

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS
CÂMPUS DE BOTUCATU

**UMA NOVA ABORDAGEM DO CICLO REPRODUTIVO DOS MACHOS E FÊMEAS,
E DA ORIGEM E DESENVOLVIMENTO DOS OÓCITOS DOS OSTARIOPHYSI, E
PERCIFORMES NEOTROPICAIS APLICADA AO ANASTOMIDAE, *Schizodon
nasutus* E AO SCIANIDAE, *Plagioscion squamosissimus***

PAULA NEHRING

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Irani Quagio-Grassiotto

Monografia apresentada ao Departamento de
Morfologia do Instituto de Biociências – UNESP –
Câmpus de Botucatu, para obtenção do título de
Bacharel em Ciências Biológicas.

BOTUCATU – SP

2010

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE

Nehring, Paula.

Uma nova abordagem do ciclo reprodutivo dos machos e fêmeas, e da origem e desenvolvimento dos oócitos do Ostariophysi, e Perciformes neotropicais aplicada ao Anostomidae, *Schizodon nasutus* e ao Sciaenidae, *Plagioscion squamosissimus* / Paula Nehring. - Botucatu, 2010

Trabalho de conclusão de curso (bacharelado - Ciências Biológicas) - Instituto de Biociências de Botucatu, Universidade Estadual Paulista, 2010

Orientador: Irani Quagio-Grassiotto

Capes: 20601000

1. Citologia. 2. Teleósteos. 3. Bagre (Peixe).

Palavras-chave: Ciclo reprodutivo; Epitélio germinativo; Fases reprodutivas; Foliculogênese; Teleostei; Terminologia gonadal.

*"Todos os caminhos são mágicos se nos levam a nossos sonhos."
Paulo Coelho*

*"Comece fazendo o que é necessário, depois o que é possível, e
de repente você estará fazendo o impossível."
São Francisco de Assis*

Agradecimentos

- À Professora Irani, pela orientação, por toda dedicação, pela grande sabedoria e pelo jeito de mãe, com toda paciência, nos meus momentos de dúvidas e angústias. Obrigada por todos os ensinamentos, não só científicos, mas palavras que carregarei para toda a vida. Com certeza a senhora é um exemplo a ser seguido, e me orgulho muito em dizer que sou sua orientada. Muito obrigada!

- Aos meus pais, Paulo e Sandra, que sempre me deram força para lutar, depositaram toda a esperança em mim e não pouparam esforços para que esse sonho se tornasse realidade. Muito obrigada por tudo, se não fossem vocês, eu definitivamente não estaria aqui hoje.

- Ao meu avozinho, Oswaldo, que infelizmente não está mais aqui para presenciar essa conquista, mas que mantém sua presença e ensinamentos constantes dentro de mim.

- À Dona Wanda, a avó mais dedicada desse mundo, obrigada por todo o apoio, por todo orgulho, por toda confiança que nunca me deixaram desistir.

- Aos meus irmãos, Thiago e Fabiane, que muito mais que irmãos, sempre foram meus grandes amigos, meu apoio. Obrigada por tudo.

- Aos amigos de longa data, Alan e Larissa, que acompanham a minha jornada desde muito cedo, nunca deixando faltar uma palavra de carinho, um ombro para chorar ou tardes de muitas risadas. Obrigada, vocês sempre foram meu refúgio e minha certeza.

- À Fernanda, minha amiga querida, com a qual muita coisa foi compartilhada, principalmente os momentos de desespero durante a execução desse trabalho. Flor, obrigada por trazer mais alegria aos meus dias, por estar sempre pronta a me ouvir e por acreditar tanto em mim, até mesmo quando eu não acreditava mais.

- Aos meninos de Guará, Alberto, Bad, Bolinha, Lessie, Rafinha, e especialmente Leandro, que apesar da pouca convivência, me fazem muito bem! Vocês realmente sabem como alegrar o dia de alguém! Obrigada por me dar forças para continuar.

- Às amigas da graduação, Ayesha, Fernanda, Larissa, Marcela, Nathali e Renata. Por me ajudarem a transformar Botucatu em um lar. Pelo apoio, dedicação e companheirismo. Que essas amizades durem para sempre!

- Aos amigos do Laboratório de Biologia da Reprodução de Peixes Neotropicais, Clarianna, Daniel, Gisleine, Júlio, Renata, Rinaldo, Talita e Vicente. Trabalhar com vocês foi muito divertido e prazeroso. Obrigada pela paciência em ensinar as técnicas, pela amizade e companheirismo no dia-a-dia do laboratório.

- Obrigada especialmente à Talita, que fez papel de amiga, de mãe, de professora. Me ensinou, com calma e dedicação, cada item necessário ao trabalho. Obrigada pelos dias de laboratório, pelos dias fora dele, pela renúncia (quantas vezes estava muito atarefada mas mesmo assim parou para me ajudar), pelas palavras, pela amizade e por vários outros itens. Com certeza, sem a sua ajuda, essa monografia jamais teria sido escrita.

- Aos Professores da Graduação, que me trouxeram até aqui, demonstrando como o estudo da vida, em suas diferentes formas, é realmente fascinante. Por vocês, hoje digo com muito orgulho que sim, escolhi ser Bióloga!

- À *Luciana Cristina Montes*, secretária do Departamento de Morfologia, sempre disposta a ajudar, sempre compreensível com os prazos curtos. Obrigada por todas as dicas, preocupação e amizade que sempre demonstrou por nós.
- Aos funcionários do Departamento, principalmente a *Dona Têra*, por toda atenção, carinho e amizade.
- Às funcionárias da Graduação, sempre dispostas a ajudar com as nossas intermináveis dúvidas.
- Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo apoio financeiro do projeto.
- A Deus, pela força que me dá todas as manhãs para que comece mais um dia.
- E a todas as pessoas que, de alguma forma, contribuíram para a realização desse trabalho.

Muito obrigada,
Paula

Sumário:

Resumo.....	1
Introdução.....	4
Revisão Bibliográfica.....	7
1. Os peixes Teleostei.....	8
2. O epitélio germinativo.....	8
3. As classes reprodutivas – as fases dos machos.....	9
4. As classes reprodutivas – as fases das fêmeas.....	10
5. Uma terminologia simplificada para a classificação reprodutiva dos peixes.....	11
6. A caracterização histológica das classes/fases reprodutivas.....	13
6.1. A oogênese.....	14
6.2. A espermatogênese.....	16
7. Os modelos biológicos.....	16
Objetivos.....	18
Material e Métodos.....	20
1. Os espécimes analisados.....	21
2. Obtenção de dados biométricos.....	21
3. Contagem de células e Área ovariana.....	21
4. Preparação do material para a microscopia de luz.....	22
5. Correspondências das denominações utilizadas para as fases reprodutivas...22	
Resultados.....	25
1. Fêmeas.....	26
1.1. Estrutura ovariana em <i>Plagioscion squamosissimus</i> e <i>Schizodon nasutus</i>	26
1.2. Foliculogênese em <i>Plagioscion squamosissimus</i> e <i>Schizodon nasutus</i>	26
1.3. Desenvolvimento folicular.....	27
1.3.1.Desenvolvimento folicular em <i>Schizodon nasutus</i>	27

1.3.2.Desenvolvimento folicular em <i>Plagioscion squamosissimus</i>	29
1.4.Análise macroscópica das gônadas e sua equivalência nas fases reprodutivas.....	30
1.5.Análise macroscópica versus análise microscópica para <i>Schizodon nasutus</i>	30
1.6.Análise macroscópica versus análise microscópica para <i>Plagioscion squamosissimumus</i>	32
1.7.Caracterizacáo morfológica das fases reprodutivas.....	34
1.7.1. <i>Plagioscion squamosissimus</i>	34
1.7.2. <i>Schizodon nasutus</i>	36
1.8.Distribuição de ninhos de células germinativas ao longo do ciclo reprodutivo <i>Schizodon nasutus</i>	39
1.9.Índice gonadossomático de <i>Schizodon nasutus</i>	40
1.10.Análises estatísticas para fêmeas de <i>Schizodon nasutus</i>	41
1.10.1.Análise de variância – ANOVA ao longo do ciclo reprodutivo....	41
1.10.2.Teste t.....	41
1.10.3.Análise de variância – ANOVA ao longo das estações do ano....	42
2. Machos.....	42
2.1.Estrutura testicular em <i>Schizodon nasutus</i> e <i>Plagioscion squamosissimumus</i>	42
2.2.Organização testicular e o epitélio germinativo em <i>Schizodon nasutus</i> ..	42
2.3.Organização testicular e o epitélio germinativo em <i>Plagioscion squamosissimus</i>	43
2.4.Espermatogênese em <i>Schizodon nasutus</i> e <i>Plagioscion squamosissimumus</i>	44
2.5.Análise macroscópica das gônadas e sua equivalência nas fases reprodutivas.....	45
2.6.Análise macroscópica versus análise microscópica para <i>Schizodon nasutus</i>	45
2.7.Análise macroscópica versus análise microscópica para <i>Plagioscion squamosissimumus</i>	47
2.8.Caracterização morfológica das fases reprodutivas.....	49
2.8.1. <i>Schizodon nasutus</i>	49
2.8.2. <i>Plagioscion squamosissimumus</i>	50

2.9.Índice gonadossomático.....	51
2.10.Análises estatísticas para machos de <i>Plagioscion squamosissimus</i> e <i>Schizodon nasutus</i>	54
2.10.1.Análise de variância – ANOVA ao longo do ciclo reprodutivo....	54
2.10.2.Teste t.....	54
2.10.3.Análise de variância – ANOVA ao longo das estações do ano....	55
2.10.4.Teste t.....	55
Discussão.....	76
1. A estrutura ovariana e o epitélio germinativo feminino.....	77
2. Foliculogênese.....	78
3. Desenvolvimento folicular.....	79
4. A estrutura testicular e o epitélio germinativo masculino.....	80
5. Análise macroscópica das gônadas e sua equivalência nas fases reprodutivas.....	82
6. Fases reprodutivas.....	85
7. Índice gonadossomático.....	88
Considerações finais.....	91
Conclusões.....	93
Referências Bibliográficas.....	9

Resumo

Nos peixes, durante a vida reprodutiva o desenvolvimento gonadal é cíclico e anual. As gônadas passam por alterações de forma, de tamanho, de cor e de textura que são utilizadas como parâmetros para a sua classificação macroscópica. Porém, o desenvolvimento das células germinativas, nem sempre é consoante com essa classificação e, machos e fêmeas nem sempre parecem concatenados. Novas propostas de classificação vêm surgindo na tentativa de compatibilizar as informações macroscópicas e histológicas, considerando a atividade do epitélio germinativo de machos e fêmeas. Ocorre, no entanto, que essas propostas vêm sendo desenvolvidas em estudos com Perciformes marinhos. Aqui, tomando-se como modelo o Characiformes, *Schizodon nasutus* e o Perciformes, *Plagioscion squamosissimus* analisou-se comparativamente o ciclo reprodutivo de ambas as espécies, frente às classificações tradicionais e às novas propostas de classificação adicionadas das características histológicas das gônadas, e pode-se perceber que a análise macroscópica das gônadas, muitas vezes, não corresponde a sua verdadeira fase do ciclo reprodutivo, analisado microscopicamente. Isso se dá porque muitas das características cruciais para distinção das fases não são visíveis a olho nu, como folículos atrésicos, maturação do oócito ou anastomose de túbulos ou lóbulos testiculares. Assim, para determinação das fases reprodutivas, deve-se sempre contar com a análise microscópica e, no presente estudo, foi considerado que a melhor classificação para tal é a proposta de Brown-Peterson e colaboradores (2009), que divide o ciclo reprodutivo em seis fases reprodutivas, bastante detalhadas. A partir da descrição do ciclo reprodutivo feminino e masculino em *S. nasutus* e *P. squamosissimus*, os dados foram correlacionados com o índice gonadossomático, determinando, assim, que o período reprodutivo de ambas as espécies estende-se da primavera ao verão. O índice gonadossomático aumenta conforme o animal avança ao longo das fases reprodutivas, ou seja, conforme sua gônada segue o desenvolvimento, das células germinativas para a produção de gametas. Após o período de desova, esse índice apresenta uma queda correspondendo às fases nas quais as gônadas estão em Regressão e Em Regeneração, dando início a um novo ciclo. As análises histológicas das gônadas mostraram que o desenvolvimento folicular e a espermatogênese dessas espécies seguem o mesmo padrão apresentado para os Teleostei em geral, mesmo se tratando aqui de uma espécie mais basal (*S. nasutus*) e uma mais derivada (*P. squamosissimus*) na escala evolutiva. A foliculogênese das fêmeas de *S. nasutus* e *P. squamosissimus* também apresenta padrões similares aos já descritos para outros Teleostei, demonstrando que este é um processo evolutivamente conservado para

os vertebrados em geral, sendo que sua ocorrência nas espécies aqui analisadas se dá ao longo de todo o ciclo, mas principalmente nas fases Em Regeneração do ovário, período de intensa reposição das células germinativas. Assim, após análises histológicas e macroscópicas das gônadas de *S. nasutus* e *P. squamosissimus* ao longo de seus ciclos reprodutivos, os resultados permitiram tecer um paralelo entre as classificações tradicionais de ciclo reprodutivo, associando as mudanças morfológicas ocorridas no período, bem como esquematizar qualitativa e quantitativamente o desenvolvimento oocitário, bem como a foliculogênese nas fêmeas de *S. nasutus* e *P. squamosissimus*.

Introdução

Nos peixes, ao longo da vida reprodutiva, o desenvolvimento gonadal é cíclico e acompanha as estações reprodutivas anuais. O desenvolvimento gonadal pode ser verificado macroscopicamente e as alterações de forma, de tamanho, de cor e de textura das gônadas têm sido utilizadas como parâmetros para a classificação do estado de maturação em que se encontram. Nos estudos sobre a biologia reprodutiva dos peixes neotropicais a classificação do desenvolvimento gonadal tradicionalmente utilizada, com algumas adaptações ou não, é a proposta por Vazzoler (1996). Nela, de modo geral as gônadas dos animais aptos para a reprodução (sexualmente maduros) são classificadas como em repouso, em maturação, maduras e esgotadas ou semi-esgotadas dependendo do tipo de desova da espécie consideradas. A verificação histológica destes estados tem mostrado, no entanto, que o desenvolvimento das células germinativas em si, nem sempre é consoante com a classificação macroscópica da própria gônada e, além disso, que machos e fêmeas nem sempre parecem concatenados.

A dissonância entre a classificação macroscópica e a histológica das gônadas chama a atenção e a resolução desta questão sempre recorrente nos estudos da biologia reprodutiva dos peixes passa necessariamente pela compreensão da dinâmica do epitélio germinativo nos machos e nas fêmeas dos peixes.

A terminologia e os esquemas utilizados sejam na descrição dos ciclos testiculares e ovarianos anuais e/ou da evolução da espermatogênese e da oogênese nos peixes diferentemente do que ocorre com os mamíferos não é uniforme. Esta falta de unicidade gera controvérsias que muitas vezes atrapalham o entendimento mais amplo destes processos. Grier e colaboradores (2009) numa extensa revisão sobre o assunto propõem uma terminologia e um esquema que contemplam tanto os aspectos morfológicos quanto fisiológicos do ciclo ovariano anual e da oogênese. Grier e Uribe-Aranzábal (2009) fazem uma proposta semelhante para os machos. Esses autores sugerem que a despeito da proposta ser oriunda de estudos provenientes principalmente de espécies marinhas, pertencentes a ordem Perciformes, ela seria aplicável também aos demais taxa dentro de Teleostei.

Também Brown-Peterson e colaboradores (2007, 2009) na tentativa de facilitar a comunicação e comparação dos estudos sobre a biologia reprodutiva dos peixes vem trabalhando no sentido de aprimorar sua proposta que inclui os conceitos de epitélio germinativo difundidos por Grier (2000). A maior dificuldade no uso de ambas as

propostas deve-se, no entanto, ao fato de que as mesmas foram desenvolvidas primariamente para as espécies marinhas e notadamente para os Perciformes.

Principalmente no que diz respeito à oogênese nos Teleostei, as informações mais divulgadas são, principalmente, oriundas dos estudos com Perciformes marinhos e as existentes sobre grupos mais basais como os Ostariophysi apesar de localmente conhecidas, permanecem ainda hoje mais restritas às publicações regionais. Estudos recentes têm exposto, no entanto, diferenças significativas no padrão de desenvolvimento oocitário entre espécies marinhas e as de água doce, ou entre os taxa mais basais em relação àqueles mais derivados (ver Le Menn *et al.*, 2007; Grier *et al.*, 2009, para revisão).

Neste sentido, considerando as novas proposições para a caracterização das classes reprodutivas, traçou-se um paralelo entre a classificação macroscópica das gônadas, o índice gonadal e o status histológico das mesmas (suas alterações morfológicas), com ênfase nos processos de proliferação celular ao longo do ciclo reprodutivo, visando a construção de um esquema do desenvolvimento oocitário que possa vir a ser utilizado como um modelo para Ostariophysi (notadamente os Characiformes com desova parcelada) e para os Perciformes de água doce, respectivamente.

Revisão Bibliográfica

1. Os peixes *Teleostei*

Os peixes constituem aproximadamente 50% dos vertebrados, ocupando os mais diversos ambientes aquáticos, sendo que, destes, 96% correspondem aos peixes *Teleostei* (Nelson, 2006).

Os *Teleostei* compreendem os grupos *Ostariophysi*, *Protacanthopterygii* e *Neoteleostei*. A superordem *Ostariophysi* compreende as ordens *Cypriniformes*, *Gymnotiformes*, *Siluriformes* e *Characiformes*. Considerado basal em *Teleostei*, este grupo de peixes, com cerca de 4.500 espécies válidas, e com alguns poucos representantes marinhos, predomina nas águas continentais das regiões centro e sul americanas (Reis *et al.* 2003).

Dentre os *Neoteleostei*, destaca-se a superordem *Acanthopterygii*, mais derivada, com mais da metade de todas as famílias de peixes e dividida em *Atherinomorpha*, *Mugilomorpha* e *Percomorpha*. A ordem *Perciformes*, pertencente à *Percomorpha*, incluem cerca de 40% de todos os peixes e constituem a maior ordem de vertebrados. Nesta ordem estão classificados cerca de 10000 espécies diferentes, presentes em quase todos os ambientes aquáticos (Nelson, 2006).

Os *Teleostei* ocorrem em uma grande diversidade de habitat constituindo um grupo extremamente heterogêneo em termos de anatomia, comportamento e ecologia (Nakatani *et al.* 2001), além de apresentarem várias estratégias reprodutivas (Vazzoler, 1996; Nakatani *et al.* 2001), incluindo mecanismos como a liberação dos gametas no ambiente aquático, no caso de fertilização externa, até estratégias mais complexas, como o desenvolvimento de órgãos especializados para introdução de espermatozoides no trato reprodutor feminino, com inseminação interna e fertilização, seguida de liberação dos ovos fertilizados ou gestação interna de embriões (Le Gac e Loir, 1999).

Os *Teleostei* são predominantemente dióicos e a maioria deles apresenta reprodução cíclica e sazonal, ou seja, o desenvolvimento gonadal e a maturação dos gametas ocorrem principalmente em uma determinada época do ano, estando frequentemente associada a uma estação do ano (Vazzoler, 1996). Sob condições favoráveis, ocorre liberação dos gametas, de forma total ou parcelada, e conseqüente reprodução da espécie (Vazzoler, 1996).

2. O epitélio germinativo

O epitélio germinativo, permanentemente ativo, que reveste os túbulos seminíferos e margeia as lamelas ovígeras é a fonte de renovação das células

germinativas que asseguram e mantêm a continuidade da gametogênese nos peixes. Na última década, Grier e colaboradores redefiniram o conceito de epitélio germinativo tanto para os machos (Grier e Taylor, 1998; Grier e Lo Nostro, 2000; Grier, 2002) quanto para as fêmeas (Grier, 2000, 2002; Parenti e Grier, 2004; Grier *et al.*, 2005; 2007) dos peixes. A redefinição do epitélio germinativo na sua base celular tem sido crucial para o entendimento dos eventos cíclicos que regem o desenvolvimento gonadal e ocorrem anualmente ao longo da vida reprodutiva dos Teleostei.

O epitélio germinativo nos vertebrados é definido pelos mesmos conceitos histológicos que definem os epitélios somáticos, mas diferentemente dos demais contém as células germinativas (Grier e Lo Nostro, 2000; Grier, 2002).

3. As Classes Reprodutivas – As Fases dos Machos

Uma nova proposta de classificação, com base na continuidade e descontinuidade do epitélio germinativo e nos tipos celulares presentes nas gônadas, define 5 classes reprodutivas durante o ciclo reprodutivo anual dos machos sexualmente aptos dos Teleostei. Os indivíduos virgens e, portanto, sexualmente imaturos não são considerados para efeito desta classificação. A classificação do epitélio germinativo em contínuo e descontínuo está relacionada à distribuição dos cistos ao longo da membrana basal que suporta o epitélio. A distribuição dos cistos varia de contínua à descontínua durante o ciclo reprodutivo. A espermição, acoplada ao esgotamento das espermatogônias primárias é a base das alterações do epitélio germinativo durante o ciclo reprodutivo anual. As 5 classes reprodutivas: regredida, maturação inicial, maturação intermediária, maturação final e em Regressão (Grier e Taylor, 1998; Grier, 2002; Lo Nostro *et al.*, 2003), como inicialmente descritas nos Perciformes, podem ser encontradas a seguir.

- *Regredida*: Na classificação tradicional esta classe corresponde ao estágio de repouso. Na classe regredida, o epitélio germinativo é contínuo, sendo formado por espermatogônias e células de Sertoli. Nesta classe, ocorre a reorganização e o crescimento testicular, devido ao repovoamento pelas espermatogônias e a divisão mitótica das células de Sertoli. Portanto, a classe regredida é marcada por intensa atividade mitótica das células germinativas (espermatogônias) e das células somáticas (células de Sertoli), sendo, desta forma, o uso do termo “repouso” inadequado para designá-la (Brown-Peterson *et al.*, 2002).

- *Maturação Inicial:* Na maturação inicial, o epitélio germinativo é contínuo e caracteriza-se por já possuir cistos de espermatócitos e de espermátides, indicando que a espermatogênese teve início. Devido ao desenvolvimento dos espermatocistos (cistos), o epitélio torna-se alto, e o lúmen dos lóbulos em geral é parcialmente obliterado. Com a espermição tendo início, os espermatozóides vão sendo liberados dos espermatocistos, e o lúmen dos lóbulos torna-se dilatado e contínuo. O testículo como um todo se torna maior.

- *Maturação Intermediária:* A maturação intermediária é caracterizada pela presença de um epitélio germinativo descontínuo na região próxima ao ducto, enquanto na periferia o epitélio ainda é contínuo. Conforme a espermição progride, o componente germinativo do epitélio germinativo vai sendo perdido. As espermatogônias e os espermatocistos contendo células germinativas tornam-se dispersos ao longo da membrana basal do lóbulo e são separados por células de Sertoli.

- *Maturação Final:* A maturação final inicia-se quando pelo menos um lóbulo, em sua porção distal, apresenta epitélio descontínuo. Com o progresso da maturação, o epitélio descontínuo torna-se predominante em toda a extensão do lóbulo, e o esgotamento das células germinativas nos lóbulos se estende para a periferia testicular. O testículo sofre uma transformação de produção para estocagem dos espermatozóides, tendo início na região do ducto testicular. Mas, as espermatogônias já começam a surgir dispersas ao longo dos lóbulos e iniciam o repovoamento.

- *Regressão:* A regressão é marcada por uma queda brusca do IGS, epitélio germinativo descontínuo, presença de cistos dispersos e em degeneração, espermatozóides residuais na luz e sendo fagocitados pelas células de Sertoli e proliferação das espermatogônias. Uma grande quantidade de centros melanomacrofágicos pode estar presente nessa classe.

4. As Classes Reprodutivas das Fêmeas

Em comparação com os machos o epitélio germinativo que margeia as lamelas ovíferas é sempre descontínuo ao longo do ciclo reprodutivo das fêmeas. Por esta razão, a caracterização das classes reprodutivas nas fêmeas não pode utilizar os mesmos critérios aplicados aos machos. Conseqüentemente as classes reprodutivas nas fêmeas são definidas com base no desenvolvimento oocitário (Taylor *et al.*, 1998).

Por definição, e em correspondência com os machos (Taylor *et al.*, 1998), são nominadas 5 classes reprodutivas nas fêmeas:

- *Regredida*: Na classificação tradicional esta classe corresponde ao estágio de repouso. Na classe regredida as lamelas ovígeras contêm somente oócitos pré-vitelogênicos em diferentes faixas de tamanho. São os oócitos do estoque de reserva das classificações tradicionais.

- *Maturação inicial*: Na classe de maturação inicial as lamelas ovígeras contêm oócitos com deposição de lipídio próximo ao núcleo, alvéolos corticais em formação e em início de deposição de vitelo.

- *Maturação intermediária*: Na classe de maturação intermediária as lamelas ovígeras contêm oócitos em vitelogênese, mas principalmente aqueles já com grande quantidade de vitelo.

- *Maturação final*: Na classe de maturação final as lamelas ovígeras contêm oócitos com citoplasma totalmente preenchido pelos grânulos de vitelo e núcleo migrando para o pólo animal. A fusão e a hidratação do vitelo ocorrem e são seguidas pela ovulação. A ovulação é detectada pela presença dos folículos vazios.

- *Regressão*: Na classe de Regressão as lamelas ovígeras já não contêm oócitos maduros, aqueles não ovulados entram em atresia e os folículos vazios regridem.

5. Uma terminologia simplificada para a classificação reprodutiva dos peixes

Na tentativa de facilitar a comunicação e comparação dos estudos sobre a biologia reprodutiva dos peixes, Brow-Peterson, Lowerre-Barbieri, Macewicz, Saborido-Rey, Tomkiewicz e Wyanski (2007; 2009) vem se empenhando nos últimos anos no desenvolvimento de uma terminologia que pretendem seja mais simples, e aplicável a fêmeas e machos. Estes autores reconhecem ao longo do ciclo reprodutivo dos indivíduos aptos à reprodução fases que se iniciam com a gônada *Em Desenvolvimento*, progride para *Apto para Extrusão/Desova*, *Extrusão/Desova Ativa*, entra *Regressão* e *Em Regeneração*. Gônadas *Imaturas* seriam conforme esses critérios aquelas dos indivíduos que ainda não estão aptos para a reprodução, isto é, ainda fora do ciclo reprodutivo porque jovens. As correspondências dessas denominações para as anteriores e a caracterização histológica das mesmas, podem ser apreciadas na tabela apresentada pelos autores (aqui traduzida e transcrita).

Fase	Terminologia anterior	Fêmeas	Machos
Imaturo Nunca desovado	Imaturo, virgem	Apenas oogônias e oócitos em crescimento primário, incluindo cromatina nucleolar e perinucleolar. Usualmente não ocorre atresia.	Testículos pequenos, apenas espermatogônias primárias, sem lúmen nos lóbulos.
Desenvolvimento Gônadas em início de desenvolvimento, não irá desovar logo	Maturando, desenvolvimento inicial, maturação inicial, pré-vitelogênese	Os oócitos nesse estágio podem apresentar: crescimento primário, alvéolos corticais e/ou início de vitelogênese. Não há evidência de POFs. Alguns em atresia podem estar presentes. Peixes com fecundidade indeterminada: presença de oócitos em vitelogênese intermediária.	Início da espermatogênese e formação de cistos. Espermatogônias secundárias, espermatócitos primários, espermatócitos secundários, espermátides e espermatozóides podem estar presentes nos cistos. Espermatozóides não estão presentes no lúmen dos lóbulos ou ductos espermáticos. O epitélio germinativo é contínuo.
Apto a Desovar O peixe irá desovar neste ciclo (ou estação)	Desenvolvimento final, maturação final, grávida e vitelogênese	Presença de oócitos vitelogênicos. Algumas atresias e POF tardio podem estar presentes. <i>Fecundidade determinada</i> : Predominância de oócitos vitelogênicos finais, a estimativa da fecundidade potencial foi feita na sub-fase sem POF. <i>Fecundidade indeterminada</i> : Prevalência de oócitos vitelogênicos intermediários e finais (com ou sem evidência de desova anterior, POFs); ou oócitos vitelogênicos iniciais com evidência de desova anterior (POFs). Oócitos menos desenvolvidos estão frequentemente presentes.	Espermatozóides no lúmen dos lóbulos e/ou ductos espermáticos. Todos os estágios da espermatogênese (espermatogônias, espermatócitos, espermátides) podem estar presentes. Cistos ao longo do testículo. O epitélio germinativo contínuo ou descontínuo. Macroscopicamente, testículos grandes mas o esperma não é liberado com uma pressão suave. Histologicamente indistinguível da fase de Desova Ativa.
Desova Ativa Iminente, desova recente ou ativa	Maduro, FOM, desova	Ovulando (desovando) ou aproximadamente 12 h antes ou depois da desova como indicado tanto por GVM, GVBD/oócitos hidratados, ou POFs < ~12 h de idade. Atresia de oócitos vitelogênicos finais/hidratados podem estar presentes. <i>Fecundidade indeterminada</i> : oócitos menos desenvolvidos estão frequentemente presentes. A estimativa de	Espermatozóides no lúmen dos lóbulos e/ou ductos espermáticos. Todos os estágios da espermatogênese (espermatogônias, espermatócitos, espermátides) podem estar presentes. Cistos ao longo do testículo. O epitélio germinativo contínuo ou descontínuo. Macroscopicamente, o esperma flui livremente com uma pressão suave. Histologicamente indistinguível da

		fecundidade e frequência de desova feita em 12h antes e depois das sub-fases de desova.	fase Apta a desova.
Regressão Cessa a desova	Esgotado, regressão, pós desova, recuperação	Presença de atresia (em qualquer estágio). A maioria dos oócitos vitelogênicos sofre atresia alpha ou beta comum. Oócitos menos desenvolvidos estão frequentemente presentes. POFs podem estar presentes.	Presença de espermatozoides residuais no lúmen dos lóbulos e ductos espermáticos. Cistos amplamente espalhados próximos à periferia contendo espermátides. Proliferação e regeneração espermatogonial do epitélio germinativo comum na periferia do testículo. Macroscopicamente, testículos pequenos e esperma não liberado com pressão.
Em Regeneração Maduro sexualmente, reprodutivamente inativo	Repouso, regredido, em recuperação	Presença apenas de oogônias e oócitos em crescimento primário, incluindo oócitos profásicos e oócitos pré-vitelogênicos. Feixes musculares, amplos vasos sanguíneos, parede ovariana espessa e/ou atresia gama, delta podem estar presentes.	Testículos pequenos. Sem cistos. Lúmen dos lóbulos pequenos ou inexistentes. Proliferação de espermatogônias primárias, ocasionalmente secundárias, por todo testículo. Espermatozoides residuais estão ocasionalmente presentes no lúmen dos lóbulos e ducto espermático.

