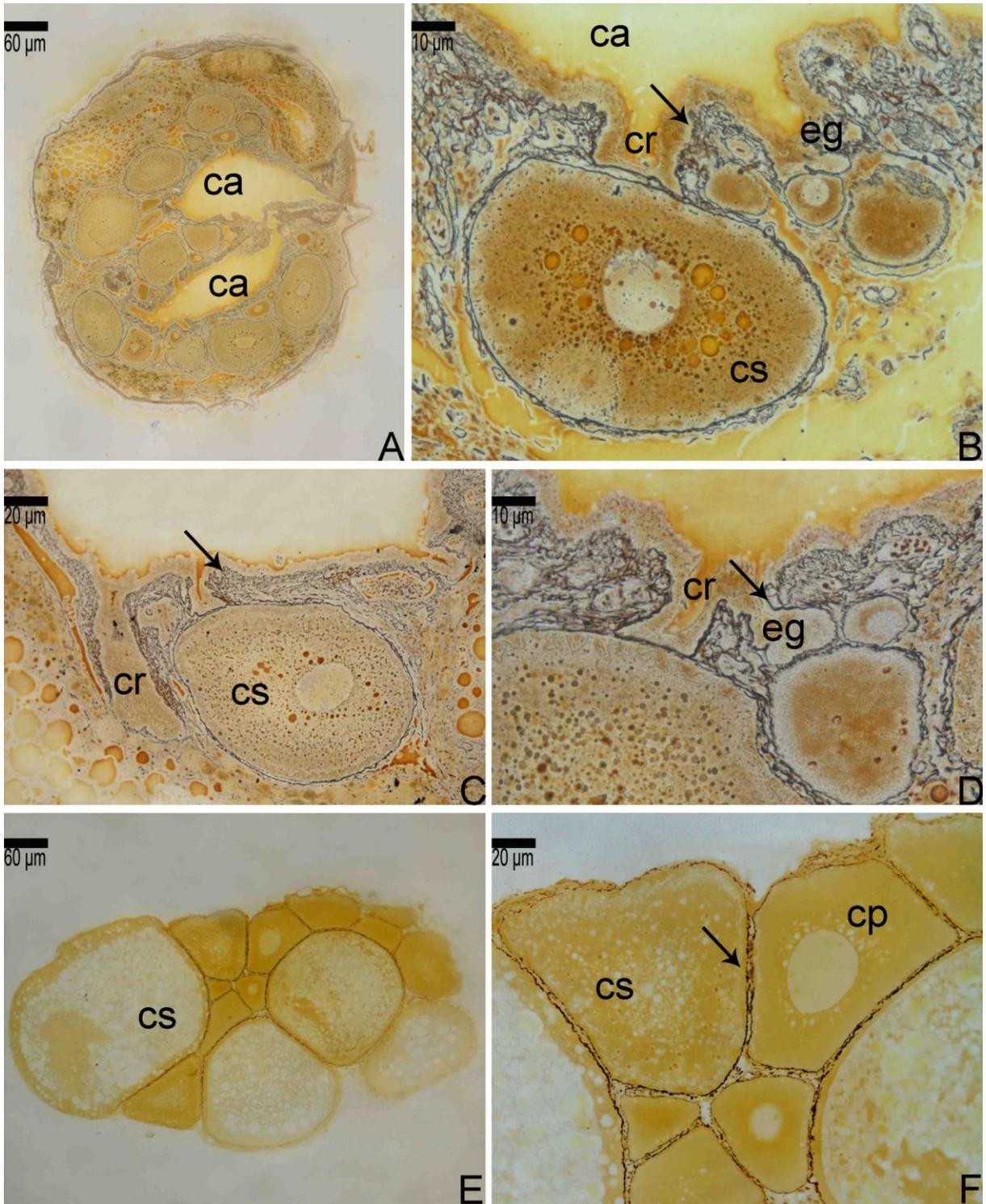


Figura 36: Corte histológico de ovário de *Tanichthys albonubes*. A) Corte histológico longitudinal da gônada feminina. B) Corte histológico longitudinal do ovário mostrando o desenvolvimento oocitário no interior das lamelas. C) Oócito em início de crescimento primário, individualizado pelas células foliculares. D) Oócito em crescimento primário com citoplasma basofílico. E-G) Oócitos em final de crescimento primário mostrando a formação e aumento gradual dos alvéolos corticais PAS positivos. H) Oócitos em crescimento secundário em final de vitelogênese com núcleo ainda central. Notar que os grânulos de vitelo permanecem íntegros e a ausência de gotículas de gordura. *Legenda:* la: lamela ovígera, n: núcleo, gv: grânulos de vitelo, ac: alvéolos corticais, cp: oócito em crescimento primário. *Coloração:* Amarelo Metanil.

Figura 36

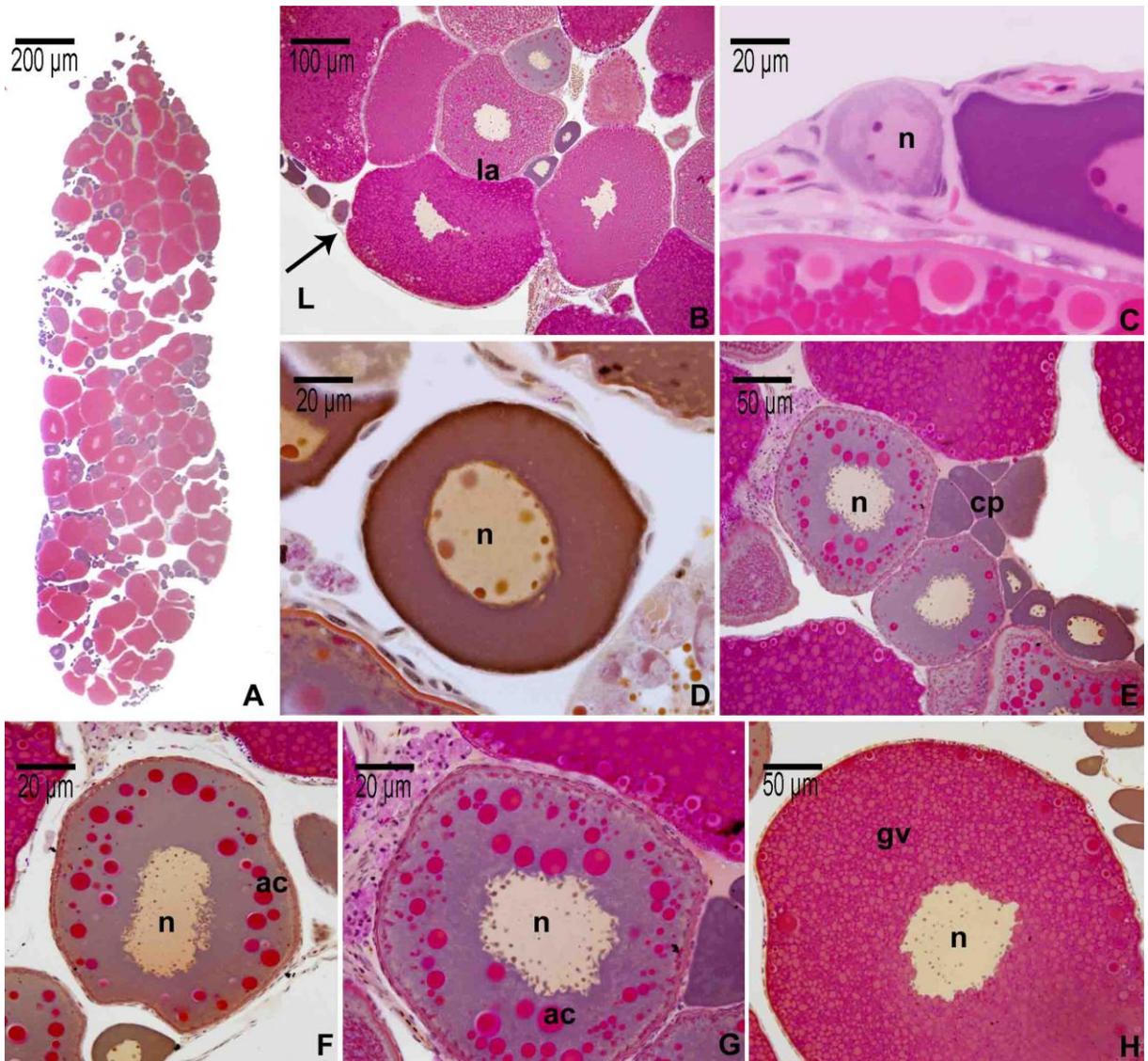


Figura 37: Corte histológico de ovário de *Gymnocorymbus ternetzi* mostrando o desenvolvimento oocitário no interior das lamelas (A-F). G) Oogônia e oócito profásico no epitélio germinativo envoltos por células pré-foliculares. H) Oócito em início de crescimento primário, individualizado pelas células foliculares. I) Oócito em crescimento primário com citoplasma basofílico e citoplasma com aspecto gretado pela distribuição de organelas. J) Oócito em crescimento secundário com vitelogênese intermediária. Notar a presença de grânulos de vitelo e de alvéolos corticais que não respondem ao PAS. K) Oócito em crescimento secundário em final de vitelogênese com núcleo ainda central. Notar que os grânulos de vitelo permanecem íntegros e a ausência de gotículas de gordura. *Legenda:* la: lamela ovígera, n: núcleo, gv: grânulos de vitelo, ac: alvéolos corticais, g: oogônia, o: oócitos profásicos, eg: epitélio germinativo, seta: célula pré-folicular, f: célula folicular. *Coloração:* Amarelo Metanil (A-F,J,K); Hematoxilina-Eosina (G-I).

Figura 37

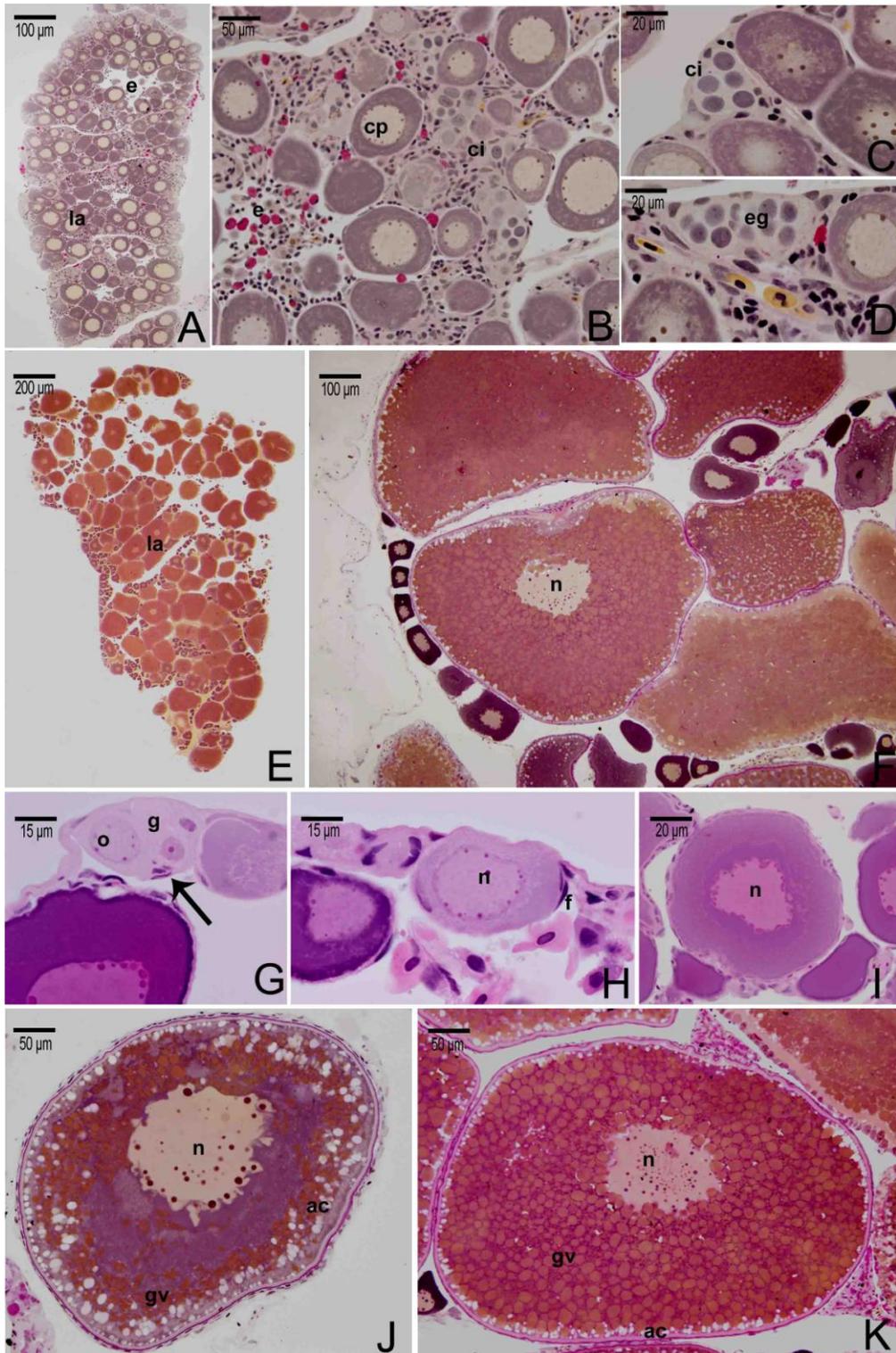


Figura 38: Corte histológico de ovário de *Corydoras schwartzi* mostrando o desenvolvimento do oócitos e aumento das lamelas ovígeras. *Legenda:* la: lamela ovígera, g: oogônia, o: oócitos profásicos, cp: oócito em crescimento primário, cs: oócito em crescimento secundário, ca: cavidade ovariana. *Coloração:* Amarelo Metanil.

Figura 38

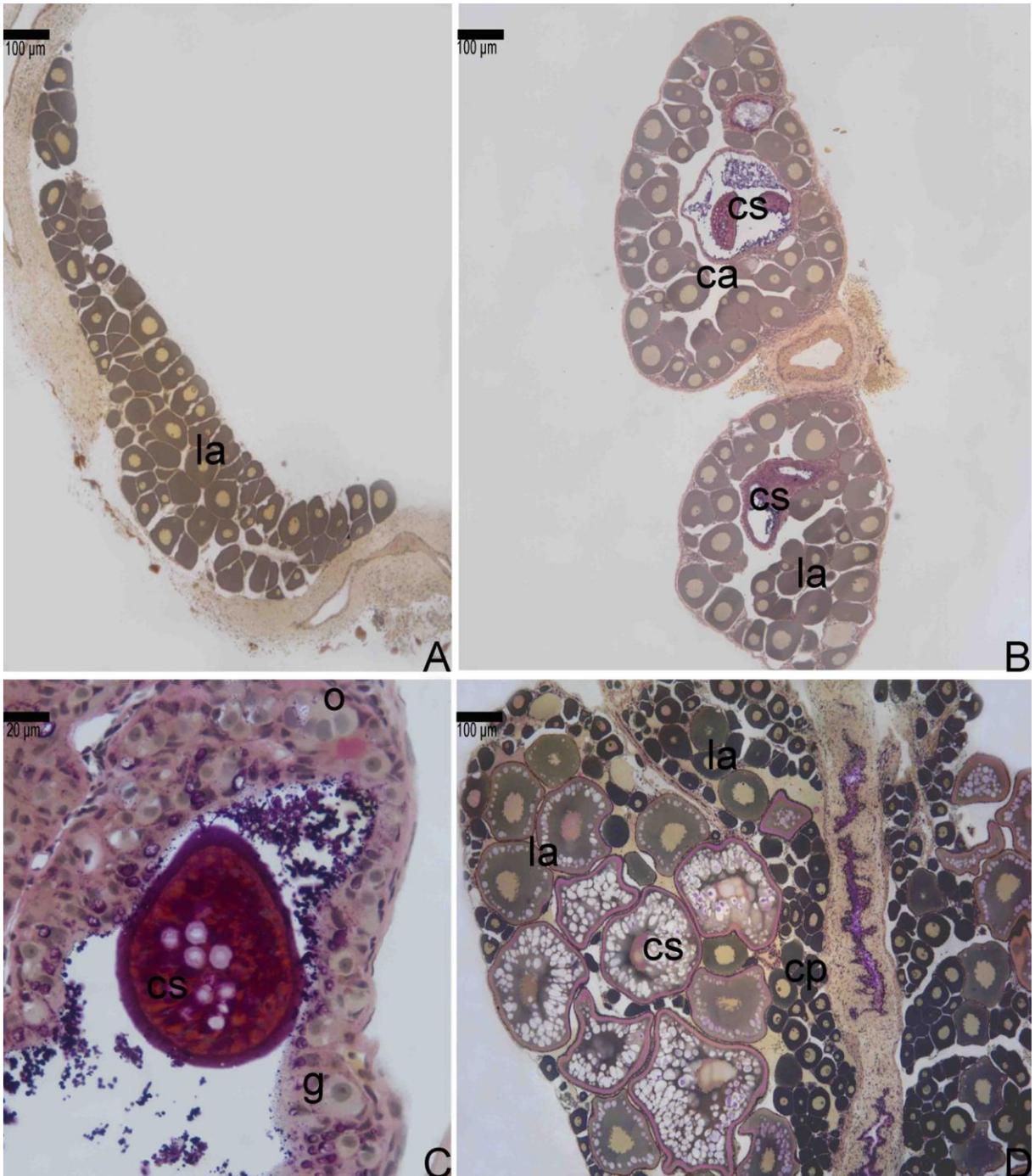


Figura 39: Foliculogênese em ovário de *Amatitlania nigrofasciata* totalmente diferenciado. A-B) Ninhos celulares no epitélio germinativo. C) Oogônia diferenciada, isolada no epitélio germinativo. D-E) Cistos de oogônias. F-G) Cisto de oócitos leptotênicos. H) Cisto de oócitos zigotênicos. I-J) Cisto de oócitos paquitênicos. K) Cisto de oócitos paquitênicos tardios com as células pré-foliculares invadindo o cisto e individualizando os oócitos. L) Oócito diplotênico inicial com um nucléolo. M) Oócito em crescimento primário conectado ao epitélio germinativo. N) Detalhe de M, mostrando região de compartilhamento da membrana basal entre o oócito e o epitélio germinativo. *Legenda:* g: oogônia, la: lamela ovígera, ni: ninhos, c: cistos, s: célula somática, ló: lúmen ovariano, ol: oócito leptotênico, oz: oócito zigotênico, pf: célula pré-folicular, op: oócito paquitênico, opt: oócito paquitênico tardio, od: oócito diplotênico inicial, cp: oócito em crescimento primário, ce: célula epitelial, MB: membrana basal, f: célula folicular, eg: epitélio germinativo, nu: nucléolo, n: núcleo. *Coloração:* Amarelo Metanil.

Figura 39

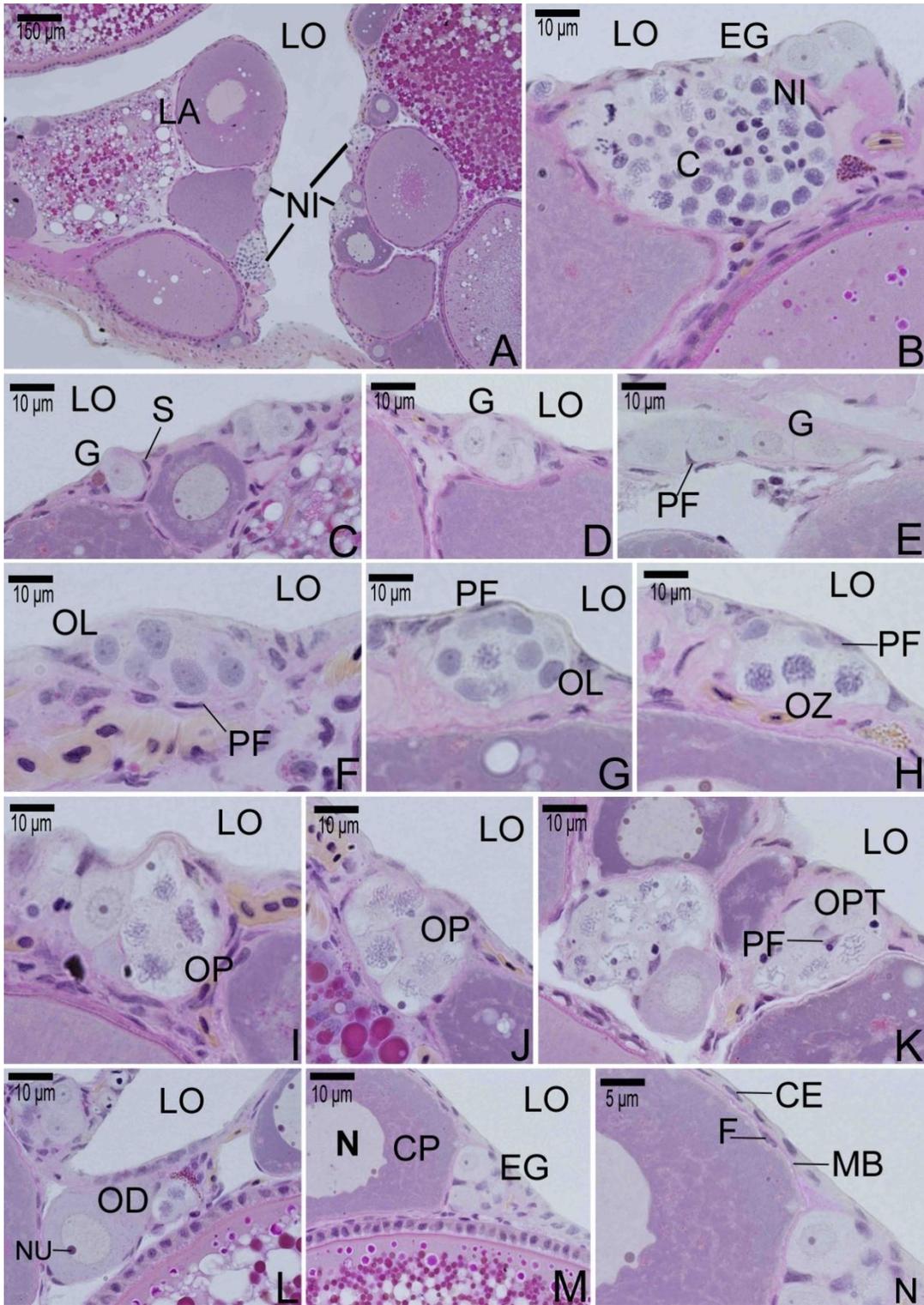


Figura 40: Corte histológico de ovário de *Amatitlania nigrofasciata* mostrando o desenvolvimento oocitário no interior das lamelas (A). B) Oogônia e oócito em crescimento primário no epitélio germinativo envoltos por células foliculares. C) Oócito em início de crescimento primário, com início de deposição de glóbulos de vitelo no citoplasma. D) Oócito em crescimento secundário com vitelogênese intermediária. E-F) Oócito em crescimento secundário em final de vitelogênese com núcleo ainda central (E) e núcleo excêntrico (F). Notar que os grânulos de vitelo permanecem íntegros dispostos entre as gotículas de gordura. *Legenda:* la: lamela ovígera, lu: lúmen ovariano, n: núcleo, v: grânulos de vitelo, cp: oócito em crescimento primário, ac: alvéolos corticais, g: oogônia. *Coloração:* Amarelo Metanil (A-F,J,K). *Coloração:* Amarelo Metanil.

Figura 40

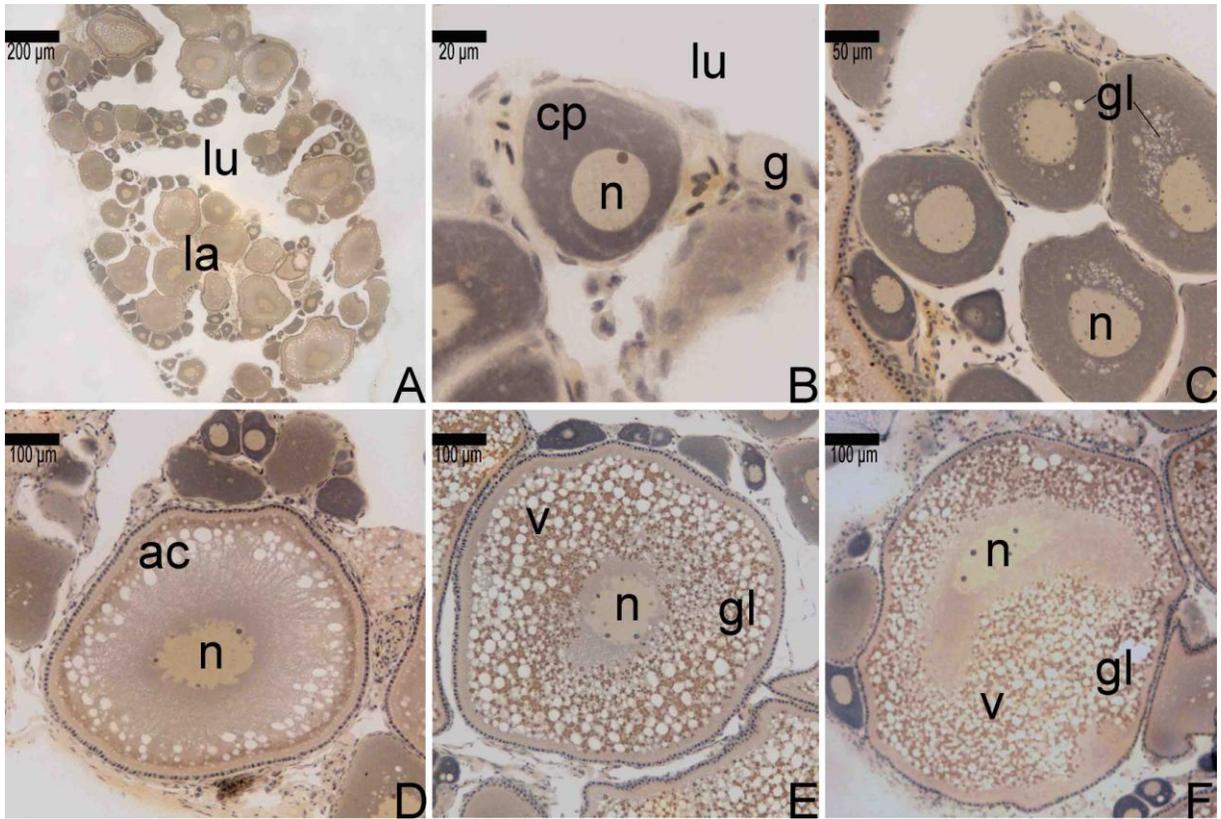


Figura 41: Corte histológico de ovário de *Poecilia reticulata*. A-C) Cortes histológicos transversais do ovário mostrando: a presença de dois gonoductos no interior do ovário, em porção dorsal (A); a porção caudal do ovário, na qual os gonoductos se fundem, formando um único gonoducto contínuo com a cavidade ovariana (B); e um ovário inseminado (C). Notar a ausência da cavidade ovariana por conta do desenvolvimento intra-folicular dos embriões. D) Corte histológico transversal do ovário mostrando o desenvolvimento oocitário no interior das lamelas. E) Detalhe do epitélio prismático do gonoducto, contínuo com o epitélio germinativo, composto por células epiteliais e oogônias. F-G) Ninhos de oogônias ao longo do epitélio germinativo. H) Cistos de oócitos profásicos no epitélio germinativo, junto às criptas do gonoducto. I) Cistos de oogônias e de oócitos paquitênicos. J) Oócitos em início de crescimento primário mostrando a mudança na basofilia citoplasmática. Notar o início da deposição de gotículas de lipídeos. K) Oócito em crescimento secundário com início de vitelogênese. Notar os grânulos de vitelo PAS positivos. L) Oócitos em crescimento secundário em vitelogênese intermediária. Nesta etapa, as gotículas de lipídeos se acumulam próximas ao núcleo. M) Oócitos em crescimento secundário em final de vitelogênese. Os grânulos de vitelo ainda mostram-se íntegros. N) Oócito em maturação, que apresenta grânulos de vitelo fundidos, formando uma massa homogênea. Na região periférica, alguns grânulos permanecem íntegros. Notar a presença de grandes gotas lipídicas, na região periférica do oócito. *Legenda:* g: oogônia, o: oócitos profásicos, op: oócitos paquitênicos, cp: oócito em crescimento primário, cs: oócito em crescimento secundário, ca: cavidade ovariana, du: gonoducto, n: núcleo, gl: gotículas de lipídeo, gr: grânulos de vitelo, v: vitelo, eg: epitélio germinativo, seta: células pré-foliculares, cabeça de seta: criptas, EM: embrião. *Coloração:* Amarelo Metanil.

Figura 41

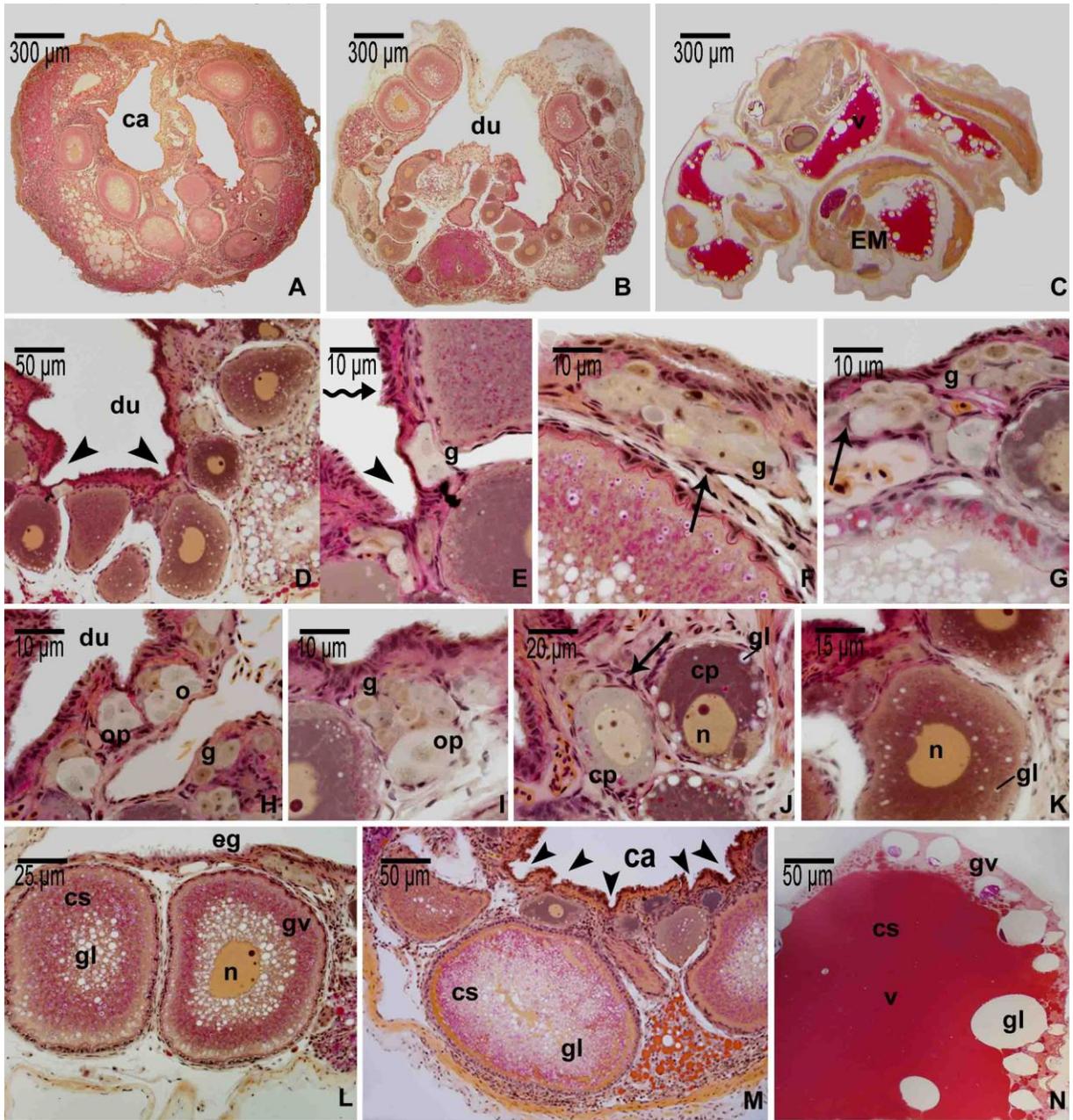


Figura 42: Corte histológico de testículo de *Amatitlania nigrofasciata* mostrando os tipos de células presentes no compartimento germinativo e intersticial, comum aos Teleostei (A). Célula de Leydig de *Amatitlania nigrofasciata* (A-inset). Eletromicrografia de testículo de Neoteleostei, dos tipos celulares encontrados nos demais Teleostei (B-G). *Legenda:* g1: espermatogônias primária, g2: espermatogônia secundária, c: espermatócito, st: espermátide, z: espermatozóide, seta: célula de Sertoli, S: célula de Sertoli, pS: célula pré-Sertoli, n: núcleo, nu: nucléolo, cs: célula somática, L: célula de Leydig, f: flagelo em formação, vs: vaso sanguíneo, mi: mitocôndria, d: desmosomos, po: ponte citoplasmática, Le: célula de Leydig. *Coloração:* Amarelo Metanil (A, A-inset).

Figura 42

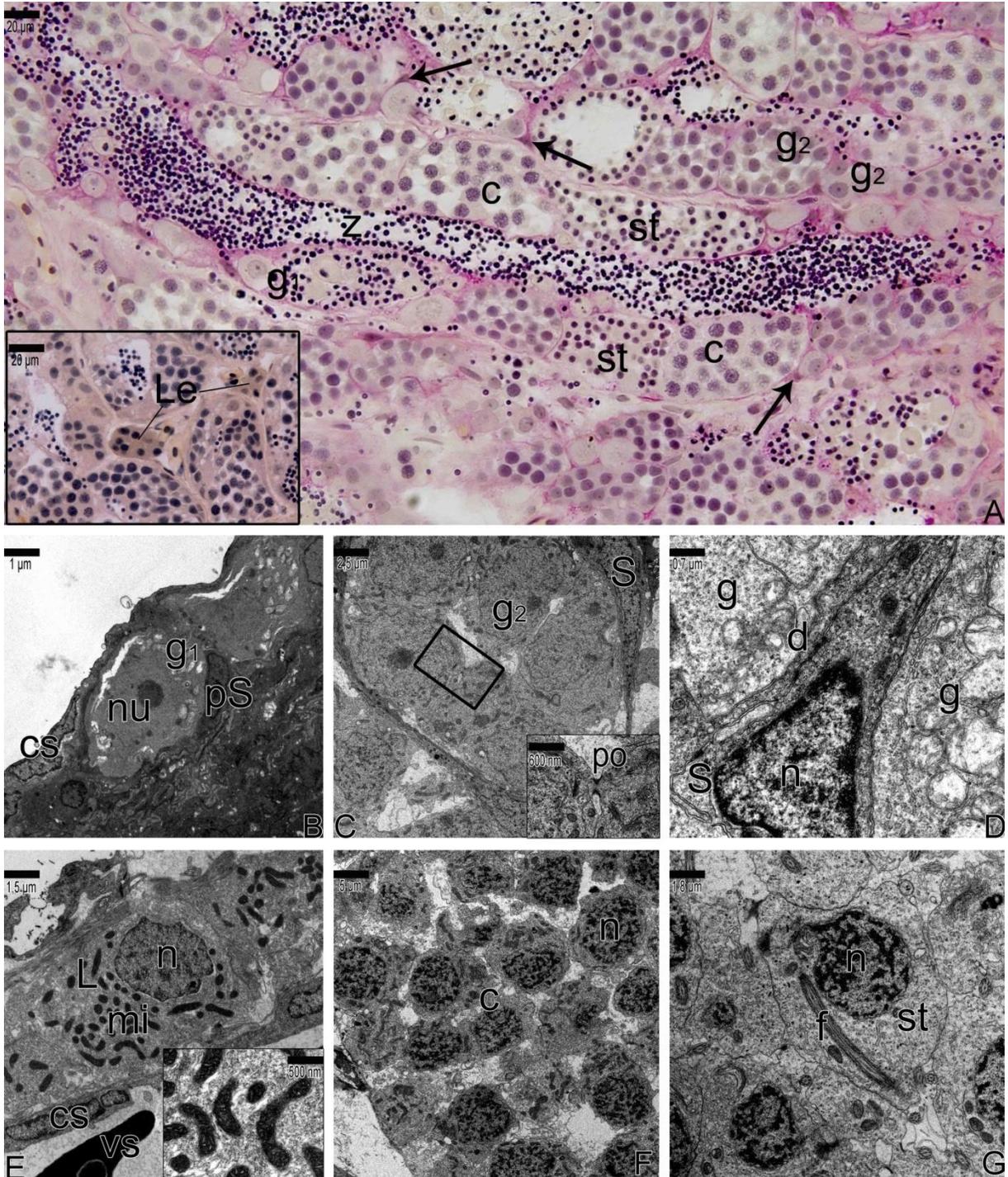


Figura 43: Corte parassagital de testículo de *Tanichthys albonubes*. Notar a disposição das espermatogônias no tecido gonadal. Aumento do número de espermatogônias em (E-G), quando comparado à etapa anterior (A-D) pela intensa proliferação celular (F,G). *Legenda:* CGP: célula germinativa primordial, s: célula somática, i: intestino, f: fígado, g: espermatogônia, seta: célula pré-Sertoli, cabeça de seta: divisões celulares de espermatogônias. *Coloração:* Amarelo Metanil.

Figura 43

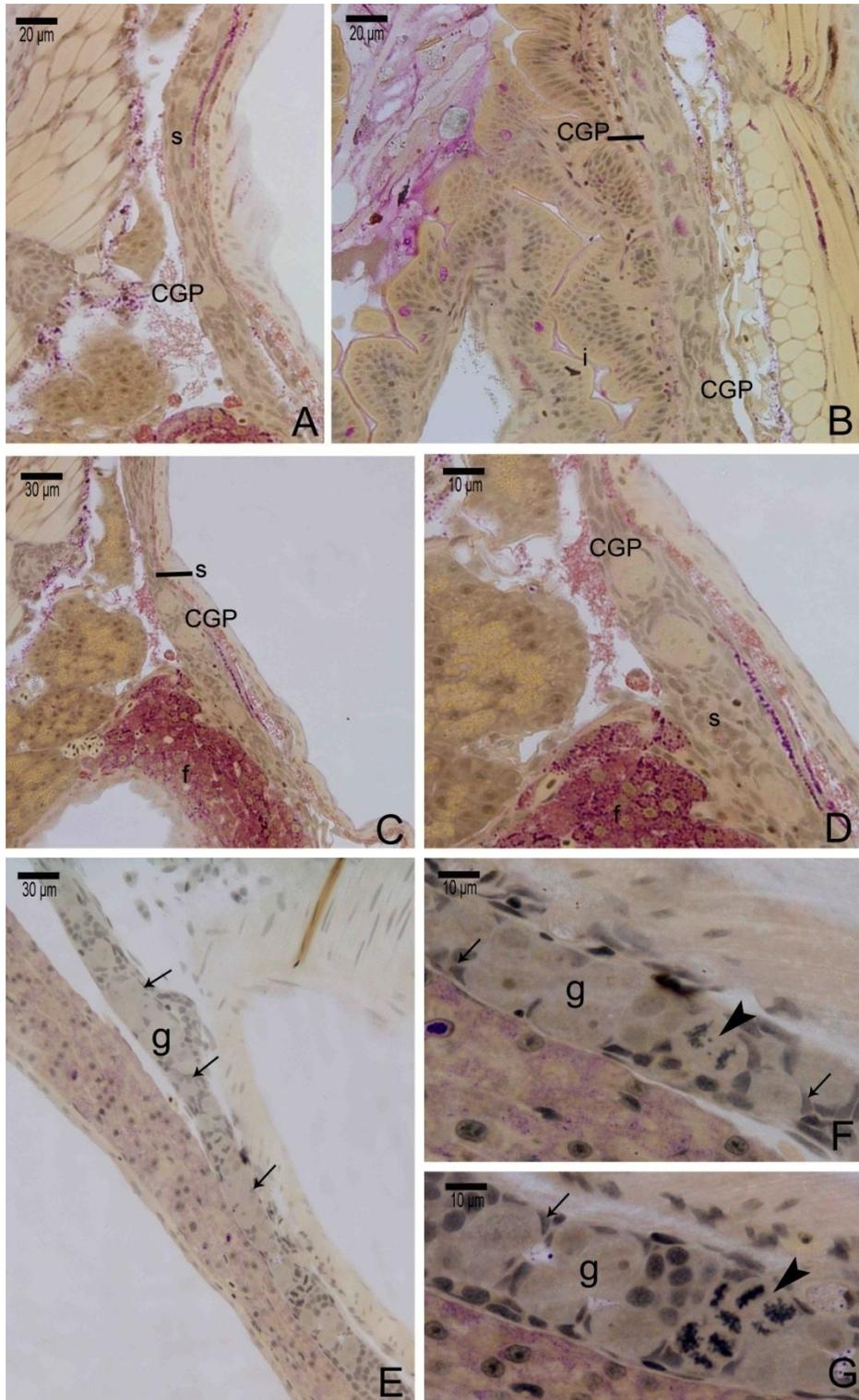


Figura 44: Corte parassagital de testículo de *Tanichthys albonubes*. Início da formação dos túbulos testiculares, pelo afastamento dos cistos de espermatogônias e estabelecimento do epitélio germinativo. Túbulos testiculares formados e início da espermatogênese. Notar os primeiros cistos de espermatócitos. Em D, detalhe de dois túbulos testiculares adjacentes sofrendo anastomose. *Legenda:* f: fígado, g: espermatogônia, seta: célula de Sertoli, asterisco: formação do compartimento luminal. *Coloração:* Amarelo Metanil (A,B,E,F); Método de Coello (C,D).

Figura 44

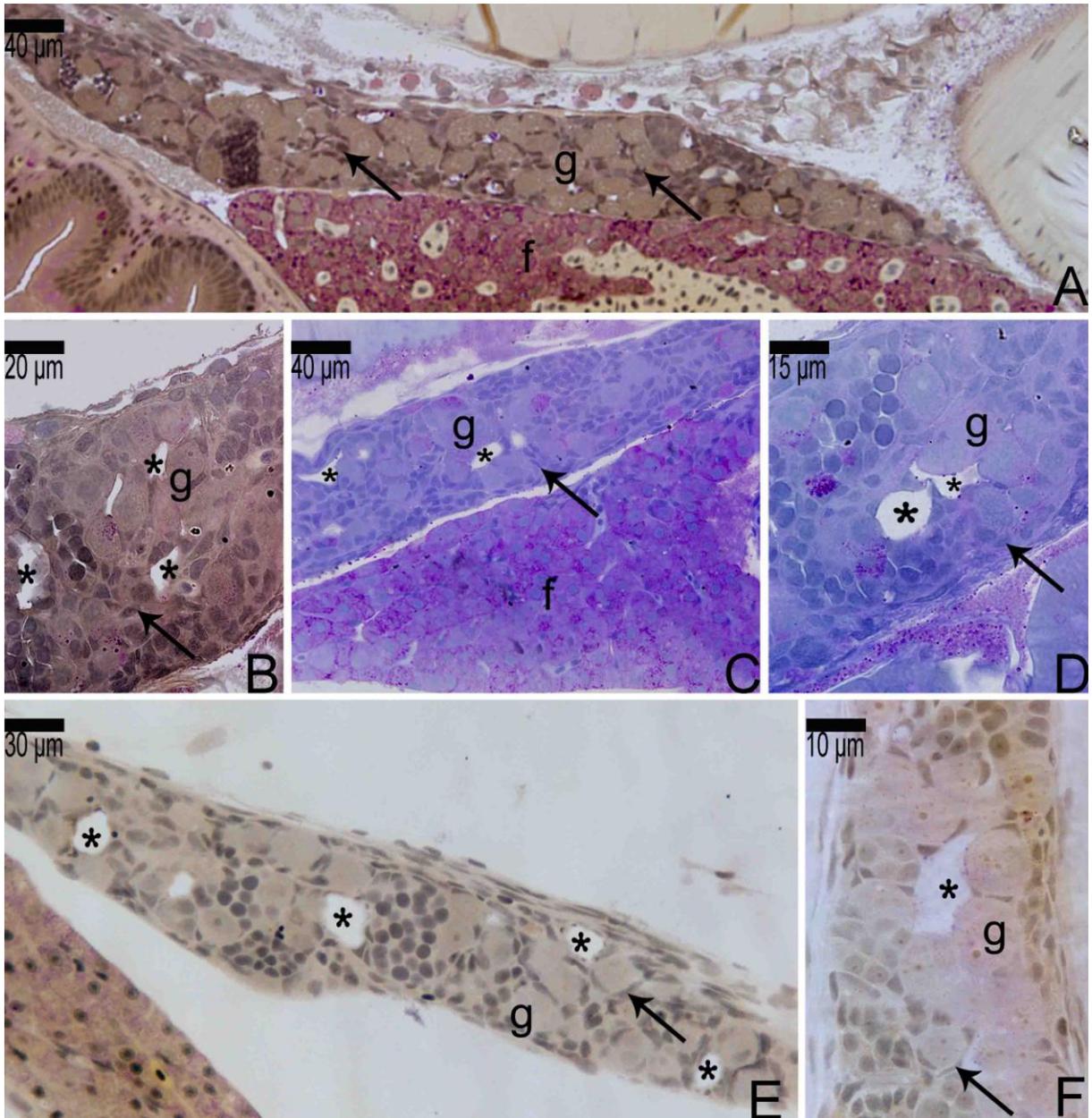


Figura 45: Corte parassagital de testículos de *Tanichthys albonubes*. Início da produção de espermatozóides. Grande quantidade de espermatogônias, e alguns túbulos testiculares ainda vazios. *Legenda:* g: espermatogônia, seta: célula de Sertoli, asterisco: lúmen dos túbulos testiculares, c: espermatócito, z: espermatozóide. *Coloração:* Amarelo Metanil.

