

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS  
CAMPUS DE BOTUCATU**

**João Paulo de Arruda Amorim**

**FOLICULOGÊNESE E CARACTERIZAÇÃO  
CELULAR DAS CLASSES REPRODUTIVAS EM  
*Pimelodus maculatus* (Siluriformes: Pimelodidae)**

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências da Universidade Estadual Paulista, Campus de Botucatu, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas. Área de Concentração: Zoologia

**Orientadora: Profa. Dra. Irani Quagio-Grassiotto**

**Botucatu - SP  
2007**

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉCNICA DE AQUISIÇÃO E TRATAMENTO  
DA INFORMAÇÃO  
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP  
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: SELMA MARIA DE JESUS

Amorim, João Paulo de Arruda.

Foliculogênese e caracterização celular das classes reprodutivas em  
*Pimelodus maculatus* (Siluriformes: Pimelodidae) / João Paulo de Arruda  
Amorim. – 2007.

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Instituto de  
Biotecnologia de Botucatu 2007.

Orientadora: Irani Quagio-Grassiotto

Assunto CAPES: 20400004

1. Peixe - Reprodução 2. Peixe - Morfologia 3. Zoologia

CDD 597

Palavras-chave: Classes reprodutivas; Epitélio germinativo; Foliculogênese;  
*Pimelodus maculatus*; Teleostei

“E nossa história não ficara, pelo avesso assim sem final feliz, teremos coisas bonitas pra contar, e até lá, vamos viver, temos muito ainda por fazer, não olhe pra trás, apenas começamos...”

Renato Russo

*Aos grandes e eternos amigos*

Quando não houver saída  
Quando não houver mais solução  
Ainda há de haver saída  
Nenhuma idéia vale uma vida

Quando não houver esperança  
Quando não restar nem ilusão  
Ainda há de haver esperança  
Em cada um de nós, algo de uma criança

Quando não houver caminho  
Mesmo sem amor, sem direção  
A sós ninguém está sozinho  
É caminhando que se faz o caminho

Quando não houver desejo  
Quando não restar nem mesmo dor  
Ainda há de haver desejo  
Em cada um de nós, aonde Deus colocou

Enquanto houver sol, enquanto houver sol  
Ainda haverá  
Enquanto houver sol, enquanto houver sol

Sérgio Britto

“Ainda que eu falasse as línguas dos homens e dos anjos,  
se eu não tivesse amor, seria como bronze que soa  
ou como címbalo que retine.

Ainda que eu tivesse o dom da profecia e  
conhecesse todos os mistérios e toda a ciência;

Ainda que eu tivesse tamanha fé,  
a ponto de transportar montanhas,  
se não tivesse amor eu nada seria.”

(Paulo, 1 Coríntios 13, 1- 2)

Dedico este trabalho ao meu grande amor, Elaine  
e a minha ingênua e amada filha, Bianca.

## AGRADECIMENTOS

A Profa.Dra. Irani Quagio-Grassiotto pela orientação e ensinamentos dedicados durante esses 2 anos de convivência.

A Profa.Dra. Priscila Gusmão Pompiani, por me encaminhar a este Programa de Pós-Graduação.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas A/C Zoologia, pela oportunidade de realizar o mestrado.

Aos Professores do Depto. de Morfologia/IBB-UNESP.

Aos técnicos do Depto. de Morfologia/IBB-UNESP, cujo auxílio foi de grande valia, Sr. Antônio Vicente Salvador, Sr. José Eduardo Bozzano, Sra. Sueli Cruz Michelin e Sr. Ricardo André Teixeira.

Ao Centro de Microscopia Eletrônica/IBB-UNESP e à sua supervisora Profa. Dra. Elisa Aparecida Gregório, pela utilização das instalações.

Aos técnicos do Centro de Microscopia Eletrônica/IBB-UNESP, Sra. Maria Helena Moreno, Sr. Nivalde Antônio Basso e Sra. Claudete dos Santos Tardivo, pelo companheirismo e auxílio técnico prestado a esse trabalho.

A Sta. Luciana Cristina Montes, secretária do Depto. de Morfologia/IBB-UNESP, por todos os serviços prestados.

Aos funcionários da Seção de Pós-Graduação em Ciências Biológicas/IBB-UNESP, pelos serviços burocráticos prestados, Sr. Sergio Primo Vicentini, Sra. Maria Helena Godoy, Sra. Luciene de C. J. Tobias e Sra. Sônia B. Ciccone.

A CAPES pela concessão da bolsa, sem a qual eu não poderia realizar este trabalho.

Aos pescadores de Santa Maria da Serra-SP, pela disponibilidade de coleta dos peixes.

Aos amigos do Depto. de Morfologia/IBB-UNESP.

Aos amigos do laboratório de Reprodução de Peixes Neotropicais/IBB-UNESP. Foi um prazer ter conhecido vocês!!! Ana Paula Ferraz da Silva, Clarianna Martins Baicere Silva, Débora Barbosa Vendramini Costa, Fernanda Natália Antoneli (e Paulo Vitor), Gisleine Fernanda França, Kátia Kato de Almeida, Maria Angélica Spadella, Priscila Gusmão, Rinaldo José Ortiz, Rosicleire Veríssimo Silveira, Talita Sarah Mazzoni.

A Nair Lopes Gusmão, Luis Antonio Gusmão, Zumira Scucucia e Luis Antonio Gusmão Junior, pelo cuidado pessoal. Muito obrigado pela hospitalidade, respeito e amizade, que com certeza serão eternos.

A Elaine, por decidir viver ao meu lado, sempre acreditando em mim e em meus ideais, muito obrigado por fazer parte da minha vida.

A meus pais, Valdivino Luiz de Amorim (*in memoriam*) e Maria da Graças de Arruda, por desejarem meu nascimento, e pela forma de amar.

E principalmente a Deus, cuja presença em minha vida é a cada dia mais intensa.

Agradeço-lhe por me conceder o dom da vida e o dom de amar. Obrigado Senhor por estar sempre ao meu lado.

## SUMÁRIO

	<b>PÁG</b>
1. <b>RESUMO</b> .....	1
2. <b>ABSTRACT</b> .....	3
3. <b>INTRODUÇÃO</b> .....	5
3.1. Justificativa e relevância do tema .....	6
4. <b>REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	8
4.1. Aspectos gerais da biologia reprodutiva dos peixes Teleostei .....	9
4.2. Estrutura ovariana .....	10
4.3. O epitélio germinativo feminino .....	11
4.4. A foliculogênese .....	12
4.5. O crescimento primário dos oócitos .....	13
4.6. O crescimento secundário dos oócitos .....	15
4.7. A maturação.....	18
4.8. A atresia folicular .....	19
4.9. A ovulação .....	21
4.10. A regressão do folículo pós-ovulatório .....	22
4.11. As classes reprodutivas .....	24
4.12. A fertilização .....	25
5. <b>OBJETIVOS</b> .....	26
6. <b>MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	28
6.1. Os animais .....	29
6.2. Microscopia de luz .....	29
6.3. Microscopia eletrônica de transmissão .....	30
6.4. Imunocitoquímica (pcna - antígeno nuclear de proliferação celular) .....	31
7. <b>RESULTADOS</b> .....	33
7.1. Anatomia ovariana.....	34
7.2. O epitélio germinativo.....	34
7.3. Foliculogênese .....	36
7.4. Imunocitoquímica (pcna - antígeno nuclear de proliferação celular) .....	37
7.5. As classes reprodutivas .....	38
7.6. Folículos pós-ovulatórios .....	40
7.7. Atresia folicular .....	41
7.8. Classes reprodutivas X foliculogênese .....	42
7.9. Figuras .....	43
8. <b>DISCUSSÃO</b> .....	72
9. <b>CONCLUSÕES</b> .....	80
10. <b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	83

## 1. RESUMO

Nas fêmeas dos Teleostei a produção ilimitada de oócitos deve-se à constante proliferação das oogônias situadas no epitélio germinativo das lamelas ovígeras. Ao entrarem em meiose dão origem aos oócitos que são envoltos por uma camada de células foliculares, formando os folículos. No interior dos folículos, os oócitos passam por diferentes estágios de desenvolvimento (crescimento primário e secundário/vitelogênese, e maturação) ao final dos quais estão prontos para a desova. Os folículos pós-ovulatórios regridem e os óocitos que não tiveram sucesso na ovulação entram em atresia. A compreensão de como ocorre a foliculogênese nos Teleostei é recente e as descrições existentes referem-se aos grupos mais derivados. Por outro lado, os diferentes estágios de desenvolvimento dos oócitos, numa nova visão, vêm sendo utilizados na descrição de diferentes classes reprodutivas, ao longo do processo de maturação gonadal que ocorre a cada ano. Para testar a aplicabilidade desses novos conceitos aos Teleostei mais basais, analisou-se a foliculogênese e procedeu-se a caracterização celular das classes reprodutivas em *Pimelodus maculatus*, através de parâmetros histológicos, ultraestruturais e imunocitoquímico. Em *P. maculatus* a proliferação mitótica das oogônias, ocorre sempre acima da membrana basal, dá origem a conjuntos de células que são gradual e individualmente envoltos pelas células epiteliais, formando um tipo de cisto. As oogônias no interior dos cistos, ou oogônias secundárias entram em meiose ou dividem novamente 1, 2, 3 ou mais vezes por mitose e entram em meiose dando origem aos ovócitos. O conjunto de células, oócitos envoltos pelas células originárias do epitélio, forma uma espécie de sáculo, que se projeta para o estroma, mas permanece conectado ao próprio epitélio, compartilhando a mesma membrana basal. As células meióticas iniciais são pequenas têm núcleo basofílico e citoplasma claro e escasso e permanecem nos sáculos ou ninhos. As células limitantes dos ninhos, agora pré-foliculares, projetam-se para o interior dos sáculos, e gradativamente envolvem cada oócito. Formam, assim, o folículo que se mantém em contato com o epitélio com o qual compartilha uma certa extensão da membrana basal, enquanto o restante do conjunto projeta-se para o estroma. No estroma, células indiferenciadas do conjuntivo organizam-se ao redor e sobre a membrana basal das células foliculares e formam a teca. No interior do folículo o oócito desenvolve. De acordo com o

estágio de desenvolvimento dos oócitos foram caracterizadas 5 classes ao longo do ciclo reprodutivo anual de *P. maculatus*. Regredida: quando as lamelas ovíferas contêm somente oócitos em crescimento primário ou não vitelogênicos. Maturação inicial: quando as lamelas ovíferas contêm oócitos pré-vitelogênicos e oócitos em início de deposição de vitelo. Maturação intermediária: quando as lamelas ovíferas contêm principalmente oócitos em maturação avançada e entre eles alguns poucos oócitos em vitelogênese inicial e oócitos pré-vitelogênicos. Maturação tardia: quando as lamelas ovíferas contêm principalmente oócitos em maturação final e entre eles alguns poucos oócitos pré-vitelogênicos. Regressão: quando as lamelas ovíferas ou não contêm oócitos maduros ou contêm oócitos em atresia e folículos pós-ovulatórios. Ao final da regressão apenas as estruturas remanescentes da absorção dos folículos pós-ovulatórios e dos oócitos atrésicos permanecem entre os numerosos oócitos pré-vitelogênicos.

**Palavras chave.** Foliculogênese, Epitélio germinativo, Classes reprodutivas, *Pimelodus maculatus*.

## 2. ABSTRACT

The unlimited production of oocytes in Teleostei females is due to the constant proliferation of the oogonia located in the germinal epithelium of ovigerous lamellae. Upon entering meiosis, oogonia give origin to the oocytes, which are surrounded by a layer of follicular cells and thus form the follicles. Within the follicles, oocytes undergo different developmental stages (primary and secondary growth/vitellogenesis, and maturation) followed by spawning. Post-ovulatory follicles regress and the oocytes that failed to ovulate enter atresia. The understanding of how folliculogenesis occurs in Teleostei has been recently achieved, and the descriptions available to date refer to the most derived groups. On the other hand, oocyte developmental stages have been used, under this new view, to describe the different reproductive classes seen along the gonadal maturation process that takes place every year. In order to test the applicability of these new concepts to the most basal Teleostei, this study aimed at analyzing folliculogenesis, and characterizing the cells found in these reproductive classes in *Pimelodus maculatus*, by using histological, ultrastructural and immunocytochemical parameters. In *P. Maculatus*, oogonia mitotic proliferation always occurs above the basement membrane, giving rise to cell sets which are gradually and individually surrounded by epithelial cells forming a sort of cyst. The oogonia located within the cysts, or secondary oogonia, either enter meiosis or divide again 1, 2, 3 or more times through mitosis, giving origin to oocyte. The cell set, oocytes surrounded by the cells originated from the epithelium, forms a sac-like structure that projects into the stroma, but remains connected to the epithelium sharing the same basement membrane. The early meiotic cells, which are small, have a basophilic nucleus, and a clear and scarce cytoplasm, remain in the sacs or nests. The nest border cells, pre-follicular cells at this stage, project into the sacs and gradually envelop each oocyte forming the follicle. The follicle remains connected to the epithelium, sharing with it part of the basement membrane, while the remainder of the set projects into the stroma. In the stroma, the undifferentiated conjunctive cells are arranged around and atop the basal lamina of the follicular cells, and thus form the theca. The oocyte develops inside the follicle. Five classes were characterized over *P. maculatus* annual reproductive cycle according to oocyte developmental stage: 1- Regressed: when ovigerous lamellae solely contain oocytes at

primary growth or non-vitellogenic oocytes; 2- Initial maturation: when ovigerous lamellae contain pre-vitellogenic oocytes and oocytes at early vitello deposition; 3- Intermediate maturation: when ovigerous lamellae contain mostly oocytes at an advanced stage of maturation with few oocytes at early vitellogenesis and pre-vitellogenic oocytes; 4- Late maturation: when ovigerous lamellae contain mostly oocytes at final maturation with few pre-vitellogenic oocytes; 5- Regression: when ovigerous lamellae contain either no mature oocytes or atretic oocytes and post-ovulatory follicles. By the end of regression, just the remainder of the absorption of post-ovulatory follicles and atretic oocytes are found among the numerous pre-vitellogenic oocytes.

**Key words.** Folliculogenesis, Germinal Epithelium, Reproductive Classes, *Pimelodus maculatus*

## ***Introdução***

### 3. INTRODUÇÃO

#### 3.1. JUSTIFICATIVA E RELEVÂNCIA DO TEMA

Ainda que bastante estudada, a oogênese nos Teleostei segue pouco clara em vários pontos. Mais recentemente, alguns desses pontos têm atraído o interesse dos investigadores. Nesse contexto chamam a atenção, a gênese dos folículos (GRIER, 2000; GRIER, 2002) e sua regressão após a ovulação (SANTOS et al., 2005). Esses processos nos seus extremos contrapõem os mecanismos de proliferação e morte celular particularmente exuberantes nas fêmeas dos Teleostei as quais produzem um número indeterminado de oócitos ao longo da sua vida reprodutiva (SELMAN & WALLACE, 1989; TYLER & SUMPTER, 1996). Os estudos sobre a foliculogênese têm utilizado como modelos experimentais principalmente representantes dos grupos mais derivados dentre os Teleostei, como os Perciformes (GRIER, 2000), Synbranchiformes (GRIER & LO NOSTRO, 2000) e Atheriniformes (GRIER, 2002; GRIER et al., 2005). Na literatura atual, até o momento não existem referências a representantes da ictiofauna neotropical.

Conforme Reis e colaboradores (2003) a ictiofauna de águas continentais centro e sul-americanas, com 4.475 espécies efetivamente descritas, é dominada, tanto em termos de diversidade taxonômica quanto em biomassa, por peixes da superordem Ostariophysi, série Otophysi, que alcançam aproximadamente 73% das espécies descritas, divididas primariamente entre as ordens Siluriformes (15 famílias e aproximadamente 37% das espécies) e Characiformes (14 famílias e aproximadamente 33% das espécies) e, secundariamente, a ordem Gymnotiformes (cinco famílias e aproximadamente 3% das espécies). Considerando o grupo dominante, Siluriformes, toma-se aqui *Pimelodus maculatus* que pertence à família Pimelodidae, como modelo experimental para uma

primeira descrição do processo de foliculogênese segundo os novos conceitos sobre epitélio germinativo introduzidos por Grier (2000).

*Pimelodus maculatus* (Lacépède, 1803) é um peixe de couro, conhecido regionalmente como bagre-amarelo, mandi-amarelo, mandi-pintado ou mandiuva, de ampla distribuição no Brasil (NOMURA, 1978), sendo encontrado em várias bacias hidrográficas da América do Sul (GODOY, 1987). Na bacia do rio São Francisco, *P. maculatus* é muito apreciado na pesca profissional e esportiva (SATO et al., 1997).

Tem reprodução sazonal com desova parcelada no período de outubro a janeiro, estação mais quente e chuvosa na região neotropical. Podendo ser antecipada ou atrasada, uma vez que está sob influência de fatores abióticos tais como temperatura elevada e constante, chuvas e aumento de nível do rio (GODINHO et al., 1974,1977; BAZZOLI et al., 1997; FENERICH, 1975). Por sua abundância, facilidade de captura e valor econômico, é bastante utilizado como modelo experimental, nas mais diversas áreas do conhecimento biológico.



*Pimelodus maculatus*

## *Revisão Bibliográfica*

#### 4. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

##### 4.1. *Aspectos gerais da biologia reprodutiva dos peixes Teleostei*

O crescente interesse pelos peixes Teleostei nas últimas décadas tem fornecido valiosas informações sobre diferentes aspectos da biologia reprodutiva destes animais, que, apesar de apresentarem características comuns, mostram grande variabilidade comportamental e morfofuncional que não permite generalizações (BENJAMIN, 2004). O sucesso do grupo é atribuído a uma série de adaptações que aperfeiçoaram sua respiração, flutuação, nutrição, e principalmente a reprodução (MOYLE & CECHE Jr., 1996), caracterizada pelas mais variadas estratégias (HOAR, 1969; NAGAHAMA, 1983; BORGES FILHO, 1987; REDDING & PATIÑO, 1993; PUDNEY, 1995, 1996; VAZZOLER, 1996; LE GAC & LOIR, 1999; NAKATANI et al., 2001). A liberação dos gametas para fertilização externa; o desenvolvimento de órgãos especializados para fertilização interna; as diferentes construções de ninhos; as variadas maneiras de cuidado com a prole; e a migração reprodutiva, seja nas formas de “piracema” ou naquelas acompanhadas por grandes alterações osmóticas são exemplos da complexidade reprodutiva dos Teleostei (HOAR, 1969; BORGES FILHO, 1987; LE GAC & LOIR, 1999).

Quanto à sexualidade, os peixes Teleostei são predominantemente gonocóricos (dióicos – sexos separados). O hermafroditismo e a reversão sexual (hermafroditismo simultâneo, protandria ou protoginia) ocorrem em menor frequência com registros em algumas famílias como Serranidae, Sparidae, Labridae, Synbranchidae e outras (HOAR, 1969; REDDING & PATIÑO, 1993; LE GAC & LOIR, 1999; LO NOSTRO, 2000).

A maioria dos Teleostei possui reprodução sazonal, ou seja, a maturação das gônadas ocorre de forma gradual e resulta na liberação dos gametas (de forma total ou

parcelada) somente em um determinado período do ciclo reprodutivo. Esse tipo de ciclo também pode ser denominado de descontínuo, sendo estritamente dependente das condições ambientais favoráveis (específica e variável para cada espécie) (SUNDARARAJ, 1981; BORGES FILHO, 1987). Em outros peixes, a reprodução é contínua, ou seja, a produção e a liberação dos gametas ocorrem de forma constante durante o ciclo reprodutivo (SUNDARARAJ, 1981; BORGES FILHO, 1987). Nesses animais, entretanto, há um período em que a reprodução é mais freqüente (LAMAS & GODINHO, 1996).

#### ***4.2. Estrutura ovariana***

Na maioria dos Teleostei, os ovários são órgãos pares, saculiformes, localizados no sentido longitudinal e dorsalmente à cavidade celomática, presos à parede do corpo pelo mesovário. Os ovários possuem uma estrutura geral básica, em sua maioria são cavitários com o compartimento germinativo em forma de lamelas que se projetam a partir da cápsula em direção à luz do órgão. A cavidade ovariana é contínua com os oviductos que se unem caudalmente, e desembocam na papila urogenital. Esta organização é conhecida como tipo cisto-ovariana (NAGAHAMA, 1983; SELMAN & WALLACE, 1986; CONNAUGHTON & AIDA, 1998; HELFMAN et al., 2000). Por outro lado, os ovários dos esturjões bem como dos salmonídeos apresentam lamelas ovígeras, abrindo diretamente na cavidade celomática, para onde os oócitos maduros são diretamente liberados na ovulação. Essa organização é descrita como tipo gymno-ovariana, e os oócitos dessas espécies podem permanecer estocados por muito tempo antes da ovulação (HELFMAN et al., 2000; JALABERT, 2005). Em alguns grupos, durante o desenvolvimento gonadal, os ovários podem fundir-se em um órgão único, e em outros, um deles pode degenerar permanecendo em ambos os casos somente um ovário funcional (NAGAHAMA, 1983).

### ***4.3. O epitélio germinativo feminino***

A definição do epitélio germinativo tem como base as definições histológicas de um epitélio (GRIER, 2000, GRIER & LO NOSTRO, 2000). A morfologia e as funções de um epitélio dependem de sua localização no corpo. Embora, morfologicamente diversos, todos os epitélios compartilham características em comum:

- Todos os epitélios revestem uma superfície do corpo, lúmen, ou ducto (estão obrigatoriamente voltados para uma luz);
- Todas as células epiteliais estão conectadas lateralmente (desmossomos, junções de adesão, junções comunicantes, etc.);
- Todos os epitélios estão apoiados sobre uma membrana basal;
- Todos os epitélios são avasculares.

Se alguma destas características estiver ausente, então o tecido não é um epitélio. O epitélio germinativo é único entre os diferentes tipos de epitélio, porque é o único que produz células germinativas haplóides que estão associadas a um componente celular somático. Tanto o epitélio germinativo feminino como o masculino, estão apoiados sobre uma membrana basal e delimitam uma cavidade do corpo (GRIER & LO NOSTRO, 2000).

O epitélio germinativo feminino, portanto, é um epitélio pouco espesso que margeia a superfície da lamela ovígera e delimita o lúmen ovariano. É composto por dois tipos de células: as células somáticas epiteliais e as células germinativas, as oogônias. As células epiteliais estão unidas através de desmossomos e junções de oclusão e estão apoiadas sobre uma membrana basal (GRIER, 2000). Ele é avascular. Espalhadas entre as células epiteliais estão as oogônias.

#### ***4.4. A foliculogênese***

O folículo ovariano dos peixes, pela definição tomada da literatura em mamíferos (GRIER, 2000, GRIER & LO NOSTRO, 2000), é composto do oócito diplotênico e sua camada de células foliculares (granulosa) associada.

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

Células epiteliais oriundas do epitélio germinativo associam-se aos oócitos em diplóteno. Agora como células pré-foliculares, envolvem, numa camada única, cada oócito em particular e constituem o epitélio folicular. Sintetizam a membrana basal que progressivamente envolve o folículo em formação que permanece unido ao epitélio germinativo (GRIER, 2000; GRIER, 2002; GRIER et al., 2005).