Legenda: Descrição geral das fases dos ciclos reprodutivos em peixes. O tempo de cada fase é espécie-dependente. Anteriormente, esquemas da classificação histológica desenvolvida de espécies individuais podem ser adicionados como subfases dentro de cada fase definida. Alguns critérios listados para as fases podem variar dependendo da espécie, estratégia reprodutiva ou temperatura da água.

Fonte: Gulf Cost Research Laboratory- http://www.usm.edu/gcrl/research/gonadal_terminology.php

by N.J. Brown-Peterson^{1*}, S.K. Lowerre-Barbieri², B.J. Macewicz³, F.Saborido-Rey⁴, J. Tomkiewicz⁵, and D.M. Wyanski⁶.

¹Department of Coastal Sciences, University of Southern Mississippi, Ocean Springs, MS 39564; ²Fish and Wildlife Research Institute, Florida Fish and Wildlife Conservation Commission, St. Petersburg, FL 33701; ³Southwest Fisheries Science Center, National Marine Fisheries Service, La Jolla, CA 92037; ⁴Instituto de Investigaciones Marinas, c/Eduardo Cabello, Vigo, Spain; ⁵Technical University of Denmark, Danish Institute for Fisheries Research, Charlottenlund, Denmark; ⁶Marine Resources Research Institute, South Carolina Department of Natural Resources, Charleston, SC 29422; *Order of authorship is alphabetical. Presented at JMIH (ASIH) conference July 2007 and AFS conference, September 2007 and at FRESH conference June 2009.

6. A caracterização histológica das classes/fases reprodutivas

A caracterização das classes/fases reprodutivas tem por base os estágios do desenvolvimento oocitário e da espermatogênese. Nos últimos anos com a adição

sistemática de novas informações a visão tanto da oogênese como da espermatogênese tem se ampliado consideravelmente.

6.1. A oogênese

No epitélio germinativo, a proliferação das oogônias dá origem a ninhos de células germinativas que se projetam em direção ao estroma ovariano. Ninhos e epitélio são suportados pela mesma membrana basal que os separa do estroma (Grier, 2000). Células somáticas derivadas do epitélio invadem os ninhos e envolvem as oogônias separando-as umas das outras e formando estruturas fechadas, os cistos. Dentro dos cistos as oogônias dividem-se por mitose e entram em meiose (Mazzoni *et al.*, 2010; Quagio-Grassiotto *et al.*, aceito). A formação de cistos, contendo células conectadas por pontes citoplasmáticas em desenvolvimento sincrônico, nas etapas iniciais do desenvolvimento das células germinativas iniciais nas fêmeas, vem sendo relatada em várias espécies animais desde insetos até mamíferos (veja revisão em Spradling, 1993; Pepling *et al.*, 1999; Pepling, 2006). Cistos contendo oogônias e cistos contendo oócitos, em geral co-ocorrem num mesmo ninho (Mazzoni *et al.*, 2010; Quagio-Grassiotto *et al.*, aceito). Ao final do paquíteno, processos citoplasmáticos das células somáticas que envolvem os cistos, denominadas de células pré-foliculares, avançam por entre os oócitos, individualizando-os (Matova e Cooley, 2001; Quagio-Grassiotto *et al.*, aceito). Coincidindo com a paralisação da meiose, os oócitos diplotênicos recém individualizados, ainda nos ninhos, entram em crescimento primário (ver revisão em Grier *et al.*, 2009). Ao mesmo tempo as células pré-foliculares sintetizam a membrana basal que as suporta e que é contínua com a membrana basal do epitélio (França *et al.*, *in press*). Conforme a membrana basal é sintetizada os folículos ovarianos em formação deixam os ninhos (Grier *et al.*, 2009; França *et al.*, *in press*; Mazzoni *et al.*, 2010; Quagio-Grassiotto *et al.*, aceito). O folículo permanece conectado ao epitélio germinativo uma vez que ambos compartilham uma porção comum da membrana basal. Ao término da foliculogênese, o folículo ovariano recém formado é constituído pelo oócito circundado pelas células foliculares que se apoiam na membrana basal. Células oriundas do estroma circundam o folículo ovariano exceto na região de compartilhamento da membrana basal formando a teca. O oócito envolto pelas células foliculares, a membrana basal e a teca formam o complexo folicular (Grier *et al.*, 2009; França *et al.*, *in press*; Mazzoni *et al.*, 2010; Quagio-Grassiotto *et al.*, aceito). Estes

eventos em seu conjunto compreendem a foliculogênese (veja revisão em Le Menn *et al.*, 2007; Grier *et al.*, 2009).

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

A progressiva deposição de vitelo e o espessamento da zona pelúcida caracterizam a vitelogênese ou crescimento secundário (Selman e Wallace, 1989; Wallace e Selman, 1990). Durante o crescimento secundário, a vitelogenina sintetizada pelo fígado e liberada na circulação sanguínea, é incorporada pelo oócito e dá origem aos glóbulos de vitelo (veja revisão em Patiño e Sullivan, 2002; Le Menn *et al.*, 2007; Grier *et al.*, 2009). A vitelogênese progride até que o oócito esteja completamente desenvolvido e o ooplasma preenchido pelos glóbulos de vitelo. Ao término do desenvolvimento secundário o oócito entra em maturação.

A maturação é caracterizada pela migração do núcleo ou vesícula germinativa em direção ao pólo animal, onde a micrópila está localizada, pela quebra da vesícula germinativa, ou seja, pela fragmentação do envoltório nuclear e, retomada da meiose.

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

A ovulação pode então ocorrer, com o oócito sendo liberado do interior do complexo folicular para o lúmen ovariano (ver Patiño e Sullivan, 2002; Grier *et al.*, 2009).

6.2. A espermatogênese

A espermatogênese compreende uma sequência de eventos morfo-funcionais através dos quais as espermatogônias transformam-se em espermatozóides aptos para a fertilização. Nos peixes Teleostei as espermatogônias destinadas à espermatogênese são envoltas individualmente por processos citoplasmáticos das células de Sertoli. A produção das células gaméticas masculinas ocorre, portanto, no interior dos cistos, no epitélio germinativo que reveste o compartimento seminífero dos testículos. Dentro de um mesmo cisto o desenvolvimento é sincrônico (veja revisão em Grier e Uribe-Aranzábal, 2009; Nóbrega *et al.*, 2009; Schultz *et al.*, 2010).

Nos cistos as espermatogônias proliferam, e ao entrarem em meiose dão origem aos espermátocitos I os quais por sua vez, com a progressão da meiose, dão origem aos espermátocitos II. O término da meiose resulta na formação das espermátides que em geral completam a sua diferenciação no interior dos cistos. Ao final da espermiogênese os cistos abrem-se e os espermatozóides são liberados no compartimento luminal dos testículos (veja revisão em Grier e Uribe-Aranzábal, 2009; Nóbrega *et al.*, 2009; Schultz *et al.*, 2010).

A espermatogênese pode, no entanto, ser semi-cística, com as células germinativas sendo liberadas dos cistos ainda em meiose ou o final da sua segunda divisão. Nesse caso a espermiogênese se completa no compartimento luminal dos testículos (Lahnsteiner e Patzner, 1990; Mattei *et al.*, 1993; Munõz *et al.*, 2002; Burns *et al.*, 2009).

Embora os espermatozóides intratesticulares sejam células terminais quanto à forma, em algumas espécies eles ainda não são capazes de fertilizar os ovos. A aquisição de motilidade e da capacidade fecundante, em geral, ocorre na passagem pelo ducto espermático e envolve alterações de natureza fisiológicas e não morfológicas, transformando os gametas não funcionais em espermatozóides maduros com capacidade fecundante (Miura e Miura, 2003).

7. Os modelos biológicos

Como representante dos Ostariophysi e para efeitos comparativos tomou-se no presente estudo uma espécie de Characiformes pertencentes à família Anostomidae, *Schizodon nasutus* (o ximborê) e como modelo dos Perciformes uma espécie pertencente à família Sciaenidae, *Plagioscion squamosissimus* (a curvina branca).

Schizodon nasutus, é relatado como tendo desova parcelada concentrada no período chuvoso, não realiza migrações (Nakatani *et al.*, 2001), alimenta-se principalmente de material vegetal (Teixeira e Bennemann, 2007) e vive em ambientes bento pelágicos (Riede, 2004).

Plagioscion squamosissimus é uma espécie de ambientes lênticos, endêmicas de água doce da América do Sul (Reis *et al.*, 2003), tem desova parcelada e período reprodutivo concentrado no período chuvoso, apesar de seus ovos e larvas serem encontrados ao longo de todo o ano, não é migradora e não apresenta cuidado parental, são piscívoras, comercialmente importantes e exploradas na pesca esportiva (Reis *et al.*, 2003; Lowe-McConnel, 1999).

Objetivos

Decorrente do aqui exposto e numa diferente abordagem do ciclo reprodutivo dos Ostariophysi, principalmente comparados aos Perciformes, alguns questionamentos afloram. Que tipo de informações adicionais a microscopia de luz de alta resolução pode nos oferecer além daquelas decorrentes dos estudos sobre a dinâmica da reprodução das espécies? Qual o período do ciclo em a reposição efetiva das células germinativas ocorre? Considerando o epitélio germinativo, como evolui a produção de gametas nos machos e nas fêmeas dos Ostariophysi pertencentes à diferentes ordens e com diferentes táticas reprodutivas quando comparados aos Perciformes? Como entender o ciclo reprodutivo dos machos nem sempre consonantes aos das fêmeas?

Com base nas proposições expostas e, na tentativa de responder algumas dessas intrigantes questões, pretende-se aqui:

(1) analisar as características histológicas das gônadas durante o ciclo reprodutivo de fêmeas e machos de *Schizodon nasutus* e *Plagioscion squamosissimus*, sua correlação com o Índice Gonadossomático, na tentativa de compatibilizar as dissonâncias sempre existentes entre as classificações macroscópicas e a verificação microscópica do estado de desenvolvimento seja dos ovários ou dos testículos;

(2) tecer um paralelo entre a classificação de Vazzoler (1996) para as fases reprodutivas das fêmeas e machos e as classificações propostas por Grier e colaboradores (Taylor *et al.*, 1998; Brown Peterson *et al.*, 2002; Grier, 2002) e também para a proposta de Brown-Peterson e seus colaboradores (2007, 2009);

(3) descrever à microscopia de luz os eventos iniciais da foliculogênese;

(4) determinar ao longo do ciclo reprodutivo, a fase em que a proliferação das células somáticas e germinativas e conseqüentemente a foliculogênese, é mais intensa;

(5) analisar o desenvolvimento oocitário de *Schizodon nasutus* e *Plagioscion squamosissimus* com intuito de se obter um esquema representativo da oogênese nos Teleostei mais basais que permita a sua distinção em relação aos esquemas hoje existentes para os grupos mais derivados, como os Perciformes, notadamente os Neotropicais.

Material e Métodos

1. Os espécimes analisados

Foram analisadas gônadas de espécimes adultos de *Schizodon nasutus* e *Plagioscion squamosissimus* num total de 50 fêmeas e 30 machos de cada espécie, coletadas mensalmente durante 12 meses consecutivos no período compreendido entre aos anos de 1996 e 1997 para os animais da espécie *Plagioscion squamosissimus* e indivíduos coletados entre os anos 1997 e 1998 para a espécie *Schizodon nasutus*. Este material já foi objeto de análise segundo os moldes tradicionais e constam do acervo de réplicas existente no Laboratório de Biologia da Reprodução em Peixes Neotropicais do Departamento de Morfologia do Instituto de Biociências de Botucatu/UNESP. Portanto, dispõe-se da classificação macroscópica das gônadas, bem como do registro dos dados biométricos. Os procedimentos realizados estão de acordo com o Comitê de Ética Animal do Instituto de Biociências de Botucatu (anexo 1).

2. Obtenção de dados biométricos

Para cada animal foram registrados o comprimento-total (L_t), que é a distância, em centímetros, entre o focinho e o pedúnculo caudal, o peso total (W_t), e o peso da gônada (W_g) em gramas. O comprimento-total, em centímetros, foi obtido com auxílio de ictiometro. O peso foi determinado em balança de precisão com sensibilidade de 0,01g. Os dados biométricos obtidos foram utilizados para calcular o índice gonadossomático (IGS). O índice gonadossomático (percentagem que as gônadas representam do peso total do indivíduo), assim como o índice gonadal (que expressa a relação entre o peso das gônadas e o comprimento total do indivíduo elevado à potência b), é utilizado como um indicador do estado funcional das gônadas (Vazzoler, 1996).

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

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

Os dados obtidos ao longo de todo o período reprodutivo foram analisados pelo método de ANOVA *one-way* (análise de variância), e as comparações multipareadas pelo teste t de Student.

3. Contagem de células e Área ovariana

A contagem de células, bem como a área ovariana ocupada pelos diferentes tipos de células germinativas femininas foi realizada por área histológica de tecido gonadal. Para todos os animais analisados, padronizou-se uma área ovariana de $0,25\text{cm}^2$. A área

ocupada pelas células germinativas foi calculada a partir do software Image J. (NIH Image - Machintosh) e convertida em frequência.

Os dados obtidos para as frequências foram analisados através do método estatístico de Kruskal-Wallis, e as comparações multipareadas pelo teste de Dunn's. A análise estatística foi feita através do programa estatístico R, sendo considerada significativa a diferença, para valores de p menor ou igual a 5% ($p \leq 0,05$).

4. Preparação do material para a microscopia de luz

Para microscopia de luz, as gônadas dos animais fixadas em solução de glutaraldeído 2% e paraformaldeído 4% em tampão Sorensen (0,1M a pH 7,2) por pelo menos 24 horas, foram desidratadas em uma série crescente de álcool (70% por 2 horas; 95% por no máximo 4 horas), infiltradas e incluídas em resina Leica. Cortes longitudinais com 3 μ m de espessura, obtidos com navalhas de vidro foram corados com Hematoxilina Férrica/Eosina, Azul de Toluidina-Bórax e PAS+Hematoxilina+Metanil Yellow (Quintero-Hunter *et al.*, 1991).

5. Correspondências das denominações utilizadas para as fases reprodutivas

As tabelas abaixo foram utilizadas comparativamente, constituindo um recurso para o entendimento da construção de cada etapa do ciclo reprodutivo propostos pelos diferentes autores, permitindo assim sua aplicação nos animais aqui analisados. Assim, a partir da classificação proposta por Brown-Peterson e colaboradores (2009), determinou-se as fases reprodutivas para os ovários e testículos de *Plagioscion squamosissimus* e *Schizodon nasutus*. As tabelas foram aqui transcritas para facilitar a compreensão das propostas feitas pelos diferentes autores, em caráter comparativo:

Propostas das etapas do ciclo reprodutivo para as fêmeas de Teleostei:

Vazzoler (1996)		Taylor et al. (1998)		Brown-Peterson et al. (2009)	
ESTÁDIOS	caracterização histológica	CLASSES	caracterização histológica	FASES	caracterização histológica
<u>Imaturo</u>	Ninhos e oócitos pré-vitelogênicos (estoque de reserva)	<u>Regredida</u>	oócitos pré-vitelogênicos	<u>Imaturo</u>	Oogônias, oócitos profásicos e oócitos em crescimento primário
<u>Repouso</u>	Células germinativas jovens e oócitos do estoque de reserva	<u>Maturação inicial</u>	Oócitos com deposição de lipídio, alvéolos corticais e início de vitelogênese	<u>Em desenvolvimento</u>	Oócitos em crescimento primário, alvéolos corticais e início de vitelogênese
<u>Em maturação</u>	Oócitos do estoque de reserva e oócitos em vitelogênese	<u>Maturação intermediária</u>	Oócitos em vitelogênese, com grande quantidade de vitelo	<u>Apto a Desovar</u>	Oócitos em vitelogênese intermediária e final, folículos atrésicos e POCs
<u>Maduro</u>	Oócitos com vitelogênese completa	<u>Maturação final</u>	Oócitos com vitelogênese completa e núcleo migrando, e POCs	<u>Desova Ativa</u>	Oócitos hidratados, folículos atrésicos e POCs recentes
<u>Esgotado</u>	Folículos atrésicos, POCs, ninhos e oócitos do estoque de reserva	<u>Regressão</u>	Folículos atrésicos e POCs	<u>Regressão</u>	Folículos atrésicos, oócitos menos desenvolvidos, POCs
-	-	-	-	<u>Em Regeneração</u>	Oogônias, oócitos profásicos e em crescimento primário, folículos atrésicos

Propostas das etapas do ciclo reprodutivo para os machos de Teleostei:

Classificações tradicionais		Grier & Taylor (1998)		Brown-Peterson et al. (2009)	
ESTÁDIOS	caracterização histológica	CLASSES	caracterização histológica	FASES	caracterização histológica
<u>Repouso</u>	Espermatogônias e células de Sertoli	<u>Regredida</u>	Epitélio germinativo contínuo, formado por espermatogônias e células de Sertoli	<u>Imaturo</u>	espermatogônias primárias; sem lúmen
<u>Em maturação</u>	Cistos de espermatogônias, espermatócitos e espermátides; pequena quantidade de espermatozóides	<u>Maturação inicial</u>	Epitélio germinativo contínuo com cistos de espermatócitos e de espermátides; início da espermição	<u>Em desenvolvimento</u>	Epitélio germinativo contínuo; cistos de espermatogônias, espermatócitos, espermátides; Ausência de espermatozóides no lúmen
<u>Maduro</u>	Grande quantidade de espermatozóides; ausência de cistos de espermatócitos e espermátides; espermatogônias isoladas	<u>Maturação intermediária</u>	Epitélio germinativo varia de contínuo (na periferia) a descontínuo (próximo ao ducto)	<u>Apto a Desovar</u>	Epitélio germinativo contínuo ou descontínuo; espermatozóides no lúmen; cistos de todos os estágios da espermatogênese ao longo do testículo
<u>Esgotado</u>	Espermatozóides residuais; lúmen vazio e espermatogônias primárias	<u>Maturação final</u>	Predominância do epitélio descontínuo; estocagem de espermatozóides	<u>Desova Ativa</u>	Epitélio germinativo contínuo ou descontínuo; espermatozóides no lúmen; cistos de todos os estágios da espermatogênese ao longo do testículo
-	-	<u>Regressão</u>	Epitélio germinativo descontínuo, cistos dispersos e em degeneração, espermatozóides residuais na luz, proliferação de espermatogônias e presença de centros melanomacrofágicos	<u>Regressão</u>	Espermatozóides residuais no lúmen; cistos de espermátides amplamente espalhados; proliferação e regeneração espermatogonial
-	-	-	-	<u>Em Regeneração</u>	Ausência de cistos; lúmen pequeno ou inexistente; proliferação de espermatogônias

Resultados

1. Fêmeas

1.1. Estrutura ovariana em *Plagioscion squamosissimus* e *Schizodon nasutus*

Os ovários das espécies estudadas são órgãos pares, de formato alongado, localizados dorsalmente na cavidade abdominal. Estão presos à parede dorsal desta cavidade por uma fina membrana de tecido conjuntivo – o mesovário.

São revestidos pela túnica albugínea, constituída de tecido conjuntivo. A túnica albugínea emite septos para o lúmen ovariano, delimitando as lamelas ovíferas.

Cada um dos ovários apresenta um lúmen ovariano. As extremidades caudais dos ovários afinam-se gradativamente constituindo o gonoducto ovariano, contínuo ao lúmen, que se comunica com o exterior através da papila urogenital, caracterizando um ovário do tipo cisto-ovário.

Durante o ciclo reprodutivo, os ovários sofrem notáveis alterações na coloração, tamanho, volume e irrigação sanguínea. Mostrando-se reduzidos e translúcidos, quando imaturos, e esbranquiçados ou amarelados de acordo com a fase reprodutiva na qual se encontram.

1.2. Foliculogênese em *Plagioscion squamosissimus* e *Schizodon nasutus*

Tanto em *Schizodon nasutus* como em *Plagioscion squamosissimus* o epitélio germinativo feminino ao longo das lamelas ovíferas é formado por células somáticas e germinativas dispostas de forma descontínua, sobre uma membrana basal (Fig. 2a). As células germinativas, oogônias, sofrem mitose, auto renovam-se e permanecem como células da linhagem tronco, sendo as precursoras de todas as células germinativas do ovário.

Existem dois tipos de oogônias, as indiferenciadas, com núcleo ovalado, cromatina moderadamente condensada, nucléolo discreto e pouca nuage. Essas células sofrem mitose e formam ninhos (Fig. 2b), delimitados pelas células pré-foliculares. As oogônias presentes nos ninhos diferenciam-se ficando maiores, com núcleo esférico e volumoso, nucléolo distinto e aumento na presença de nuage. Processos citoplasmáticos das células pré-foliculares envolvem as oogônias, individualizando-as (Fig. 1a; 2c).

Essas oogônias, individualizadas, passam a ser chamadas de oogônias diferenciadas. Sofrem mitose (Fig. 2d) e originam aglomerados de oogônias diferenciadas, chamados de cistos. No interior dos cistos as oogônias entram em meiose e passam a ser chamadas de oócitos.

Os oócitos iniciais, profásicos, têm núcleos com padrões distintos de organização da cromatina, dependendo em que etapa da prófase meiótica se encontram, sendo que no cisto, o desenvolvimento ocorre de forma sincrônica, ou seja, todas as células de um mesmo cisto estão na mesma fase.

Os oócitos podem ser distinguidos por seus padrões de organização da cromatina. Oócitos leptotênicos têm núcleo fortemente basofílico, com nucléolo evidente (Fig. 1b; 2e). Com o avanço da prófase, a basofilia nuclear é progressivamente perdida. Com a formação inicial dos complexos sinaptonêmicos e o pareamento dos cromossomos homólogos, a cromatina nuclear torna-se granular, caracterizando o oócito zigotênico (Fig. 1c-d; 2f). Os complexos sinaptonêmicos estão completamente formados no paquíteno, quando os cromossomos bivalentes podem ser distinguidos (Fig. 2g). No paquíteno tardio a desmontagem do complexo sinaptonêmico é iniciada e os cromossomos retraem-se dentro do envelope nuclear (Fig. 1e). A entrada em diplóteno inicial, e a parada meiótica subsequente, é detectada pela desmontagem dos complexos sinaptonêmicos (Fig. 1f), a aparência de um nucléolo distinto (Fig. 2h) e o aparecimento posterior de uma condensação perinuclear de rRNA, que forma um anel basofílico associado com o envelope nuclear (Fig. 2i). As células epiteliais pré-foliculares invadem os cistos contendo oócitos em paquíteno tardio, individualizando-os e assim, iniciando a formação de folículos (Fig. 1g). O folículo formado é constituído pelo oócito diplotênico inicial envolto pela zona pelúcida (em formação), células foliculares e membrana basal. Uma vez organizada a teca, ao redor da membrana basal do folículo, tem-se o final da formação do complexo folicular.

1.3. Desenvolvimento folicular

1.3.1. Desenvolvimento folicular em *Schizodon nasutus*

A entrada do oócito em crescimento primário é sinalizada pelo aumento da basofilia citoplasmática, e pode ser iniciada ainda dentro dos ninhos. Os oócitos interrompem a meiose, permanecendo em diplóteno da prófase I e deixam os ninhos. Os folículos ovarianos estão formados, compostos pelo oócito diplotênico rodeado por células foliculares que repousam sobre a membrana basal. Esta os mantém ligados ao epitélio germinativo.

Durante o crescimento primário ocorre a produção de múltiplos nucléolos (Fig. 3a) que gradativamente orientam-se em posição perinuclear (Fig. 3b), o citoplasma torna-se gradativamente mais basofílico e o núcleo, que possuía contorno regular, torna-

se irregular e cheio de reentrâncias (Fig. 3c). Células mesenquimais envolvem os folículos constituindo a teca.

Ao fim do crescimento primário, a zona pelúcida, camada acelular, é sintetizada entre o oócito e as células foliculares. De natureza química polissacarídica, a zona pelúcida, nesta etapa do desenvolvimento folicular, responde positivamente ao PAS e apresenta-se em uma única camada (Fig. 3c). O complexo folicular está formado. O oócito encontra-se agora envolto pela zona pelúcida, células foliculares pavimentosas, membrana basal e células da teca, oriundas do estroma ovariano.

Como último evento do crescimento primário, tem-se a formação dos alvéolos corticais (Fig. 3d), inicialmente dispersos pelo citoplasma do oócito como pequenas vesículas que ao longo do desenvolvimento oocitário tornam-se maiores e passam a se localizar periféricamente. Os alvéolos corticais não respondem ao PAS e coram-se fracamente com Azul de Toluidina, indicando a presença de polissacarídeos ácidos.

Inicia-se o crescimento secundário, caracterizado pelo início da vitelogênese (Fig. 3e). Nesta etapa o oócito incorpora vitelogenina, que será utilizada na formação dos grânulos de vitelo. Assim o oócito aumenta bruscamente de tamanho e os alvéolos corticais são deslocados para a sua periferia (Fig. 3f). Concomitantemente a membrana basal vai se espessando e torna-se visível a microscopia de luz, apresentando resposta positiva ao PAS, dado sua natureza glicoprotéica.

A deposição de grânulos de vitelo é gradual. Inicialmente o oócito apresenta pouca quantidade de grânulos de vitelo, encontrando-se numa etapa de vitelogênese inicial (Fig. 3e). Com o aumento de grânulos de vitelo, o oócito em vitelogênese intermediária (Fig. 3f) apresenta metade da área citoplasmática preenchida por grânulos de vitelo. Ao final da vitelogênese, os grânulos de vitelo passam a ocupar completamente todo o citoplasma, caracterizando o oócito em vitelogênese final (Fig. 3g). Os grânulos de vitelo coram-se pela eosina, comprovando sua natureza protéica.

Durante o crescimento secundário, as células foliculares tornam-se cúbicas e a zona pelúcida, mais espessa, diferencia-se em duas camadas. A camada mais interna, junto ao oócito, apresenta coloração alaranjada quando corada com Metanil Yellow, sendo, portanto, constituída por glicoproteínas. A camada mais externa, rica em polissacarídeos neutros, é PAS positiva e é formada por estruturas globulares (Fig. 3h).

Com o término da vitelogênese, na qual o vitelo é totalmente incorporado, tem-se a maturação do oócito. O núcleo, até então central, retoma a meiose e migra para a periferia do oócito (Fig. 3i), localizando-se próximo à micrópila (Fig. 3j). Após a

maturação, o oócito envolto pela zona pelúcida é liberado do ovário, porém as células foliculares e tecais, bem como a membrana basal, permanecem conectadas ao epitélio germinativo, numa estrutura conhecida como complexo pós-ovulatório (Fig. 3k). Não há evidências de que ocorra fusão dos grânulos do vitelo em nenhuma das etapas do desenvolvimento folicular.

1.3.2. Desenvolvimento folicular em *Plagioscion squamosissimus*

O desenvolvimento folicular em *Plagioscion squamosissimus* é bastante semelhante à *Schizodon nasutus*.

As células germinativas sofrem os mesmos processos de proliferação e diferenciação celular até a entrada do oócito em crescimento primário. Inicialmente o oócito em crescimento primário apresenta um único nucléolo (Fig. 3a'), então passa a ter múltiplos nucléolos (Fig. 3b'), que gradativamente orientam-se em posição perinuclear (Fig. 3c'). A incorporação e acúmulo de substâncias no citoplasma, durante o crescimento primário e secundário dá-se da mesma forma. Porém, tem-se o acúmulo gradual de gotículas de gordura no citoplasma do oócito, próximo ao núcleo, que pode ser iniciado anteriormente (Fig. 3d'), posteriormente (Fig. 3e') ou concomitantemente (Fig. 3f') à formação dos alvéolos corticais.