Figura 45

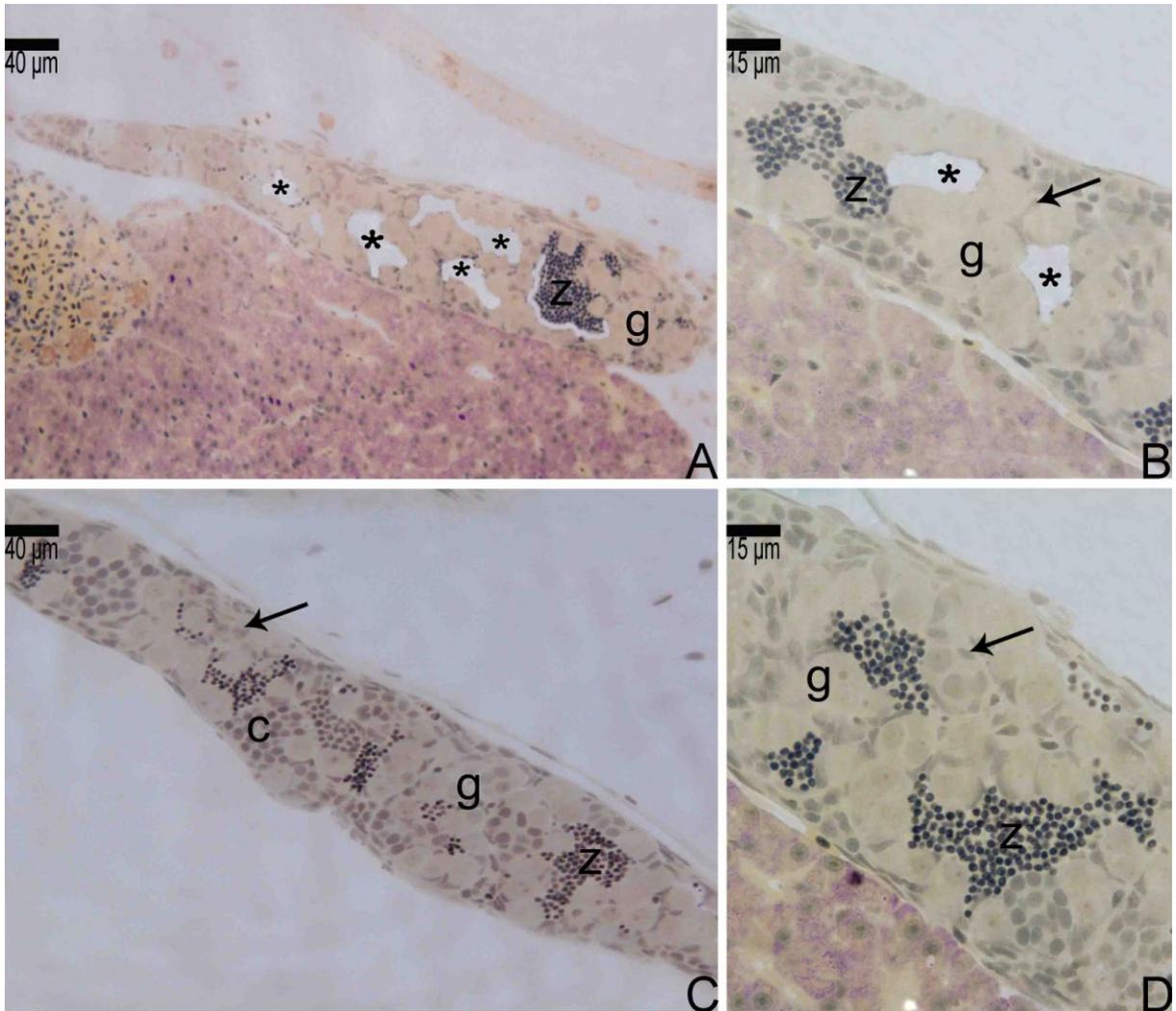


Figura 46: Corte parassagital de testículos de *Tanichthys albonubes*. Túbulos testiculares preenchidos por grande quantidade de espermatozóides. Cistos de células germinativas em diferentes etapas da espermatogênese, porém com predomínio de espermatogônias. *Legenda:* g: espermatogônia, seta: célula de Sertoli, c: espermátocito, st: espermátide, z: espermatozóide, f: fígado. *Coloração:* Amarelo Metanil.

Figura 46

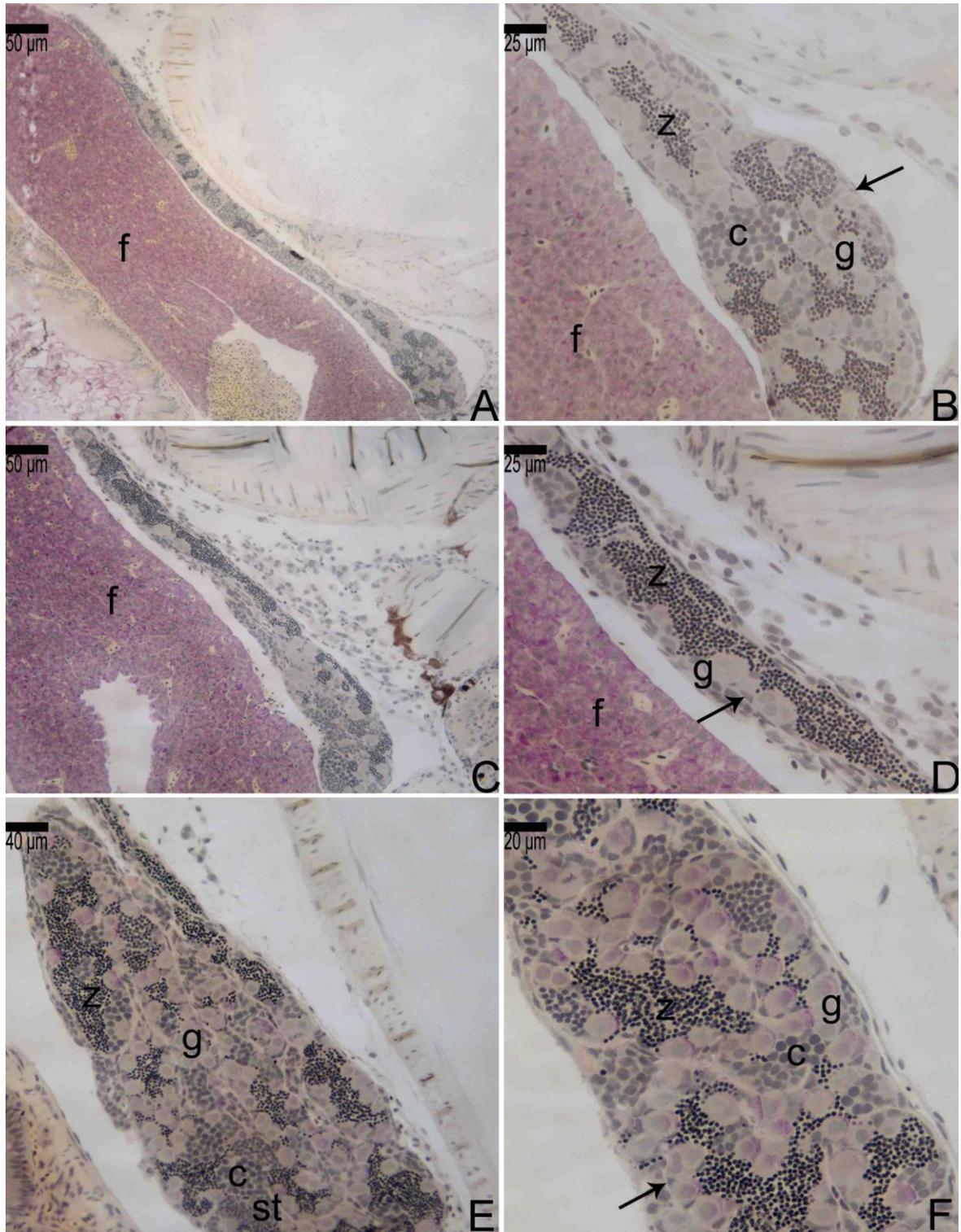


Figura 47: Corte histológico de testículo de *Tanichthys albonubes*. A-D) Corte histológico longitudinal da gônada masculina, formada pelo compartimento germinativo e pelo compartimento intersticial. E) Túbulo testicular anastomosado, totalmente preenchido por espermatozóides, formado por cistos de espermatogônias, espermatócitos e espermatídes. F) Cistos de espermatogônia e cistos de espermatócitos. G) Espermatogônia em metáfase ao lado de uma única espermatogônia encistada pela célula de Sertoli. *Legenda:* g: espermatogônia, seta: célula de Sertoli, c: espermatócito, st: espermatíde, z: espermatozóide, i: interstício, lu: lúmen testicular, ta: túbulos anastomosados. *Coloração:* Amarelo Metanil (A-D); Azul de Toluidina-Bórax (E-F).

Figura 47

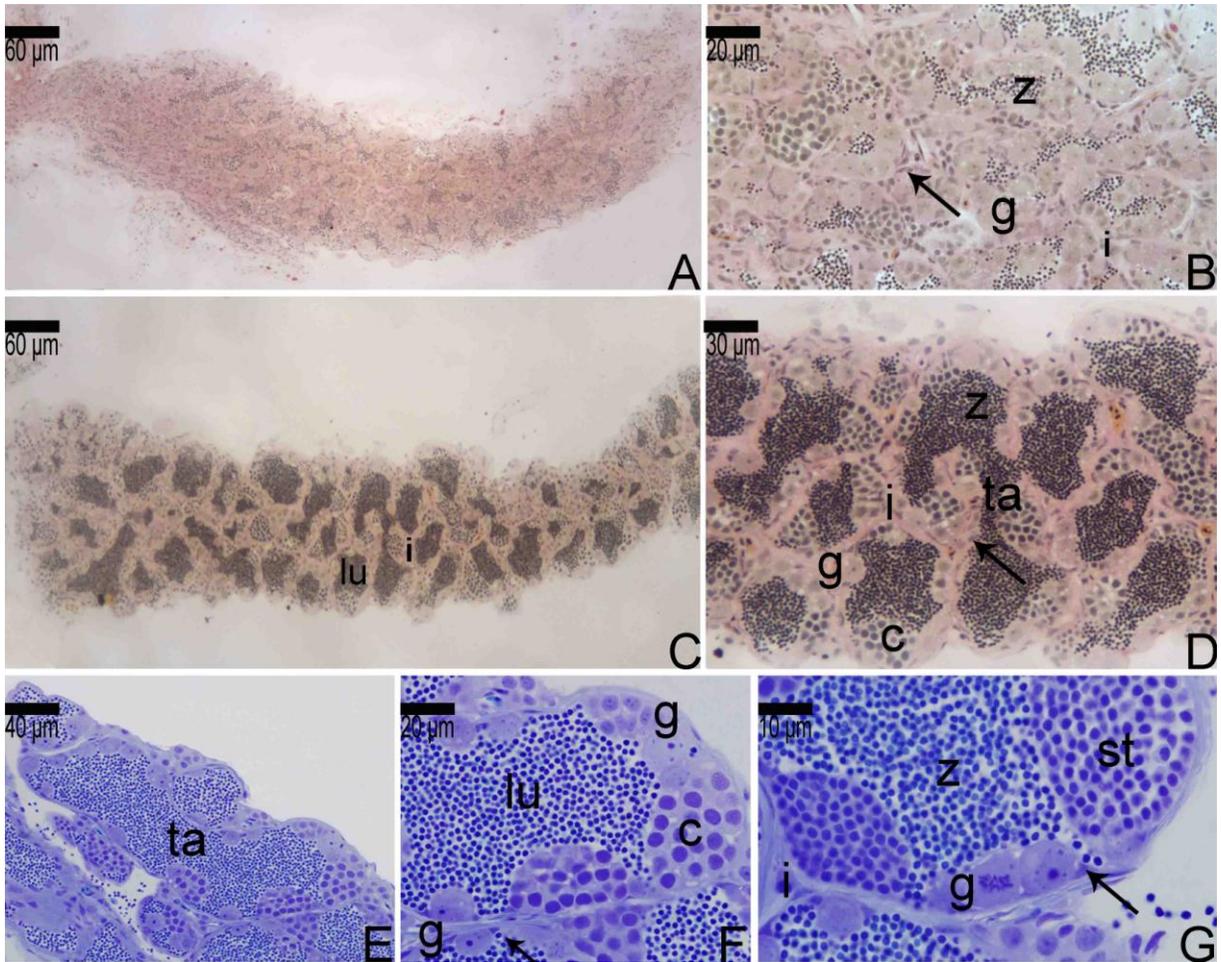


Figura 48: Corte histológico de tecido ovariano supostamente masculino em *Gymnocorymbus ternetzi* (A). Tecido gônada com grande quantidade de granulócitos (B,C). A degeneração causa afastamento dos oócitos (D) e aparecimento de substâncias amorfas pelo tecido (E). Regiões de degeneração tecidual, com corpos apoptóticos (F,G). *Legenda:* to: tecido ovariano, cabeça de seta: granulócitos, i: interstício, cp: oócito em crescimento primário, f: célula folicular, seta: regiões de degeneração do tecido ovariano, o: oócitos profásicos. *Coloração:* Amarelo Metanil.

Figura 48

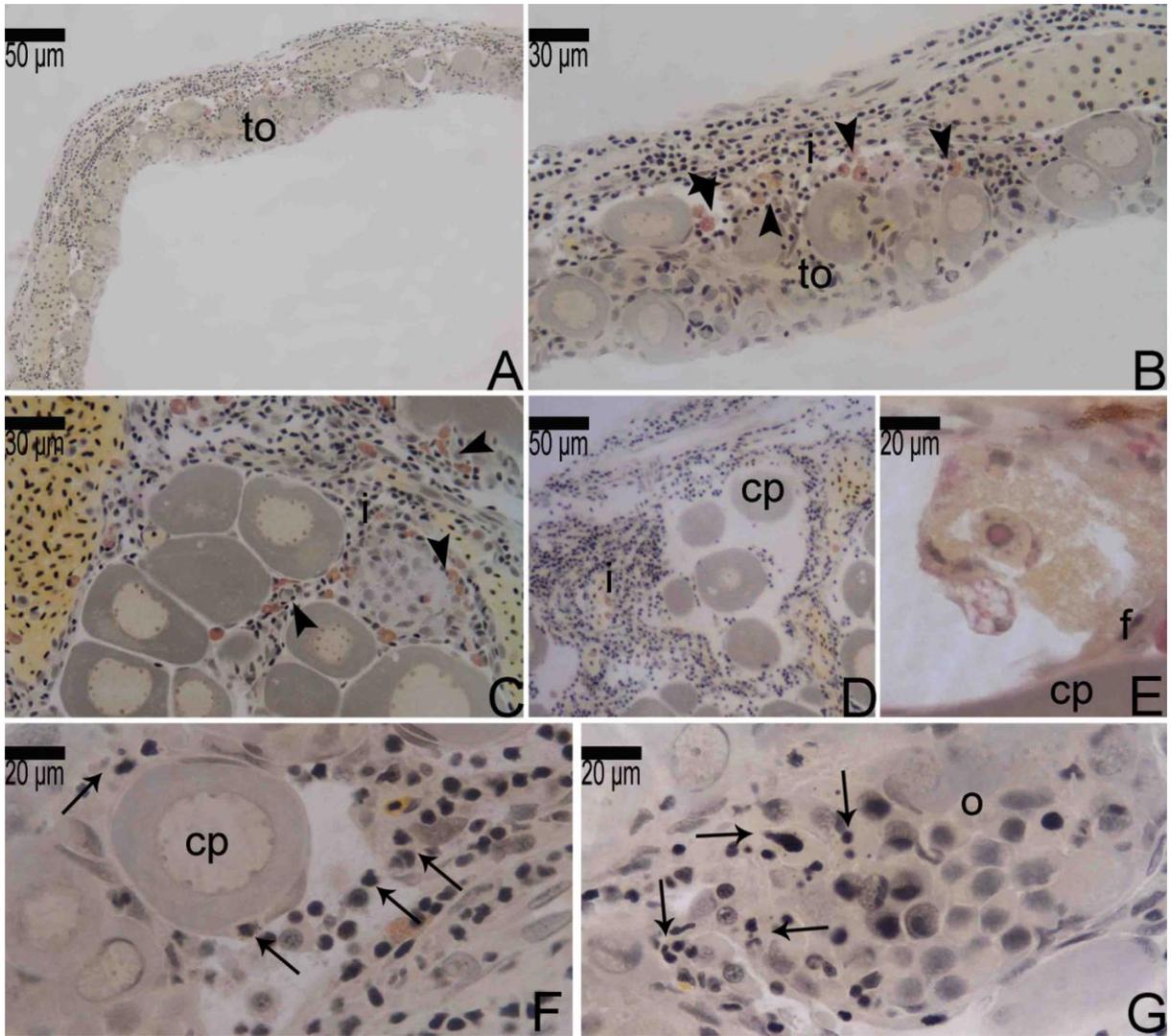


Figura 49: Corte histológico de gônada de *Gymnocorymbus ternetzi*. Tecido gonadal de transição com características femininas e masculinas (A-G). Primeiros túbulos testiculares a se formarem (A-C,G). Grande quantidade de macrófagos pelo tecido gonadal, causando desorganização estrutural (D-G). Notar granulócito no interior de um cisto germinativo (E) causando sua desorganização (F). *Legenda:* to: tecido ovariano, tt: tecido testicular, cabeça de seta: macrófagos, cp: oócito em crescimento primário, seta: regiões de degeneração do tecido ovariano, o: oócitos profásicos, ci: cistos, tu: túbulos testiculares. *Coloração:* Amarelo Metanil.

Figura 49

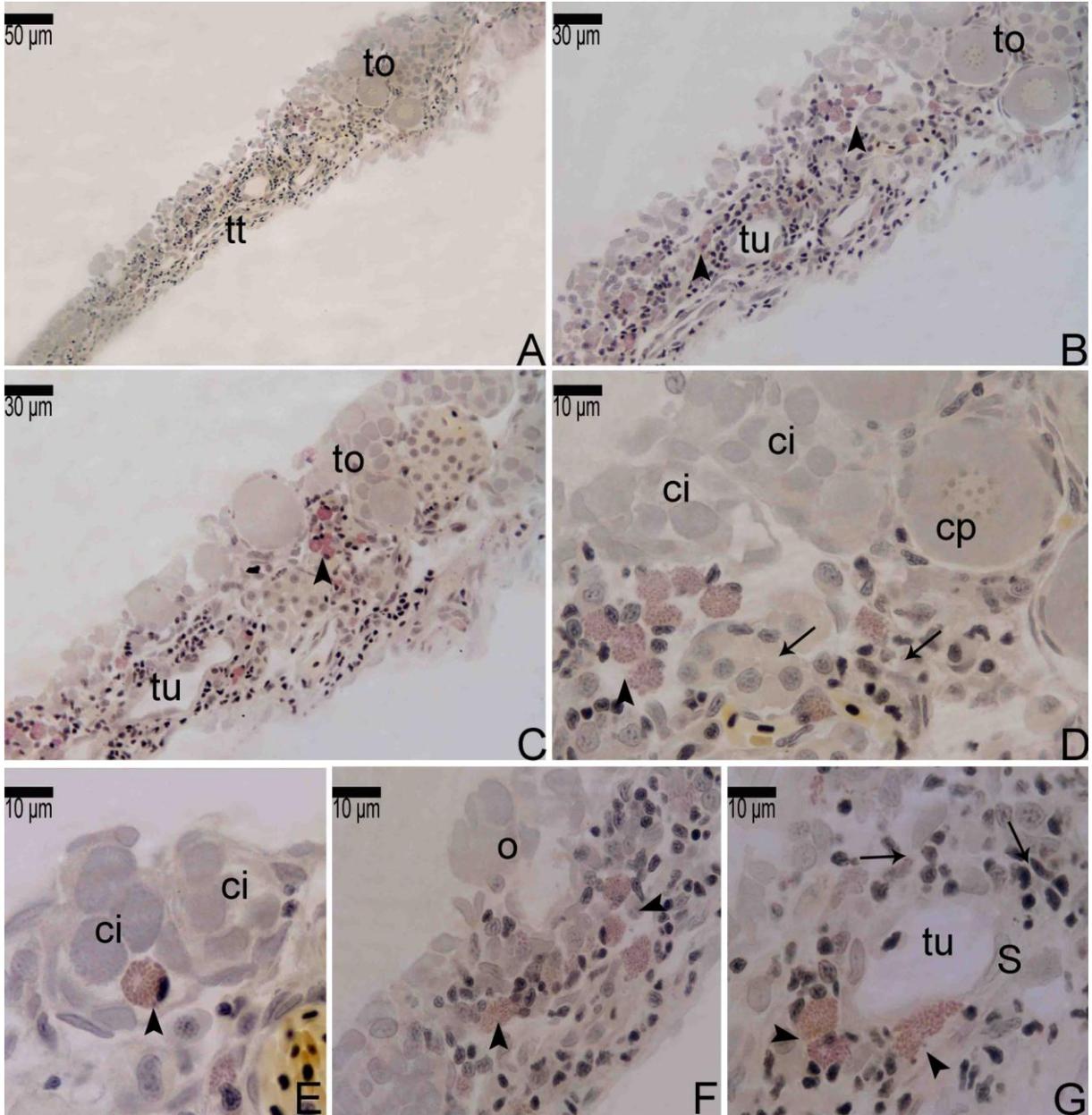


Figura 50: Corte histológico de gônada de *Gymnocorymbus ternetzi*. Tecido gonadal com características predominantemente masculinas (A-B). Notar a diminuição da quantidade de oócitos. Túbulos testiculares estabelecidos (C) e espermatogônias compondo o epitélio germinativo masculino (D). *Legenda:* S: células somáticas, cp: oócito em crescimento primário, tu: túbulos testiculares, c: espermatócito, g: espermatogônia. *Coloração:* Amarelo Metanil.

Figura 50

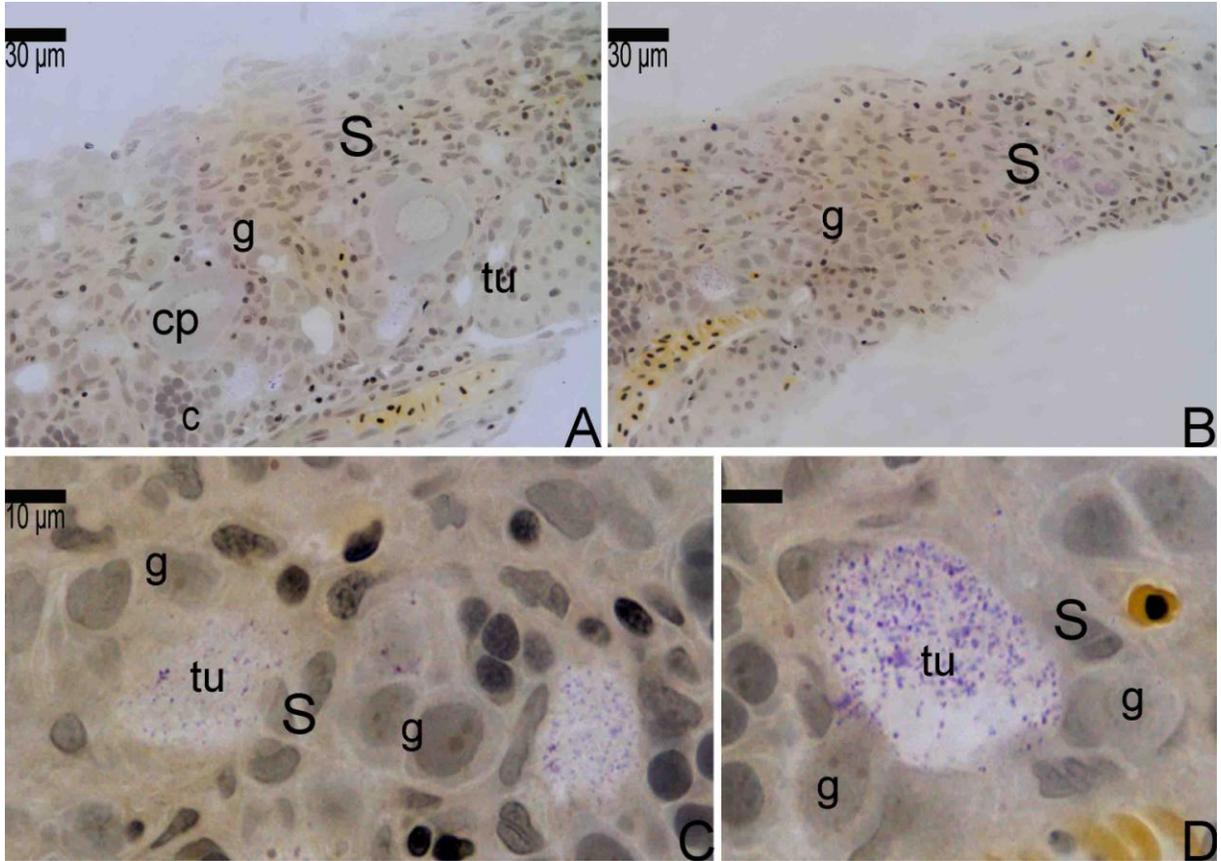


Figura 51: Corte histológico de testículo de *Gymnocorymbus ternetzi*. Epitélio germinativo totalmente estabelecido (A-C). Aumento da extensão do epitélio germinativo pela proliferação celular (D-G). Notar células de Sertoli compondo um epitélio descontínuo, pela intensa proliferação celular descompassada com o aumento das espermatogônias (F-G). Aumento da quantidade de cistos germinativos ao longo do epitélio, tornando-o contínuo (H-M). *Legenda:* tt: tecido testicular, cabeça de seta: divisão de célula de Sertoli, seta: célula de Sertoli (S), eg: epitélio germinativo, cp: oócito em crescimento primário, tu: túbulos testiculares, c: espermatócito, g: espermatogônia, lu: lúmen testicular, ta: túbulos anastomosados, o: oócitos. *Coloração:* Amarelo Metanil.

Figura 51

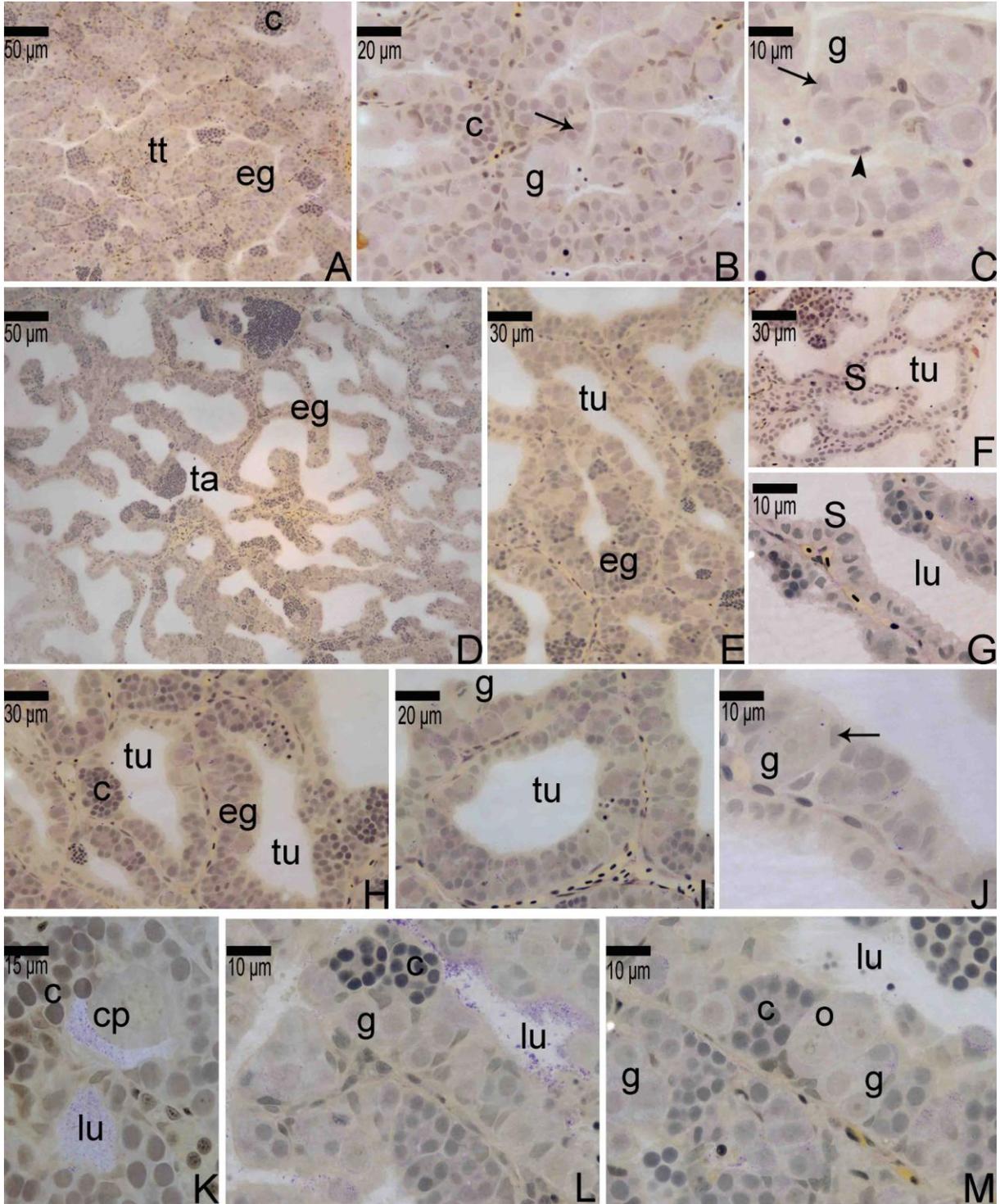


Figura 52: Corte histológico de testículo de *Gymnocorymbus ternetzi*. Aumento da quantidade de cistos germinativos ao longo do epitélio, reduzindo o lúmen testicular (A-C) que passa a ser preenchido por grande quantidade de espermatozóides (D-H). Notar oócitos remanescentes no epitélio. *Legenda:* seta: célula de Sertoli, eg: epitélio germinativo, cp: oócito em crescimento primário, tu: túbulos testiculares, c: espermatócito, g: espermatogônia, ta: túbulos anastomosados, st: espermátides, i: interstício, z: espermatozóides. *Coloração:* Amarelo Metanil.

Figura 52

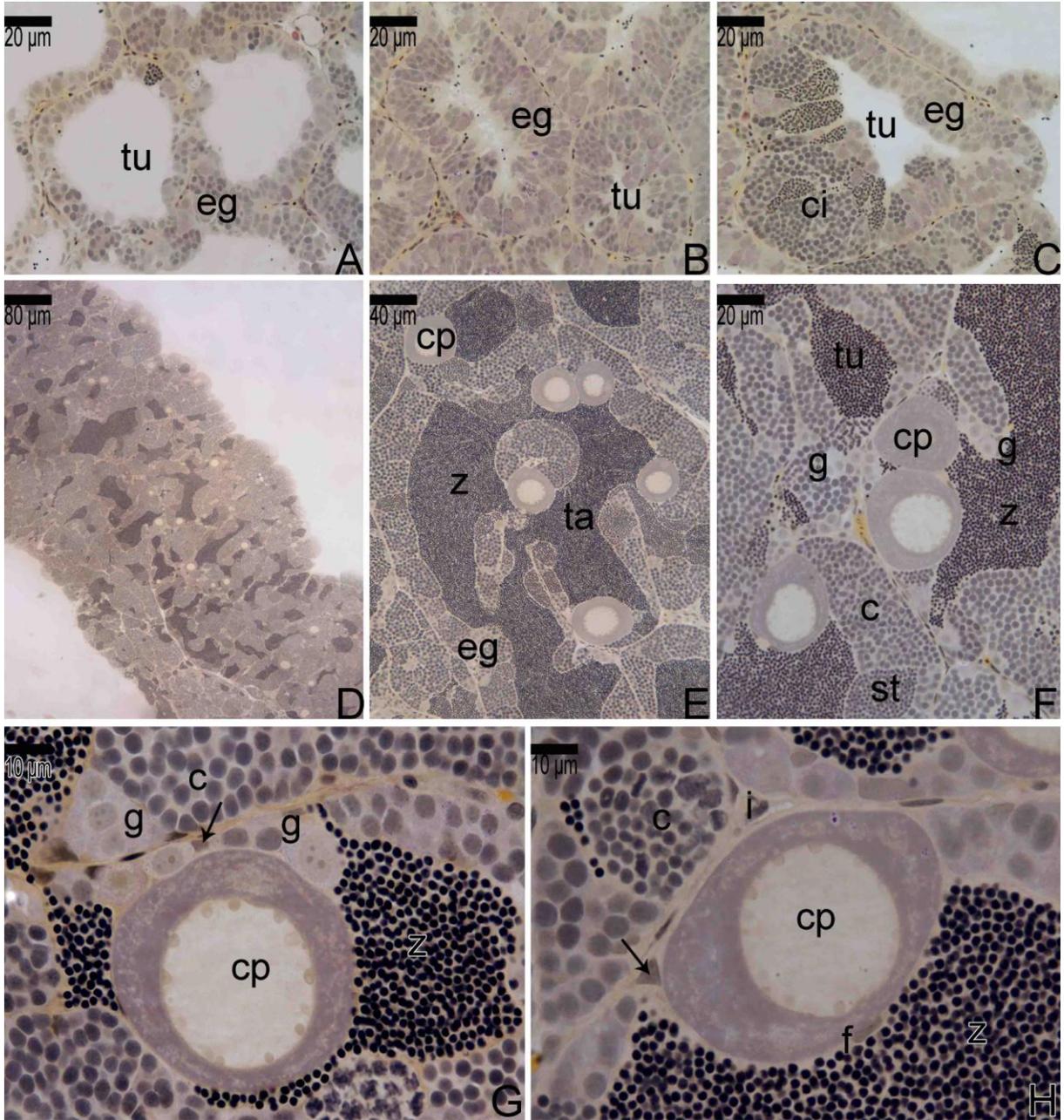


Figura 53: Corte histológico de testículo de *Gymnocorymbus ternetzi*, formado pelo compartimento germinativo e pelo compartimento intersticial. Notar a grande quantidade de espermatozóides nos túbulos testiculares. O epitélio germinativo formado por cistos de espermatogônias, espermatócitos e espermátides, organiza-se em túbulos testiculares anastomosados. *Legenda:* eg: epitélio germinativo, cp: oócito em crescimento primário, tu: túbulos testiculares, c: espermatócito, g: espermatogônia, ta: túbulos anastomosados, st: espermátides, z: espermatozóides. *Coloração:* Amarelo Metanil.

Figura 53

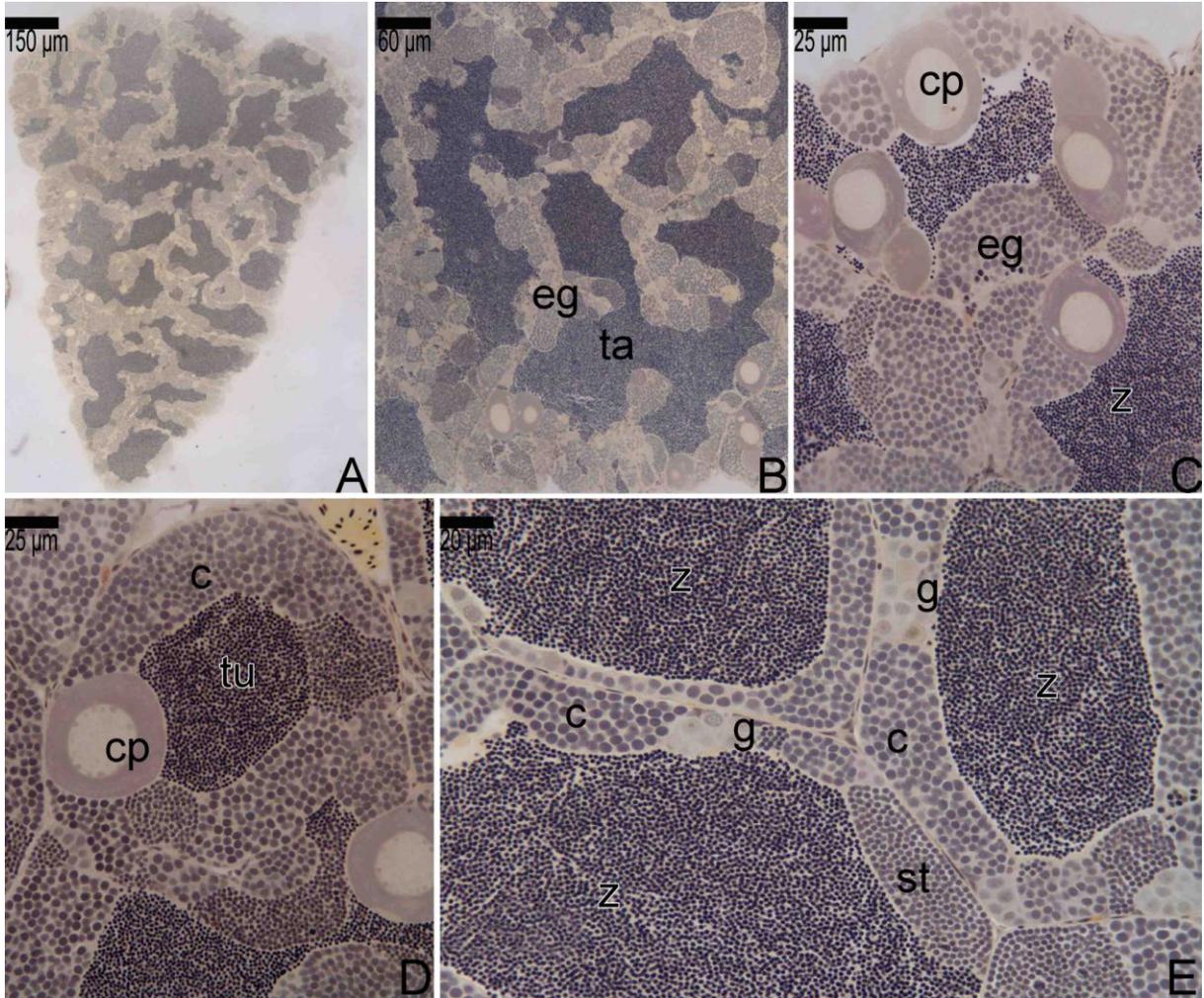


Figura 54: Corte parassagital (A,B,F-I) e transversal(C-E) de testículo de *Corydoras schwartzi*. Notar a disposição das espermatogônias no tecido gonadal, inicialmente em cordões e posteriormente organizando-se em ácinos. *Legenda:* G: gônada, g: espermatogônia, seta: célula pré-Sertoli, cabeça de seta: divisões celulares de espermatogônias, co: cordões contínuos de espermatogônias, i: interstício. *Coloração:* Amarelo Metanil.

Figura 54

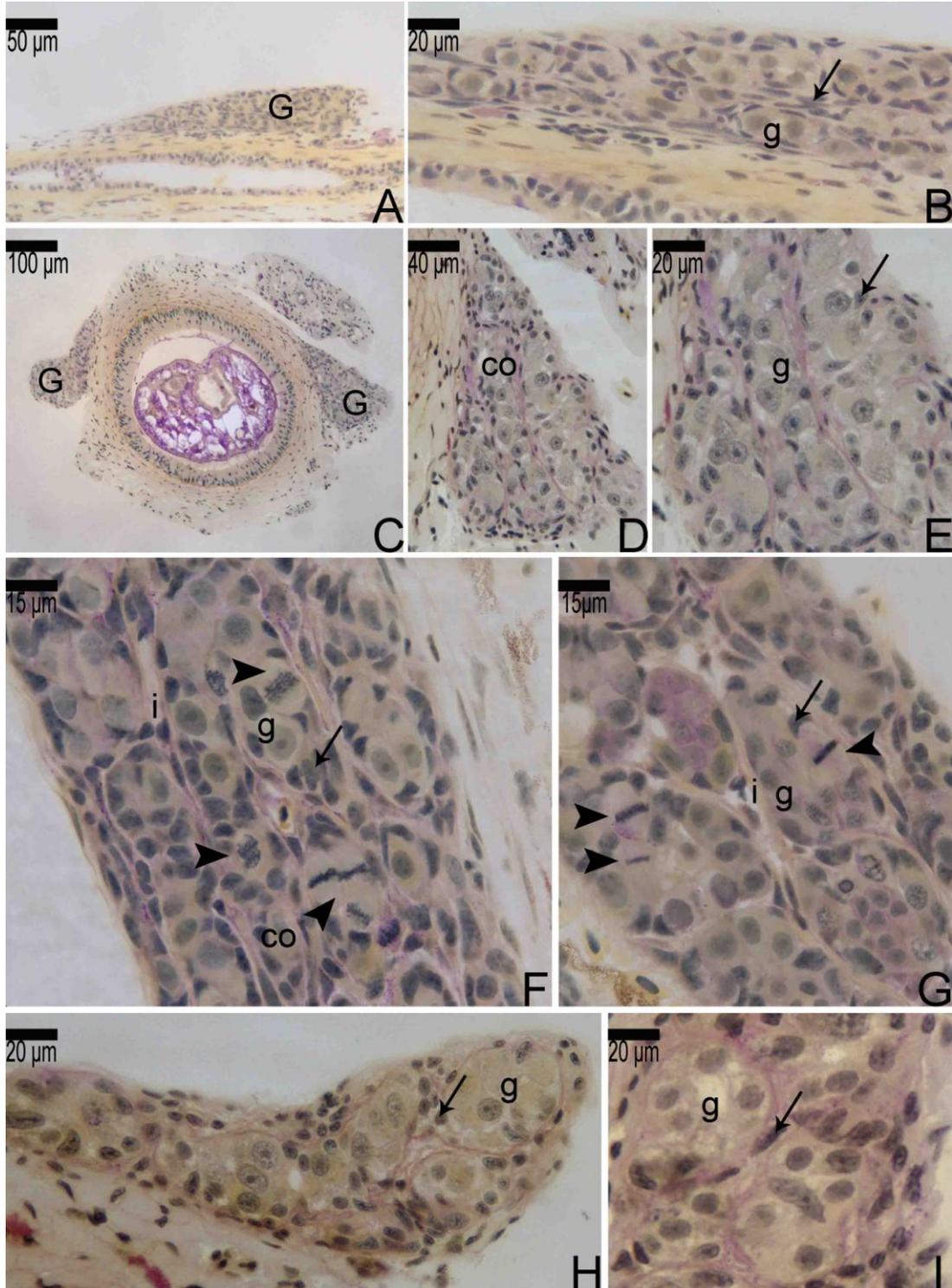


Figura 55: Corte parassagital de testículo de *Corydoras schwartzi* mostrando organização das espermatogônias em estruturas acinares. Notar os diferentes tipos de espermatogônias.
Legenda: G: gônada, g1ind: espermatogônia primária indiferenciada, g1dif: espermatogônia primária diferenciada, g2: espermatogônia secundária, seta: célula pré-Sertoli, a: ácidos.
Coloração: Amarelo Metanil.

Figura 55

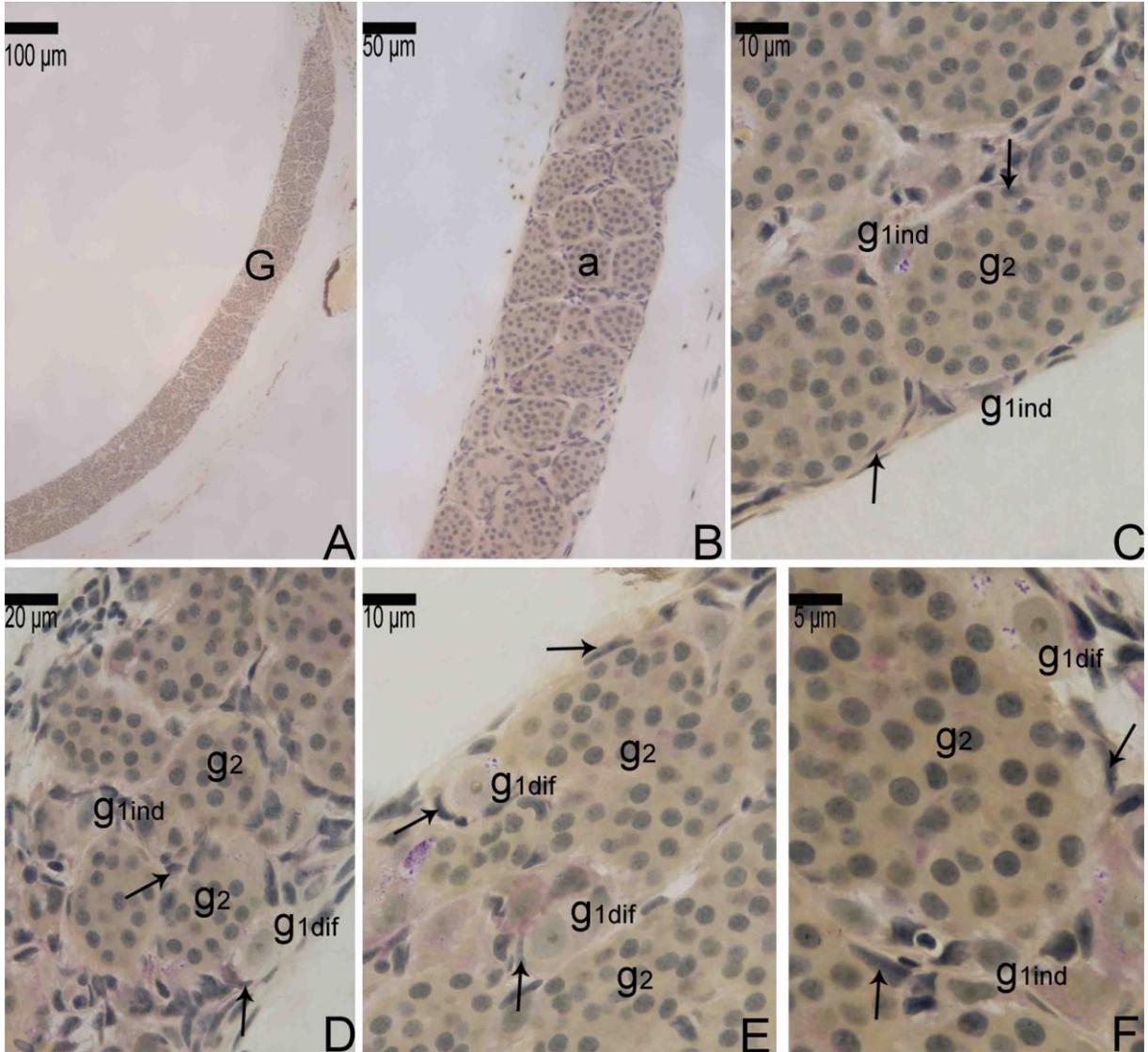


Figura 56: Corte parassagital de testículo de *Corydoras schwartzi*. A região dos ácinos começa a sofrer processo de degeneração. *Legenda:* G: gônada, g1ind: espermatogônia primária indiferenciada, g1dif: espermatogônia primária diferenciada, g2: espermatogônia secundária, seta: célula de Sertoli, a: ácinos, cabeça de seta: figuras de divisões celulares, seta sinuosa: células com aspecto de apoptose. *Coloração:* Amarelo Metanil.