A partir do conjuntivo circundante, células pré-tecais, que são células indiferenciadas do estroma dispõem-se ao redor do folículo em formação, sobre a membrana basal recém sintetizada, e dão origem às células da teca interna e externa. Completa-se, assim a formação do complexo folicular. O complexo folicular é, portanto, constituído pelo oócito diplotênico, envolto seqüencialmente pelo epitélio folicular apoiado na membrana basal e por duas camadas de células da teca (TOKARZ, 1978; WALLACE & SELMAN, 1990; GRIER, 2000; GRIER, 2002; GRIER & LO NOSTRO, 2000).

#### ***4.5. O crescimento primário dos oócitos***

O término da formação dos complexos foliculares marca o início do crescimento primário dos oócitos. Conhecido também por crescimento pré-vitelogênico é caracterizado por um drástico aumento do volume celular (WALLACE & SELMAN, 1981; NAGAHAMA, 1983; SELMAN & WALLACE, 1989; WEST, 1990; GUIMARÃES & QUAGIO-GRASSIOTTO, 2001; PATINO & SULLIVAN, 2002 E ABASCAL & MEDINA, 2005). No núcleo, os organizadores nucleolares são amplificados, destacam-se dos cromossomos, tornam-se circulares e dão origem a inúmeros nucléolos que se dispõem junto ao envoltório nuclear, caracterizando a fase perinucleolar. Uma grande quantidade de RNA heterogêneo e RNA ribossomal são sintetizados (MAZABRAND et al., 1975; GURAYA, 1986; WALLACE & SELMAN, 1990; TYLER & SUMPTER, 1996; FRANCOLI et al., 2003). Os RNAs associam-se a proteínas e são transferidos para o citoplasma onde dão origem a corpos densos conhecidos como “nuages” (EDY, 1975; CLÉROT, 1976; TOURY et al., 1977). Nesta fase os cromossomos plumosos tornam-se visíveis (NAGAHAMA, 1983; SELMAN & WALLACE, 1989); organiza-se o núcleo de vitelo, ou corpúsculo de Balbiani, um aglomerado de organelas membranosas que se localizam na posição juxtenuclear (HUBBARD, 1894 *apud* SELMAN & WALLACE, 1989, MUNÓZ et al., 2001); tem início a formação do envelope oocitário (ANDERSON, 1967, QUAGIO-GRASSIOTTO & GUIMARÃES, 2003) e a diferenciação do envoltório folicular (QUAGIO-GRASSIOTTO & GUIMARÃES, 2003).

No período, a proliferação das organelas membranosas é intensa. Inicialmente dispostas ao redor do núcleo, aumentam em número e extensão, espalham-se pelo citoplasma e atingem a periferia do oócito.

Glicoproteínas são produzidas e incorporadas aos alvéolos recém formados na

periferia do oócito. Os alvéolos corticais formam-se a partir de depressões do oolema, tornam-se progressivamente maiores e constituem as grandes vesículas que margeiam a superfície oocitária. Durante a reação cortical, na fertilização, o conteúdo dos alvéolos é liberado no espaço perivitelínico, entre a superfície do oócito e o envelope vitelínico (ANDERSON, 1968; WALLACE & SELMAN, 1981; NAGAHAMA, 1983; VERMA & THAKUR, 1988; SELMAN & WALLACE, 1989; OHTA et al., 1990; WEST, 1990; PATIÑO & SULLIVAN, 2002).

Os alvéolos corticais, cujo conteúdo protéico e de carboidratos, tem origem de síntese endógena (ANDERSON, 1968; TESORIERO, 1980; WALLACE & SELMAN, 1981; NAGAHAMA, 1983; DE VLAMING, 1983; SELMAN & WALLACE, 1989; TYLER & SUMPTER, 1996), são responsáveis pelo endurecimento do envelope oocitário (TYLER & SUMPTER, 1996) e pela prevenção da poliespermia (OHTA et al., 1990; TYLER & SUMPTER, 1996) durante a fecundação.

Mais recentemente tem-se o aparecimento dos alvéolos corticais como parte do crescimento primário, na sua fase final (PATIÑO & SULLIVAN, 2002). No entanto, a literatura tradicional trata o aparecimento dos alvéolos corticais como a fase inicial do crescimento secundário ou período vitelogênico (ANDERSON, 1968; WALLACE & SELMAN, 1981; NAGAHAMA, 1983; DE VLAMING, 1983; GURAYA, 1986; SELMAN & WALLACE, 1989; WALLACE & SELMAN, 1990; WEST, 1990; BAZZOLI & GODINHO, 1994; GUIMARÃES & QUAGIO-GRASSIOTTO, 2002).

A deposição de lipídeos nos oócitos, geralmente, tem início no período pré-vitelogênico (SELMAN & WALLACE, 1989). A origem dos lipídeos não é clara, supõe-se que sejam provenientes das VLDL circulantes (lipoproteínas de baixa densidade), que hidrolisadas em ácidos graxos livres no endotélio dos vasos, difundem pelo envelope

vitelínico e alcançam o interior dos oócitos (PATIÑO & SULLIVAN, 2002).

Pequenas microvilosidades que se projetam na superfície do oócito, bem como na superfície das células foliculares, são os primeiros indícios da formação do envelope vitelínico (ANDERSON, 1967; WALLACE & SELMAN, 1981; SELMAN & WALLACE, 1989; QUAGIO-GRASSIOTTO & GUIMARÃES, 2003). Durante o desenvolvimento oocitário, as microvilosidades aumentam em número e comprimento, e estendem-se por poros ou canais resultantes da deposição de material elétron-denso ao seu redor (DROLLER & ROTH, 1966; ANDERSON, 1967; LAALE, 1980; COTELLI et al., 1988; BEGOVAC & WALLACE, 1988, 1989; CRUZ-LANDIM & CRUZ-HÖFLING, 1989; QUAGIO-GRASSIOTTO & GUIMARÃES, 2003). O material elétron-denso se organiza em camadas variáveis em número, espessura, composição química, estrutura e eletron-densidade (WOURMS, 1976; LAALE, 1980; ABRAHAM et al., 1984; COTELLI et al., 1988; SELMAN & WALLACE, 1989; WALLACE & SELMAN, 1990; QUAGIO-GRASSIOTTO & GUIMARÃES, 2003).

#### ***4.6. O crescimento secundário dos oócitos***

Nos oócitos, em crescimento secundário, o núcleo tem um contorno altamente irregular. Os nucléolos são periféricos, instalam-se nas chanfraduras do envoltório nuclear, e na sua correspondência, no citoplasma organizam-se as “nuages” (YAMAMOTO, 1964; ANDERSON, 1968, LOPES et al., 1987; BAZZOLI & RIZZO, 1990; GUIMARÃES & QUAGIO-GRASSIOTTO, 2002). Inclusão de corpos lipídicos, formação do envelope oocitário propriamente dito, e o aparecimento da célula micropilar entre as células foliculares, determinando o pólo animal, são outras características destes tipos celulares

(SELMAN & WALLACE, 1989; WALLACE & SELMAN, 1990; RIZZO & BAZZOLI, 1993; TYLER & SUMPTER, 1996; QUAGIO-GRASSIOTTO & GUIMARÃES, 2003).

A célula micropilar faz contato com a superfície do oócito, obstruindo a formação do envelope vitelínico no local. Na ovulação, destaca-se e permanece associada ao epitélio no folículo pós-ovulatório (SANTOS et al., 2005). O resultado é o aparecimento de um orifício na superfície do envelope vitelínico, a micrópila (KOBAYASHI & YAMAMOTO, 1985; RIZZO & BAZZOLI, 1993).

Os espermatozóides dos Teleostei são desprovidos de acrossomo (JAMIESON, 1991; MATTEI, 1991). É através da micrópila que atingem o oolema por ocasião da fertilização (AMANZE & YVENGAR, 1990).

O início e o término da vitelogenese ocorrem ao longo do crescimento secundário dos oócitos. No processo, a vitelogenina (uma lipofosfoglicoproteína, precursora das proteínas vitelínicas) sintetizada e secretada pelo fígado, atinge a superfície dos folículos em crescimento, via circulação. Difunde-se pela membrana basal (que separa as células da teca, das foliculares), pelos espaços intercelulares do epitélio folicular, pelos canais do envelope vitelínico e finalmente atinge as microvilosidades do oócito, onde faz contato com o oolema. É capturada por endocitose mediada por receptores, translocada via vesículas cobertas para o citoplasma; e quebrada por proteólise no sistema endossoma/lisossoma. Resultantes do processo, a lipovitelina e a fosfovítina (as subunidades polipeptídicas das proteínas vitelínicas) são utilizadas na formação dos grânulos de vitelo (BUSSON-MABILLOT, 1984; WALLACE, 1985; HART et al., 1987; STIFANI et al., 1990; WALLACE & SELMAN, 1990; SIRE et al., 1994). As proteínas vitelínicas constituem uma importante fonte de aminoácidos e lipídeos para os embriões e sustentam o seu desenvolvimento.

Durante o crescimento secundário, ocorre, portanto, um novo e drástico aumento do volume oocitário, devido agora ao acúmulo de vitelo. A deposição de vitelo é feita na forma de grânulos, limitados por membrana, formados pela fusão das vesículas cobertas menores, que aparecem inicialmente no citoplasma periférico e que gradualmente preenchem o ooplasma (YAMAMOTO, 1964; WALLACE & SELMAN, 1981; NAGAHAMA, 1983; SELMAN & WALLACE, 1989; WALLACE & SELMAN, 1990; WEST, 1990; TYLER & SUMPTER, 1996).

A quantidade de lipídeos nos oócitos dos Teleostei é variável. Nas espécies marinhas, com ovos pelágicos, gotas de lipídeo podem ocupar metade ou mais do volume oocitário e contêm principalmente lipídeos neutros, como os triglicerídeos e as ceras. Durante a maturação, as gotas de lipídeo dos ovos pelágicos coalescem e formam um ou dois grandes glóbulos. Nas espécies marinhas com ovos demersais, os lipídeos estão associados à vitelogenina e são principalmente polares, do tipo presente nas membranas celulares (SILVERSAND & HAUX, 1995; WEIGAND, 1996). Este parece ser também, o caso das espécies de água doce. Supõe-se que além de constituírem uma fonte de reservas para as demandas energéticas da embriogênese, estejam associados à fluutuabilidade dos ovos (CRAIK & HARVEY, 1987). A deposição de lipídeos nos oócitos dos Teleostei pode ocorrer independentemente ou ser simultânea à deposição das proteínas do vitelo. Seu mecanismo, no entanto, permanece não explorado (PATIÑO & SULLIVAN, 2002). Existem evidências de que lipoproteínas de muito alta densidade e de alta densidade possam constituir importantes fontes de lipídeos para os oócitos de alguns Teleostei (NAGLER & IDLER, 1990; WEIGAND, 1996).

Mudanças estruturais consideráveis ocorrem no envelope oocitário que completa a sua formação. Os microvilos do oócito e das células foliculares alongam-se, a deposição de

substância amorfa ao seu redor acelera-se, levando ao espessamento da estrutura como um todo. A substância amorfa depositada ao redor dos microvilos é de natureza principalmente protéica (LAALE, 1980; COTELLI et al., 1988; BEGOVAC & WALLACE, 1989). Suas proteínas precursoras são variadas e têm origem hepática ou ovariana ou mesmo de ambas (PATIÑO & SULLIVAN, 2002).

Nos pontos de contato entre os microvilos dos oócitos com aqueles dos seus pares no epitélio folicular, formam-se junções comunicantes. As junções comunicantes propiciam uma continuidade entre o citoplasma dos pares, e acredita-se que estejam envolvidas na coordenação do desenvolvimento e diferenciação dos vários compartimentos celulares (IWAMATSU et al., 1988; YORK et al., 1993).

#### ***4.7. A maturação***

Ao final do crescimento secundário o oócito entra em maturação e retoma o processo meiótico. O núcleo (vesícula germinativa) migra para a periferia da célula determinando o pólo animal do oócito e o envoltório nuclear fragmenta-se. Os cromossomos condensam e avançam para a metáfase da primeira meiose. O primeiro corpúsculo polar é eliminado e completa-se a primeira divisão da meiose. A segunda divisão tem início. Os cromossomos remanescentes avançam para a metáfase da segunda divisão, e aí permanecem (NAGAHAMA, 1983; SELMAN & WALLACE, 1989; WEST, 1990; KHAN & THOMAS, 1999; MUNÓZ et al., 2001; FRANCOLINI, 2003; ABASCAL & MEDINA, 2005).

Paralelamente, as estruturas citoplasmáticas preparam-se para fertilização e desenvolvimento do embrião. Em várias espécies marinhas, ocorre uma nova proteólise das

proteínas vitelínicas que provoca a hidratação dos oócitos maduros e novo aumento do volume celular (WALLACE & BEGOVAC, 1985; SELMAN & WALLACE, 1989; FYHN et al., 1999, MUNÓZ et al., 2001; ABASCAL & MEDINA, 2005). Acredita-se que os aminoácidos livres resultantes da proteólise das proteínas vitelínicas sejam responsáveis pelo gradiente osmótico que controla o influxo de água (GREELEY et al., 1991; THORSEN & FYHN, 1996; MATSUBARA & SAWANO, 1995; MATSUBARA & KOYA, 1997; MATSUBARA et al., 1999).

#### ***4.8. A atresia folicular***

A atresia folicular é um processo degenerativo comum freqüentemente observado em ovários de vertebrados, em condições naturais ou experimentais, que pode ser induzida por diferentes fatores físicos ou químicos, tais como estresse, jejum, agentes tóxicos, luz, temperatura, confinamento e níveis hormonais inadequados (SAIDAPUR, 1978; NAGAHAMA, 1983; GURAYA, 1986; BROMLEY et al., 2000; WOOD & VAN DER KRAAK, 2002). Em Teleostei, a atresia é mais freqüentemente encontrada em oócitos vitelogênicos, que como consequência, pode reduzir o potencial reprodutivo da espécie (RIZZO & BAZZOLI, 1995; MIRANDA et al., 1999; BENJAMIM, 2004; SANTOS et al., 2005).

A degeneração e absorção dos folículos atrésicos é um processo prolongado variando de 4 a 7 meses, e freqüentemente deixa sinais nos ovários que podem permanecer ao longo do próximo ciclo reprodutivo (RIZZO & BAZZOLI, 1995; MIRANDA et al., 1999).

A maioria dos eventos morfológicos de atresia folicular é similar na maioria dos Teleostei ovíparos (SAIDAPUR, 1978; MIRANDA et al., 1999; BROMLEY et al., 2000,

BENJAMIM, 2004). O início da atresia é marcado pelo aparecimento de fendas na zona pelúcida, desorganização do citoplasma periférico tanto dos oócitos pré-vitelogênicos quanto daqueles em vitelogênese avançada e liquefação do vitelo. Com o avanço do processo, ocorre a hipertrofia das células foliculares que se tornam vacuolizadas devido a intensa atividade fagocítica decorrente da ingestão e digestão do vitelo. Nos folículos atrésicos, as células foliculares hipertrofiadas pela ingestão e digestão do vitelo, contêm numerosos vacúolos heterogêneos, inclusões elétron-densas como figuras de mielina e pigmentos, elementos citoplasmáticos em degeneração (MIRANDA et al., 1999). Nelas a atividade fosfatase ácida (LAMBERT, 1970) intensifica-se em decorrência da sua participação ativa no processo de digestão dos componentes do oócito (LANG, 1981a; BESSEAU & FALIEUX, 1994). Na fase final, as células foliculares invadem o ooplasma, digerem o vitelo residual e acumulam um pigmento castanho-amarelado, que permanece no ovário por longos períodos. (LAMBERT, 1970; VIZZIANO & BEROIS, 1990; MIRANDA et al., 1999; BAZZOLI E RIZZO, 1995; RIZZO & BAZZOLI, 1995; SANTOS et al., 2005). A formação desse pigmento é atribuída à deficiência dos lisossomos na digestão de lipídeos (LANG, 1981b), e reconhece-se no pigmento, a presença de grãos de lipofucsina (MIRANDA et al, 1999).

Além da ação das células foliculares no processo de absorção do vitelo, os vasos sanguíneos da teca, que aumentam em numero, têm uma atuação ativa no processo. O tecido conjuntivo que circunda o oócito em degeneração torna-se ricamente vascularizado e eosinófilos conduzidos a estes sítios pelo aumento da vascularização local podem estar presentes já nas fases iniciais do processo (LANG, 1981a; BAZZOLI & RIZZO, 1995; BENJAMIM, 2004). Outros relatos sobre o aumento da vascularização, registram a

presença de granulócitos ativos próximos a folículos atrésicos somente nos estágios finais de absorção (MIRANDA et al., 1999).

Sugere-se que os eosinófilos teriam uma ação sinérgica à das células foliculares no processo de reabsorção folicular, invadindo o oócito em atresia e aí liberando seus grânulos que contêm enzimas líticas (BESSEAU & FALIEUX, 1994).

As suspeitas de que os folículos atrésicos teriam atividade esteroideogênica têm sido refutadas (LAMBERT, 1970; MIRANDA et al., 1999). Porém permanece a dúvida sobre a sua ação indutora dessas atividades nas células intersticiais, as quais secretariam os hormônios esteróides necessários ao crescimento, diferenciação e maturação dos folículos normais (GURAYA, 1986).

O final do processo de atresia envolve a involução do epitélio folicular e é apoptose dependente (SANTOS et al., 2005). Sabendo que as células foliculares são importantes na proteólise e na absorção do vitelo em Teleostei, entende-se que a apoptose deva aumentar somente nos estágios mais avançados da atresia folicular (WOOD & VAN DER KRAAK, 2003; SANTOS et al., 2005). Assim, mecanismos autócrinos e parácrinos devem agir nos ovários de Teleostei após a desova contribuindo para a sobrevivência das células foliculares durante a absorção de vitelo nos folículos atrésicos (SANTOS et al., 2005).

#### ***4.9. A ovulação***

A ovulação envolve a expulsão do oócito maduro, que ganha a cavidade da gônada e a degradação e ruptura do envoltório folicular, que permanece na lamela ovígera (LESSMAN, 1998). Exceção feita às espécies com fertilização intrafolicular, e aquelas em que o desenvolvimento embrionário ocorre no interior dos folículos (THIBAUT & SCHULTZ, 1978). Novamente os mecanismos envolvidos no desencadear desse processo

permanecem pouco claros nos Teleostei (PATIÑO & SULLIVAN, 2002).

#### ***4.10. A regressão do folículo pós-ovulatório***

As descrições existentes sobre a regressão dos folículos pós-ovulatórios até recentemente tratavam apenas dos seus aspectos morfológicos. Assim, com a expulsão do oócito, formam-se dobras no epitélio folicular que diminuem com a regressão (GOLDBERG et al., 1984; FITZHUGH & HETTLER, 1995). Folículos pós-ovulatórios são derivados de folículos ovarianos, e estão presentes nos ovários de peixes após a desova e não são homólogos aos corpos lúteos de mamíferos (LANG, 1981b; SELMAN & WALLACE, 1989). Os folículos pós-ovulatórios são contínuos com o lúmen ovariano, apresentam um lúmen amplo e irregular, parede constituída por camada única de células foliculares, pela teca e por uma camada de músculo liso (LANG, 1981b; BENJAMIM, 2004).

As primeiras modificações dos folículos após a desova são mecânicas, ou seja, formam-se dobras no epitélio após a saída do oócito, que diminuem com a regressão do folículo. O lúmen do folículo é gradativamente obstruído pela proliferação e hipertrofia de células foliculares, pela liberação de restos celulares, por secreção de natureza glicoprotéica, e pela pressão exercida pelos oócito presentes que continuam em desenvolvimento (GOLDBERG et al., 1984; FITZHUGH & HETTLER, 1995; BENJAMIM, 2004).

Nas espécies que as células foliculares são pavimentosas, ocorre a hipertrofia, tornando-as células colunares ou prismáticas (DRUMMOND et al., 2000). Os trabalhos existentes que informam sobre a hipertrofia das células foliculares nos folículos pós-ovulatórios mostram que o processo obedece a um padrão comum entre os diferentes taxa

nos Teleostei (BARLEY, 1933; BENJAMIM, 2004, DRUMMOND et al., 2000; SANTOS, et al., 2005).

Nas fases finais de absorção dos folículos pós-ovulatórios, torna-se difícil diferenciá-los dos folículos atrésicos, (GOLDBERG et al., 1984; FITZHUGH & HETTLER, 1995). Um marcador que pode ser usado para diferenciar as estruturas, é a presença de material castanho-amarelado, presente nos folículos atrésicos (LAMBERT, 1970; BENJAMIM, 2004). Durante a regressão dos folículos pós-ovulatórios, os vasos da teca aumentam de calibre e tornam-se mais numerosos (DRUMMOND et al., 2000) facilitando o aporte ao local de células do sistema de defesa. Eosinófilos detectados no lúmen dos folículos pós-ovulatórios e no tecido intersticial circum-adjacente desde os estádios iniciais de degeneração podem ter um papel expressivo no processo (FITZHUGH & HETTLER, 1995).

Acredita-se que durante a regressão dos folículos pós-ovulatórios, as células foliculares além de um papel fagocítico (MIRANDA et al., 1999; BENJAMIM, 2004) tenham também atividade esteroidogênica (VAN DEN HURK & PEUTE, 1979,1985; GURAYA, 1968; VAN NASSAUW & CALLEBAUT, 1991). A suposta atividade esteroidogênica deve-se à detecção de gotas de lipídios e lipoproteínas difusas no citoplasma das células foliculares (LANG, 1981b) que não devem ser consideradas determinantes, uma vez que não são uma constante nos folículos pós-ovulatórios dos Teleostei (DRUMMOND, 1996).

No final da fase degenerativa, o lúmen dos folículos é ocupado principalmente por células foliculares com núcleo picnótico (GOLDBERG et al., 1984; VIZZIANO & BEROIS 1990). Sabe-se agora que o processo de regressão dos folículos pós-ovulatórios é apoptose dependente. Durante a regressão, nas células foliculares ocorre a compactação e

marginalização da cromatina junto ao envoltório nuclear, retração celular, formação de bolhas na superfície celular, perda de adesão e fragmentação celular com formação de corpos apoptóticos. Com a quebra da membrana basal as células foliculares destacam e preenchem o lúmen folicular (SANTOS et al., 2005).

#### ***4.11. As Classes Reprodutivas***

Ao longo do ciclo reprodutivo das fêmeas, no epitélio germinativo das lamelas ovígeras, as oogônias proliferam e entram em meiose dando origem aos oócitos. Os oócitos são continuamente recrutados, e maturam. A maturação dos oócitos envolve o crescimento primário, o crescimento secundário ou vitelogênese, e a maturação final que precede a ovulação. Desde que não é possível definir classes reprodutivas para os ovários dos peixes via alterações do epitélio germinativo, procedimento atualmente utilizado para os machos, as classes reprodutivas nas fêmeas têm por base as alterações nos estágios de desenvolvimento dos oócitos (GRIER, 2000). Por definição, e em correspondência com os machos (TAYLOR et al., 1998), são nominadas 5 classes reprodutivas nas fêmeas:

- Regredida, quando as lamelas ovígeras contêm somente oócitos não vitelogênicos;
- Maturação inicial, quando as lamelas ovígeras contêm oócitos com deposição de lipídio próximo ao núcleo, e em início de deposição de vitelo;
- Maturação intermediária, quando as lamelas ovígeras contêm oócitos em vitelogênese avançada;
- Maturação tardia, quando as lamelas ovígeras contêm oócitos em maturação final (com citoplasma totalmente preenchido pelos grânulos de vitelo, núcleo migrando para o pólo animal, ocorre a hidratação e posterior ovulação);

-Regressão, quando as lamelas ovíferas ou não contêm oócitos maduros ou contêm oócitos em atresia.