Durante a vitelogênese (Fig. 3g'-i'), as gotículas de gordura permanecem individualizadas e distribuem-se por todo o citoplasma, colocando-se entre os grânulos de vitelo. Os alvéolos corticais permanecem na periferia do oócito como vesículas citoplasmáticas que não se coram com PAS.

Ao longo de todo o desenvolvimento folicular, a zona pelúcida mostra-se em uma única camada bastante delgada, PAS positiva (Fig. 3j'). As células foliculares mantêm-se pavimentosas até o final do crescimento secundário (Fig. 3j').

Ocorre a maturação do oócito, o núcleo migra para a periferia (Fig. 3k'; m'), próximo a micrópila (Fig. 3l'). Em *Plagioscion squamosissimus*, não foram observados complexos pós-ovulatórios.

Em alguns animais, foram observados folículos atrésicos, que se apresentavam em estágio de degeneração, com formato irregular, deformação da zona pelúcida e desorganização dos grânulos de vitelo. As células foliculares, muitas vezes, apresentavam-se hipertrofiadas. Ao redor desses folículos, há uma grande quantidade de macrófagos, constituindo os centros melanomacrofágicos.

Uma proposta comparativa entre o desenvolvimento oocitário de *Schizodon nasutus* e *Plagioscion squamosissimus* pode ser observado na figura 4.

1.4. Análise macroscópica das gônadas e sua equivalência nas fases reprodutivas

As gônadas femininas de *Plagioscion squamosissimus* e *Schizodon nasutus* foram classificadas macroscopicamente, no momento da dissecação, em quatro estádios, correspondentes aos propostos por Vazzoler (1996).

Estádio I – Imaturo-Repouso: as gônadas são pequenas, filamentosas, translúcidas e não se observam oócitos a olho nu. Não há sinais de vascularização ou estas são reduzidas.

Estádio II – em Maturação: os ovários são maiores e vascularizados. A olho nu notam-se pequenos e médios oócitos.

Estádio III – Maduro: os ovários apresentam-se túrgidos e ocupam grande parte da cavidade abdominal. São opacos ou amarelados, sendo possível observar a olho nu um grande número de oócitos.

Estádio IV – Esgotado: os ovários são flácidos, de tamanho relativamente grande, mas pouco volumosos. Os poucos oócitos observados são esbranquiçados estando em estado de absorção. É caracterizado principalmente pela presença de zonas hemorrágicas.

Os ovários assim classificados macroscopicamente foram analisados à microscopia de luz para detecção das fases reprodutivas a partir de dados histológicos (Tabela I e II).

Para determinar as fases reprodutivas, os ovários das fêmeas de *Plagioscion squamosissimus* e *Schizodon nasutus* foram classificados histologicamente segundo a proposta de Brown-Peterson e colaboradores (2009) de acordo com as frequências dos tipos de oócitos presentes nas lamelas ovíferas.

1.5. Análise macroscópica versus análise microscópica para *Schizodon nasutus*

Para *Schizodon nasutus*, a associação dos dados obtidos a partir das análises macroscópicas e microscópicas (Tabela I, Fig. I) mostrou que todas as gônadas classificadas macroscopicamente como Imaturas e Repouso, apresentavam características histológicas correspondentes às gônadas imaturas (100%). Das gônadas consideradas macroscopicamente Em maturação, 65,21% correspondiam à gônadas imaturas, 21,76% à gônadas em fase de Desenvolvimento e 13,03% à fase Apto a

Desovar. Já os ovários considerados Maduros, foram classificados histologicamente como Apto a Desovar (66,66%) e Desova Ativa (33,34%). Ovários em estágio Esgotado mostraram-se em fase de Desenvolvimento (80,07%) e Apto a Desovar (19,93%)

Tabela I: Frequência das fases reprodutivas por estágio de desenvolvimento gonadal. Análise comparativa dos dados macroscópicos e microscópicos das gônadas femininas de *Schizodon nasutus*.

Análise Macroscópica	Fase Reprodutiva	Análise Histológica
Imaturo - Repouso	Imaturo (100%)	Oogônias, oócitos profásicos e oócitos em crescimento primário
Em maturação	Imaturo (65,21%)	Oogônias, oócitos profásicos e oócitos em crescimento primário
	Desenvolvimento (21,76%)	Oócitos em crescimento primário, alvéolos corticais e início de vitelogênese
	Apto a Desovar (13,03%)	Oócitos em vitelogênese intermediária e final, folículos atrésicos e POCs
Maduro	Apto a Desovar (66,66%)	Oócitos em vitelogênese intermediária e final, folículos atrésicos e POCs
	Desova Ativa (33,34%)	Oócitos hidratados, folículos atrésicos e POCs recentes
Esgotado	Desenvolvimento (80,07%)	Oócitos em crescimento primário, alvéolos corticais e início de vitelogênese
	Apto a Desovar (19,93%)	Oócitos em vitelogênese intermediária e final, folículos atrésicos e POCs

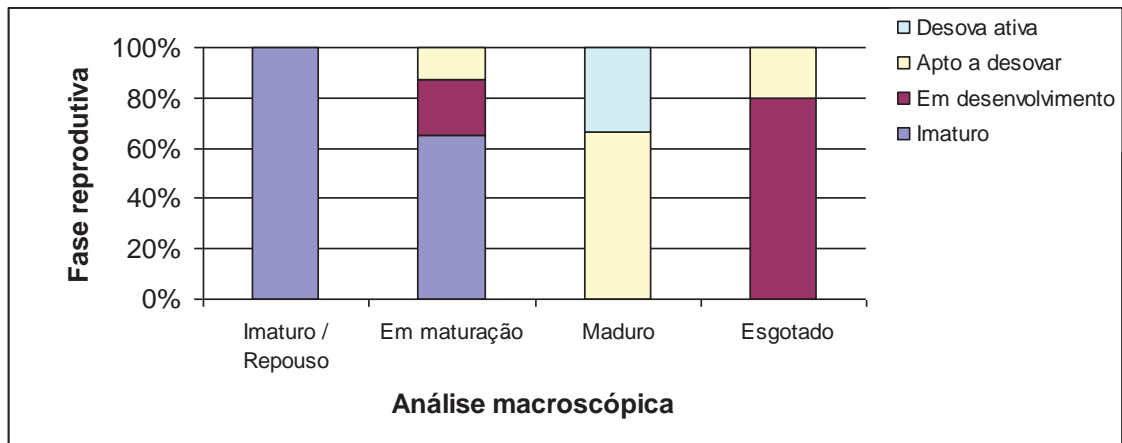


Figura I: Frequência das fases reprodutivas por estágio de desenvolvimento gonadal ao longo do ciclo reprodutivo de *Schizodon nasutus*.

1.6. Análise macroscópica versus análise microscópica para *Plagioscion squamosissimus*

Em *Plagioscion squamosissimus*, os ovários foram classificados macroscopicamente como Imaturo–Repouso, Em Maturação e Maduro. Porém, as análises histológicas mostraram que esses três tipos de estádios gonadais correspondiam à gônadas imaturas ou à gônadas em fase Em Regeneração (Tabela II, Fig. II).

Tabela II: Frequência das fases reprodutivas por estágio de desenvolvimento gonadal. Análise comparativa dos dados macroscópicos e microscópicos das gônadas femininas de *Plagioscion squamosissimus*.

Análise Macroscópica	Fase Reprodutiva	Análise Histológica
Imaturo - Repouso	Imaturo (70%)	Oogônias, oócitos profásicos e oócitos em crescimento primário
	Em Regeneração (30%)	Oogônias, oócitos profásicos, oócitos em crescimento primário, folículos atrésicos, cápsula espessa e macrófagos
Em maturação	Imaturo (40%)	Oogônias, oócitos profásicos e oócitos em crescimento primário
	Em Regeneração (60%)	Oogônias, oócitos profásicos, oócitos em crescimento primário, folículos atrésicos, cápsula espessa e macrófagos
Maduro	Imaturo (10%)	Oogônias, oócitos profásicos e oócitos em crescimento primário
	Em Regeneração (90%)	Oogônias, oócitos profásicos, oócitos em crescimento primário, folículos atrésicos, cápsula espessa e macrófagos

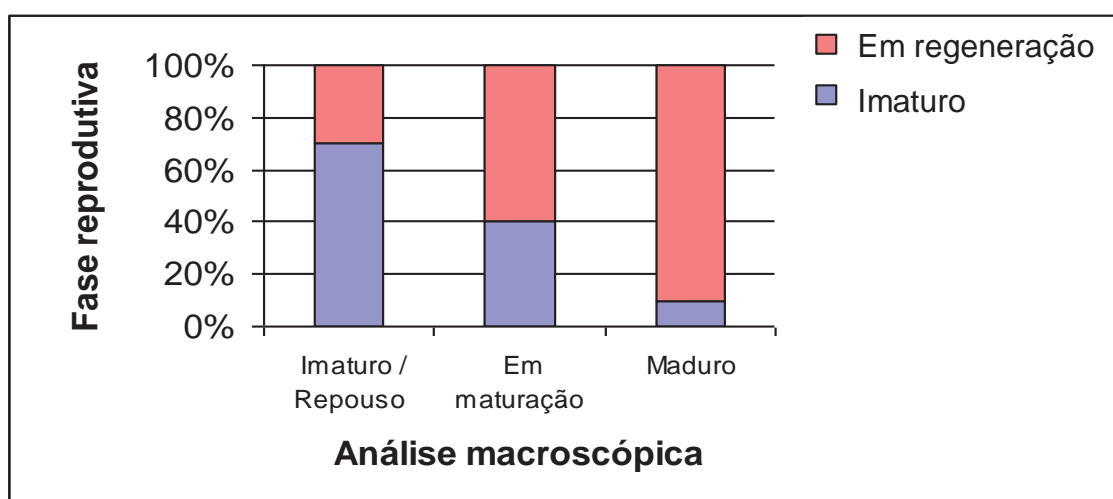


Figura II: Frequência das fases reprodutivas por estágio de desenvolvimento gonadal ao longo do ciclo reprodutivo de *Plagioscion squamosissimus*.

1.7. Caracterização morfológica das fases reprodutivas

1.7.1. *Plagioscion squamosissimus*

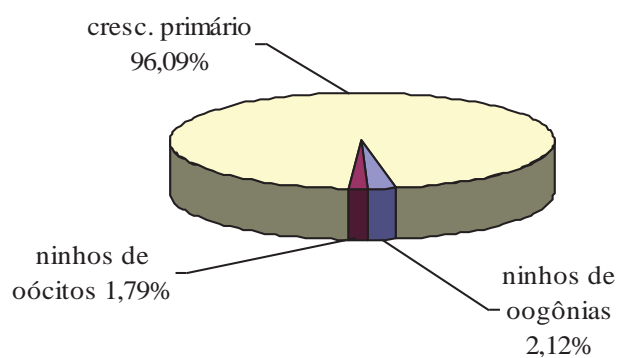
Para a espécie *Plagioscion squamosissimus*, foram analisados 51 indivíduos, no período de agosto de 1996 a junho de 1997. Durante esse período, foram encontrados apenas ovários Imaturos e ovários correspondentes à fase reprodutiva Em Regeneração. Por este motivo, o ciclo reprodutivo de *Plagioscion squamosissimus* não pode ser descrito no período estudado.

Os ovários imaturos (Fig. 5a) de *Plagioscion squamosissimus* apresentam grande quantidade de ninhos de oogônias (Fig. 5c) e ninhos de oócitos profásicos, principalmente oócitos leptotênicos. Os ninhos de oogônias ocupam uma área ovariana equivalente à 2,12% da área total analisada ($0,25\text{cm}^2$), enquanto que os ninhos de oócitos profásicos, 1,79% (Fig. III). Além desses, todas as outras células germinativas encontradas são oócitos em crescimento primário (Fig. 5b), que ocupam 96,09%. Não há oócitos em crescimento secundário, folículos atrésicos ou complexos pós-ovulatórios.

Os ovários Em Regeneração (Fig. 5d) são histologicamente bastante semelhantes aos ovários Imaturos, porém apresentam aglomerados de macrófagos (Fig. 5e), alguns folículos atrésicos (Fig. 5g) e a cápsula ovariana, formada pela túnica albugínea, é bastante espessa, quando comparada às cápsulas dos ovários Imaturos (Fig. 5f). Além disso, esses ovários apresentam grande quantidade de ninhos de oogônias (1,98% da área ovariana) e ninhos de oócitos profásicos (2,31%) (Fig. III), sendo que os oócitos leptotênicos, zigotênicos e paquitênicos estão em maior quantidade do que nos ovários Imaturos (Fig. V).

Dos ninhos analisados em ambos os ovários, os ninhos de oogônias nos ovários Imaturos correspondem a 54,55% dos ninhos totais, enquanto os ninhos de oócitos profásicos correspondem a 45,45%. Em contrapartida, nos ovários Em Regeneração, a frequência dos ninhos de oogônias e de oócitos profásicos correspondem a 42,31% e 57,69%, respectivamente (Fig. IV).

IMATURO



EM REGENERAÇÃO

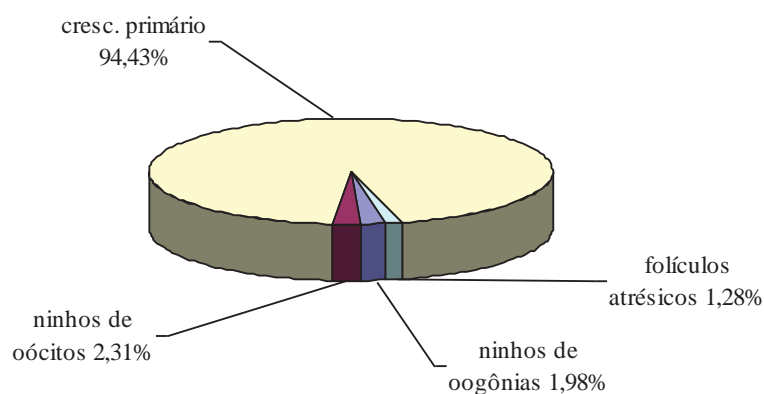


Figura III: Porcentagem de área ocupada por ninhos de oogônias, ninhos de oócitos profásicos, oócitos em crescimento primário e folículos atresicos nos ovários Imaturos e Em Regeneração de *Plagioscion squamosissimus*, em uma área ovariana de 0,25cm².

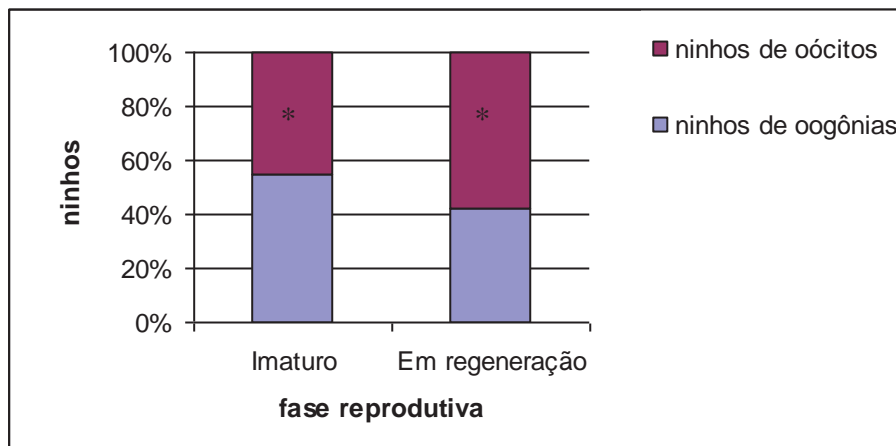


Figura IV: Análise comparativa entre as frequências de ninhos de oogônias e ninhos de oócitos nos ovários Imaturos e Em Regeneração de *Plagioscion squamosissimus*. Os ninho de oócitos (*) apresentam diferença significativa para $p < 0,05$.

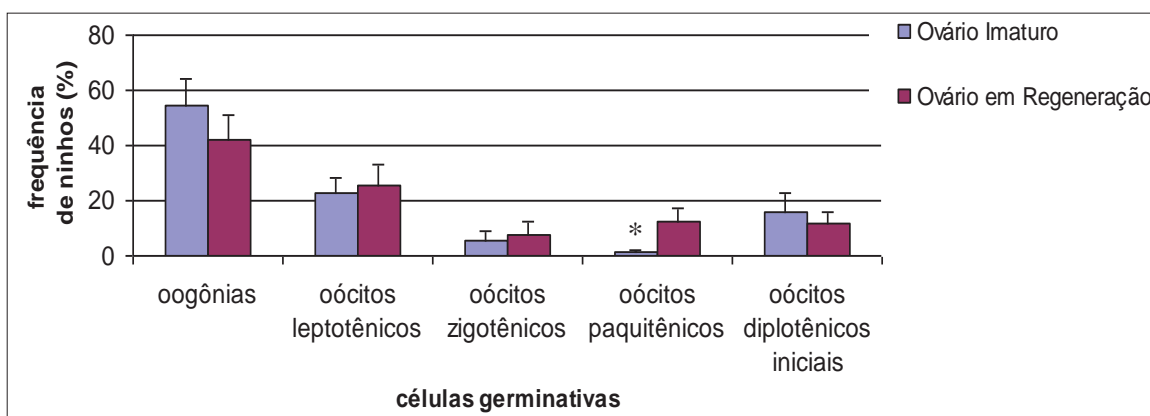


Figura V: Frequência de ninhos de células germinativas (oogônias e oócitos profásicos) nos ovários Imaturos e Em Regeneração de *Plagioscion squamosissimus*. * Diferença significativa para $p < 0,05$.

1.7.2. *Schizodon nasutus*

Em *Schizodon nasutus*, nos 40 indivíduos analisados durante o período de maio de 1997 a abril de 1998, determinou-se três fases reprodutivas – Desenvolvimento; Apto a Desovar e Desova Ativa – além de animais que apresentavam gônadas imaturas. Animais nas fases Regressão e Em Regeneração não foram encontrados durante o período de coleta.

Fase – Imaturo

Foram coletados indivíduos nessa fase durante todo o ano. Nesta fase, o ovário está repleto de ninhos de oogônias, resultantes da intensa proliferação de células germinativas e somáticas, oócitos profásicos e oócitos em crescimento primário, não sendo possível observar oócitos com alvéolos corticais, oócitos em vitelogênese, folículos atrésicos ou complexos pós-ovulatórios (Fig. 6a-b). Nos ovários, os ninhos de oogônias e de oócitos profásicos ocupam uma área correspondente a 1,24%, enquanto que oócitos em crescimento primário, 98,76% (Fig. VI). Cada ninho apresenta uma grande quantidade de oogônias e/ou oócitos profásicos.

Fase – Desenvolvimento (outono e inverno)

Nesta fase, o ovário apresenta a maior variedade de desenvolvimento folicular (Fig. 6c-d), apresentando oócitos em crescimento primário (59,10%), com ou sem alvéolos corticais e oócitos em crescimento secundário, em vitelogênese inicial e intermediária (40,52%). O epitélio germinativo apresenta, em menor número, ninhos de oogônias e de oócitos profásicos, ocupando apenas 0,38% da área ovariana analisada (Fig. VI).

Fase – Apto a Desovar (inverno e primavera)

Nesta fase, a maioria dos oócitos em crescimento secundário está em vitelogênese final (97,93%). É a primeira fase na qual estes oócitos podem ser observados (Fig. 6e). Aqui, já incorporaram em sua totalidade o vitelo, porém ainda apresentam núcleo central (Fig. 6f). No entanto ainda é possível observar alguns oócitos em vitelogênese inicial e intermediária (0,91%) e oócitos em crescimento primário (1,16%). Os ninhos tornam-se escassos (0,01%), compostos principalmente por oogônias isoladas (Fig. VI).

Fase - Desova Ativa (primavera e verão)

Nesta fase, podem ser observados, principalmente, oócitos em vitelogênese final (51,04%) e oócitos em maturação (45,49%), sendo que as outras etapas de desenvolvimento folicular ainda são encontradas, em menor número (1,85%). Nos oócitos em maturação, os núcleos estão migrando para a periferia do oócito, em direção à micrópila (Fig. 6g-h). São encontrados, pela primeira vez no ciclo reprodutivo, os complexos pós-ovulatórios (POCs), estruturas resultantes da liberação dos oócitos maduros de seus folículos (1,60%). Os ninhos mantêm-se escassos (0,01%), sendo compostos ainda por oogônias isoladas (Fig. VI).

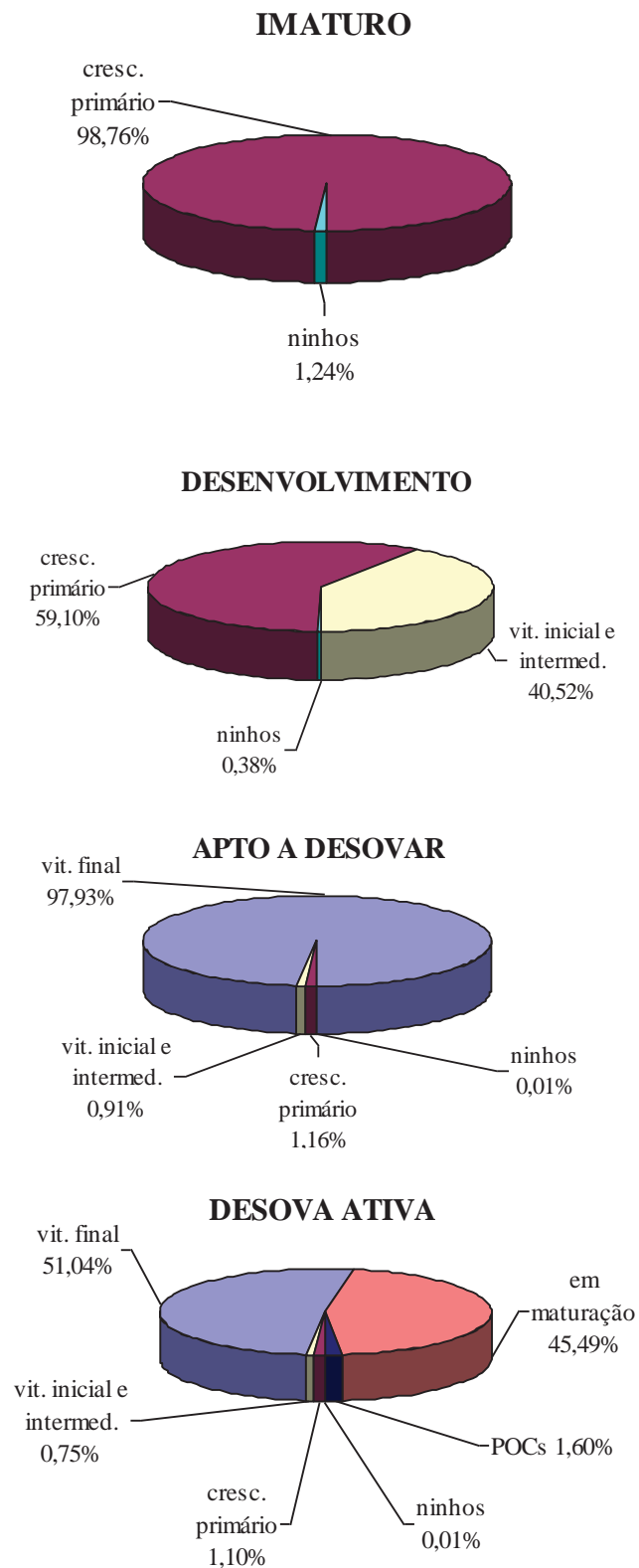


Figura VI: porcentagem de área ocupada pelos diferentes tipos de células germinativas, ao longo das fases reprodutivas encontradas para *Schizodon nasutus*, em uma área ovariana de 0,25cm².

1.8. Distribuição de ninhos de células germinativas ao longo do ciclo reprodutivo de *Schizodon nasutus*

Em *Schizodon nasutus* há uma maior quantidade de ninhos de células germinativas em animais sexualmente Imaturos e durante a fase de Desenvolvimento (Fig. VII). Nos animais Imaturos, os ninhos formados por oogônias indiferenciadas e diferenciadas são mais numerosos que ninhos formados por oócitos profásicos. Durante a fase reprodutiva de Desenvolvimento, os ninhos de oogônias e oócitos profásicos aparecem em quantidades semelhantes. Já nas fases Apto a Desovar e Desova Ativa, existem poucos ninhos de células, sendo possível observar somente ninhos formados por oogônias.

Os ninhos nas fases iniciais do ciclo reprodutivo apresentam um maior número de células por ninho, sejam eles compostos por oogônias ou oócitos. Já os ninhos presentes nas fases Apto a Desovar e Desova Ativa são menores, sendo formados, na maioria das vezes, por uma ou duas oogônias.

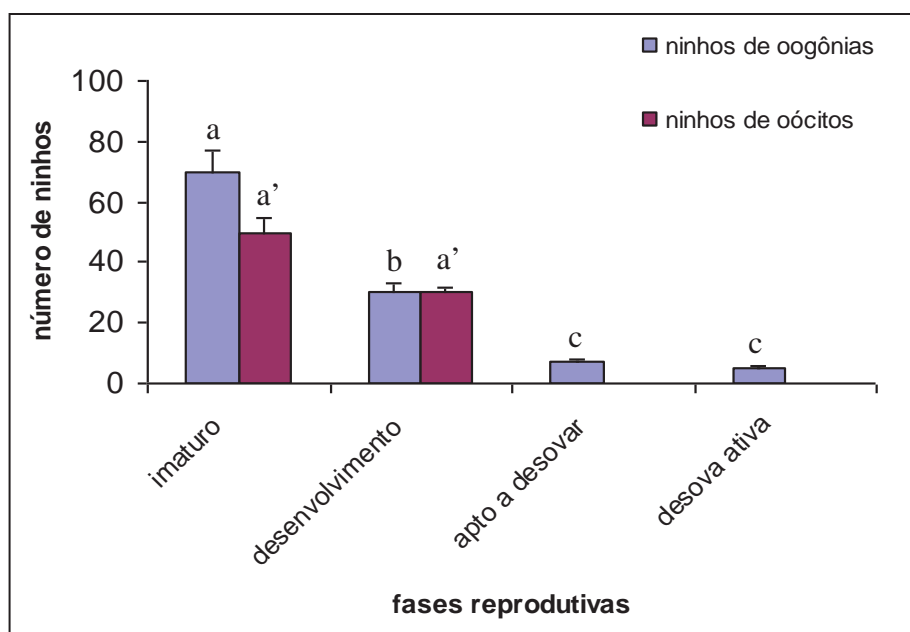


Figura VII: Número ninhos de oogônias e ninhos de oócitos profásicos por área ovariana ($0,25\text{cm}^2$) ao longo das fases reprodutivas em *Schizodon nasutus*. Para $p < 0,05$ os grupos a, b e c são diferentes estatisticamente, enquanto os grupos a' não apresentam diferenças entre si.

1.9. Índice gonadossomático de *Schizodon nasutus*

O índice gonadossomático (IGS) expressa a porcentagem que as gônadas representam do peso total do indivíduo e, de acordo com os dados obtidos, está diretamente relacionado com o desenvolvimento ovariano no ciclo reprodutivo, ou seja, quanto mais avançada é a fase reprodutiva, maior o índice gonadossomático (Fig. VIII). Assim, o menor valor de IGS registrado para *Schizodon nasutus* corresponde a fase de ovário Imaturo (0,74%), seguida das fases Desenvolvimento (0,93%) e Apto a Desovar (6,57%), na fase seguinte, Desova Ativa, como o ovário inicia a desova esse valor decai (5,55%), mas continua bastante elevado se comparado com as fases iniciais.

Para calcular o IGS durante as estações do ano os animais classificados como Imaturos foram descartados, já que estão presentes o ano todo e representam os indivíduos jovens da população, ou seja, ainda não estão sexualmente maduros. Comparando-se os valores do IGS em relação às estações do ano (Fig. IX), tem-se a época do ano na qual o animal está reproduzindo. Os maiores valores de IGS ocorreram na Primavera (6,33%) e no Verão (6,17%), nas quais há predominância das fases Apto a Desovar e Desova Ativa. Os menores valores foram encontrados no Outono (0,78%) e no Inverno (3,49%), estações nas quais ocorre apenas a fase Desenvolvimento.