Figura 56

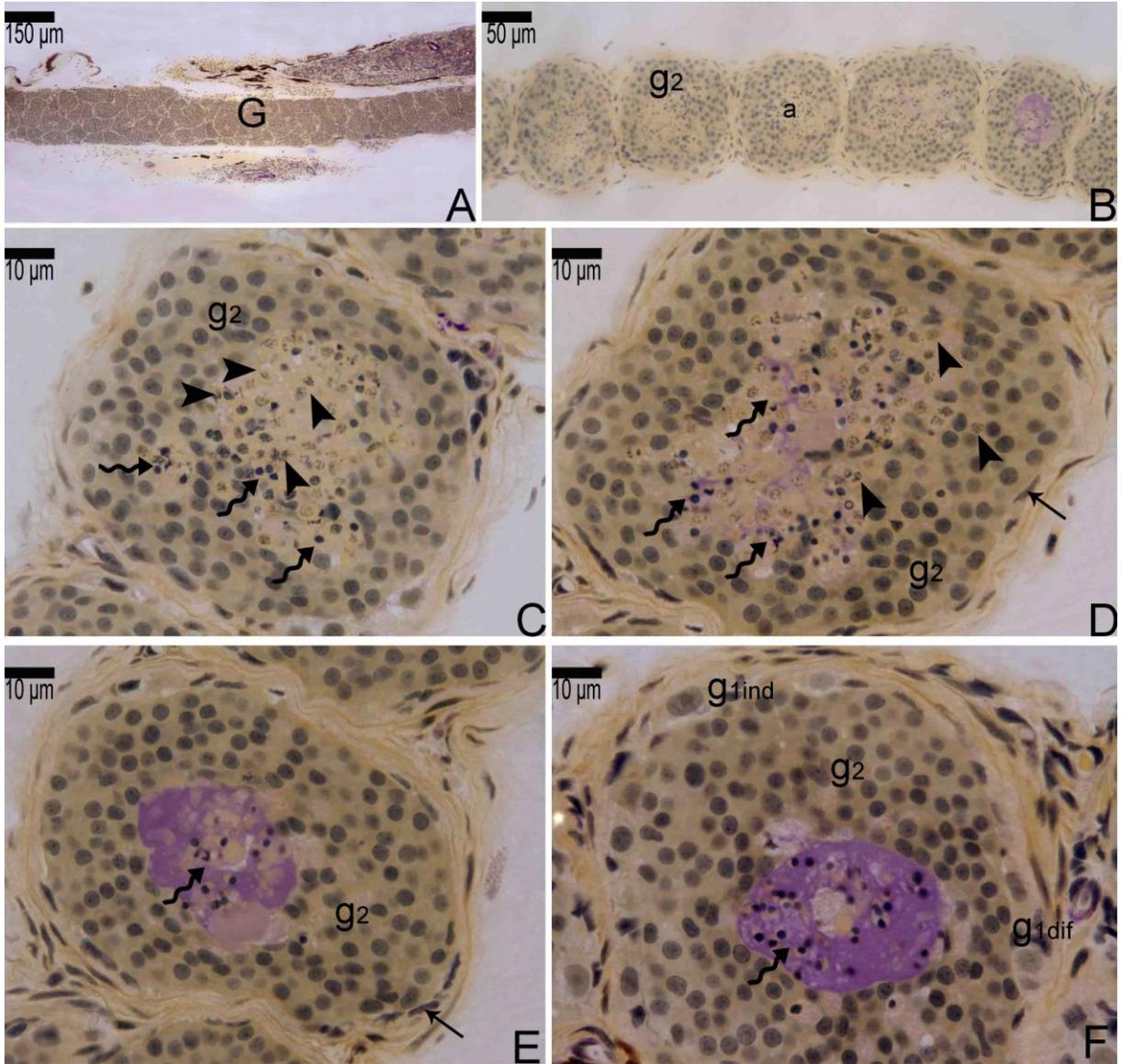


Figura 57: Corte parassagital de testículo de *Corydoras schwartzi*. Testículo com aspecto desorganizado, causado pela remodelação tecidual, após degeneração dos ácinos (A-D). Epitélio dos túbulos desprovido de células germinativas e substância PAS positiva no interior dos túbulos (E-I). *Legenda:* G: gônada, f: filamentos, a: ácinos, g1ind: espermatogônia primária indiferenciada, g2: espermatogônia secundária, seta: célula de Sertoli, tu: túbulos testiculares, RS: região secretora, RE: região espermatogênica. *Coloração:* Amarelo Metanil.

Figura 57

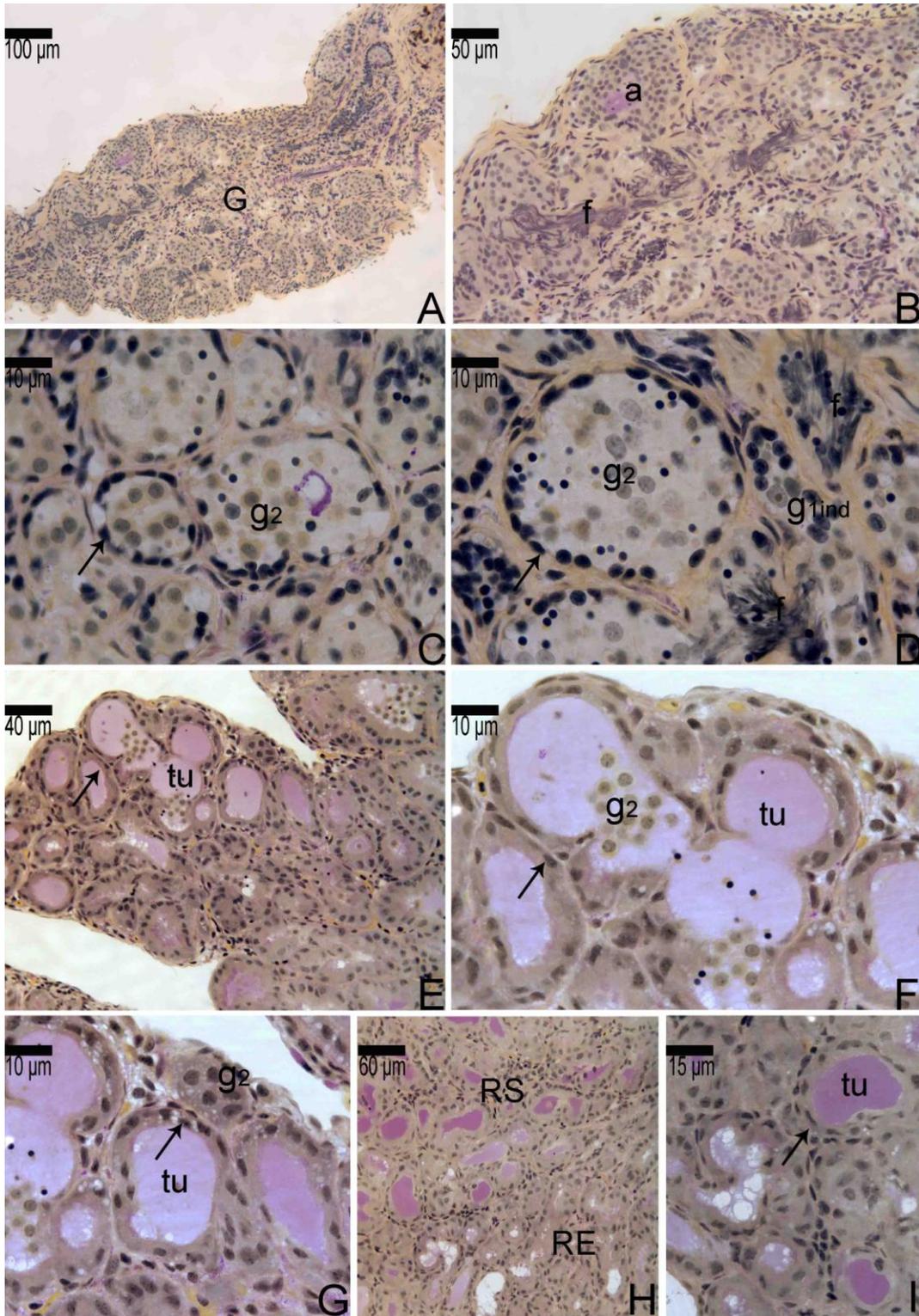


Figura 58: Corte parassagital de testículo de *Corydoras schwartzi*. A-B) Estabelecimento do epitélio germinativo. Ocorre repovoamento do epitélio tubular, definindo o epitélio germinativo, a partir de cistos de espermatogônias remanescentes. C-F) Formação das câmaras secretoras pelo acúmulo de substância, constituindo a porção secretora do testículo. Notar o epitélio desprovido de células germinativas. C) substância secretada no tecido gonadal rica em proteína (positiva ao Amarelo Metanil). *Legenda:* g: espermatogônia, seta: célula de Sertoli, tu: túbulos testiculares, RS: região secretora, S: células somáticas, sc: secreção. *Coloração:* Amarelo Metanil.

Figura 58

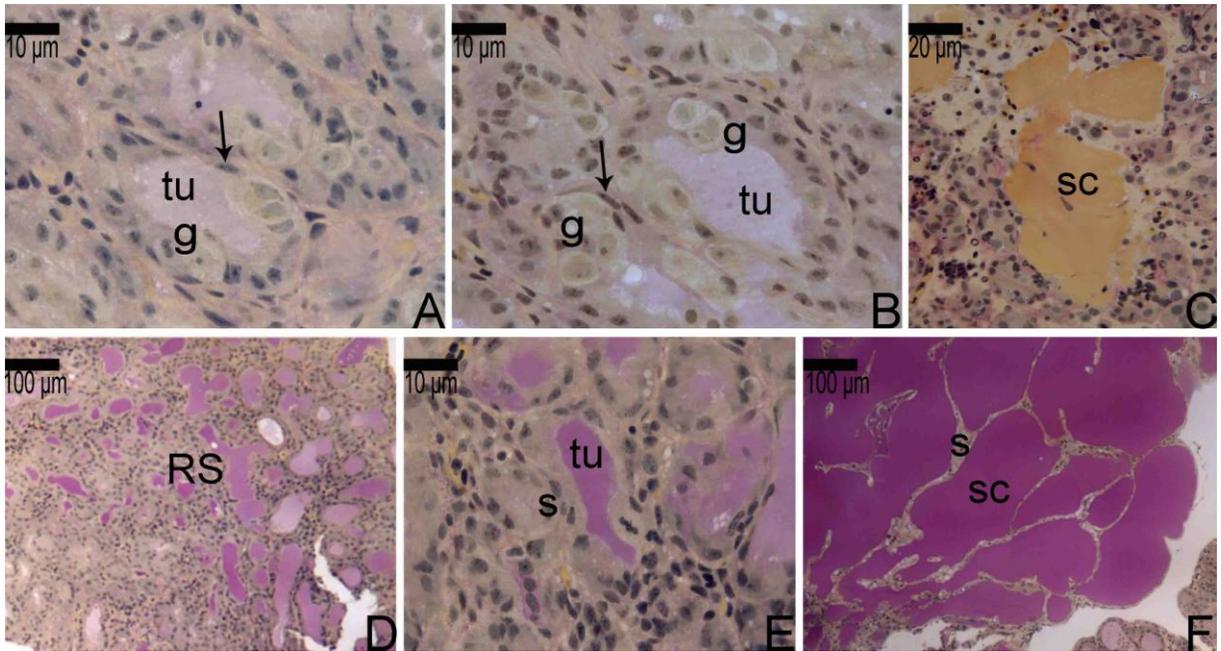


Figura 59: Corte transversal (A-G) e parassagital (H-K) de testículo de *Corydoras schwartzi*. Início da formação dos túbulos testiculares (A-C) e aumento da quantidade de túbulos que se tornam gradativamente anastomosados (B-G). Epitélio germinativo constituído principalmente por espermatogônias. H) Início da espermatogênese com intensa atividade mitótica (I) e meiótica (J,K) aumentando os cistos germinativos. As espermatídes começam a preencher os túbulos testiculares (H). *Legenda:* G: gônada, g: espermatogônia, seta: célula de Sertoli, tu: túbulos testiculares, c: espermatócito, st: espermatídes, i: interstício. *Coloração:* Amarelo Metanil.

Figura 59

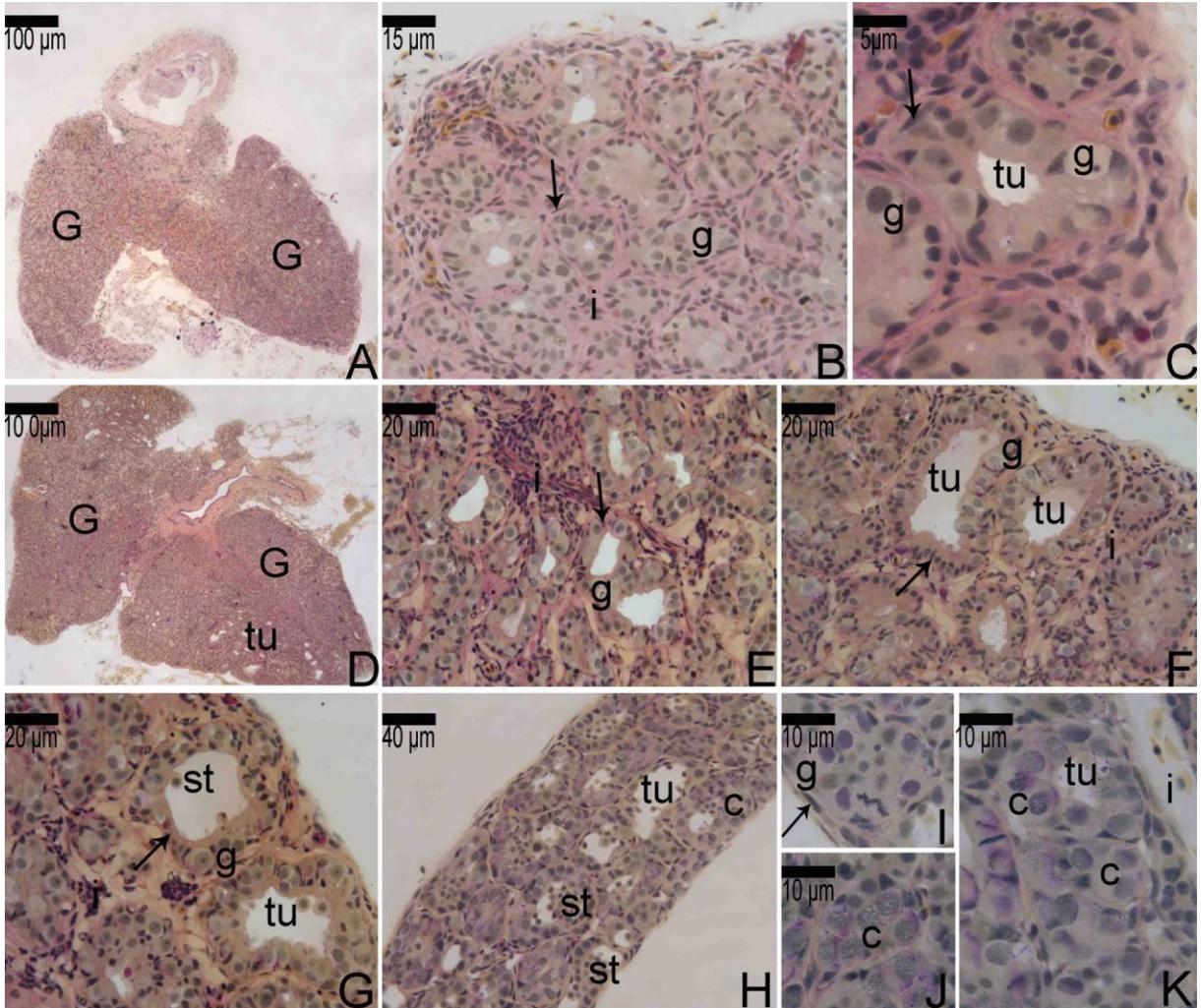


Figura 60: Corte histológico de testículo de *Tanichthys albonubes* – Método de Reticulina. Cordões de células germinativas são separados por uma membrana basal discreta dos demais componentes intersticiais, já no início da diferenciação gonadal (A-D). Os túbulos testiculares adjacentes são circundados de forma incompleta pela membrana basal, permitindo a anastomose dos mesmos. *Legenda:* g: espermatogônia, seta: membrana basal, tu: túbulos testiculares, ta: túbulos anastomosados, z: espermatozóides.

Figura 60

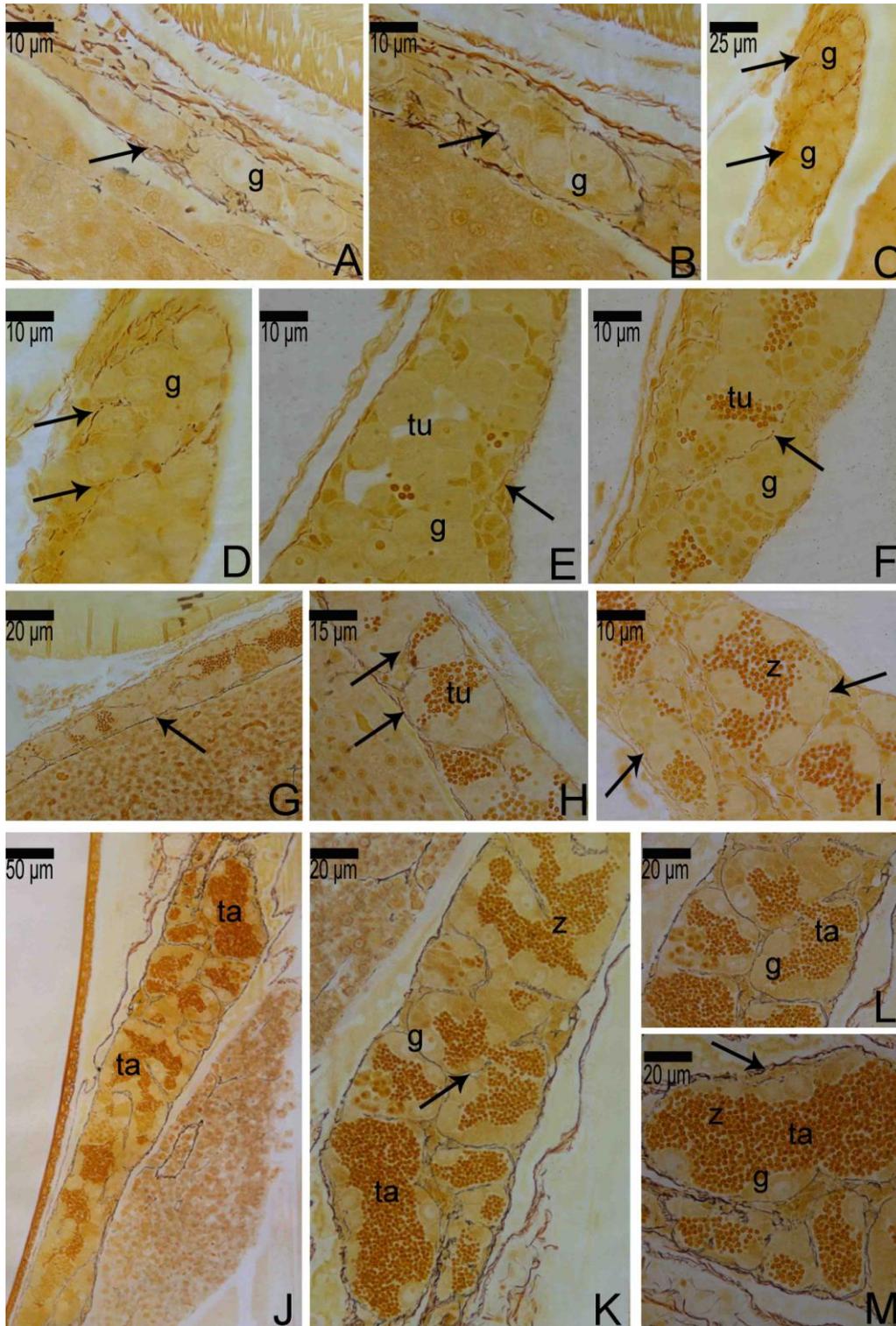


Figura 61: Corte histológico de testículo totalmente desenvolvido de *Tanichthys albonubes* – Método de Reticulina. A membrana basal torna-se mais espessa com o progresso da diferenciação testicular e crescimento do tecido. *Legenda:* seta: membrana basal, tu: túbulos testiculares, ta: túbulos anastomosados, z: espermatozóides, ci: cistos, i: interstício.

Figura 61

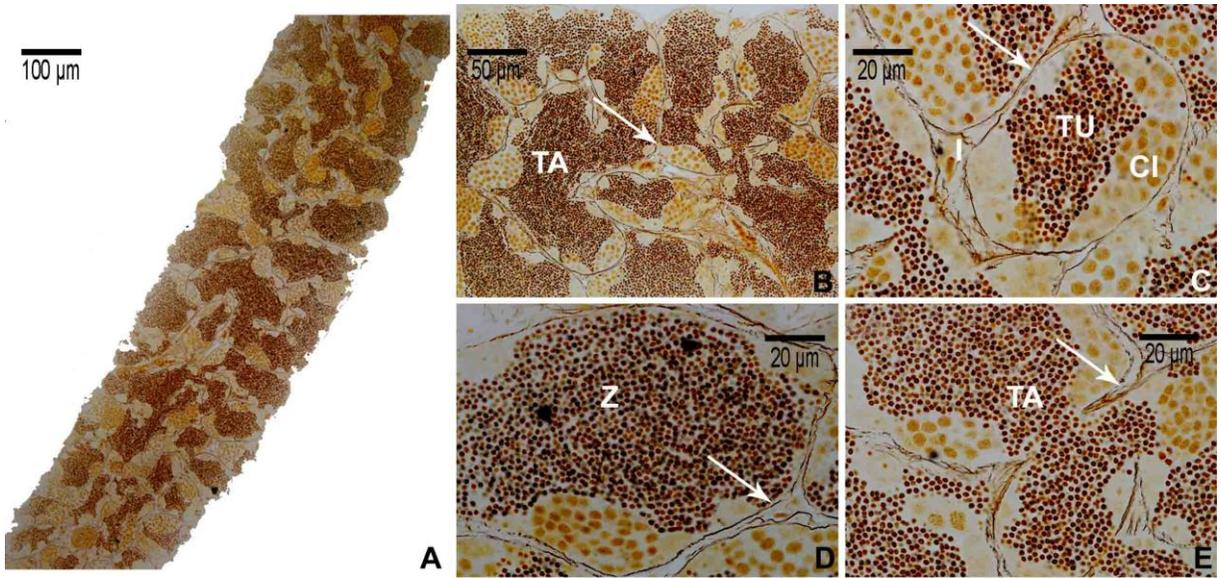


Figura 62: Corte histológico de testículo totalmente desenvolvido de *Gymnocorymbus ternetzi* – Método de Reticulina. Tecido gonadal ovariano, supostamente masculino não apresenta marcação (A-B). A membrana basal é detectada a partir do estabelecimento do epitélio germinativo e dos túbulos testiculares que já mostram-se anastomosados (C-E). Com o aumento da extensão do epitélio, a anastomose entre os túbulos torna-se maior (F,G). Os túbulos testiculares em gônadas plenamente desenvolvidas, são totalmente circundados pela membrana basal, exceto em regiões que irão ocorrer anastomoses (I-L). Notar que não há membrana basal ao redor dos oócitos remanescentes (J,L) a despeito de estes apresentarem células foliculares ao seu redor. *Legenda:* seta: membrana basal, to: tecido ovariano, eg: epitélio germinativo, tu: túbulos testiculares, ta: túbulos anastomosados, z: espermatozóides, c: espermatócitos.

Figura 62

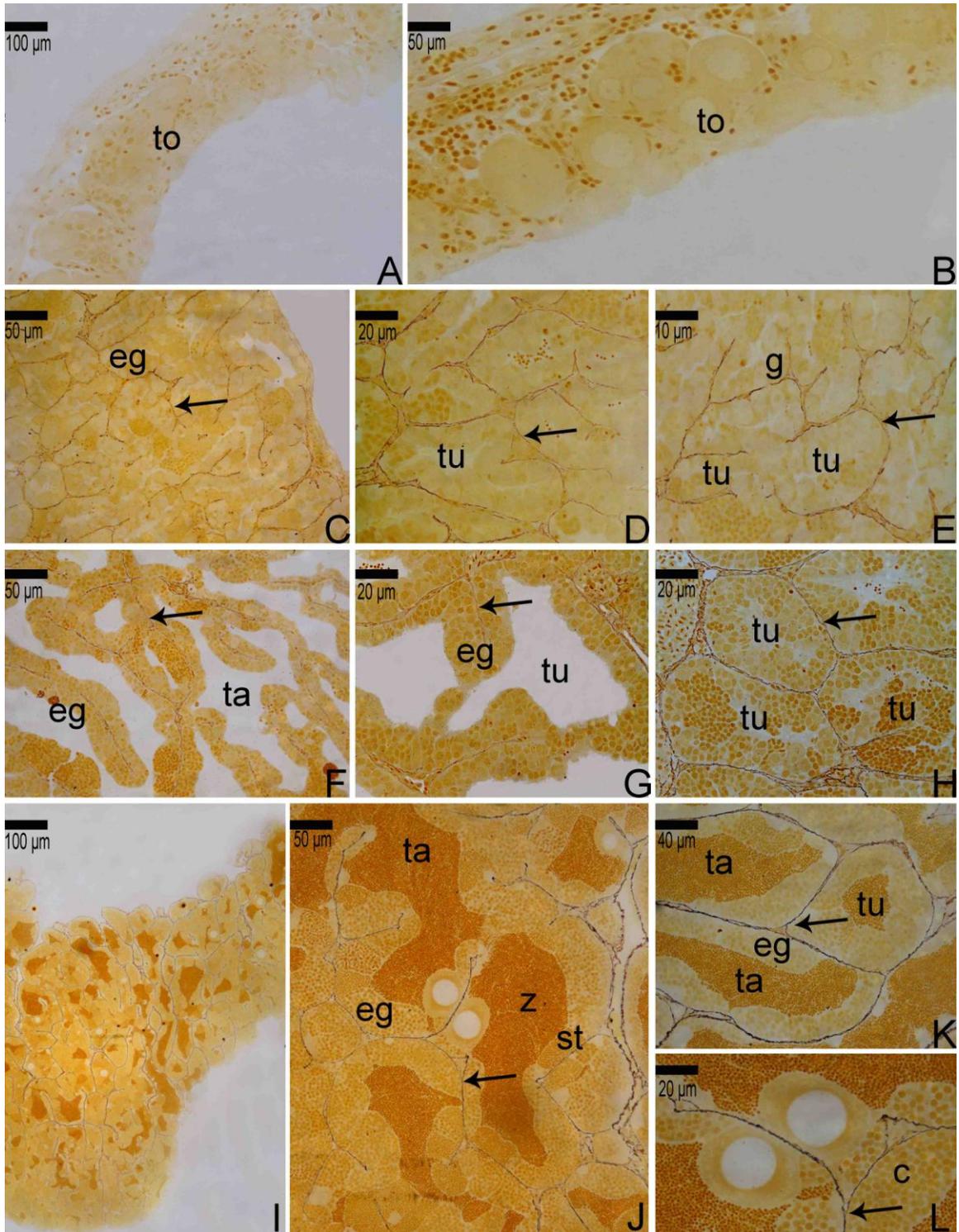


Figura 63: Corte histológico de testículo totalmente desenvolvido de *Corydoras schwartzi* – Método de Reticulina. Tanto os cordões contínuos de espermatogônias, como as estruturas acinares são totalmente circundadas por uma membrana basal, separando o compartimento germinativo do intersticial (A-C). Os túbulos testiculares adjacentes apresentam ausência de membrana basal na região que ocorrerá anastomose (D-E). A organização testicular tubular anastomosada é formada desde as primeiras etapas da diferenciação (F-I) e segue este padrão até o desenvolvimento completo da gônada (K-L). Ao redor das câmaras secretoras, o epitélio também é sustentado por uma membrana basal e os túbulos também sofrem anastomoses (J). *Legenda:* seta: membrana basal, co: cordões contínuos de espermatogônias, a: ácinos, tu: túbulos testiculares, ta: túbulos anastomosados, RS: região secretora, RE: região espermatogênica.

Figura 63

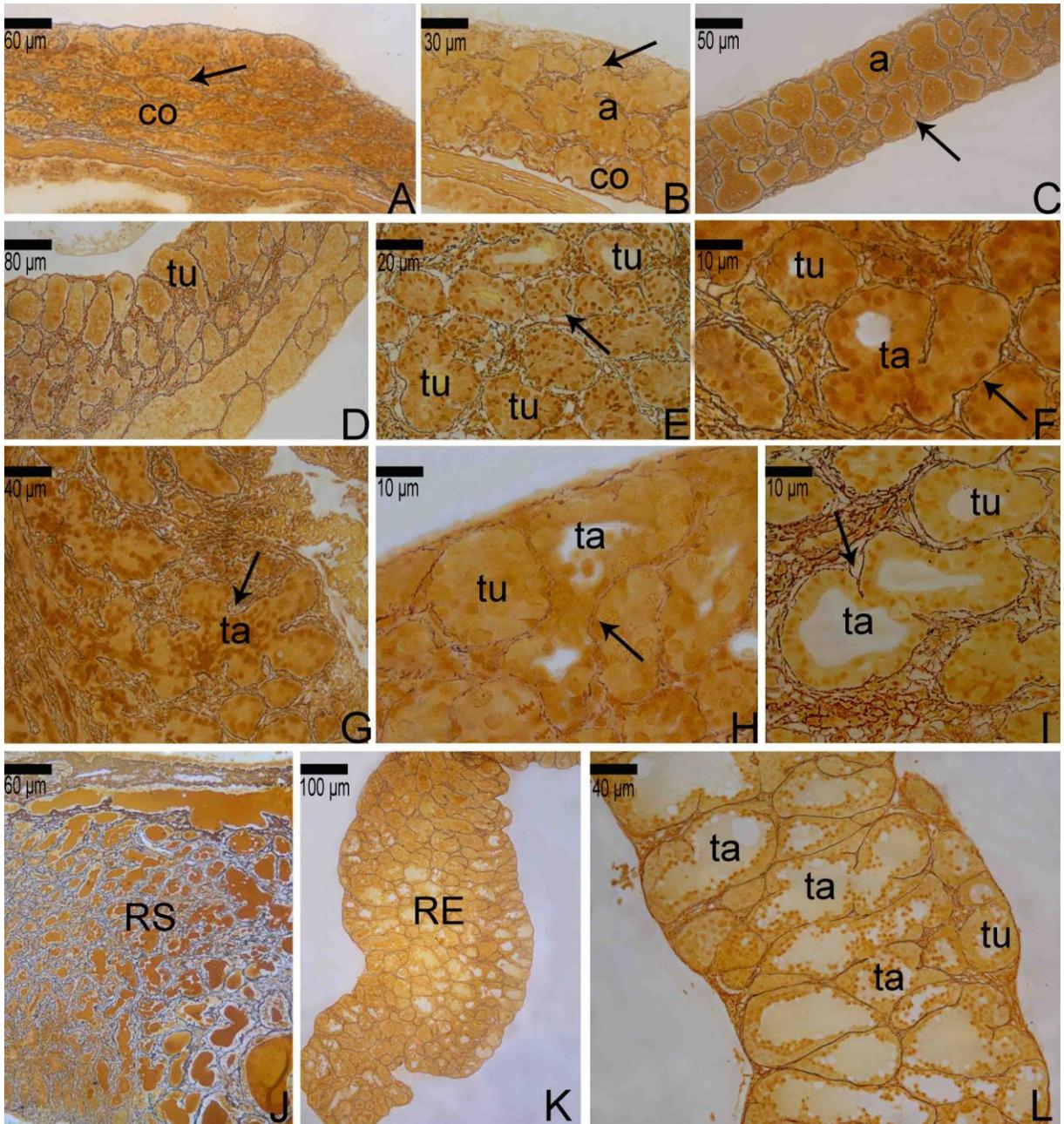


Figura 64: Corte histológico parassagital de gônada indiferenciada masculina de *Amatitlania nigrofasciata* formada por espermatogônias e células somáticas. Presença do ducto espermático. B) Detalhes de A, mostrando a disposição das espermatogônias na região periférica da gônada (porção ventral). *Legenda:* DU: ducto testicular, g: espermatogônia, S: células somáticas. *Coloração:* Amarelo Metanil.

Figura 64

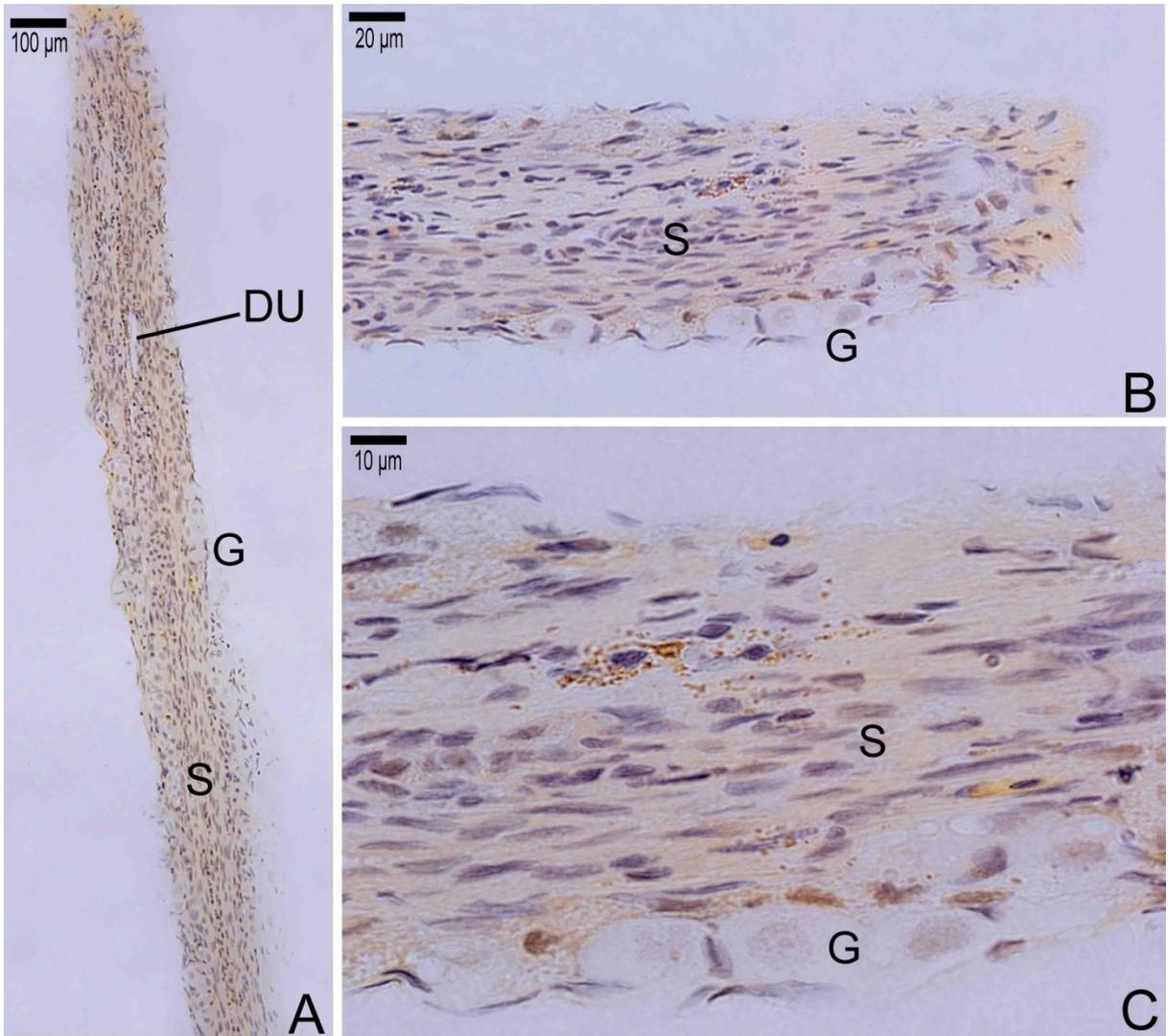


Figura 65: A) Corte histológico parassagital de testículo de *Amatitlania nigrofasciata*, mostrando presença de ducto testicular na porção dorsal (B,C) e concentração de espermatogônias na porção ventral (B-D). E) Corte longitudinal de testículo, mostrando presença de ducto testicular e espermatogônias na periferia da gônada. F-H) Corte parassagital de testículo, mostrando presença de ducto testicular na porção dorsal (G) e lóbulo testicular se formando (H). *Legenda:* DU: ducto testicular, g: espermatogônia, CS: células somáticas, vs: vaso sanguíneo, lo: lóbulo testicular. *Coloração:* Amarelo Metanil.

Figura 65

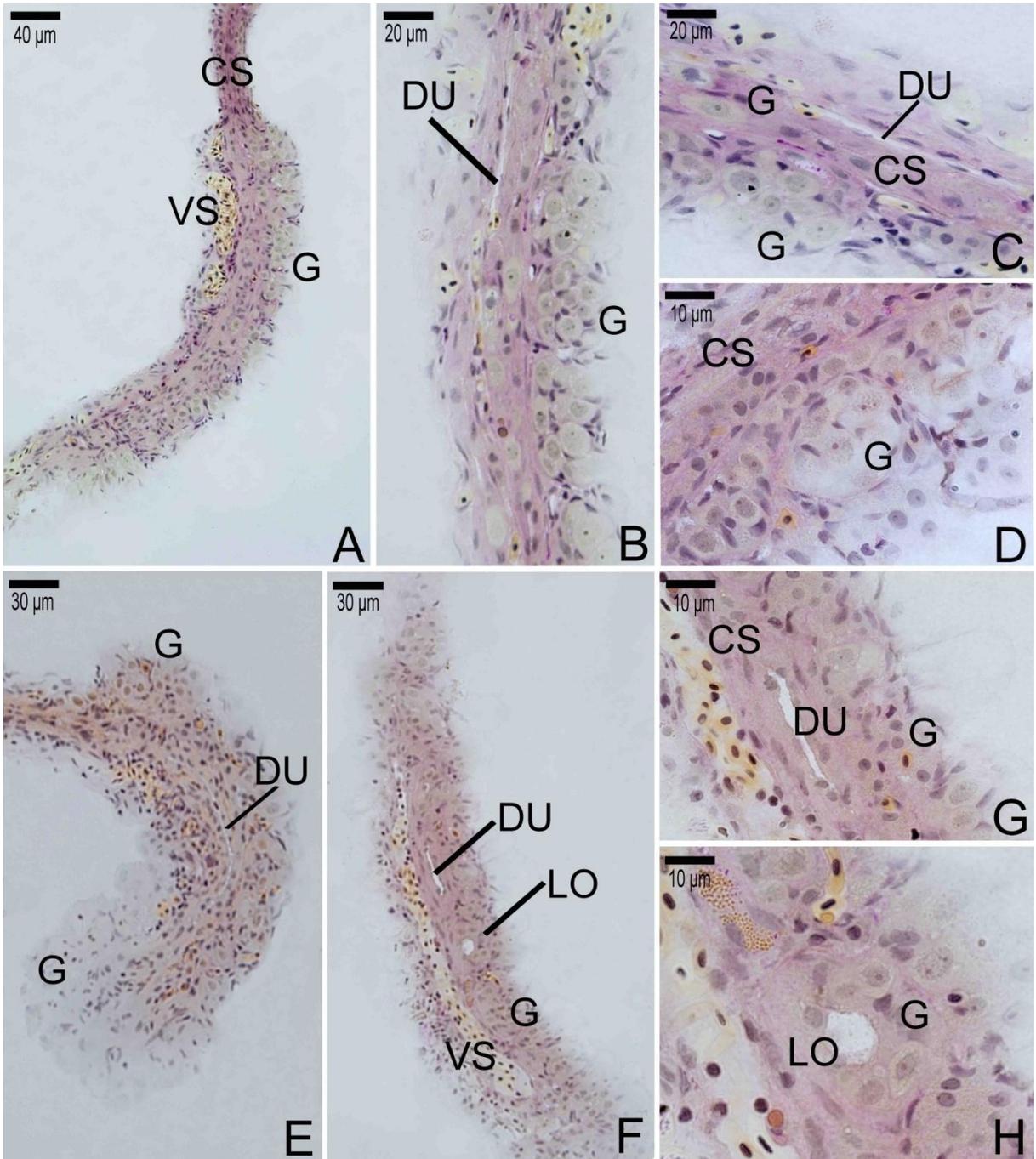


Figura 66: A) Corte histológico parassagital de testículo de *Amatitlania nigrofasciata* mostrando grande quantidade de espermatogônias associadas às células pré-Sertoli. As espermatogônias organizam em conjuntos celulares semelhantes à ácinos (B,C). D-E) Início da formação dos lóbulos testiculares. Notar o compartimento luminal se formando entre as espermatogônias de um conjunto celular. *Legenda:* DU: ducto testicular, g: espermatogônia, lo: lóbulo testicular, pS: célula pré-Sertoli, sinal de +: formação do lúmen testicular, S: célula de Sertoli. *Coloração:* Amarelo Metanil (A-C,E); Hematoxilina-Eosina (D,F).

Figura 66

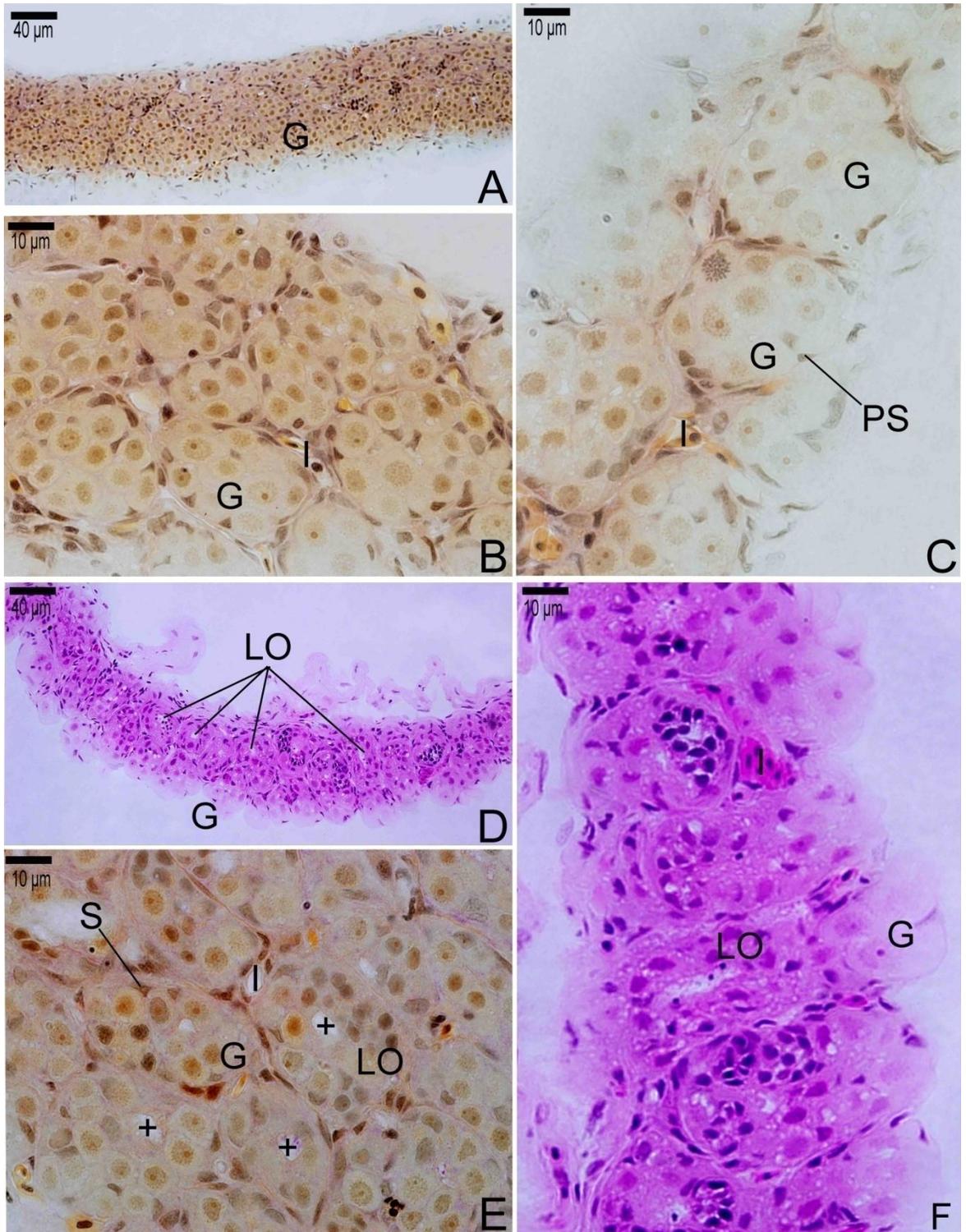


Figura 67: Eletromicrografia de testículo de *Amatitlania nigrofasciata* mostrando a disposição das espermatogônias em cordões contínuos na região periférica da gônada (A). Espermatogônias associadas às células pré-Sertoli, formando um cisto (B). Espermatogônias na região periférica deixando de se organizarem em cordões e passando a formar estruturas acinares (C,D). Conjunto de espermatogônias formando estruturas assinares, todas envolvidas por células de Sertoli (D,E). Lúmen testicular, delimitado por células somáticas (F). *Legenda:* g: espermatogônia, lu: lúmen testicular, cs: célula somática, pS: célula pré-Sertoli, lu: lúmen testicular, S: célula de Sertoli.