#### **4.12. A fertilização**

Os gametas femininos pós-ovulatórios dos Teleostei são desprovidos de células somáticas e, conseqüentemente, o envelope vitelínico está exposto ao meio externo (o fluido ovariano ou o ambiente aquático). O espermatozóide atinge a superfície do oócito através da micrópila e induz a reação cortical, durante a qual o conteúdo dos alvéolos corticais é liberado no espaço perivitelínico. O material liberado é osmoticamente ativo e causa a hidratação e hidrólise das proteínas do envelope vitelínico em pequenas subunidades. As subunidades repolimerizam numa proteína insolúvel (IWAMATSU et al., 1995; HA & LUCCHI, 1996). O envelope vitelínico enrijecido é conhecido como envelope de fertilização (KUDO, 1982). A fertilização induz a retomada da segunda divisão da meiose, que se completa com a liberação do segundo corpúsculo polar (LESSMAN, 1998).

## ***Objetivos***

## 5. OBJETIVOS

Os conceitos de epitélio germinativo feminino aplicam-se aparentemente à grande maioria dos Teleostei, porém até então as poucas descrições existentes referem-se a grupos mais derivados. Portanto sua aplicação na descrição da foliculogênese nos Teleostei mais basais foi aqui testada em *P. maculatus*. Além disso, procedeu-se a caracterização celular das classes reprodutivas anuais e buscou-se determinar a classe reprodutiva da fêmea em que o processo de foliculogênese é mais intenso. Considerando, ainda, que o ciclo reprodutivo completa-se com a liberação dos oócitos maduros e nos ovários restam, portanto, os folículos vazios e os ovócitos não ovulados, documentou-se também a regressão e a atresia folicular, tendo como ferramentas de análise, a Microscopia de Luz, a Microscopia Eletrônica de Transmissão e a Técnica de PCNA.

## ***Materiais e Métodos***

## **6. MATERIAIS E MÉTODOS**

### **6.1. Os animais**

Fêmeas adultas de *Pimelodus maculatus* foram coletadas, mensalmente no rio Piracicaba (Município de Santa Maria da Serra – SP), durante o período de novembro de 2003 a maio de 2006, somando um total 136 exemplares.

Os animais foram anestesiados com 0,1% de benzocaína (0,1g/l), pesados e seus comprimentos total (distância entre as extremidades anterior e final do animal) e padrão (distância entre a extremidade anterior e a inserção da nadadeira caudal do animal) mensurados. Em seguida os animais foram sacrificados por decapitação e seus ovários rapidamente removidos, pesados e imersos em solução de fixação apropriada para cada metodologia.

### **6.2. Microscopia de luz**

Para microscopia de luz, os ovários dos animais foram fixados em solução de glutaraldeído 2% e paraformaldeído 4% em tampão Sorensen (0,1M a pH 7,2) por pelo menos 24 horas. Após fixação, os ovários foram fotografados e seccionados e depois fragmentados em porções cranial, medial e caudal. O material foi desidratado em uma série crescente de etanol (70% por 2 horas; 95% por no máximo 4 horas) e trocado para uma solução de resina (Technovit 7100 = Jung HistoResin [Leica]) + etanol absoluto por 4 horas. Os ovários foram infiltrados em solução de resina pura (Technovit 7100 = Jung HistoResin [Leica]) (“overnight”) e incluídos em meio apropriado de inclusão.

Cortes transversais, longitudinais e seriados foram obtidos com 3 µm de espessura utilizando micrótomo equipado com navalha de vidro e submetidos a diferentes técnicas de coloração (Hematoxilina Férrica/Eosina, Azul de Toluidina-Bórax, Feulgen e PAS+Hematoxilina+ Amarelo de Metila (Metanil Yellow) - QUINTERO-HUNTER et al., 1991) para posterior análise microscópica. O metanil yellow foi cedido gentilmente por Harry J. Grier, (Florida Marine Research Institute).

A anatomia ovariana foi fotografada e as secções histológicas analisadas e documentadas através de sistema computadorizado para análise de imagens (Leica Qwin 2.5).

### ***6.3. Microscopia eletrônica de transmissão***

Para os estudos ultra-estruturais, fragmentos de ovários foram fixados em solução contendo glutaraldeído 2% e paraformaldeído 4% em tampão Sorensen (0,1M a pH 7,2) por pelo menos 24 horas. O material foi pós-fixado por 2h no escuro em 1% de tetróxido de ósmio no mesmo tampão, contrastado em bloco com solução aquosa de acetato de uranila 5% por 2 horas, desidratado em acetona e embebido em araldite. Após seleção (cortes semifinos), os ovários foram seccionados em ultramicrótomo equipado com navalha de diamante, contrastados com solução saturada de acetato de uranila em etanol 50% e com citrato de chumbo 0,2% em NaOH, 0,1N, e documentados em microscópio eletrônico de transmissão Phillips – CM 100. Toda esta metodologia foi realizada no Centro de Microscopia Eletrônica do Instituto de Biociências da Unesp – Botucatu.

#### **6.4. Imunocitoquímica para proliferação celular (PCNA - proliferating cell nuclear antigen)**

O antígeno nuclear de proliferação celular (PCNA) atua em diversos processos no ciclo celular, incluindo replicação, alongação e reparo do DNA (ver CHIEFFI et al., 2001). É uma proteína nuclear não histônica, com aparente ponto isoelétrico entre 4,8-4,9 e de massa molecular de 36KDa (ver MIURA et al., 2002). Atua como uma proteína auxiliar da DNA polimerase  $\delta$  e  $\epsilon$  (CHIEFFI et al., 2001; MIURA et al., 2002). Também é utilizada no controle do ciclo celular, interagindo diretamente com ciclinas/ complexos cdk, permitindo a passagem de G1 para S (ver CHIEFFI et al., 2001). O PCNA é altamente conservado e tem sido identificado em uma grande quantidade de eucariotos (ver CHIEFFI et al., 2001). Para avaliar a expressão do PCNA, fragmentos de ovários de *Pimelodus maculatus* foram fixados em líquido de Bouin (contendo solução saturada de ácido pícrico 75%, formol tamponado 25% e ácido acético 5%) desidratados em etanol, clareados em xilol, embebidos em paraplast e seccionados com 5 $\mu$ m de espessura, utilizando micrótomo equipado com navalha de aço. Os cortes obtidos foram desparafinizados com xilol e hidratados com água destilada. O bloqueio da peroxidase endógena foi feito com 3% de peróxido de hidrogênio em tampão TBS (pH 7,6) (Tris + tampão fosfato) por 10 minutos. Após o bloqueio, os cortes foram submetidos a recuperação antigênica em microondas (potência máxima), com tampão citrato (0,01M; pH 6,0) durante três vezes de 5 minutos. Após a recuperação antigênica, os cortes foram lavados em tampão TBS e o bloqueio inespecífico realizado com soro bloqueador (3% de leite Molico desnatado, sem  $Ca^{+2}$ , em tampão TBS) por 10 minutos. O material foi incubado com o anticorpo primário (1:200) (Novocastra – NCL-PCNA) por 1 hora a temperatura ambiente (em câmara úmida) ou “overnight” na geladeira. As lâminas foram lavadas com tampão TBS, incubadas com anticorpo secundário

biotinilado diluído (Novostain *Super ABC Kit – Universal – NCL-ABCu*) por 30 minutos, lavadas novamente com TBS e incubadas com o reagente Super ABC (complexo avidina-biotina-peroxidase) (Novostain *Super ABC Kit – Universal – NCL-ABCu*) por 30 minutos. Após lavagem em TBS, o material foi revelado com 0,05% DAB (3',3'-diaminobenzidina, dissolvido em TBS) e 0,03% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Em seguida as lamínas foram contracoradas com hematoxilina, montadas e documentadas em sistema computadorizado para análise de imagens (Leica Qwin 2.5). Como controles negativo, em algumas lâminas, o anticorpo primário foi omitido ou substituído por TBS.

## *Resultados*

## **7. RESULTADOS**

### **7.1. ANATOMIA OVARIANA**

Os ovários de *P.maculatus* são órgãos pares, saculiformes, localizados no sentido longitudinal e na região dorsal da cavidade celomática, com dimensões variadas de acordo com o seu grau de desenvolvimento (Fig. 1A). Estão conectados ao teto da cavidade celomática pelo mesovário (Fig. 1B).

Nos ovários o compartimento germinativo organiza-se em lamelas que se projetam a partir da cápsula em direção à luz do órgão (Figs. 1D,E,F). As lamelas ovígeras são limitadas pelo epitélio germinativo, e contêm os folículos derivados do epitélio e o compartimento estromal (Figs. 1G e 14C). O estroma é formado por um tecido conjuntivo frouxo do tipo mucoso com células mesenquimais indiferenciadas que darão origem as células da teca interna e externa, as células pré-tecais que ao final da foliculogênese envolvem o folículo em formação (Figs. 14C).

Na cavidade dos ovários, o lúmen reduzido e sinuoso é contínuo com os oviductos curtos que se unem caudalmente, num curto ducto único que desemboca na papila urogenital (Figs. 1A, C). As lamelas ovígeras são margeadas pelo epitélio germinativo que contém tanto células somáticas epiteliais que se tornam posteriormente células foliculares, bem como as células germinativas, as oogônias, que originam os oócitos. (Fig. 1G).

### **7.2. O EPITÉLIO GERMINATIVO**

O epitélio germinativo feminino em *P.maculatus* é um epitélio simples, pavimentoso, que reveste a superfície da lamela e delimita o lúmen ovariano e é separado do estroma por uma membrana basal. É composto por dois tipos de células: as células

somáticas epiteliais e as células germinativas, as oogônias, apoiadas na membrana basal (Fig. 12A).

### ***7.2.1. Células epiteliais***

As células epiteliais são pavimentosas, e possuem núcleo alongado e basófilo (Figs. 1G e 2A). Têm citoplasma contendo poucas mitocôndrias, microfilamentos, cavéolas e núcleo alongado com cromatina parcialmente descompactada (Figs. 11A-D). No epitélio associam-se umas às outras ou as oogônias (Figs. 12B,C,D). Unem-se lateralmente através de complexos juncionais constituídos, da base para o ápice, por desmossomos, junções de aderência e junções de oclusão (Fig. 11E). No epitélio, emitem processos citoplasmáticos com os quais envolvem as oogônias formando verdadeiros cistos (Figs. 12B,F).

### ***7.2.2. As oogônias***

As oogônias são células arredondadas com núcleo grande e esférico contendo cromatina descondensada e um único nucléolo bem desenvolvido e podem ser mais ou menos eletron-densas. No citoplasma apresentam, nuages e inúmeras mitocôndrias arredondadas e pouco elétron densas (Figs. 12A,C,F).

Espalhadas entre as células epiteliais, as oogônias individuais, nunca fazem um contato direto com o lúmen ovariano. Estão sempre envoltas total ou parcialmente pelos prolongamentos citoplasmáticos das células epiteliais (Fig. 12F). Algumas das oogônias apóiam-se diretamente sobre a membrana basal (Fig. 12A).

### 7.3. FOLICULOGÊNESE

A cada ciclo reprodutivo as oogônias residentes do epitélio dividem-se por mitose para manter sua população e na sua maioria entram em meiose produzindo os oócitos.

Em *P. maculatus* as oogônias são células arredondadas ou ovaladas, de pequenas dimensões. Apresentam citoplasma escasso, claro, com granulações que respondem a eosina e ao amarelo de metila. Têm núcleo grande, esférico, claro, e um único nucléolo muito desenvolvido (Figs. 2A,B e 3A).

A intensa proliferação mitótica das oogônias ocorre sempre acima da membrana basal (Figs. 2B,C, 12C,D,E e 13A), dá origem a conjuntos de células que são gradual e individualmente envoltas pelas células epiteliais, formando um tipo de cisto (Figs. 2D,12F e 13B,C,E). As oogônias no interior dos cistos, ou oogônias secundárias entram em meiose ou dividem-se novamente 1, 2, 3 ou mais vezes mitose (Fig. 2E) e entram em meiose dando origem aos oócitos (Figs. 2D,F). O conjunto de células, oócitos envoltos pelas células originárias do epitélio, forma uma espécie de sáculo, que se projeta para o estroma, mas permanece conectado ao próprio epitélio, compartilhando a mesma membrana basal (Figs. 13D,F).

As células meióticas iniciais são pequenas têm núcleo basofílico e citoplasma claro e escasso e permanecem nos sáculos ou ninhos (Figs. 2F,G). Conforme avançam nas diferentes fases da meiose, leptóteno, zigóteno, paquíteno, e até que estacionem em diplóteno, no núcleo dos oócitos, os cromossomos compactam, formam-se os complexos sinaptomêmicos, ocorre o pareamento dos homólogos e a troca de material gênico, os complexos sinaptonêmicos desestruturam e surgem os cromossomos plumosos característicos do diplóteno. Esses eventos nucleares resultam em diferentes aspectos da cromatina que podem ser acompanhados ainda no núcleo dos oócitos no interior dos ninhos

(Figs. 2F-L e 14A,B). As células limitantes dos ninhos, agora pré-foliculares, projetam-se para o interior dos sáculos, e gradativamente envolvem as células germinativas e colocam-se entre e ao redor de cada oócito (Figs. 2F,I,J e 3A,B,C). Totalmente envolvidos pelas agora células foliculares os oócitos iniciais tornam-se individualizados (Figs. 3D-G). Mantém-se em contato com o epitélio com o qual compartilham uma certa extensão da membrana basal enquanto que o restante do conjunto projeta-se para o estroma (Figs. 11B,C,F e 13D,F). No estroma, células indiferenciadas do conjuntivo organizam-se ao redor e sobre a membrana basal das células foliculares e formam a teca interna. Entre as células da teca, algumas diferenciam-se em células esteroidogênicas (Figs. 14F-H).

A foliculogênese em *P. maculatus* completa-se antes do início do crescimento primário (Figs. 3D,E). O complexo folicular, no interior do qual o oócito desenvolve-se, é constituído pelo oócito diplotênico associado a uma camada de células foliculares, rodeado pela membrana basal, e pelas tecas interna e externa (Figs. 14E). O complexo folicular sempre compartilha com o epitélio germinativo uma certa extensão da membrana basal, portanto mantém-se em continuidade com o epitélio durante todo o crescimento oocitário (Figs. 4A-D e 14C,D). É por essa comunicação, que o oócito maduro faz passagem para o lúmen, na desova (Figs. 4E,F).

## **7.4. IMUNOCITOQUÍMICA (PCNA - ANTÍGENO NUCLEAR DE PROLIFERAÇÃO CELULAR)**

### **7.4.1. Proliferação das células germinativas e somáticas epiteliais**

A imunomarcção ao PCNA confirma a proliferação das células germinativas e principalmente das células somáticas durante todo processo de foliculogênese em *P. maculatus*.

As oogônias que residem no epitélio germinativo apresentaram marcações discretas em resposta ao PCNA (Fig. 5A). Nas células germinativas a imuno-reação ao PCNA concentra-se nos núcleos dos oócitos diplotênicos ainda nos ninhos ou sáculos (Figs. 5A,B,C). Os oócitos primordiais também respondem ao PCNA (Fig. 5D).

A proliferação das células somáticas é detectada no epitélio (Figs. 5A,B,C), ocorre nas células derivadas do epitélio, que invadem os ninhos associando-se aos oócitos (Fig. 5A) e nas células pré-foliculares já associadas aos oócitos primordiais (Fig. 5D). Durante o crescimento primário, as células foliculares continuam a responder a imunomarcagem pelo PCNA (Figs. 5E), assegurando o aumento de número necessário para acompanhar o crescimento de oócito.

## **7.5. AS CLASSES REPRODUTIVAS**

Nas lamelas ovígeras, os oócitos continuamente recrutados maturam. A maturação dos oócitos envolve o crescimento primário, o crescimento secundário ou vitelogênese, e a maturação final que precede a ovulação. Nas lamelas, os folículos pós-ovulatórios regridem e os oócitos maduros não ovulados entram em atresia. O desenvolvimento dos oócitos leva a uma série de alterações que se refletem na estrutura das lamelas e na condição ovariana como um todo. Em seu conjunto as alterações foram utilizadas em *P. maculatus* na caracterização das diferentes classes reprodutivas (Regredida, Maturação Inicial, Intermediária e Final, e Regressão).

### *-Regredida*

Nos ovários regredidos, as lamelas ovígeras contêm somente oócitos em crescimento primário ou não vitelogênicos. Nos oócitos em crescimento primário ou pré-

vitelogênicos o citoplasma, decorrente da deposição de RNA, torna-se intensamente basofílico e aumenta de volume. Ocorre amplificação nucleolar que resulta no aparecimento de inúmeros nucléolos que se dispõem perifericamente. Ao final do crescimento primário, o contorno do núcleo torna-se irregular e tem início a formação dos alvéolos corticais. As células foliculares tornam-se cúbicas (Figs. 6A,B,C).

#### *-Maturação inicial*

Nos ovários em maturação inicial as lamelas ovígeras contêm oócitos pré-vitelogênicos e oócitos em início de deposição de vitelo. Nos oócitos em vitelogênese inicial, na coloração pelo amarelo de metila, os alvéolos corticais, pequenas vesículas não coradas dispõem-se junto ao oolema e grânulos de vitelo (em amarelo) surgem no citoplasma (Figs. 6D,E,F).

#### *-Maturação intermediária*

Nos ovários em maturação intermediária, as lamelas ovígeras contêm principalmente oócitos em maturação avançada e entre eles alguns poucos oócitos em vitelogênese inicial e oócitos pré-vitelogênicos. Nos oócitos em vitelogênese intermediária, os grânulos de vitelo preenchem praticamente todo o citoplasma e o núcleo é central (Figs. 6G,H,I).

#### *-Maturação tardia*

Nos ovários em maturação tardia, as lamelas ovígeras contêm principalmente oócitos em maturação final e entre eles alguns poucos oócitos pré-vitelogênicos. Nos

oócitos em maturação final, os grânulos de vitelo preenchem todo o citoplasma, o núcleo migra para o pólo animal e ocorre a ovulação (Figs. 6J, L).

#### *-Regressão*

Nos ovários em regressão, as lamelas ovígeras ou não contêm oócitos maduros ou contêm oócitos em atresia e folículos pós-ovulatórios. Ao final da regressão apenas as estruturas remanescentes da absorção dos folículos pós-ovulatórios e dos oócitos atrésicos permanecem entre os numerosos oócitos pré-vitelogênicos (Figs. 6M,N).

### **7.6. FOLÍCULOS PÓS-OVULATÓRIOS**

Os folículos pós-ovulatórios que permanecem nas lamelas ovígeras após a desova apresentam um lúmen reduzido e irregular, e parede constituída por uma camada única de células foliculares, a membrana basal e pela teca (Figs. 7A-C,G).

Durante a regressão as células foliculares inicialmente cilíndricas, com citoplasma de aspecto vacuolizado e núcleo basal, hipertrofiam (Fig. 7G). No citoplasma os vacúolos PAS positivos aumentam de tamanho, e o núcleo desloca-se para o ápice da célula (Figs. 7D,E). As células perdem o arranjo linear, surgem inúmeras dobras na parede dando um aspecto sanfonado ao folículo remanescente (Figs. 7B,E).

A cavidade que se forma no folículo pós-ovulatórios após a saída do oócito maduro, tem o lúmen rapidamente obstruído pela hipertrofia das células foliculares e pela liberação de restos celulares (Fig. 7C). Com o avanço dos processos de regressão dos folículos pós-ovulatórios, as dobras da parede do folículo diminuem, mas ainda mantém sua forma irregular (Fig. 7F).

A presença de eosinófilos foi observada no interior dos folículos pós-ovulatórios, quando o lúmen já se encontrava quase totalmente obstruído pelas células foliculares (Figs. 7F,H), porém hemácias sempre estiveram presentes durante o processo (Figs. 7A-G).

### **7.7. ATRESIA FOLICULAR**

Em *P. maculatus* a atresia folicular é esporádica e atinge principalmente os oócitos maduros, não ovulados (Figs. 8A,B). No decorrer deste processo, os oócitos regridem, passando por várias fases de degeneração e absorção.

No oócito surgem fendas na zona pelúcida, o citoplasma periférico desorganiza-se e o vitelo torna-se liquefeito (Figs. 8C,D). As células foliculares hipertrofiam, tornam-se fagocíticas, projetam-se para o interior do oócito, sempre mantendo contato com a membrana basal (Fig. 10C), e tornam-se vacuolizadas devido a ingestão e digestão do vitelo e dos resquícios da zona pelúcida (Figs. 8C,E,F e 10A-C). As células foliculares durante o processo de atresia, mantêm intacta sua membrana em contato com outras células (Fig. 10E). Ao final do processo, o citoplasma das células foliculares apresenta-se preenchido por vesículas (Figs. 8I) e um pigmento castanho amarelado (Fig. 8J).

Ao longo do processo de atresia folicular, em *P. maculatus*, o tecido conjuntivo que circunda o oócito em degeneração torna-se ricamente vascularizado e eosinófilos conduzidos a estes sítios pelo aumento de vascularização local estão presentes desde as fases iniciais do processo (Figs. 8G e 10A-D). Nas fases finais de atresia folicular, os eosinófilos são encontrados no interior dos folículos atresícos, entremeados às células foliculares (Fig. 8H). A membrana basal que inicialmente envolve o oócito, permanece preservada ao final do processo de atresia (Figs. 10F,G).

Nas fases finais de absorção, corpos apoptóticos, evidenciados pela coloração de Feulgen, são encontrados no interior dos folículos atrésicos (Figs. 8L,M).