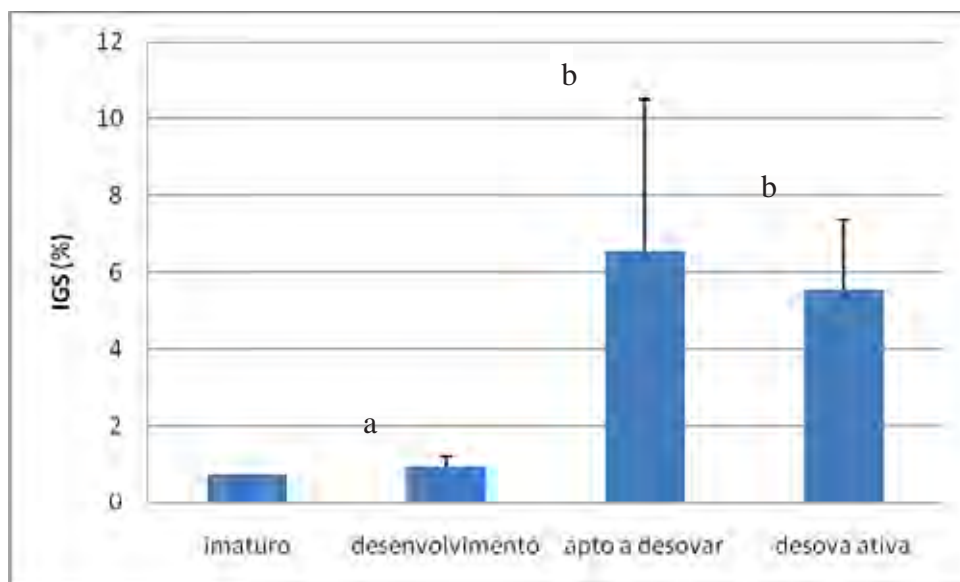


Figura VIII – Relação entre o índice gonadossomático com a fase do ciclo reprodutivo em que o animal se encontra. Letras diferentes significam diferenças estatísticas $p < 0,05$.

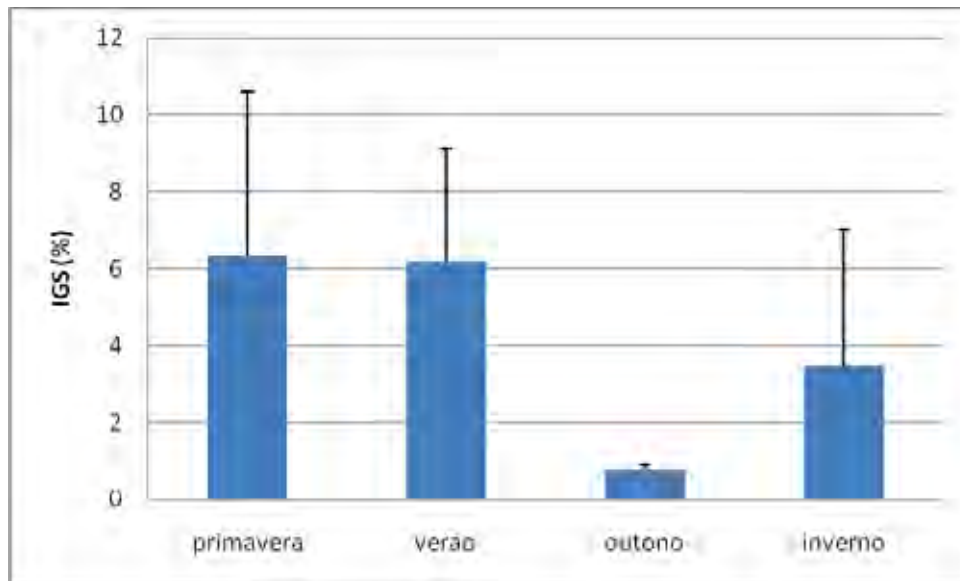


Figura IX – Relação entre o índice gonadossomático e a estação do ano em que o animal foi coletado. *Não houve diferença significativa entre nenhuma das estações.

1.10. Análises Estatísticas para fêmeas de *Schizodon nasutus*

1.10.1. Análise de Variância – ANOVA ao longo do ciclo reprodutivo

<i>Fase reprodutiva</i>	<i>S. nasutus</i>
<i>Desenvolvimento</i>	0,078494
<i>Apto a Desovar</i>	15,35518
<i>Desova Ativa</i>	3,293824

<i>Espécie</i>	<i>valor-P</i>
<i>S. nasutus</i>	0,000905 *

* $valor-P \leq 0,05$ = diferença significativa dentro do grupo

1.10.2. Teste t:

<i>Teste t</i>	<i>S. nasutus</i>
<i>Apto a Desovar / Desenvolvimento</i>	-4,423 *
<i>Apto a Desovar / Desova Ativa</i>	0,350
<i>Desenvolvimento / Desova Ativa</i>	-2,442 *
<i>t crítico</i>	2,423

* módulo de t calculado \geq t crítico = diferença significativa entre os grupos

1.10.3. Análise de Variância – ANOVA ao longo das estações do ano

<i>Estação do ano</i>	<i>S. nasutus</i>
<i>Primavera</i>	18,20741
<i>Verão</i>	8,71661
<i>Outono</i>	0,014566
<i>Inverno</i>	12,59144

<i>Espécie</i>	<i>valor-P</i>
<i>S. nasutus</i>	0,1368 *

* *valor-P* \geq 0,05 = diferença não significativa dentro do grupo

2. Machos

2.1. Estrutura testicular em *Schizodon Nasutus* e *Plagioscion squamosissimus*

Os testículos de ambas as espécies são órgãos pares, alongados, localizados longitudinalmente na região dorsal da cavidade celomática. Estão presos à parede dorsal desta cavidade por uma fina membrana de tecido conjuntivo – o mesórquio. Cada testículo apresenta um ducto espermático que, na região caudal, confluem em um gonoducto único, o qual desemboca na papila urogenital. São envoltos por uma túnica albugínea de natureza conjuntiva, que emite septos para o interior do tecido gonadal.

Conforme a fase reprodutiva em que se encontram ao longo do ciclo reprodutivo, os testículos podem apresentar volume e coloração variados, sendo mais translúcidos durante o início do ciclo, tornando-se mais volumosos e esbranquiçados, durante o período reprodutivo.

2.2. Organização testicular e o epitélio germinativo em *Schizodon Nasutus*

Em *Schizodon Nasutus*, os testículos são formados por dois compartimentos: o intersticial e o germinativo separados entre si por uma membrana basal.

O compartimento germinativo é organizado em alças e túbulos interconectados entre si, formando anastomoses em diferentes regiões do testículo, desde a região periférica até, e principalmente, próximo ao ducto espermático, caracterizando um testículo do tipo tubular anastomosado (Fig. 7a).

Os túbulos seminíferos delimitam um lúmen no interior dos testículos, o qual é revestido pelo epitélio germinativo. O epitélio germinativo é composto pelas células germinativas (oogônias, espermátocitos e espermátides) e pelas células somáticas (células de Sertoli), que se organizam formando cistos, a partir de prolongamentos citoplasmáticos das células de Sertoli, que envolvem as células germinativas. No

interior desses cistos ocorre a espermatogênese para a produção de gametas masculinos (espermatozóides), de forma sincrônica, ou seja, células de um mesmo cisto sempre estão na mesma fase da espermatogênese.

O epitélio dos túbulos seminíferos pode variar de contínuo a descontínuo, dependendo da fase do ciclo reprodutivo em que o animal se encontra, sendo que o epitélio contínuo caracteriza-se pela presença contínua de cistos e o descontínuo pela ausência destes.

Os cistos de espermatogônias, espermatócitos e espermatídes encontram-se distribuídos aleatoriamente pelos túbulos seminíferos. Com o término da espermiogênese, os cistos se rompem e liberam os espermatozóides para o lúmen dos túbulos seminíferos.

2.3. Organização testicular e o epitélio germinativo em *Plagioscion squamosissimus*

Assim como em *Schizodon Nasutus*, os testículos de *Plagioscion squamosissimus* são formados por dois compartimentos: o intersticial e o germinativo separados entre si por uma membrana basal.

O compartimento germinativo em *Plagioscion squamosissimus* é formado por estruturas digitiformes, os lóbulos testiculares, que terminam em fundo cego na região periférica do testículo, caracterizando uma organização testicular do tipo lobular (Fig. 7b).

Os cistos de espermatogônias, bem como os cistos de outras células germinativas, distribuem-se de forma aleatória e irrestrita ao longo do lóbulo testicular, caracterizando um testículo do tipo lobular irrestrito. Os lóbulos também podem sofrer anastomoses principalmente na região do ducto espermático.

A espermatogênese em *Plagioscion squamosissimus* ocorre no interior dos cistos, de forma sincrônica, como em *Schizodon Nasutus*. Ao término da espermatogênese os espermatozóides são liberados na luz dos lóbulos, principalmente na região do ducto espermático, o que torna o epitélio germinativo na região descontínuo.

Em ambas as espécies, o compartimento intersticial, composto de células do tecido conjuntivo, fibroblastos, fibras colágenas, células mióides, vasos sanguíneos e células de Leydig, também sofre alterações ao longo do ciclo reprodutivo, apresentando

variações na espessura de fibras colágenas, na quantidade de vasos sanguíneos e no número de células intersticiais.

2.4. Espermatogênese em *Schizodon Nasutus* e *Plagioscion squamosissimus*

Tanto em *Plagioscion squamosissimus* como em *Schizodon nasutus*, após a organização das células germinativas em cistos no epitélio germinativo, inicia-se a espermatogênese. O processo no interior de cada cisto ocorre de forma sincrônica, ou seja, em cada cisto, as células germinativas encontram-se em uma mesma fase de desenvolvimento.

As espermatogônias primárias são as maiores células da linhagem germinativa masculina, com núcleo volumoso, nucléolo evidente, cromatina finamente granulada, citoplasma acidófilo e rico em nuage (Fig. 8a-b). Estas células dividem-se por mitose, no interior dos cistos, dando origem às espermatogônias secundárias, com características semelhantes às espermatogônias primárias, porém com menor tamanho (Fig. 8c).

As espermatogônias podem proliferar por mitose, mantendo um estoque de células no testículo ou podem entrar em meiose, dando origem aos espermatócitos.

Os espermatócitos são ainda menores que as espermatogônias, têm núcleo basofílico com cromatina em diferentes graus de compactação e não possuem nucléolo (Fig. 8d). Durante as etapas da espermatogênese, são facilmente identificados pelas figuras de divisão celular (Fig. 8e).

Seguindo a meiose, os espermatócitos dão origem às espermatídes, as quais se apresentam como pequenas células esféricas com citoplasma bastante reduzido e flagelo em formação (Fig. 8f). Seu núcleo, com cromatina em compactação, decresce gradualmente em diâmetro ao longo da espermiogênese.

Em ambas as espécies, observam-se espermatídes iniciais, que ocupam todo o espaço delimitado pelo cisto notando-se somente seus núcleos (Fig. 8f), e espermatídes finais com flagelos visíveis e núcleos organizados junto à parede dos cistos (Fig. 8g).

Ao término da espermiogênese, os cistos se rompem e os espermatozoides são liberados para o lúmen testicular (Fig. 8h) dos túbulos de *Schizodon nasutus* ou dos lóbulos de *Plagioscion squamosissimus*.

Os espermatozoides são as menores células da linhagem germinativa, caracterizam-se por apresentar um longo flagelo e núcleo arredondado, com cromatina bastante compacta, a qual se cora intensamente pela Hematoxilina (Fig. 8h) e Azul de

Toluidina. Conforme os cistos de rompem, o epitélio germinativo deixa de ser contínuo, tornando-se descontínuo.

2.5. Análise macroscópica das gônadas e sua equivalência nas fases reprodutivas

As gônadas masculinas de *Plagioscion squamosissimus* e *Schizodon nasutus* foram classificadas macroscopicamente, no momento da dissecação, em quatro estádios, correspondentes às classificações tradicionais e em analogia à proposta de Vazzoler (1996) para fêmeas.

Estádio I – Imaturo-Repouso: as gônadas são pequenas, filamentosas, translúcidas e sem vascularização.

Estádio II – em Maturação: os testículos são maiores, opacos e a vascularização torna-se visível.

Estádio III – Maduro: os testículos apresentam-se esbranquiçados, vascularizados e ocupam grande parte da cavidade abdominal.

Estádio IV – Esgotado: os testículos são flácidos, de tamanho relativamente grande, mas pouco volumosos. É caracterizado principalmente pela presença de zonas hemorrágicas.

Os testículos assim classificados macroscopicamente foram analisados à microscopia de luz para detecção das fases reprodutivas a partir de dados histológicos (Tabela III e IV).

Para determinar as fases reprodutivas, os testículos dos machos de *Plagioscion squamosissimus* e *Schizodon nasutus* foram classificados histologicamente segundo a proposta de Brown-Peterson e colaboradores (2009) de acordo com as frequências dos tipos de espermatocistos no epitélio germinativo.

2.6. Análise macroscópica versus análise microscópica para *Schizodon nasutus*

Em *Schizodon nasutus*, a associação dos dados obtidos a partir das análises macroscópicas e microscópicas (Tabela III, Fig. X) mostrou que 1/3 das gônadas classificadas macroscopicamente como Imaturas e Repouso, apresentavam características histológicas correspondentes à gônadas imaturas; 1/3 às gônadas em fase de Desenvolvimento e 1/3 às gônadas em fase de Apto a Desovar. Das gônadas consideradas macroscopicamente Em maturação, 55,57% correspondiam à gônadas em Desenvolvimento, 33,32% à gônadas em fase de Apto a Desovar e 11,11% à fase Em Regeneração. Já os testículos considerados Maduros, foram classificados

histologicamente como em Desenvolvimento (19,99%), Apto a Desovar (19,99%) e Desova Ativa (60,02%).

Tabela III: Frequência das fases reprodutivas por estágio de desenvolvimento gonadal. Análise comparativa dos dados macroscópicos e microscópicos das gônadas masculinas de *Schizodon nasutus*.

Análise Macroscópica	Fase Reprodutiva	Análise Histológica
Imaturo / Repouso	Imaturo (33,33%)	espermatogônias primárias; sem lúmen
	Desenvolvimento (33,33%)	epitélio germinativo contínuo; cistos de espermatogônias, espermatócitos e espermátides; ausência de espermatozóides no lúmen
	Apto a Desovar (33,33%)	epitélio germinativo variando de contínuo a descontínuo; espermatozóides no lúmen; cistos de todos os estágios da espermatogênese ao longo do testículo
Em maturação	Desenvolvimento (55,57%)	epitélio germinativo contínuo; cistos de espermatogônias, espermatócitos e espermátides; ausência de espermatozóides no lúmen
	Apto a Desovar (33,32%)	epitélio germinativo variando de contínuo a descontínuo; espermatozóides no lúmen; cistos de todos os estágios da espermatogênese ao longo do testículo
	Em Regeneração (11,11%)	ausência de cistos; lúmen pequeno ou inexistente; proliferação de espermatogônias
Maduro	Desenvolvimento (19,99%)	epitélio germinativo contínuo; cistos de espermatogônias, espermatócitos e espermátides; ausência de espermatozóides no lúmen
	Apto a Desovar (19,99%)	epitélio germinativo variando de contínuo a descontínuo; espermatozóides no lúmen; cistos de todos os estágios da espermatogênese ao longo do testículo
	Desova Ativa (60,02%)	epitélio germinativo variando de contínuo a descontínuo; espermatozóides no lúmen; cistos de todos os estágios da espermatogênese ao longo do testículo

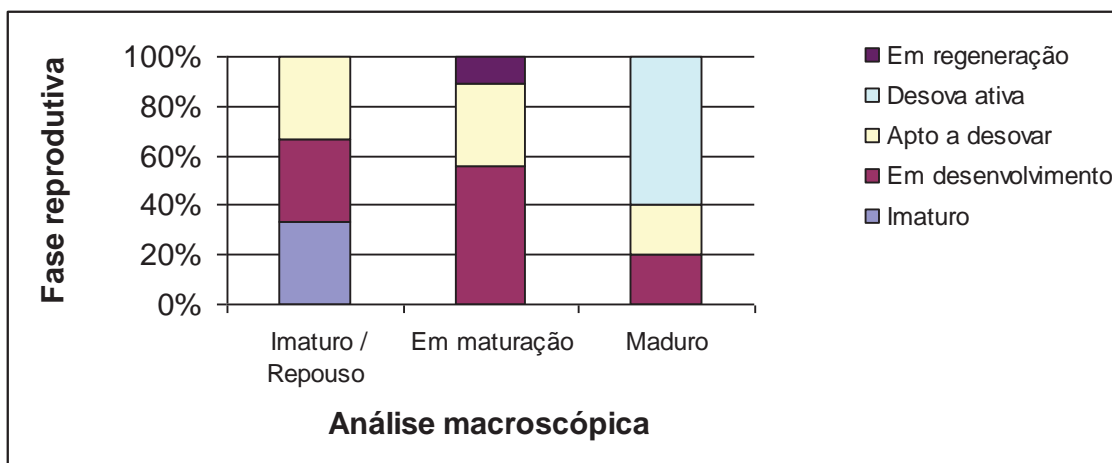


Figura X: Frequência das fases reprodutivas por estágio de desenvolvimento gonadal ao longo do ciclo reprodutivo de *Schizodon nasutus*.

2.7. Análise macroscópica versus análise microscópica para *Plagioscion squamosissimus*

Em *Plagioscion squamosissimus*, a associação dos dados obtidos a partir das análises macroscópicas e microscópicas (Tabela IV, Fig. XI) mostrou que 25% das gônadas classificadas macroscopicamente como Imaturas e Repouso apresentavam características histológicas correspondentes à gônadas em fase de Desova Ativa; 25% às gônadas em fase de Regressão e 50% às gônadas em fase Em Regeneração. As gônadas consideradas macroscopicamente Em maturação foram classificadas histologicamente como em Desenvolvimento (13,33%), Apto a Desovar (33,33%), Desova Ativa (20%), Regressão (20%) e Em Regeneração (13,33%). Já os testículos considerados Maduros, foram classificados histologicamente como em Desenvolvimento (20%), Apto a Desovar (40%), Desova Ativa (20%) e Regressão (20%).

Tabela IV: Frequência das fases reprodutivas por estágio de desenvolvimento gonadal. Análise comparativa dos dados macroscópicos e microscópicos das gônadas masculinas de *Plagioscion squamosissimus*.

Análise Macroscópica	Fase Reprodutiva	Análise Histológica
Imaturo / Repouso	Desova Ativa (25%)	epitélio germinativo variando de contínuo a descontínuo; espermatozóides no lúmen; cistos de todos os estágios da espermatogênese ao longo do testículo
	Regressão (25%)	Espermatozóides residuais no lúmen; cistos de espermátides amplamente espalhados; proliferação e regeneração espermatogonial
	Em Regeneração (50%)	ausência de cistos; lúmen pequeno ou inexistente; proliferação de espermatogônias
Em maturação	Desenvolvimento (13,33%)	epitélio germinativo contínuo; cistos de espermatogônias, espermátides e espermatozóides no lúmen
	Apto a Desovar (33,33%)	epitélio germinativo variando de contínuo a descontínuo; espermatozóides no lúmen; cistos de todos os estágios da espermatogênese ao longo do testículo
	Desova Ativa (20%)	epitélio germinativo variando de contínuo a descontínuo; espermatozóides no lúmen; cistos de todos os estágios da espermatogênese ao longo do testículo
	Regressão (20%)	Espermatozóides residuais no lúmen; cistos de espermátides amplamente espalhados; proliferação e regeneração espermatogonial
	Em Regeneração (13,33%)	ausência de cistos; lúmen pequeno ou inexistente; proliferação de espermatogônias
Maduro	Desenvolvimento (20%)	epitélio germinativo contínuo; cistos de espermatogônias, espermátides e espermatozóides no lúmen
	Apto a Desovar (40%)	epitélio germinativo variando de contínuo a descontínuo; espermatozóides no lúmen; cistos de todos os estágios da espermatogênese ao longo do testículo
	Desova Ativa (20%)	epitélio germinativo variando de contínuo a descontínuo; espermatozóides no lúmen; cistos de todos os estágios da espermatogênese ao longo do testículo
	Regressão (20%)	Espermatozóides residuais no lúmen; cistos de espermátides amplamente espalhados; proliferação e regeneração espermatogonial

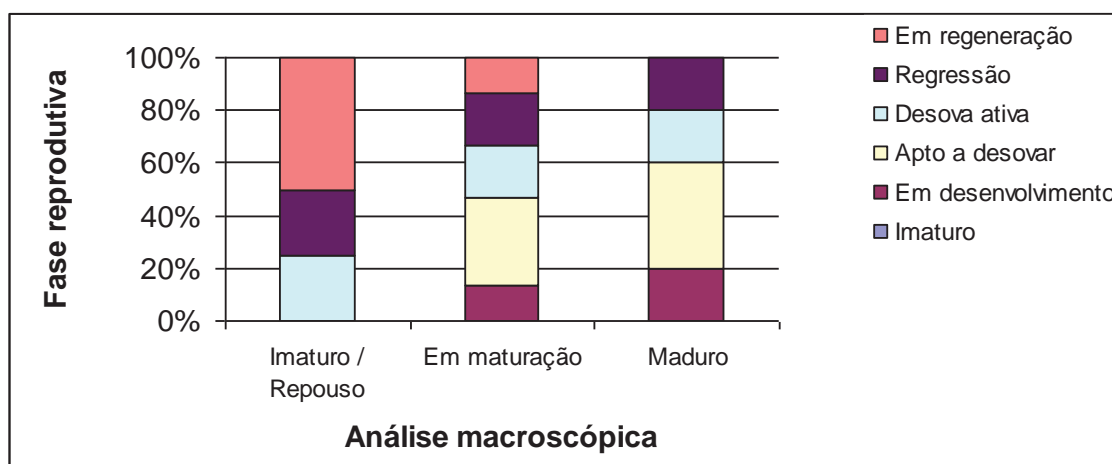


Figura XI: Frequência das fases reprodutivas por estágio de desenvolvimento gonadal ao longo do ciclo reprodutivo de *Plagioscion squamosissimus*.

2.8. Caracterização morfológica das fases reprodutivas

2.8.1. *Schizodon nasutus*

Em *Schizodon nasutus*, nos 17 indivíduos analisados de maio de 1997 a abril de 1998, determinou-se quatro fases reprodutivas – Desenvolvimento; Apto a Desovar; Desova Ativa e Em Regeneração – além de animais que apresentavam gônadas imaturas.

Fase – Imaturo (outono)

Os indivíduos dessa fase possuem o testículo repleto de cistos de espermatogônias e ainda não se pode observar o lúmen dos túbulos testiculares (Fig. 9a). No interstício pode-se observar apenas fibras colágenas, fibroblastos e vasos sanguíneos.

Fase – Desenvolvimento (inverno e demais estações)

Os animais dessa fase foram coletados principalmente no inverno, podendo também ser encontrados em todas as demais estações do ano. É nessa fase que a espermatogênese tem início. Podem ser encontrados cistos com células em todas as fases da espermatogênese (espermatogônias, espermatócitos, espermátides), com exceção de espermatozoides (Fig. 9b). O lúmen dos túbulos testiculares, se presente, é pequeno e vazio. O epitélio germinativo em todo o testículo é contínuo.

Fase – Apto a Desovar (primavera)

Nessa fase observou-se cistos de espermatogônias, espermatócitos e espermatídes, sendo que os dois últimos ocorrem em número crescente. Inicia-se a produção de espermatozóides, que podem ser encontrados no lúmen dos túbulos testiculares (Fig. 9c-d). Conforme os espermatozóides são liberados para o lúmen, o epitélio germinativo torna-se progressivamente descontínuo, principalmente nas regiões próximas ao ducto espermático.

Fase – Desova Ativa (primavera)

Os túbulos testiculares, totalmente preenchidos por espermatozóides, sofrem anastomoses (Fig. 9e) culminando para o ducto espermático (Fig. 9f). Ainda podem ser encontrados cistos de espermatogônias, espermatócitos e espermatídes, porém, dispersos e em pequena quantidade. O epitélio germinativo tende a se tornar totalmente descontínuo, desde a região periférica testicular até a região do ducto espermático.

Fase – Em Regeneração (outono)

Nesta fase, observam-se apenas cistos de espermatogônias (Fig. 9g). O lúmen dos túbulos testiculares está ausente, ou, se presente, são pequenos e podem conter espermatozóides residuais (Fig. 9h).

2.8.2. *Plagioscion squamosissimus*

Para *Plagioscion squamosissimus*, foram analisados 25 indivíduos, entre setembro de 1996 e junho de 1997. Determinou-se cinco fases reprodutivas – Desenvolvimento; Apto a Desovar; Desova Ativa; Regressão e Em Regeneração – não foram coletados animais Imaturos.

Fase – Desenvolvimento (outono e inverno)

Nesta fase, os testículos estão totalmente povoados por cistos de espermatogônias, espermatócitos e espermatídes (Fig. 10a). O lúmen dos lóbulos testiculares ainda são pequenos e vazios (ausência de espermatozóides) (Fig. 10b) no centro do testículo, e inexistentes na periferia do órgão. No interstício são encontrados apenas fibroblastos, fibras colágenas e vasos sanguíneos.

Fase – Apto a Desovar (primavera)

Nesta fase podem ser visualizados, por todo o testículo, cistos em diferentes fases da espermatogênese (espermatogônias, espermatócitos, espermatídes e espermatozóides). O lúmen dos lóbulos testiculares, principalmente do centro do testículo, estão totalmente preenchidos por espermatozóides. Devido à liberação dos espermatozóides para o lúmen o epitélio germinativo pode variar de contínuo a descontínuo (Fig. 10c).

Fase – Desova Ativa (verão)

Nesta fase, os cistos de espermatogônias, espermatócitos e espermatídes são pouco frequentes. O lúmen dos lóbulos testiculares está repleto de espermatozóides e se anastomosam (Fig. 10d) desembocando na região do ducto espermático (Fig. 10e). Com o rompimento e abertura dos cistos para a liberação dos espermatozóides, o epitélio germinativo torna-se descontínuo.

Fase – Regressão (outono)

Esta fase é caracterizada por possuir cistos de espermatócitos e espermatídes por todo testículo e espermatozóides residuais no lúmen dos lóbulos testiculares (Fig. 10f). No interstício encontra-se grande quantidade de macrófagos (Fig. 10g) associados à fagocitose de espermatozóides residuais. Inicia-se, nessa fase, a proliferação e Em Regeneração do epitélio germinativo, tornando-o, novamente, contínuo.

Fase – Em Regeneração (outono – primavera e verão)

Essa fase, encontrada principalmente no outono, e em menor frequência no verão e na primavera apresenta apenas cistos de espermatogônias (Fig. 10h). O lúmen dos lóbulos testiculares, se presentes, são pequenos e podem apresentar espermatozóides residuais (Fig. 10i). Macrófagos são encontrados no interstício com frequência.

2.9. Índice gonadossomático

O índice gonadossomático (IGS) expressa a porcentagem que as gônadas representam do peso total do indivíduo. Em *Schizodon nasutus* os dados de IGS revelam que o aumento do índice está diretamente relacionado com a progressão da espermatogênese, assim quanto mais avançada é a fase reprodutiva, maior o índice (Fig. XII). A fase Em Regeneração possui o menor valor de IGS (0,19%), seguida da fase Desenvolvimento (0,45%). Nos indivíduos “aptos a desovar” esse índice foi um pouco

mais alto (1,03%) atingindo seu máximo em Desova Ativa (2,25%). Distribuindo-se os valores de IGS por estação do ano (Fig. XIII) tem-se que o índice mais baixo foi encontrado no verão (0,12%), aumentando no outono (0,38%) e no inverno (0,49%), atingindo seu ápice na primavera (1,67%).

Em *Plagioscion squamosissimus* o IGS da fase Desenvolvimento foi de 0,20%, decaiu na próxima fase, Apto a Desovar (0,15%), aumentando em Desova Ativa (0,19%), decaindo nas próximas fases, Regressão (0,13%) e Em Regeneração (0,11%) (Fig. XIV). Distribuindo-se os dados por estação do ano (Fig. XV) teve-se que o IGS foi mais alto no inverno e na primavera (0,22%), decaiu no verão (0,16%) e no outono (0,11%).

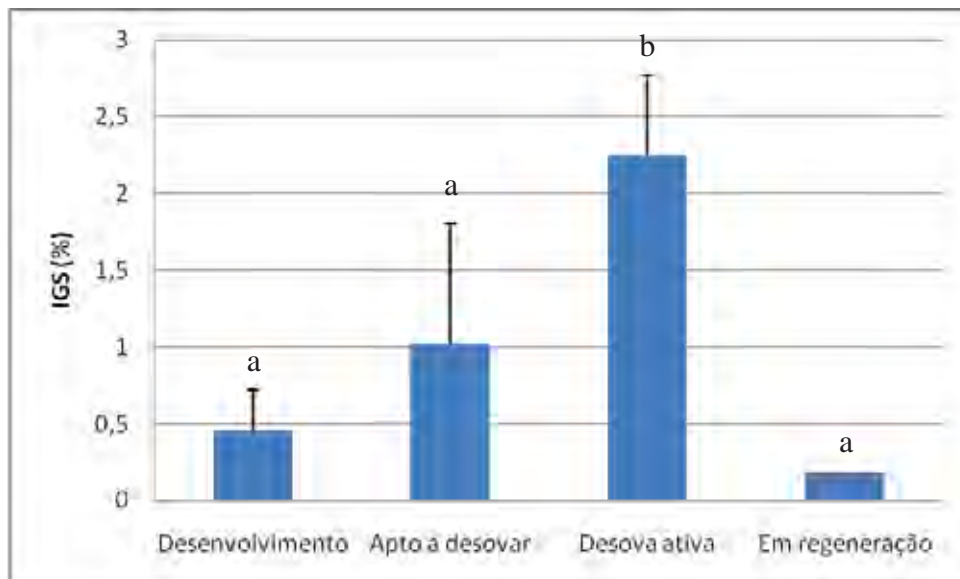


Figura XII: Relação entre o índice gonadosomático de *Schizodon nasutus* com a fase do ciclo reprodutivo em que o animal se encontra. Letras diferentes significam diferenças estatísticas $p < 0,05$.