Figura 67

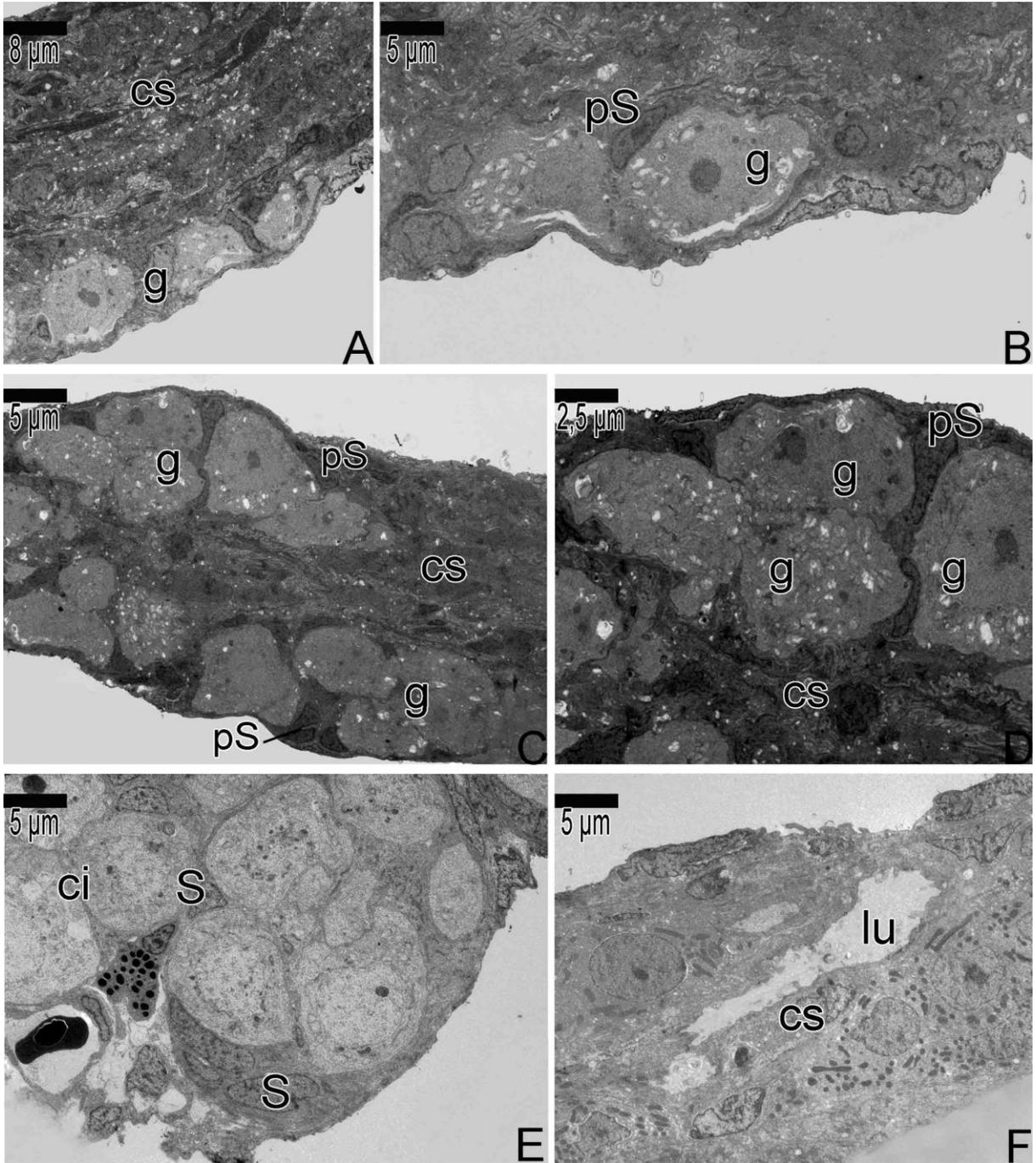


Figura 68: A) Corte histológico parassagital de testículo de *Amatitlania nigrofasciata* mostrando início da espermatogênese. A espermatogênese tem início na região central do testículo (A-E). Notar os cistos de espermatócitos (A-F), a presença de ductos (C,D) e de lóbulos testiculares (C-F). *Legenda:* DU: ducto testicular, g: espermatogônia, lo: lóbulo testicular, S: célula de Sertoli, c: espermatócito. *Coloração:* Amarelo Metanil.

Figura 68

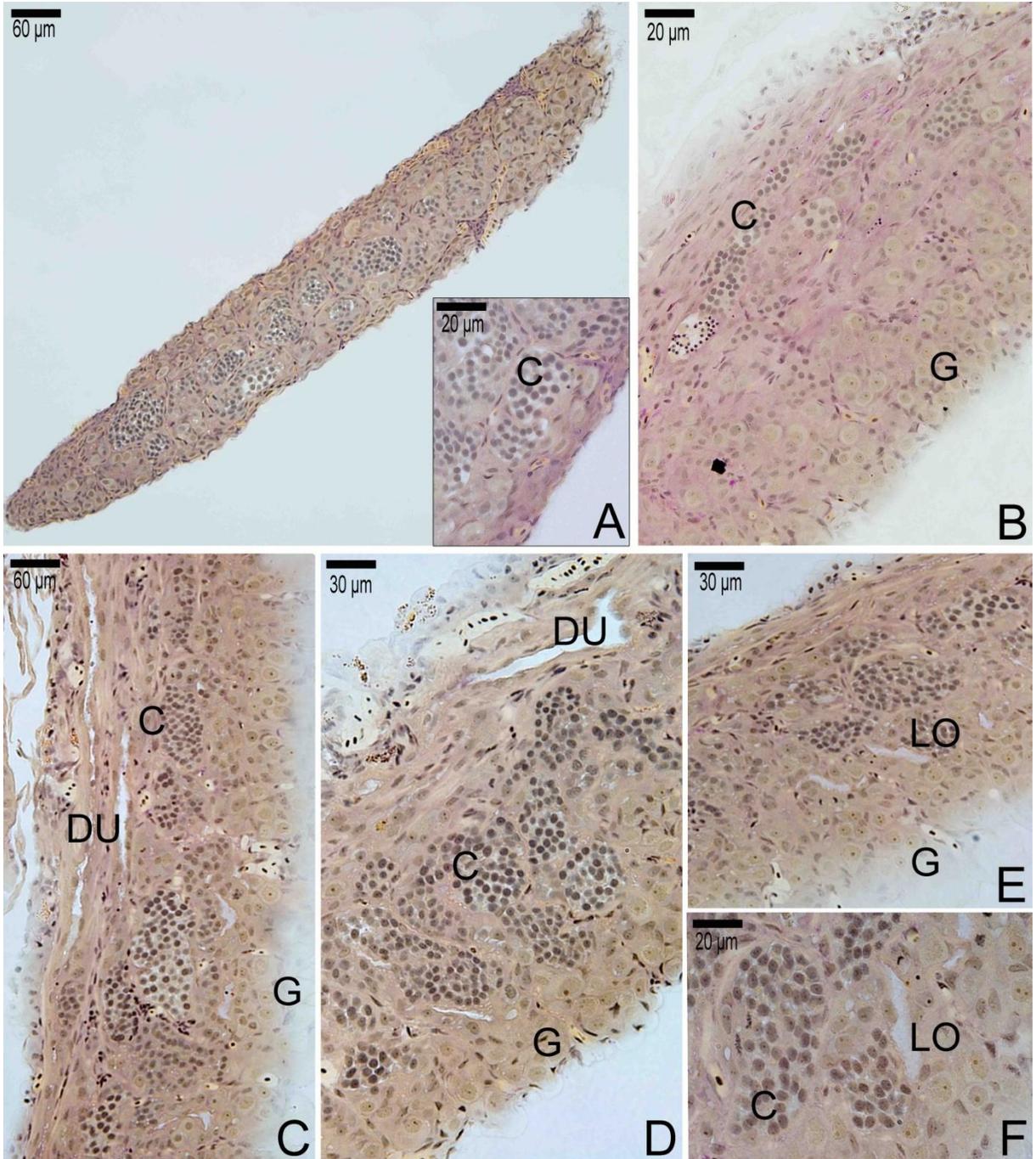


Figura 69: A) Corte histológico parassagital de testículo de *Amatitlania nigrofasciata* mostrando início da produção de espermatozóides. B) Detalhe de A. Notar o tipo de organização testicular – lobular irrestrita. C-D) Lóbulos testiculares digitiformes, com fundo cego – região de concentração de espermatogônias. *Legenda:* DU: ducto testicular, lo: lóbulo testicular, g: espermatogônia, c: espermatócito, z: espermatozóide. *Coloração:* Amarelo Metanil.

Figura 69

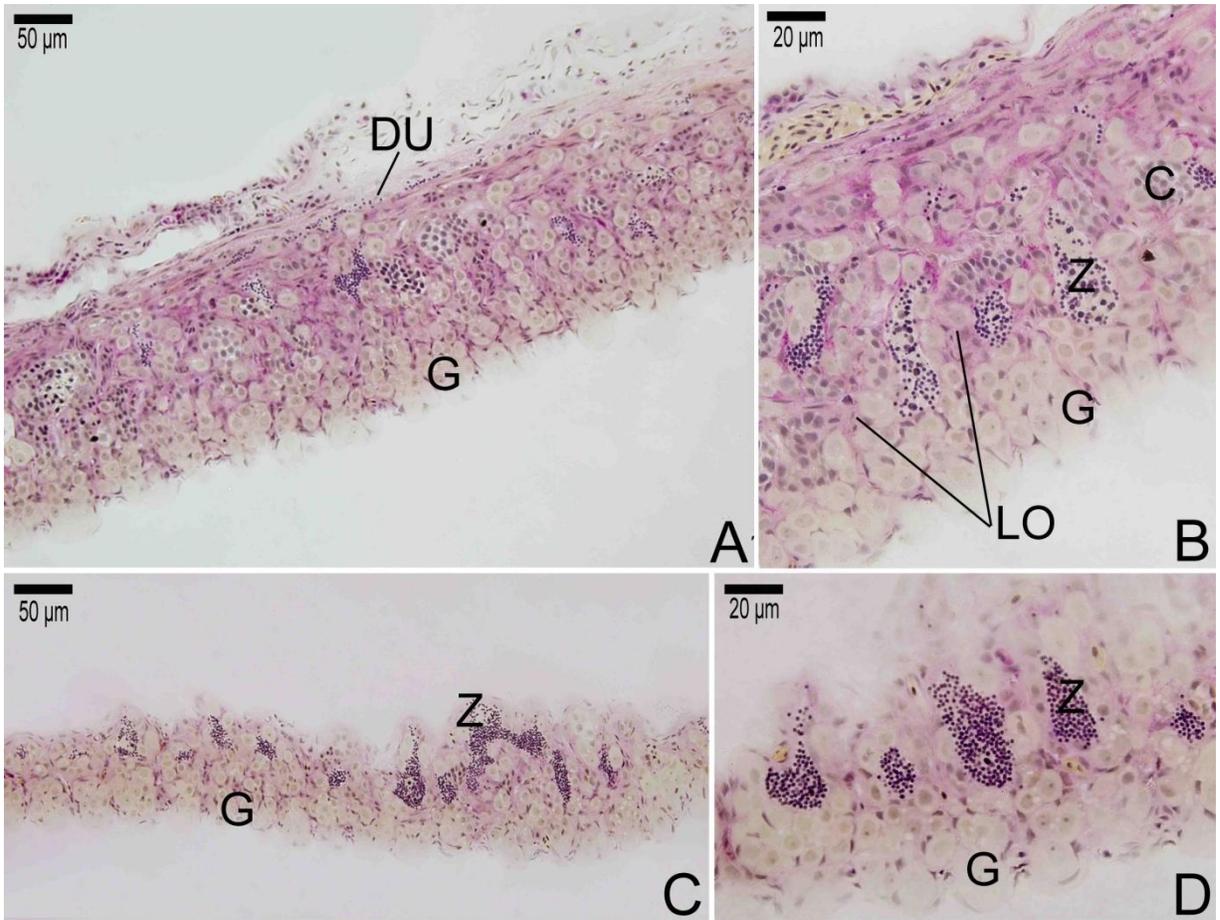


Figura 70: Corte histológico longitudinal de um testículo de *Amatitlania nigrofasciata* totalmente diferenciado (A,E). Notar distribuição das espermatogônias na região periférica da gônada. O testículo é formado por lóbulos testiculares, constituídos por cistos de espermatogônias, espermatócitos e espermatídes. No lúmen do lóbulo, nota-se a presença dos espermatozóides. *Legenda:* DU: ducto testicular, lo: lóbulo testicular, g: espermatogônia, c: espermatócito, z: espermatozóide, T: espermatíde, seta: célula de Sertoli. *Coloração:* Amarelo Metanil.

Figura 70

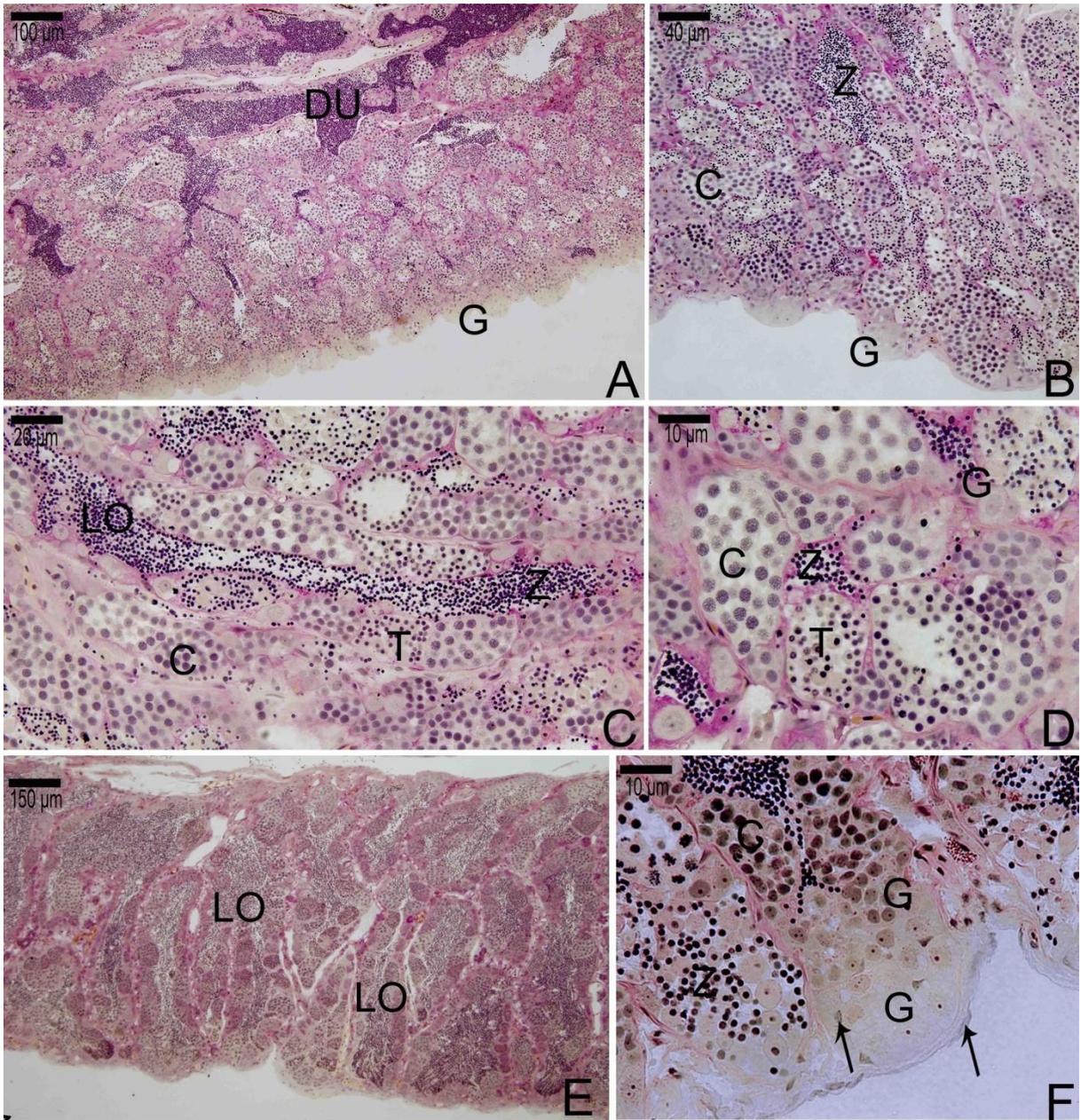


Figura 71: A) Corte histológico parassagital de testículo de *Amatitlania nigrofasciata* – Método de Reticulina. Diferentes fases da diferenciação, mostrando a formação da membrana basal. A) Antes da formação total dos lóbulos testiculares, a membrana basal é observada na porção central do testículo, estando ausente na região periférica, na qual concentram-se os conjuntos de espermatogônias. B-C) Início da síntese de membrana basal ao redor dos ácidos. D-E) Formação dos lóbulos testiculares e estabelecimento do epitélio germinativo, suportado pela membrana basal. F-G) Testículo com início de espermatogênese. Os lóbulos estão formados e são delimitados pela membrana basal, desde a região periférica até o ducto testicular. H-I) Testículo com produção de espermatozoides. A membrana basal está ausente somente na região na qual o lóbulo testicular desemboca no ducto testicular e delimita os lóbulos testiculares. *Legenda:* seta: membrana basal, DU: ducto testicular, lo: lóbulo testicular, g: espermatogônia, z: espermatozoide, vs: vaso sanguíneo, c: cistos, a: ácidos, os: célula pré-Sertoli.

Figura 71

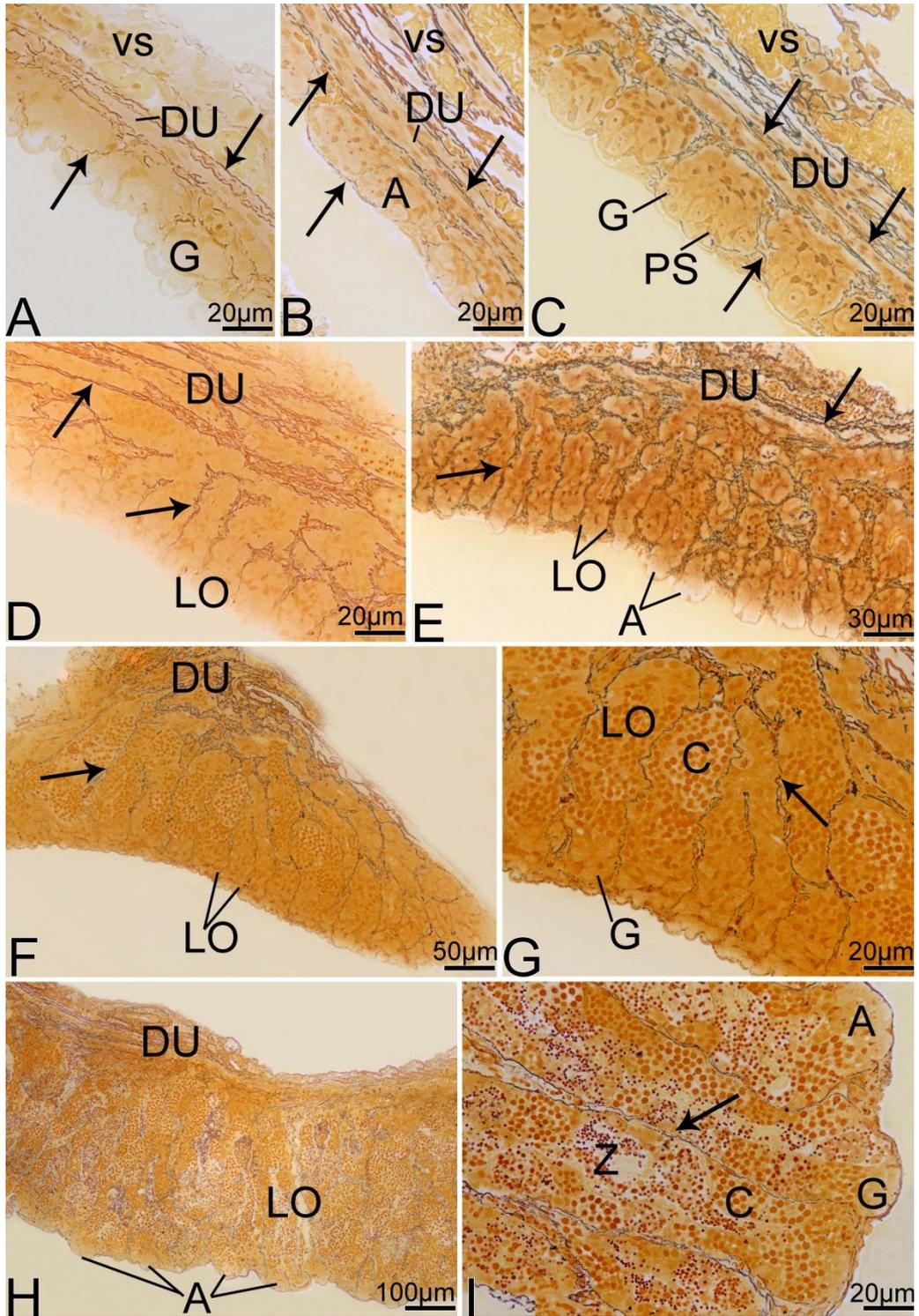


Figura 72: Corte histológico transversal (A-B) e parassagital (C-F) de testículo de *Poecilia reticulata*. Início da diferenciação testicular. Notar o acúmulo de células somáticas na região dorsal do tecido gonadal (A-B). Nos cortes parassagitais, notar o acúmulo de células somáticas na região dorsal do tecido gonadal e a estrutura gonadal formando conjuntos de espermatogônias, na forma de cachos ou ácinos (C-F). *Legenda:* g: espermatogônia, S: célula somática, seta: célula pré-Sertoli, a: ácino, me: mesentério. *Coloração:* Amarelo Metanil.

Figura 72

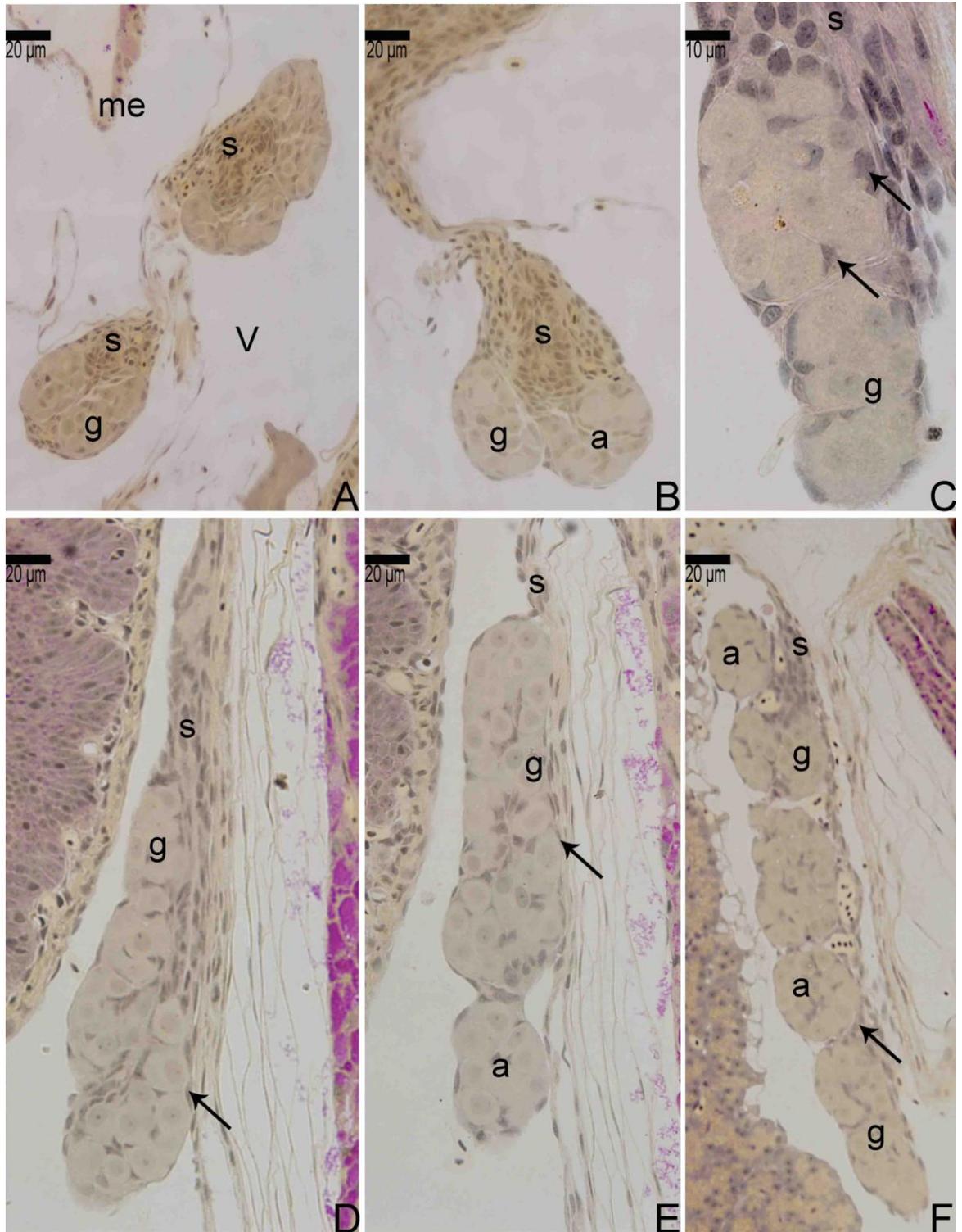


Figura 73: Corte histológico longitudinal de testículo de *Poecilia reticulata*. Formação do ducto testicular e os primeiros lóbulos testiculares, compostos apenas por espermatogônias e ductos testiculares ramificados (A-E). Cortes longitudinais da região do ducto principal (F,G).
Legenda: ci: cistos, du: ducto testicular, g: espermatogônia, pS: célula pré-Sertoli, seta: ácinos - formação dos primeiros lóbulos testiculares. *Coloração:* Azul de Toluidina-Bórax.

Figura 73

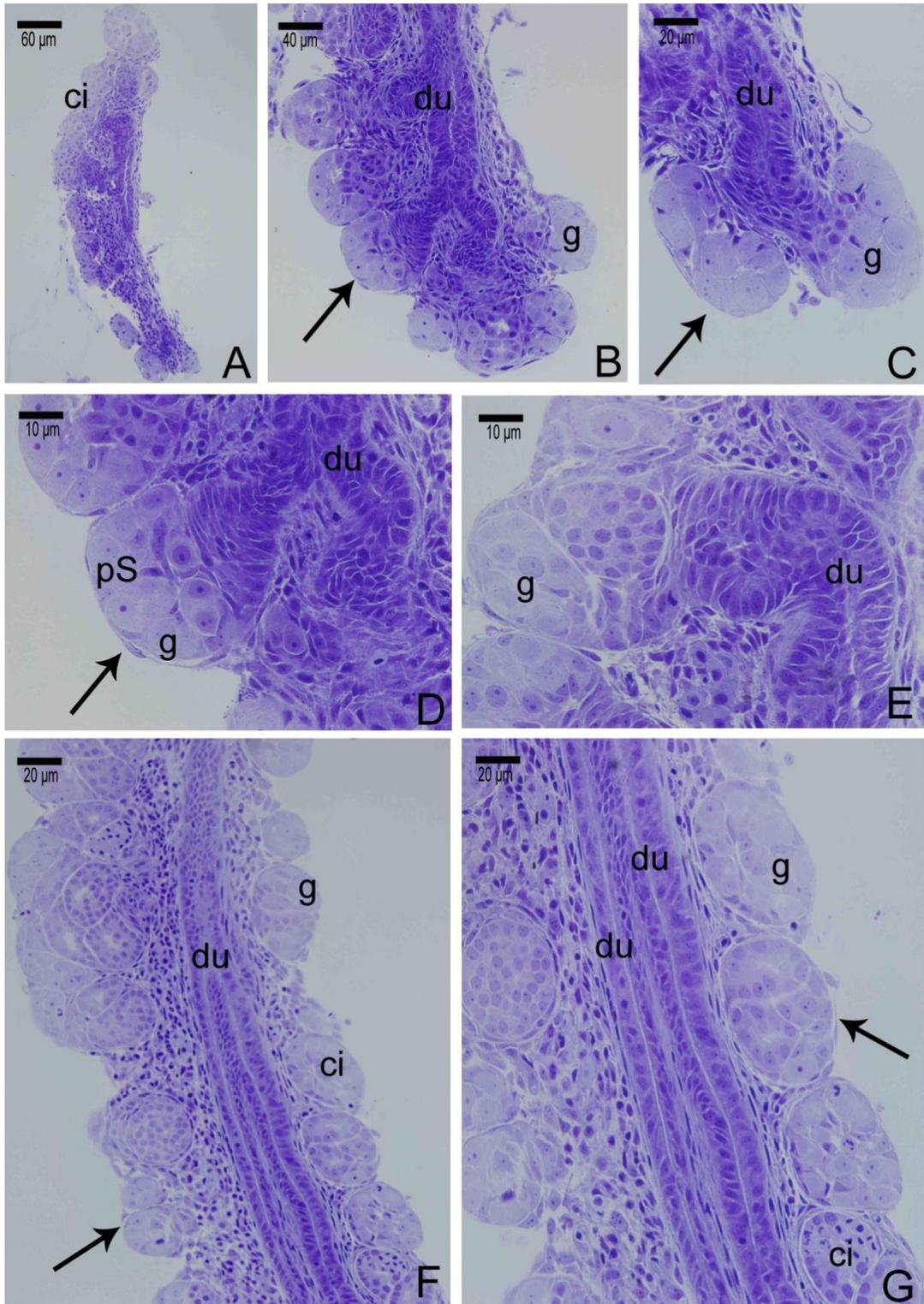


Figura 74: Corte histológico longitudinal de testículo de *Poecilia reticulata*, mostrando os primeiros lóbulos testiculares com cistos de espermatócitos e ramificação do ducto testicular. *Legenda:* du: ducto testicular, g: espermatogônia, S: célula de Sertoli, seta: lóbulos testiculares, c: espermatócitos. *Coloração:* Azul de Toluidina-Bórax.

Figura 74

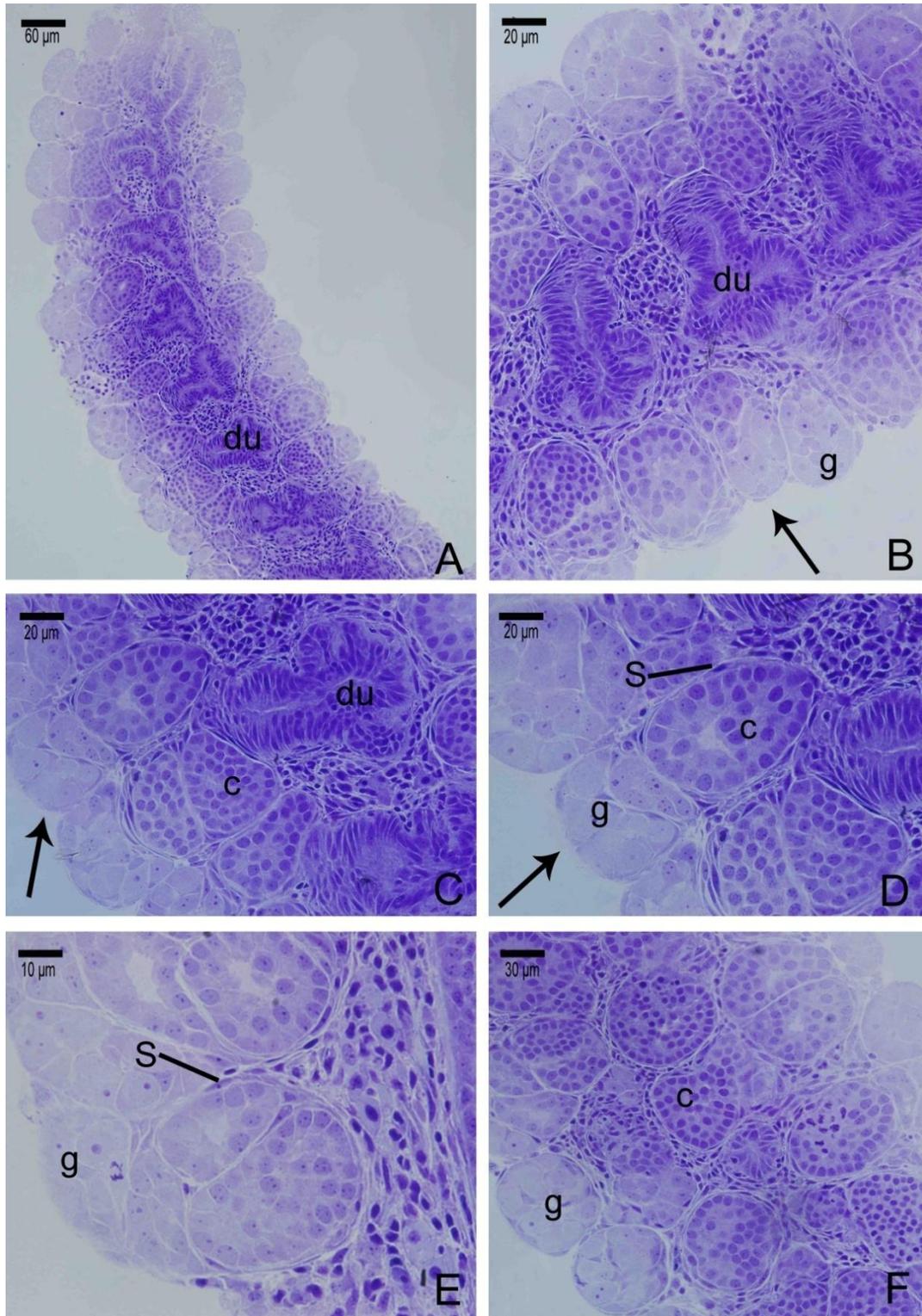


Figura 75: Corte histológico longitudinal de testículo de *Poecilia reticulata* já mais desenvolvido. Notar o maior número de cistos de espermatócitos (A-B), início da formação de espermatídes (C), o lóbulo totalmente formado (D) e a organização testicular que caracteriza o tipo lobular restrito (E). Notar o aumento de cistos de espermatídes e ausência de espermatozóides (E). *Legenda:* du: ducto testicular, g: espermatogônia, c: espermatócitos, st: espermatídes, i: interstício. *Coloração:* Amarelo Metanil.

Figura 75

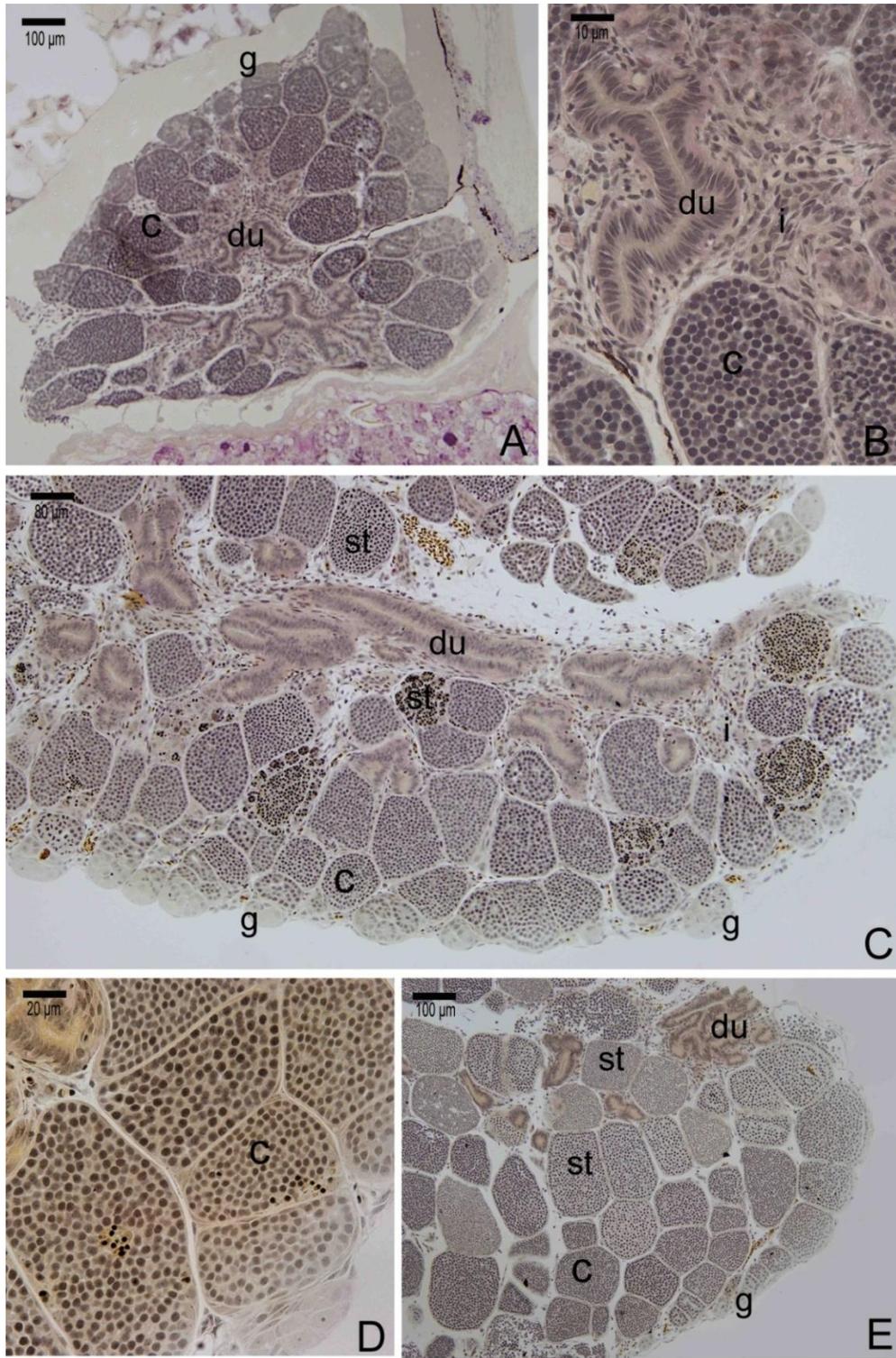


Figura 76: Corte histológico longitudinal de testículo de *Poecilia reticulata*. A-B) região do ducto testicular preenchido por secreção. Notar a presença de espermatídes finais e ausência de espermatozóides. C) Início da produção de espermatozóides. D) Região de ducto testicular preenchido com secreção que envolve os espermatozóides. *Legenda:* du: ducto testicular, g: espermatogônia, c: espermatócitos, st: espermatídes, z: espermatozóide. *Coloração:* Amarelo Metanil.

Figura 76

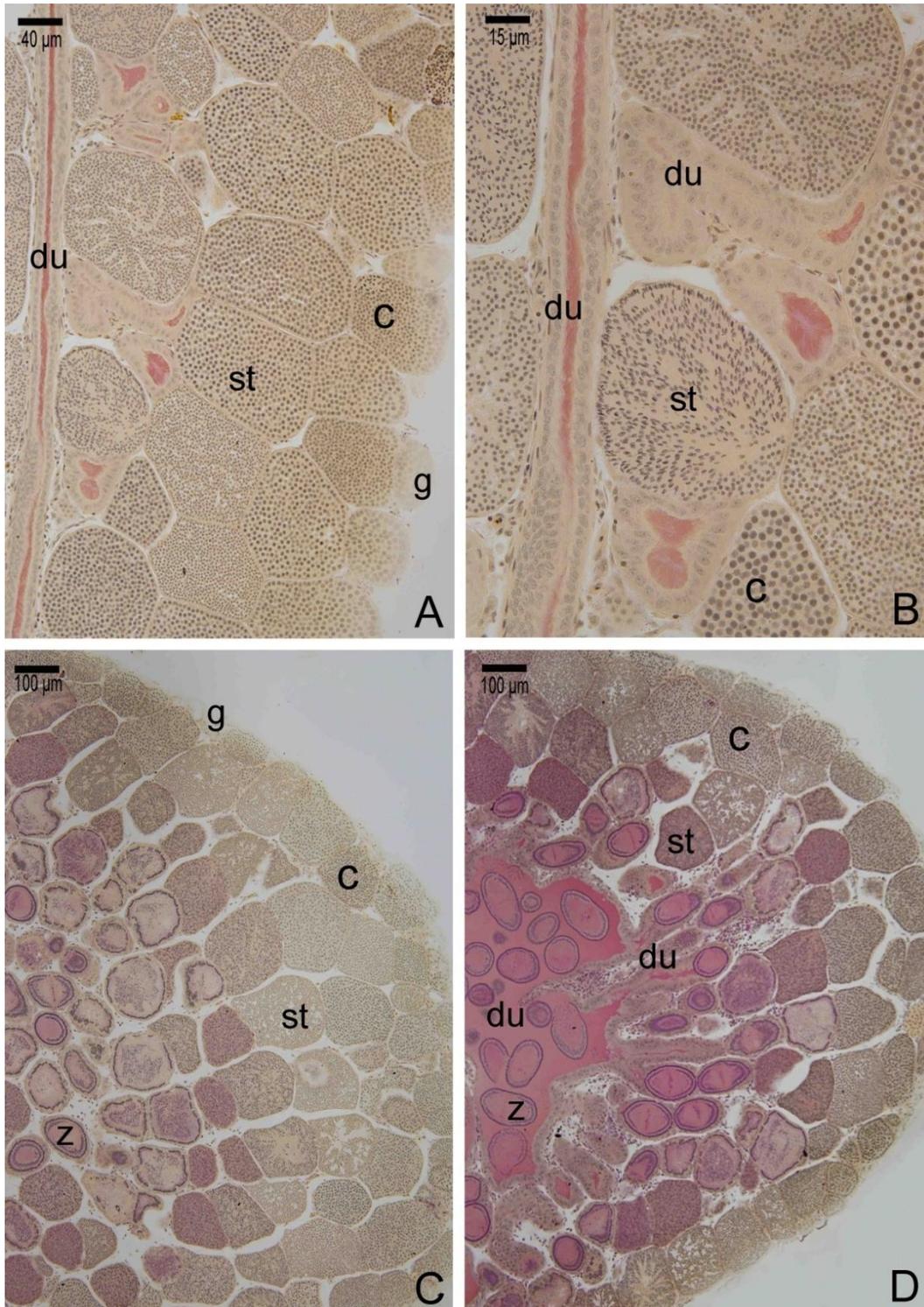


Figura 77: Corte histológico longitudinal de testículo de *Poecilia reticulata*. A) Corte histológico longitudinal da gônada masculina, mostrando uma região periférica formada por cistos de células germinativas, e uma região central, na qual se localizam os espermatozéugmatas. Notar a ausência de lúmen no interior do testículo. B) Corte histológico longitudinal do testículo mostrando a estrutura testicular na qual o epitélio germinativo organiza-se em lóbulos com distribuição restrita de espermatogônias. Ao longo do lóbulo, os cistos desenvolvem-se em direção à porção distal do lóbulo, sendo que as espermatogônias localizam-se somente na região periférica do testículo. C) Cisto de espermatogônias em metáfase. D-E) Cistos de espermatogônias, delimitadas por células de Sertoli. F) Cisto de espermatócitos, delimitado por células de Sertoli pavimentosas. G) Cisto de espermátides. Notar a presença de flagelos. H) Cisto de espermatozóides já organizados em espermatozéugmata. As células de Sertoli deixam de ser pavimentosas e tornam-se cúbicas. I) Região do ducto testicular. No interior do ducto, nota-se a presença de espermatozéugmatas imersos em uma secreção PAS positiva. *Legenda:* g: espermatogônia, c: espermatócitos, st: espermátides, z: espermatozóides, seta: célula de Sertoli, zt: espermatozéugmata, du: ducto testicular. *Coloração:* Amarelo Metanil.

Figura 77

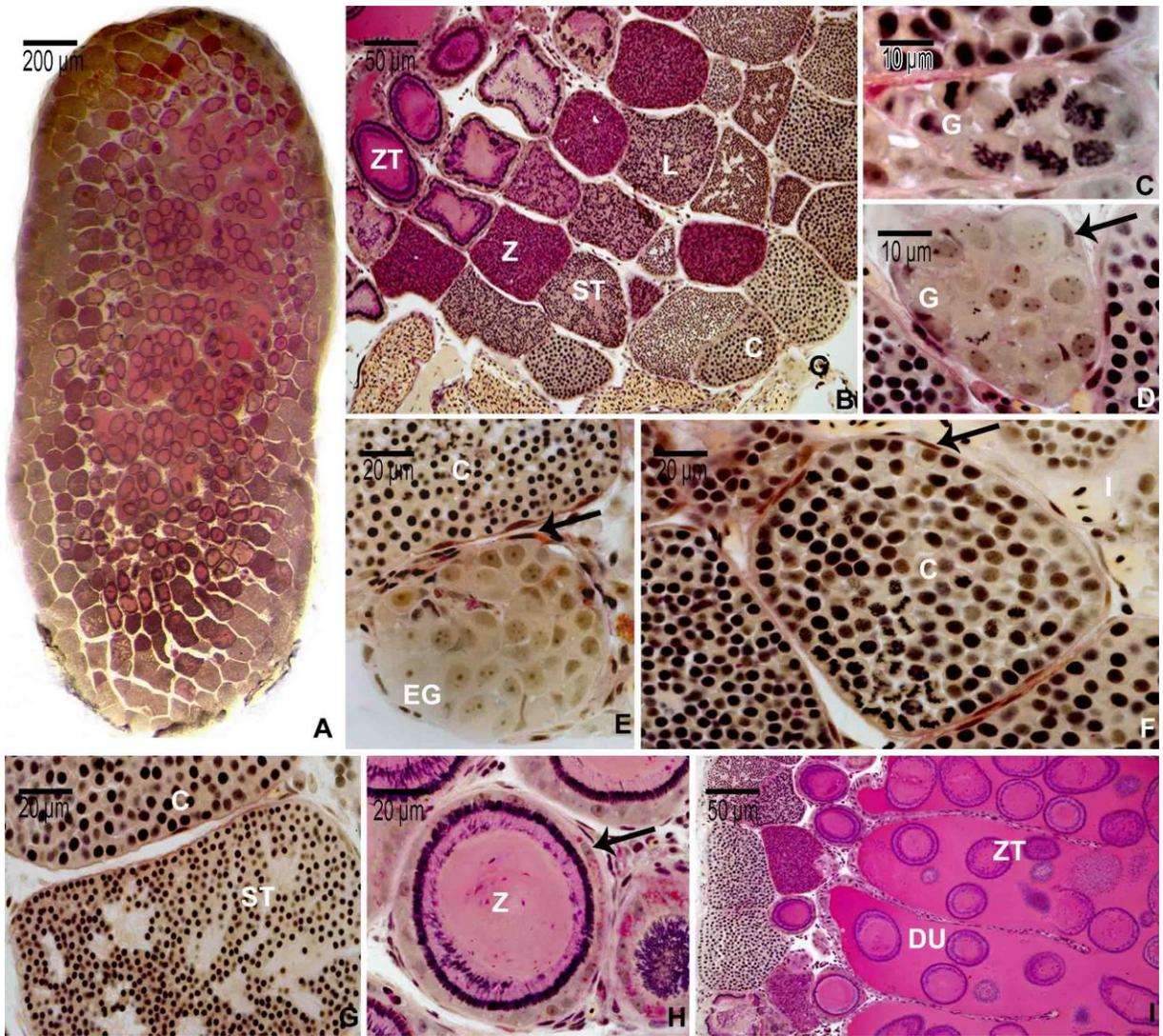


Figura 78: Corte histológico longitudinal de testículo de *Poecilia reticulata* – Método de Reticulina. A membrana basal é detectada ao redor das células somáticas, na região dorsal do testículo, que dará origem ao ducto testicular e ao redor de cada ácino e nunca no seu interior, esboçando desde muito cedo um lóbulo testicular (A-G). O padrão se mantém e a membrana basal é detectada somente ao redor de cada lóbulo e nunca entre cistos de um mesmo lóbulo (H-N). A membrana basal do ducto testicular é contínua à membrana basal do lóbulos testiculares (O-Q). Notar ausência de membrana basal em cistos de um mesmo lóbulo (J,K).
Legenda: seta: membrana basal, g: espermatogônia, cs: célula somática, du: ducto testicular, lo: lóbulo testicular, S: célula de Sertoli, ci: cisto, cabeça de seta: região entre dois cistos de um mesmo lóbulo desprovida de membrana basal.