#### **7.8. CLASSES REPRODUTIVAS X FOLICULOGÊNESE**

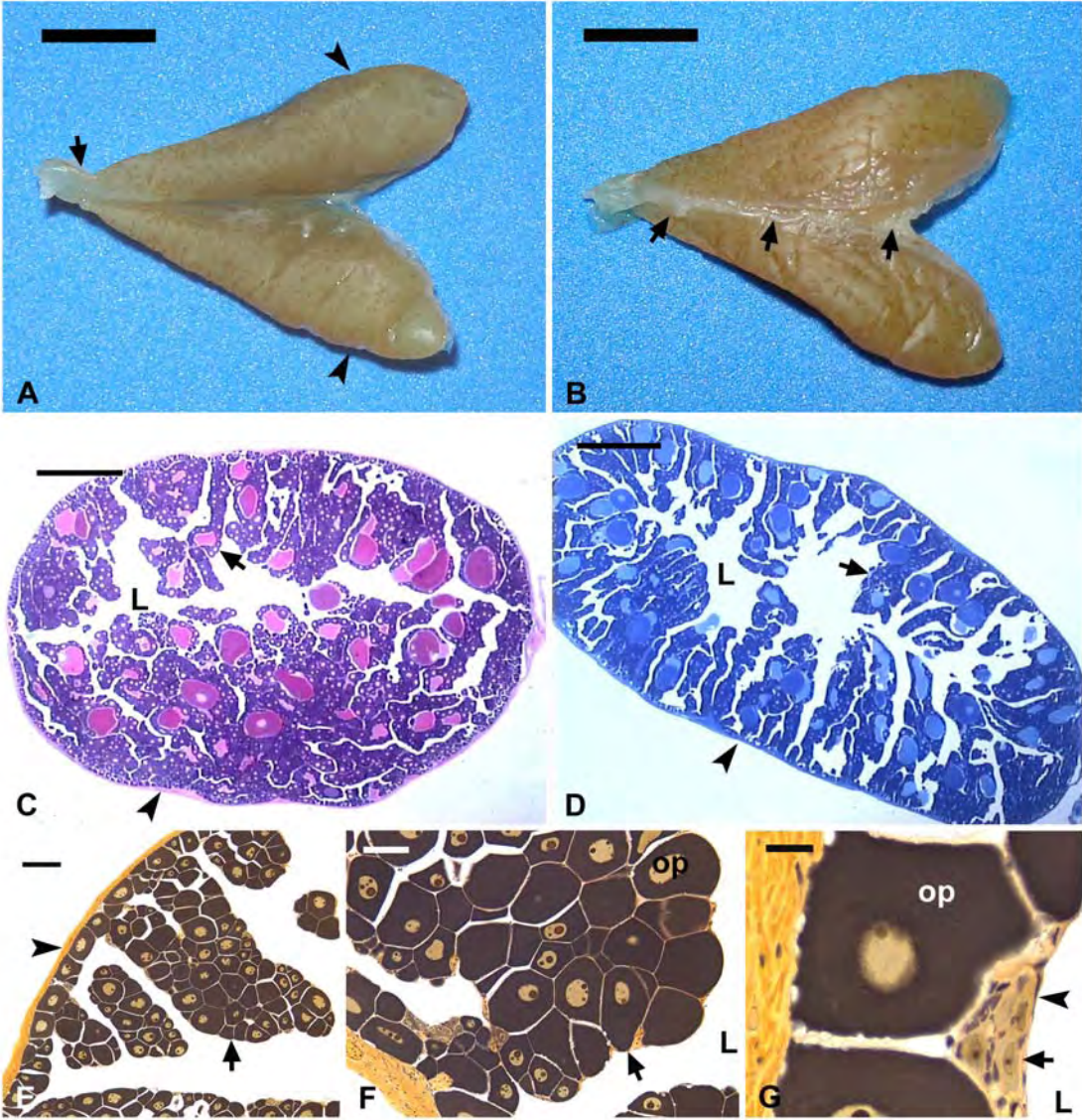
Em *P. maculatus* a maior incidência de oogônias isoladas, ou formando ninhos e oócitos primordiais nas lamelas ovíferas ocorre ao final da regressão, quando a absorção dos folículos atrésicos e pós-ovulatórios completa-se. A foliculogênese mantém-se intensa nos ovários regredidos, continua na maturação inicial e intermediária, e torna-se discreta na maturação final (Figs. 9A-J).

## **7.9. FIGURAS**

**Figura 1.** Estrutura geral e secções histológicas da estrutura ovariana de *P. maculatus* (MO)

**A:** Ovários de *P. maculatus* em posição ventral. Ovário esquerdo e direito (cabeça de seta); região da união dos oviductos na região caudal (seta); Barra = 1cm. **B:** Ovários de *P. maculatus* em posição dorsal. Região do mesovário (seta); Barra = 1cm. **C - D:** Secções transversais do ovário. Lúmen (L); região da cápsula (cabeça de seta); lamela ovígera (seta); **C:** Barra = 2mm, **D:** Barra = 1mm. **E:** Secção histológica do ovário. Cápsula (cabeça de seta); lamela ovígera contendo oócitos primários (seta); Barra = 100µm. **F:** Secção histológica de ovário. Lúmen (L); lamela ovígera (seta); Barra = 50µm. **G:** Epitélio germinativo feminino. Lúmen (L); células epiteliais (cabeça de seta); oogônia (seta); Barra = 10µm.

Figura 1



**Figura 2.** Foliculogênese (MO)

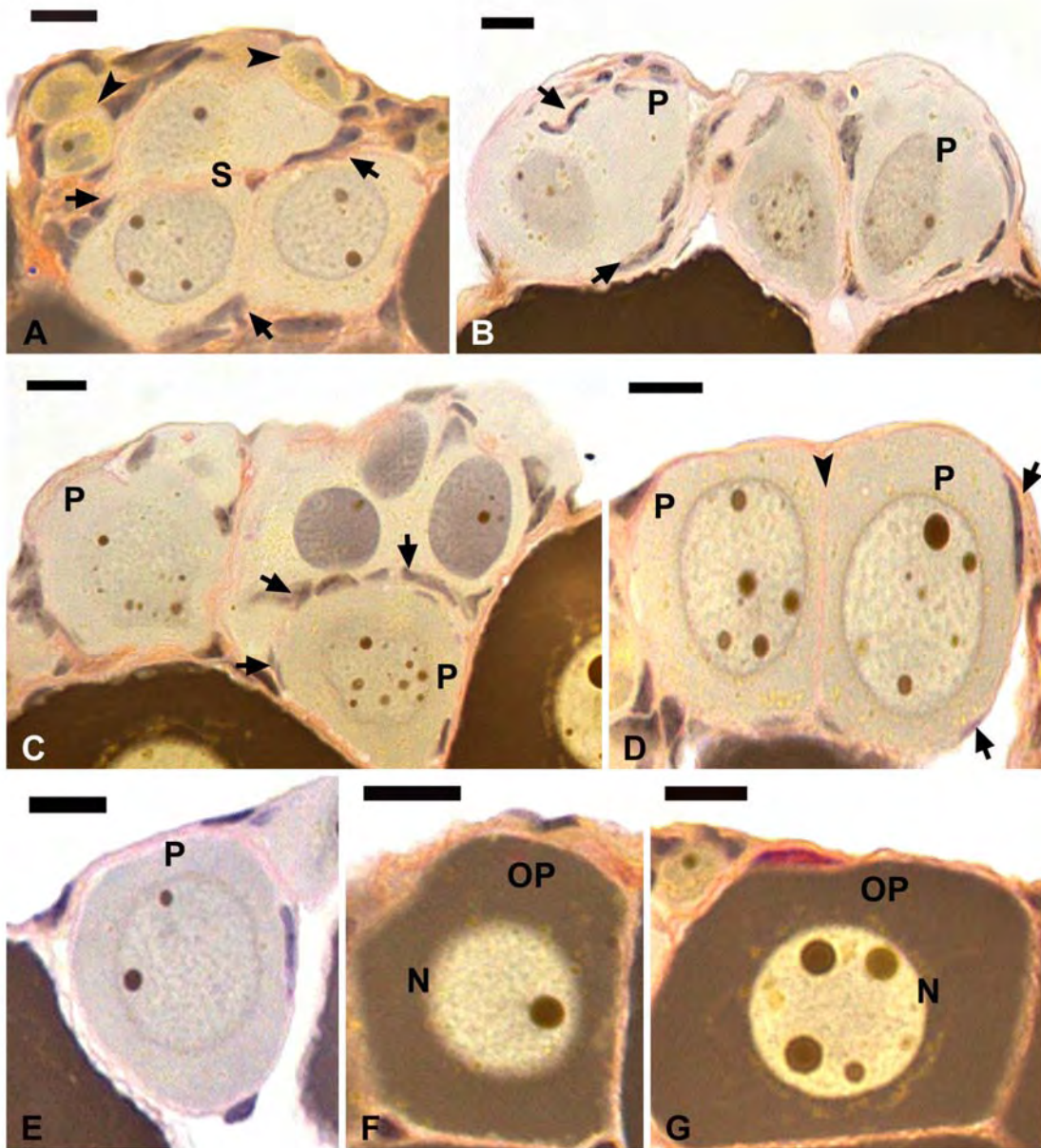
**A:** Imagem de oogônia isolada no epitélio. Lúmen (L); células epiteliais (cabeça de seta); oogônia (seta); oócito primário (OP); Barra = 10 $\mu$ m. **B:** Proliferação de oogônias no epitélio formando ninhos. Lúmen (L); oogônias do tipo B (GB); Limite do ninho (seta) Barra = 10 $\mu$ m. **C:** Detalhe do limite de um ninho (LN); região de conexão com o epitélio (cabeça de seta); lúmen (L); oogônias do tipo B (GB); Barra = 10 $\mu$ m. **D:** Região de epitélio germinativo mostrando proliferação e encistamento. Lúmen (L); ninho de oogônias em proliferação (N); oogônias sendo envoltas/encistadas (seta); sáculos/ninhos de oócitos diplotênicos (S); Barra = 20 $\mu$ m. **E – L:** Fases da foliculogênese. **E:** Cisto/ninho de oogônias (C); limite da membrana basal que envolve o cisto (seta); lúmen (L); Barra = 10 $\mu$ m. **F:** Sáculo/Ninho de oócitos (C); limite da membrana basal envolvendo o cisto (seta); células limitantes do sáculo (cabeça de seta); Barra = 10 $\mu$ m. **G:** Sáculo contendo oócitos diplotênicos (OD); membrana basal que individualiza cada folículo (seta); Barra = 10 $\mu$ m. **H:** Oócito isolado (seta); células pré-foliculares envolvendo o oócito (cabeça de seta); Barra = 10 $\mu$ m. **I:** Sáculo de oócitos diplotênicos (OD); células limitantes do sáculo (cabeça de seta); Barra = 10 $\mu$ m. **J:** Sáculo de oócitos diplotênicos (OD); células pré-foliculares invadindo o sáculo e envolvendo cada oócito (cabeça de seta); Barra = 20 $\mu$ m. **L:** Sáculo de oócitos (S) em que a invasão pelas células pré-foliculares ainda não ocorreu (asterisco); membrana basal delimitando o sáculo (seta); Barra = 10 $\mu$ m.



**Figura 3.** Foliculogênese (MO)

**A:** Sáculo/ninho (S) de oócito sendo invadido pelas células limitantes/pré-foliculares. Células pré-foliculares no início do envolvimento de cada oócito (seta); oogônia (cabeça de seta) Barra = 10µm. **B:** Oócitos primordiais (P); sendo gradativamente envolvidos por células pré-foliculares (seta); Barra = 10µm. **C:** Oócitos primordiais (P); quase totalmente envolvidos por células pré-foliculares (seta); Barra = 10µm. **D:** Secção histológica mostrando membrana basal das células foliculares (cabeça de seta) entre dois de oócitos primordiais (P); células foliculares (seta); Barra = 10µm. **E:** Oócito primordial(P) totalmente envolto pelas células foliculares; Barra = 10µm. **F:** Oócito em início de crescimento primário com apenas um núcleo. Oócito primário (OP); núcleo (N); Barra = 10µm. **G:** Oócito em crescimento primário, com amplificação de nucléolos. Oócito primário (OP); núcleo (N); Barra = 10µm.

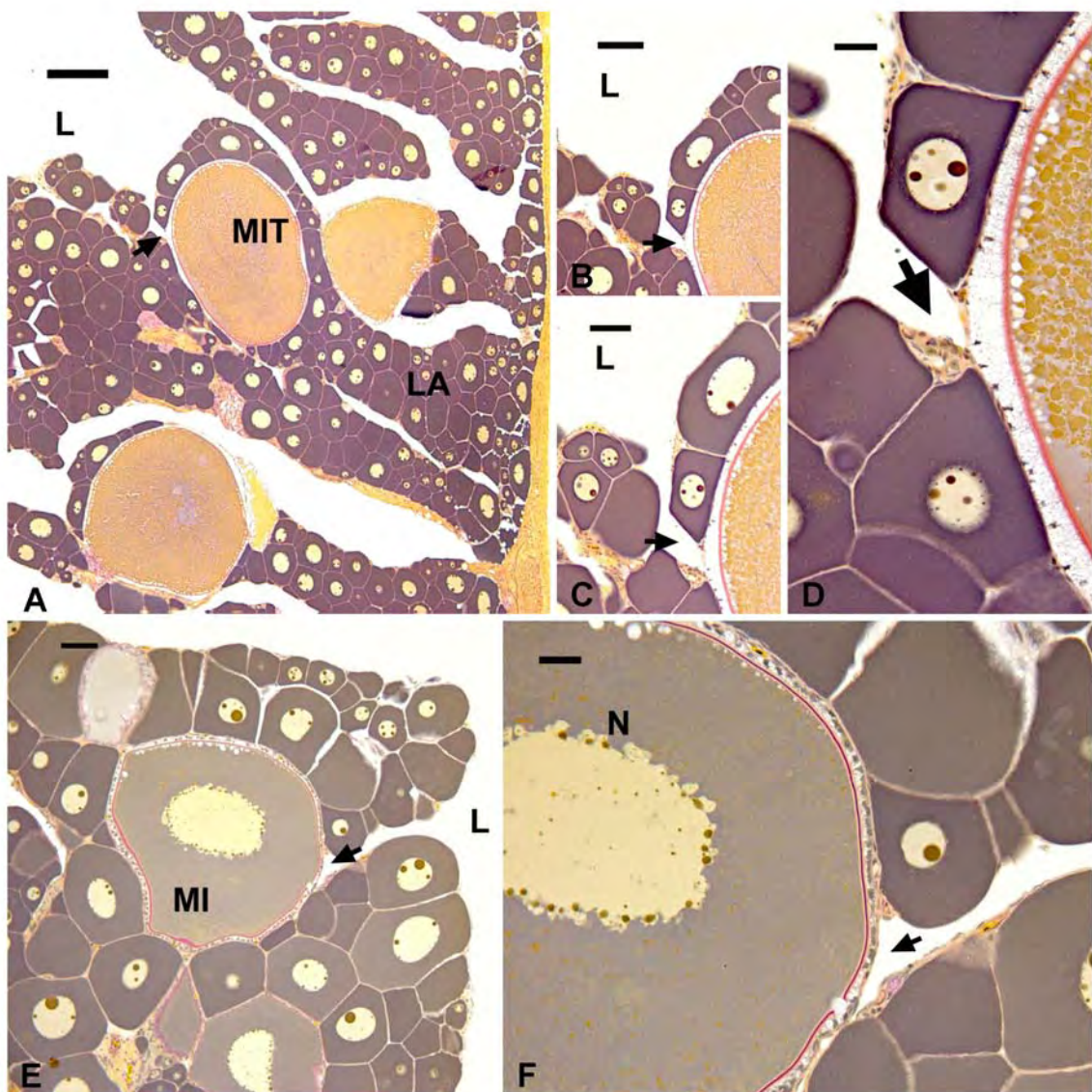
Figura 3



**Figura 4.** Contato do folículo com o epitélio germinativo feminino (MO)

**A:** Ovário em maturação intermediária (MIT), mostrando contato de oócito vitelogênico com o epitélio germinativo (seta); lúmen (L); lamela (LA); Barra = 200 $\mu$ m. **B – D:** Região de contato do oócito com o epitélio. Lúmen (L); região do contato (seta); **B:** Barra = 100 $\mu$ m, **C:** Barra = 50 $\mu$ m, **D:** Barra = 20 $\mu$ m. **E:** Ovário em maturação intermediária (MI); Região de contato do oócito pré-vitelogênico com a região do epitélio (seta); lúmen (L); Barra = 50 $\mu$ m. **F:** Região de contato do oócito pré-vitelogênico com a região do epitélio (seta); núcleo (N); Barra = 20 $\mu$ m.

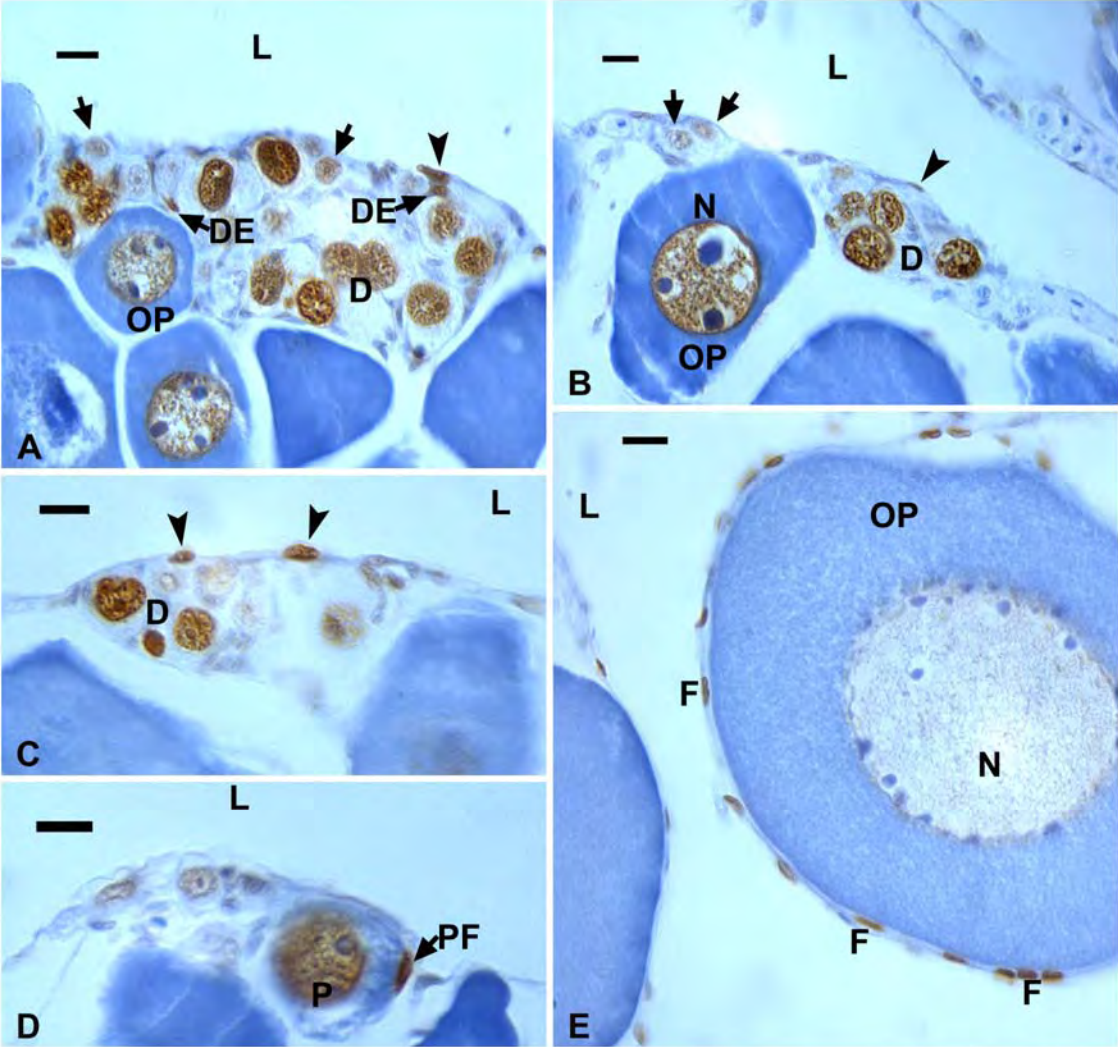
Figura 4



**Figura 5.** Proliferação celular das células somáticas e germinativas (PCNA)

**A - C:** Região de epitélio germinativo, indicando intensa proliferação celular. Lúmen (L); célula epitelial (cabeça de seta); oogônia (seta); células derivadas do epitélio (DE); oócitos diplotênicos (D); oócitos primários (OP); **A - C**, Barra = 10 $\mu$ m. **D:** Célula pré-folicular marcada pelo PCNA (PF); oócito primário (P); Barra = 10 $\mu$ m. **E:** Células foliculares(F) envolvendo um oócito primário (OP); núcleo (N); lúmen (L); Barra = 10 $\mu$ m.

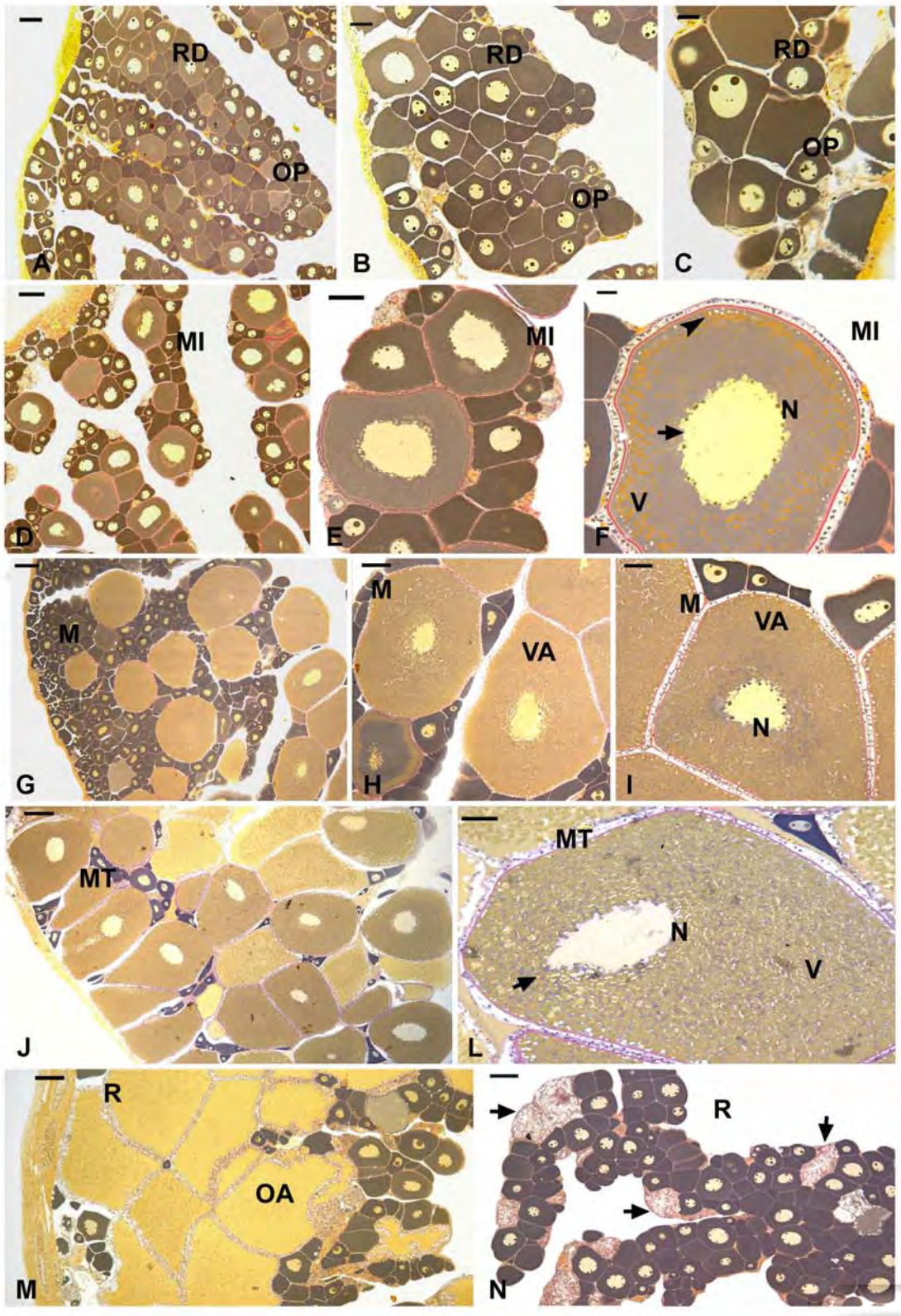
Figura 5



**Figura 6.** Classes reprodutivas (MO)

**A-C:** Secções histológicas de ovários regredidos (RD), apresentando lamelas contendo somente oócitos em crescimento primário (OP); **A:** Barra = 100µm, **B:** Barra = 50µm, **C:** Barra = 20µm. **D -F:** Secções histológicas de ovários em maturação inicial (MI); apresentando lamelas contendo oócitos pré-vitelogênicos. Início da formação dos alvéolos corticais (cabeça de seta); início de deposição de vitelo no citoplasma (V); núcleo (N) com contorno irregular (seta); **D:** Barra = 100µm, **E:** Barra = 50µm, **F:** Barra = 20µm. **G -I:** Secções histológicas de ovários em maturação intermediária (M); apresentando lamelas contendo oócitos em vitelogênese avançada (VA); **G:** Barra = 200µm, **H:** Barra = 10µm, **I:** Barra = 50µm. **J -L:** Secções histológicas de ovários em maturação tardia (MT); apresentando lamelas contendo principalmente oócitos em vitelogênese final; o núcleo (N); migrando para o pólo animal (seta); **J:** Barra = 200µm, **L:** Barra = 50µm. **M-N:** Secções histológicas de ovários em regressão (R); apresentando lamelas contendo principalmente oócitos em atresia inicial (AO) e/ou atresia finais (seta); **M -N:** Barra = 100µm.