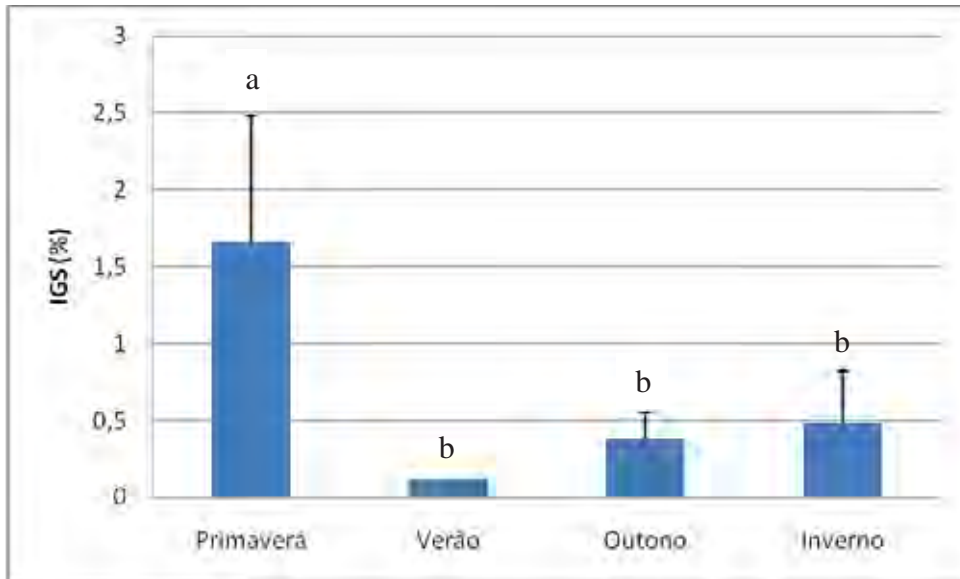


Figura XIII: Relação entre o índice gonadosomático de *Schizodon nasutus* e a estação do ano em que o animal foi coletado. Letras diferentes significam diferenças estatísticas $p < 0,05$.

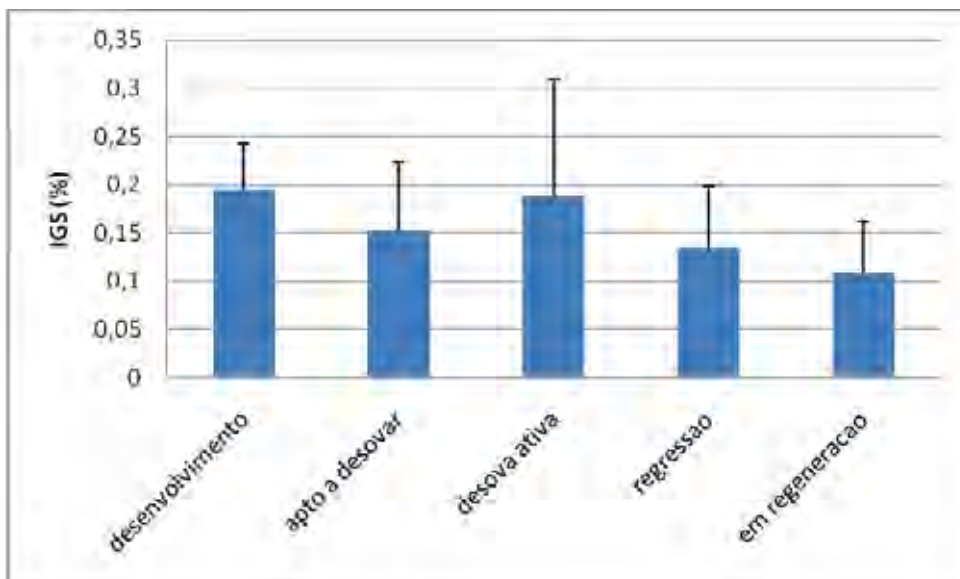


Figura XIV: Relação entre o índice gonadosomático de *Plagioscion squamosissimus* com a fase do ciclo reprodutivo em que o animal se encontra. Não houve diferença significativa entre nenhuma das fases reprodutivas.

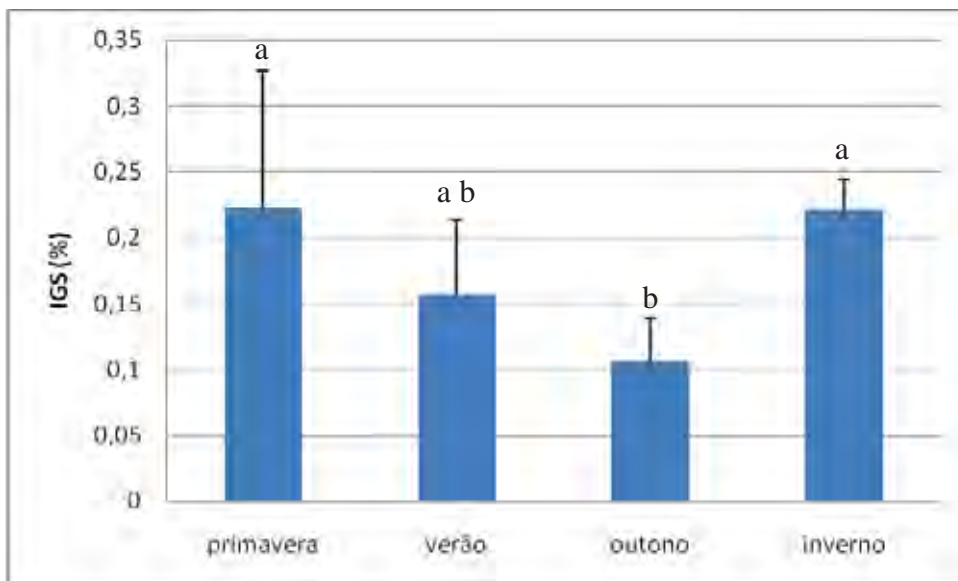


Figura XV: Relação entre o índice gonadosomático de *Plagioscion squamosissimus* e a estação do ano em que o animal foi coletado. Letras diferentes significam diferenças estatísticas $p < 0,05$.

2.10. Análises Estatísticas para machos de *Plagioscion squamosissimus* e *Schizodon nasutus*

2.10.1. Análise de Variância – ANOVA ao longo do ciclo reprodutivo

Fase reprodutiva	<i>P. quamosissimus</i>	<i>S. nasutus</i>
Desenvolvimento	0,002297	0,072599
Apto a Desovar	0,005125	0,613701
Desova Ativa	0,014531	0,263886
Regressão	0,004018	-
Em Regeneração	0,002907	-

Espécie	valor-P
<i>P. quamosissimus</i>	0,491399
<i>S. nasutus</i>	0,001874 *

* valor-P $\leq 0,05$ = diferença significativa dentro do grupo

2.10.2. Teste t:

Teste t	<i>S. nasutus</i>
Apto a Desovar / Regressão	1,901
Apto a Desovar / Desenvolvimento	1,796
Apto a Desovar / Desova Ativa	-3,182 *
Regressão / Desenvolvimento	-0,616
Regressão / Desova Ativa	-4,287 *
Desenvolvimento / Desova Ativa	-4,824 *
t crítico	2,560

* módulo de t calculado \geq t crítico = diferença significativa entre os grupos

2.10.3. Análise de Variância – ANOVA ao longo das estações do ano

<i>Estação do ano</i>	<i>P. quamosissimus</i>	<i>S. nasutus</i>
<i>primavera</i>	0,010894	0,668211
<i>verão</i>	0,003172	-
<i>outono</i>	0,001053	0,029315
<i>inverno</i>	0,000517	0,109559

<i>Espécie</i>	<i>valor-P</i>
<i>P. quamosissimus</i>	0,0051 *
<i>S. nasutus</i>	0,0077 *

* $\text{valor-P} \leq 0,05$ = diferença significativa dentro do grupo

2.10.4. Teste t:

<i>Teste t</i>	<i>P. quamosissimus</i>	<i>S. nasutus</i>
<i>inverno / primavera</i>	-0,029	-2,849 *
<i>inverno / verão</i>	1,757	0,897
<i>inverno / outono</i>	2,448 *	0,230
<i>primavera / verão</i>	1,757	3,224 *
<i>primavera / outono</i>	3,787 *	3,417 *
<i>verão / outono</i>	1,559	-0,512
<i>t crítico</i>	2,414	2,560

* módulo de t calculado \geq t crítico = diferença significativa entre os grupos

Figura 1: Foliculogênese em *Schizodon nasutus*. **a)** Ninhos de oogônias (g) delimitadas pelas células pré-foliculares (pf). Oócitos em crescimento primário (o). **b)** As oogônias (g) entram em meiose dando origem aos cistos de oócitos leptotênicos (ol), delimitados por células pré-foliculares (pf). **c-d)** Com o avanço da prófase a cromatina nuclear torna-se granular, caracterizando o oócito zigotênico (oz), que organiza-se em cistos delimitados pelas células pré-foliculares (pf). **e)** Os oócitos em paquíteno (op) são caracterizados pela formação dos complexos sinaptonêmicos. **f)** Com a desmontagem dos complexos sinaptonêmicos têm-se os oócitos diplotênicos (od) que deixam os cistos e são individualizados pelas células pré-foliculares (pf). **g)** Quando os oócitos (o) diplotênicos são individualizados pelas células foliculares (f) formam-se os folículos ovarianos. **a-g)** Coloração: Metanil Yellow.

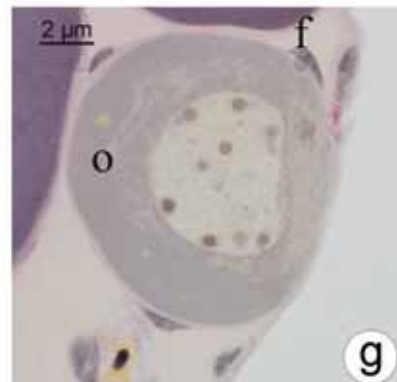
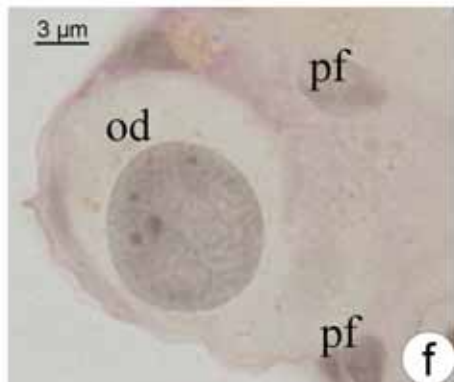
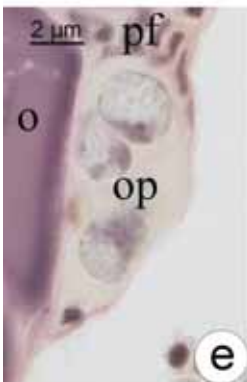
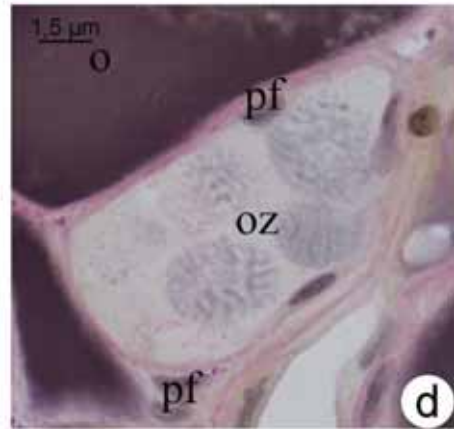
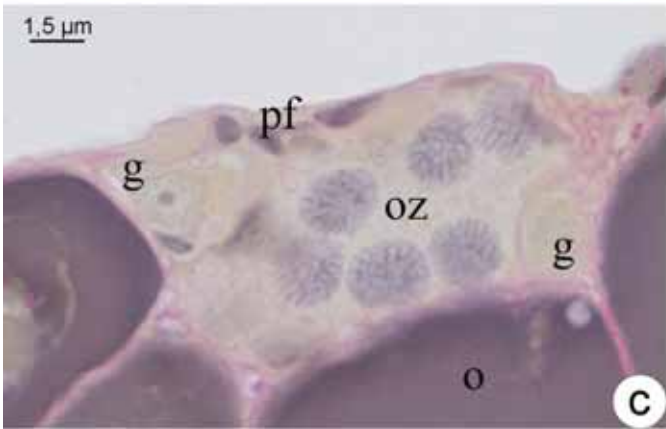
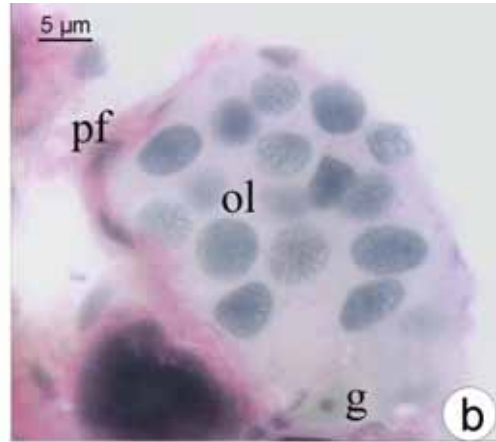
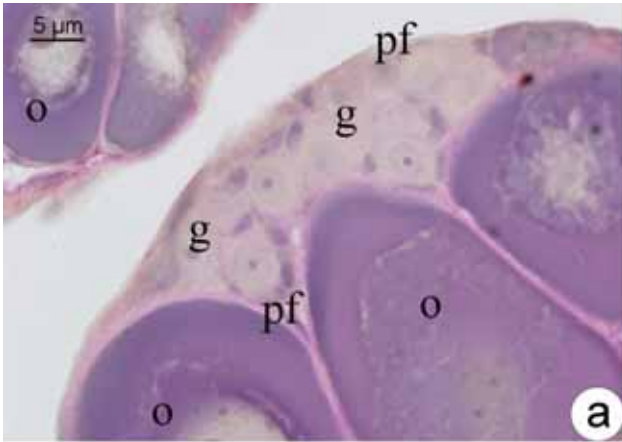


Figura 2: Foliculogênese de *Plagioscion squamosissimus*. **a)** Oogônia (o) individualizada pelas células pré-foliculares (pf). Oócitos em crescimento primário (o). **b)** As oogônias (g) sofrem mitose (m) dando origem aos ninhos, delimitados pelas células pré-foliculares. **c)** As oogônias (g) são individualizadas por processos citoplasmáticos das células pré-foliculares (pf). **d)** Depois de individualizadas as oogônias (g) sofrem mitose (m) dando origem aos cistos. **e)** Dentro dos cistos as oogônias (g) sofrem meiose dando origem aos cistos de oócitos leptotênicos (ol), também delimitados pelas células pré-foliculares (pf). **f)** Com o avanço da prófase a cromatina nuclear torna-se granular, caracterizando o oócito zigotênico (oz). **g)** Com a formação dos complexos sinaptonêmicos têm-se os oócitos em paquíteno (op). **h-i)** Com a desmontagem dos complexos sinaptonêmicos tem-se os oócitos diplotênicos (od). Em "i" notar o anel basofílico, formado pela condensação perinuclear de rRNA, associado ao envelope nuclear. **a-i)** Coloração: Metanil Yellow.

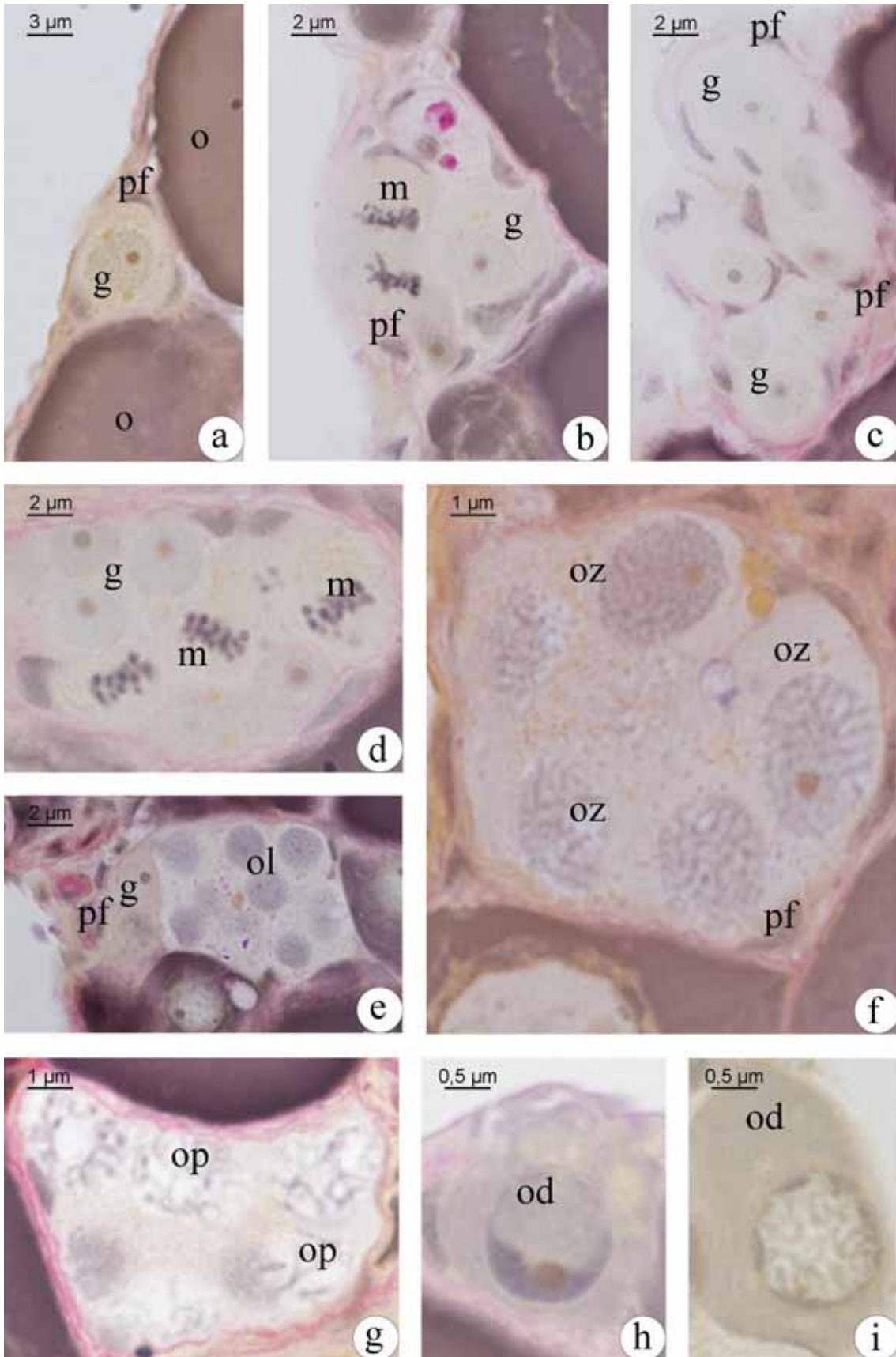


Figura 3: Comparação entre o desenvolvimento folicular de *Schizodon nasutus* (Characiformes) e *Plagioscion squamosissimus* (Perciformes). Alvéolos corticais (a); camada folicular (f); complexo pós-ovulatório (POC); gotículas de gordura (g); membrana basal (mb); núcleo (n); nucléolo (nu); primeira camada da zona pelúcida (zpI); segunda camada da zona pelúcida (zp II); teca (t); vitelo (v); zona pelúcida (zp). **a-k; a'-m'**) Coloração: Metanil Yellow.

Schizodon nasutus

Plagioscion squamosissimus

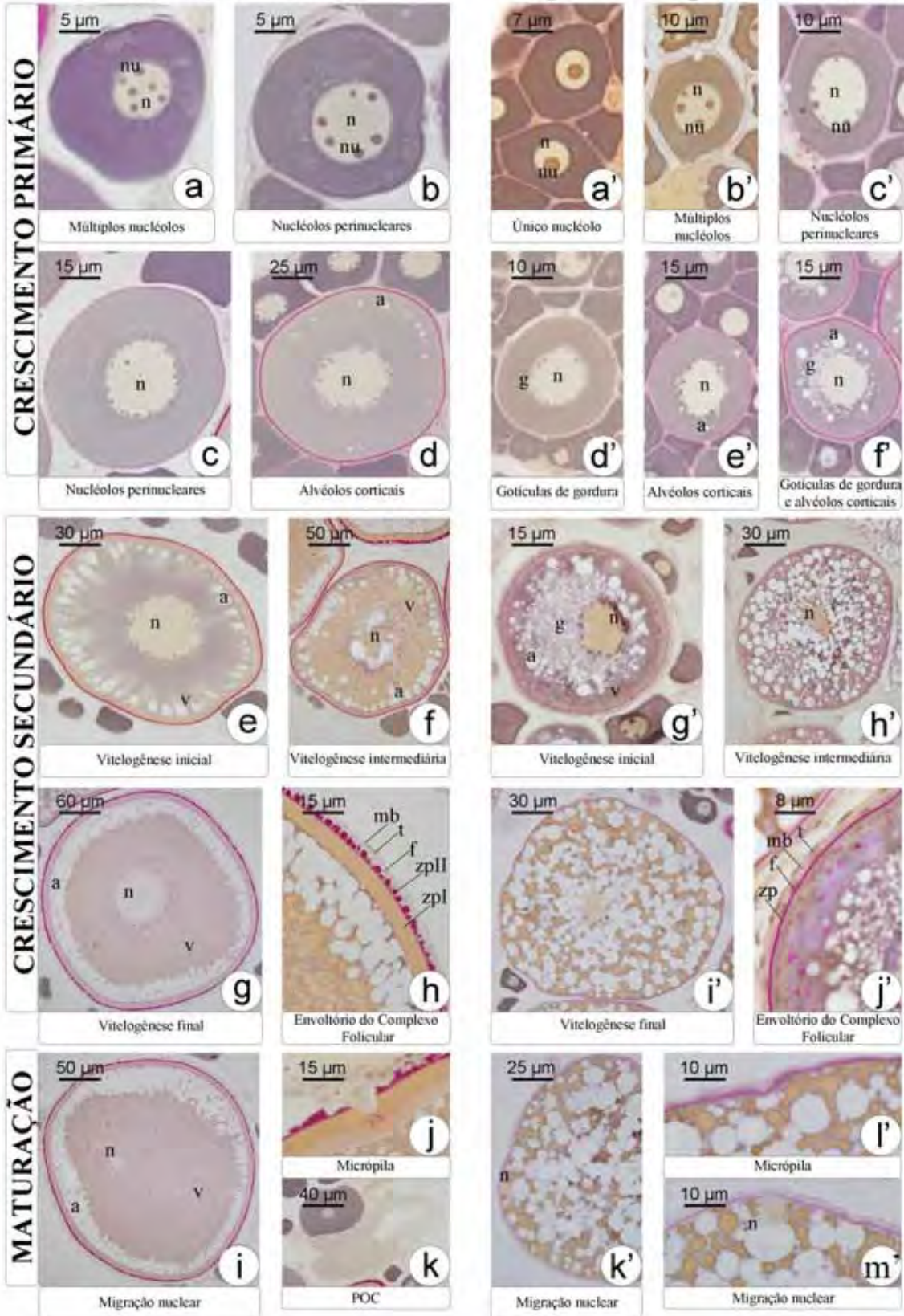


Figura 4: Esquema comparativo do desenvolvimento oocitário entre o Characiformes *Schizodon nasutus* e o Perciformes *Plagioscion squamosissimus*.

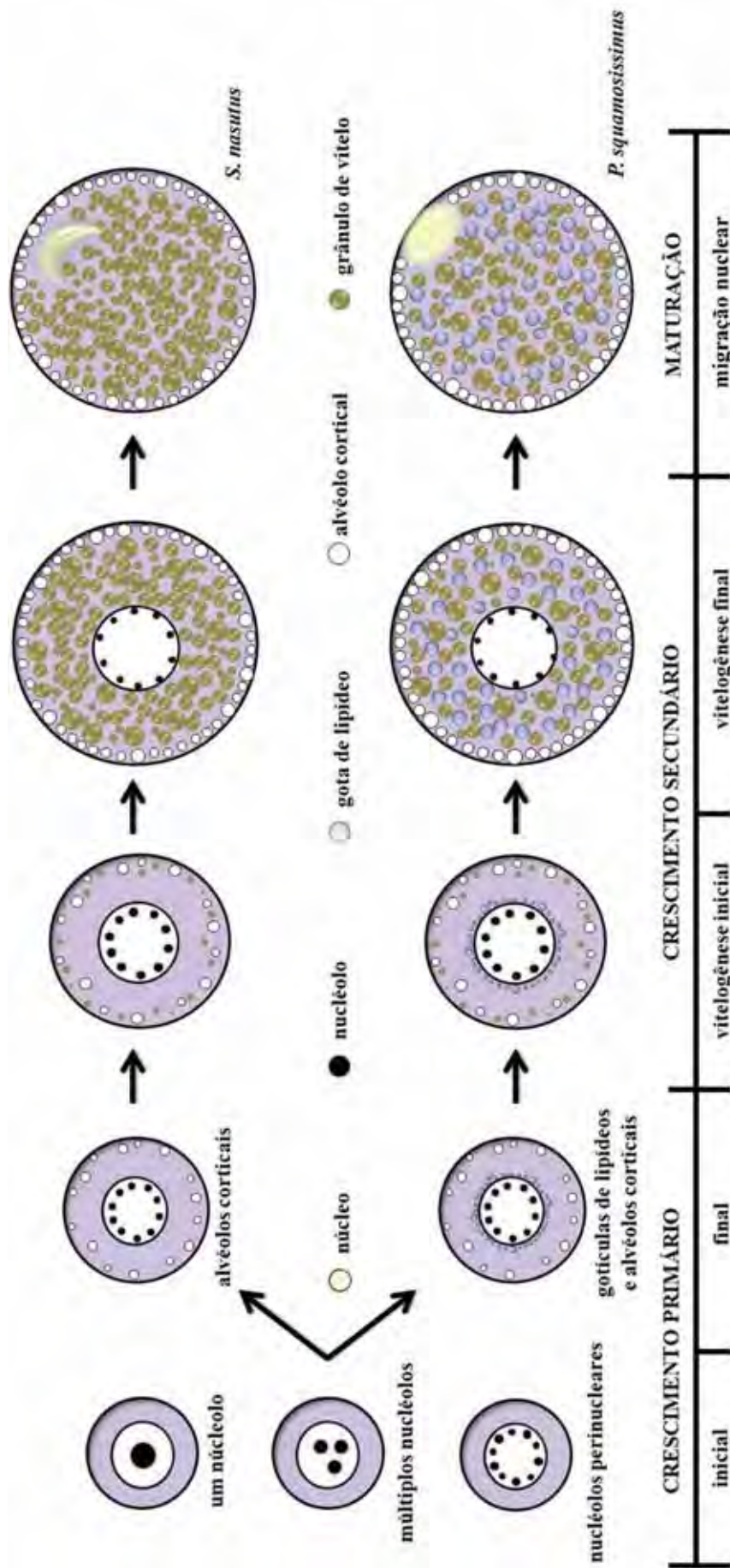


Figura 5: Ciclo reprodutivo de *Plagioscion squamosissimus*. **a)** Ovário imaturo; lamelas (L) compostas apenas de oócitos em crescimento primário, sem alvéolos corticais, e ninhos de oogônias e oócitos profásicos. Notar a cápsula (cp) delgada. **b)** Detalhe de a mostrando as lamelas (L) e a cápsula (cp) do ovário. **c)** Detalhe de ovário imaturo mostrando oócitos em crescimento primário (op) e ninhos de oogônias (g). **d)** Ovário Em Regeneração, oócitos em crescimento primário (op), alvéolos corticais (oa) e com gordura (og) ao longo das lamelas (L). Notar que a cápsula (cp) dessa fase é mais espessa. **e)** Ovário Em Regeneração, com grande quantidade de macrófagos (mc) e cápsula (cp) espessa. Vaso sanguíneo (vs). **f)** Detalhe de e evidenciando os macrófagos (mc), os ninhos de oogônias (g) e a cápsula (cp) espessa do ovário. **g)** Folículo atrésico (fa), típico de ovário Em Regeneração. Estroma ovariano (e). **a-f)** Coloração: Metanil Yellow.