Figura 78

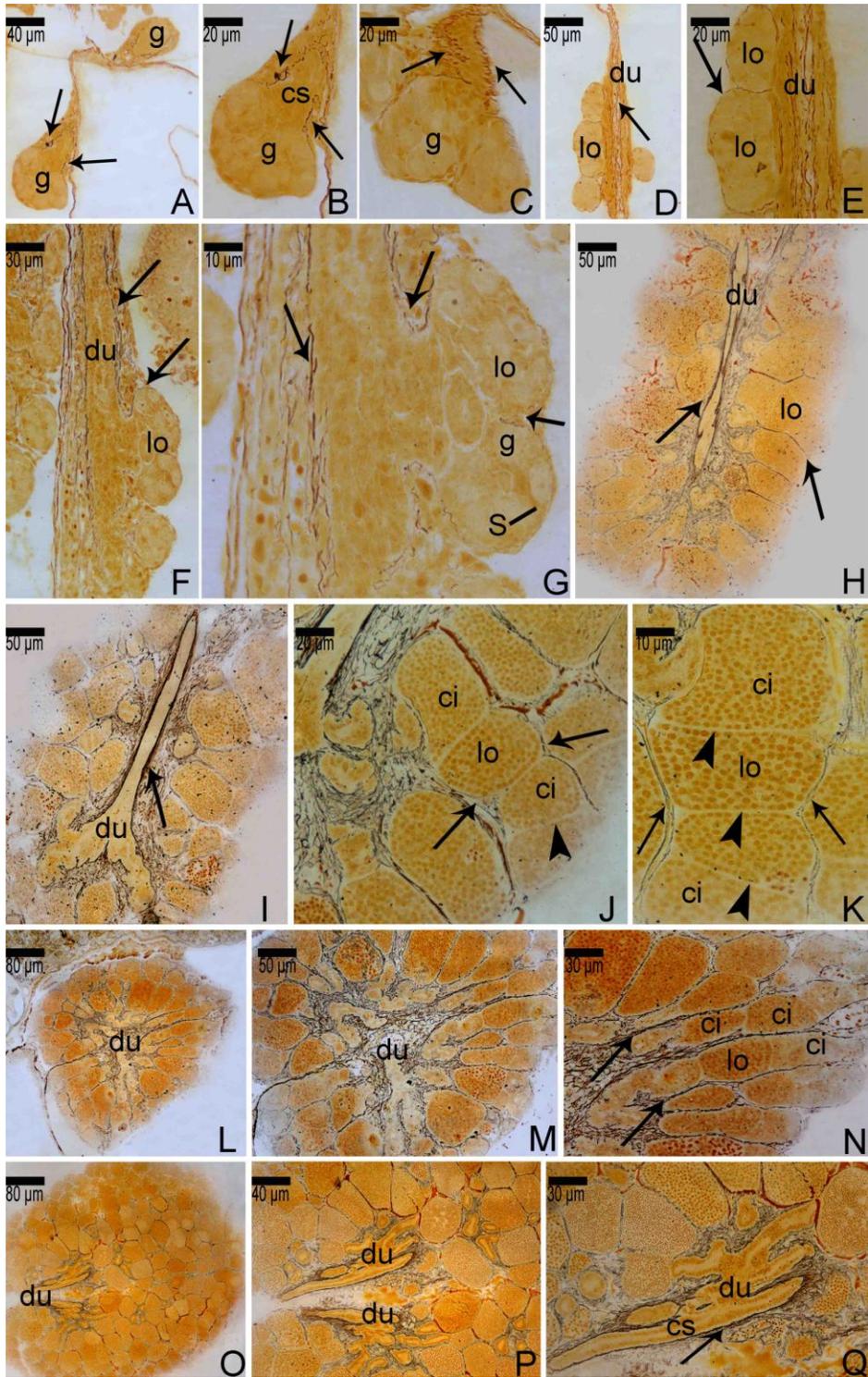


Figura 79: Corte histológico longitudinal de testículo de *Poecilia reticulata* – Método de Reticulina. A) Corte histológico longitudinal da gônada masculina. B) Corte histológico longitudinal do testículo mostrando a estrutura testicular na qual o epitélio germinativo organiza-se em lóbulos. Notar a descontinuidade da membrana basal na região de confluência do ducto testicular. A membrana basal é detectada somente ao redor de cada lóbulo e nunca entre cistos de um mesmo lóbulo (C-F), a despeito das células de Sertoli estarem delimitando um cisto (E,F,H,I). A membrana basal do ducto testicular é contínua à membrana basal do lóbulos testiculares (G). *Legenda:* seta: membrana basal, du: ducto testicular, lo: lóbulo testicular, S: célula de Sertoli, ci: cisto, cabeça de seta: região entre dois cistos de um mesmo lóbulo desprovida de membrana basal.

Figura 79

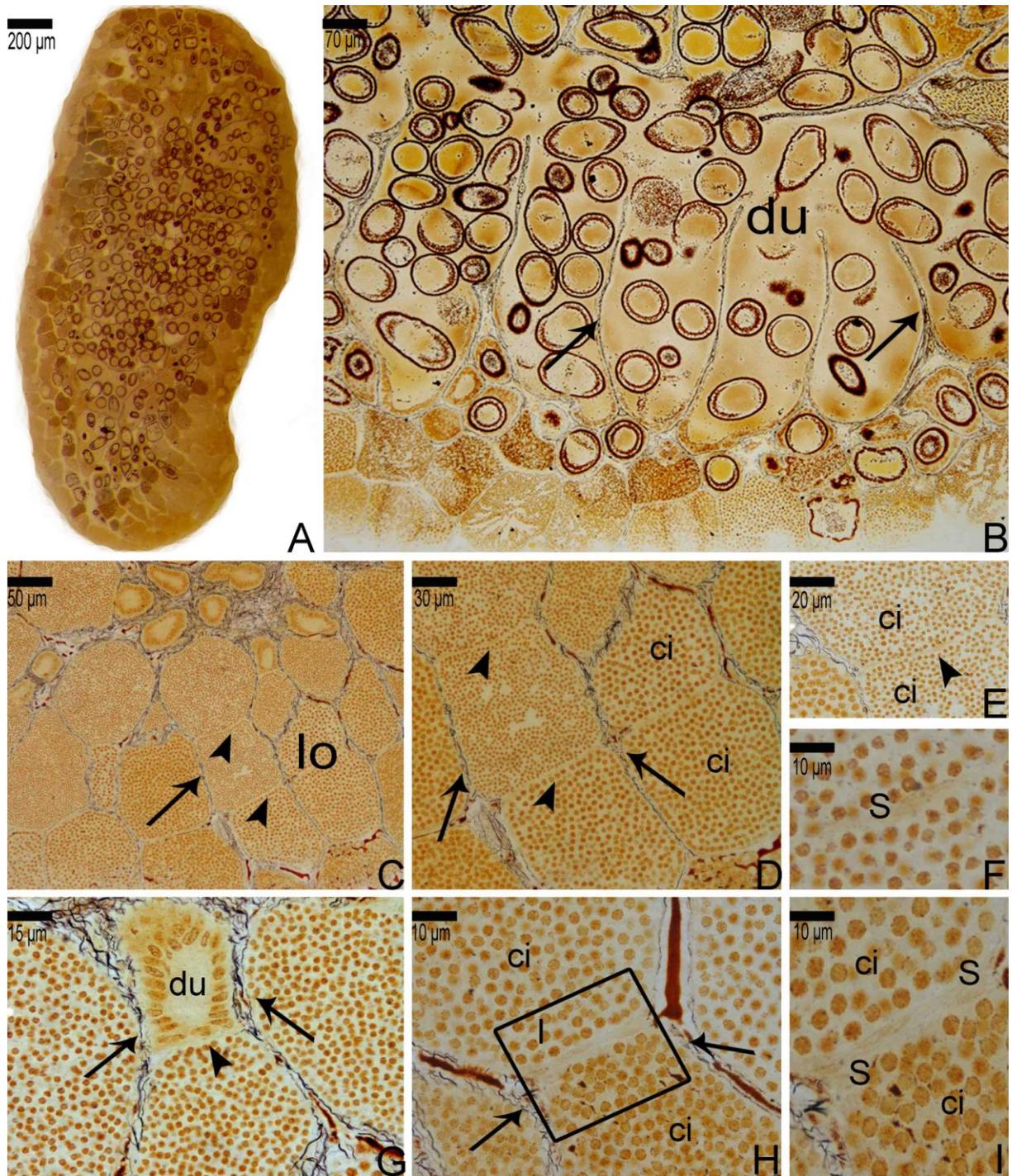


Figura 80: Micrografia Eletrônica de Transmissão de testículo de *Poecilia reticulata*. Região entre dois cistos contíguos dentro de um mesmo lóbulo testicular, demonstrando ausência de membrana basal nesta região (A-D). Membrana basal detectada na periferia do lóbulo testicular, contornando-o. A célula de Sertoli mantém-se apoiada sobre a membrana basal (B). Entre um cisto e outro, as células de Sertoli estão unidas fortemente por inúmeros desmossomos (D). *Legenda:* seta: membrana basal, S: célula de Sertoli, ci: cisto, d: desmossomos, n: núcleo.

Figura 80

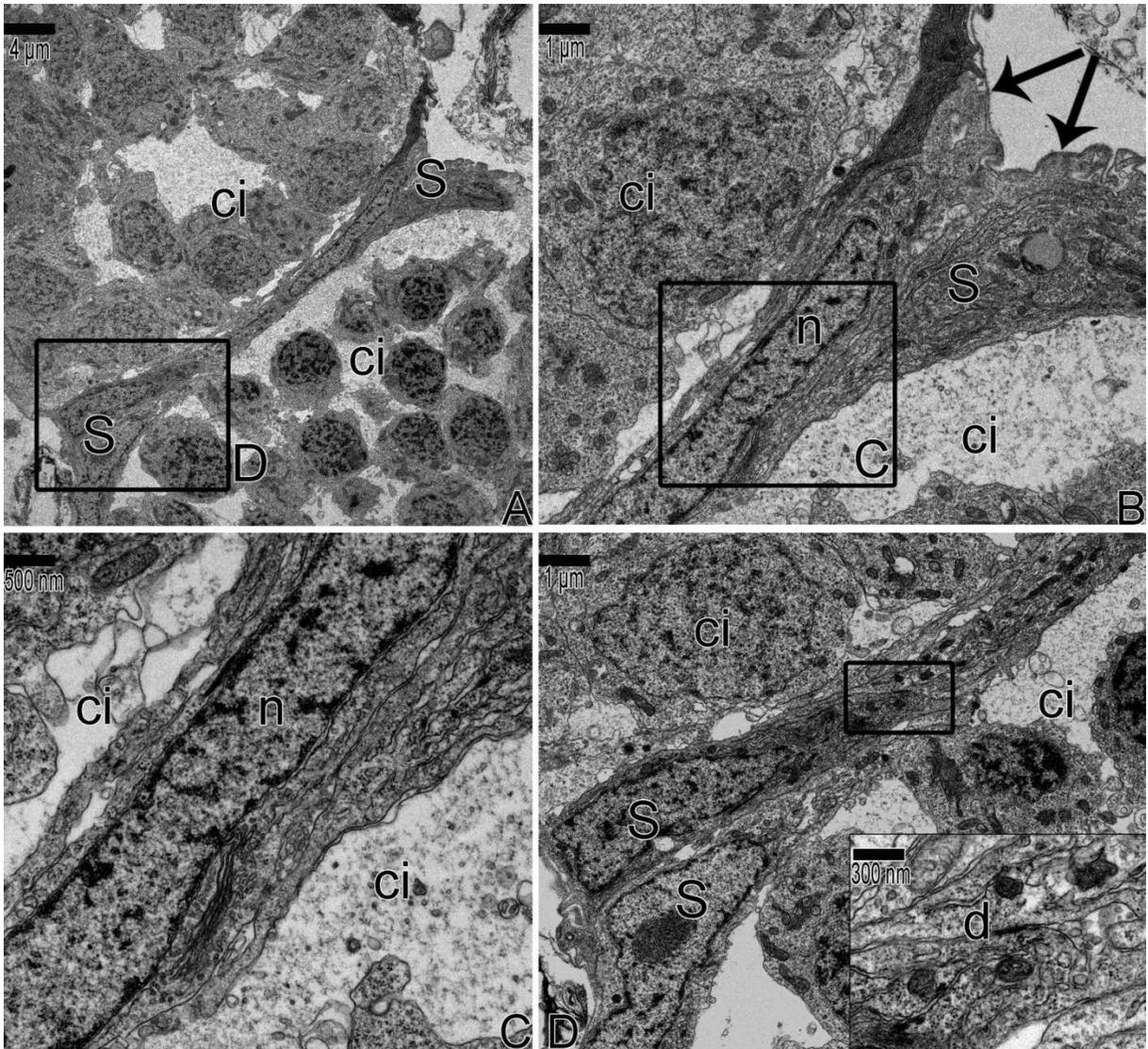


Figura 81: Imunohistoquímica para detecção de proteína Vasa (A-D), PCNA (E-H) e enzima 3 β -HSD (I-N) em testículos de *Tanichthys albonubes*. Notar que a marcação para Vasa ocorre em todas as células germinativas, exceto no espermatozóide (A-D). I) Gônada indiferenciada com resposta negativa para 3 β -HSD (I). Notar que a detecção para 3 β -HSD inicia-se durante a formação dos primeiros túbulos testiculares, em células intersticiais (J), as quais aumentam a intensidade de resposta conforme a espermatogênese progride e o testículo desenvolve-se (K-N). *Legenda:* seta: indicação de marcações positivas, g: espermatogônia, ep, eg: epitélio germinativo, s: célula somática, c: espermatócito, z: espermatozóide, pS: célula pré-Sertoli S: célula de Sertoli. *Contra-coloração:* Hematoxilina de Harris.

Figura 81

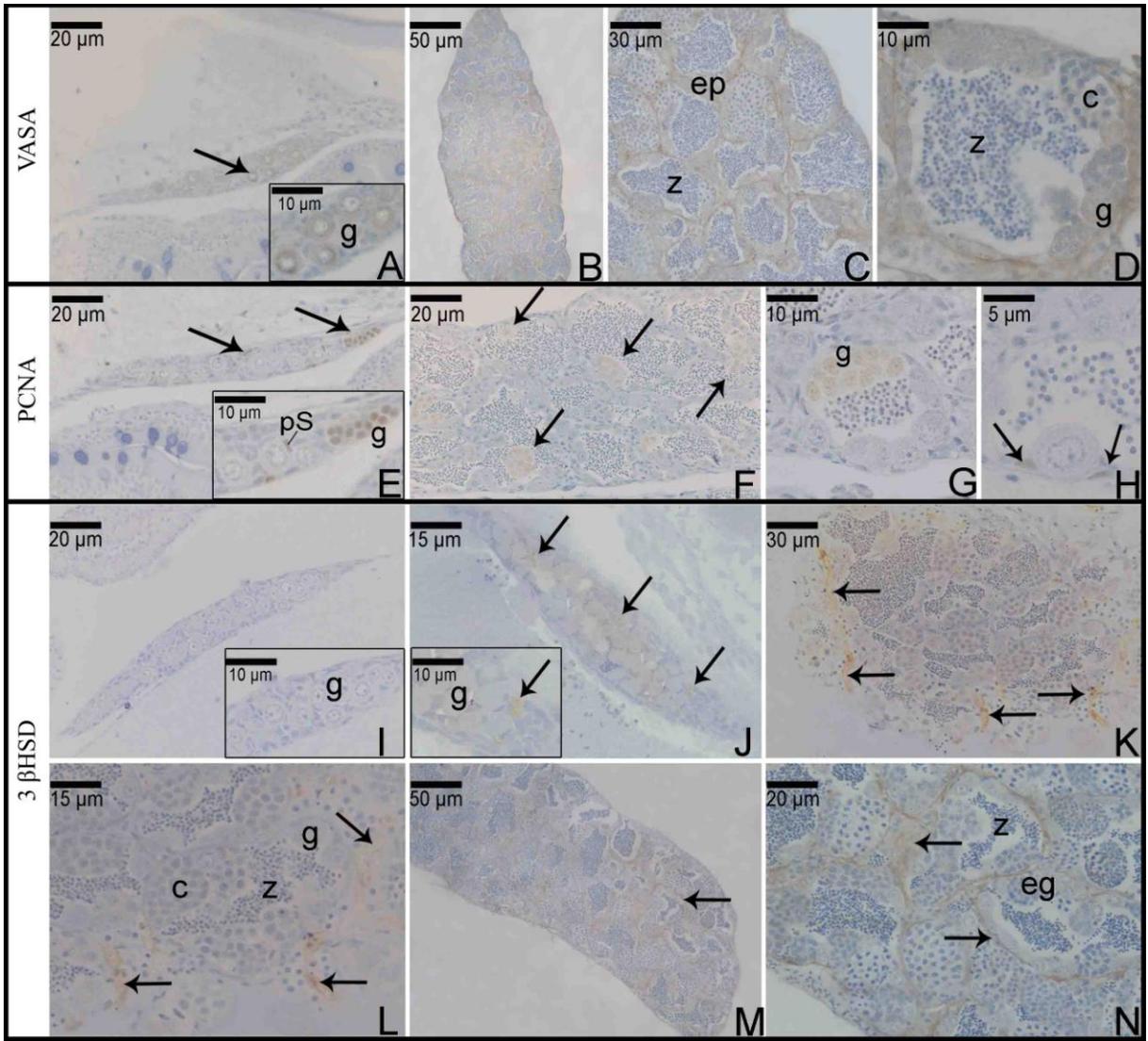


Figura 82: Imunohistoquímica para detecção de proteína Vasa (A-C), PCNA (D-M) e enzima 3β -HSD (N-P) em testículos de *Amatitlania nigrofasciata*. Notar que a marcação para Vasa ocorre em todas as células germinativas, exceto no espermatozóide (A-D). Os ácinos de espermatogônias na periferia gonadal respondem intensamente à detecção (B,C). D-M) Detecção para PCNA: Intensa proliferação celular das células somáticas na região correspondente ao ducto (D,E). Proliferação das espermatogônias, localizadas na região periférica da gônada (F). Notar a intensa proliferação das espermatogônias, localizadas na região periférica da gônada, formando ácinos (K). Proliferação das células de Sertoli (L,M). N) Gônada indiferenciada com resposta negativa para 3β -HSD. Notar que a detecção para 3β -HSD inicia-se durante a formação dos primeiros lóbulos testiculares, em células intersticiais (O), as quais aumentam a intensidade de resposta conforme a espermatogênese progride e o testículo desenvolve-se (P). Célula de Leydig (P-inset). *Legenda:* RD: região dorsal, RV: região ventral, ps: célula pré-Sertoli, seta: indicação de marcações positivas, g: espermatogônia, s: célula somática, c: espermatócito, e: espermátide, z: espermatozóide, S: célula de Sertoli, du: ducto testicular, ci: espermatocisto, vs: vaso sanguíneo. *Contra-coloração:* Hematoxilina de Harris.

Figura 82

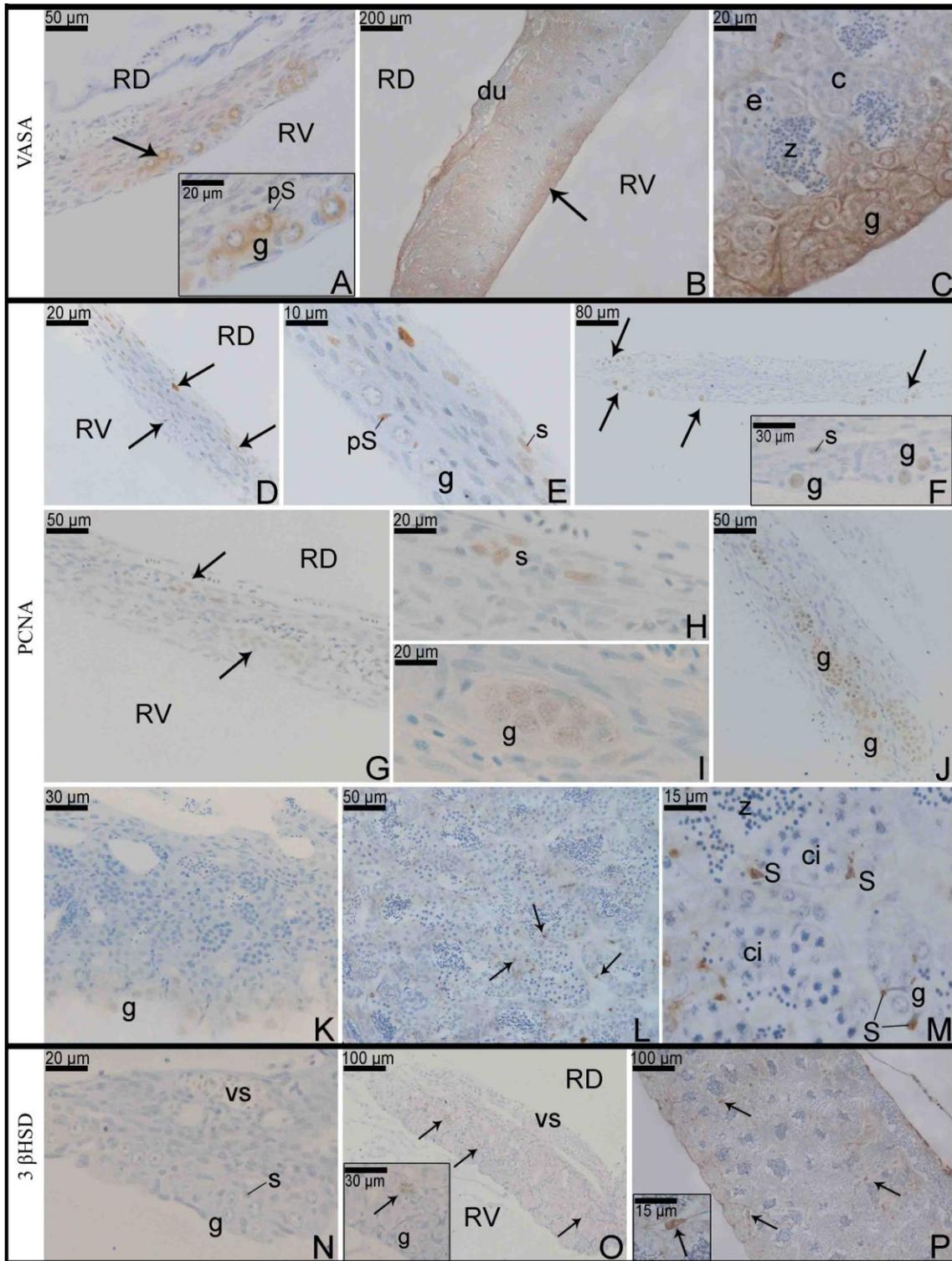


Figura 83: Imunohistoquímica para detecção de proteína Vasa (A-D), PCNA (E-L) e enzima 3β -HSD (M-P) em testículos de *Poecilia reticulata*. Notar que a marcação para Vasa ocorre em todas as células germinativas (A-D), exceto no espermatozóide. Os ácinos de espermatogônias na periferia gonadal respondem intensamente à detecção (B,C). E-L) Detecção para PCNA: Intensa proliferação celular das células somáticas na região correspondente ao ducto (E). Proliferação das espermatogônias, localizadas na região periférica da gônada (F,G). Notar a proliferação das espermatogônias, localizadas na região periférica da gônada (J,K). Proliferação das células de Sertoli (H,L). M-N) A detecção para 3β -HSD inicia-se durante a formação dos primeiros lóbulos testiculares, em células intersticiais (N), e permanecem com a mesma intensidade de resposta conforme o testículo desenvolve-se (O,P). *Legenda:* seta: indicação de marcações positivas, g: espermatogônia, s: célula somática, c: espermatócito, e: espermátide, S: célula de Sertoli, du: ducto testicular, ló: lóbulo testicular. *Contra-coloração:* Hematoxilina de Harris.

Figura 83

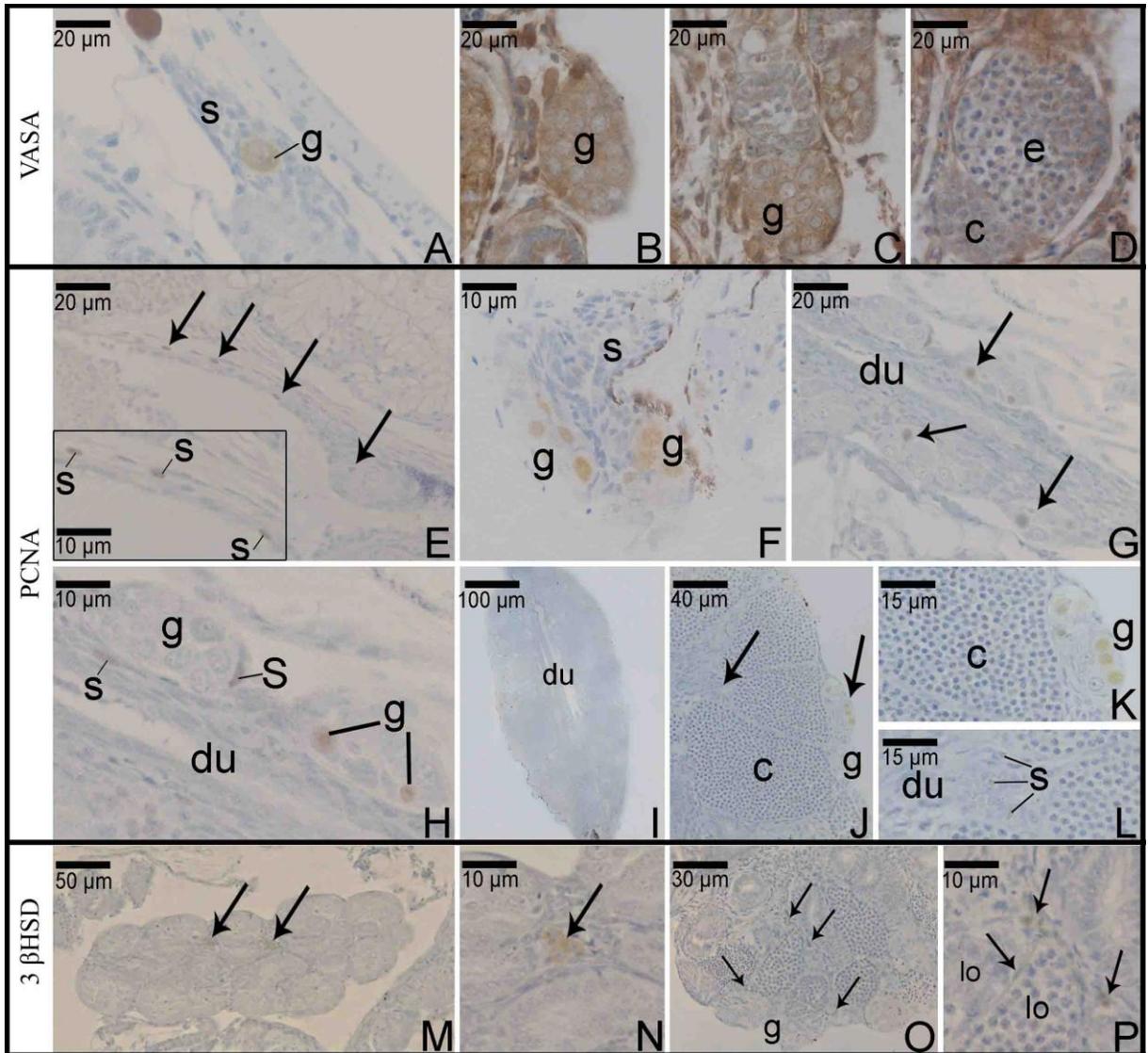


Figura 84: Imunohistoquímica para detecção de PCNA em ovários de *Tanichthys albonubes* (A-I), *Amatitlania nigrofasciata* (J-O) e *Poecilia reticulata* (P-W). Proliferação de oogônias (A,F-I; K-N; P,Q,S,T,U) e de células somáticas – foliculares (B-G,I; J,N,O; P,R,V,W,W-inset). *Legenda:* seta: indicação de marcações positivas, g: oogônia, s: células somáticas, pf: célula pré-folicular, o: oócito, f: célula folicular, ep: epitélio. *Contra-coloração:* Hematoxilina de Harris.

Figura 84

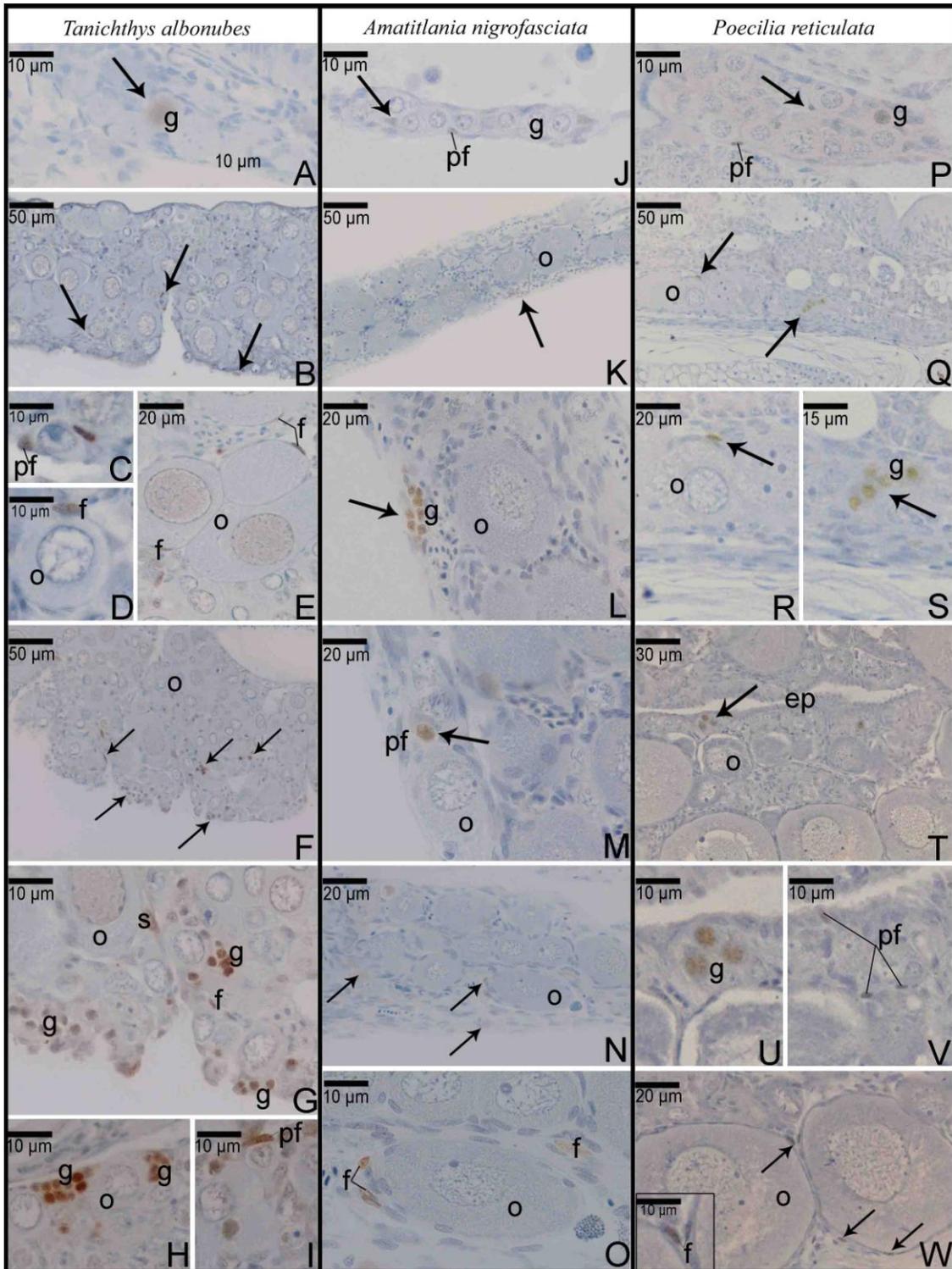


Figura 85: Imunohistoquímica para detecção de proteína Vasa e enzima aromatase Cyp19a1a em ovários de *Tanichthys albonubes* (A-F), *Amatitlania nigrofasciata* (G-J) e *Poecilia reticulata* (K-P). Detecção de Vasa é positiva nas células germinativas das três espécies (A,G,K). B-F) Em *Tanichthys albonubes*, os oócitos diplotênicos iniciais apresentam intensa marcação para Cyp19a1a (B). A detecção passa a ser mais intensa em células intersticiais e foliculares, após a diferenciação gonadal (C-F). Em *Amatitlania nigrofasciata*, a gônada indiferenciada supostamente feminina apresenta intensa marcação para detecção de Cyp19a1a (H). Os oócitos diplotênicos iniciais também apresentam resposta (I), a qual passa a ser mais intensa nas células intersticiais, após diferenciação gonadal (J). Em *Poecilia reticulata* a marcação é mais intensa nas células intersticiais, no início da diferenciação gonadal (L). Após a diferenciação, houve marcação em células abaixo do epitélio germinativo (M,N), bem como em oócitos e células foliculares (O) e em células da teca (seta) (P). *Legenda:* seta: indicação de marcações positivas, g: oogônia, s: células somáticas, pf: célula pré-folicular, o: oócito, f: célula folicular, eg: epitélio germinativo, lu: lúmen ovariano. *Contra-coloração:* Hematoxilina de Harris.

Figura 85

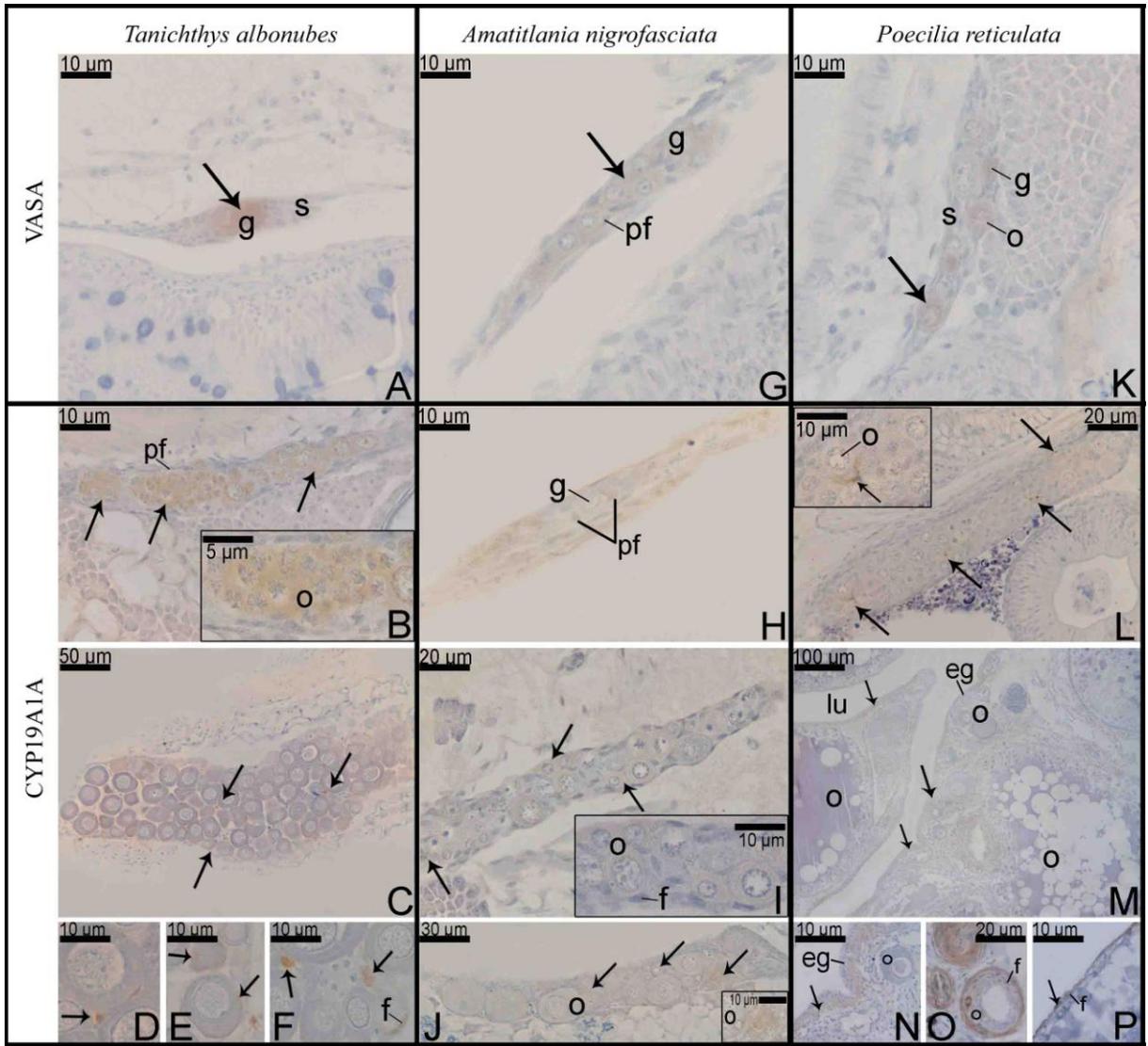


Figura 86: Cortes histológicos de testículos de *Tanichthys albonubes* (A-C), *Gymnocorymbus ternetzi* (D-F), *Corydoras schwartzi* (G-I), *Amatitlania nigrofasciata* (J-L) e *Poecilia reticulata* (M-O) 24 horas após extrusão, durante a reprodução. Notar a disposição das espermatogônias ao longo dos túbulos e lóbulos testiculares de cada espécie. *Legenda:* seta: interstício, z: espermatozóide, g: espermatogônia, t: espermátide, du: ducto testicular, c: espermatócito. *Coloração:* Amarelo Metanil.

Figura 86

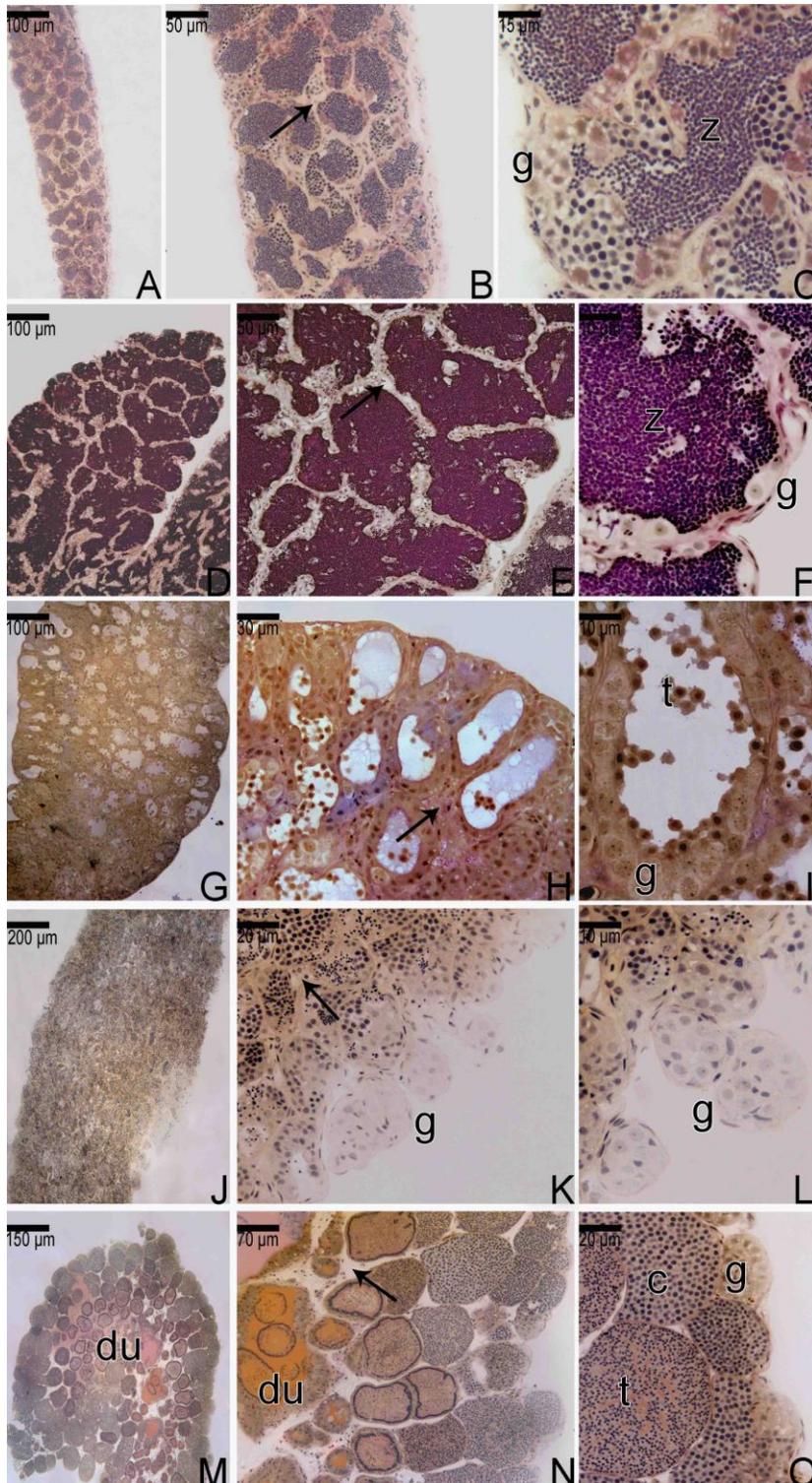


Figura 87: Esquema da formação do epitélio germinativo durante a diferenciação gonadal em *Tanichthys albonubes*, representando os Otophysi. A) Primórdio gonadal. B-C) Gônada indiferenciada, com formação de cordões contínuos de células germinativas primordiais (C). D-F) Diferenciação testicular. Notar a formação de estruturas acinares ao longo do tecido gonadal (D). E) Dois ácinos adjacentes com uma pequena luz central em cada um deles, sendo envolvidos por uma única membrana basal. F) Formação dos primeiros túbulos testiculares, a partir da fusão de dois ácinos adjacentes, envoltos pela membrana basal. Está estabelecido o epitélio germinativo (F, F-inset), composto por espermatogônias em cisto, apoiados sobre uma membrana basal. G) Início da espermatogênese. G-inset) Detalhes sobre o compartimento germinativo, mostrando cistos de diferentes células da linhagem germinativa e início da produção de espermatozóides. H) Estrutura testicular totalmente diferenciada e idêntica ao testículo adulto, que passa agora a apresentar ciclos reprodutivos. H-inset) Detalhes do compartimento germinativo e compartimento intersticial, ambos separados por uma membrana basal. *Legenda:* CGP: célula germinativa primordial, s: célula somática, MB: membrana basal, i: interstício, ce: células epiteliais, cc: cordões contínuos de CGPs, ac: ácinos, pS: célula pré-Sertoli, g: espermatogônia, tu: túbulo testicular, lu: lúmen testicular, S: célula de Sertoli, ta: túbulos anastomosados, c: espermatócito, t: espermátide, z: espermatozóide, ci: compartimento intersticial, Le: célula de Leydig, vs: vaso sanguíneo, m: metáfase, du: ducto testicular.