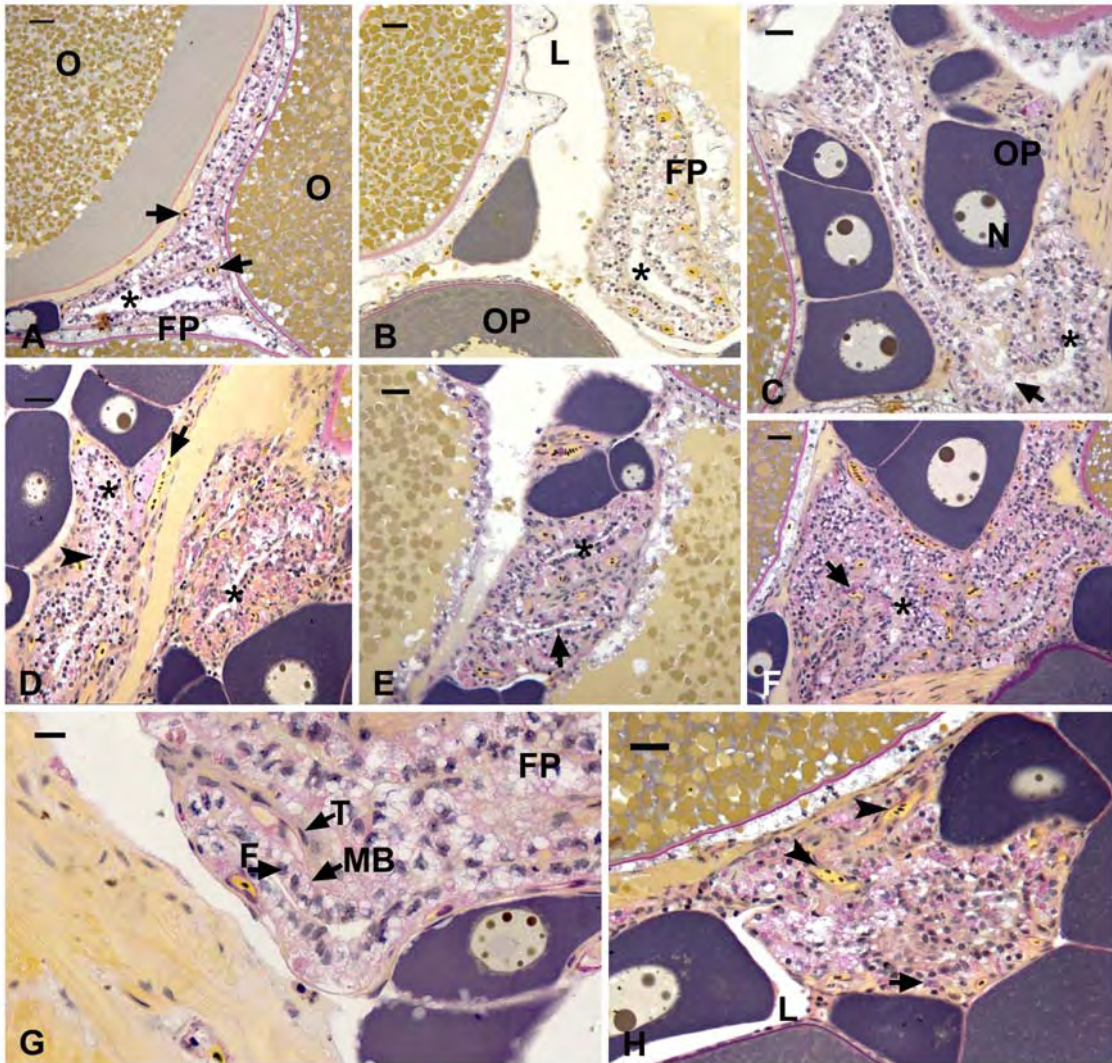
Figura 6



**Figura 7.** Folículos pós-ovulatórios (MO)

**A:** Folículo pós-ovulatório (FP); apresentando lúmen irregular (asterisco); hemácias (seta); oócitos (O); Barra = 20 $\mu$ m. **B:** Folículo pós-ovulatório (FP); lúmen (asterisco); oócito primário (OP); Barra = 20 $\mu$ m. **C:** Restos celulares (seta) no interior do lúmen (asterisco); oócitos primários (OP); núcleo (N); Barra = 20 $\mu$ m. **D:** Aumento de vasos sanguíneos (seta); lúmen (asterisco); núcleo da célula folicular em posição apical (cabeça de seta); Barra = 20 $\mu$ m. **E:** Núcleo da célula folicular em posição apical (seta); lúmen (asterisco); Barra = 20 $\mu$ m. **F:** Lúmen (asterisco); eosinófilos (seta); Barra = 20 $\mu$ m. **G:** Constituição do folículo pós-ovulatório (FP); célula folicular (F); membrana basal (MB); teca (T); Barra = 10 $\mu$ m. **H:** Folículo pós-ovulatório em fase avançada de regressão; contendo muitas hemácias (cabeça de seta) e eosinófilos (seta); Barra = 20 $\mu$ m.

Figura 7

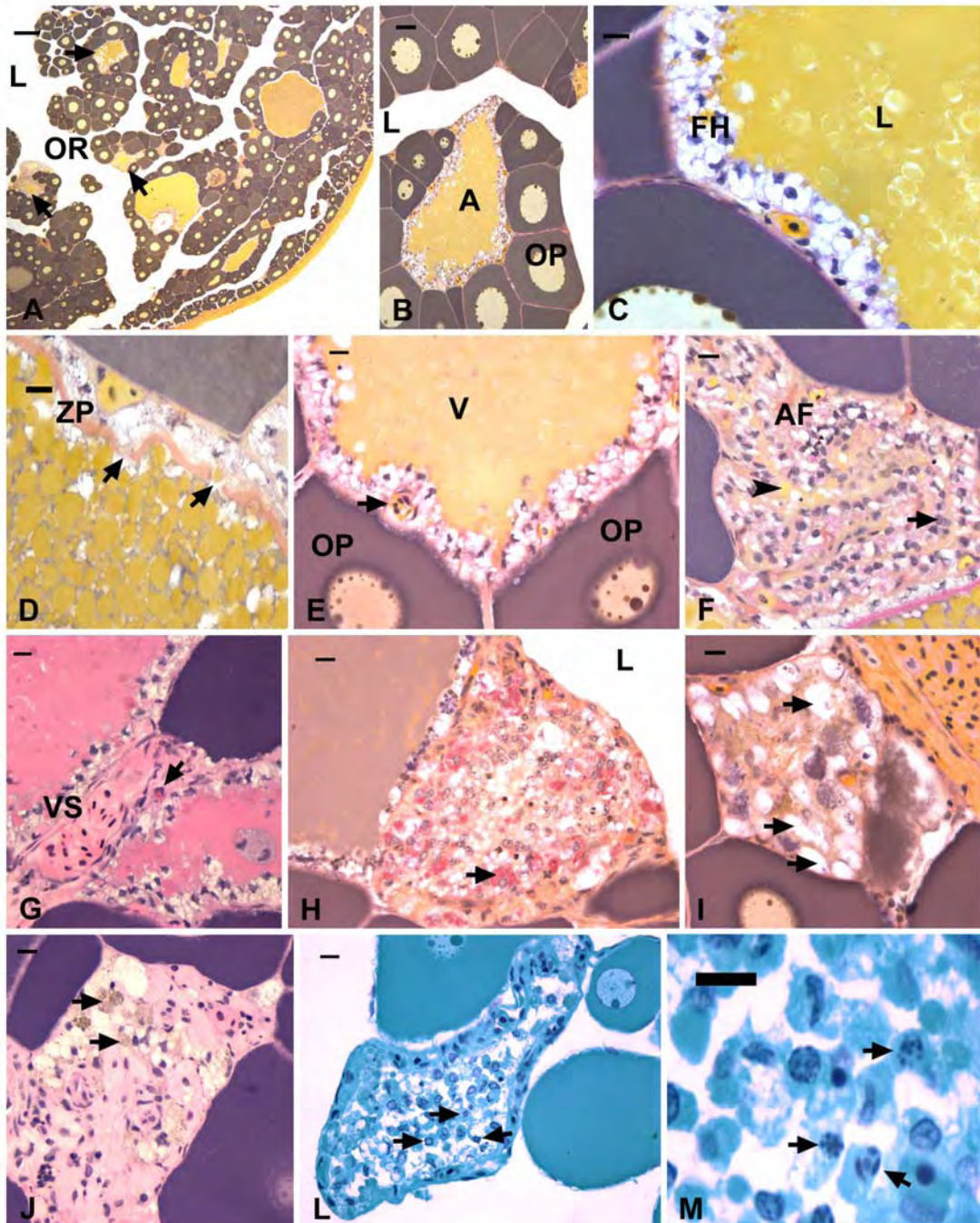


**Figura 8.** Atresia folicular (MO)

**A:** Ovário em regressão (OR); contendo vários oócitos atrésicos (seta); lúmen (L); Barra = 200 $\mu$ m. **B:** Lamela contendo oócitos primários (OP); e oócito vitelogênico em atresia (A); lúmen (L); Barra = 50 $\mu$ m. **C:** Citoplasma apresentando vitelo liquefeito (L), e células foliculares hipertrofiadas (FH), Barra = 10 $\mu$ m.

**D:** Fendas na zona pelúcida (seta), Barra = 10 $\mu$ m. **E:** Vitelo liquefeito (V); e aumento de vasos sanguíneos (seta); Barra = 20 $\mu$ m. **F:** Atresia folicular avançada (AF); restos de vitelo (cabeça de seta); célula folicular (seta); Barra = 20 $\mu$ m. **G:** Tecido conjuntivo ricamente vascularizado (VS); eosinófilos (seta); Barra = 10 $\mu$ m. **H:** Eosinófilos (seta) no interior dos folículos atrésicos; Barra = 20 $\mu$ m. **I:** Células foliculares com citoplasma preenchido por vesículas (seta); Barra = 10 $\mu$ m. **J:** Células foliculares contendo pigmento castanho amarelado (seta); Barra = 10 $\mu$ m. **L-M:** Núcleos apoptóticos nas etapas finais de absorção (seta); **L:** Barra = 10 $\mu$ m, **M:** Barra = 10 $\mu$ m.

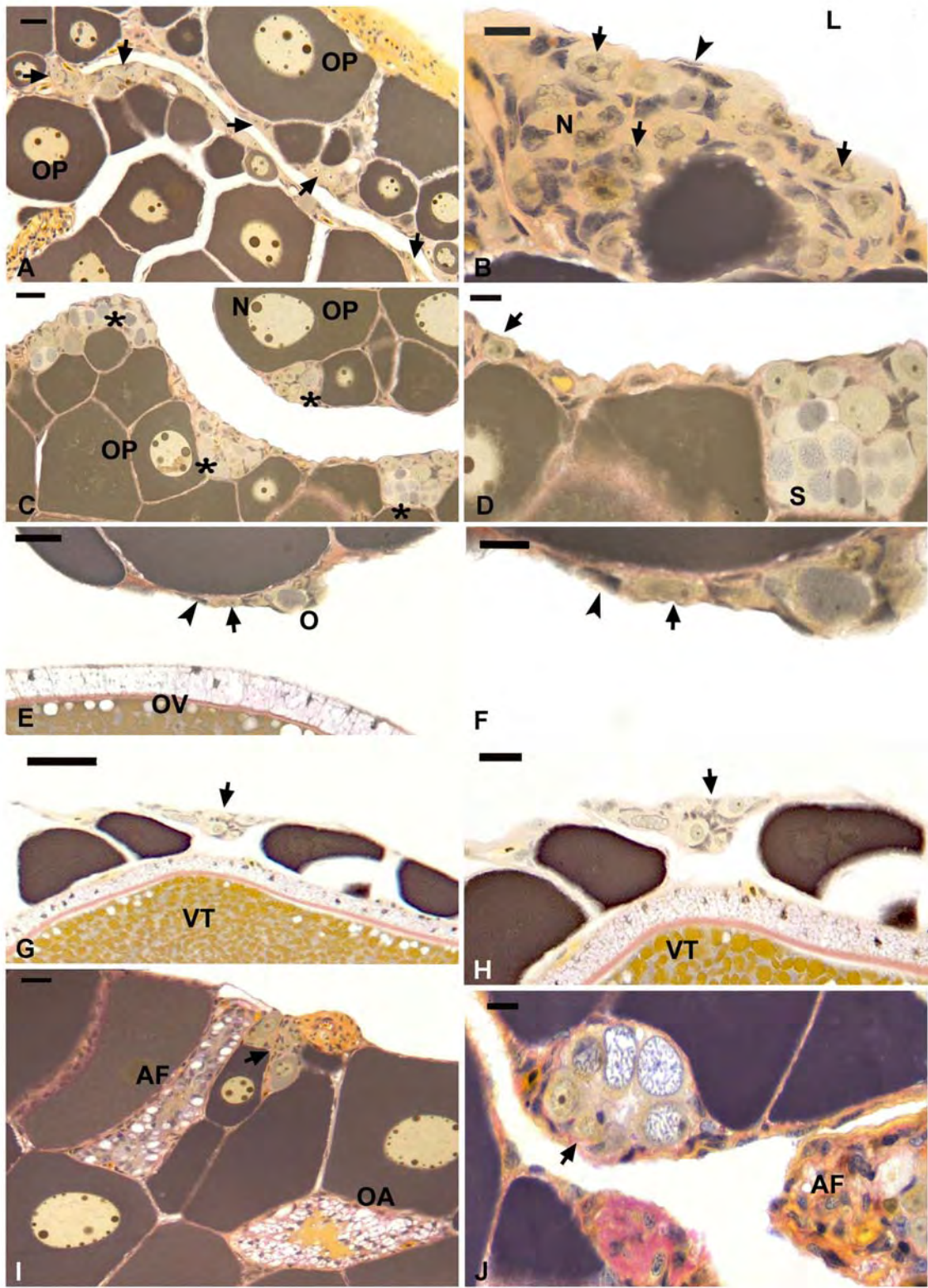
Figura 8



**Figura 9.** Classes reprodutivas X proliferação celular (MO)

**A-B:** Secções histológicas de ovários regredidos, com uma grande quantidade de oogônias no epitélio. **A:** Presença de oócitos primários (OP); e oogônias no epitélio (seta); Barra = 20µm. **B:** Ninho contendo oogônias (seta) e células epiteliais (cabeça de seta); lúmen (L); Barra = 10µm. **C-D:** Secções histológicas de ovários em maturação inicial. **C:** Presença de muitos sáculos/ninhos de oócitos (asterisco); e oócitos primários (OP); Barra = 20µm. **D:** Presença de oogônias (seta) isoladas no epitélio e sáculos/ninhos de oócitos (S); Barra = 10µm. **E-F:** Secções histológicas de ovários em maturação intermediária. **E:** Apresentando muitos oócitos em vitelogênese avançada (OV); e poucos oócitos iniciais (O); oogônias (seta) e células epiteliais (cabeça de seta); Barra = 20µm. **F:** Detalhes das células epiteliais (cabeça de seta) e oogônias (seta); Barra = 10µm. **G-H:** Secções histológicas de ovários em maturação tardia. Apresentando muitos oócitos em vitelogênese tardia (VT); poucos oócitos iniciais e oogônias (seta); **G:** Barra = 50µm, **H:** Barra = 20µm. **I-J:** Secções histológicas de ovários em regressão. **I:** Apresentando oócitos em atresia (AO); figuras de atresia final (AF); e alguns oócitos em início de crescimento primário (seta); Barra = 20µm. **J:** Detalhes de ninho contendo oócitos e oogônias (seta) e uma figura de atresia final (AF); Barra = 10µm.

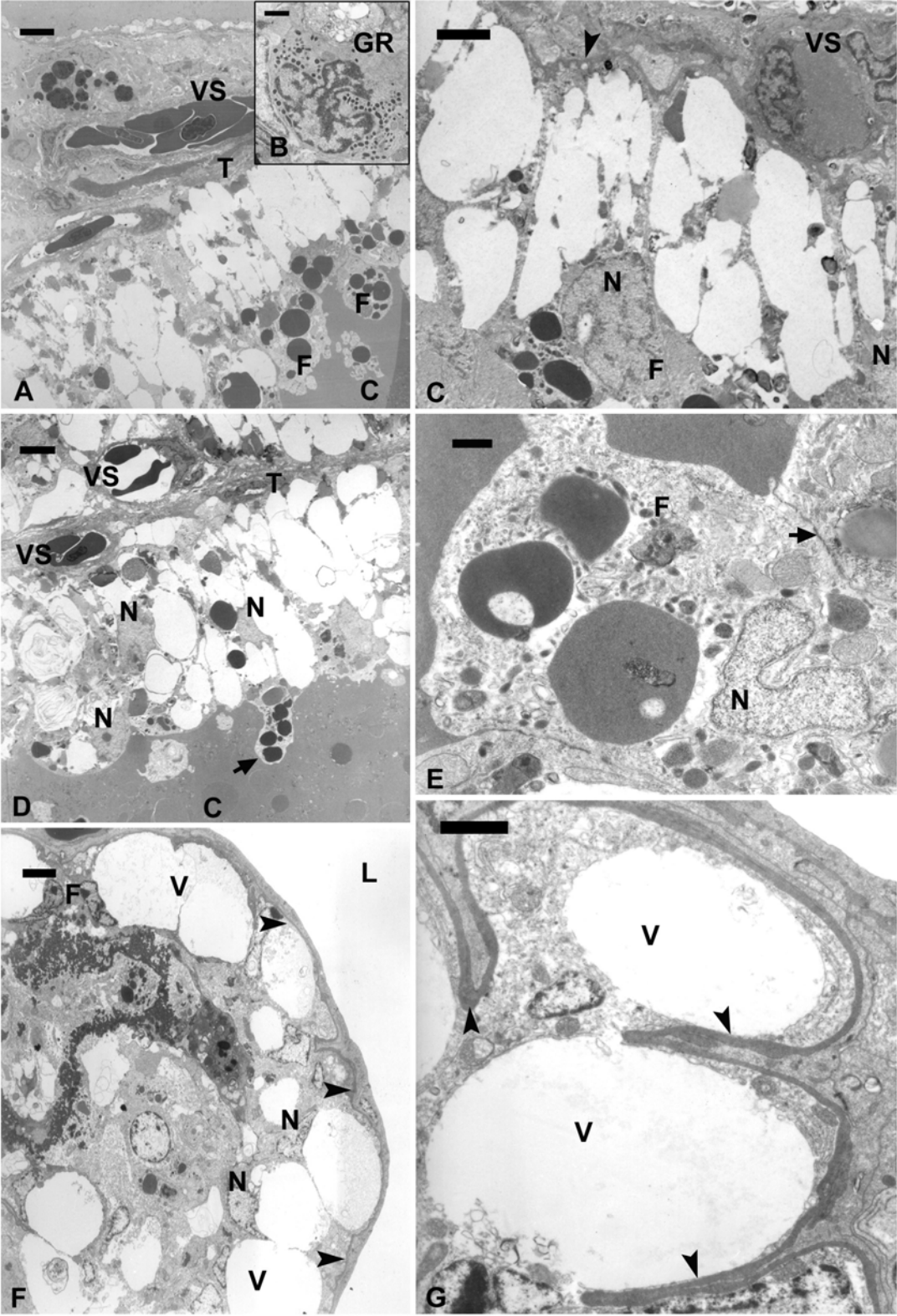
Figura 9



**Figura 10.** Atresia folicular (ME)

**A:** Célula folicular (F); citoplasma do oócito atrésico (C); vasos sanguíneos (VS); na região da teca (T); Barra: 4,08 $\mu$ m. **B:** Granulócito (GR); Barra: 1,02 $\mu$ m. **C:** Vaso sanguíneo (VS); membrana basal (cabeça de seta); núcleo (N) das células foliculares (F); Barra: 2,29 $\mu$ m. **D:** vasos sanguíneos (VS) na região da teca (T); núcleos (N) das células foliculares; citoplasma das células foliculares invadindo o interior do oócito (seta); Barra: 4,08 $\mu$ m. **E:** Célula folicular (F); núcleo (N); limite entre uma célula e outra (seta); Barra: 1,02 $\mu$ m. **F:** Células foliculares com citoplasma vacuolizado (V); membrana basal do folículo (cabeça de seta); núcleo da célula folicular (N); Barra: 4,08 $\mu$ m. **G:** citoplasma vacuolizado (V); membrana basal do folículo (cabeça de seta); Barra: 1,73 $\mu$ m.