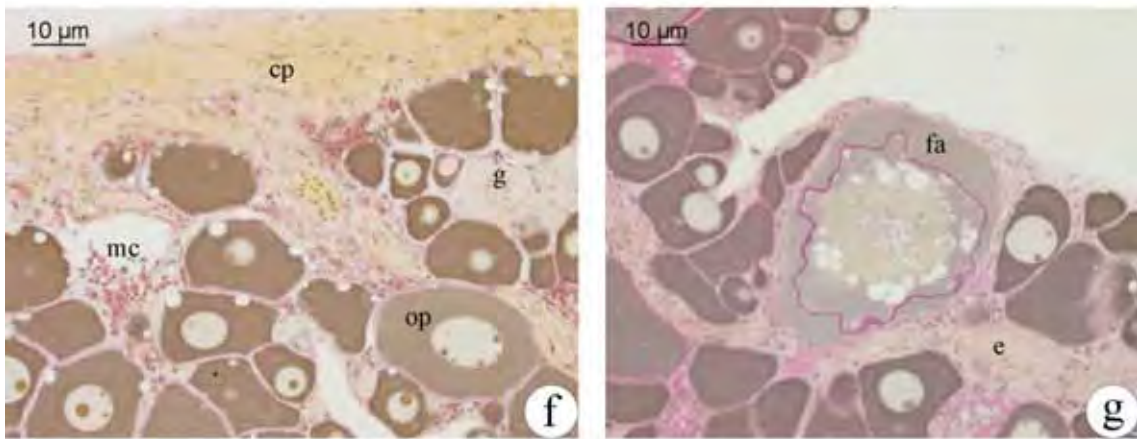
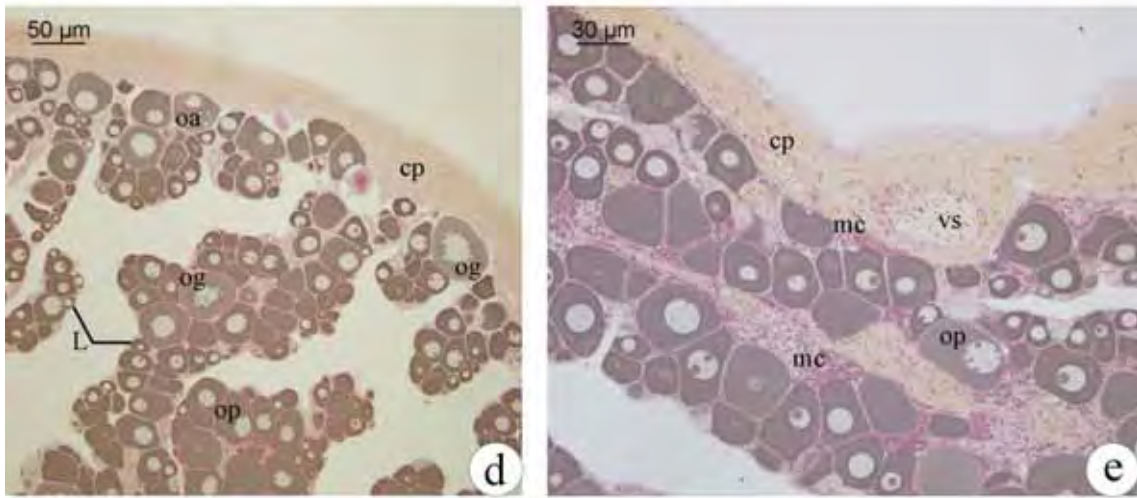
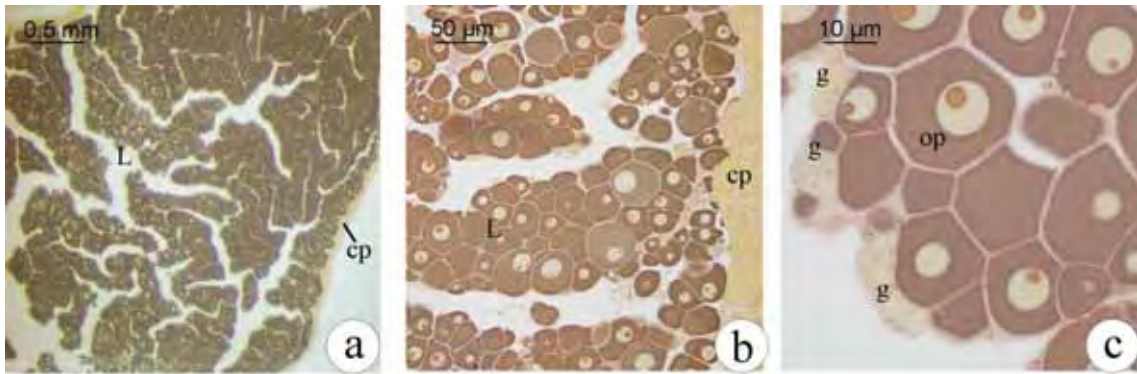


Figura 6: Ciclo reprodutivo de *Schizodon nasutus*. **a)** Ovário Imaturo, lamelas (L) apenas com oócitos em início de crescimento primário. **b)** Detalhe de a mostrando os oócitos em crescimento primário (op). **c)** Ovário em Desenvolvimento, presença de oócitos em crescimento primário com alvéolos corticais (oa). **d)** Detalhe de c. **e)** Ovário Apto a Desovar, com grande quantidade de oócitos em vitelogênese final (ov). **f)** Detalhe de e mostrando um oócito em vitelogênese final (ov), com núcleo (n) central e alvéolos corticais (a) na periferia do oócitos. **g)** Ovário em Desova Ativa, oócitos em vitelogênese final e núcleo migrando para a periferia. **h)** Ovário em Desova Ativa, notar o núcleo (n) dos oócitos em meia-lua, migrando para próximo da micrópila. **a-h)** Coloração: Metanil Yellow.

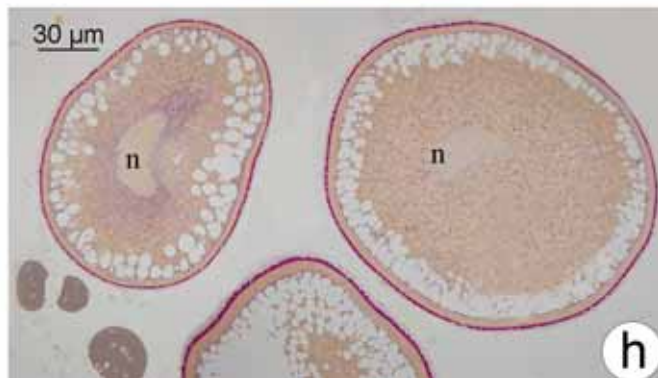
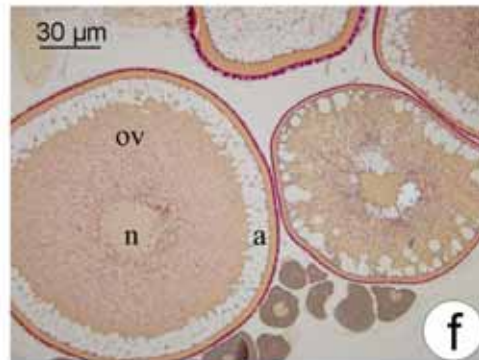
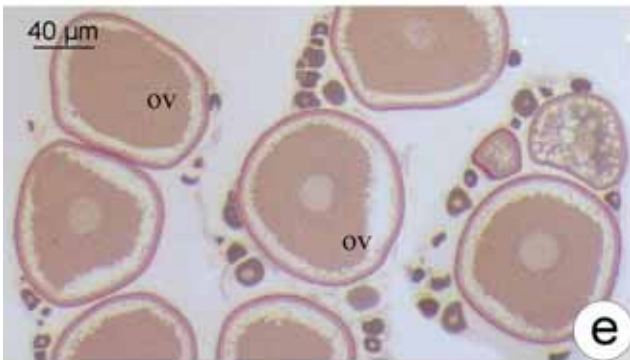
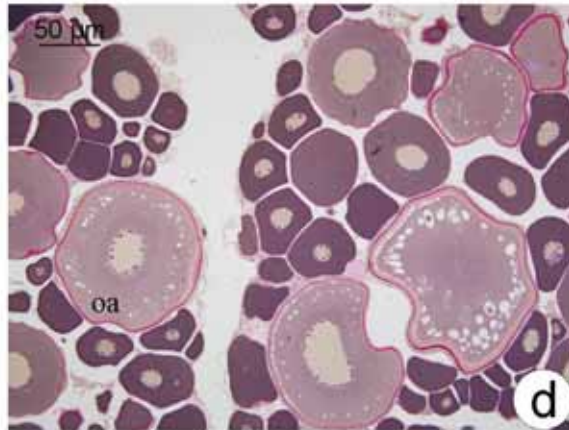
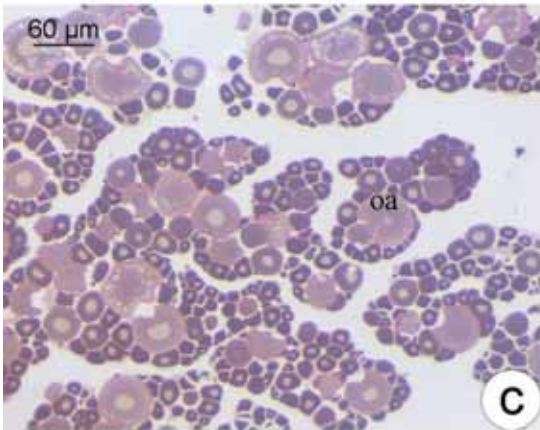
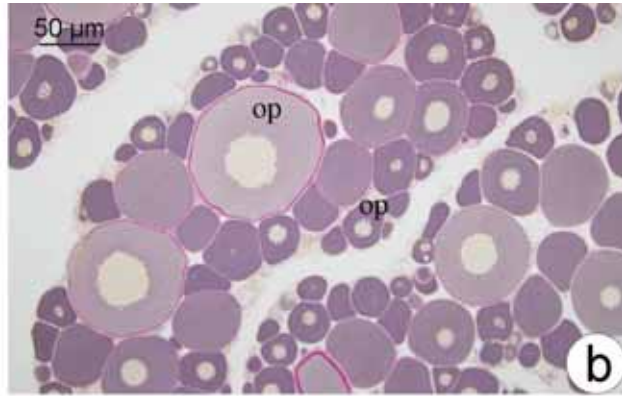
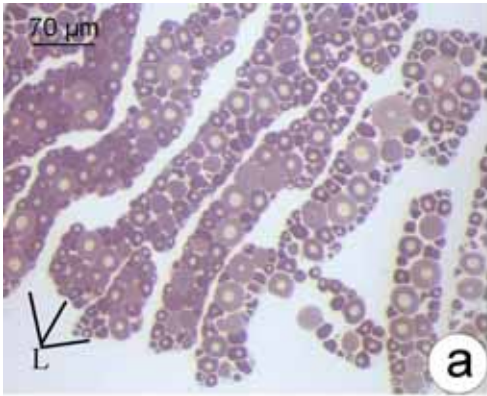


Figura 7: Estrutura testicular. **a)** Testículo de *Schizodon nasutus*, com organização do tipo tubular anastomosado. Notar os túbulos anastomosados (ta) confluindo para o lúmen (lu) dos túbulos testiculares. **b)** Testículo de *Plagioscion squamosissimus*, notar os lóbulos testiculares (lb) que, nos limites (L) entre eles, são separados pelo interstício (i). **a-b)** Coloração: Metanil Yellow.

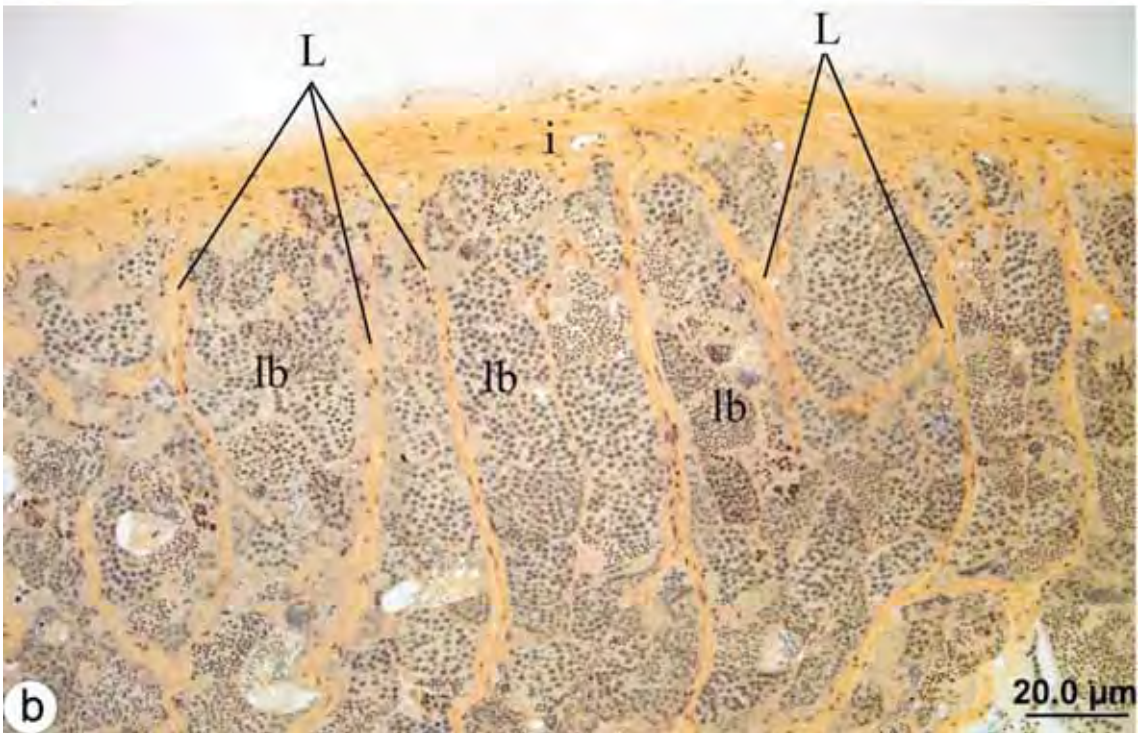
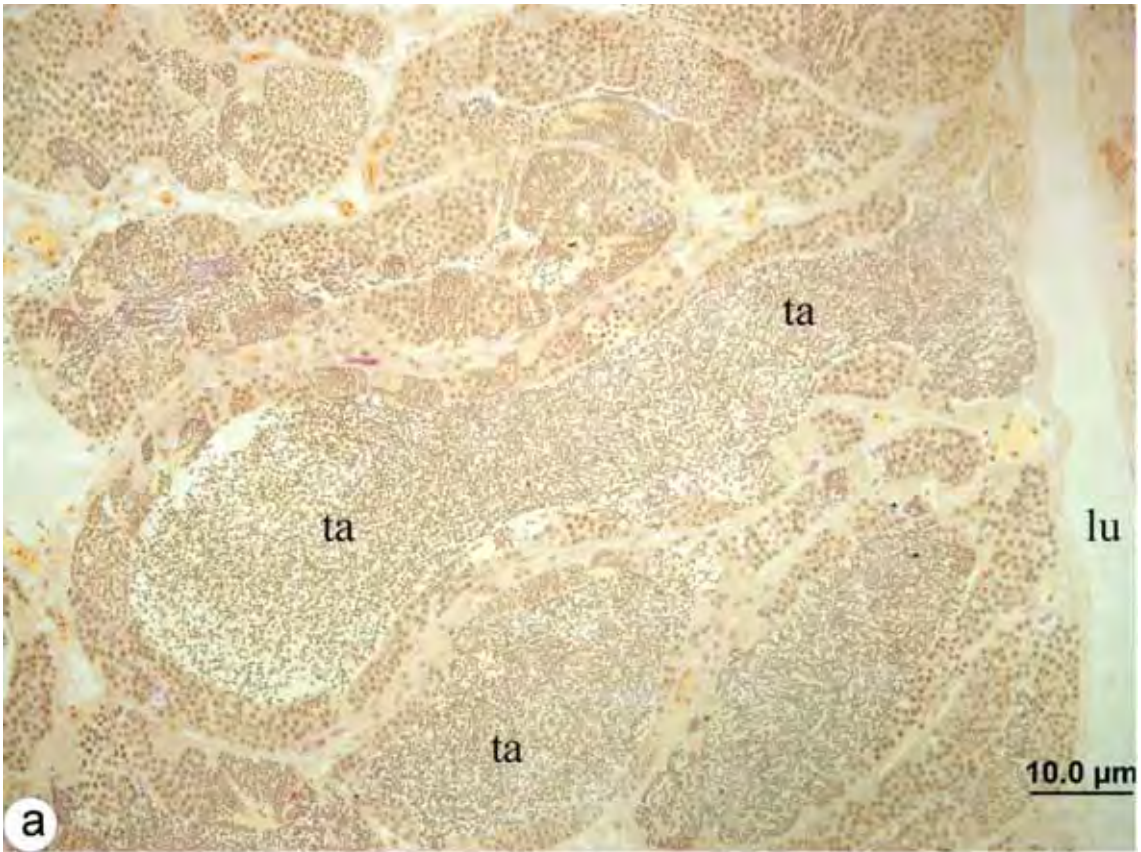


Figura 8: Espermatogênese de *Schizodon nasutus* e *Plagioscion squamosissimus*. **a-b)** Cisto de espermatogônias primárias (g) de animal imaturo (a) e animal sexualmente maduro (b). Notar as células de Sertoli envolvendo-as. **c)** As espermatogônias primárias sofrem mitose dando origem aos cistos de espermatogônias secundárias (gs), as células de Sertoli (S) delimitam esses cistos. **d)** As espermatogônias secundárias entram em meiose dando origem aos cistos de espermatócitos (c), também delimitados pelas células de Sertoli (S). **e)** Cistos de espermatócitos (c) dando continuidade à meiose (m). **f)** Os espermatócitos (c) dão origem às espermátides iniciais (e). Com o avanço da espermiogênese têm-se as espermátides finais (ef) nas quais os flagelos podem ser visualizados. **g)** Detalhe mostrando um cisto de espermátides finais (ef). **h)** Após o término da espermiogênese os espermatozóides (z) são liberados para o lúmen dos lóbulos testiculares. **a-h)** Coloração: Metanil Yellow. **a,d,f-g)** Testículo de *Schizodon nasutus*. **b-c,e,h)** Testículo de *Plagioscion squamosissimus*.

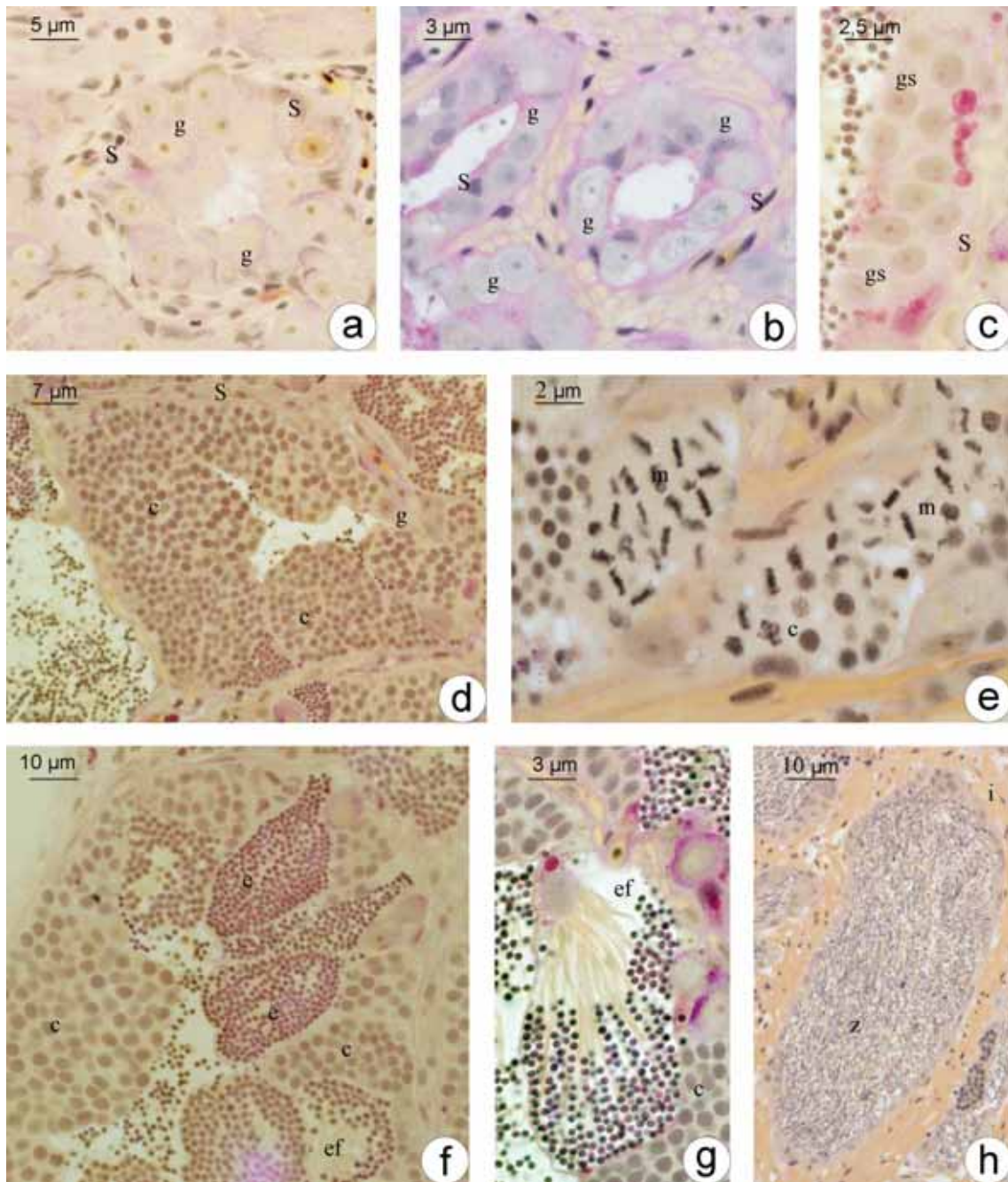


Figura 9: Ciclo reprodutivo de *Schizodon nasutus*. **a)** Testículo imaturo, composto apenas por cistos de oogônias (g) e células de Sertoli (cs). Vaso sanguíneo (vs). **b)** Testículo em Desenvolvimento, composto por cistos em diferentes fases da espermatogênese, cistos de espermatogônias (g), espermatócitos (c) e espermatídes (e). Ausência de espermatozóides. **c)** Testículo Apto a Desovar, com cistos de oogônias (g), espermatócitos (c), espermatídes e início da produção de espermatozóides (z). **d)** Detalhe de espermatócitos em meiose (m). **e)** Testículo em Desova Ativa, túbulos testiculares anastomosados (ta) repletos de espermatozóides que irão confluir no ducto espermático. **f)** Detalhe de testículo em Desova Ativa, mostrando o ducto espermático (du) cheio de espermatozóides (z) e, no epitélio germinativo, cistos de espermatogônias (g) e espermatócitos (c). **g-h)** Testículo Em Regeneração, composto por cistos de espermatogônias (g) e lúmen dos túbulos testiculares ausentes ou, quando presentes, podem apresentar espermatozóides residuais (zr). **a-h)** Coloração: Metanil Yellow.

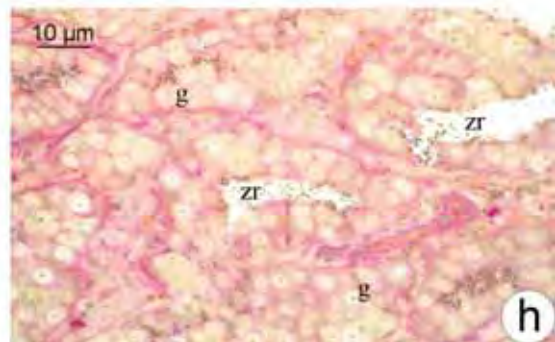
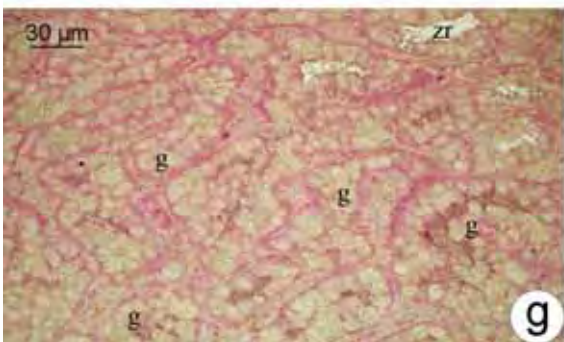
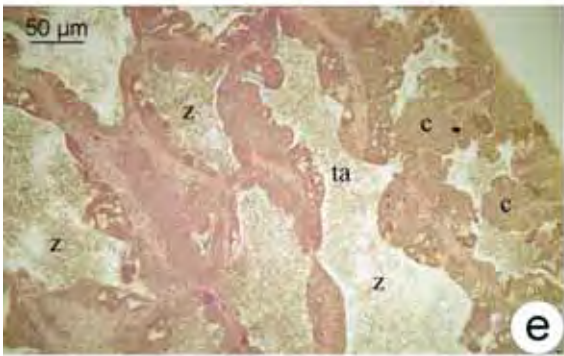
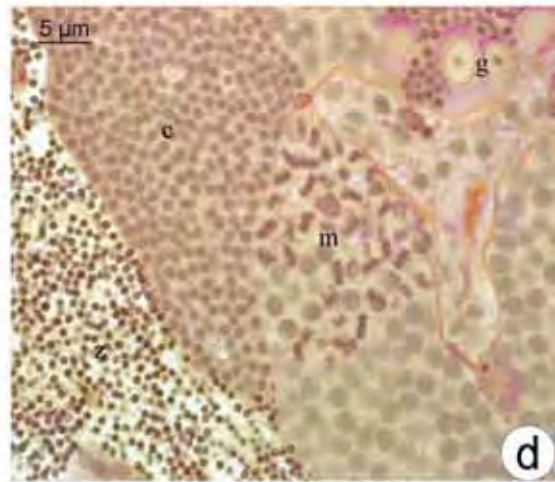
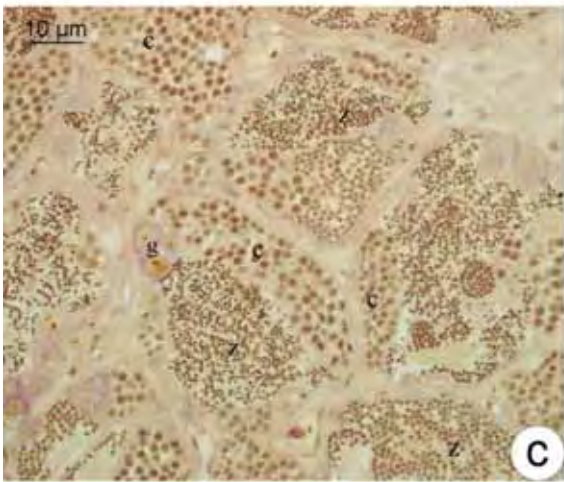
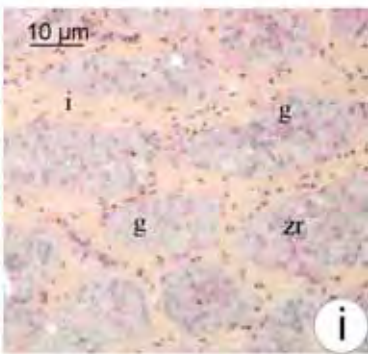
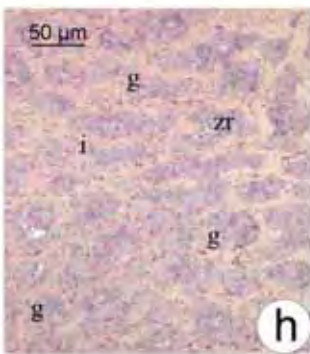
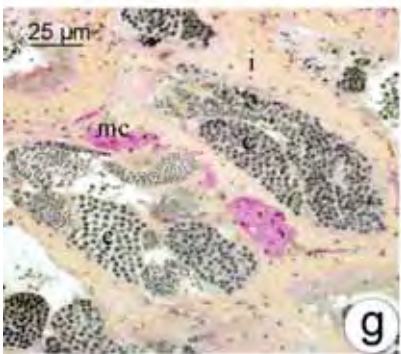
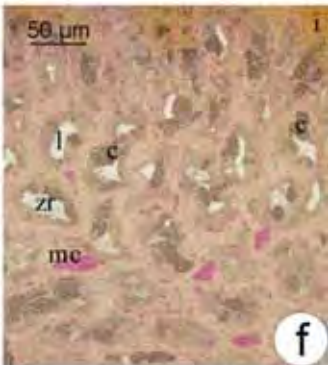
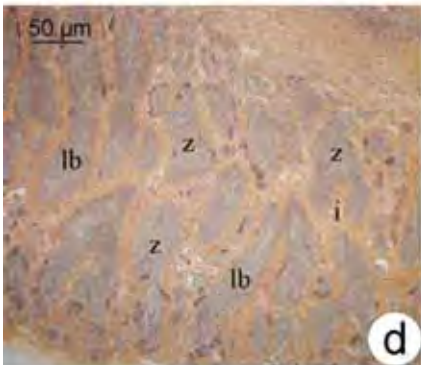
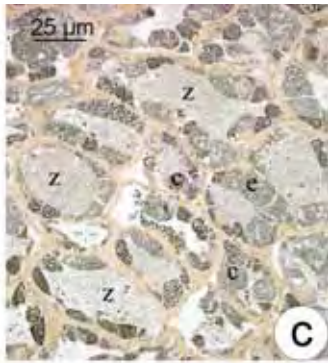
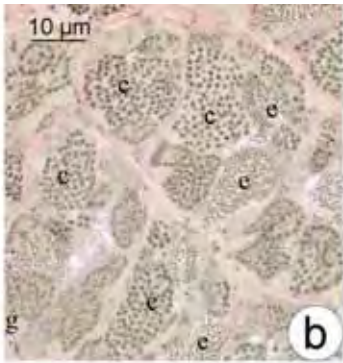
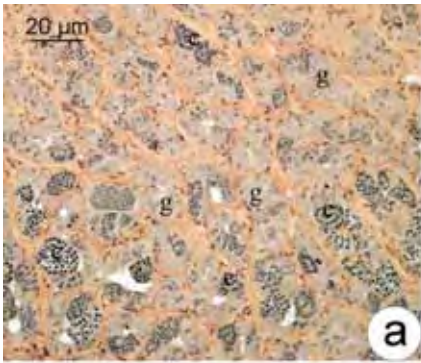


Figura 10: Ciclo reprodutivo de *Plagioscion squamosissimus*. **a)** Testículo em Desenvolvimento, composto por cistos em diferentes fases da espermatogênese, espermatogônias (g), espermatócitos (c) e espermatídes. Não há espermatozóides nessa fase. **b)** Detalhe de a mostrando cistos de espermatócitos (c) e espermatídes (e). **c)** Testículo Apto a Desovar, presença de cistos de espermatócitos (c), espermatídes e espermatozóides (z). **d)** Testículo em Desova Ativa. Lóbulos testiculares (lb) anastomosados repletos de espermatozóides (z) e separados entre si pelo interstício (i). **e)** Testículo em Desova Ativa evidenciando o ducto espermático (du) cheio de espermatozóides (z). **f)** Testículo em Regressão, composto por cistos em diferentes fases da espermatogênese, principalmente espermatócitos (c), lúmen (l) dos lóbulos testiculares pequenos e vazios ou com espermatozóides residuais (zr). Grande quantidade de macrófagos (mc). **g)** Detalhe de f mostrando um centro de macrófagos (mc). **h-i)** Testículo Em Regeneração, apresenta apenas cistos de oogônias (g), lúmen ausente ou, se presente, com espermatozóides residuais e interstício (i) espesso. **a-i)** Coloração: Metanil Yellow.