Figura 87

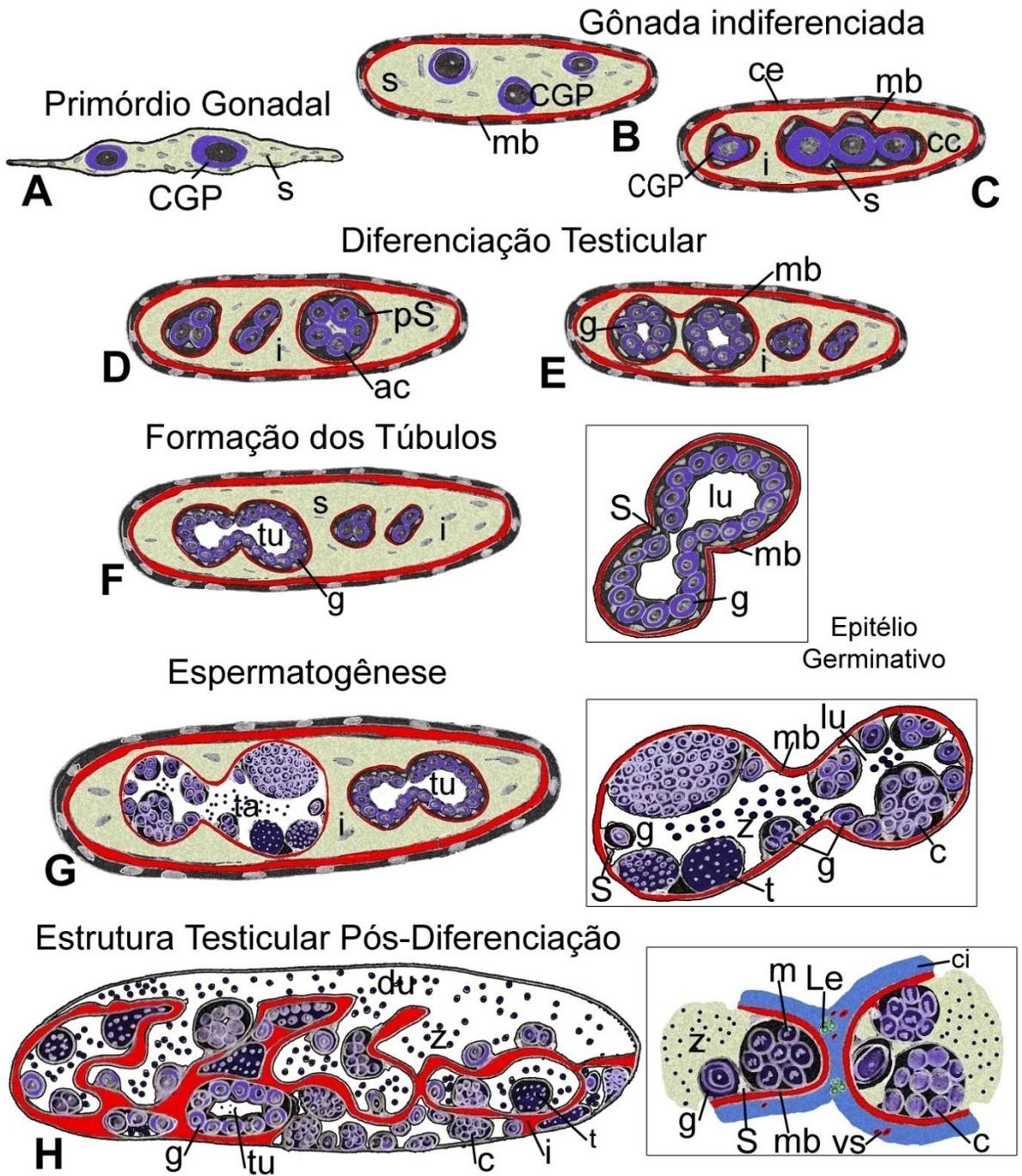


Figura 88: Esquema da formação do epitélio germinativo durante a diferenciação gonadal em *Amatitlania nigrofasciata*, representando os Percomorpha. A) Primórdio gonadal. B) Gônada indiferenciada, com células germinativas primordiais localizadas na região ventral da gônada. C) Gônada em diferenciação, com formação de cordões contínuos de células germinativas primordiais na região ventral. Notar a formação do ducto testicular, a partir da reorganização de células somáticas na região dorsal da gônada. D) Reorganização das espermatogônias em estruturas acinares, localizadas na região ventral da gônada. Notar a formação da membrana basal ao redor de cada ácino. E-F) Formação dos lóbulos testiculares. E) Alongamento das estruturas acinares, envoltas por membrana basal, que acabam por se conectar ao ducto testicular. Está definido o epitélio germinativo (E-inset), composto por espermatogônias em cisto, apoiados sobre uma membrana basal. F) Finalização do processo de formação dos lóbulos testiculares, com lúmen testicular totalmente definido, conectados ao ducto testicular. G) Início da espermatogênese em estrutura testicular totalmente diferenciada e idêntica ao testículo adulto, que passa agora a apresentar ciclos reprodutivos. G-inset) Lóbulos testiculares, mostrando detalhes do compartimento germinativo e compartimento intersticial, ambos separados por uma membrana basal. Notar os cistos de diferentes células da linhagem germinativa, início da produção de espermatozóides e distribuição aleatória de espermatogônias. Notar a aglomeração de espermatogônias na porção distal dos lóbulos, formando ácidos. *Legenda:* CGP: célula germinativa primordial, s: célula somática, MB: membrana basal, i: interstício, cc: cordões contínuos de CGPs, ac: ácidos, pS: célula pré-Sertoli, g: espermatogônia, ló: lóbulos testiculares, lu: lúmen testicular, S: célula de Sertoli, c: espermatócito, t: espermátide, z: espermatozóide, ci: compartimento intersticial, Le: célula de Leydig, vs: vaso sanguíneo, du: ducto testicular.

Figura 88

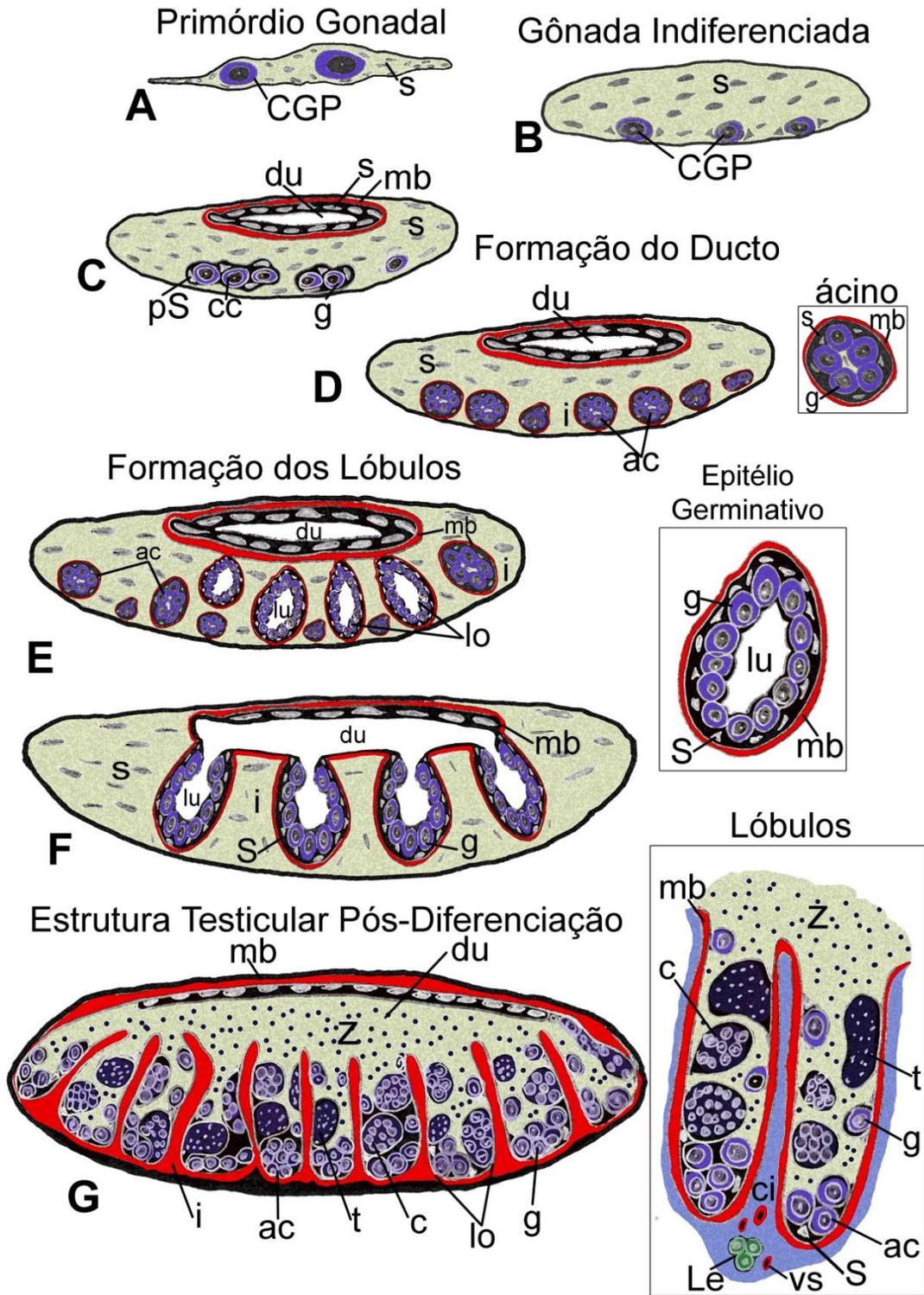


Figura 89: Esquema da formação do epitélio germinativo durante a diferenciação gonadal em *Poecilia reticulata*, representando os Atherinomorpha. A) Primórdio gonadal. B) Gônada indiferenciada, com células germinativas primordiais localizadas na região ventral da gônada. C) Gônada em diferenciação, com formação de estruturas acinares de células germinativas primordiais na região ventral. Notar a reorganização de células somáticas na região dorsal da gônada para a futura formação do ducto testicular, que já apresentam uma membrana basal em formação. D) Formação do ducto testicular na região dorsal da gônada. Notar a distribuição de ácinos na porção ventral da gônada. Notar o acúmulo de células somáticas sobre cada ácino (seta). A membrana basal contorna todos os ácinos continuamente. E) Formação dos lóbulos testiculares, a partir da reorganização de células somáticas que conectam cada ácino ao ducto testicular, formando os primeiro lóbulos testiculares, compostos apenas por espermatogônias. Notar a individualização de cada lóbulo pela membrana basal, contínua à membrana basal do ducto. Neste estágio, o tecido epitelióide está definido. F) Finalização do processo de formação dos lóbulos testiculares, pelo alongamento dos lóbulos testiculares, resultado da formação de novos cistos em direção ao ducto. Notar a direção centrípeta em que ocorre a espermatogênese no interior dos lóbulos. O lúmen do ducto testicular passa a ser preenchido por uma secreção que envolve os espermatozóides organizados em espermatozeugmata. F-inset) Lóbulos testiculares com organização do tipo restrita, com as espermatogônias localizadas somente na porção distal dos lóbulos. Detalhes do compartimento germinativo e intersticial. Detalhe da espermatozeugmata, mostrando a posição dos espermatozóides no seu interior. *Legenda:* CGP: célula germinativa primordial, s: célula somática, MB: membrana basal, i: interstício, ac: ácinos, pS: célula pré-Sertoli, g: espermatogônia, ló: lóbulos testiculares, lu: lúmen testicular, S: célula de Sertoli, c: espermatócito, t: espermátide, z: espermatozóide, ci: compartimento intersticial, Le: célula de Leydig, vs: vaso sanguíneo, du: ducto testicular, n: núcleo, f: flagelo, ez: espermatozeugmata, m: metáfase.

Figura 89

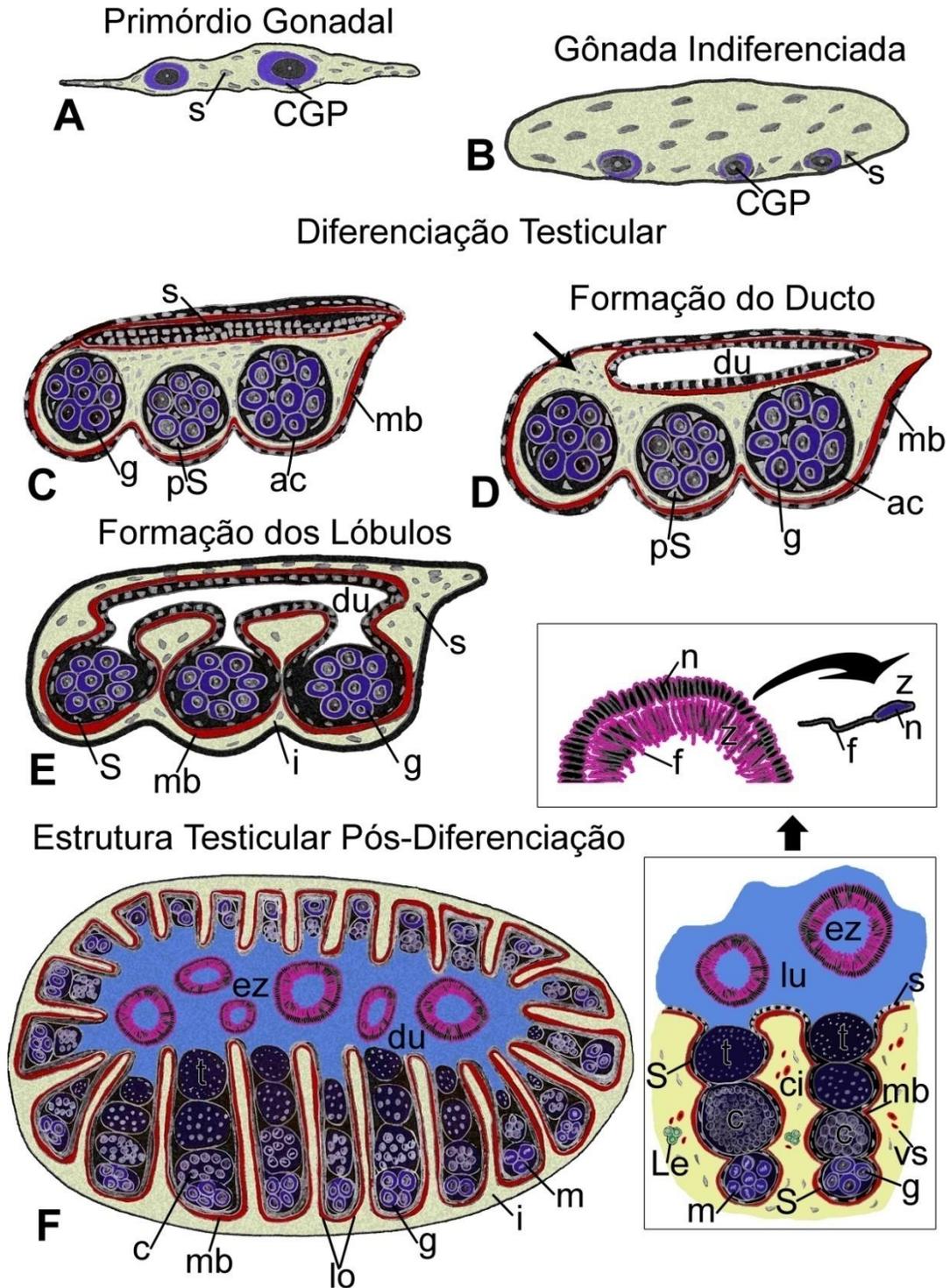


Figura 90

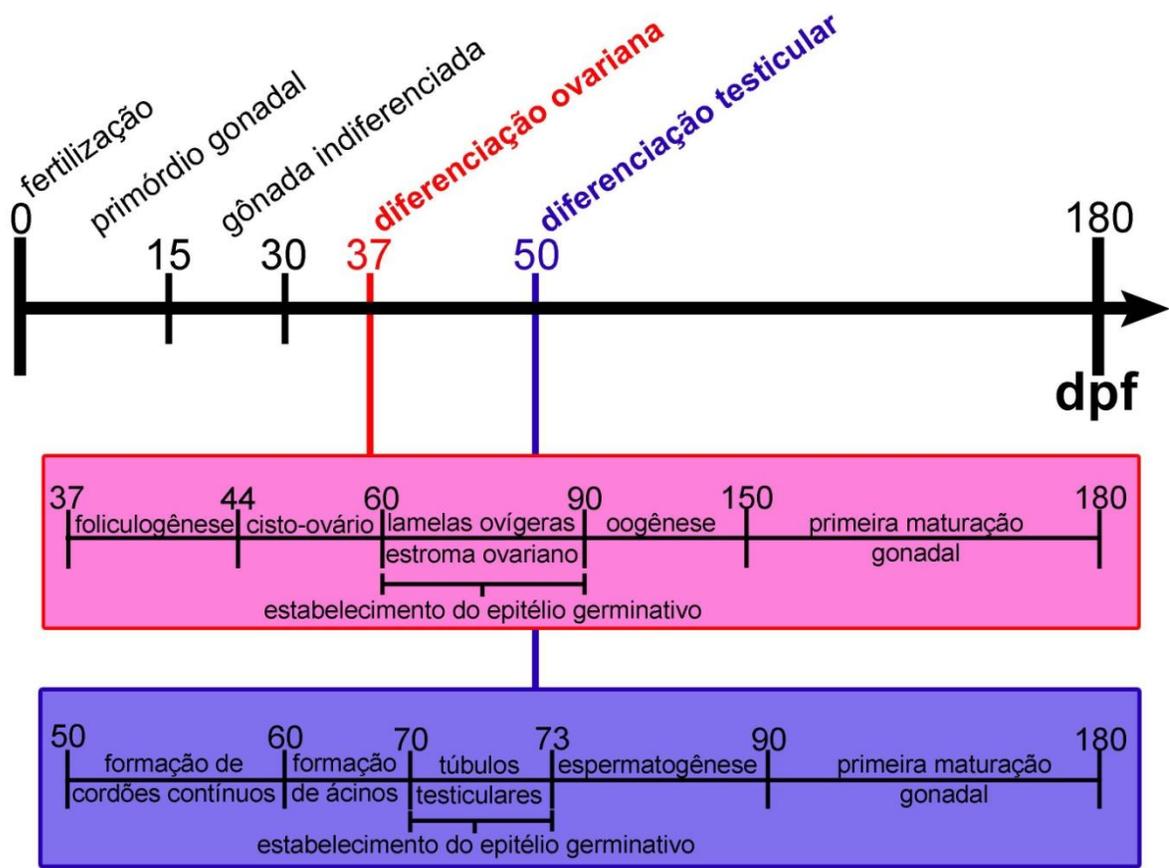


Figura 90: Cronologia da diferenciação gonadal em *Tanichthys albonubes*. Principais eventos da diferenciação gonadal feminina e masculina ao longo do tempo (dias pós-fertilização - dpf), desde o momento da fertilização (0h) até a primeira maturação gonadal.

Figura 91

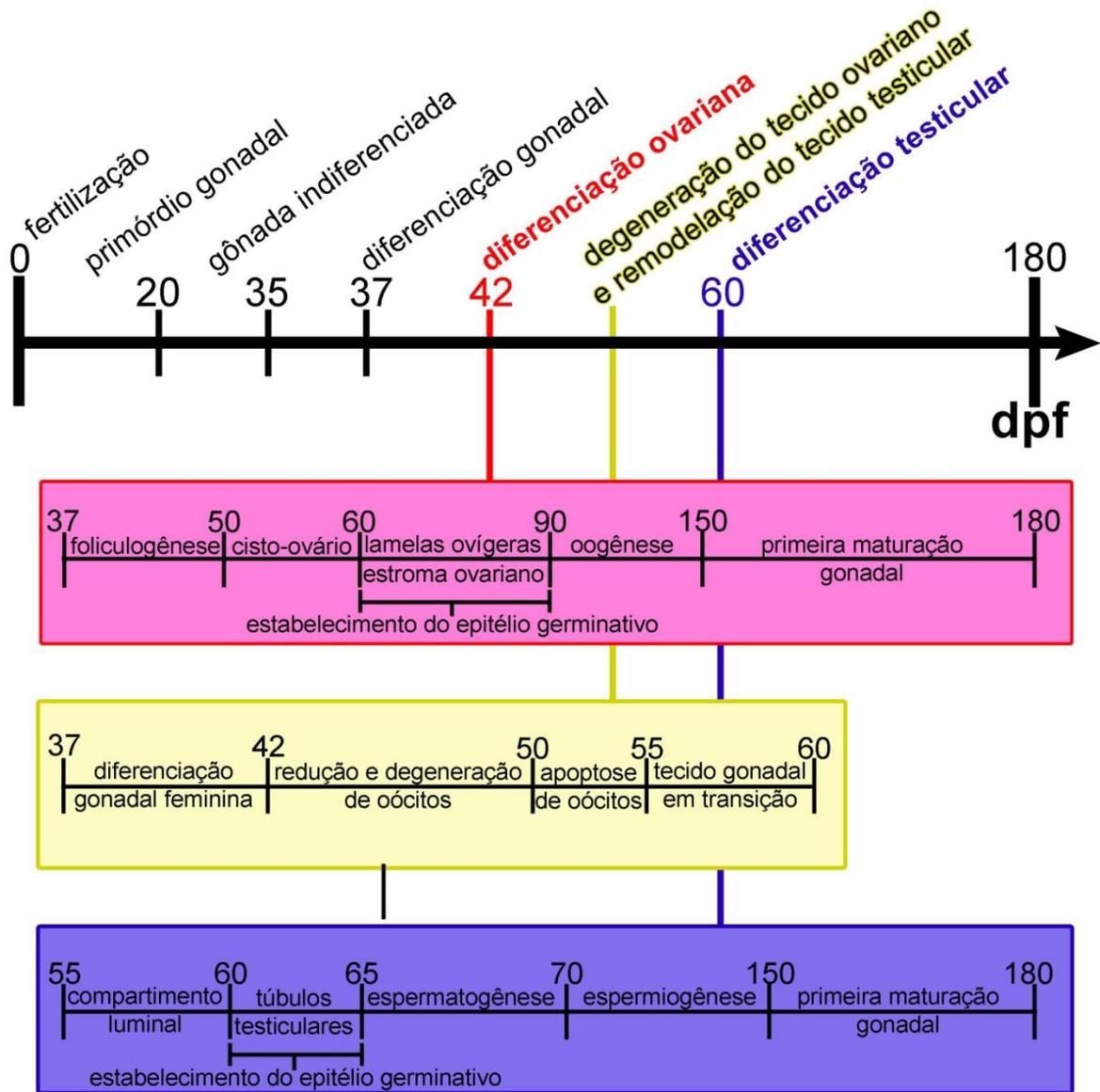


Figura 91: Cronologia da diferenciação gonadal em *Gymnocorymbus ternetzi*. Principais eventos da diferenciação gonadal feminina e masculina ao longo do tempo (dias pós-fertilização - dpf), desde o momento da fertilização (0h) até a primeira maturação gonadal.

Figura 92

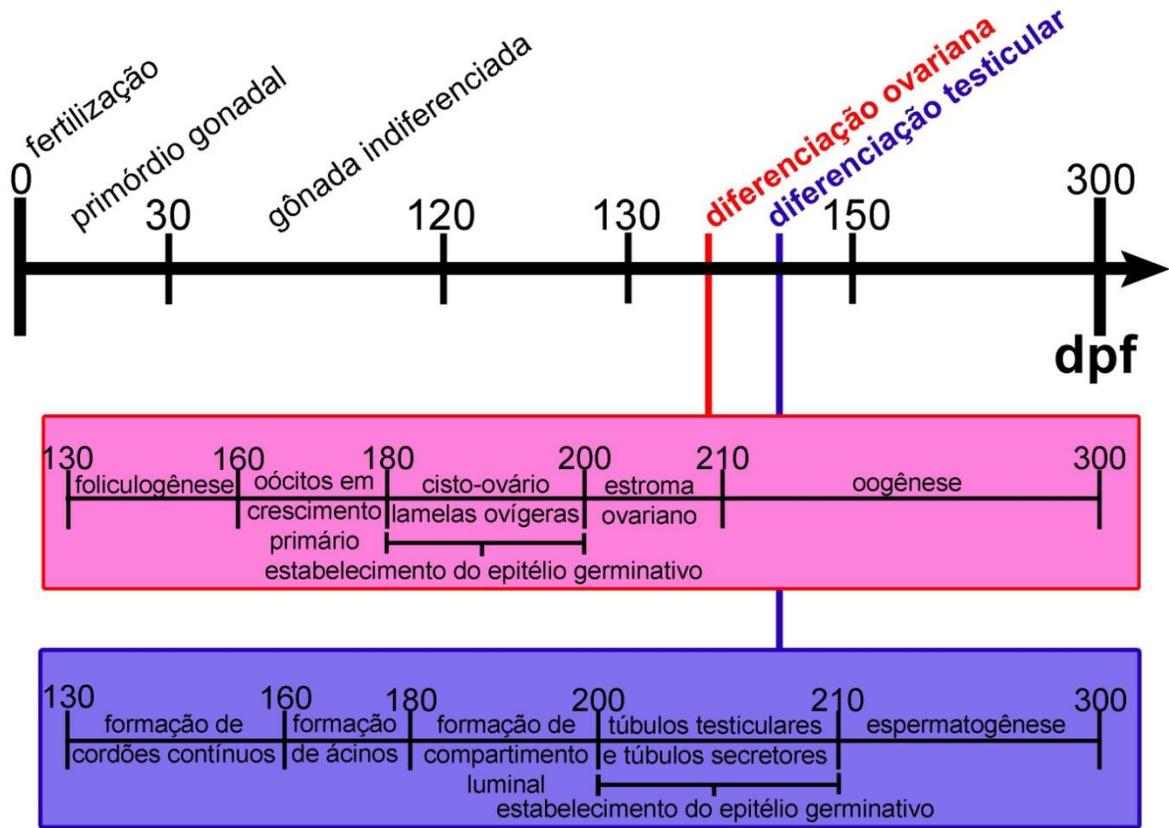


Figura 92: Cronologia da diferenciação gonadal em *Corydoras schurtzi*. Principais eventos da diferenciação gonadal feminina e masculina ao longo do tempo (dias pós-fertilização - dpf), desde o momento da fertilização (0h) até a oogênese e espermatogênese.

Figura 93

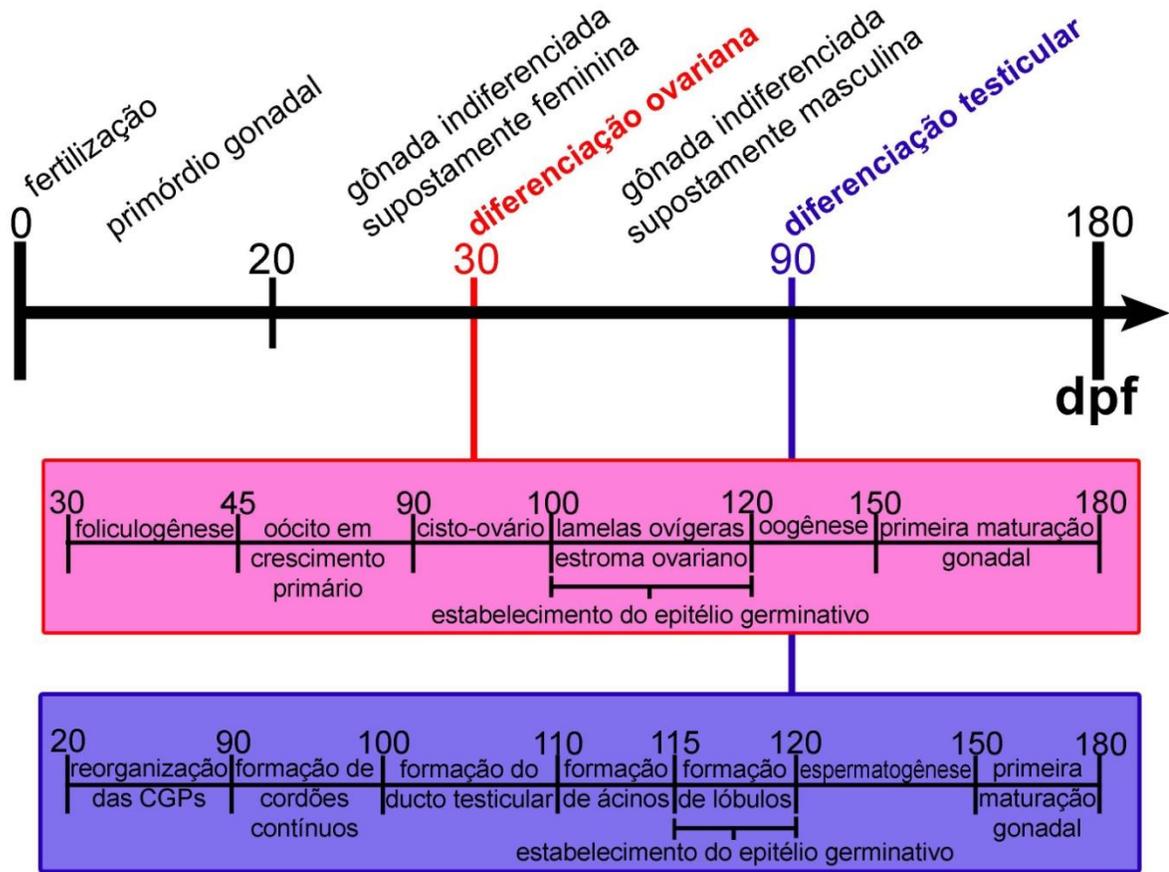


Figura 93: Cronologia da diferenciação gonadal em *Amatitlania nigrofasciata*. Principais eventos da diferenciação gonadal feminina e masculina ao longo do tempo (dias pós-fertilização - dpf), desde o momento da fertilização (0h) até a primeira maturação gonadal.

Figura 94

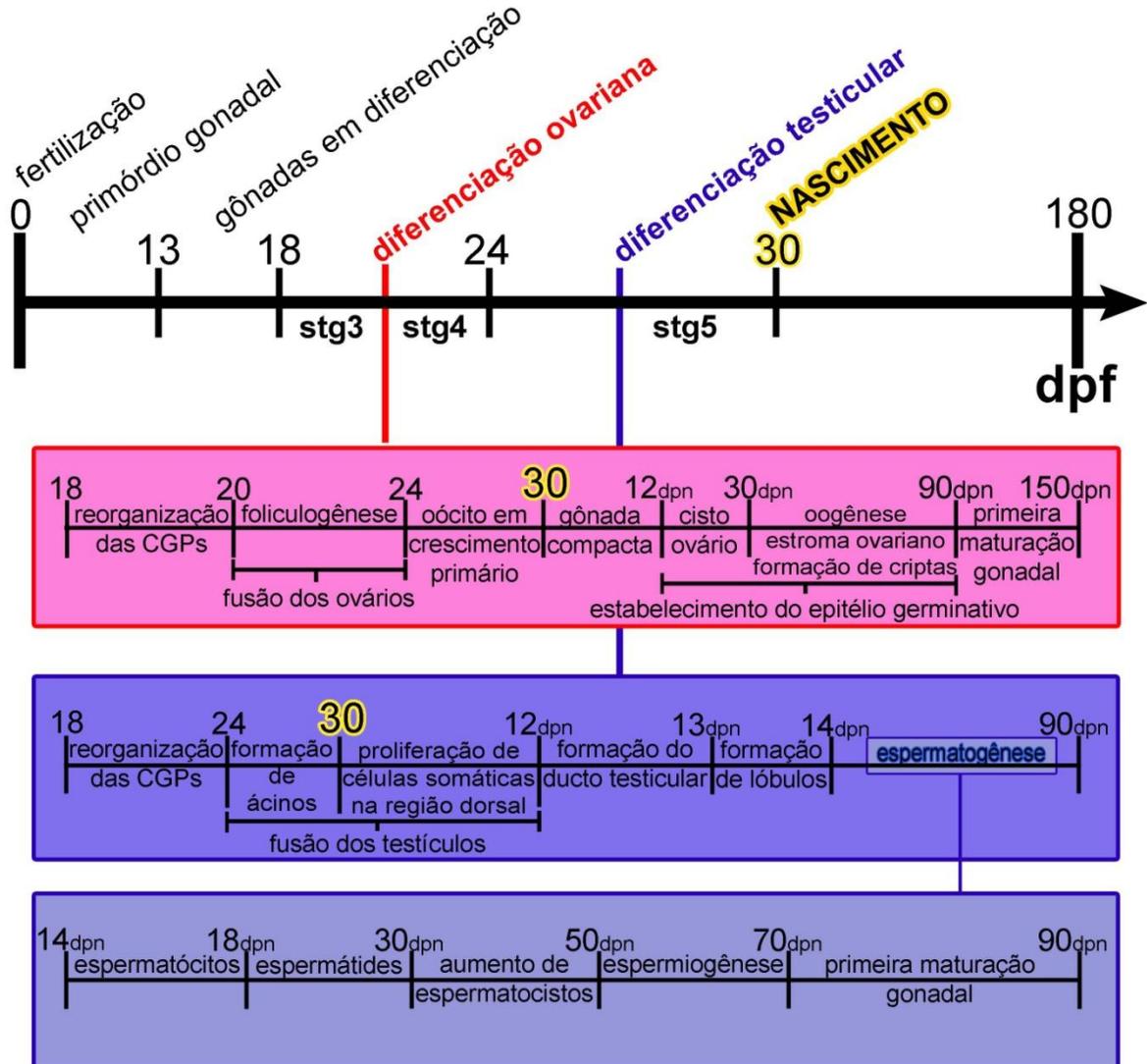


Figura 94: Cronologia da diferenciação gonadal em *Poecilia reticulata*. Principais eventos da diferenciação gonadal feminina e masculina ao longo do tempo (dias pós-fertilização - dpf), desde o momento da fertilização (18dpf) até o nascimento do animal (30dpf), e do nascimento (30dpf) até a primeira maturação gonadal (dias pós-nascimento – dpn). Estágio: stg.

DISCUSSÃO

I. O PRIMÓRDIO GONADAL E A GÔNADA INDIFERENCIADA

Os estudos sobre diferenciação gonadal nos Teleostei até então realizados (Davies e Takashima, 1980; Timmermans e Taverne, 1983; Colombo *et al.*, 1984; Parmentier e Timmermans, 1985; Winkoop *et al.*, 1992; Colombo e Grandi, 1996; Timmermans *et al.*, 1996; Grandi e Colombo, 1997; Meijide *et al.*, 2005, Otani *et al.*, 2005; Çek, 2006; Nakamura *et al.*, 2006; Saito *et al.*, 2007; Nakamura *et al.*, 2008; Pandolfi *et al.*, 2009; Guerrero-Estévez e Moreno-Mendoza, 2010, 2012; Nakamura *et al.*, 2010; Kobayashi *et al.*, 2011) geralmente abordam a origem das células germinativas primordiais e sua associação com as células somáticas na estruturação gonadal, porém não descrevem a formação inicial do epitélio germinativo, seja este feminino ou masculino.

Nas espécies aqui estudadas, representantes de peixes mais basais (*Tanichthys albonubes*, *Gymnocorymbus ternetzi* e *Corydoras schwartzi*) e mais derivados na escala evolutiva (*Amatitlania nigrofasciata* e *Poecilia reticulata*), o primórdio gonadal foi observado nos primeiros dias de vida pós-fertilização de todos os animais. Nestas espécies, os primórdios gonadais apresentam padrões de organização bastante semelhantes entre si e aos demais Teleostei, sendo formados por poucas e grandes células germinativas primordiais e células somáticas (Sato, 1974; Hamaguchi, 1982; Timmermans e Taverne, 1989; Winkoop *et al.*, 1992; Flores e Burns, 1993; Parmentier e Timmermans, 1985; Timmermans *et al.*, 1996; Nakamura *et al.*, 2006; Saito *et al.*, 2007; Nakamura *et al.*, 2008; Guerrero-Estévez e Moreno-Mendoza, 2010, 2012; Mazzoni *et al.* 2010; presente estudo).

Nas cinco espécies aqui analisadas, o primórdio gonadal dispõe-se aos pares, em ambos os lados da bexiga natatória e ventralmente ao rim, inclusive em *Poecilia reticulata*, espécie em que o adulto apresenta uma gônada ímpar, característico dos Poecilídeos (Groove e Wourms, 1994; Potter e Kramer, 2000; Benjamin, 2004).

Nos vivíparos como os Cyprinodontiformes *Poecilia reticulata* (presente estudo) e *Chapalichthys encaustus* (Guerrero-Estévez e Moreno-Mendoza, 2012) ou no Perciformes *Zoarcetes viviparus* também vivíparo (Rasmussen *et al.*, 2006) é comum a formação bilateral de primórdios gonadais que sofrem fusão ao longo do desenvolvimento do tecido gonadal,

formando um único órgão no animal adulto (Nagahama, 1983, Groove e Wourms, 1994; presente estudo).

No período de transição do primórdio gonadal para a gônada indiferenciada, a atividade mitótica das células germinativas primordiais foi detectada com certa frequência nas cinco espécies aqui analisadas *Tanichthys albonubes*, *Gymnocorymbus ternetzi*, *Corydoras schwartzi*, *Amatitlania nigrofasciata* e *Poecilia reticulata*. Os resultados de imunocitoquímica para PCNA comprovam a intensa proliferação celular que ocorre neste período. Esses sucessivos ciclos mitóticos das células germinativas primordiais, bem como das células somáticas levam ao povoamento da gônada em desenvolvimento (Winkoop *et al.*, 1992), que se alonga e torna-se mais espessa (Hliwa *et al.*, 2003).

A despeito das células somáticas presentes no primórdio gonadal e na gônada ainda indiferenciada de *Tanichthys albonubes*, *Gymnocorymbus ternetzi*, *Corydoras schwartzi*, *Amatitlania nigrofasciata* e *Poecilia reticulata*, essas são morfologicamente semelhantes tanto nas gônadas supostamente masculinas como nas femininas e parecem ser provenientes de um epitélio celomático (mesotélio da crista gonadal), tendo, portanto, origem epitelial (ver Devlin e Nagahama, 2002 para revisão).

II. A DIFERENCIAÇÃO GONADAL

A diferenciação gonadal em *Tanichthys albonubes*, *Gymnocorymbus ternetzi*, *Corydoras schwartzi*, *Amatitlania nigrofasciata* e *Poecilia reticulata* envolve alterações tanto das células germinativas primordiais quanto das células somáticas, assim como ocorre na maioria dos Teleostei (Nakamura e Takahashi, 1973; Strüssmann *et al.*, 1996; Nakamura *et al.*, 1998; Meijide *et al.*, 2005; Pandolfi *et al.*, 2009; Guerrero-Estévez e Moreno-Mendoza, 2010; Kobayashi *et al.*, 2011). É consenso entre diferentes autores que as alterações das células germinativas primordiais são evidenciadas por atividade meiótica de futuras oogônias e espermatogônias, enquanto que as células somáticas estão envolvidas no processo de formação da cavidade ovariana, de ductos eferentes, ductos espermáticos e da formação dos lóbulos testiculares (Patiño e Takashima 1995; Nakamura *et al.*, 1998; Meijide *et al.*, 2005; Rasmussen *et al.*, 2006; Pandolfi *et al.*, 2009). Essas alterações morfológicas no tecido gonadal constituem, até o presente momento, os principais parâmetros utilizados para a

distinção sexual das gônadas gonocóricas com desenvolvimento direto (Nakamura e Takahashi, 1973; Nakamura e Nagahama, 1989; Strüssmann *et al.*, 1996; Nakamura *et al.*, 1998; Meijide *et al.*, 2005; Komatsu *et al.*, 2006; Pandolfi *et al.*, 2009; Guerrero-Estévez e Moreno-Mendoza, 2010, 2012; Kobayashi *et al.*, 2011).

Porém, no presente estudo, a distinção entre as gônadas femininas e masculinas pode ser detectada antecedendo tanto a entrada das células germinativas primordiais em meiose, quanto a formação de estruturas gonadais pelas células somáticas. Essa detecção de gônadas presumidamente femininas ou masculinas é factível quando se considera a organização das células germinativas e somáticas no tecido gonadal, bem como quando se faz uma associação entre a quantidade dessas células e o tamanho da gônada (maior ou menor), em uma idade específica do animal (Mazzoni, 2009).

Entretanto, mesmo que haja um pré-estabelecimento da distribuição das células, é preciso considerar que as gônadas, neste período, são ainda indiferenciadas, constituídas, portanto, de células germinativas primordiais similares e bipotentes em ambos os sexos, ou seja, capazes de originar oogônias ou espermatogônias com o mesmo potencial (Devlin e Nagahama, 2002; Rasmussen *et al.*, 2006). Portanto, embora a distinção morfológica das gônadas em femininas ou masculinas possa ser detectada precocemente neste trabalho, a diferenciação gonadal propriamente dita deve ocorrer somente quando as células germinativas primordiais e os componentes somáticos se diferenciam.

A diferenciação gonadal parece estar intimamente relacionada com a organização dos tipos celulares que compõem o tecido gonadal (Mazzoni *et al.*, 2009). A interação célula somática-célula germinativa primordial tem um papel significativo neste processo. Estudos recentes mostram que as células germinativas afetam a diferenciação sexual de células somáticas (Siegfried e Nüsslein-Volharda, 2008; Tanaka *et al.*, 2008), principalmente nas gônadas femininas (Shinomiya *et al.*, 2001). Lóbulos testiculares normais são formados mesmo na ausência das células germinativas (Siegfried e Nüsslein-Volharda, 2008), enquanto que as células somáticas, na gônada feminina, só se diferenciam em foliculares, na presença das células germinativas femininas (Shinomiya *et al.*, 2001; Siegfried e Nüsslein-Volharda, 2008).

Uma peculiaridade observada nos Acanthopterygii aqui estudados, representados por *Amatitlania nigrofasciata* e *Poecilia reticulata*, é o fato de que o padrão de organização celular nas gônadas ainda indiferenciadas é diferente entre si. Assim, gônadas que supostamente darão origem aos ovários e testículos, já apresentam certa diferenciação morfológica. Em *Poecilia reticulata* os dados obtidos pelo método de Reticulina confirmam esta hipótese, uma vez que distingue dois padrões de formação da membrana basal, entre machos e fêmeas.

Esse padrão de organização dos Acanthopterygii difere daquele encontrado nos Ostariophysi aqui estudados *Tanichthys albonubes*, *Gymnocorymbus ternetzi* e *Corydoras schwartzi*, os quais apresentam padrões que se assemelham à maioria das descrições existentes para Teleostei (Davies e Takashima, 1980; Timmermans e Taverne, 1983; Colombo *et al.*, 1984; Parmentier e Timmermans, 1985; Winkoop *et al.*, 1992; Colombo e Grandi, 1996; Timmermans *et al.*, 1996; Grandi e Colombo, 1997; Meijide *et al.*, 2005, Otani *et al.*, 2005; Çek, 2006; Nakamura *et al.*, 2006; Saito *et al.*, 2007; Nakamura *et al.*, 2008; Pandolfi *et al.*, 2009; Nakamura *et al.*, 2010; Mazzoni *et al.*, 2010). Embora estes autores tenham trabalhado tanto com peixes basais quanto com peixes mais derivados, é possível que os primeiros estágios de transição entre primórdio gonadal e gônada indiferenciada nos Neoteleostei não tenham sido sutilmente analisados, uma vez que para detecção e confirmação destes dados é necessário um grande número de amostras, bem como cortes histológicos seriados e em distintas orientações (longitudinal, transversal e parassagital). Portanto, é possível que esta disposição das células germinativas primordiais seja uma característica que distingue os Neoteleostei dos Otophysi, em estágios bastante precoces da morfogênese gonadal.

Em ambos os Acanthopterygii aqui estudados, Percomorpha e Atherinomorpha, os animais supostamente femininos apresentam células germinativas primordiais distribuídas principalmente na região central do tecido gonadal, que se mostra com um menor número de células somáticas, concentradas principalmente na região periférica da gônada. Já os machos têm um padrão bastante diferenciado; suas células germinativas primordiais estão concentradas na região ventral do tecido gonadal, enquanto que a região dorsal é ocupada por várias camadas de células somáticas. Essa afirmação é verdadeira quando se compara o padrão de distribuição das células germinativas e somáticas em etapas mais avançadas da

diferenciação gonadal, período em que as gônadas masculinas e femininas já apresentam características típicas de testículos e ovários.

Os dados obtidos com a Imunohistoquímica para PCNA também mostram que *Amatitlania nigrofasciata* e *Poecilia reticulata* compartilham um mesmo padrão – em gônadas indiferenciadas supostamente masculinas, a região dorsal, correspondente à futura região na qual irá formar-se o ducto espermático em ambas as espécies apresenta uma grande quantidade de células somáticas em proliferação celular. Este dado, além de diferenciar gônadas supostamente masculinas das femininas, confere uma primeira diferença entre gônadas de Otophysi e Neoteleostei em processo de diferenciação, uma vez que, nos Otophysi aqui analisados, na gônada indiferenciada supostamente masculina, não há qualquer indício que leve à suposição da formação de ductos testiculares. Porém, nos Otophysi, com o avanço da morfogênese, as células germinativas primordiais organizam-se de forma distinta no tecido gonadal, de modo a determinar uma nova relação entre as células germinativas e somáticas, comprometendo o rumo da diferenciação, na qual as gônadas femininas e masculinas assumem definitivamente o seu destino (presente estudo; Mazzoni *et al.*, 2010).

1. A DISTINÇÃO SEXUAL DAS GÔNADAS

Nos pressupostos testículos dos Otophysi *Tanichthys albonubes* e *Corydoras schwartzi* e do Percomorpha *Amatitlania nigrofasciata*, as células germinativas primordiais organizam-se inicialmente em cordões contínuos (Hamaguchi, 1992; Flores e Burns, 1993; Meijide *et al.*, 2005; Mazzoni, 2009; Mazzoni *et al.*, 2010; presente estudo) enquanto que o mesmo não acontece nos pressupostos ovários. A reorganização estrutural que se segue das células germinativas primordiais deixando de formar cordões contínuos e se agrupando em estruturas semelhantes à ácinos, constitui um primeiro indício de que um novo testículo está prestes a ser formado (Mazzoni, 2009; presente estudo). Esta fase inicial da diferenciação gonadal é compartilhada, portanto, durante a formação de dois testículos com padrões de organização diferentes: do tipo tubular em *Tanichthys albonubes* e *Corydoras schwartzi* (grupos mais basais) e lobular em *Amatitlania nigrofasciata* (grupos mais derivados aqui estudado).

A despeito do Atherinomorpha *Poecilia reticulata* não apresentar formação de cordões contínuos, as células germinativas primordiais organizam-se, desde o princípio, em

grupamentos acinares. Portanto, todos os representantes do sexo masculino, aqui estudados, compartilham uma mesma etapa, na qual o tecido gonadal tem suas células germinativas primordiais organizadas em ácinos. Estruturas semelhantes foram encontradas no Otophysi *Cyprinus carpio*, um Cyprinidae, pertencente à mesma família que *Tanichthys albonubes*, nas etapas iniciais de diferenciação gonadal (Mazzoni, 2009). Esta morfologia parece ocorrer tanto em peixes mais basais quanto nos mais derivados, uma vez que estruturas globulares semelhantes à ácinos também foram encontradas em condições experimentais nas gônadas em diferenciação do Atherinomorpha *Oryzias latipes* (Beloniformes) (Shinomiya *et al.*, 2001).

Essas estruturas acinares encontram-se circundadas por uma membrana basal tanto nos grupos aqui estudados, quanto no Otophysi *Cyprinus carpio* (Mazzoni, 2009) e no Atherinomorpha *Oryzias latipes* (Beloniformes) descrito por Shinomiya e colaboradores (2001) que sugerem que em *Oryzias latipes* estas estruturas sejam os precursores dos lóbulos testiculares. Características morfológicas semelhantes também foram descritas por Meijide e colaboradores (2005) para o Percomorpha *Cichlasoma dimerus* pertencente à mesma ordem que *Amatitlania nigrofasciata*. Isto reforça ainda mais a hipótese de que estruturas acinares são características de gônadas supostamente masculinas dentre os Teleostei, seja ele basal ou derivado. Esta organização parece, portanto, ser bastante conservada dentre os Teleostei.

Dentre os peixes não Teleostei, há poucas informações sobre a diferenciação gonadal. Um exemplo de não Teleostei é o esturjão, que pertence à ordem Acipenseriformes, dentro da subclasse Chondrostei (Nelson, 2006), grupo mais basal que os Teleostei. Estudos sobre a diferenciação gonadal em esturjão mostram uma diferença entre os padrões celulares encontrados nas gônadas dos Teleostei. Tanto no esturjão siberiano, *Acipenser baerii* (Rzepakowska e Ostaszewska, 2013), como no esturjão russo, *Acipenser gueldenstaedtii* (Rzepakowska e Ostaszewska, 2013), as células germinativas primordiais, em gônadas masculinas, formam cordões contínuos, mas não estruturas acinares. O padrão de estrutura acinar parece ser uma característica da gônada feminina, fato que se inverte quando se analisa os peixes Teleostei.

Nos Teleostei, a diferenciação gonadal feminina tanto nos Otophysi quanto nos Neoteleostei é inicialmente marcada pelo aparecimento de figuras meióticas a partir das

oogônias no tecido gonadal (presente estudo; Nakamura *et al.*, 1998; Meijde *et al.*, 2005; Mazzoni *et al.*, 2010).