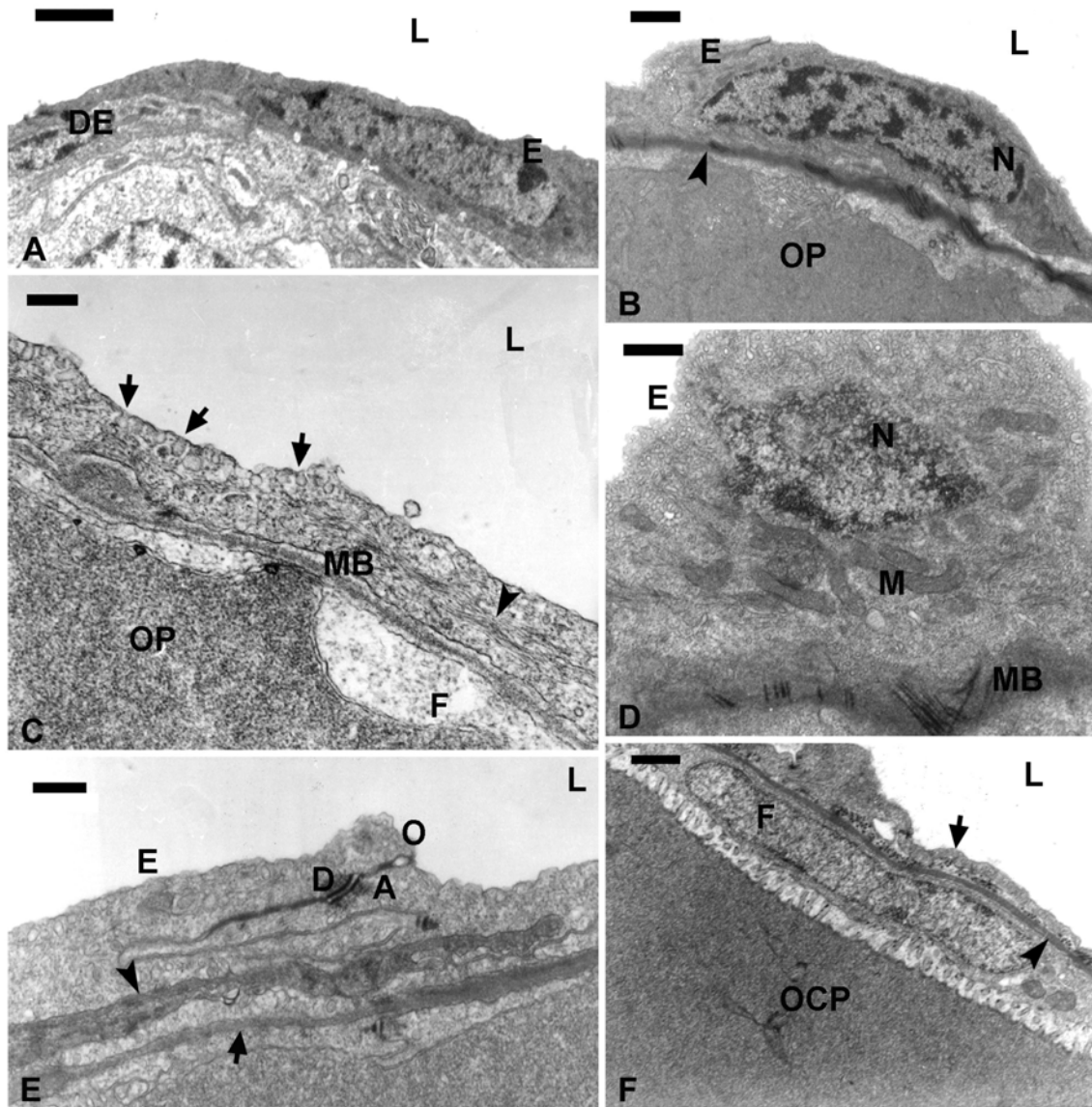
Figura 10



**Figura 11.** Células epiteliais e compartilhamento de membrana basal (ME)

**A:** Célula epitelial (E); célula derivada do epitélio (DE); lúmen (L); Barra = 2,29 $\mu$ m. **B:** Célula epitelial (E); membrana basal compartilhada pelo epitélio e pelo folículo (cabeça de seta); oócito primário (OP); lúmen (L); Barra = 1,29 $\mu$ m. **C:** Oócitos primário (OP); região de célula folicular (F); membrana basal compartilhada pelo folículo e pelo epitélio (MB); microfilamentos no citoplasma das células foliculares (cabeça de seta); cavéolas (setas); lúmen (L); Barra = 0,23 $\mu$ m. **D:** Célula epitelial (E); mitocôndrias da célula epitelial (M); membrana basal (MB); Barra = 0,58 $\mu$ m. **E:** Célula epitelial (E); desmossomos (D); junção de aderência (A); junção de oclusão (O); membrana basal do epitélio (cabeça de seta); membrana basal do folículo (seta); lúmen (L); Barra = 0,43 $\mu$ m. **F:** Oócito em crescimento primário (OCP); célula folicular (F); membrana basal (cabeça de seta); prolongamentos citoplasmáticos das células epiteliais (seta); lúmen (L); Barra = 0,75 $\mu$ m.

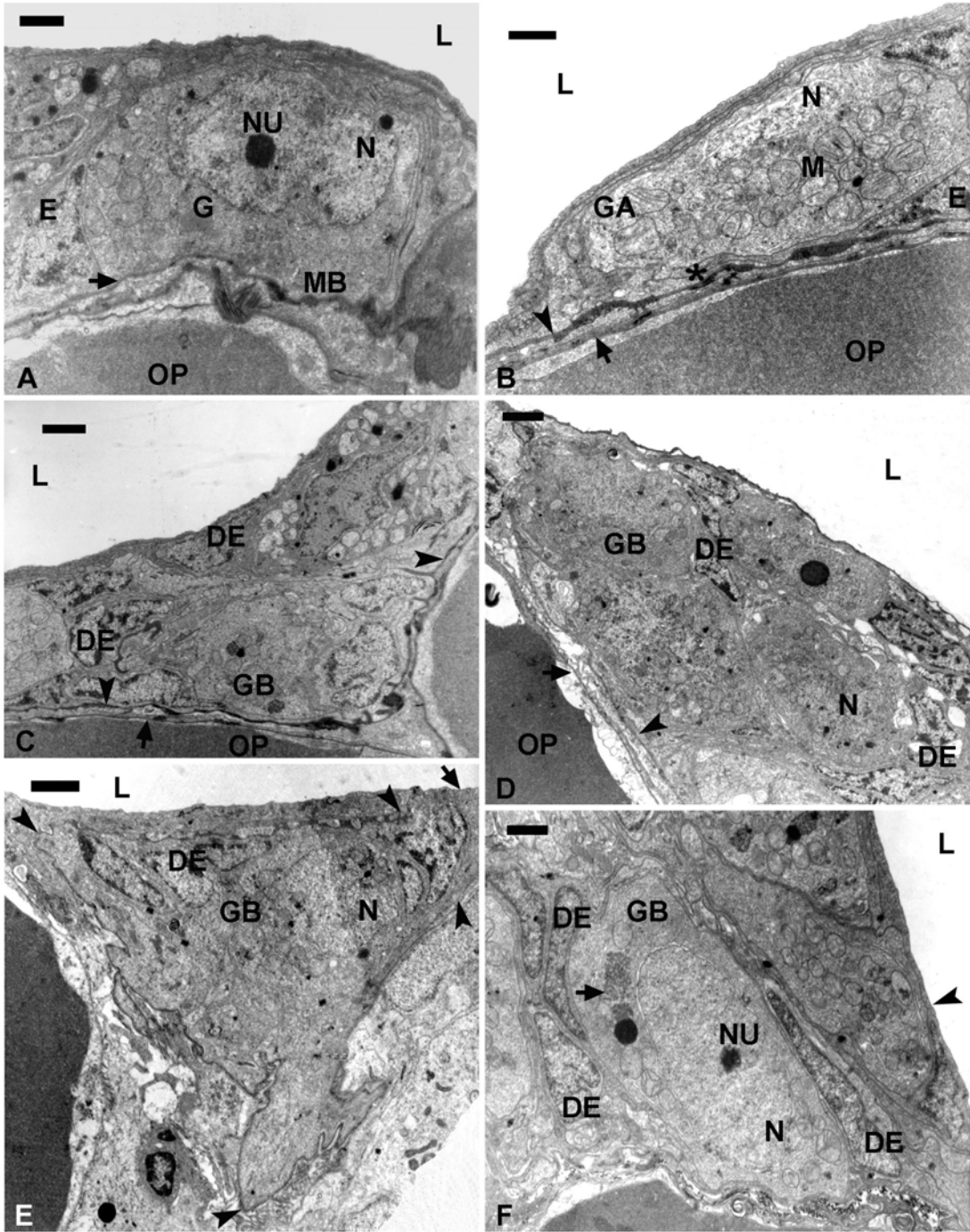
Figura 11



**Figura 12.** Foliculogênese (ME)

**A:** Oogônia (G) no epitélio em contato (seta) com a membrana basal (MB); núcleo (N); nucléolo (NU); célula epitelial (E); lúmen (L); Barra = 1,29 $\mu$ m. **B:** Oogônia do tipo A (GA) envolta por prolongamentos (asterisco) das células epiteliais (E); membrana basal do folículo (seta); membrana basal do epitélio (cabeça de seta); núcleo da oogônia (N); mitocôndrias (M); Barra = 1,02 $\mu$ m. **C:** oogônias do tipo B (GB); acima da membrana basal (cabeça de seta); entremeadas por células derivadas do epitélio (DE); membrana basal do folículo (seta); lúmen (L); Barra = 1,73 $\mu$ m. **D:** Proliferação de oogônias no epitélio. Oogônias do tipo B (GB); células derivadas do epitélio (DE); núcleo das oogônias (N); membrana basal do epitélio (cabeça de seta); membrana basal (seta) do folículo (OP); lúmen (L), Barra = 2,29 $\mu$ m. **E:** Ninho de oogônias do tipo B (GB); delimitado pela membrana basal (cabeça de seta) das células derivadas do epitélio (DE); epitélio germinativo na borda da lamela ovígera (seta); lúmen (L); Barra = 2,29 $\mu$ m. **F:** Oogônias do tipo B (GB); sendo envolta (encistada) por células derivadas do epitélio (DE); núcleo da oogônia (N); nucléolo (NU); nuage (seta); prolongamentos citoplasmáticos das células epiteliais envolvendo as oogônias (cabeça de seta); lúmen (L); Barra = 1,29 $\mu$ m.

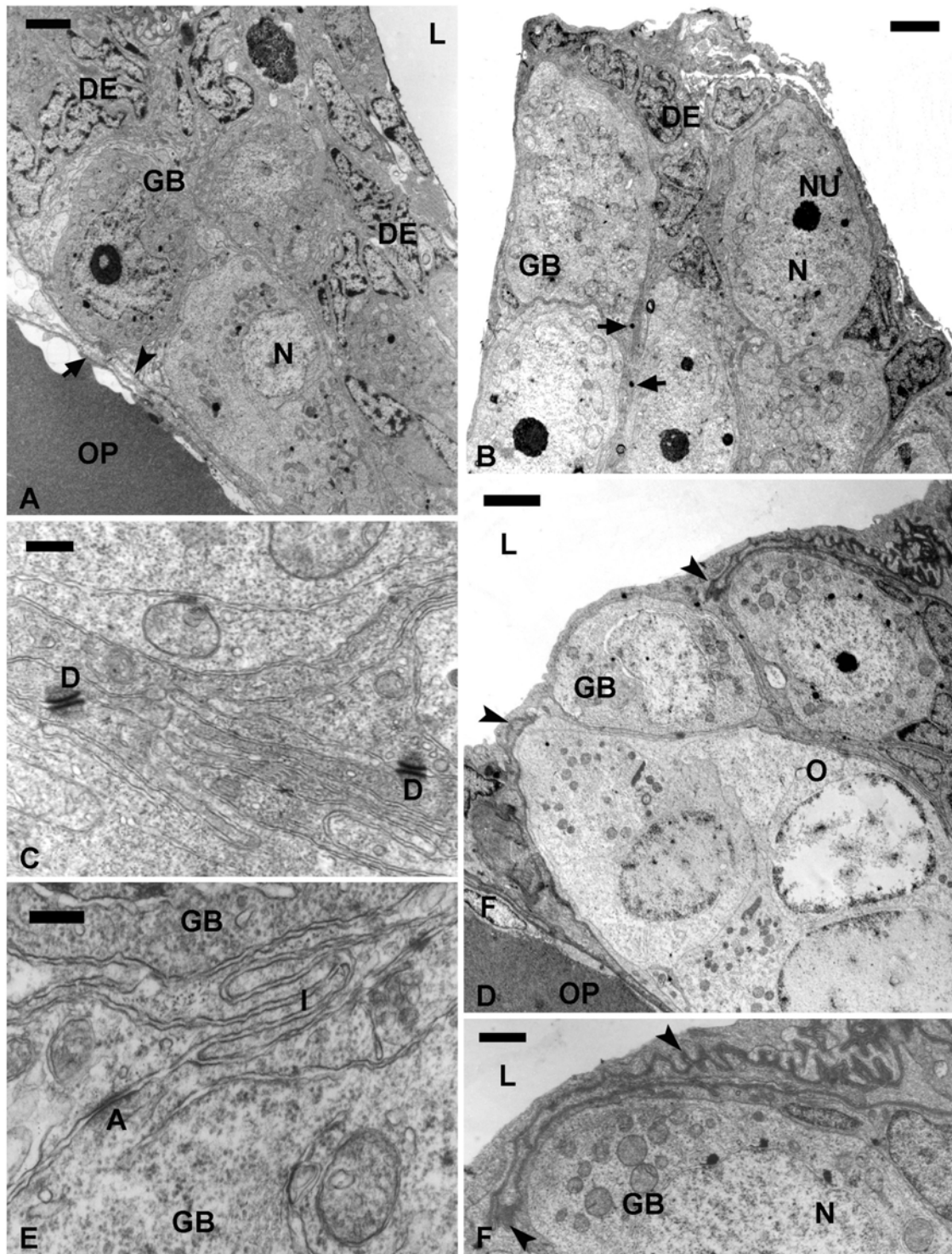
Figura 12



**Figura 13.** Foliculogênese em (ME)

**A:** Oogônias do tipo B (GB); e células derivadas do epitélio (DE); formando um ninho acima da membrana basal do epitélio (cabeça de seta); núcleo da oogônia (N); membrana basal (seta) do folículo contendo um oócito primordial (OP); lúmen (L); Barra = 2,29 $\mu$ m. **B:** ninho de oogônias do tipo B (GB); células derivadas do epitélio (DE); desmossomos unindo as células derivadas do epitélio situadas entre as oogônias (seta); núcleo (N) e nucléolo (NU) da oogônia; Barra = 2,29 $\mu$ m. **C:** detalhe dos desmossomos (D); Barra = 0,31 $\mu$ m. **D:** Oogônias do tipo B (GB); oócito (O); membrana basal das células limitantes do ninho (cabeça de seta); célula folicular (F); oócito primário (OP); lúmen (L); Barra = 3,07 $\mu$ m. **E:** Junções de aderência (A) e interdigitações (I) das células derivadas do epitélio situadas entre as oogônias do tipo B (GB); Barra = 0,23 $\mu$ m. **F:** Detalhe da membrana basal (cabeça de seta) das células limitantes do ninho (cabeça de seta); núcleo (N); Lúmen (L); Barra = 1,29 $\mu$ m.

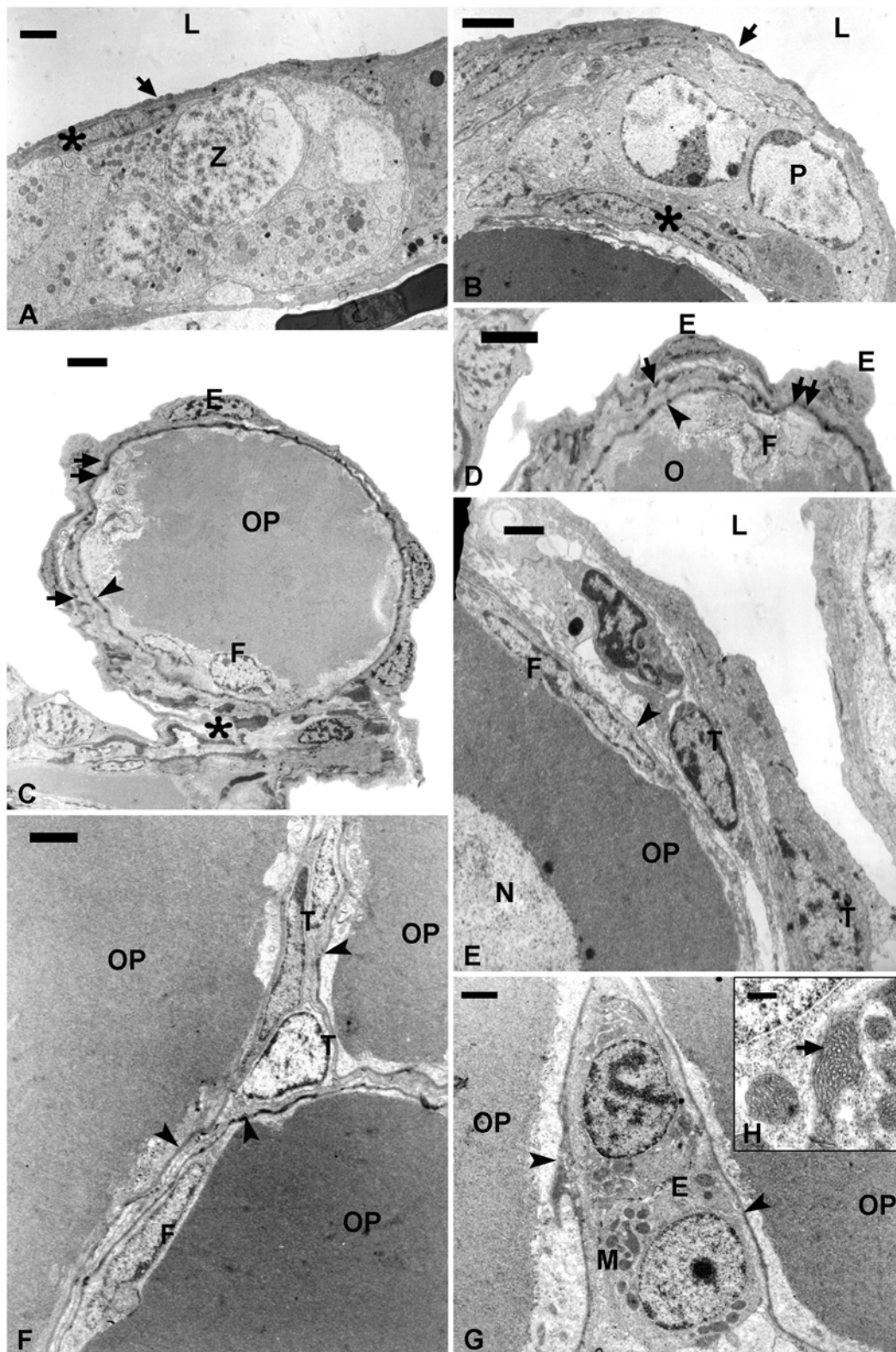
Figura 13



**Figura 14.** Foliculogênese (ME)

**A:** Célula limitante do sáculo/ninho (asterisco); prolongamentos citoplasmáticos das células epiteliais (seta); oócito zigotênico (Z); lúmen (L); Barra = 2,29 $\mu$ m. **B:** Célula limitante de sáculo (asterisco); oócito primordial (P); célula epitelial (seta); lúmen (L); Barra = 2,29 $\mu$ m. **C:** Oócito primário (OP); célula folicular (F); membrana basal do oócito (cabeça de seta); membrana basal do epitélio (seta), compartilhamento de membrana basal (dupla seta); célula epitelial (E); região do estroma (asterisco); Barra = 4,08 $\mu$ m. **D:** Célula epitelial (E); célula folicular (F); oócito (O); compartilhamento de membrana basal (dupla seta); Barra = 4,08 $\mu$ m. **E:** Oócito primário (OP); Núcleo (N); célula folicular (F); membrana basal do folículo (seta); teca (T); Barra = 1,29 $\mu$ m. **F:** Oócito primário (OP); célula folicular (F); membranas basais dos oócitos (cabeça de seta); teca (T); Barra = 1,02 $\mu$ m. **G:** Célula esteróidogênica (E); mitocôndrias (M); oócito primário (OP); membrana basal do folículo (cabeça de seta); Barra = 1,29 $\mu$ m. **H:** Detalhe das mitocôndrias das células esteróidogênicas, apresentando cristas tubulares (seta); Barra = 0,23 $\mu$ m.

Figura 14



## *Discussão*

## 8. DISCUSSÃO

Na última década, estudos desenvolvidos por Grier e seus colaboradores (GRIER & TAYLOR, 1998; GRIER & LO NOSTRO, 2000; GRIER, 2000; 2002) têm conduzido à reelaboração do conceito de epitélio germinativo, o qual permanentemente ativo é a fonte de renovação celular, tanto germinativa quanto somática, que garante e sustenta a continuidade da gametogênese (masculina e feminina) nos peixes. Apesar de ter sido desenvolvido inicialmente para os machos, o conceito também se aplica às fêmeas dos Teleostei (GRIER, 2000; GRIER et al., 2005). Desta forma, a redefinição do epitélio germinativo nas suas bases celulares tem sido decisiva na compreensão dos fenômenos cíclicos que regem o desenvolvimento gonadal ao longo da vida reprodutiva dos Teleostei, inclusive daqueles em que ocorre reversão de sexo (LO NOSTRO et al., 2003).

Ao descrever o epitélio germinativo feminino de *Centropomus undecimalis* (Teleostei: Centropomidae), Grier (2000) demonstra que a produção ilimitada de oócitos nas fêmeas dos Teleostei deve-se à constante proliferação das oogônias situadas de forma descontínua entre as células epiteliais da lamela ovígera. As oogônias podem individualmente evoluir para meiose, ou em grupos podem a um só tempo entrar em meiose formando ninhos de oócitos (GRIER, 2000). Os oócitos diplotênicos no epitélio são envoltos gradativamente por células do próprio epitélio, as células pré-foliculares, que ao sintetizarem a membrana basal segregam o oócito que por sua vez mergulha no estroma ovariano. No estroma, o complexo folicular é formado quando o oócito e sua camada circundante de células foliculares são envoltos por células de origem mesenquimal, as células da teca. Dados recentes em *Ilyodon whitei*, um Cyprinodontiformes vivíparo, pertencente à família Goodeidae (GRIER et al., 2005), demonstram que na realidade os ninhos de oócitos e posteriormente os oócitos individuais permanecem conectados ao

epitélio, com o qual compartilham certa extensão da membrana basal. A região de compartilhamento mantém-se ao longo de todo o desenvolvimento oocitário, e no caso dos peixes ovíparos, corresponde ao local de saída do oócito no momento da desova.

Com base na redefinição do epitélio germinativo, a foliculogênese em *P. maculatus*, em linhas gerais, transcorre como descrita pelos autores supra citados. No entanto, o processo ainda que de aparente aplicação universal, pode ter suas particularidades nos diversos grupos de peixes Teleostei. Em *P. maculatus*, as oogônias isoladas ou em grupos nunca fazem contato direto com o lúmen ovariano, isto é, estão sempre envoltas pelas células epiteliais. Quando não envoltas totalmente, as oogônias assentam diretamente sobre a membrana basal, e em proliferação formam agregados celulares acima da membrana basal (GRIER, 2000). Células derivadas do epitélio, cuja movimentação gera um intenso polimorfismo, invadem esses agregados, emitem processos citoplasmáticos os quais envolvem e individualizam as oogônias, formando verdadeiros cistos, como no epitélio germinativo masculino dos peixes (GRIER, 1981; 2002; BILLARD, 1986; PUDNEY, 1995; GURAYA, 2001).