Discussão

1. A estrutura ovariana e o epitélio germinativo feminino

As espécies analisadas no presente estudo, *Plagioscion squamosissimus* e *Schizodon nasutus*, apresentam dois ovários localizados longitudinal e dorsalmente na cavidade abdominal, presos por um mesovário. Tanto esta posição, quanto a orientação anatômica dos ovários na cavidade abdominal de ambas as espécies aqui estudadas mantêm o mesmo padrão encontrado na maioria dos Teleostei, ou seja, as gônadas ocupam a região anterior da cavidade abdominal, com o gonoducto desembocando em uma papila urogenital localizada caudalmente, em relação ao corpo do animal (Nagahama, 1983; Selman e Wallace, 1986; Connaughton e Aida, 1998; Grier, *et al.*, 2007).

Tanto em *Plagioscion squamosissimus* como em *Schizodon nasutus*, os ovários são órgãos cavitários, em formato de estrutura sacular. O desenvolvimento de uma estrutura sacular, característico dos ovários de Teleostei, é única entre os vertebrados. Essa estrutura sacular determina a condição de um ovário do tipo cisto-ovário (Hoar, 1969; Nagahama, 1983), no qual a cavidade ovariana é contínua ao gonoducto (Nagahama, 1983; Selman e Wallace, 1986; Grier *et al.*, 2007).

Os ovários das espécies aqui analisadas apresentam externamente uma cápsula de tecido conjuntivo, a túnica albugínea, que emite septos para o interior do tecido ovariano, formando as lamelas ovígeras. Assim, as lamelas ovígeras projetam-se para o lúmen ovariano, delimitando-o. Ao delimitá-lo, o epitélio lamelar mostra-se constituído pelo epitélio germinativo (Grier *et al.*, 2009; Lubzens *et al.*, 2010).

Como esperado, observou-se no presente estudo, o mesmo padrão de organização das lamelas ovígeras, encontrado nos demais Teleostei, sendo a lamela ovígera composta pelo epitélio germinativo e pelo estroma ovariano subjacente. Presente entre eles, e separando os dois compartimentos ovarianos, encontra-se a membrana basal, na qual o epitélio está apoiado. O epitélio germinativo é constituído de dois tipos celulares: as células somáticas epiteliais e as células germinativas (oogônias e oócitos). No interior do estroma, o tecido conjuntivo contém diversos tipos celulares, como fibroblastos, granulócitos, fibras colágenas e vasos sanguíneos (Grier, 2002; Grier *et al.*, 2007), sendo que tanto o epitélio germinativo como o estroma ovariano, em *Schizodon nasutus*, sofrem mudanças significativas no decorrer do ciclo reprodutivo.

Além de todas essas características comuns, os resultados obtidos no presente trabalho mostram que o epitélio germinativo feminino em *Plagioscion squamosissimus*

e *Schizodon nasutus* compartilha as mesmas características descritas para os Teleostei em geral.

Assim, nos animais aqui analisados, a origem dos folículos ovarianos se dá a partir do epitélio germinativo, fato este comum a todos os Teleostei (ver Grier *et al.*, 2009 para revisão), independente do grupo ao qual as espécies *Schizodon nasutus* e *Plagioscion squamosissimus* pertençam – Chacariformes e Perciformes, respectivamente. Comparando-se ambas as espécies, sendo uma mais basal na escala evolutiva (*Schizodon nasutus*) e outra mais derivada (*Plagioscion squamosissimus*), nota-se que os eventos iniciais da formação folicular são bastante similares.

Nos animais aqui analisados, o folículo ovariano é composto pela célula germinativa, o oócito, e pelas células somáticas derivadas do epitélio, as células foliculares (Grier, 2000; Grier *et al.*, 2007; Lubzens *et al.*, 2010). Ao redor do folículo, dispõem-se as células da teca (Grier, 2000; Grier *et al.*, 2007), que juntamente ao folículo ovariano constituem o complexo folicular (Grier e Lo Nostro, 2000).

2. Foliculogênese

A foliculogênese em *Plagioscion squamosissimus* e *Schizodon nasutus* envolve sucessivos mecanismos de interação entre as células germinativas e as células foliculares, quando ainda na conformação de oogônias e células epiteliais. Nesses animais, as oogônias apresentam uma distribuição descontínua ao longo do epitélio germinativo, em concordância ao observado por Grier (2000). No epitélio, as oogônias isoladas ou em ninhos formam aglomerados celulares, que constituem locais de proliferação das células germinativas (Selman *et al.*, 1993). A partir dessas regiões, tem-se a formação de novas células germinativas – oogônias ou oócitos, a partir de divisões mitóticas ou meióticas, respectivamente.

As células germinativas mostram-se sempre envolvidas por projeções citoplasmáticas das células epiteliais (pré-foliculares). Ao dividirem-se as oogônias formam cistos de células, delimitados por células pré-foliculares. Ao entrar em meiose, as oogônias dão origem aos oócitos profásicos. O cisto de oócitos, em paquíteno tardio, é invadido por células pré-foliculares que acabam por envolver cada oócito individualmente, dando origem aos folículos ovarianos (Quagio-Grassiotto *et al.*, 2010).

Esses dados estão de acordo com recentes trabalhos em peixes (Quagio-Grassiotto *et al.*, aceito) e em outros vertebrados (Pepling e Spradling, 2001; Pepling, 2006) que demonstram claramente que o folículo ovariano forma-se a partir da

individualização do oócito paquitênico pelas células pré-foliculares, as quais rompem as pontes citoplasmáticas existentes entre os oócitos até esta etapa do desenvolvimento. A existência dessas pontes citoplasmáticas entre os oócitos explica o desenvolvimento sincrônico dos oócitos profásicos no interior dos cistos, como ocorre nas células germinativas masculinas de peixes e de outros animais (Fawcett *et al.*, 1959; De Rooij e Russell, 2000, Grier e Uribe-Aranzábal, 2009).

Após o rompimento das pontes, as células foliculares, agora ao redor do oócito diplotênico, sintetizam progressivamente uma membrana basal individualizando cada oócito, que deixa o ninho celular e segue seu desenvolvimento folicular (Mazzoni *et al.* 2010; Quagio-Grassiotto *et al.* aceito).

Esse processo de desagregação dos cistos e o rearranjo das células somáticas ao longo da foliculogênese nos peixes aqui estudados reforçam mais uma vez a hipótese de que a formação dos folículos ovarianos nas fêmeas de Teleostei em geral constitui um processo evolutivamente conservado entre os vertebrados.

3. Desenvolvimento folicular

As etapas do desenvolvimento oocitário podem ser identificadas através de diferentes critérios, como tamanho do oócito, presença e quantidade de substâncias citoplasmáticas de reserva e morfologia nuclear (Selman e Wallace, 1989; Vazzoler, 1996; Patiño e Sullivan, 2002). Para o presente trabalho, o desenvolvimento oocitário e consequentemente o desenvolvimento folicular foi classificado segundo a proposta de Grier e colaboradores (2009) que o dividem em crescimento primário, crescimento secundário e maturação.

Nas duas espécies analisadas e em correspondência aos demais Teleostei, o oócito, ao deixar o ninho e já em crescimento primário, inicia uma notável mudança em sua basofilia citoplasmática, devido ao acúmulo de RNAs no citoplasma (Selman e Wallace, 1989). Porém, durante esta etapa do desenvolvimento, os oócitos em crescimento primário de *Plagioscion squamosissimus* e *Schizodon nasutus* mostram as primeiras diferenças morfológicas, associadas às diferentes ordens as quais pertencem (Perciformes e Characiformes, respectivamente).

Enquanto os oócitos de *Schizodon nasutus* mantêm-se livres de qualquer tipo de vesículas citoplasmáticas, as quais surgem somente no fim de seu crescimento primário, na forma de alvéolos corticais, os oócitos de *Plagioscion squamosissimus* apresentam acúmulo gradual de gotículas de lipídeos, junto à região nuclear, logo a mudança

basofílica de seu citoplasma acontece. Essas características encontradas nos oócitos em crescimento primário de *Plagioscion squamosissimus* assemelham-se às características oocitárias apresentadas pelos peixes do seu mesmo grupo, os Perciformes. Porém, em contrapartida ao descrito por Patiño e Sullivan (2002) e Grier e colaboradores (2009), as primeiras gotículas de gordura podem surgir em *Plagioscion squamosissimus* antes do aparecimento dos alvéolos corticais, posteriormente, ou ainda, de forma concomitante.

Outra diferença encontrada quando se compara *Plagioscion squamosissimus* aqui estudado, um Perciformes de água doce, aos Perciformes marinhos comumente utilizados como referência para descrição do desenvolvimento oocitário nos trabalhos acima citados (Patiño e Sullivan, 2002; Grier *et al.*, 2009; Lubzens *et al.*, 2010), é que as gotas de gordura, embora aumentem de tamanho durante o desenvolvimento do oócito, mantêm-se sempre individualizadas mesmo ao fim do crescimento secundário do oócito, quando se apresentam dispersas entre os grânulos de vitelo.

Com a entrada em crescimento secundário, inicia-se a incorporação e deposição de vitelo na forma de grânulos, de forma idêntica, em ambas as espécies. Os grânulos de vitelo dos oócitos de *Plagioscion squamosissimus* e *Schizodon nasutus* não apresentaram fusão, tampouco mostraram-se liquefeitos em nenhum momento durante o desenvolvimento oocitário, seja no fim do crescimento secundário, ou nos oócitos em maturação, os quais já apresentavam núcleo excêntrico. Essas características também os diferem das propostas utilizadas por outros autores para classificar os oócitos durante seu desenvolvimento (Patiño e Sullivan, 2002; Le Menn *et al.*, 2007; Grier *et al.*, 2007; 2009).

Apesar dessas pequenas peculiaridades ao longo do desenvolvimento, de modo geral, o desenvolvimento oocitário em *Plagioscion squamosissimus* e *Schizodon nasutus* mantém o mesmo padrão encontrado nos demais Teleostei (ver Selman e Wallace, 1989; Tyler e Sumpter, 1996; Patiño e Sullivan, 2002; Grier, *et al.*, 2009; Lubzens *et al.*, 2010 para revisão).

4. A estrutura testicular e o epitélio germinativo masculino

A organização básica dos testículos é comum a todos os Teleostei e aos demais vertebrados. Apresenta função espermatogênica e androgênica, sendo dividido em dois compartimentos: o compartimento intersticial e o compartimento germinativo, os quais se encontram separados por uma membrana basal (Grier, 1992, 1993; Loir *et al.*, 1995; Pudney, 1996; Grier e Lo Nostro, 2000; Grier e Uribe, 2009; Schulz *et al.*, 2010).

Os Ostariophysi basais, representados neste estudo por *Schizodon nasutus* apresentam testículos tubulares anastomosados, nos quais o compartimento germinativo não termina na periferia testicular. Ao contrário, apresentam alças ramificadas que podem sofrer anastomoses em diferentes regiões do testículo, principalmente na porção dorsal, correspondente à região do ducto espermático.

Já em *Plagioscion squamosissimus*, representante dos Perciformes neste trabalho, o compartimento germinativo organiza-se em lóbulos ao invés de túbulos, sendo que esses podem sofrer anastomoses somente na porção proximal do lóbulo, junto ao ducto testicular. Na porção distal do lóbulo, ou seja, na periferia do testículo, os lóbulos se encerram em fungo cego (Grier, 1993; Parenti e Grier, 2004; Grier e Uribe-Aranzábal, 2009).

O compartimento germinativo, nas espécies aqui analisadas, seja este na forma de lóbulos ou túbulos anastomosados, determina a formação de cavidades revestidas pelo epitélio germinativo no interior dos testículos. Em ambos os casos – lóbulos ou túbulos anastomosados – o epitélio germinativo organiza-se em cistos formados por grupos de células germinativas em desenvolvimento sincrônico, envoltas pelas células de Sertoli (Grier, 1981; 2002; Billard, 1986; Pudney, 1995; Guraya, 2001; Grier e Uribe, 2009; Schulz *et al.*, 2010).

Devido a essa organização em cistos, o epitélio germinativo passa por alterações morfológicas ao longo do ciclo reprodutivo variando de contínuo a descontínuo sobre a membrana basal, de acordo com a presença ou ausência dos cistos (Grier, 1993; Grier e Taylor, 1998; Taylor *et al.*, 1998; Lo Nostro, 2000; Grier, 2002). A partir dessa variação do epitélio germinativo, caracterizou-se as diferentes fases reprodutivas, aqui apresentadas, ao longo do ciclo gonadal.

Os cistos de células germinativas estão presentes de acordo com a fase reprodutiva em que o animal se encontra. Entre esses cistos, em ambas as espécies, nota-se a distribuição espermatogonial aleatória, ou seja, os cistos de espermatogônias estão presentes em todas as porções do testículo. Ao longo do ciclo reprodutivo, nota-se que a distribuição das mesmas pode se mostrar mais concentrada em uma determinada região testicular. Exemplo disso ocorre durante as fases nas quais os testículos encontram-se com grande quantidade de espermatozóides. Nessas fases, com o início da espermição e período de não reposição das células germinativas, ocorre perda gradual do compartimento germinativo (Grier, 2002; Lo Nostro *et al.*, 2003; Grier e Uribe-Aranzábal, 2009), levando a uma dispersão de espermatogônias ao longo do mesmo.

Assim, nesses testículos, a espermatogônias nas regiões periféricas testiculares, quando comparadas com as regiões centrais, são mais numerosas. Este fato se dá possivelmente pela espermatogênese ocorrer da região central para a região periférica do testículo, como na maior parte dos Teleostei (Grier, 2002; Lo Nostro *et al.*, 2003). Essa diferença morfológica regional acarreta uma descontinuidade do epitélio germinativo na região próxima ao ducto, mas não na região periférica. Dessa forma, essa informação deve ser considerada na classificação morfológica da gônada ao longo do ciclo reprodutivo. Ao realizar uma classificação de fases reprodutivas deve-se levar em conta a análise de todas as porções testiculares, evitando possíveis erros nas classificações, associados às análises de porções testiculares isoladas.

As análises histológicas das fases reprodutivas de *Plagioscion squamosissimus* e *Schizodon nasutus* ao longo do ciclo reprodutivo estão de acordo com as observadas por Brown-Peterson e colaboradores (2009). Essa informação sustenta a hipótese de que os mecanismos de alterações do epitélio germinativo são conservados durante a evolução dos Teleostei, apresentando apenas pequenas modificações e adaptações decorrentes da biologia reprodutiva de cada espécie ou grupo (Nóbrega, 2006).

5. Análise macroscópica das gônadas e sua equivalência nas fases reprodutivas

A definição de uma escala de desenvolvimento gonadal tem se mostrado fundamental para o entendimento do ciclo reprodutivo anual dos peixes. Os estudos atuais existentes sobre desenvolvimento gonadal nos Teleostei, em especial no Brasil, baseiam-se principalmente em aspectos macroscópicos das gônadas (Vazzoler, 1996), sem se preocupar com caracterizações histológicas que, de fato, permitiriam observar as condições reais da gônada e seus respectivos estágios de desenvolvimento.

Ao caracterizar as gônadas de machos e fêmeas, no presente trabalho, no que tange aspectos histológicos e dados macroscópicos, notou-se que as classificações macroscópicas frequentemente não são condizentes, quando comparadas com as condições morfológicas microscópicas nas quais as gônadas realmente se encontram.

Ovários de fêmeas histologicamente imaturas de *Plagioscion squamosissimus*, por exemplo, foram classificados macroscopicamente como imaturos, em maturação e maduros, ou seja, os três tipos de estágios de desenvolvimento gonadal encontrados durante o período do estudo. O mesmo aconteceu com ovários Em Regeneração, desta mesma espécie. Este fato pode ser atribuído ao considerar que ovários Imaturos e Em Regeneração distinguem-se microscopicamente apenas pela presença de folículos

atrésicos, centros melanomacrofágicos e cápsula espessa nos ovários Em Regeneração (Brown-Peterson *et al.*, 2009). Porém essas estruturas ovarianas não se mostram visíveis a olho nu, podendo levar a uma classificação errônea ou contraditória dos ovários Em Regeneração, que se assemelham macroscopicamente aos ovários Imaturos.

Já nas fêmeas de *Schizodon nasutus*, 100% dos ovários considerados imaturos foram classificados corretamente. Em contrapartida, ovários considerados em maturação encontravam-se Imaturos, em Desenvolvimento ou Aptos a Desovar. Ainda na mesma espécie, ovários macroscopicamente maduros apresentavam características de ovários nas fases de Apto a Desovar e Desova Ativa.

Os dados obtidos indicam que em fases nas quais os ovários encontram-se ainda pouco desenvolvidos, a classificação macroscópica é de fácil identificação. Em fases mais avançadas de desenvolvimento, a classificação macroscópica torna-se duvidosa, uma vez que os ovários já apresentam oócitos visíveis e vasos sanguíneos, porém não é possível distinguir as etapas de desenvolvimento do oócito. Ao analisarem-se esses ovários histologicamente, têm-se aspectos morfológicos bastante diferentes entre os diferentes ovários, levando à classificações em fases reprodutivas distintas. Ou seja, ovários classificados macroscopicamente em um mesmo estágio de desenvolvimento gonadal frequentemente pertencem a fases reprodutivas distintas.

Dados semelhantes foram observados em *Merluccius hubbsi* (Honji *et al.*, 2006). Neste estudo, a identificação macroscópica apresentou resultados satisfatórios apenas para ovários Imaturos.

O grau de sucesso obtido com ovários imaturos pode ser atribuído à relativa facilidade de identificação dessas gônadas, pelas características peculiares que apresentam (Honji *et al.*, 2006; presente estudo), como pequeno tamanho e coloração translúcida, sem oócitos visíveis.

Para todas as outras fases reprodutivas, a identificação macroscópica parece apresentar um alto índice de erro, possivelmente atribuído às características do tecido gonadal (Honji *et al.*, 2006; presente estudo).

Esses resultados estão de acordo também com Dias e colaboradores (1998) que ao comparar a identificação macroscópica e microscópica dos ovários de algumas espécies de Teleostei mostraram que ovários em estádios de maturação são o que estão sujeitos a maior discrepância no que diz respeito à classificação.

Por outro lado, pode-se explicar o fato dos ovários de *Schizodon nasutus* classificados aqui como maduros, pertencerem às fases Apto a Desovar e Desova Ativa.

Neste caso, as diferenças histológicas entre essas duas fases reprodutivas não se refletem em mudanças macroscópicas da gônada. Oócitos com migração nuclear e oócitos hidratados nem sempre são passíveis de serem detectados macroscopicamente.

Além disso, nas classificações macroscópicas deve-se considerar também o tipo de desova do animal e suas estratégias reprodutivas. Animais que apresentam desovas parciais irão apresentar ovários repletos de oócitos em diferentes etapas de desenvolvimento, o que pode dificultar tanto a classificação macroscópica (West, 1990), como a análise microscópica. Este fato pode ter contribuído para o alto índice de discordâncias entre as classificações macroscópicas e microscópicas, nas fêmeas aqui analisadas.

Para machos, a correlação entre as classificações macroscópicas e microscópicas é ainda mais complexa. Todos os testículos classificados macroscopicamente como imaturo, em maturação e maduro, em ambas as espécies aqui analisadas, *Plagioscion squamosissimus* e *Schizodon nasutus*, apresentavam características histológicas de pelo menos três fases reprodutivas diferentes. Porém, a fase reprodutiva com maior frequência, na maioria dos casos, correspondia ao estágio de desenvolvimento gonadal classificado macroscopicamente. Em *Schizodon nasutus*, por exemplo, das gônadas consideradas macroscopicamente como imaturas, 33,33% realmente eram testículos Imaturos. Das gônadas em maturação, 55,57% correspondiam a testículos em fase reprodutiva de Desenvolvimento, e dos testículos considerados maduros, 60,02% deles eram gônadas em fase reprodutiva de Desova Ativa.

Para *Plagioscion squamosissimus*, situação semelhante foi observada. Porém, diferentemente das gônadas imaturas de *Schizodon nasutus*, neste caso a análise histológica dos testículos mostrou que 50% deles encontravam-se Em Regeneração. Este dado pode ser associado ao fato das gônadas imaturas e Em Regeneração apresentarem características bastante semelhantes, principalmente no aspecto macroscópico, diferenciando-se histologicamente somente pela presença de macrófagos e espermatozóides residuais nos testículos Em Regeneração.

Da mesma forma, 40% dos testículos maduros, encontravam-se em fase reprodutiva de Apto a Desovar e 20% em Desova Ativa, ou seja, macroscopicamente, essas fases são de difícil distinção.

Assim, conclui-se que a classificação macroscópica das gônadas masculinas, em relação às fêmeas, apresenta um índice relativamente alto de concordância com a análise microscópica.

Tanto nos machos quanto nas fêmeas, gônadas imaturas e Em Regeneração sempre foram classificadas macroscopicamente como imaturas. No caso de fêmeas de *Schizodon nasutus* e machos de *Plagioscion squamosissimus* isso não aconteceu somente porque a fase Em Regeneração era inexistente ou apresentava uma baixa amostragem.

6. Fases reprodutivas

A biologia reprodutiva nos Teleostei é caracterizada a partir da determinação das fases reprodutivas de acordo com os diferentes estágios de desenvolvimento oocitário nas fêmeas (Vazzoler, 1996; Taylor *et al.*, 1998; Brown-Peterson *et al.*, 2009), e nos machos através da descrição das alterações estruturais do epitélio germinativo e dos estágios das células germinativas (Grier e Taylor, 1998; Grier e Lo Nostro, 2000; Brown-Peterson *et al.*, 2009). Com base nessas informações, os animais aqui analisados são passíveis de serem classificados de acordo com as três propostas citadas tanto para fêmeas (Vazzoler, 1996; Taylor *et al.*, 1998; Brown-Peterson *et al.*, 2009) como para machos (adaptado de Vazzoler, 1996; Grier e Taylor, 1998; Brown-Peterson *et al.*, 2009). Porém, ao comparar as três propostas, nota-se que Brown-Peterson e colaboradores (2009) dividem o ciclo reprodutivo em seis fases - Imaturo, Desenvolvimento, Apto a Desovar, Desova Ativa, Regressão e Em Regeneração - e não quatro ou cinco como nas classificações anteriores (de Vazzoler, 1996; Grier e Taylor, 1998; e Taylor *et al.*, 1998). Isso se deve principalmente ao fato das classificações tradicionais considerarem animais prontos para reproduzir como “maduros” (Vazzoler, 1996) ou em “maturação final” (Taylor *et al.*, 1998; Grier e Taylor, 1998), enquanto que Brown-Peterson e colaboradores (2009) dividem-nas em duas fases: Apto a Desovar e Desova Ativa. Essa caracterização é importante, principalmente em relação às fêmeas. A distinção entre essas duas fases se dá em relação ao desenvolvimento oocitário. Enquanto gônadas nas fases Apto a Desovar apresentam oócitos em crescimento secundário com vitelogênese completa, nas fases de Desova Ativa, os oócitos encontram-se em maturação, ou seja, seus núcleos são excêntricos, dispondo-se em processo de migração ou já junto à micrópila.

A partir da comparação das propostas acima citadas, a caracterização dos ovários e testículos de *Schizodon nasutus* e *Plagioscion squamosissimus* em fases reprodutivas foi estabelecida de acordo com a proposta de Brown-Peterson e colaboradores (2009), na qual a histologia do tecido gonadal ao longo do ciclo

reprodutivo parece ser a mais adequada. Esta proposta faz referência ainda à análise macroscópica da gônada, o que auxiliaria na classificação da fase reprodutiva, no caso da análise histológica manter-se semelhante. Exemplo disso é o considerado para machos, nas fases Apto a Desovar e Desova Ativa, indistinguíveis histologicamente. No entanto, no presente estudo pode-se perceber que os animais aptos a desovar possuem espermatozóides no lúmen dos lóbulos/túbulos testiculares, mas que estes ainda não sofreram anastomoses. Já os nos animais em Desova Ativa, os lóbulos/túbulos testiculares estão anastomosados, confluindo para o ducto espermático.

Aspecto frequente de discordâncias entre as classificações tradicionais refere-se principalmente às fases de “repouso”, “regredida” e “em regeneração”. Essas fases são comumente confundidas com gônadas imaturas, ou seja, gônadas de animais sexualmente imaturos. Brown-Peterson e colaboradores (2009) propõem que essas fases podem ser distinguidas através da espessura da cápsula do órgão. Animais sexualmente maduros apresentam cápsulas cada vez mais espessas ao longo dos ciclos reprodutivos, enquanto que animais Imaturos têm cápsulas bastante delgadas. Este é um aspecto importante a ser considerado, quando outras características histológicas, como folículos atrésicos, nas fêmeas, por exemplo, estejam ausentes e todas as outras características histológicas sejam semelhantes em gônadas maduras e imaturas.

Além disso, o termo “repouso” utilizado por Vazzoler (1996) é inadequado para esta fase reprodutiva, na qual o epitélio germinativo das gônadas masculinas ou femininas é marcado por um período de intensa proliferação de células germinativas (oogônias e espermatogônias) e células epiteliais (foliculares e células de Sertoli). O termo Em Regeneração utilizado por Brown-Petterson e colaboradores (2009) é mais adequado e representativo para caracterização da fase, mesmo quando comparado ao termo “fase regredida” (Taylor *et al.*, 1998; Grier e Taylor, 1998).

Outra característica marcante, que difere as fases de Regressão e Em Regeneração, seja nos machos ou nas fêmeas, é a presença de células fagocíticas, como os macrófagos. Essas fases apresentam intensa reabsorção celular e essas células, associadas aos centros melanomacrofágicos, parecem ter um papel crucial na reabsorção de folículos atrésicos nas fêmeas e de espermatozóides residuais e restos celulares nos machos, estando envolvidos em ambos os casos na remodelação tecidual (Grier e Taylor, 1998; Lo Nostro, 2000; França, 2010).

Quanto ao desenvolvimento oocitário de *Schizodon nasutus*, ao longo das fases reprodutivas, obteve-se um resultado satisfatório, em relação à frequência dos tipos de

oócitos. À medida que o ovário avança pelas fases reprodutivas ao longo do ciclo, o desenvolvimento oocitário também progride, mudando as características ovarianas conformacionais, o que se reflete como áreas nitidamente distintas entre os diferentes tipos de ovários. Assim, ovários Imaturos apresentam 98,76% de área ovariana ocupada por oócitos em crescimento primário. Estes passam a ocupar 59,10% da área, nos ovários em Desenvolvimento, sendo 40,52% ocupado agora por oócitos em crescimento secundário (em vitelogênese inicial e intermediária). Nos ovários em fases de Apto a Desovar, 97,93% da área é ocupada por oócitos em crescimento secundário com vitelogênese final. Já nos ovários em Desova Ativa, os oócitos em vitelogênese final ocupam o equivalente a 51,04% da área, enquanto que os oócitos em maturação, 45,49%. Isso se deve a progressão do desenvolvimento oocitário, no qual, na fase de Desova Ativa, parte dos oócitos que completaram sua vitelogênese, entram em maturação e passam a apresentar núcleos em processo de migração, caracterizando a fase de Desova Ativa.