No tecido gonadal masculino, a diferenciação dos componentes somáticos, iniciando a formação do ducto testicular, precede a meiose das células germinativas nos Neoteleostei aqui estudados, como também no Atherinomorpha *Oryzias latipes* (Nakamura *et al.*, 1998) e no Percomorpha *Cichlasoma dimerus* (Meijde *et al.*, 2005). Nos Otophysi, porém, o ducto espermático é a última estrutura a se formar, resultante de futuras anastomoses dos túbulos testiculares. A formação dos túbulos testiculares precede a meiose das células germinativas, nas três espécies de Otophysi, sejam eles Cypriniformes (*Tanichthys albonubes*), Characiformes (*Gymnocorymbus ternetzi*) ou Siluriformes (*Corydoras schwartzi*). Esta mesma informação foi encontrada no Cypriniformes *Cyprinus carpio* (Mazzoni, 2009).

Os dados acima descritos compõem os primeiros indícios da diferenciação gonadal em Otophysi e Neoteleostei. Nos machos, tanto a formação de ductos testiculares (nos Neoteleostei), como a reorganização das células germinativas primordiais (nos Otophysi) constituem os principais indicativos morfológicos da diferenciação gonadal, enquanto que nas fêmeas, a entrada em meiose parece ser uma característica comum tanto aos Otophysi como aos Neoteleostei.

Nos três grupos aqui analisados, o Otophysi *Tanichthys albonubes*, o Percomorpha *Amatitlania nigrofasciata* e o Atherinomorpha *Poecilia reticulata*, os testículos permanecem indiferenciados por um período maior do que os ovários. Consequentemente, o início da espermatogênese é atrasado, quando comparado com o período em que a fêmea leva para iniciar a oogênese. (Nakamura *et al.*, 1998; Strüssmann e Nakamura, 2002). Esse atraso da diferenciação testicular em relação à diferenciação ovariana parece ser um fenômeno comum à maioria dos Teleostei gonocorísticos mais basais ou mais derivados (Nakamura *et al.*, 1998; Meijde *et al.*, 2005; Mazzoni, 2009; Pandolfi *et al.*, 2009; Kobayashi *et al.*, 2011). Porém, é um consenso entre os autores que a formação dos primeiros gametas viáveis para reprodução formam-se primeiro em machos do que em fêmeas, ou seja, a primeira maturação gonadal masculina precede a feminina nos animais aqui estudados e na maioria dos Teleostei.

Dentre os Otophysi estudados, o Characiformes *Gymnocorymbus ternetzi* apresenta distinção sexual das gônadas gonocorísticas após desenvolvimento indireto, ou seja, os

testículos se desenvolvem e são remodelados sobre um tecido gonadal feminino já diferenciado, como ocorre no Otophysi *Danio rerio* (Cypriniformes).

Até o momento não há relatos de diferenciação gonocorística do tipo indireta dentro da ordem Characiformes, tampouco casos de hermafroditismo em animais adultos (Avisé e Mank, 2008), portanto, ao menos em condições de cativeiro, esta é a primeira vez que este tipo de diferenciação gonocorística é relatado para tal ordem.

Algumas espécies mostram ainda uma diferenciação simultânea entre machos e fêmeas, como por exemplo, nos Percomorpha *Oreochromis mossambicus* (Nakamura e Takahashi, 1973) e *Oreochromis niloticus* (Nakamura e Nagahama, 1989), não existindo nenhum caso na literatura que relate a precedência masculina (Strüssmann e Nakamura, 2002). Neste trabalho, esta diferenciação simultânea também foi encontrada entre os Otophysi, no Siluriformes *Corydoras schwartzi*. Portanto a diferenciação gonocorística direta ou indireta, bem como a diferenciação simultânea parece ocorrer independente na posição da espécie na escala evolutiva.

2. A DIFERENCIAÇÃO OVARIANA

Diferentemente do que ocorre com as gônadas masculinas que apresentam padrões de organização testiculares distintos e desconsiderando o fato de o Atherinomorpha *Poecilia reticulata* apresentar fusão das gônadas femininas durante o período de embriogênese (Nagahama, 1983; Constantz, 1989; presente estudo), o desenvolvimento gonadal feminino e o processo de diferenciação gonadal são bastante semelhante nos três grupos aqui estudados – Otophysi, Percomorpha e Atherinomorpha, bem como nos Teleostei em geral, envolvendo a entrada das células germinativas em meiose e a formação de uma cavidade ovariana (Devlin e Nagahama, 2002 para revisão).

Nos Ostariophysi (*Tanichthys albonubes*, *Gymnocorymbus ternetzi* e *Corydoras schwartzi*) e Acanthopterygii (*Amatitlania nigrofasciata* e *Poecilia reticulata*) aqui analisados, a diferenciação da linhagem germinativa no tecido gonadal feminino parece preceder a diferenciação dos componentes somáticos, ou seja, a entrada das células germinativas precede o aparecimento de um compartimento luminal e a estruturação em um cisto-ovário, dados que

ocorrem similarmente tanto em *Ostariophysis* (Mazzoni *et al.*, 2010) quanto em *Acanthopterygii* (Meijide *et al.*, 2005).

Assim, considera-se que os eventos envolvidos na diferenciação gonadal feminina são bastante semelhantes e a maior diferença encontrada entre os grupos analisados refere-se principalmente à ordem cronológica da diferenciação das células germinativas e das células somáticas, fato que parece variar comumente entre as espécies de Teleostei.

2.1. A formação dos primeiros folículos ovarianos

Análogo ao que ocorre no epitélio germinativo das lamelas ovígeras nas fêmeas sexualmente adultas (Grier, 2000; Le Menn *et al.*, 2007; Grier *et al.*, 2009; França *et al.*, 2010), também na gônadas em diferenciação de *Tanichthys albonubes*, *Gymnocorymbus ternetzi*, *Corydoras schwartzi*, *Amatitlania nigrofasciata* e *Poecilia reticulata*, cada oogônia no interior do cisto pode continuar se dividindo por mitose, formando novas oogônias ou pode entrar em meiose originando os oócitos. Com as divisões celulares ocorrendo dentro dos cistos, estes aumentam de tamanho devido ao aumento do número de células e têm uma nova expansão com a entrada em meiose. O aumento do tamanho dos cistos é acompanhado pela proliferação das células somáticas, pré-foliculares, que o envolvem, dados confirmados pela Imunohistoquímica para PCNA.

Conforme esperado, o desenvolvimento das células germinativas no interior de cada cisto é sincrônico em todas as espécies analisadas. O desenvolvimento sincrônico das células germinativas no interior de cistos deve-se à presença de pontes citoplasmáticas entre os oócitos profásicos, sejam estas em gônadas em diferenciação (Saito *et al.*, 2007; Nakamura *et al.*, 2008; Mazzoni *et al.*, 2010; sejam em fêmeas sexualmente maduras (Le Menn *et al.*, 2007; Quagio-Grassiotto *et al.*, 2011) tanto em animais basais quanto mais derivados. Existentes entre as células germinativas nos cistos dos machos sexualmente adultos desde a fase de espermatogônia (Grier, 1976; Billard, 1984; Silveira *et al.*, 1990; Gusmão *et al.*, 2002; Quagio-Grassiotto e Carvalho, 1999; Negrão *et al.*, 2002), as pontes citoplasmáticas também foram observadas entre as oogônias de um mesmo cisto, no ovário em diferenciação de *Amatitlania nigrofasciata*.

Seguindo a entrada e posterior permanência em diplóteno, os oócitos desenvolvem-se, de forma semelhante entre todas as espécies analisadas. O desenvolvimento primário dos oócitos, que se inicia ainda nos cistos, tem continuidade no interior dos folículos ovarianos. O oócito em crescimento projeta-se para fora do cisto e é progressivamente envolto pelas células, agora, foliculares, como em animais sexualmente adultos. Nestes últimos, durante a formação dos folículos ovarianos, as células pré-foliculares progressivamente interpenetram nos cistos e envolvem cada oócito individualizando-os (ver Le Menn *et al.*, 2007; Grier *et al.*, 2009 para revisão; Quagio-Grassiotto *et al.*, 2011). Portanto, nas gônadas femininas em processo de diferenciação, tanto nos Ostariophysi (*Tanichthys albonubes*, *Gymnocorymbus ternetzi* e *Corydoras schwartzi*) quanto nos Acanthopterygii (*Amatitlania nigrofasciata* e *Poecilia reticulata*) estes eventos são similares, porém em todos os casos, com uma gônada ainda compacta, os folículos ovarianos em formação permanecem imersos no tecido gonadal, até que o epitélio germinativo feminino seja estabelecido (presente estudo; Mazzoni *et al.*, 2010).

As células foliculares, inicialmente polimórficas em decorrência do seu ativo processo de movimentação, ao envolverem completamente os oócitos tornam-se pavimentosas. Formam-se assim os primeiros folículos ovarianos, constituídos pelo oócito em crescimento primário, envolto por uma camada de células foliculares pavimentosas, circundadas e apoiadas sobre uma membrana basal em formação. A membrana basal segrega os folículos recém-formados dos demais constituintes celulares presentes nas gônadas em diferenciação (Meijide *et al.*, 2005; Mazzoni *et al.*, 2010).

2.2. A formação da cavidade ovariana

O segundo evento que caracteriza a diferenciação ovariana nas espécies analisadas é a formação da cavidade ovariana, que, no presente estudo, acontece, portanto, após a entrada das células germinativas em meiose, precedendo a diferenciação das lamelas ovígeras, o estabelecimento do epitélio germinativo e formação do estroma ovariano.

Em alguns grupos, como por exemplo, no Otophysi *Ictalurus punctatus* (Siluriformes) (Patiño *et al.*, 1996) e nos Percomorpha *Sarotherodon niloticus* (Nakamura e Nagahama, 1985) e *Zoarcetes viviparus* (Rasmussen *et al.*, 2006), ambos Perciformes, a diferenciação da gônada feminina é marcada pelo desenvolvimento inicial da cavidade ovariana precedendo a

atividade meiótica das oogônias, sendo esse o primeiro sinal de diferenciação ovariana (Kobayashi *et al.*, 2011). Esses eventos podem ocorrer, ainda, de forma simultânea, mesmo entre os Perciformes, por exemplo, em *Oreochromis mossambicus* (Nakamura e Takahashi, 1973), *Oreochromis niloticus* e *Oreochromis aureus* (Patiño e Takashima 1995; Nakamura *et al.*, 1998).

O processo de formação da cavidade ovariana nos Otophysi *Tanichthys albonubes* e *Gymnocorymbus ternetzi*, bem como nos Acanthopterygii *Amatitlania nigrofasciata* e *Poecilia reticulata*, não difere do descrito para outras espécies de peixes (ver Nakamura *et al.*, 1998 para revisão), sendo, portanto, resultado da proliferação de células somáticas na periferia do ovário. Essa proliferação leva à formação de lâminas teciduais que se expandem lateralmente e se fusionam, encerrando o ovário em formação em uma cavidade, antes celomática, agora, o lúmen ovariano.

Independente da ordem cronológica em que os eventos da diferenciação gonadal estejam ocorrendo, todas as espécies aqui analisadas desenvolvem, no final do processo, um ovário em forma de uma estrutura sacular, com um lúmen no seu interior, sendo, portanto um órgão cavitário. O desenvolvimento de uma estrutura sacular, característico dos ovários de Teleostei, é único entre os vertebrados. Essa estrutura sacular determina a condição de um ovário do tipo cisto-ovário tanto para os Otophysi, Percomorpha (Hoar, 1969; Nagahama, 1983; Dodd, 1986; ver Grier *et al.*, 2009 para revisão), como também para os Poecilídeos vivíparos (Atherinomorpha) (Groove e Wourms, 1994).

O cisto-ovário assim formado, comum entre os Teleostei, (Patiño e Takashima, 1995; Nakamura *et al.*, 1998; Strüssmann e Nakamura, 2002; Meijide *et al.*, 2005; Mazzoni *et al.*, 2010), constitui-se agora de um órgão cavitário, no qual se projetam as lamelas ovígeras (Hoar, 1969; Nagahama, 1983; Selman e Wallace, 1986; Connaughton e Aida, 1998; Helfman *et al.*, 2000), tornando-se contínuo com o gonoducto (Grier *et al.*, 2007; 2009) que desemboca na papila urogenital.

Esse processo de formação das lâminas teciduais que levam ao fechamento do ovário e a constituição da cavidade ovariana têm sido descrita sempre em secções transversais nas quais se apresentam como protuberâncias laterais do órgão formadas por células somáticas e que aumentam gradativamente até encontrarem-se e se fundirem, delimitando, assim, a

cavidade ovariana (Patiño e Takashima, 1995; Nakamura *et al.*, 1998; Strüssmann e Nakamura, 2002; Mejjide *et al.*, 2005; Mazzoni *et al.*, 2010).

Apesar das similaridades encontradas durante a formação do cisto-ovário entre os grupos de peixes analisados, uma única divergência pode ser observada, no que diz respeito à localização dos locais de proliferação de células somáticas no ovário e direcionamento das lâminas teciduais rumo à cavidade celomática. Este fato, porém, parece não estar relacionado com a posição da espécie na escala evolutiva, visto que em ambas as espécies, *Tanichthys albonubes* e *Poecilia reticulata*, um peixe mais basal e outro mais derivado, as lâminas teciduais crescem dorsalmente ao ovário. Contraditoriamente em *Gymnocorymbus ternetzi* e *Amatitlania nigrofasciata*, mais basal e mais derivado, respectivamente, as lâminas teciduais crescem ventralmente ao ovário.

Não se pode afirmar se há relações entre a formação da cavidade ovariana e a escala evolutiva, uma vez que quando se compara espécies dentro de uma mesma família ou entre ordens diferentes, não há padrões claros de semelhança ou distinção. Isso se deve ao fato de que até o momento não há nenhum estudo abrangente neste aspecto. Dentro dos Cypriniformes, por exemplo, *Tanichthys albonubes* e *Rutilus rutilus* (Paull *et al.*, 2008) compartilham exatamente os mesmos mecanismos para a formação do cisto-ovário, ambos com a cavidade ovariana e lamelas ovígeras projetadas para a região dorsal da gônada. Apesar de pertencerem a subfamílias próximas, não se acredita que haja uma associação positiva dentro da escala evolutiva. Já em *Cyprinus carpio*, espécie pertencente à mesma família Cyprinidae que *Tanichthys albonubes* e *Rutilus rutilus*, as lâminas teciduais crescem ventrolateralmente ao ovário e as lamelas ovígeras encontram-se projetadas para a região ventral da gônada (Mazzoni *et al.*, 2010).

Em *Corydoras schwartzi*, apesar de o ovário ser também considerado um cisto-ovário, a formação da cavidade ovariana dá-se por outro mecanismo, que se assemelha à formação do ducto testicular nos testículos lobulares dos Acanthopterygii. Longitudinalmente no tecido gonadal, a partir de um acúmulo de células somáticas na região medial do ovário, as células afastam-se uma das outras, abrindo um pequeno canal que, revestido por um epitélio pavimentoso, progressivamente torna-se mais espaçado. Este processo da formação da

cavidade ovariana coincide com a formação das lamelas ovígeras, uma vez que um evento é consequência do outro e sua formação ocorre, portanto, pelo processo de cavitação.

Durante a formação dos cisto-ovários, algumas espécies podem apresentar uma etapa durante a diferenciação que antecede a formação da cavidade ovariana, passando por uma organização do tipo gymno-ovariana, como descrito para *Cyprinus carpio* (Mazzoni *et al.*, 2010). Gymno-ovários presentes em alguns grupos de peixes como os Salmoniformes, por exemplo, grupo mais derivado que os Ostariophysi, têm as lamelas ovígeras expostas diretamente para a cavidade celomática, na qual os oócitos maduros são liberados (Helfman *et al.*, 2000; Grier *et al.*, 2007; 2009). Porém, uma vez que cavidade ovariana formou-se antes de qualquer primórdio de lamela ovígera, os ovários das espécies aqui analisadas não passaram por esta etapa, na qual tecido gonadal apresenta-se como gymno-ovário.

2.3. A formação do epitélio germinativo feminino, a constituição das lamelas ovígeras e a organização dos complexos foliculares

Em todas as espécies aqui analisadas, o tecido gonadal, em uma etapa que precede a formação das lamelas ovígeras, encontra-se ainda compacto, porém, com uma cavidade ovariana já formada. No tecido gonadal, os folículos ovarianos em formação são gradualmente circundados por uma membrana basal, permanecendo imersos no tecido gonadal, juntamente com cistos de oogônias, de oócitos profásicos e oogônias isoladas (Mazzoni *et al.*, 2010).

A partir desta etapa, nos Otophysi *Tanichthys albonubes* e *Gymnocorymbus ternetzi*, e no Percomorpha *Amatitlania nigrofasciata*, células epiteliais em movimentação, oriundas da periferia gonadal, invadem o tecido compacto formando invaginações que progridem adentrando o tecido gonadal. Esse mecanismo, ao mesmo tempo em que forma as lamelas ovígeras, dá origem ao epitélio germinativo que as margeia (Mazzoni *et al.*, 2010).

Em *Corydoras schwartzi*, a formação do lúmen ovariano por cavitação, ocorre por um mecanismo semelhante, no qual o afastamento das células somáticas ao longo do tecido gonadal delimita a cavidade ovariana. As células somáticas que revestem a cavidade ovariana intercalam-se agora com células germinativas, passando a constituir o epitélio germinativo feminino que margeia os primórdios das lamelas ovígeras.

Por um mecanismo oposto aos demais Ostariophysi aqui analisados, as lamelas ovíferas no Siluriformes *Corydoras schwartzi* formam-se por evaginação e crescimento do tecido gonadal em direção à luz da cavidade ovariana, esta então, já estabelecida. Nos cortes transversais, o tecido gonadal apresenta lamelas ovíferas pouco proeminentes, em ambos os lados do ovário. Com o avanço do desenvolvimento gonadal, ocorre uma expansão do tecido gonadal em direção à luz ovariana e as lamelas ovíferas até então bastante retilíneas, tornam-se definidas.

Já nos ovários de *Poecilia reticulata*, não ocorre a formação de estruturas lamelares, ao contrário da maioria das espécies de Teleostei (Grier *et al.*, 2007; 2009), porém, como será visto a seguir, o desenvolvimento oocitário é comum aos demais Teleostei, com crescimento do folículo ovariano a partir do epitélio germinativo, indo em direção ao estroma ovariano. Por esta razão, em cortes histológicos transversais, o ovário apresenta-se perfeitamente organizado, com oogônias e cistos germinativos junto ao epitélio germinativo, e oócitos em desenvolvimento migrando para a região periférica da gônada, conforme avançam em crescimento primário e secundário.

Até o presente momento, raros são os relatos sobre os diferentes mecanismos que podem levar à formação das lamelas ovíferas, portanto, estes mecanismos nos demais Teleostei são ainda bastante desconhecidos, impossibilitando uma comparação mais aprofundada ao longo da escala evolutiva.

Dessa forma, embora a formação das lamelas ovíferas seja diferente para *Corydoras schwartzi* o processo que se segue para o estabelecimento do epitélio germinativo é o mesmo, inclusive para o Atherinomorpha *Poecilia reticulata*, que não apresenta formação de lamelas ovíferas.

Durante a formação do epitélio germinativo feminino, as células somáticas epiteliais oriundas de regiões específicas para cada uma das espécies, após migrarem pelo tecido gonadal compacto, interpõem-se por entre as células germinativas, interconectando-as. Uma vez que as células germinativas, desde o início de formação da gônada, estão segregadas dos demais componentes teciduais pelas células pré-foliculares que por sua vez apoiam-se sobre uma membrana basal, o epitélio germinativo, quando da sua formação, estará separado do futuro estroma ovariano pela membrana basal (Mazzoni *et al.*, 2010).

Em todas as espécies analisadas, ao longo do tecido gonadal feminino, interpostos aos folículos ovarianos já formados e aos cistos de oogônias e/ou oócitos, encontram-se outros componentes celulares. Dentre estes, surgem pequenos espaços, que se expandem gradativamente dando origem a espaços extravasculares. Os espaços extravasculares são preenchidos por fluidos, ricos em glicoproteínas. Em animais adultos supõe-se que se originam a partir do extravasamento de fluidos do plasma sanguíneo, que deixam o sistema circulatório por entre as células endoteliais e passam a preencher regiões no interior do tecido gonadal (Parenti e Grier, 2004). Supõe-se que os espaços extravasculares em animais em diferenciação gonadal sejam formados desta mesma maneira.

Esse fluido agora se dispõe entre os componentes celulares, afastando-os. Concomitantemente, entre os componentes celulares, células estreladas com características mesenquimais progressivamente se interconectam formando uma rede frouxa que dá origem a um compartimento intersticial (Mazzoni *et al.*, 2010). Este compartimento corresponde ao estroma ovariano, no qual novos componentes celulares irão se diferenciar, permanecendo isolados do compartimento germinativo pela membrana basal. O estroma ovariano nos peixes é em geral formado por um tecido conjuntivo frouxo do tipo mucoso, no qual os espaços extravasculares são amplos e a quantidade de fibras colágenas é pequena (Grier, 2000; Mazzoni *et al.*, 2010; presente estudo).

A partir do estroma recém-formado, as células mesenquimais emitem prolongamentos citoplasmáticos que interagem com os folículos ovarianos e respondem de ora em diante pela formação dos constituintes da teca. Como os folículos já apresentam uma membrana basal totalmente formada, as células mesenquimais ao contatarem o folículo, apoiam-se sobre sua membrana basal, diferenciam-se em uma célula pré-tecal e, posteriormente, em células da teca (Mazzoni *et al.*, 2010). O estroma ovariano pode se mostrar mais ou menos desenvolvido, dependendo da espécie em questão. No presente estudo, *Gymnocorymbus ternetzi* e *Corydoras schwartzi* apresentam um estroma bastante desenvolvido já nas primeiras etapas da diferenciação gonadal. Contrariamente, *Tanichthys albonubes*, *Amatitlania nigrofasciata* e *Poecilia reticulata* apresentam inicialmente um crescimento do tecido gonadal para só então, em etapas mais avançadas do desenvolvimento oocitário, apresentarem um estroma desenvolvido.

Com a diferenciação das células da teca, o folículo ovariano passa a constituir o complexo folicular. O complexo folicular é formado, portanto, pelo oócito diplotênico, envolto pelas células foliculares, apoiadas em uma membrana basal e por duas camadas de células da teca (a teca interna e a teca externa) (Tokarz, 1978; Wallace e Selman, 1990; Grier, 2000; Grier e Lo Nostro, 2000; Grier, 2002; Grier *et al.*, 2007; Le Menn *et al.*, 2007; Grier *et al.*, 2009).

A gônada apresenta agora dois compartimentos distintos - o epitélio germinativo que reveste as lamelas ovígeras e o estroma ovariano (Grier *et al.*, 2007; Le Menn *et al.*, 2007; Grier *et al.*, 2009; presente estudo) – separados pela membrana basal que se torna totalmente contínua.

No interior dos complexos foliculares, o desenvolvimento dos oócitos prossegue, microvilosidades surgem no ooplasma e na região apical das células foliculares colocando em contato oócito e células foliculares, e a formação da zona pelúcida tem início (Quagio-Grassiotto e Guimarães, 2003; França *et al.*, 2010; presente estudo).

Uma vez que o epitélio germinativo esteja totalmente estabelecido, tornar-se-á, a partir de então, permanentemente ativo. No epitélio, as oogônias proliferam formando aglomerados celulares, denominados de ninhos. Nestes, as oogônias associam-se às células somáticas de origem epitelial, diferenciam-se e forma-se um novo cisto germinativo (Quagio-Grassiotto *et al.*, 2011). No interior do cisto, as oogônias proliferam ou entram em meiose dando origem a cistos de oócitos. Oogônias não encistadas, oogônias no interior de cistos, cistos contendo oócitos, e células pré-foliculares passam a conviver no interior de um mesmo ninho (Mazzoni *et al.*, 2010; Quagio-Grassiotto *et al.*, 2011). Quando da formação do folículo ovariano, o oócito segue seu crescimento, permanecendo conectados ao epitélio germinativo através de certa extensão da membrana basal compartilhada entre as células foliculares e as células epiteliais (Grier *et al.*, 2007; 2009; Mazzoni *et al.*, 2010; Quagio-Grassiotto *et al.*, 2011; estudo em andamento).

3. A DIFERENCIAÇÃO TESTICULAR

3.1. A Diferenciação Testicular e a Teoria da Evolução Pedomórfica

No presente estudo, o padrão de estruturação das gônadas masculinas em início de diferenciação, bem como o estabelecimento do epitélio germinativo masculino, vem sendo ora analisado sob a visão de Parenti e Grier (2004), que propõem que a estrutura testicular do tipo tubular anastomosada seria mais basal em relação à lobular. Essa transição de uma estrutura para outra seria explicada através de uma evolução pedomórfica (Parenti e Grier, 2004), em que animais adultos mais derivados na escala evolutiva (Neoteleostei) retêm características do desenvolvimento inicial dos peixes mais basais (Otophysi), ou seja, o organismo adulto apresenta características típicas do seu ancestral juvenil.

Segundo Parenti e Grier (2004) a transição de um testículo tubular anastomosado para um testículo lobular pode ter sido resultado de um alongamento do compartimento germinativo de um testículo como a que ocorre durante sua maturação inicial, quando o epitélio germinativo torna-se alto devido ao desenvolvimento dos cistos. Neste período, o testículo como um todo se torna maior para a entrada no período reprodutivo (Grier e Taylor, 1998; Grier, 2002; Lo Nostro *et al.*, 2003). Para suportar o epitélio germinativo, uma mudança durante a formação da membrana basal teria levado à formação de lóbulos a partir dos túbulos testiculares (Parenti e Grier, 2004).

De forma similar, a restrição das espermatogônias na porção distal dos lóbulos testiculares dos Atherinomorpha, aqui representado por *Poecilia reticulata*, teria sido causada pelo estabelecimento de cordões epitelióides de células de Sertoli e espermatogônias nos testículos dos Perciformes (Grier e Taylor, 1998; Parenti e Grier, 2004), característicos das fases reprodutivas “regredida” e “em regressão” (Brown-Peterson *et al.*, 2002), visto que em Perciformes, como em *Oreochromis niloticus*, os testículos apresentam um acúmulo de espermatogônias na porção final do lóbulo (Lacerda *et al.*, 2012). O mesmo ocorre com *Amatitlania nigrofasciata*, na qual essa concentração de espermatogônias mantém-se durante todas as fases reprodutivas (observação pessoal).

Neste contexto, durante a morfogênese gonadal dos representantes dos Otophysi, a estrutura testicular do tipo tubular anastomosada tenderia a se desenvolver primeiramente em um testículo lobular, característico dos Neoteleostei. Entretanto, os dados obtidos para as espécies do presente estudo não estão de acordo com a proposta apresentada sobre a evolução

pedomórfica, se considerar-se como característica pedomórfica a presença de lóbulos na diferenciação gonadal dos Otophysi.

No entanto, ao se analisar as espécies, nota-se ao menos uma característica comum entre todas elas, tanto entre os grupos mais basais (Otophysi) e os mais derivados (Neoteleostei), como entre as espécies de um mesmo grupo: a presença de ácinos. Assim, ao se considerar o ácino como uma estrutura que foi mantida durante o desenvolvimento gonadal, ao longo de uma escala evolutiva, pode-se afirmar que esta seria uma característica pedomórfica, a qual foi conservada entre as espécies. Ou seja, os animais mais derivados na escala evolutiva (Acanthopterygii) retiveram características do desenvolvimento inicial dos peixes mais basais (Ostariophysi). Dessa forma, sob uma visão ontogênica, explica-se a evolução pedomórfica, na qual os grupos mais derivados apresentam características durante sua ontogenia típicas da ontogenia de grupos mais basais.

Dentre os Ostariophysi, por exemplo, o Cypriniformes *Tanichthys albonubes* apresenta em sua primeira etapa de diferenciação gonadal masculina, estruturas acinares ao longo do tecido gonadal. Este estágio é igualmente encontrado em outros Cypriniformes como *Cyprinus carpio* (Mazzoni, 2009) e *Rutilus rutilus* (Paull *et al.*, 2008). Estes grupamentos celulares correspondem à primeira etapa da diferenciação gonadal de *Corydoras schwartzi*, outro Otophysi, porém pertencente à ordem Siluriformes, mais derivada que os Cypriniformes.

Nos Acanthopterygii, *Amatitlania nigrofasciata* e *Poecilia reticulata*, as estruturas acinares que compõem os cistos de espermatogônias na região ventral da gônada são mantidas durante a todas as etapas da diferenciação gonadal, desde os primeiros indícios da diferenciação gonadal e, embora não sejam mantidas nas gônadas adultas dos Otophysi, característica esta esperada, sob uma visão de pedomorfia, são preservadas durante todas as fases reprodutivas dos Acanthopterygii.

Assim, uma vez atribuída esta fundamentação, pode-se aplicar neste trabalho um padrão de diferenciação gonadal, no qual a ontogenia de grupos mais derivados recapitula um estágio pedomórfico dos grupos mais basais, tanto como uma característica da forma adulta, como também do próprio estágio ontogênico.

Além disso, após a diferenciação gonadal masculina dar-se por completa nos diferentes grupos, algumas características permanecem em comum entre as espécies mais basais e mais

derivadas. Por exemplo, o Cypriniformes *Tanichthys albonubes* passa a apresentar um testículo convictamente organizado em túbulos anastomosados. Porém, até que o animal atinja sua primeira maturação e dê início aos ciclos reprodutivos, as porções testiculares periféricas podem apresentar uma organização que se assemelha a estruturas lobulares ao invés de tubulares. Isto se deve ao fato de que, durante a primeira maturação, o testículo mostra-se ainda em processo de remodelação, apresentando uma grande quantidade de espermatogônias nas margens testiculares, as quais podem estar associadas ao crescimento testicular (observação pessoal).

Em *Amatitlania nigrofasciata*, esta mesma estruturação é encontrada durante a primeira maturação, fazendo com que os lóbulos irrestritos assemelhem-se a lóbulos restritos, na sua porção distal. Dessa forma, pode-se considerar que estas gônadas passam por um estágio de organização semi-restrita durante o processo de desenvolvimento testicular, até atingirem um padrão de organização conhecidamente do tipo lobular irrestrito.

3.2. A formação do epitélio germinativo masculino e a organização testicular

3.2.1. Diferenciação das células germinativas primordiais e das células somáticas

Durante a morfogênese gonadal, as gônadas masculinas dos Ostariophysii *Tanichthys albonubes* e *Corydoras schwartzi* bem como do Acanthopterygii *Amatitlania nigrofasciata*, apresentam inicialmente cordões contínuos de células germinativas primordiais, as quais sofrem uma reorganização estrutural, após intensa atividade mitótica das células germinativas primordiais. Esse padrão é comum entre os Teleostei, desde os mais basais como em *Cyprinus carpio* (Mazzoni, 2009) até os mais derivados, como em *Cichlasoma dimerus* (Meijide *et al.*, 2005). Nesta fase de diferenciação gonadal, as análises ultraestruturais confirmam que as células germinativas primordiais apresentam-se envolvidas por prolongamentos citoplasmáticos das células somáticas, as células pré-Sertoli (Meijide *et al.*, 2005; Mazzoni, 2009; Pandolfi *et al.*, 2009). Com a individualização das células germinativas primordiais, formam-se os cistos, nos quais, as agora espermatogônias, encontram-se circundadas e isoladas uma das outras pelos prolongamentos citoplasmáticos das agora células de Sertoli (Timmermans e Taverne, 1983; Parmentier e Timmermans, 1985; Nakamura *et al.*, 1998; Meijide *et al.*, 2005; Otani *et al.*, 2005; Çek, 2006). As células de Sertoli são tidas como

oriundas de células epiteliais (Hamaguchi, 1992; Grier, 1993) e ao envolverem as espermatogônias, estabelecem inúmeros complexos juncionais, que respondem pela integridade do cisto e composição da barreira hemato-testicular (Nagahama, 1983; Pudney, 1993; Meijide *et al.*, 2005; Schulz *et al.*, 2010). Concomitantemente, a membrana basal passa a ser sintetizada, separando desde o início da diferenciação gonadal, o futuro compartimento germinativo dos demais componentes somáticos, que darão origem ao tecido intersticial (Mazzoni, 2009; presente estudo).

No Ostariophysi *Gymnocorymbus ternetzi* o processo que resulta na formação de um cisto é o mesmo descrito acima, porém como a diferenciação gonocórica é indireta, as células germinativas primordiais, uma vez encistadas, irão originar, no início do processo de morfogênese gonadal, oogônias ao invés de espermatogônias. As células germinativas primordiais são semelhantes em ambos os sexos, mantendo-se indiferenciadas até serem expostas a fatores externos e influências hormonais que as induzem à diferenciação em oogônia ou espermatogônia (Devlin e Nagahama, 2002). Dessa forma, e sabendo-se da alta bipotencialidade das células germinativas para transformar-se em oogônias ou espermatogônias, de acordo com o estímulo recebido (Devlin e Nagahama, 2002; Kobayashi *et al.*, 2013), células-tronco originárias das células germinativas primordiais devem manter-se quiescentes durante o desenvolvimento do tecido gonadal feminino, tornando-se ativa em determinado momento para constituir o tecido gonadal masculino e dar prosseguimento à diferenciação gonadal nos machos de *Gymnocorymbus ternetzi*. Os mecanismos envolvidos parece não diferirem daqueles encontrados em animais adultos hermafroditas ou que apresentam reversão sexual bidirecional, bem como nas espécies em que o desenvolvimento sexual dos juvenis é alterado por fatores sociais ou exógenos. Em todos os casos, os animais apresentam igualmente enorme plasticidade em seus padrões sexuais (Sadovy de Mitcheson e Liu, 2008).

3.2.2. A organização testicular: a formação do epitélio germinativo masculino e a constituição dos túbulos seminíferos e lóbulos testiculares

Alguns eventos que se seguem na diferenciação gonadal para formação de um testículo são comuns entre os grupos de animais aqui analisados, enquanto outros são bastante divergentes, dependendo do tipo de organização testicular encontrado em cada espécie.

Após a formação de grupamentos celulares de espermatogônias, circundados por células de Sertoli, definidos aqui como ácidos, cada espécie segue um determinado padrão de diferenciação gonadal.

Tanichthys albonubes e *Amatitlania nigrofasciata*, por exemplo, apesar de pertencerem a grupos filogenéticos distantes, apresentam pontos bastante semelhantes no início da diferenciação gonadal, especialmente durante a formação de um espaço luminal no interior dos ácidos, constituindo os primeiros túbulos testiculares em *Tanichthys albonubes* e o primórdio de um lóbulo testicular em *Amatitlania nigrofasciata*. Nesta etapa, a gônada de uma espécie mais basal apresenta, portanto, o mesmo padrão de organização de uma gônada de uma espécie mais derivada. A partir daí, o rumo da diferenciação gonadal torna-se divergente.

O processo de formação dos túbulos testiculares que ocorrem em *Tanichthys albonubes*, no presente estudo, é idêntico ao encontrado no também Cypriniformes *Cyprinus carpio* por Mazzoni (2009). Em ambos os Cypriniformes *Tanichthys albonubes* (presente estudo) e *Cyprinus carpio* (Mazzoni, 2009), o que se segue é uma anastomose entre túbulos testiculares adjacentes recém-formados. Rearranjos celulares na região livre de membrana basal entre conjuntos de cistos adjacentes permitem a sua fusão ou confluência, ampliando o lúmen testicular, que se torna maior e sinuoso, caracterizando o padrão de organização deste testículo como tubular anastomosada já no início da diferenciação gonadal.

Em contrapartida, em *Amatitlania nigrofasciata*, cada lóbulo testicular até então esférico, torna-se gradativamente mais alongado, havendo confluência somente na região dorsal. Nesta porção testicular, os compartimentos luminiais de cada lóbulo tornam-se contínuos à região do ducto espermático, criando estruturas verdadeiramente digitiformes, que terminam em fundo cego, no qual se encontram verdadeiros aglomerados de espermatogônias, definindo, assim, um lóbulo testicular.

Com o aparecimento do lúmen testicular delimitando os lóbulos ou túbulos testiculares, todos os critérios pelos quais o epitélio germinativo é definido encontram-se agora reunidos no

tecido gonadal do Otophysi *Tanichthys albonubes* e do Percomorpha *Amatitlania nigrofasciata*.

Amatitlania nigrofasciata, compartilha não só semelhanças com grupos mais basais como *Tanichthys albonubes*, mas também com o Atherinomorpha *Poecilia reticulata*. Ambas as espécies *Amatitlania nigrofasciata* (Perciformes) e *Poecilia reticulata* (Cyprinodontiformes), representantes dos Neoteleostei, apresentam um acúmulo de células somáticas na porção dorsal do tecido gonadal durante a formação da gônada indiferenciada. Nesta região, ocorrerá a formação do ducto espermático em um estágio de diferenciação gonadal ainda bastante inicial. Este dado coincide com alguns relatos descritos anteriormente para outras espécies de Perciformes (Nakamura e Takahashi, 1973; Nakamura e Nagahama, 1985, 1989; Meijide *et al.*, 2005; Pandolfi *et al.*, 2009) e Cyprinodontiformes (Guerrero-Estévez e Moreno-Mendoza, 2012). Em concordância aos referidos autores, a formação do ducto testicular, em muitos Teleostei, constitui um indício bastante confiável para reconhecimento do início da diferenciação testicular, antes mesmo que haja qualquer início de meiose.

Após a proliferação das células germinativas primordiais, tanto *Amatitlania nigrofasciata* quanto *Poecilia reticulata* apresentam grupamentos celulares de espermatogônias, formando estruturas em formas de cachos. Neste estágio de diferenciação gonadal, a morfologia gonadal de ambas as espécies são bastante semelhantes, tornando-se posteriormente distintas, principalmente pela diferenciação dos ductos testiculares em *Poecilia reticulata*. Diferente do que ocorre em *Amatitlania nigrofasciata* que mantém seus ductos com tamanhos inicialmente reduzidos, os ductos testiculares de *Poecilia reticulata* desenvolvem-se e se ramificam, passando a apresentar um epitélio simples cilíndrico.

Outra diferença marcante entre as espécies é o fato de que em *Poecilia reticulata*, conforme esperado, não há formação de lúmen no interior dos lóbulos, nem mesmo durante os eventos da diferenciação gonadal, e as espermatogônias concentram-se na periferia do tecido, caracterizando um testículo lobular restrito. Em *Amatitlania nigrofasciata*, embora haja uma concentração de espermatogônias na porção terminal de cada lóbulo testicular, as espermatogônias distribuem-se aleatoriamente, desde a região dorsal até a região ventral conforme se dá o crescimento do lóbulo.

Em relação ao outro Otophysi aqui estudado, o Siluriformes *Corydoras schwartzi*, sua diferenciação gonadal é bastante interessante, uma vez que apresenta etapas iniciais na diferenciação que remetem às características de uma gônada desprovida de lúmen.

Apesar dos eventos iniciais se distanciarem morfológicamente dos eventos que ocorrem em outros animais, mesmo dentro de Otophysi, a diferenciação gonadal em *Corydoras schwartzi* apresenta eventos que se assemelham às alterações estruturais que ocorrem no epitélio germinativo ao longo do ciclo reprodutivo em animais sexualmente maduros pertencentes à mesma família Callichthyidae da espécie em questão. Dentre os Callichthyidae, os representantes do gênero *Corydoras* apresentam uma espermatogênese do tipo semi-cística, na qual as espermátides são liberadas do cisto e completam sua espermiogênese no lúmen testicular e não no interior dos cistos (Spadella *et al.*, 2007; Mazzoldi *et al.*, 2007). Assim, em um primeiro momento da diferenciação gonadal, as espermatogônias, após formarem cistos que constituem diversos ácinos espalhados por todo o tecido gonadal, entram em meiose originando espermátócitos que acabam por ser degenerados no interior de cada ácino. Após a degeneração do centro da estrutura acinar, alguns cistos de espermatogônias remanescentes repovoam o epitélio acinar, tornando-o novamente contínuo. Dessa forma, o epitélio germinativo em *Corydoras schwartzi* encontra-se formado, bem como os túbulos testiculares. Degeneração semelhante do tecido gonadal foi descrita para o Perciformes *Siganus guttatus*, porém, neste caso, o processo resultou na formação dos ductos eferentes (Nakamura, *et al.*, 2006). Portanto, no caso de *Corydoras schwartzi*, os eventos que ocorrem na diferenciação gonadal parecem estar mais relacionados com a modelação de uma estrutura final adulta previamente definida na espécie do que com processos evolutivos, exceto pela semelhança dos ácinos entre todos os grupos aqui analisados, e da entrada em meiose em um testículo ainda desprovido de lúmen, assemelhando-se a estrutura gonadal de testículos lobulares restritos, como em *Poecilia reticulata* (presente estudo).

Após a formação dos túbulos testiculares, o padrão de diferenciação gonadal em *Corydoras schwartzi* torna-se os mesmos descritos para *Tanichthys albonubes* (presente estudo) e a gônada passa a apresentar uma organização do tipo tubular anastomosada, a mesma encontrada nos demais Siluriformes e grupos basais (Parenti e Grier, 2004).

Em outro Otophysi aqui analisado, *Gymnocorymbus ternetzi*, porém pertencente à ordem Characiformes, o tecido gonadal, inicialmente feminino, passa por remodelações para formar o epitélio germinativo masculino. Até o presente momento, não há dados na literatura sobre a formação do epitélio germinativo em outros Characiformes, especialmente em espécies gonogorísticas com diferenciação direta, o que permitiria a comparação dos padrões e eventos envolvidos em Characiformes com os demais grupos de Teleostei.

Dentre os Otophysi, não há relatos até o presente momento sobre casos de espécies gonogorísticas com diferenciação indireta nos Characiformes, porém algumas espécies de pertencentes a outras ordens são exaustivamente conhecidas, como o Cypriniformes *Danio rerio*. Nesta espécie, como também em outro Cypriniformes *Barbus tetrazona* (Takahashi, 1977; Takahashi e Shimizu, 1983) todas as gônadas desenvolvem-se inicialmente em ovários, porém em etapas mais avançadas, aproximadamente metade da população apresenta degeneração do tecido gonadal, que é subsequentemente invadido por células somáticas. Em seguida, ocorre masculinização da gônada e desenvolve-se um tecido intersexual, que posteriormente assume a condição de testículos normais (Devlin e Nagahama, 2002), exatamente como ocorre para *Gymnocorymbus ternetzi*, sustentando a hipótese de sua condição gonocorística indiferenciada. Após o processo de degeneração nas gônadas de *Gymnocorymbus ternetzi*, células somáticas reorganizam-se no tecido degenerado, delimitando um espaço e aprisionando espermatogônias adjacentes, que passam a compor o epitélio germinativo. Consequentemente, os túbulos testiculares se estabelecem e tornam-se anastomosados, como os demais Otophysi.

3.2.3. Organização testicular

Apesar de cada espécie aqui analisada apresentar padrões específicos durante a diferenciação gonadal, posteriormente à diferenciação, todas elas compartilham uma mesma característica: assim como os demais Teleostei já diferenciados e maduros sexualmente, os testículos de *Tanichthys albonubes*, *Gymnocorymbus ternetzi*, *Corydoras schwartzii*, *Amatitlania nigrofasciata* e *Poecilia reticulata* mantêm-se formados por dois compartimentos: o compartimento germinativo, constituído pelo epitélio germinativo que margeia os lóbulos e túbulos testiculares, e o compartimento intersticial, ambos separados por uma membrana basal

(Grier, 1992, 1993; Loir *et al.*, 1995; Pudney, 1996; Grier e Lo Nostro, 2000; Grier e Uribe, 2009).

A organização testicular, seja nos Ostariophysi ou nos Acanthopterygii, até então de difícil detecção pelos métodos de coloração convencionais, como por exemplo, o método de PAS ou pela imagem negativa das gônadas maduras dos animais sexualmente adultos (Grier, 1992), pode aqui finalmente ser delineada com clareza quando do uso da metodologia que utiliza a afinidade pela prata para contrastar as fibras reticulares, permitindo o acompanhamento tanto dos diferentes padrões de organização testicular, como da formação e estabelecimento do epitélio germinativo, através da membrana basal (Mazzoni *et al.*, 2009).

Uma vez organizados os compartimentos testiculares de *Tanichthys albonubes*, *Gymnocorymbus ternetzi*, *Corydoras schwartzi*, *Amatitlania nigrofasciata* e *Poecilia reticulata*, a espermatogênese tem início. Nos animais já diferenciados, os cistos de células germinativas distribuem-se aleatoriamente ao longo dos túbulos testiculares nos Otophysi ou dos lóbulos testiculares no Percomorpha, compondo o epitélio germinativo, agora permanentemente ativo. No Atherinomorpha, as espermatogônias permanecem concentradas na porção distal dos lóbulos, enquanto ao longo do lóbulo a espermatogênese progride e os espermatozóides são liberados para o ducto espermático (Parente e Grier, 2004).

Como na maioria dos Teleostei a espermatogênese em *Tanichthys albonubes*, *Gymnocorymbus ternetzi*, *Amatitlania nigrofasciata* e *Poecilia reticulata* é cística, o processo no interior de cada cisto ocorre de forma sincrônica, ou seja, em cada cisto células germinativas encontram-se em uma mesma fase de desenvolvimento. As espermatogônias dividem-se mitoticamente dando origem às espermatogônias secundárias, as quais através de divisões meióticas darão origem aos espermátócitos, que se diferenciam em espermátides e espermatozóides (Grier, 1981; 2002; Billard, 1986; Pudney, 1995; Guraya, 2001; Grier e Uribe, 2009).

Já em *Corydoras schwartzi* a escassez de cistos de espermátócitos e a falta de cistos de espermátides nos túbulos testiculares é uma indicação da ocorrência de espermatogênese do tipo semi-cística, na qual as espermátides são liberadas no lúmen testicular, local em que completam sua maturação, dando origem aos espermatozóides (Mattei *et al.*, 1993). Essas

mesmas características também foram observadas em outras espécies de *Corydoras* (Mazzoldi *et al.*, 2007).

Considerada como característica dos Teleostei mais basais, como os Ostariophysi (Grier, 1993; Grier e Uribe, 2009), portanto nos também Otophysi aqui analisados *Tanichthys albonubes*, *Gymnocorymbus ternetzi* e *Corydoras schwartzi*, a organização testicular em animais totalmente diferenciados é do tipo tubular anastomosada. Neste tipo de organização testicular, os túbulos sofrem anastomoses em diferentes regiões do testículo, especialmente na região do ducto espermático (Grier, 1993; Grier e Uribe, 2009). Conforme acima descrito, estas anastomoses ocorrem gradualmente ao longo de todo processo de diferenciação das gônadas, sucedem a formação dos túbulos testiculares, decorrentes da fusão de conjuntos de cistos adjacentes e respondem pela organização do tipo tubular anastomosada dos testículos dos Ostophysi (presente estudo).