O número de oócitos iniciais encontrados nos ninhos sugere que em *P. maculatus* as oogônias individuais passam por, no mínimo, 2, 3 ou talvez 4 ciclos mitóticos antes de avançarem, sincronicamente, pelas várias fases da prófase I da meiose. A evolução simultânea das células germinativas dentro de um mesmo espermatocisto (cisto) é uma característica peculiar do desenvolvimento das células germinativas masculinas dos peixes. Nos machos, células germinativas oriundas da mesma espermatogônia mantêm-se conectadas por pontes citoplasmáticas. Supõe-se que as pontes citoplasmáticas sejam responsáveis pelo desenvolvimento sincrônico das células germinativas masculinas, seja nos peixes ou em outros grupos de animais (FAWCETT et

al., 1959; GRIER, 1976; BILLARD, 1984; SILVEIRA et al., 1990; GUSMÃO et al., 2002; NEGRÃO et al., 2002). Portanto o mesmo esperar-se-ia ocorrer com os oócitos nos ninhos, no caso de serem provenientes de uma mesma oogônia. Apesar de não documentado em *P. maculatus*, a comunicação citoplasmática entre oócitos zigotênicos contidos num mesmo ninho pode ser vista em *Serrasalmus spilopleura*, um outro Ostariophysii, pertencente à ordem Characiformes (GUIMARÃES & QUAGIO-GRASSIOTTO, 2001).

A maneira pela qual os oócitos deixam os ninhos e formam os folículos não está ainda bem clara. Entretanto as imagens registradas em *P. maculatus* e as de Grier e colaboradores (2005), em *Ilyodon whitei*, sugerem fortemente que não há uma invasão dos ninhos por células derivadas do epitélio, como descrito anteriormente pelo mesmo autor (GRIER, 2000). Nessa última espécie, os oócitos diplotênicos que iniciam o crescimento primário são gradualmente envoltos pelas células que fazem o limite dos ninhos, num movimento de fora para dentro, formando desta maneira o folículo ovariano, o qual permanece conectado ao epitélio da lamela através de uma certa extensão da membrana basal. Considerando todos os oócitos de um mesmo ninho, este mesmo movimento poderia explicar o crescimento em extensão das lamelas ovíferas.

No interior dos ninhos de *P. maculatus*, no transcurso das fases iniciais da prófase I da meiose, não existe documentação de células pré-foliculares (sensu GRIER, 2000) entre os oócitos. Portanto, as futuras células foliculares, numa via seqüencial, seriam oriundas da proliferação das células limitantes dos cistos que por sua vez seriam provenientes da proliferação das células que envolveram as oogônias e, estas sim teriam origem diretamente da proliferação das células epiteliais (nossos dados de PCNA). No estroma, à exceção da região que compartilha com o epitélio, o folículo é circundado pelas células da teca (GRIER et al., 2005). As células da teca resultam da diferenciação das células

mesenquimais presentes no estroma (GRIER, 2002). Nas fases iniciais da organização do complexo folicular, células com características esteroidogênicas surgem entre as células da teca de *P. maculatus*. Essas células apresentam retículo endoplasmático liso desenvolvido e cristas mitocôndrias tubulares, à semelhança das células de Leydig presentes no tecido intersticial dos testículos dos machos (PUDNEY, 1996; GURAYA, 2001). Células com essas características também foram detectadas entre as células da teca de *S. spilopleura* (GUIMARÃES & QUAGIO-GRASSIOTTO, 2003). Seja em *P. maculatus*, ou em *S. spilopleura*, estas células não apresentam gotas de lipídio. Característica que repete nos machos dessas mesmas espécies, nos quais as células de Leydig também não apresentam gotas de lipídio (NÓBREGA, 2006; NÓBREGA & QUAGIO-GRASSIOTTO, 2007). Células da teca com características esteroidogênicas vêm sendo documentadas desde os taxa mais basais até os mais derivados de Teleostei, como em Cypriniformes (NAGAHAMA et al., 1976; ÜNAL et al., 2005), Salmoniformes (NAGAHAMA et al., 1978; KAGAWA et al., 1981; NAGAHAMA et al., 1982) e Perciformes (MATSUYAMA et al., 1991). O envolvimento destas células na produção dos hormônios esteroidogênicos ovarianos, no entanto, continua controversa (NAGAHAMA et al., 1976; NAGAHAMA et al., 1978; KAGAWA et al., 1981; NAGAHAMA et al., 1982; MATSUYAMA et al., 1991; ÜNAL et al., 2005).

O desenvolvimento dos oócitos em *P. maculatus* ocorre conforme o padrão geral descrito para os Teleostei (para revisão, ver SELMAN & WALLACE, 1989; TYLER & SUMPTER, 1996; PATIÑO & SULLIVAN, 2002) e, em particular, para os Siluriformes do grande grupo neotropical da antiga família Pimelodidae (OLIVEIRA-JÚNIOR, 2002; RIBEIRO, 2002; BRITO & BAZZOLI, 2003; BARROS, 2006; SANTOS et al., 2006). Diferentemente das espécies de Teleostei marinhos, na grande maioria das espécies de água

doce não ocorre deposição de lipídios durante o crescimento primário e tampouco ocorre a fusão e a proteólise dos grânulos de vitelo que precedem à ovulação (SELMAN & WALLACE, 1989; TYLER & SUMPTER, 1996; PATIÑO & SULLIVAN, 2002). Uma característica dos folículos de *P. maculatus* são as células foliculares que ao final da vitelogênese apresentam citoplasma vacuolizado e, tornam-se cilíndricas e muito altas à semelhança do que ocorre em *Iheringichthys labrosus* (SANTOS et al., 2006). O conteúdo dos vacúolos, ou grandes vesículas (SANTOS et al., 2006), e sua resposta à técnicas específicas de coloração em *P. maculatus*, permite supor que sintetizem moléculas glicídicas ricas em polissacarídeos sulfatados. A atresia folicular e a regressão dos folículos pós-ovulatórios em *P. maculatus*, também, comportam-se morfológicamente como descrito por diferentes autores (BARLEY, 1933; GURAYA, 1968; LAMBERT, 1970; SAIDAPUR, 1978; VAN DEN HURK & PEUTE, 1979,1985; LANG, 1981a; LANG, 1981b; NAGAHAMA, 1983; GOLDBERG et al., 1984; GURAYA, 1986; SELMAN & WALLACE, 1989; VIZZIANO & BEROIS, 1990; VAN NASSAUW & CALLEBAUT, 1991; BESSEAU & FALIEX, 1994; FITZHUGH & HETTLER, 1995; RIZZO & BAZZOLI, 1995; BAZZOLI E RIZZO, 1995; DRUMMOND, 1996; MIRANDA et al., 1999; BROMLEY et al., 2000; WOOD & VAN DER KRAAK, 2002,2003; BENJAMIM, 2004) e como demonstrado recentemente (DRUMMOND et al., 2000; SANTOS et al., 2005) é apoptose dependente.

Em *P. maculatus*, como esperado, a foliculogênese ocorre ao longo de todo o ciclo reprodutivo. Oogônias e células epiteliais proliferam por mitose. As oogônias, envoltas pelas células derivadas do epitélio (pré-foliculares), dividem novamente por mitose antes de entrarem em meiose. A partir dos ninhos de oócitos surgem os folículos que ao serem envoltos pelas células da teca, formam os complexos foliculares. Nos folículos recém

formados, as células pré-foliculares, agora denominadas de células foliculares, continuam proliferando por mitose para acompanhar o crescimento posterior dos oócitos (nossos dados de PCNA). Uma série de eventos sincronizados ocorre no interior dos complexos foliculares, como: 1) crescimento primário dos oócitos; 2) vitelogênese; 3) maturação dos oócitos; 4) ovulação, que consiste na saída do oócito do complexo folicular para o lúmen ovariano; e 5) regressão da camada de células foliculares que permanecem nas lamelas após o processo de ovulação. Os ovócitos maduros remanescentes e que não tiveram sucesso na ovulação entram em atresia e são absorvidos.

Com base na alternância do epitélio germinativo entre os estados contínuo e descontínuo e no tipo de célula germinativa presente, 5 classes reprodutivas são definidas durante o ciclo reprodutivo dos machos dos Teleostei: regredida, maturação inicial, intermediária e final, e regressão (GRIER & TAYLOR, 1998; GRIER, 2002; LO NOSTRO et al., 2003). O conceito de epitélio germinativo contínuo e descontínuo refere-se à distribuição dos cistos contendo as células germinativas que varia de contínua ou descontínua sobre a membrana basal conforme a época do ciclo reprodutivo (GRIER & TAYLOR, 1998; GRIER, 2002). Diferentemente dos machos, o epitélio germinativo das fêmeas dos Teleostei, cuja atividade é constante ao longo de todo o ciclo reprodutivo, não se presta à definição de classes reprodutivas. Conseqüentemente as classes reprodutivas das fêmeas são definidas com base nos estágios de desenvolvimento dos oócitos.

Em *P. maculatus*, os estágios de desenvolvimento oocitário associados à presença de folículos pós-ovulatórios e oócitos atrésicos nas lamelas foram os critérios utilizados na determinação das classes reprodutivas, à semelhança do descrito em *C. undecimalis* (Perciformes: Centropomidae) (TAYLOR et al., 1998). Além de testar a aplicabilidade do epitélio germinativo (GRIER, 2002), a determinação das classes reprodutivas em *P.*

*maculatus* teve por finalidade estabelecer a relação entre a condição ovariana e a foliculogênese. Os dados obtidos mostram que apesar da formação constante dos folículos ovarianos ao longo de todo o ciclo reprodutivo de *P. maculatus*, a foliculogênese torna-se particularmente intensa ao final da regressão, mantém assim nos ovários regredidos, continua em menor intensidade durante a maturação inicial e intermediária e torna-se muito discreta na maturação final (nossos resultados com PCNA). Os dados encontram correspondência naqueles existentes para os machos dos Teleostei (GRIER & TAYLOR, 1998; GRIER, 2002), inclusive para os próprios machos de *P. maculatus* (NÓBREGA, 2006), nos quais a atividade do epitélio germinativo é intensa na regressão, momento em que, os testículos são repovoados através da proliferação das espermatogônias e das células de Sertoli, mantém-se em menor intensidade ao longo do ciclo e é muito discreta nos testículos em maturação final.

## *Conclusões*

## 9. CONCLUSÕES

A foliculogênese em *P. maculatus*, em suas fases iniciais é muito similar ao processo de proliferação gonial que ocorre nos machos dos Teleostei. A proliferação das oogônias ocorre no epitélio, sempre acima da membrana basal, e forma conjuntos celulares ou ninhos. Células derivadas do epitélio invadem os ninhos e envolvem as oogônias formando um tipo de cisto. Nos cistos a oogônias podem entrar diretamente em meiose dando origem aos oócitos e conseqüentemente aos folículos, ou nos cistos podem passar por 1, 2 ou mais ciclos mitóticos formando sáculos/ninhos. Difere da espermatogênese cística dos machos no momento da formação dos folículos quando as células limitantes (pré-foliculares) dos cistos/sáculos envolvem os oócitos diplotênicos, individualizando-os.

Desde sua formação os ninhos de oogônias e os cistos/sáculos de oócitos sempre mantêm uma região de contato com o epitélio germinativo com o qual compartilha a membrana basal. Da mesma forma os folículos ovarianos sempre mantêm uma região compartilhamento de membrana basal com o epitélio germinativo, facilitando assim a saída do oócito maduro em direção ao lúmen ovariano na ocasião de desova.

As células somáticas epiteliais, desde sua origem no epitélio, quando em associação com oócitos em crescimento primário, já como células foliculares, mantêm sua atividade mitótica acompanhando o crescimento dos oócitos. A proliferação das células limitantes dos cistos pode ainda responder pela incorporação dos folículos diretamente ao epitélio das lamelas, levando a um aumento na extensão do epitélio germinativo e conseqüentemente das próprias lamelas ovígeras.

O desenvolvimento dos oócitos em *P. maculatus*, respeitado o fato de que se trata de uma espécie de água doce, a atresia folicular e a regressão dos folículos pós-ovulatórios comportam-se morfológicamente como descrito na literatura.

As oogônias presentes no epitélio germinativo feminino proliferam durante todo o ciclo reprodutivo, porém a proliferação das células germinativas torna-se mais intensa ao final da regressão, mantém-se nos ovários regredidos, continua em menor intensidade durante a maturação inicial e intermediária e torna-se muito discreta na maturação final assim como nos próprios machos de *P. maculatus*.

## *Referências Bibliográficas*

## 10. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABASCAL, F.J.; MEDINA, A. Ultrastructure of oogenesis in the Bluefin Tuna, *Thunnus Thynnus*. **J. Morphol.**, v.264, p.149-160, 2005.
- ABRAHAM, M.; HILGE, V.; LISON, S.; TIBIKA, H. The cellular envelope of oocytes in teleosts. **Cell. Tissue. Res.**, v.235, p.403-410, 1984.
- AMANZE, D.; IYVENGAR, A. The micropyle: a sperm guidance system in teleost fertilization. **Development.**, v.109, p. 495-500, 1990.
- ANDERSON, E. The formation of the primary envelop during oocyte differentiation in teleosts. **J. Cell Biol.**, v.35, p.193-212, 1967.
- ANDERSON, E. Cortical alveoli formation and vitellogenesis during oocyte differentiation in pipefish, *Syngnathus fuscus*, and killifish, *Fundulus heteroclitus*. **J. Morphol.**, v.125, p.23-60, 1968.
- BARLEY, R.J. The ovarian cycle in the viviparous teleost *Xiphophorus helleri*. **Biol. Bull.**, v.64, p.206-225, 1933.
- BARROS, M.D.M. 2006. **Morfologia gonadal e gametogênese de** *Lophiosilurus alexandri* Steindachner, 1877 (Siluriformes: Pseudopimelodidae) **do rio Santo Antônio, bacia do rio Doce, Joanésia, Minas Gerais, Brasil**. Dissertação de Mestrado. Programa de Pós-Graduação em Zoologia de Vertebrados da PUC Minas, Belo Horizonte.
- BAZZOLI, N.; CANGASSU, L.C.V.; RIZZO, E.; SANTOS, G.B. Reprodução e desova de mandis *Pimelodus maculatus* e *Iheringichthys labrosus* (Pisces, Pimelodidae) nos reservatórios de Furnas, Marimbondo e Itumbiara. **BIOS, Cadernos do Departamento de Ciências Biológicas da PUC Minas**, v. 5, n. 5, p.7-15, 1997.

- BAZZOLI, N.; RIZZO, E. A comparative cytological and cutochemical study of the oogenesis in ten Brazilian teleost fish species. **Eur.Arch. Biol.**, v.101,p.399-410, 1990.
- BAZZOLI, N.; GODINHO, H.P. Cortical alveoli in the oocytes of the freshwater neotropical teleost fish. **Boll. Zool.**, v.61,p.301-308, 1994.
- BAZZOLI, N.; RIZZO, E. Reabsorção de folículos atrésicos em *Astyanax bimaculatus lacustris* (Pisces, Teleostei) mantidos em confinamento. **BIOS, Cadernos de Ciências Biológicas da PUC-MG**, v.2, p.41-45, 1995.
- BEGOVAC, P. C.; WALLACE, R. A. Stages of oocyte development in the pipefish, *Syngnathus scovelli*. **J. Morphol.**, v.197, p.353-369, 1988.
- BEGOVAC, P. C.; WALLACE, R. A. Major vitelline envelope proteins in pipefish oocytes originate within the follicle and are associated with the Z3 layer. **J. Exp. Zool.**, v.51, p.56-73, 1989.
- BENJAMIM, L. A. **Caracterização dos ovários e do desenvolvimento ovocitário, e da recuperação ovariana pós-parto do *Platy* (*Xiphophorus maculatus*) (Teleostei, Poeciliidae) em condições laboratoriais controladas e sob ação do hormônio de crescimento.** 2004.Tese de Doutorado. UNICAMP, Campinas –SP.
- BESSEAU, L.; FALIEUX, E. Resorption of unemitted gametes in *Lithognathus mormyrus* (Sparidae, Teleostei): a possible synergic action of somatic and immune cells. **Cell Tissue Res.**, v.276, p.123-132, 1994.
- BILLARD, R. Ultrastructural changes in the spermatogonia and spermatocytes of *Poecilia reticulata* during spermatogenesis . **Cell Tissue Res.**, v.273, p.219-226, 1984.
- BILLARD, R. Spermatogenesis and spermatology of some teleost fish species. **Reprod. Nutr. Dev.**, v.26, p.877-1024, 1986.

- BORGES FILHO, O.F. **Caracterização dos Estádios de Maturação e Correlação com Avaliações Histoquímico-Enzimáticas e Ultra-Estruturais das Células Endócrinas Testiculares, durante o Ciclo Reprodutivo do *Prochilodus scrofa* Steindachner, 1881.** 1987. Tese de Doutorado, Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo, São Paulo.
- BRITO, M.F.G.; BAZZOLI, N. Reproduction of the surubim catfish *Pseudoplatystoma coruscans* (Pisces, Pimelodidae) in the São Francisco river, Pirapora region, Minas Gerais, Brazil. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v.55 (5), p.624–633, 2003.
- BROMLEY, P.J.; RAVIER, C.; WITTHAMES, P.R. The influence of feeding regime on sexual maturation, fecundity and atresia in first-time spawning turbot. **J. Fish Biol.**, v.56, p.264-278, 2000.
- BUSSON-MABILLOT, S. Endosomes transfer yolk proteins to lysosomes in the vitellogenic oocyte of the Trout. **Biol. Cell.**, v.51, p.53-66, 1984.
- CHIEFFI, P.; NASTI, M.; FULGIONI, D.; FRANCO, R. Expression of PCNA in the testis of the lizard, *Podarcis s. sicula*: an endogenous molecular marker of mitotic germinal epithelium proliferation. **Zygote.**, v.9, p.317-322, 2001.
- CLÉROT, J.C. Les groupements mitochondriaux des cellules germinales des poissons téléostéens cyprinidés. I. Étude ultrastructurale. **J. Ultrastruct. Res.**, v.54, p.461-475, 1976.
- CONNAUGHTON, M.A.; AIDA, K. Female reproductive system, fish. *In*: Krobil, E.; Neill, J. D. (ed.). **Encyclopedia of Reproduction**. San Diego, Academic Press. 1998.pp. 193-205.

- COTELLI, F.; ANDRONICO, F.; BRIVIO, M.; LAMIA, C.L. Structure and composition of the fish egg chorion (*Carassius auratus*). **J. Ultrastruct. Mol. Struct. Res.**, v.99, p.70-78, 1988.
- CRAIK, J.C.A.; HARVEY, S.M. The causes of buoyance in eggs of marine teleosts. **J. Mar. Biol. Ass. U. K.**, v.67, p.169-182, 1987.
- CRUZ-LANDIM, C.; CRUZ-HÖFLING, M. A. Electron microscopic studies on the development of the chorion of *Astyanax bimaculatus* (Teleostei, Characidae). **Zool. Jb. Anat.**, v.119, p.241-249, 1989.
- DE VLAMING, V. Oocyte development patterns and hormonal involvements among teleosts. In: RANKIN, J. C.; PITCHER, T. J. AND DUGGAN, R. T. **Control Processes in Fish Physiology**. Croom Helm Ltd., London & Canbrra, p.176-199, 1983.
- DROLLER, M.J.; ROTH, T. F. An electron microscopic study of yolk formation during oogenesis in *Lebistes reticulatus guppyi*. **J. Cell Biol.**, v.28, p.209-232, 1966.
- DRUMMOND, C.D. **Folículo pós-ovulatório de lambari *Astyanax bimaculatus laacustris* (Pisces, characidae) submetido a desova induzida: estudo histológico e ultra-estrutural**. 1996. Dissertação de mestrado UFMG, Belo Horizonte – MG.
- DRUMMOND, C.D.; BAZZOLI, N.; RIZZO, E.; SATO, Y. Post-ovulatory follicle: a model for experimental studies of programmed cell death or apoptosis in teleosts. **J. Exp. Zool.**, v.287, p.176-182. 2000.
- EDY, E. M. Germ plasm and the differentiation of the germ cell line. **Int. Rev. Cytol.**, v.43, p.229-280, 1975.

- FAWCETT, D. W.; ITO, S.; SLAUTERBACK, D.L. The occurrence of intercellular bridges in groups, of cells exhibiting synchronous differentiation. **J. Biophys. Biochem. Cytol.**, v.5, p.453-460, 1959.
- FENERISH, N.A. **Hipófise de *Pimelodus maculatus* Lacépède, 1803**(Teleósteo). **Morfologia e variações em relação com o ciclo ovárico**. 1975.Dissertação de Mestrado, Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo, São Paulo.
- FITZHUGH, G.R.; HETTLER, W.F. Temperature influence on postovulatory follicle degeneration in Atlantic menhaden, *Brevoortia tyrannus*. **Fish. Bull.**, v.93, p.568-572, 1995.
- FRANCOLINI, M.; LORA LAMIA, C.; BONSIGNORIO, C.; COTELLI, F. Oocyte development and egg envelope formation in *Oreochromis niloticus*, a mouth-brooding cichlid fish. **J. Submicrosc. Cytol. Pathol.**, v.35, p.49-60, 2003.
- FYHN, H.J.; FINN, R.N.; REITH, M.; NORBERG, B. Yolk protein hydrolysis and oocyte free amino acids as a key features in the adaptative evolution of teleost fishes to seawater. **Sarsia.**, v.84, p.451-456, 1999.
- GODINHO, H.M.; FENERICH, N.A.; BASILE-MARTINS, M.A.; BARKER, J.M.B. Maturation curve of the ovary of *Pimelodus maculatus* Lac, (Siluroidei, Teleostei). **Bol. Inst. Pesca.**, São Paulo v.3, p.1-20, 1974.
- GODINHO, H.M.; BASILE-MARTINS, M.A.; FENERICH, N.A.; NARAHARA, N.Y. Fecundidade e tipo de desova do mandi, *Pimelodus maculatus* Lacépède, 1803 (Pisces, Siluroidei). **Rev. Brasil. Biol.**, v.37, p.737-744, 1977.
- GODOY, M. P. **Peixes do Estado de Santa Catarina, Florianópolis**. Editora da UFSC, co-edição Eletrosul/FURB, 1987. pp. 572.

- GOLDBERG, S.R.; ALARCON, V.H.; ALHEIT, J. Post-ovulatory follicle histology of the Pacific sardine, *Sardinops sagax*, from Peru. **Fish. Bull.**, v.82, p.443-445, 1984.
- GREELY, M.S. Jr.; HOLS, H.; WALLACE, R.A. Changes in size, hydration and low molecular weight osmotic effectors during meiotic maturation of *Fundulus* oocytes *in vivo*. **Comp. Biochem. Physiol.**, v.100A, p.639-647, 1991.
- GRIER, H.J. Sperm Development in the Teleost *Oryzias latipes*. **Cell Tiss. Res.** v.168, p.419-431, 1976.
- GRIER, H.J. Cellular organization of the testis and spermatogenesis in fishes. **Amer Zool.**, v.21, p.345-357, 1981.
- GRIER, H.J.; TAYLOR, R.G. Testicular maturation and regression in the common snook. **J. fish Biol.** V.53, p.512-542, 1998.
- GRIER, H.J. Ovarian germinal epithelium and folliculogenesis in the Common Snook, *Centropomus undecimalis* (Teleostei: Centropomidae). **J. Morphol.**, v.243, p.265-281, 2000.
- GRIER, H.J.; LO NOSTRO, F. 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, 2000.
- GRIER, H.J. The germinal epithelium: its dual role in establishing male reproductive classes and understanding the basis for indeterminate egg production in female fishes. In: Creswell, R.L. editor. **Proceedings of the fifty-third annual Gulf and Caribbean Fisheries Institute**, November 2000. Fort Pierce: Mississippi/Alabama Sea Grant Consortium, p.537-552, 2002.