Ainda para *Schizodon nasutus*, os ninhos de oogônias e de oócitos profásicos ocupam 1,24% de área ovariana, em gônadas imaturas. Conforme avança no ciclo reprodutivo, os ninhos tornam-se menos frequentes e passam a ocupar somente 0,38% de área ovariana em gônadas em Desenvolvimento, e 0,01% nas gônadas em fase reprodutiva de Apto a Desovar e Desova Ativa. Nessas duas últimas fases, além da queda percentual, nota-se que cada um dos ninhos é menor em relação às outras fases reprodutivas, sendo formado por poucas células ou por uma única oogônia isolada.

Em *Plagioscion squamosissimus* os resultados encontrados para os ovários Imaturos e Em Regeneração são similares, uma vez que estes tipos de gônada apresentam características histológicas bastante semelhantes (Brown-Peterson *et al.*, 2009). Os oócitos em crescimento primário ocupam 96,09% da área ovariana da gônada imatura, enquanto que na gônada Em Regeneração, 94,43%. Ninhos de oogônias correspondem a 2,12% e 1,98% da área ovariana nas gônadas imaturas e Em Regeneração, respectivamente. Já os ninhos de oócitos aparecem com 1,79% nas gônadas imaturas, aumentando sua frequência nas gônadas Em Regeneração (2,31%). Com base nesses resultados, nota-se que as gônadas apresentam constituição oocitária que as difere somente pelo fato das gônadas Em Regeneração apresentarem 1,28% da área ocupada por folículos atrésicos.

Em relação à composição dos ninhos de células germinativas em *Plagioscion squamosi* os ninhos de oogônias são mais frequentes nos ovários Imaturos do que nos

Em Regeneração, apesar dessa frequência não apresentar diferença significativa. Já os ninhos formados por oócitos leptotênicos, zigotênicos e paquitênicos são mais frequentes nos ovários Em Regeneração, sendo que a única diferença significativa existente é em relação aos ninhos de oócitos paquitênicos. Estes são facilmente detectáveis nos ovários Em Regeneração e dificilmente visualizados nos ovários Imaturos. Já os oócitos diplotênicos iniciais, que ainda não entraram em crescimento primário, são mais numerosos nos ovários Imaturos. Assim, percebe-se que em ambos os casos, o epitélio germinativo feminino mantém-se em constante proliferação de oogônias e conseqüente produção ilimitada de oócitos (Grier, 2000; Grier *et al.*, 2007; Grier *et al.*, 2009; presente estudo).

Os resultados deste trabalho indicam que muito possivelmente, a formação dos folículos ovarianos, bem como a proliferação de oogônias, é intensa no início do ciclo reprodutivo, ou seja, nas fases Em Regeneração. Essa afirmação pode ser feita, quando se compara os dados das duas espécies analisadas, apesar de ambas apresentarem ciclos reprodutivos incompletos. Porém, sabendo-se que formação do folículo representa um processo evolutivamente conservado tanto entre os vertebrados, como nos Teleostei em geral (Quagio-Grassiotto *et al.*, aceito), provavelmente as fases reprodutivas apresentam resultados similares, ou seja, ao analisar a distribuição e frequência do processo de foliculogênese ao longo do ciclo reprodutivo, a maior frequência encontrada seria nos ovários em fases de Em Regeneração (observação pessoal em *Tanichthys albonubes* – projeto em andamento).

Essa presença constante de oogônias isoladas, ninhos de oogônias, ninhos de oócitos, bem como folículos ovarianos em diferentes etapas do desenvolvimento oocitário, folículos maduros, folículos atrésicos e complexos pós-ovulatórios, nos ovários de *Plagioscion squamosissimus* e *Schizodon nasutus*, aqui analisados caracterizam um epitélio germinativo permanentemente ativo (ver Grier, *et al.*, 2009 para revisão) que sofre alterações significativas ao longo de seus ciclos reprodutivos.

7. Índice gonadossomático (IGS)

Segundo Vazzoler (1996) o índice gonadossomático (IGS), em associação a análises macroscópicas e histológicas constitui uma boa ferramenta como indicador da atividade reprodutiva dos peixes.

Os resultados obtidos no presente estudo revelam que para *Schizodon nasutus* os valores do IGS, de ovários e testículos, confrontados com as fases reprodutivas, são

condizentes com o desenvolvimento das gônadas durante todo o ciclo reprodutivo, isto é, o aumento percentual das gônadas em relação ao corpo do animal ocorre concomitantemente ao desenvolvimento dos ovários e testículos, nas fases reprodutivas.

Para fêmeas de *Schizodon nasutus*, por exemplo, o maior valor de IGS foi de 14,12%, em uma fêmea capturada durante a primavera, com gônada em fase reprodutiva de Apto a Desovar, ou seja, período que antecede a desova. De acordo com Guraya (1986), esse aumento de peso dos ovários em relação ao peso total do corpo que ocorre no período anterior a desova pode variar de 1% a 20% e deve-se principalmente ao acúmulo de nutrientes pelo oócito, ou seja, acúmulo de grânulos de vitelo, durante o crescimento secundário do oócito, no qual este apresenta um aumento brusco de tamanho (Patiño e Sullivan, 2002; Spadella *et al.*, 2005).

A análise do IGS das fêmeas de *Schizodon nasutus* apresentou para os meses correspondentes à primavera e verão elevados valores médios de IGS (6,3% e 6,1% respectivamente) que, apesar de não apresentar diferença estatística em relação às outras estações, sugere que estas sejam as estações nas quais ocorra a reprodução. Para os machos, quando se analisa os índices gonadossomáticos ao longo do ano têm-se os maiores valores nos meses correspondentes à primavera.

Ainda em relação ao período reprodutivo, os dados histológicos obtidos neste trabalho para *Schizodon nasutus* apontam machos e fêmeas com gônadas aptas à reprodução, na primavera e verão. A análise de frequência das fases reprodutivas corrobora esta afirmação e traça um perfil sobre o ciclo reprodutivo de *Schizodon nasutus*, com ovários em fases reprodutivas de Apto a Desovar e Desova Ativa presentes principalmente durante a primavera e verão.

Assim, unindo os dados de IGS aos de frequência das fases reprodutivas durante os meses de coleta, conclui-se que as gônadas de *Schizodon nasutus* encontram-se prontas para a reprodução durante as estações de primavera e verão, concordando com os dados já existentes na literatura (Rêgo, 2008).

Em relação à espécie *Plagioscion squamosissimus*, o IGS foi calculado apenas para os machos, uma vez que as fêmeas encontravam-se sexualmente imaturas ou em fases reprodutiva de Em Regeneração, não sendo possível estudar seu ciclo reprodutivo de forma completa.

Para machos de *Plagioscion squamosissimus*, não houve diferença significativa entre o IGS nas diferentes fases do ciclo reprodutivo. No entanto, registrou-se picos de IGS durante quase todo o ano (primavera, verão e inverno).

Apesar disso, quando se observa as frequências das fases reprodutivas por mês ao longo do ano, os resultados apontam que essa espécie está apta a reprodução durante a primavera e verão. Este período parece ser realmente o período considerado como o reprodutivo para *Plagioscion squamosissimus* (Braga, 1997).

As possíveis diferenças existentes entre períodos reprodutivos entre machos e fêmeas de uma mesma espécie podem ser atribuídas ao fato de que normalmente são as fêmeas que determinam a época de desova, uma vez que os machos costumam permanecer com testículos maduros por um período mais longo do que as fêmeas (Chaves, 1991), ao longo do ciclo reprodutivo.

Além disso, outro fato a ser considerado, são as condições ambientais que influem diretamente no período reprodutivo (Vazzoler, 1996), bem como a área geográfica na qual a espécie se encontra (Bazzoli, 2003). Por esta razão, ao descrever o ciclo reprodutivo de *Plagioscion squamosissimus* e *Schizodon nasutus*, optou-se por fazê-lo por estação do ano.

Muitos representantes dos Characiformes, por exemplo, presentes na bacia do Paraná, reproduzem-se de outubro a janeiro, quando se tem temperatura elevada e alto nível fluviométrico (Vazzoler, 1992), ou seja, período correspondente no Brasil, à primavera e verão, confirmando o período reprodutivo aqui encontrado para o Characiformes *Schizodon nasutus*.

Ainda em relação ao ciclo reprodutivo, os ovários do Characiformes aqui analisados, *Schizodon nasutus*, têm possivelmente desova parcial ou desenvolvimento oocitário assincrônico. A desova do tipo parcelada é evidenciada pelo longo período reprodutivo e pela ocorrência de ovários parcialmente esgotados, com a presença de complexos pós-ovulatórios e oócitos em diferentes fases de desenvolvimento (Barbieri e Barbieri, 1985; Vazzoler, 1996; presente estudo). Nos ovários desse tipo, observam-se características morfológicas de mais de um tipo de fase reprodutiva, devido à liberação parcial de lotes de oócitos ao longo do ciclo, e conseqüente reposição oocitária.

Dessa forma, os ovários frequentemente apresentam folículos ovarianos em todas as etapas de desenvolvimento oocitário, ao longo de todo o ciclo reprodutivo (Wallace e Selman, 1981; Spadella *et al.*, 2005; França, 2010), sendo utilizada a maior frequência dos tipos de oócitos presentes para classificar as gônadas nas diferentes fases reprodutivas.

Considerações finais

Apesar da proposta inicial deste trabalho ter sido uma compatibilização entre as classificações macroscópicas e a verificação microscópica, e sua correlação com o índice gonadossomático (IGS), na tentativa de sanar as dissonâncias existentes entre classificações macroscópicas e histológicas, observou-se que houve correlação somente entre a análise histológica e o IGS.

Os dados referentes aos valores de IGS foram insuficientes, devido provavelmente ao baixo número de amostragem. Assim, não houve fundamento em correlacionar IGS com dados macroscópicos. Isso se deve ao fato do IGS não apresentar diferenças significativas entre todas as fases reprodutivas, seja em machos ou em fêmeas. Dessa forma, a melhor maneira encontrada para padronizar a classificação das gônadas em fases reprodutivas foi através da associação entre as análises morfológicas macroscópicas e microscópicas.

Apesar da análise macroscópica ser mais simples e de aplicação imediata, os resultados aqui apresentados mostram claramente a distonância existente entre a classificação macroscópica e microscópica. Os valores de IGS podem auxiliar numa pré-classificação das fases reprodutivas das gônadas, porém a análise histológica faz-se necessária, principalmente em fases reprodutivas nas quais o IGS é semelhante, como em Apto a Desovar e Desova a Ativa.

Para minimizar erros na identificação das fases reprodutivas, sugere-se que seja realizado um estudo prévio para uma possível padronização entre as observações macroscópicas e microscópicas das gônadas, para uma determinada espécie a ser estudada. Assim, aspectos macroscópicos característicos de cada espécie poderiam ser determinados ao início do estudo, facilitando as futuras análises e classificações em diferentes fases reprodutivas.

Conclusões

A partir dos resultados obtidos no presente trabalho pode-se concluir que:

- A morfologia gonadal macroscópica e microscópica das espécies *Plagioscion squamosissimus* e *Schizodon nasutus* é semelhante àquela encontrada para os demais Teleostei.
- A foliculogênese de *Plagioscion squamosissimus* e *Schizodon nasutus* segue o mesmo padrão encontrado para os demais Teleostei, reforçando a hipótese de que a formação dos folículos ovarianos constitui um processo evolutivamente conservado entre os vertebrados em geral.
- O desenvolvimento folicular de *Plagioscion squamosissimus* e *Schizodon nasutus* ocorre como o já descrito para outras espécies de Teleostei, porém apresentam pequenas diferenças próprias de cada espécie. Ainda assim, essas diferenças são comuns quando se compara a espécie a outros peixes do mesmo grupo, ou seja, *Plagioscion squamosissimus* apresenta desenvolvimento folicular característico dos Perciformes, como acúmulo de gordura no citoplasma e *Schizodon nasutus* desenvolvimento folicular característico dos Characiformes. Ao final do desenvolvimento folicular, em ambos os casos, a fusão do vitelo não ocorre.
- Os testículos de *Plagioscion squamosissimus* apresentam organização testicular do tipo lobular irrestrita, enquanto que *Schizodon nasutus*, tubular anastomosada.
- A classificação macroscópica das gônadas masculinas e femininas em fases reprodutivas, por si só não apresenta dados confiáveis para tal. Assim, visando uma melhor classificação, os dados macroscópicos devem ser minuciosamente analisados e comparados às análises microscópicas, evitando erros na identificação das fases reprodutivas ao longo do ciclo reprodutivo.
- Embora qualquer uma das propostas existentes na literatura, utilizadas tradicionalmente para classificação de fases reprodutivas, possa ser empregada para classificação das espécies aqui analisadas, aquela que apresenta maior número de fases reprodutivas foi a mais adequada, uma vez que as caracterizações histológicas de cada

fase reprodutiva tornam-se assim mais detalhadas, evitando possíveis erros durante a classificação.

- A proliferação das oogônias, das células somáticas a elas associadas e a formação dos oócitos profásicos iniciais, nas fêmeas analisadas, ocorrem principalmente nos períodos iniciais do ciclo reprodutivo, ou seja, durante as fases Em Regeneração do ovário, além de também ocorrer em frequência elevada nos ovários Imaturos.

- O período reprodutivo de *Plagioscion squamosissimus* e *Schizodon nasutus* ocorre nos meses equivalentes à primavera e verão, sendo que o tipo de desova é parcelada em ambas as espécies.

- O índice gonadossomático (IGS) de *Plagioscion squamosissimus* e *Schizodon nasutus*, tanto em machos como nas fêmeas foi menor em animais imaturos, bem como nos peixes sexualmente maduros com gônadas em fase de Desenvolvimento e Em Regeneração, apresentando um aumento gradual em fases mais avançadas do ciclo reprodutivo. Assim, animais em fase reprodutiva de Apto a Desovar apresentaram um IGS elevado, correspondendo ao período antecedente à desova propriamente dita. Durante a Desova Ativa, o IGS manteve-se alto, porém discretamente menor em relação ao período anterior, quando o animal encontra-se Apto a Desovar.

- Para *Plagioscion squamosissimus* e *Schizodon nasutus* o índice gonadossomático (IGS) associado à análise macroscópica das gônadas não foi um bom indicador da fase reprodutiva, sendo mais adequado uma associação entre análises macroscópicas e histológicas para tal determinação.

Referências Bibliográficas

- Barbieri, M.C. e Barbieri, G. (1985). Reprodução de *Gymnotus carapo* Linnaeus, 1758 na represa do Lobo (SP). Morfologia e histologia do ovário. Variação sazonal. (Teleostei, Gymnotidae). *Revista Brasileira de Biologia*, v.45, n.1/2, p.3-12, 1985.
- Bazzoli, N. (2003). Parâmetros reprodutivos de peixes de interesse comercial do rio São Francisco, região de Pirapora, MG, p. 286-300. In: H.P. Godinho e A.L. Godinho (Eds). Águas, peixes e pescadores do São Francisco das Minas Gerais. Editora PUC Minas, 440p.
- Billard, R. (1986). Spermatogenesis and spermatology of some teleost fish species. *Reprod. Nutr. Dev.*, 26: 877-1024.
- Braga, F.M.S. (1997). Biologia reprodutiva de *Plagioscion squamosissimus* (Teleostei, Sciaenidae) na represa de Barra Bonita, Rio Piracicaba (SP). *Rwv. UNIMAR* 19 (2): 447-460. 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.
- Brown-Peterson, N.J.; Lowerre-Barbieri, S.K.; Macewicz, B.J.; Saborido-Rey, F.; Tomkiewicz, J.; Wyanski, D.M. (2007). An Improved and Simplified Terminology for Reproductive Classification in Fishes.
- Brown-Peterson, N.J.; Lowerre-Barbieri, S.K.; Macewicz, B.J.; Saborido-Rey, F.; Tomkiewicz, J.; Wyanski, D.M. (2009). An improved and simplified terminology for reproductive classification in fishes. Fonte: Gulf Cost Research Laboratory – http://www.usm.edu/gcrl/research/gonadal_terminology.php.
- Burns, J.R.; Quagio-Grassiotto, I.; Jamieson B.G.M. (2009). Ultrastructure of Spermatozoa: Ostariophysi. . In: Jamieson BGM, editor. Reproductive Biology and Phylogeny of Fishes (Agnathans and Neoteleostomi). Phylogeny-Reproductive System-Viviparity-Spermatozoa. *Enfield: Science Publishers Inc.* p 287-387.
- Chaves, M.M.(1991). Effects of water deficits on carbon assimilation. *Journal of Experimental Botany* 42: 1–16.
- Connaughton, M.A.; Aida, K. (1998). Female reproductive system, fish. In: Krobil, E.; Neill, J. D. (ed.). *Encyclopedia of Reproduction*. San Diego, Academic Press. p. 193-205.

- De Rooij, D.G.; Russell, L. D. All you wanted to know about spermatogonia but were afraid to ask. *J. Androl.*, v.21, n.6, p.776-798, 2000.
- Dias, J.F.; Peres-Rios, E.; Chaves, C.L.D.B.; Rossi-Wongtschowski, C.L.D.B. (1998). Análise macroscópica dos ovários de teleósteos: problemas de classificação e recomendações de procedimentos. *Revista Brasileira de Biologia*, 58(1): 55-69.
- Fawcett, D.W.; Ito, S.; Slauterback, D.L. (1959). The occurrence of intercellular bridges in groups, of cells exhibiting synchronous differentiation. *J Biophys Biochem Cytol.* 5: 453-460.
- França, G.F.; Grier, H.J.; Quagio-Grassiotto, I. A new vision of the origin and the oocyte development in the Ostariophysi applied to *Gymnotus* sp. (Teleostei: Gymnotyformes). *Neotr Ichthyol.in press*
- Grier, H.J. (1981). Cellular organization of the testis and spermatogenesis in fishes. *Amer. Zool.*, 21: 345-357.
- Grier, H.J. (1992). Chordate testis: the extracellular matrix hypothesis. *J. Experiment. Zool.*, 261: 151-160.
- Grier, H.J. (1993). Comparative organization of Sertoli cells including the Sertoli cell barrier. In: *The Sertoli cell*, (Russel L.D. e. Griswold, M.D., eds.) Clearwater, Cache River Press. pp. 704-730.
- Grier, H.J.; Taylor, R.G. (1998). Testicular maturation and regression in the common snook. *Journal of Fish Biology*, 53: 521-542.
- Grier, H.J. (2000). Ovarian germinal epithelium and folliculogenesis in the Common Snook, *Centropomus undecimalis* (Teleostei: Centropomidae). *J Morphol* 243: 265-281.
- Grier, H.J., 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. p.233-236.
- Grier, H.J. (2002). The germinal epithelium: its dual role in establishing male reproductive classes and understanding the basis for indeterminate egg production

in female fishes. 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, H.J.; Uribe, M.C.; Parenti, L.R., 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, H.J.; Uribe, M.C.; Parenti, L.R. (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, J.H.; Uribe-Aranzábal, M.C.; Patiño, R. (2009). The ovary, folliculogenesis and oogenesis in teleosts. In: Jamieson BJM, editor. *Reproductive Biology and Phylogeny of Fishes (Agnathans and Bony Fishes) Phylogeny Reproductive System Viviparity Spermatozoa* Enfield: Science Publishers, p 25-84.

Grier, H.J.; Uribe-Aranzábal, M.C. (2009). The testis and spermatogenesis in teleost. In: Jamieson BGM, editor. *Reproductive Biology and Phylogeny of Fishes (Agnathans and Neoteleostomi). Phylogeny-Reproductive System-Viviparity-Spermatozoa*. Enfield: Science Publishers Inc. p 119-142.

Guraya, S.S. (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.

Hoar, W.S. (1969). Reproduction. In: Hoar, W.S. e Randall, D.J. editors. *Fish Physiology*. New York: Academic Press, 111: chap.1.

Honji, R.M.; Vaz-dos-Santos, A.M.; Rossi-Wongtschowski, C.L.D.B. (2006). Identification of the estages of ovarian maturation of the Argentine hake *Merluccius hubbsi* Marini, 1933 (Teleostei: Merlucciidae): advantages and disadvantages of the use of the macroscopic and microscopic scales. *Neotrop. Ichthyol.* 4(3):329-337.

LaFleur, G.F.; Raldúa, D.; Fabra, M.; Carnevali, O.; Denslow, N.; Wallace, R.A.; Cerdà, J. (2005). Derivation of major yolk proteins from parental vitellogenin, and

alternative processing during oocyte maturation in *Fundulus heteroclitus*. *Biol Reprod* 73:815-824.

Lahnsteiner, F.; Patzner, R.A. (1990). Spermiogenesis and structure of mature spermatozoa in blenniid fishes (Pisces, Blenniidae). *J. Submicrosc Cytol Pathol* 22: 565-576.

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, P.J. (2007). Ultrastructural aspects of the ontogeny and differentiation of ray-finned fish ovarian follicles. In: Babin PJ, Cerdà J, Lubzens E. editors. *The Fish Oocyte: From Basic Studies to Biotechnological Applications*. Dordrecht: Springer, p1-37.

Lo Nostro, F. L. (2000). Espermatogénesis, ciclo anual e inducción hormonal de la espermiación en el pez protogínico diándrico, *Synbranchus marmoratus*, Bloch, 1975 (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, G.A. (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.

Lowe-McConnell, R.H. (1999). Estudios ecológicos de comunidades de peixes tropicais. *São Paulo: Edusp*, 534p.

Loir, M.; Sourdain, P. ; Mendis-Handagama, S.M.L.C. ; Jégou, B. (1995). Cell-cell interactions in the testis of teleosts and elasmobranchs. *Microsc. Res. Tech.*, 32: 533-552.

Lubzens, E.; Young, G.; Bobe, J.; Cerdá, J. (2010). Oogenesis in teleosts: how fish eggs are formed. *Gen. Comp. Endocrinol.* 165: 36-389.

Matova, N; Cooley, L. (2001). Comparative aspects of animal oogenesis. *Dev Biol* 231: 291-320.

- Mattei, X. (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.
- Mazzoni, T.S.; Grier, H.J.; Quagio-Grassiotto, I. (2010) Germline cysts and the formation of the germinal epithelium during female morphogenesis in *Cyprinus carpio* (Teleostei: Ostariophysi: Cypriniformes). *Anat Rec* 293:1581-1606.
- Miura, T.; Miura, C.I. (2003). Molecular control mechanisms of fish spermatogenesis. *Fish Physiol Biochem* 28: 181-186.
- Muñoz, M.; Casadevall, M.; Bonet, S. (2002). Testicular structure and semicyclic spermatogenesis in a specialized ovuliparous species: *Scorpaena notata* (Pisces, Scorpaenidae). *Acta Zool* 83: 213-219.
- 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.
- Nakatani, K.; Agostinho, A.A.; Baumgartner, G.; Bialecki, A.; Sanches, P.V.; Makrakis, M.C.; Pavanelli, C.S. (2001). Ovos e larvas de peixes de água doce. *Ed. Da Universidade Estadual de Maringá*. 378p.
- Nelson, J.S. (2006). *Fishes of the world*. Fourth edition. John Wiley & Sons, Inc., New York. 601 p.
- Nóbrega, R.H. (2006). Alterações do epitélio germinativo masculino, células endócrinas testiculares e células gonadotrópicas durante o ciclo reprodutivo de *Serrasalmus spilopleura* (Kner, 1859) e *Pimelodus maculatus* (Lacépède, 1803). Dissertação de Mestrado, Universidade Estadual de Campinas.
- Nóbrega, R.H.; Batlouni, S.R.; França, L.R. (2009). An overview of functional and sterological evaluation of spermatogenesis and germ cell transplantation in fish. *Fish Physiol Biochem* 35:197-206.
- Parenti, L.R. ; Grier, H.J. (2004). Evolution and phylogeny of gonad morphology in bony fishes. *Integr Comp Biol* 44:333-348.

- Patiño, R.; Sullivan, C.V. (2002). Ovarian follicle growth, maturation, and ovulation in teleost fish. *Fish Physiol Biochem* 26: 57-70.
- Pepling, M.E.; de Cuevas, M.; Spradling, A.C. (1999). Germline cysts: a conserved phase of germ cell development? *Trends Cell Biol* 9:257-262.
- Pepling, M.E.; Spradling, A.C. (2001). The mouse ovary contains germ cell cysts undergo programmed breakdown to form follicles. *Dev. Biol.* 234, 339-351.
- Pepling, M.E. (2006). From primordial germ cell to primordial follicle: mammalian female germ cell development. *Genesis* 44:622-632.
- Pudney, J. (1995). Spermatogenesis in nonmammalian vertebrates. *Microsc. Res. Techn.*, 32: 459-497.
- Pudney, J. (1996). Comparative cytology of the Leydig cell. In: *The Leydig cell*. (Payne, A.H.; Hardy, M.P.; Russel, L.D., eds.) Vienna, Cache River Press. pp. 98-142.
- Quagio-Grassiotto, I.; Grier, H.J.; Mazzoni, T.S.; Nóbrega, R.H.; Amorim, J.P.(aceito) Activity of the Ovarian Germinal Epithelium in the Freshwater Catfish, *Pimelodus maculatus* (Teleostei: Ostariophysi: Siluriformes): Germline Cysts, Follicle Formation and Oocyte Development. *J. Morphol.*
- Quintero-Hunter, I.; Grier, H.J.; Muscato, M. (1991). Enhancement of histological detail using metanil yellow as counterstain in periodic acid/Schiff's hematoxylin staining of glycol methacrylate tissue sections. *Biotech Histochem* 66: 169-172.
- Rêgo, A.C.L. (2008). Composição, abundância e dinâmica reprodutiva e alimentar de populações de peixes de um reservatório recém-formado (UHE – Capim Branco I/IMG). Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de Uberlândia.
- Reis, R.E.; Kullander, S.O.; Ferraris, J.R. (2003). Check list of the freshwater fishes of South and Central America. Porto Alegre, EDIPUCRS, 742p.
- Riede, K. (2004). Global register of migratory species - from global to regional scales. Federal Agency for Nature Conservation, Bonn, Germany. 329 p.

- Schulz, R.W.; França, L.R.; Lareyre, J-J; LeGac, F.; Chiarini-Garcia, H.; Nóbrega, R.H.; Miura, T. (2010). Spermatogenesis in fish. *Gen Comp Endocrinol* 165:390-411.
- Selman, K.; Wallace, R.A.; Sarka, A. (1993). Stages of oocyte development in the zebrafish *Brachydanio rerio*. *J Morphol* 152: 203-224.
- Selman K, Wallace RA, Sarka A, Qi X (1993) Stages of oocyte development in the zebrafish *Brachydanio rerio*. *J Morphol* **152**: 203–224
- Selman, K.; Wallace, R.A. (1986). Gametogenesis in *Fundulus heteroclitus*. *Am. Zool.*, 26: 173-192.
- Selman, K.; Wallace, R.A. (1989). Cellular aspects of oocyte growth in teleosts. *Zool Science* 6: 211-231.
- Spadella, C.T.; Macedo, C.S.; Machado, J.L.M.; Schellini, S.A.; Padovanni, C.R. (2005). Estudo comparativo entre cinco diferentes tratamentos sobre as alterações clínicas e laboratoriais do rato diabético induzido pela aloxana. *Acta Cir Bras* 20(1): 46-54.
- Spradling, A.C. (1993). Germline cysts: communes that work. *Cell* 72:649-651.
- Taylor, R.G.; Grier, H.J.; Whittington, J.A. (1998). Spawning rhythms of common snook in Florida. *J Fish Biol* 53:502-520.
- Teixeira, I.; Bennemann, S.T. (2007). Ecomorfologia refletindo a dieta dos peixes em um reservatório no sul do Brasil. *Biota Neotropical*, v7 n2.
- Tyler, C.R.; Sumpter, J.P. (1996). Oocyte growth and development in teleosts. *Rev Fish Biol Fish* 6: 287-318.
- Wallace, R.A.; Selman, K. (1981). Cellular and dynamic aspects of oocyte growth in teleosts. *Scien. Zool.*, 21: 325-343.
- Wallace, R.A.; Selman, K. (1990). Ultrastructural aspects of oogenesis and oocyte growth in fish and amphibians. *J Electron Micr Tech* 16:175-201.
- West, G. (1990). Methods of assessing ovarian development in fish: a review. *Aust. J. Mar. Freshw. Res.*, 41: 199-222.

Vazzoler, A. E. A. M. (1992). Situação Atual e Perspectivas da Ictiologia no Brasil.
Editora da Universidade Estadual de Maringá.

Vazzoler, A.E.A.M. (1996). Biologia da reprodução de peixes Teleósteos. Teoria e Prática. Maringá: EDUEM, 169p

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo nº **195-CEEA**, sobre “Uma nova abordagem do ciclo reprodutivo dos machos e fêmeas, e da origem e desenvolvimento dos oócitos dos Ostariophysí, e Perciformes Neotropicais aplicada ao Anastomidae, Schizodon nasutus e ao Scianidae, Plagioscion squamosissimus”, sob a responsabilidade de **Irani Quagio-Grassiotto**, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e foi aprovado “Ad referendum” da **COMISSÃO DE ÉTICA NA EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL (CEEA)**, nesta data.

Botucatu, 22 de março de 2010.



Prof.^a Dr.^a **PATRICIA FERNANDA F. PINHEIRO**
Presidente - CEEA

Anexo 1: Certificado do Comitê de Ética Animal para a realização do projeto.