Descrito para os Teleostei mais derivados, ocorrendo nos Acanthopterygii e, portanto em *Amatitlania nigrofasciata* e *Poecilia reticulata*, o testículo lobular apresenta o compartimento germinativo, em formato digitiforme, terminando em fundo cego na periferia testicular, sendo do tipo restrito nos Atherinomorpha e irrestrito nos Percomorpha, de acordo com a localização das espermatogônias ao longo do lóbulo testicular (Grier, 1993; Parenti e Grier, 2004; Grier e Uribe, 2009).

4. Expressão de enzimas esteroidogênicas e a determinação sexual

A esteroidogênese, a determinação sexual e a diferenciação gonadal estão intimamente relacionadas entre si (Hofsten e Olsson, 2005; ver Nagahama, 2005 para revisão). Porém, a dificuldade na detecção de enzimas envolvidas, bem como na demonstração de evidências e provas bioquímicas de uma síntese endógena eficaz de esteróides durante as primeiras etapas da diferenciação gonadal pode ser explicada pelos obstáculos enfrentados para avaliação de tais substâncias em pequenos tecidos gonadais que compõem as gônadas de peixes em diferenciação (Vizziano *et al.*, 2007).

A aromatase gonadal (Cyp19a1a), produto do gene Cyp19, é produzida nas gônadas e dirige a conversão de testosterona em 17 β -estradiol, constituindo um importante regulador esteroidogênico (Nagahama, 1994). No presente trabalho, a aromatase parece estar envolvida

na diferenciação ovariana, tanto de peixes gonocorísticos diretos como de gonocorísticos indiretos, não estando claro seu papel na diferenciação testicular (ver Guan-Chung *et al.*, 2008 para revisão) uma vez que gônadas supostamente femininas apresentaram intensa marcação, ao passo que nenhuma resposta foi encontrada em gônadas supostamente masculinas. No Perciformes *Oryzias latipes* a aromatase também é expressa antes da diferenciação morfológica dos ovários (Nakamura *et al.*, 1998), concordando com os dados aqui obtidos, tanto nos Otophysi, quanto nos Neoteleostei. Entretanto, aparentemente, a aromatase não está diretamente relacionada à diferenciação testicular, porém uma vez que é expressa em etapas mais avançadas em gônadas masculinas, parece assumir um outro papel nos machos após a diferenciação.

A hipótese de que a aromatase está envolvida na diferenciação gonadal feminina pode ser sustentada através de estudos realizados com inibidores de aromatase, que resultaram na formação de machos fenotípicos em animais geneticamente femininos, demonstrando a importância da síntese de estrógeno para o desenvolvimento de uma gônada feminina (Vizziano *et al.*, 2008; Vizziano-Cantonnet *et al.*, 2008)

Contraditoriamente à expressão de aromatase, a expressão de 3 β -hidroxiesteroide desidrogenase (3 β -HSD) parece estar relacionada ao início do processo de espermatogênese, aparecendo somente em gônadas masculinas que já apresentavam epitélio germinativo definido. Portanto, não se pode afirmar seu envolvimento na diferenciação testicular, mas sim durante o início da espermatogênese. A enzima 3 β -HSD está envolvida em diversas etapas da biossíntese dos hormônios esteroides, sendo responsável pelas conversões de pregnenolona em progesterona; 17 α -hidroxipregnenolona em 17 α -hidroxiprogesterona; dehidroepiandrosterona em androstenediona; e androstenediol em testosterona (Kobayashi *et al.*, 1996), estando envolvida, portanto, na manutenção da espermatogênese. Neste aspecto, a função de andrógenos durante a diferenciação testicular ainda é bastante controversa, uma vez que sua síntese nem sempre pode ser detectada em estágios que precedem a diferenciação testicular nos Teleostei (Nakamura *et al.*, 1998; 2003).

Nas gônadas femininas, a marcação para enzima 3 β -HSD só se iniciou em gônadas já desenvolvidas com oócitos com seus complexos foliculares totalmente formados. Em algumas gônadas femininas, esporadicamente, algumas células do estroma responderam à marcação,

porém fracamente. Essa marcação positiva para 3β -HSD em células intersticiais e foliculares de fêmeas em processo avançado de desenvolvimento oocitário pode ser atribuída à funções esteroidogênicas exercidas por estas células no ovário, funções estas ainda bastante controversas (Nakamura *et al.*, 1998; 2003).

CONCLUSÕES

- Nos Otophysi, apesar do desenvolvimento dos primórdios gonadais ser semelhante nas fêmeas e nos machos, a distinção sexual ocorre cedo nas gônadas ainda indiferenciadas e pode ser morfológicamente detectada após o momento em que as células germinativas primordiais, associadas às células somáticas epiteliais (células pré-Sertoli e pré-foliculares), perdem a organização cordonal.

- Nos Neoteleostei, a distinção feminina e masculina é facilmente detectável pela organização das células no tecido gonadal: células germinativas primordiais na região ventral e células somáticas na região dorsal.

- Nos Neoteleostei, a diferenciação feminina e masculina pode ser distinguida pelos padrões de organização da construção da membrana basal, nas primeiras fases da gônada indiferenciada.

- Na espécie gonocorística indiferenciada, a ausência da membrana basal nas primeiras etapas da diferenciação pode estar ligada à remodelação tecidual que irá se suceder.

- Em todas as espécies, tanto nas gônadas supostamente femininas como nas masculinas, as células somáticas epiteliais ao se associarem às células germinativas primordiais formam cistos no interior dos quais ocorrerá a formação e diferenciação inicial dos gametas femininos, e a formação e diferenciação dos gametas masculinos.

Na diferenciação gonadal masculina:

- Os padrões de organização testicular encontrados durante a diferenciação gonadal nos Otophysi e os Neoteleostei, quando comparados, sustentam a hipótese da evolução pedomórfica ao se considerar a estrutura acinar como elemento pedomórfico.

- Em todas as espécies, as células germinativas e as células epiteliais a elas associadas estão segregadas dos demais componentes celulares presentes nas gônadas em diferenciação por uma membrana basal, desde a formação dos cordões pelas células germinativas primordiais até a constituição do epitélio germinativo, e assim permanecem nas gônadas diferenciadas.

- Nos Neoteleostei, a primeira estrutura que marca a diferenciação gonadal masculina é a formação do ducto espermático, última estrutura a se formar nos Otophysi.

- Em *Tanichthys albonubes* e *Amatitlania nigrofasciata*, é a partir da associação entre células epiteliais de cistos contíguos que se formam os conjuntos de cistos que caracterizam as gônadas masculinas. São estas que ao se afastarem no centro dos conjuntos de cistos dão início a formação do compartimento luminal dos testículos.

- A fusão entre ácinos vizinhos que apresentam compartimento luminal em *Tanichthys albonubes* e o alongamento dos ácinos em *Amatitlania nigrofasciata* dá origem aos túbulos e lóbulos testiculares respectivamente, e, conseqüentemente, ao epitélio germinativo que os reveste.

- É a partir da degeneração de um tecido gonadal feminino e posterior remodelação que se forma o tecido gonadal masculino em *Gymnocorymbus ternetzi*.

- Em *Corydoras schwartzi* o epitélio germinativo masculino só é estabelecido após a proliferação de espermatogônias, seguida da degeneração intra-ácinar.

- As porções secretoras nos testículos de *Corydoras schwartzi* são constituídas por câmaras secretoras, oriundas da formação de túbulos inicialmente germinativos, mantendo um padrão tubular anastomosado, mesmo após tornarem-se estritamente secretoras.

- A organização tubular anastomosada dos testículos dos Otophysi deve-se a fusão progressiva entre os conjuntos de cistos vizinhos nas gônadas em diferenciação e se continua com a anastomose dos túbulos nas gônadas já diferenciadas, formando ao final do desenvolvimento da gônada, o ducto testicular.

- Nos três representantes dos Otophysi, a organização testicular do tipo tubular anastomosada é definida já nas primeiras fases da diferenciação gonadal.

- A atividade da enzima 3 β -HSD está associada ao início da espermatogênese em todas as espécies analisadas.

Na diferenciação gonadal feminina:

- A foliculogênese é um processo bastante conservado entre os Teleostei mais basais e os mais derivados, não havendo qualquer diferença entre as espécies.

- Em todas as espécies, a diferenciação gonadal feminina é marcada pela entrada das oogônias em meiose.

- Em todas as espécies, a formação do cisto-ovário se dá após a entrada em meiose e precede a formação das lamelas ovígeras.

- Em *Tanichthys albonubes*, *Gymnocorymbus ternetzi* e *Amatitlania nigrofasciata*, a partir da invaginação das células epiteliais oriundas da periferia das gônadas femininas compactas formam-se as lamelas ovígeras e a sua consequente associação com os componentes germinativos que leva à constituição do epitélio germinativo que margeia as lamelas.

- É a partir do afastamento de células somáticas na região central da gônada de *Corydoras schwartzi* que se forma o lúmen ovariano, e consequentemente, as lamelas ovígeras são estabelecidas, sendo margeadas por um epitélio somático que se associa às oogônias, constituindo o epitélio germinativo feminino.

- Nos Otophysi e Neoteleostei, no interior das lamelas ovígeras a formação dos espaços extravasculares é decorrente do afastamento entre as células somáticas mesenquimais as quais respondem também pela organização do estroma ovariano e a organização da teca nos complexos foliculares.

- A atividade da enzima Cyp19a1a parece ser um indicador da diferenciação ovariana, em etapas bastante iniciais do processo de diferenciação gonadal.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alberts B; Johnson A; Lewis J, Raff M; Roberts K; Walter P. (2008). *Molecular biology of the cell*. 5th ed. New York: Garland Science. p. 1268.
- Avise JC; Mank JE. (2008). Evolutionary Perspectives on Hermaphroditism in Fishes. *Sex Dev.* 3:152–163.
- Baylis, JR. (1981). The evolution of parental care in fishes, with reference to Darwin's rule male sexual selection. *Env. Biol. Fishes*, 6: 223-251.
- Baroiller JF; D’Cotta H. (2001). Environment and sex determination in farmed fish. *Comp. Biochem. Physiol. C*, 130: 399-409.
- Benjamin, LA. (2004) Caracterização dos ovários, do desenvolvimento ovocitário, e da recuperação ovariana pós-parto do platy (*Xiphophorus maculatus*) (Teleostei, Poeciliidae). Tese de doutorado. Unicamp, Campinas, SP.
- Billard R. (1986). Spermatogenesis and spermatology of some teleost fish species. *Reprod. Nutr. Dev.*, 26: 877-1024.
- Blázquez M; Somoza GM. (2010). Fish with thermolabile sex determination (TSD) as models to study brain sex differentiation. *Gen. Comp. Endocrinol.*, 166: 470–477.
- Blumer LS. (1982). A bibliography and categorization of bonyfishes exhibiting parental care. *Zool. J. Lin. Soc.*, 76: 1-22.
- Braat AK; Speksnijder JE; Zivkovic D. (1999a). Germ line development in fishes. *Int. J. Dev. Biol.*, 43: 45-760.
- Braat AK; Zandbergen T; Van De Water S; Henk J Th Goos HJT; Zivkovic D. (1999b). Characterization of Zebrafish Primordial Germ Cells: Morphology and Early Distribution of vasa RNA. *Dev. Dynam.*, 216: 153-167.
- Brown-Peterson NJ; Grier HJ; Overstreet RM. (2002). Annual changes in germinal epithelium determine male reproductive classes of the cobia. *J. Fish. Biol.*, 60:178-202.
- Çek S. (2006). Early gonadal development and sex differentiation in rosy barb (*Puntius conchonius*). *Anim. Biol.*, 56:335-350. Cesar, M.P.; Murgas, L.D.S.; Araújo, R.V.; Drummond, C.D. (2005). Métodos para obtenção de população monosexo na piscicultura. *Bol. Agropec. Universidade Federal de Lavras- MG*, 69: 1-27.
- Cesar MP; Murgas LDS; Araújo RV; Drummond CD. (2005). Métodos para obtenção de população monosexo na piscicultura. *Bol. Agropec. Universidade Federal de Lavras- MG*, 69: 1-27.
- Colombo G; Grandi G; Rossi R. (1984). Gonad differentiation and body growth in *Anguilla anguilla* L. *J. Fish. Biol.*, 24: 215-228.
- Colombo G; Grandi G. (1996). Histological study of the development and sex differentiation of the gonad in the European eel. *J. Fish. Biol.*, 48:493-512.
- Connaughton MA; Aida K. (1998). Female reproductive system, fish. In: Krobil, E.; Neill, J. D. (ed.). *Encyclopedia of Reproduction*. San Diego, Academic Press. p. 193-205.
- Constantz GD. (1989). Reproductive biology of Poeciliid fishes. In: Ecology and evolution of livebearing fishes (Poeciliidae) (Meffe GK, Snelson FF, eds). Englewood Cliffs, New Jersey: Prentice Hall; 33-50.
- Davies PR; Takashima, F. (1980). Sex determination in common carp, *Cyprinus carpio*. *J. Tokyo Univ. Fish.*, 66: 191-199.
- Devlin RH; Nagahama Y. (2002). Sex determination and sex differentiation in fish: an overview of genetic, physiological, and environmental influences. *Aquaculture*, 208:191–364.
- Dodd JM; Sumpter JP. (1986). Fishes. In: Lamming GE, editor. *Marshall’s Physiology of Reproduction*, Vol. 1. London: Churchill Livingstone. Chapter 1: 1–126.

- Fink SV; Kink WL. (1981). Interrelationships of the ostariophysan fishes (Teleostei). *Zool. J. Linn. Soc.*, London, 72: 297-353.
- FishBase. (2013). Froese, R.; Pauly, D. Editors. World Wide Web electronic publication. www.fishbase.org, version (06/2013).
- Flores JA; Burns JR. (1993). Ultrastructural study of embryonic and early adult germ cells, and their support cells, in both sexes of *Xiphophorus* (Teleostei: Poecillidae). *Cell Tissue Res.*, 271:263-270.
- Foyle TP. (1993). A histological description of gonadal development and sex differentiation in the salmon (*Oncorhynchus kisutch*) for both untreated and estradiol immersed fry. *J. Fish. Biol.*, 42: 699-712.
- França GF; Grier H J; Quagio-Grassiotto I. (2010). A new vision of the origin and the oocyte development in the Ostariophysi applied to *Gymnotus sylvius* (Teleostei: Gymnotiformes). *Neotr. Ichthyol.*, 8: 787-804.
- Frisch A. (2004). Sex-change and gonadal steroids in sequentially-hermaphroditic fish. *Rev. Fish Biol. Fisheries*, 14: 481-99.
- García-Alonso J; Ruiz-Navarro A; Chaves-Pozo E; Torralva M; García-Ayala A. (2009). Gonad plasticity and gametogenesis in the endangered Spanish toothcarp *Aphanius iberus* (Teleostei: Cyprinodontidae). *Tissue and Cell*, 41: 206-213.
- Gevers P; Dulos J; Schipper H; Timmermans LPM. (1992). Origin of primordial germ cells, as characterized by the presence of nuage in embryos of the teleost fish *Barbus conchoniuis*. *Eur. J. Morphol.*, 30:195-204.
- Grandi G; Colombo G. (1997). Development and early differentiation of gonad in the European eel (*Anguilla Anguilla* [L], Anguilliformes, Teleostei): a cytological and ultrastructural study. *J. Morphol.*, 231:195-216.
- Grier HJ; Linton JR; Leatherland JF; De Vlaming VL. (1980). Structural evidence for two different testicular types in teleost fishes. *Amer. J. Anat.*, 159: 331-345.
- Grier HJ. (1981). Celular organization of the testis and spermatogenesis in fishes. *Amer. Zool.*, 21: 345-357.
- Grier HJ; Van Den Hurk R; Billard, R. (1989). Cytological identification of cells types in the testis of *Esox lucius* and *E. niger*. *Cell Tissue Res.*, 257:491-496.
- Grier HJ. (1992). Chordate testis: the extracellular matrix hypothesis. *J. Experiment. Zool.*, 261: 151-160.
- Grier, HJ. (1993). Comparative organization of Sertoli cells including the Sertoli cell barrier. In: *The Sertoli cell*, (Russel L.D. & Griswold, M.D., eds.) Clearwater, Cache River Press. pp. 704-730.
- Grier HJ; Taylor RG. (1998). Testicular maturation and regression in the common snook. *J. Fish Biol.*, 53: 521-542.
- Grier HJ. (2000). Ovarian germinal epithelium and folliculogenesis in the Common Snook, *Centropomus undecimalis* (Teleostei: Centropomidae). *J. Morphol.*, 243: 265-281.
- Grier, HJ; Lo Nostro F. (2000). The germinal epithelium in fish gonads: the unifying concept. In: Norberg, B.; Kjesbu, O.S.; Taranger, G.L.; Andersson, E.; Stefansson, S.O. editors. *Proceedings of the 6th International Symposium on the Reproductive Physiology of Fish*. Norway: University of Bergen. pp.233-236.
- 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 MC; Parenti LR, Rosa-Cruz G. (2005). Fecundity, the Germinal, and Folliculogenesis in Viviparous fishes. *Viviparous Fishes*, First edition published by New Life Publication. pp. 191-216.
- Grier HJ; Uribe 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 MC. (2009). The Testis and Spermatogenesis in Teleosts. In: Jamieson, B.J.M. (Ed): *Reproductive Biology and Phylogeny of Fishes (Agnathans and Bony Fishes) Phylogeny Reproductive System Viviparity Spermatozoa*. 802p.
- Grier JH; Uribe MC; Patiño R. (2009). The ovary, folliculogenesis and oogenesis in teleosts. In: Jamieson, B.J.M. (Ed): *Reproductive Biology and Phylogeny of Fishes (Agnathans and Bony Fishes) Phylogeny Reproductive System Viviparity Spermatozoa*. 802p.
- Grove, BD; Wourms JP. (1994). Follicular placenta of the viviparous fish, *Heterandria formosa*. II. Ultrastructure and development of the follicular placenta. *J. Morphol.*, 220:167-184.
- Guan-Chung W; Tomy S; Nakamura M; Ching-Fong C. (2008). Dual Roles of *cyp19a1a* in Gonadal Sex Differentiation and Development in the Protandrous Black Porgy, *Acanthopagrus schlegelii*. *Biol. Reprod.*, 79: 1111–1120.
- Guraya SS. (2001). Comparative cellular and molecular biology of testis in vertebrates. Trends in endocrine, paracrine and autocrine regulation of structure and functions. Enfield, Science Publishers, Inc. 91p.
- Guerrero-Estévez S; Moreno-Mendoza N. (2010). Sexual determination and differentiation in teleost fish. *Rev Fish Biol Fisheries*, 20:101-121.
- Guerrero-Estévez S; Moreno-Mendoza N. (2012). Gonadal morphogenesis and sex differentiation in the viviparous fish *Chapalichthys encaustus* (Teleostei, Cyprinodontiformes, Goodeidae). *J. Fish. Biol.*, doi:10.1111/j.1095-8649.2011.03196.x.
- Hamaguchi S. (1982). A light- and electron-microscopic study on the migration of primordial germ cells in the teleost, *Oryzias latipes*. *Cell Tiss Res.*, 227:139-151.
- Hamaguchi S. (1992). Sex differentiation of germ cells and their supporting cells in *Oryzias latipes*. *Fish Biol J. Medaka*, 4:11-18.
- Helfman GS; Collette BB; Facey D. (2000). Teleosts at last I: Bony-tongues through Anglerfishes. In: *The diversity of fishes*. Blackwell, Massachusetts, p. 221-243.
- Hoar WS. (1969). Reproduction. In: Hoar, W.S. & Randall, D.J. editors. *Fish Physiol*. New York: Academic Press, 111: chap.1.
- Hofsten JV; Olsson, PE. (2005). Zebrafish sex determination and differentiation: Involvement of FTZ-F1 genes. *Reprod. Biol. Endocr.*, 3:63.
- Javonillo R; Burns JR; Weitzman SH. (2007). Reproductive morphology of *Brittanichthys axelrodi* (teleostei: Characidae), a miniature inseminating fish from South America. *J. Morphol.*, 268:23-32
- Jia R; Nie L-W; Wang N; Wang J. (2009). Molecular cloning and expression patterns of the *Vasa* gene from *Rana nigromaculata* (Amphibia: Anura). *Zool.*, 26(2): 316-322.
- Junqueira LC; Carneiro J. (1999). *Histologia Básica*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 433p.
- Kobayashi T; Chang XT; Nakamura M; Kajiura H; Nagahama Y. (1996). Fish 3 β -Hydroxysteroid Dehydrogenase/ Δ 5- Δ 4Isomerase: Antibody Production and Their Use for the Immunohistochemical Detection of Fish Steroidogenic Tissues. *Zool. Science*, 13(6): 909-914.
- Kobayashi T; Kajiura-Kobayashi H; Nagahama Y. (2000). Differential expression of *vasa* homologue gene in the germ cells during oogenesis and spermatogenesis of a teleost fish, tilapia, *Oreochromis niloticus*. *Mech. Develop.*, 99: 139-142.
- Kobayashi T; Ishibashi R; Yamamoto S; Otani S; Ueno K; Murata O. (2011). Gonadal morphogenesis and sex differentiation in cultured chub mackerel, *Scomber japonicas*. *Aquacult. Res.*, 42: 230-239.
- Kobayashi Y; Nagahama Y; Nakamura M. (2013). Diversity and Plasticity of Sex Determination and Differentiation in Fishes. *Sex Dev*. DOI: 10.1159/000342009
- Kunz YW. (2004). *Developmental Biology of Teleost Fishes*. Dordrecht, Springer. 636p.

- Lacerda SMSN; Aponte PM; Costa GMJ; Campos-Junior PHA; Segatelli TM; Silva MA, França LR. (2012). An overview of spermatogonial stem cell physiology, niche and transplantation in fish. *Anim. Reprod.*, 9:798-808.
- Le Gac F; Loir M. (1999). Male Reproductive System, Fish. In: Knobil, E. & Neill, J.D. editors. *Encyclopedia of Reproduction*. San Diego: Academic Press, 3: 20-30.
- Le Menn F; Cerdà J; Babin PJ. (2007). Ultrastructural aspects of the ontogeny and differentiation of ray-finned fish ovarian follicles. In: Babin, J.P., Cerdà and Lubzens E. (Eds): *The Fish Oocyte: From Basic Studies to Biotechnological Applications*, Springer, Dordrecht. pp.1-37.
- Loir M; Cauty C; Planquette P; Le Bail PY. (1989). Comparative study of the male reproductive tract in seven families of South-American catfishes. *Aquat. Living Resour.*, 2: 45-56.
- Loir M; Sourdain P; Mendis-Handagama SMLC; Jégou B. (1995). Cell-cell interactions in the testis of teleosts and elasmobranchs. *Microsc. Res. Tech.*, 32: 533-552.
- Lo Nostro FL. (2000). Espermatogénesis, ciclo anual e inducción hormonal de la espermiación en el pez protogínico diándrico, *Synbranchus marmoratus*, Bloch, 1795 (Teleostei, Synbranchidae). Tesis Doctoral. Depto. de Ciencias Biológicas, Facultad de Ciencias Exactas, Hemeroteca, Universidad de Buenos Aires, Argentina.
- Lo Nostro F; Grier H; Andreone L; Guerrero, GA. (2003). Involvement of the gonadal germinal epithelium during sex reversal and seasonal testicular cycling in the protogynous swamp eel, *Synbranchus marmoratus* Bloch 1795 (Teleostei, Synbranchidae). *J. Morphol.*, 257: 107-126.
- Lubzens E; Young G; Bobe J; Cerdà J. (2010). Oogenesis in teleosts: How fish eggs are formed. *Gen. Comp. Endocrinol.*, 165(3): 367-89.
- Mansour N; Lahnsteiner F; Patzner RA. (2009). Ovarian fluid plays an essential role in attachment of Eurasian perch, *Perca fluviatilis* eggs. *Theriogenology*, 71: 586-593.
- Mattei X; Siau OT; Thiauw OT, Thiam D. 1993. Peculiarities in the organization of testis of *Ophidion* sp. (Pisces: Teleostei). Evidence for two types of spermatogenesis in teleost fish. *J. Fish Biol.*, 43: 931-937.
- Mazzoldi C; Lorenzi V; Rasotto, MB. (2007). Variation of male reproductive apparatus in relation to fertilization modalities in the catfish families Auchenipteridae and Callichthyidae (Teleostei: Siluriformes). *J. Fish Biol.*, 70, 243-256.
- Mazzoni TS; Grier HJ; Quagio-Grassiotto I. (2010). Germline cysts and the formation of the germinal epithelium during the female gonadal morphogenesis in *Cyprinus carpio* (Teleostei: Ostariophysi). *Anat. Rec.*, 293(9): 1581-1606.
- Mazzoni TS. (2009). Formação do epitélio germinativo durante a morfogênese e diferenciação gonadal em *Cyprinus carpio* (Teleostei: Cypriniformes): análise estrutural e ultraestrutural das células germinativas e somáticas. Dissertação de Mestrado, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, São Paulo.
- Meffe GK. (1985). Life history patterns of *Gambusia marshi* (Poeciliidae) from Cuatro Ciénegas, Mexico. *Copeia*, 4: 898-905.
- Meijide FJ; Lo Nostro F; Guerrero GA. (2005). Gonadal Development and Sex Differentiation in the Cichlid Fish *Cichlasoma dimerus* (Teleostei, Perciformes): A Light- and Electron-Microscopic Study. *J. Morphol.*, 264: 191-210.
- Miura T. (1998). Spermatogenetic cycle in fish. In: *Encyclopedia of reproduction*. (Knobil, E. & Neill, J. D. eds.). San Diego. Academic Press, 4: 571-578.
- Molyneaux K; Wylie C. (2004). Primordial germ cell migration. *Int. J. Dev. Biol.*, 48: 537-44.
- Moreira HLM; Vargas L; Ribeiro RP; Zimmermann S. (2001). Fundamentos da Moderna Aqüicultura. Editora da ULBRA/ Canoas. 200p.

- Munoz RC; Warner RRA. (2003). New version of the size-advantage hypothesis for sex change: Incorporating sperm competition and size-fecundity skew. *Am. Naturalist*, 161: 749-61.
- Nagahama Y. (1983). The functional morphology of teleost gonads. In: *Fish physiology*. (Hoar, W.S.; Randall, D.J.; Donaldson, E.M., eds.). New York, Academic Press. V. IX, chap. 6.
- Nagahama Y. (1994). Endocrine regulation of gametogenesis in fish. *Int J Dev Biol.*, 38(2): 217-29.
- Nagahama Y. (2005). Molecular mechanisms of sex determination and gonadal sex differentiation in fish. *Fish Physiol Biochem.*, 31: 105–109.
- Nakamura M; Takahashi H. (1973). Gonadal sex differentiation in *Tilapia mossambicus* with special regard to the time of estrogen treatment effective in inducing complete feminization of genetic males, *Bull. Fac. Fish., Hokkaido Univ.* 24: 1-13.
- Nakamura M; Takahashi H; Hiroi O. (1974). Sex differentiation in the masu salmon (*Oncorhynchus masou*). *Sci.Rep. Hokkaido Salmon Hatchery.* 28: 1-8.
- Nakamura M; Kobayashi T; Chang XT; Nagahama Y. (1998). Gonadal sex differentiation in teleost fish. *J. Exp.Zool.*, 281: 362-372.
- Nakamura M; Bhandari RK; Higa M. (2003). The role estrogens play in sex differentiation and sex changes of fish. *Fish Physiol. and Bioch.*, 28: 113-117.
- Nakamura S; Kokayashi D; Aoki Y; Yokoi H; Ebe Y; Joachim Wittbrodt; Tanaka M. (2006). Identification and lineage tracing of two populations of somatic gonadal precursors in medaka embryos. *Dev. Biol.*, 295:678–688.
- Nakamura S; Aoki Y; Saito D; Kuroki Y; Fujiyama A; Naruse K; Tanaka M. (2008). Sox9b/sox9a2-EGFP transgenic medaka reveals the morphological reorganization of the gonads and a common precursor of both the female and male supporting cells. *Mol. Reprod. Dev.*, 75: 472-476.
- Nakamura S; Kobayashi K; Nishimura T; Higashijima S; Tanaka M. (2010). Identification of Germline Stem Cells in the Ovary of the Teleost Medaka. *Science*, 328: 1561-1563
- Nakatani K; Agostinho AA; Baumgartner G; Bialecki A; Sanches PV; Makrakis MC; Pavanelli CS. (2001). Ovos e larvas de peixes de água doce: Desenvolvimento e manual de identificação. Maringá: EDUEM.
- Nakatani M; Miya M; Mabuchi K; Saitoh K; Nishida M. (2011). Evolutionary history of Otophysi (Teleostei), a major clade of the modern freshwater fishes: Pangaean origin and Mesozoic radiation. *Evolutionary Biol.*, 11:177.
- Negrão JNC; Carvalho ED; Foresti F; Quagio-Grassiotto I. (2002). Spermatogonia and spermatocyte ultrastructure in *Hoplias malabaricus* (Teleostei, Characiformes: Erythrinidae). *J. Zool.*, 257: 287-293.
- Nelson JS. (2006). Fishes of the world. 4nd. Ed. New York: John Wiley & Sons. 601p.
- Otani S; Kitauchi T; Saito T; Sakao S; Maegawa S; Inoue K; Yamaha E. (2005). The formation of primordial germ cells from germline cells in spherical embryos derived from the blastodisc of 2-cell embryos in goldfish, *Carassius auratus*. *Int. J. Dev. Biol.*, 49: 843-850.
- Parenti LR; Grier HJ. (2004). Evolution and phylogeny of gonad morphology in bony fishes. *Integr. Comp. Biol.*, 44: 333-348.
- Parmentier HK; Timmermans LPM. (1985). The differentiation of germ cells and gonads during development of carp (*Cyprinus carpio* L.). A study with anti-carp sperm monoclonal antibodies. *J Embryol. Exp. Morphol.*, 90: 13-32.
- Pandolfi M; Canepa MM; Mejjide FJ; Alonso F; Vázquez GR; Maggese MC; Vissio PG. (2009). Studies on the reproductive and developmental biology of *Cichlasoma dimerus* (Perciformes, Cichlidae). *Biocell*, 33(1): 1-18.
- Patiño R; Takashima F. (1995). In: Takashima, F.; Hibiya, T., editors. *An atlas of fish histology*, 2nd ed. Stuttgart Kodansha-Gustav Fisher, 128-153.

- Patiño R; Davis KB; Schoore JE; Uguz C; Strussmann CA; Parker NC; Simco BA; Goudie CA. (1996). Sex differentiation of channel catfish gonads: normal development and effects of temperature. *J. Exp. Zool.*, 276: 209-218.
- Patiño R; Sullivan CV. (2002). Ovarian follicle growth, maturation, and ovulation in teleost fish. *Fish Physiol. Biochem.*, 26: 57-70.
- Paull GC; Lange A; Henshaw AC; Tyler CR. (2008). Ontogeny of Sexual Development in the Roach (*Rutilus rutilus*) and Its Interrelationships with Growth and Age *J. Morphol.* 269: 884–895.
- Perry AN; Grober MS. (2003). A model for social control of sex change: interactions of behaviour, neuropeptides, glucocorticoids, and sex steroids. *Horm. Behav.*, 43: 31-38.
- Piferrer F. (2001). Endocrine sex control strategies for the feminization of teleost fish. *Aquaculture*, 197: 229-281.
- Potter H; Kramer CR. (2000). Ultrastructural observations on sperm storage of the platyfish, *Xiphophorus maculatus* (Teleostei: Poeciliidae): the role of the duct epithelium. *J. Morphol.*, 245: 110-129.
- 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.
- Pudney J. (1993). Comparative cytology of the non-mammalian vertebrate Sertoli cell. In: *The Sertoli cell*. (Russell, L.D. & Griswold, M.D., eds.) Clearwater, Cache River Press. pp. 612-657.
- Pudney J. (1995). Spermatogenesis in nonmammalian vertebrates. *Microsc. Res. Techn.*, 32: 459-497.
- Pudney J. (1996). Comparative Cytology of the Leydig Cell. Pp 98-142. In: Payne, A.H., M.P. Hardy & L.D. Russel (Eds). *The Leydig Cell*. Vienna, Cache River Press.
- Quagio-Grassiotto I; Carvalho ED. (1999). The ultrastructure of *Surubim lima* (Teleostei, Siluriformes, Pimelodidae) spermatogenesis: premeiotic and meiotic periods. *Tissue & Cell*, 3: 561-567.
- Quagio-Grassiotto I; Guimarães ACD. (2003). Follicular epithelium theca and egg envelope formation in *Serrasalmus spilopleura* (Teleostei, Characiformes, Characidae). *Acta Zool.* (Stockholm), 84: 121-129.
- Quagio-Grassiotto I; Grier HJ; Mazzoni TS; Nóbrega RH; Amorim JP. (2011). Activity of the ovarian germinal epithelium on the follicle formation and the oocyte development in the freshwater catfish *Pimelodus maculatus* (Teleostei: Ostariophysi: Siluriformes). *J. Morphol.*, 272: 1290-1306.
- Quintero-Hunter I; Grier H; Muscato M. (1991). Enhancement of histological detail using Amarelo Metanil as counterstain in periodic acid/Schiff's hematoxylin staining of glycol methacrylate tissue sections. *Biotech. Histochem.*, 66: 169-172.
- Rasmussen TH; Jespersen A; Korsgaard B. (2006). Gonadal Morphogenesis and Sex Differentiation in Intraovarian Embryos of the Viviparous Fish *Zoarcetes viviparus* (Teleostei, Perciformes, Zoarcidae): A Histological and Ultrastructural Study. *J. Morphol.* 267: 1032-1047.
- Redding JM; Patiño R. (1993). Reproductive physiology. In: Evans, D.H. editor. *The physiology of fishes*. Boca Raton, FL: CRC Press. p.503-534.
- Riehl R; Baensch HA. (1991). Aquarien Atlas. Band. 1. Melle: Mergus, Verlag für Natur- und Heimtierkunde, Germany. 992 p.
- Rzepakowska M; Ostaszewska T. (2013). Proliferating cell nuclear antigen and Vasa protein expression during gonadal development and sexual differentiation in cultured Siberian (*Acipenser baerii* Brandt, 1869) and Russian (*Acipenser gueldenstaedtii* Brandt & Ratzeburg, 1833) sturgeon. *Reviews in Aquaculture*. 5: 1–14
- Sadovy de Mitcheson Y; Liu M. (2008). Functional hermaphroditism in teleosts. *Fish and Fisheries*. 9: 1-43.
- Saito D; Morinaga C; Aoki Y; Nakamura S; Mitani H; Furutani-Seiki M; Kondh H; Tanaka M. (2007). Proliferation of germ cells during gonadal sex differentiation in medaka: insights from germ cell-depleted mutant zenzai. *Dev Biol.*, 310:280–290.

- Satoh N (1974). An ultrastructural study of sex differentiation in the teleost *Oryzias latipes*. *J. Embryol. Exp. Morphol.* 32:195-215.
- Schulz RW; Miura T. (2002). Spermatogenesis and its endocrine regulation. *Fish. Physiol. Biochem.*, 26: 43-56.
- Schulz RW. (2003). Endocrine regulation of spermatogenesis in teleost fish. *ARBS Ann. Rev. Biom. Sc.*, 5: 57-58.
- Schulz RW; França LR; Lareyre J-J; LeGac F; Chiarini-Garcia H; Nóbrega RH; Miura T. (2010). Spermatogenesis in fish. *Gen. Comp. Endocrinol.* 165: 390-411.
- Selman K; Wallace RA. (1986). Gametogenesis in *Fundulus heteroclitus*. *Am. Zool.*, v.26, p.173-192.
- Selman K; Wallace R.A. (1989). Cellular aspects of oocyte growth in teleosts. *Zool. Sci.*, v.6, p.211-231.
- Shinomiya A; Hamaguchi S; Shibata N. (2001). Sexual Differentiation of Germ Cell Deficient Gonads in the Medaka, *Oryzias latipes*. *J. Exp. Zool.*, 290: 402-410.
- Siegfried KR; Nüsslein-Volhard C. (2008). Germ line control of female sex determination in zebrafish. *Dev. Biol.* 324: 277-287.
- Spadella MA; Oliveira C; Quagio-Grassiotto I. (2007). Comparative analysis of the spermiogenesis and sperm ultrastructure in Callichthyidae (Teleostei: Ostariophysi: Siluriformes). – *Neotropical Ichthyol.*, 5: 337–350.
- Strum JM; Gartner LP; Hiatt JL. (2007). Cell biology and histology. Hagerstown, MD: Lippincott Williams & Wilkins. p. 83.
- Strüssmann CA; Takashima F; Toda K. (1996). Sex differentiation and hormonal feminization in pejerrey *Odontesthes bonariensis*. *Aquaculture*, 139: 31-45.
- Strüssmann CA; Nakamura M. (2002). Morphology, endocrinology, and environmental modulation of gonadal sex differentiation in teleost fishes. *Fish Physiol. Biochem.*, 26: 13-29.
- Tanaka M; Saito D; Morinaga C; Kurokawa H. (2008). Cross talk between germ cells and gonadal somatic cells is critical for sex differentiation of the gonads in the teleost fish, medaka (*Oryzias latipes*). *Develop. Growth Differ.*, 50:273–278.
- Timmermans LPM; Taverne N. (1983). Origin and differentiation of primordial germ cells (PGCs) in the rosy barb, *Barbus conchoni* (Cyprinidae, Teleostei). *Acta Morph. Neerl. Scan.*, 21, 182.
- Timmermans LPM; Taverne N. (1989) Segregation of primordial germ cells: their numbers and fate during early development of *Barbus conchoni* (Cyprinidae, Teleostei) as indicated by 3H-thymidine incorporation. *J. Morphol.*, 202: 225-237.
- Timmermans LPM; Wang J; Taverne N; Schipper H; Parmentier HK. (1996) Characterization of antigens specific for spermatozoa and germ cells during early gonadal development of carp (*Cyprinus carpio*, Cyprinidae, Teleostei) with monoclonal antibodies. *Int. J. Dev. Biol.*, 1: 221S-222S.
- 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.
- Vizziano D; Randuineau G; Baron D; Cauty C; Guiguen Y. (2007). Characterization of early molecular sex differentiation in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Develop. Dynamics*, 236(8): 2198-2206.
- Vizziano D; Baron D; Randuineau G; Mahè S; Cauty C; Guiguen, Y. (2008). Rainbow trout gonadal masculinization induced by inhibition of estrogen synthesis is more physiological than masculinization induced by androgen supplementation. *Biol. Reprod.*, 78(5): 939-46.
- Vizziano-Cantonnet D; Baron D; Mahe S; Cauty C; Fostier A; Guiguen Y. (2008). Estrogen treatment up-regulates female genes but does not suppress all early testicular markers during rainbow trout male-to-female gonadal transdifferentiation. *J. Mol. Endocrinol.*, 41:277–288

- Wallace RA; Selman K. (1990). Ultrastructural aspects of oogenesis and oocyte growth in fish and amphibians. *J. Electron Microsc. Tech.*, 16: 175-201.
- Winkoop A; Booms GHR; Dulos GJ; Timmermans LPM. (1992). Ultrastructural changes in primordial germ cells during early gonadal development of the common carp (*Cyprinus carpio* L. Teleostei). *Cell Tissue Res.*, 267: 337-346.
- Yamamoto T. (1969). Sex differentiation. In: Hoar WS, Randall DJ, editors. New York: Academic Press. *Fish physiol.*, 3: 117-175.
- Yoon C; Kawakami K; Hopkins N. (1997). Zebrafish *vasa* homologue RNA is localized to the cleavage planes of 2-and 4-cell-stage embryos and is expressed in the primordial germ cells. *Development*, 124: 3157-3166.

ANEXO I: COLORAÇÕES

1. Amarelo Metanil ou Metanil Yellow

Método de coloração que utiliza Ácido Periódico de Schiff (PAS) + Hematoxilina Férrica + Amarelo Metanil.

Procedimento:

- ✓ Hidratar em água destilada,
- ✓ Ácido Periódico 1% por 10 minutos,
- ✓ Lavar em água corrente por 10 minutos,
- ✓ Reativo de Schiff durante 1 hora,
- ✓ Lavar em água corrente 10 minutos,
- ✓ Hematoxilina Férrica por 6 minutos,
- ✓ Lavar em água,
- ✓ Amarelo Metanil por 2 minutos (Fórmula Molecular: $C_{18}H_{14}N_3O_3SNa$),
- ✓ Desidratar em estufa e montar.

Resultado: A resposta positiva observada para a coloração com PAS é demonstrada pela presença da coloração magenta, evidenciando a presença de glicoproteínas e polissacarídeos neutros. A hematoxilina cora em roxo, estruturas de natureza ácida (basófilas). Em contraste, o Amarelo Metanil cora substâncias básicas (eosinófilas), como proteínas citoplasmáticas.

2. Método de Coello

Método de coloração que utiliza Ácido Periódico de Schiff (PAS) + Hematoxilina de Ehrlich + Azul de Bromofenol.

Procedimento:

- ✓ Hidratar em água destilada,
- ✓ Ácido Periódico 1% por 10 minutos,
- ✓ Lavar em água corrente por 10 minutos,
- ✓ Reativo de Schiff durante 1 hora,
- ✓ Lavar em água corrente 10 minutos,
- ✓ Corar com azul de bromofenol 0,1% em álcool 95% por 15 minutos,
- ✓ Tratar com ácido acético 0,5% por 20 minutos,
- ✓ Lavar em água corrente por 3 minutos,
- ✓ Corar com hematoxilina de Ehrlich por 20 minutos,
- ✓ Diferenciar com solução tampão* pH 7,4 - 8,0 por 1 minuto x 2,
- ✓ Desidratar em estufa e montar.
- ✓

*Tampão de Holmes: pH 8,0 – Ácido bórico M/5 (70 ml) – Bórax M/20 (30 ml)

Resultado: A resposta positiva observada para a coloração com PAS é demonstrada pela presença da coloração magenta, evidenciando a presença de glicoproteínas e polissacarídeos

neutros. A hematoxilina cora em roxo, estruturas de natureza ácida (basófilas). Em contraste, o azul de bromofenol cora substâncias básicas (eosinófilas), como proteínas citoplasmáticas.

3. Hematoxilina Férrica-Eosina

Método de coloração que utiliza Hematoxilina Férrica + Eosina Alcoólica.

Procedimento:

- ✓ Hidratar em água,
- ✓ Corar com hematoxilina férrica por 8 minutos,
- ✓ Lavar em água corrente por 10 minutos,
- ✓ Passagem rápida em álcool 95%,
- ✓ Corar com eosina durante 10 minutos,
- ✓ Lavar em água corrente para retirar o excesso de corante,
- ✓ Desidratar e montar.

Resultado: A hematoxilina férrica cora em roxo, estruturas de natureza ácida (basófilas). Em contraste, a eosina cora substâncias básicas (eosinófilas), como proteínas citoplasmáticas.

4. Azul de Toluidina – Bórax

Método de coloração que utiliza Azul de Toluidina – Bórax

Procedimento:

- ✓ Hidratar em água,
- ✓ Corar com azul de toluidina (0,5%) – bórax (1%) com pH entre 7,5 e 8,0),
- ✓ Lavar para retirar o excesso de corante
- ✓ Desidratar em álcool e montar.

Resultado: A coloração de azul de toluidina em pH básico, devido ao bórax, é inespecífica, ou seja, é usada para mostrar a morfologia geral das células. A presença de metacromasia é observada somente em regiões que apresentam grande quantidade de polissacarídeos ácidos.

ANEXO II:
TRABALHO SUBMETIDO À REVISTA “THE ANATOMICAL RECORD”

The Anatomical Record



The Anatomical Record

Male gonadal differentiation and the paedomorphic evolution of the testis in Teleostei

Journal:	<i>Anatomical Record</i>
Manuscript ID:	Draft
Wiley - Manuscript type:	Full Length Article
Date Submitted by the Author:	n/a
Complete List of Authors:	Mazzoni, Talita; Instituto de Biologia, Unicamp, Graduate Program on the Cell and Structural Biology Grier, Harry; Florida Fish & Wildlife Res Inst, Quagio-Grassiotto, Irani; Instituto de Biociências, Unesp, Morfologia
Keywords:	germinal epithelium, gonadal differentiation, Ostariophysi, Percomorpha, Atherinomorpha

SCHOLARONE™
Manuscripts

John Wiley & Sons, Inc.

ANEXO III: PROTOCOLO DO COMITÊ DE ÉTICA

DECLARAÇÃO

Declaro para os devidos fins que o conteúdo de minha **Tese de Doutorado** intitulada "**Formação do epitélio germinativo e diferenciação das estruturas gonadais: uma análise comparativa entre os grupos mais basais (Ostariophys) e mais derivados (Atherinomorpha e Percomorpha) dentro de Teleostei**":

() 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: _____

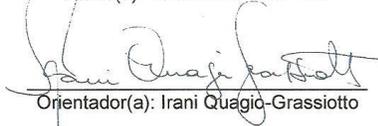
(X) CEUA - Comissão de Ética no Uso de Animais , projeto nº 175, Instituição: Instituto de Biociências de Botucatu, UNESP.

() 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(a): Talita Sarah Mazzoni

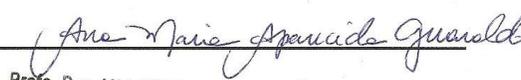


Orientador(a): Irani Quaglio-Grassiotto

Para uso da Comissão ou Comitê pertinente:

(X) Deferido () Indeferido

Carimbo e assinatura


Profa. Dra. ANA MARIA APARECIDA GUARALDO
Presidente da CEUA/UNICAMP

Para uso da Comissão ou Comitê pertinente:

() Deferido () Indeferido

Carimbo e assinatura



CERTIFICATE

We certify that the protocol n° 175 about "Formation of the germinal epithelium and gonadal structures differentiation: comparative analysis between groups more basal (Ostariophysi) more derivative (Atherinomorpha and Percomorpha) within Teleostei" agree with ETHICAL PRINCIPLES IN ANIMAL RESEARCH adopted by Brazilian College of Animal Experimentation (COBEA) and was approved by the BIOSCIENCE INSTITUTE/UNESP ETHICAL COMMITTEE FOR ANIMAL RESEARCH (CEEA), in 04/09/2009.

Botucatu, september 4, 2009.


Prof. Dra. PATRÍCIA FERNANDA F. PINHEIRO
Presidente - CEEA