GRIER, H.J.; URIBE, M.C.; PARENTI, L.R., ROSA-CRUZ, G. Fecundity, the Germinal, and Folliculogenesis in Viviparous fishes. **Viviparous Fishes**, First edition published by New Life Publication, 2005. p. 191-216.

GUIMARÃES, A. C. D.; QUAGIO-GRASSIOTTO, I. Ultrastructural aspects of oogenesis and oocyte primary growth in *Serrasalmus spilopleura* (Teleostei, Characiformes, Serrasalminae). **Tissue & Cell.**, v.33, p.241-248, 2001.

GUIMARÃES, A.C.D.; QUAGIO-GRASSIOTTO, I. The ultrastructural aspects of vitellogenesis or oocyte secondary growth in *Serrasalmus spilopleura* (Teleostei, Characiformes, Serrasalminae). **J. Submicrosc. Cytol. Pathol.**, v.34, 2, p.199-206, 2002.

GURAYA, S.S. Histochemical study of granulosa (follicular) cells in the pre-ovulatory and postovulatory follicles of amphibian ovary. **Gen. Comp. Endocrinol.**, v.10, p.138-146, 1968.

GURAYA, S.S. **The Cell and Molecular Biology of Fish Oogenesis**. Basel: Ed. Sauer, H. W. Karger. P. 223, 1986.

GURAYA, S.S. **Comparative Cellular and Molecular Biology of Testis in Vertebrados**. Trends in Endocrine, Paracrine and Autocrine Regulation of Structure and Functions. Science Publishers, Inc. 2001, 91p.

GUSMÃO, P.; FORESTI, F.; QUAGIO-GRASSIOTTO, I. The ultrastructure of the pre-meiotic and meiotic stages of spermatogenesis in *Plagioscion squamosissimus* (Teleostei, Perciformes, Sciaenidae). **J Submicrosc Cytol Pathol.**, v.34(2), p.159-165, 2002.

- HA, C.R.; LUCHI, I. Participation of a metalloprotease in the fertilization-associated conversion of the egg envelope (chorion) of the fish, *Oryzias latipes*. **Dev. Growth Differ.**, v.38, p.509-516, 1996.
- HART, N.; WOLENSKI, J.S.; DONAVAN, M.J. Ultrastructural localization of lysosomal enzymes in the egg cortex of *Brachydanio rerio*. **J. Exp. Zool.**, v.244, p.17-32, 1987.
- HELFMAN, G.S.; COLLETE, B.B.; FACEY, D. Teleosts at last I: Bony-tongues through Anglerfishes. In: **The diversity of fishes**. Blackwell, Massachusetts, 2000.p. 221-243.
- HOAR, W.S. Reproduction. In: Hoar, W.S. & Randall, D.J. editors. **Fish Physiology**. New York: Academic Press. volume 111, chap.1, 1969.
- IWAMATSU, T.; OTHA, T.; OSHIMA, E.; SAKAI, N. Oogenesis in the medaka *Oryzias latipes*. Stages of oocyte development. **Zool. Sci.**, v.5, p.353-373. 1988.
- IWAMATSU, T.; SHIBATA, Y.; KANIE, T.J. Changes in the chorion proteins induced by the exudate released from the egg cortex at time of fertilization in the teleost, *Oryzias latipes*. **Dev. Growth Differ.**, v.37, p.747-759, 1995.
- JALABERT, B. Particularities of reproduction and oogenesis in teleost fish compared to mammals. **Reprod. Nutr. Dev.**, v.45, p.261-279, 2005.
- JAMIESON, B.G.M. **Fish evolution and systematics: evidence from spermatozoa**. Cambridge, Cambridge University Press, 1991.
- KAGAWA, H.; TAKANO, K.; NAGAHAMA, Y. Correlation of plasma estradiol-17b and progesterone levels with ultrastructure and histochemistry of ovarian follicles in the white-spotted char, *Salvelinus leucomaenis*. **Cell Tissue Res.**, v.218, p.315-329, 1981.

- KHAN, I. A.; THOMAS, P. Ovarian cycle, teleost fish. *In*: Krobil, E.; Neill, J. D. (ed.). **Encyclopedia of Reproduction**. San Diego, Academic Press. v.3. p.552-564,1999.
- KOBAYASHI, W.; YAMAMOTO, T.S. Fine structure of the micropylar cells and its change during oocyte maturation in the chum salmon, *Oncarhynchus keta*. **J. Morphol.**, v.184, p.263-276, 1985.
- KOYA, Y.; MUNEHARA, H.; TAKANO, K. Sperm Storage and degeration in the ovary of a marine copulating sculpin, *Alcichthys alcicornis* (Teleostei: Scorpaeniformes: role of intercellular junctions between inner ovarian epithelial cells. **J. Morphol .**, v.233, p.153-163, 1997.
- KUDO, S. Ultrastructure and ultracytochemistry of fertilization envelope formation in the carp egg. **Develop. Growth and Differ.**, v.24, p.327-339,1982.
- LAALE, H.W. The perivitelline space and egg envelops of bony fish: a review. **Copeia.**, v.2, p.210-226, 1980.
- LE GAC, F.; LOIR, M. Male Reproductive System, Fish. *In*: Knobil, E. & Neill, J.D. editors. **Encyclopedia of Reproduction**. San Diego: Academic Press. volume 3, 1999. p.20-30.
- LAMAS, I.R.; GODINHO, A.L. Reproduction in the piranha *Serrasalmus spilopleura*, a neotropical fish with an usual pattern of sexual maturity. *Environ. Biol. Fishes.*, v.45, p.161-168, 1996.
- LAMBERT, J.G. The ovary of the guppy *Poecilia reticulata*, the atretic follicle, a corpus atreticum or a corpus luteum preovulations. **Z. Zellforsch.**, v.107, p.54-67, 1970.
- LANG, I. Electron microscopic and histochemical investigations of the atretic oocyte of *Perca fluviatilis* L. (Teleostei). **Cell Tissue Res.**, v.220, p.201-212, 1981a.

- LANG, I. Electron microscopic and histochemical study of the postovulatory follicles of *Perca fluviatilis* L. (Teleostei). **Gen. Comp. Endocrinol.**, v.45, p.219-233, 1981b.
- LESSMAN, C.A. Oogenesis, in nonmammalian vertebrates. *In*: Krobil, E.; Neill, J. D. (ed.). **Encyclopedia of Reproduction**. San Diego, Academic Press. 1998. p. 498-508.
- LO NOSTRO, F. **Espermatogénesis, ciclo anual e inducción hormonal de la espermiación en el pez protogínico diándrico, *Synbranchus marmoratus*, Bloch, 1975** (Teleostei, Synbranchidae). 2000. 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. 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 .**, v.257, p.107–126, 2003.
- LOPES, R.A.; WATANABE, I.; NUTI-SOBRINHO, A.; SANTOS, H.S.L.; PAULA-LOPES, O.V. On the reproduction of brazilian fishes. XIII. Scanning electron microscopic study of the rhythm of the development in oocyte of the lambari (*Astianax bimaculatus*) Reinhardt 1874 (Piscies, Characidae). **Rev. Bras. Ciên. Morfol.**, v. 4, n. 2, p.99-105, 1987.
- MATSUBARA, T.; KOYA, Y. Course of proteolytic cleavage in three classes of yolk proteins during oocyte maturation in barfin flounder (*Verasper moseri*). **J. Exp. Zool.**, v.278, p.189-200, 1997.
- MATSUBARA, T.; OHKUBO, N.; ANDOH, T.; SULLIVAN, C.V.; HARA, A. Two forms of vitellogenin, yielding two distinct lipovitellins, play different roles during oocyte maturation and early development of barfin flounder, *Verasper moseri*, a marine teleost that spawns pelagic eggs. **Dev. Biol.**, v.213, p.18-32, 1999.

- MATSUBARA, T.; SAWANO, K. Proteolytic cleavage of vitellogenin and yolk uptake and oocyte maturation in barfin flounder (*Verasper moseri*). **J. Exp. Zool.**, v.272, p.34-45, 1995.
- MATSUYAMA, M.; NAGAHAMA, Y.; MATSUYAMA, S. Observations on ovarian follicle ultrastructure in the marine teleost, *Pagrus major*, during vitellogenesis and oocyte maturation. **Aquaculture.**, v.92, p.67-82, 1991.
- MATTEI, X. Spermatozoon ultrastructure and its systematic implications in fishes. **Can. J. Zool.**, v.69, p.3038-3055, 1991.
- MAZABRAND, T.; WEGNEZ, M.; DENIS, H. Biochemical research on the oogenesis. RNA accumulation in the oocytes of teleost. **Develop. Biol.**, v.44, p.326-332, 1975.
- MIRANDA, A.C.L.; BAZZOLI, N.; RIZZO, E.; SATO, Y. Ovarian follicular atresia in two teleost species; a histological and ultrastructural study. **Tissue & Cell.**, v.31, p.480-488, 1999.
- MIURA, C.; MIURA, T.; YAMAHITA, M. PCNA protein expression during spermatogenesis of the Japanese eel (*Anguilla japonica*). **Zool. Sci.**, v.19, p.87-91, 2002.
- MOYLE, P.B.; CECH Jr, J.J. **Fishes: An Introduction to Ichthyology**. Third Edition, 1996.
- MUÑOZ, M.; CASADEVALL, M.; BONET, S. Gonadal structure and gametogenesis of *Aspitrigla obscura* (Pisces, Triglidae). **Ital. J.Zool.**, v.68, p.39-46, 2001.
- NAGAHAMA, Y.; CHAN, K.; HOAR, W.S. Histochemistry and ultrastructure of pre-and post-ovulatory follicles in the ovary of the goldfish, *Carassius auratus*. **Can. J. Zool.**, v.54, p.1128- 1139, 1976.

- NAGAHAMA, Y.; CLARKE, W.C.; HOAR, W.S. Ultrastructure of putative steroid-producing cells in the gonads of coho (*Oncorhynchus kisutch*) and pink salmon (*Oncorhynchus gorbuscha*). **Can. J. Zool.**, v.56, p.2508-2519, 1978.
- NAGAHAMA, Y.; KAGAWA, H.; YOUNG, G. Cellular sources of sex steroids in teleost gonads. **Can. J. Fish Aquat. Sci.**, v.39, p.56-64, 1982.
- NAGAHAMA, Y. The functional morphology of teleost gonads. *In*: Hoar, W. S., RANDALL, D. J.; BRETT, J. R. **Fish physiology, Reproduction** New York: Academic Press. 1983.p.223-275.
- NAGLER, J.J.; IDLER, D.R. Ovarian uptake of vitellogenin and another high density lipoprotein in winter flounder (*Pseudopleuronectes americanus*) and their relationship to yolk proteins. **Cell Biol.**, v.68, p.330-335, 1990.
- NAKATANI, K; AGOSTINHO, A.A.; BAUMGARTNER, G.; BIALETZKI, A.; SANCHES, P.V.; MAKRAKIS, M.C.; PAVANELLI, C.S. **Ovos e larvas de peixes de água doce: Desenvolvimento e manual de identificação**. Maringá: EDUEM, 2001.
- NEGRÃO, J. N.C.; CARVALHO, E. D.; FORESTI, F.; QUAGIO-GRASSIOTTO, I. Spermatogonia and spermatocyte ultrastructure in *Hoplias malabaricus* (Teleostei, characiformes: Erythrinidae). **J. Zool. Lond.**, v.257, p.287-293, 2002.
- NOBREGA, R. H. **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)**". 2006.Dissertação de Mestrado. UNICAMP, Campinas –SP.

- NÓBREGA, R.H.;QUAGIO-GRASSIOTTO, I. Morphofunctional changes in Leydig cells throughout the continuous spermatogenesis of a freshwater teleost fish *Serrasalmus spilopleura* (Characiformes, Characidae) an ultrastructural and enzymatical study. **Cell Tissue Research** (in press), 2007.
- NOMURA, H. **Aquicultura e Biologia de Peixes**. São Paulo, Nobel. p. 200, 1978.
- OHTA, T.; IWAMATSU, T.; TAKAMA, M.; YOSHIMOTO, Y. Cortical alveolus breakdown in the eggs of the freshwater teleost *Rhodeus ocellatus ocellatus*. **Anat. Rec.**, v.227, p.486-496, 1990.
- OLIVEIRA-JÚNIOR, R.L. **Análise comparativa da reprodução do mandi amarelo, *Pimelodus maculatus* Lacépède, 1803 (Pisces, Pimelodidae) em dois trechos do rio São Francisco, MG**. 2002. Dissertação de Mestrado. Departamento de Morfologia, Curso de Pós-Graduação em Biologia Celular, UFMG, Belo Horizonte, MG.
- PATIÑO, R.; SULLIVAN, C.V. Ovarian follicle growth, maturation, and ovulation in teleost fish. **Fish Physiol Biochem.**, v.26, p.57-70, 2002.
- PUDNEY, J. Spermatogenesis in Nonmammalian Vertebrates. **Microsc. Res. Tech.**, v.32, p.459-497, 1995.
- PUDNEY, J. Comparative Cytology of the Leydig Cell. In: Payne, A.H.; Hardy, M.P.; Russel, L.D. editors. **The Leydig Cell**. Vienna, IL: Cache River Press. 1996. p.98-142.
- QUAGIO-GRASSIOTTO, I.; GUIMARÃES, A. C. D. Follicular epithelium, theca and egg envelop formation in *Serrasalmus Spilopleura* (Teleostei, Characiformes, Characidae). **Acta Zool.**, v.84, p.121-129, 2003.

- QUINTERO-HUNTER, I; GRIER, H; MUSCATO, M. Enhancement of histological detail using metanil yellow as counterstain in periodic acid/Schiff's hematoxylin staining of glycol methacrylate tissue sections. **Biotech Histochem.**, v. 66, p 169-172, 1991.
- REDDING, J.M.; PATIÑO, R. Reproductive physiology. In: EVANS, D.H. editor. **The physiology of fishes**. Boca Raton, FL: CRC Press. 1993. p.503-534.
- REIS, R.E.; KULLANDER, S.O.; FERRARIS JR, C.J. **Check List of the Freshwater Fishes of South and Central America**. EDIPUCRS. Porto Alegre. 2003. 742 p.
- RIBEIRO, D.C.J. **Biologia reprodutiva do pirá** *Conorhynchus conirostris* Valenciennes, 1840 (Pisces: Pimelodidae) **do rio São Francisco, região de Pirapora, Minas Gerais**. 2002. Dissertação de Mestrado - Programa de Pós-graduação em Zoologia de Vertebrados da PUC Minas, Belo Horizonte - MG.
- RIZZO, E.; BAZZOLI, N. Oogenesis, oocyte surface and micropylar apparatus of *Prochilodus affinis* Reinhardt, 1874 (Pisces:Characiformes). **Eur. Arch. Biol.**, v.104, p.1-6, 1993.
- RIZZO, E.; BAZZOLI, N. Follicular atresia in curimatá-pioa *Prochilodus affinis* Reinhardt (Pisces, Characiformes). **Rev. Brasil. Biol.**, v.55, p.697-703, 1995.
- SAIDAPUR, S. K. Follicular atresia in the ovaries of non mammalian vertebrates. **Int. Rev. Cytol.**, v.54, p.225-244, 1978.
- SANTOS, J.E.; RIZZO, E.; BAZZOLI, N.; SATO, Y.; MORO, L. Ovarian regression and apoptosis in the South American Teleost *Leporinus Taeniatus* Lutken (Characiformes, Anostomidae) from the São Francisco Basin. **J. Fish Biol.**, v.67, p.1446-1459, 2005.

- SANTOS, J.E.; PADILHA, G.E.V.; BOMCOMPAGNI-JÚNIOR, O.; SANTOS, G.B.; RIZZO, E.; BAZZOLI, N. Ovarian follicle growth in the catfish *Iheringichthys labrosus* (Siluriformes: Pimelodidae). **Tissue & Cell.**, v.38, p.303-310, 2006.
- SATO, Y.; FENERICH-VERANI, N.; VERANI, J.R.; GODINHO, H.P.; SAMPAIO, E.V. Hipofiseação do *Pimelodus maculatus* (Pisces; Pimelodidae). **In: Congresso Brasileiro de Limnologia, São Carlos, 1997.** Resumos. São Carlos: Sociedade Brasileira de Limnologia, p.438.
- SELMAN, K.; WALLACE, R.A. Gametogenesis in *Fundulus heteroclitus*. **Am. Zool.**, v.26, p.173-192, 1986.
- SELMAN, K.; WALLACE, R.A. Cellular aspects of oocyte growth in teleosts. **Zool. Sci.**, v.6, p.211-231, 1989.
- SILVEIRA, H.; RODRIGUES, P.; AZEVEDO, C. Fine structure of the spermatogenesis of *Blenninus pholis*(Pisces, blenniidae). **J. Submicrosc. Cytol.**, v.22, p.103-109, 1990.
- SILVERSAND, C.; HAUX, C. Fatty acid composition of vitellogenin from four teleost species. **J. Comp. Physiol.**, v.164B, p.593-599, 1995.
- SIRE, M.F.; BABIN, P.J.; VERNIER, J.M. Involvement of the lysosomal system in yolk protein deposit and degradation during vitellogenesis and embryonic development in trout. **J. Exp. Zool.**, v.269, p.69-83, 1994.
- STIFANI, S.; LE MENN, F.; RODRIGUEZ, J.N.; SCHEIDER, W. J. Regulation of oogenesis: the piscine receptor for vitellogenin. **Biochim. Biophys.**, v.1045, p.271-279, 1990.

- SUNDARARAJ, B.I. **Reproductive Physiology of Teleost Fishes: A Review of Present Knowledge and Needs for Future Research.** Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO), Rome, 1981.
- TAYLOR, R.G.; GRIER, H.J.; WHITTINGTON, J.A. Spawning rhythms of common snook in Florida. **J. Fish. Biol.**, v.53, p.502–520, 1998.
- TESORIERO, J.V. The distribution and fate of 3H-glucose and 3H-galactose in oocytes of *Oryzias latipes*. **Cell Tissue Res.**, v.209, p.117-129, 1980.
- THIBAU, R.; SCHULTZ, R. J. Reproductive adaptations among viviparous fishes (Cynprinodontiformes: Poeciliidae). **Evolution.**, v.32, p.320-333, 1978.
- THORSEN, A.; FYHN, H. J. Final oocyte maturation *in vivo* and *in vitro* in marine fishes with pelagic eggs: yolk protein hidrolysis and free amino acid content. **J. Fish Biol.**, v.48, p.1195-1209, 1996.
- TOKARZ, R.R. Oogonial proliferation, oogenesis, and folliculogenesis in nonmammalian vertebrates. *In*: Jones, R. E. (ed.). **The vertebrate ovary.** New York, Plenum Press. pp.145-179, 1978.
- TOURY, R.; CLÉROT, J.C.; ANDRÉ, J. Les groupements mitochondriaux des cellules germinales des poissons teleostéens Cyprinides. IV. Analyse biochimique des constituants du “ciment” intermitochondrial isolé. **Biol. Cell.**, v.30, p.225-232, 1977.
- TYLER, C.R.; SUMPTER, J.P. Oocyte growth and development in teleosts. **Rev. Fish Biol. Fisher.**, v.6, p.287-318, 1996.
- ÜNAL, G.; KARAKISI, H.; ELP, M. Ovarian Follicle Ultrastructure and Changes in levels of Ovarian Steroids during Oogenesis in *Chalcalburnus tarichi* Pallas, 1811. **Turk J Vet Anim Sci.**, v.29, p.645-653, 2005.

- VAN DEN HURKE, R.; PEUTE, J. Cyclic changes in the ovary of the rainbow trout, *Salmo gairdneri*, with special reference to sites of steroidogenesis. **Cell Tissue Res.**, v.199, p.289-306, 1979.
- VAN DEN HURKE, R.; PEUTE, J. Functional aspects of the postovulatory follicle in the ovary of the African catfish, *Clarias gariepinus*, after induced ovulation. An ultrastructural and enzyme-histochemical study. **Cell Tissue Res.**, v.240, p.199-208, 1985.
- VAN NASSAUW, L.; CALLEBAUT, M. Structural and immunohistochemical aspects of the post-ovulatory follicle in Japanese quail. **Anat. Rec.**, v.229, p.27-30, 1991.
- VAZZOLER, A.E.A.M. **Biologia da reprodução de peixes teleósteos. Teoria e Prática.** EDUEM, Maringá, 1996.
- VERMA, G.P.; THAKUR, C. Origin and composition of cortical granules in oocytes of a teleost, *Mastacembelus armatus armatus* (Lacépède). **Arch. Biol.**, v.99, p.325-334, 1988.
- VIZZIANO, D.; BEROIS, N. Histología del ovario de *Macrodon ancylodon* (Bloch Y Schneider, 1801) Teleostei: Sciaenidae) Ovogénesis. Folículos post-ovulatorios. Atresia. **Rev. Brasil. Biol.**, v.50, p.523-536, 1990.
- WALLACE, R.A. Vitellogenesis and oocyte growth in nonmammalian vertebrates. *In*: Browder, L. W. (ed.). **Developmental Biology**. New York: Plenum Press. v. 1, p.127-177, 1985.
- WALLACE, R.A.; BEGOVAC P.C. Phosphovitins in *Fundulus* oocytes and eggs. Preliminary chromatographic and eletrophoretic anlyses together with biological considerations. **J. Biol. Chem.**, v.260, p.11268-11274. 1985.

- WALLACE, R.A.; SELLMAN, K. Cellular and dynamic aspects of oocyte growth in teleosts. **Scien. Zool.**, v.21, p.325-343, 1981.
- WALLACE, R.A.; SELMAN, K. Ultrastructural aspects of oogenesis and oocyte growth in fish and amphibians. **J. Electron Microsc. Tech.**, v.16, p.175-201, 1990.
- WIEGAND, M. D. Composition, accumulation and utilization of yolk lipids in teleost fish. **Rev. Fish Biol. Fisheries.**, v.6, p.259-286, 1996.
- WEST, G. Methods of assessing ovarian development in fish: a review. **Aust. J. Mar. Freshw. Res.**, v.41, p.199-222, 1990.
- WOOD, A. W.; VAN DER KRAAK, G. Inhibition of apoptosis in vitellogenic ovarian follicles of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) by salmon gonadotrophin, epidermal growth factor, and 17 $\beta$ -estradiol. **Mol.Repro. Dev.**, v.61, p.511-518, 2002.
- WOOD, A. W.; VAN DER KRAAK, G. Yolk proteolysis in rainbow trout oocytes after serum-free culture: evidence for a novel biochemical mechanism of atresia in oviparous vertebrates. **Mol.Repro. Dev.**, v.65, p.219-227, 2003.
- WOURMS, J.P. Annual fish oogenesis. I. Differentiation of the mature oocyte and formation of the primary envelop. **Develop. Biol.**, v.50, p.335-354, 1976.
- YAMAMOTO, M. Electron microscopy of fish development. III. Changes in the ultrastructure of the nucleus and cytoplasm of the oocyte during its development in *Oryzias latipes*. **J. Fac. Sci.**, Tokyo Univ., v.10, p.335-346, 1964.
- YORK, W. S.; PATIÑO, R.; THOMAS, P. Ultrastructural changes in follicle cell-oocyte associations during development and maturation of the ovarian follicle in Atlantic croaker. **Gen. Comp. Endocrinol.**, v.92, p.402-418, 1993.