

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE ENGENHARIA DE ILHA SOLTEIRA
CAMPUS DE ILHA SOLTEIRA**

LAÍZA MARIA DE JESUS SILVA

**CICLO REPRODUTIVO DE FÊMEAS DE *Devario aequipinnatus*
(CYPRINIFORMES, CYPRINIDAE) SUBMETIDAS A DIFERENTES
TEMPERATURAS.**

Ilha Solteira

2016



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de Ilha Solteira

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E
TECNOLOGIA ANIMAL**

LAÍZA MARIA DE JESUS SILVA

**CICLO REPRODUTIVO DE FÊMEAS DE *Devario aequipinnatus*
(CYPRINIFORMES, CYPRINIDAE) SUBMETIDAS A DIFERENTES
TEMPERATURAS.**

Dissertação apresentada à Faculdade de
Engenharia de Ilha Solteira – UNESP
como parte dos requisitos para obtenção
do título de Mestre em Ciência e
Tecnologia Animal

Profª Drª Rosicleire Veríssimo Silveira
Orientadora

Ilha Solteira

2016

FICHA CATALOGRÁFICA

Elaborada pela Seção Técnica de Aquisição e Tratamento da Informação
Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação da UNESP - Ilha Solteira.

- | | |
|-------|--|
| S586c | <p>Silva, Laiza Maria de Jesus.</p> <p>Ciclo reprodutivo de fêmeas de <i>Devario aequipinnatus</i> (Cypriniformes, Cyprinidae) submetidas a diferentes temperaturas / Laiza Maria de Jesus. -- Ilha Solteira : [s.n.], 2016.</p> <p>75 f. : il.</p> <p>Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista. Faculdade de Engenharia de Ilha Solteira. Área de conhecimento: Produção Animal, 2016</p> <p>Orientadora: Rosicleire Veríssimo Silveira</p> <p>Inclui bibliografia</p> <p>1. Peixe – Reprodução . 2. Células germinativas. 3. Temperatura.</p> |
|-------|--|

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: Ciclo reprodutivo de fêmeas de *Devario aequipinnatus* (Cypriniformes, Cyprinidae) submetidas a diferentes temperaturas..

AUTORA: LAÍZA MARIA DE JESUS SILVA

ORIENTADORA: ROSICLEIRE VERISSIMO SILVEIRA

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Mestra em CIÊNCIA E TECNOLOGIA ANIMAL, área: PRODUÇÃO ANIMAL, pela Comissão Examinadora:


Profa. Dra. ROSICLEIRE VERISSIMO SILVEIRA
Departamento de Biologia e Zootecnia / Faculdade de Engenharia de Ilha Solteira


Profa. Dra. CRISTIELE DA SILVA RIBEIRO
Departamento de Biologia e Zootecnia / Faculdade de Engenharia de Ilha Solteira


Profa. Dra. RENATA GUIMARÃES MOREIRA WHITTON
Departamento de Fisiologia Geral / Instituto de Biociências/USP, São Paulo-SP

Ilha Solteira, 04 de março de 2016

DEDICO

Aos meus pais, Aracelis e João, e aos meus avôs, Josefa e Domingos. Agradeço a Deus por ter me dado a oportunidade de nascer nesta família tão maravilhosa, pela oportunidade de realizar um sonho, por todo o amor recebido, pelo incentivo nos momentos de difíceis, por serem meus exemplos e por me conduzirem da melhor forma pelos caminhos da vida.

Ao meu pai, João Rosa, que me possibilitou concluir mais etapa da minha vida, sem o qual isso jamais seria possível. Obrigada por escolher ser meu pai e me fazer compreender o verdadeiro significado desta palavra, agradeço imensamente por todo carinho, amor e educação para a formação da pessoa que eu sou, eu te amo!

AGRADECIMENTOS

A **Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”**, por fornecer toda a infraestrutura necessária para o desenvolvimento deste trabalho.

A **Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP** (processo nº 2014/12584-0), pelo apoio financeiro, possibilitando a realização deste trabalho.

A **Profª Drª Rosicleire Veríssimo Silveira**, por acreditar na minha capacidade, ensinamentos, “puxões de orelha”, carinho, paciência e exigência, sem a qual eu jamais teria executado este trabalho. Agradeço muito a orientação nestes seis anos, pelas oportunidades que me deu durante a iniciação científica e o mestrado.

Ao **Profº Drº Alexandre Ninhaus Silveira**, pelos ensinamentos, atenção e por sempre batalhar para nos oferecer a melhor infraestrutura e subsídios para a realização dos nossos trabalhos.

A **Profª Drª Cristiéle da Silva Ribeiro**, por aceitar participar da minha banca de qualificação e defesa, pelo auxílio em todas as coletas, pelas conversas, colaboração no meu trabalho e acima de tudo pela amizade.

Aos membros da banca de qualificação, **Profª Drª Flávia Cristina Rodrigues Lisoni e Profº Drº Edson Guilherme Vieira**, pela disponibilidade em contribuir com o meu trabalho.

Aos membros da banca de defesa, **Profª Drª Renata Guimarães Moreira Whitton, Profº Drº Igor Paiva e Drº Diógenes Henrique de Siqueira Silva** por aceitarem participar da minha banca de defesa contribuindo para a finalização de uma etapa tão importante.

A **Profª Drª Rosimeire Filardi**, pela disposição em tirar nossas dúvidas, atenção, conversas e dedicação em sempre melhorar nosso curso de Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia Animal.

Ao **Laboratório de Ictiologia Neotropical (L.I.Neo)**, por me oferecer subsídios para que este trabalho fosse possível, pelos momentos descontraídos e pela colaboração dos meus colegas Amanda, Diógenes, Geovanna, Fabrício, Maria, Maira, Naiara, Patrícia e Pricila.

A **Dona Cleuza e Meire**, do Departamento de Biologia e Zootecnia, por sempre nos auxiliar, pelas conversas e risadas.

A minha querida e amada irmã de coração **Ingrid Amaral**, por todo amor, carinho e amizade mesmo estando fisicamente longe de mim. Quero agradecer por ser tão maravilhosa comigo, pelas conversas, risadas e apoio incondicional.

A minha amiga de república **Marcela Maróstica**, por ser tão compreensível nos momentos difíceis, por sempre estar ao meu lado, pelos chás de madrugada e principalmente pela convivência e paciência nestes dois anos.

As minhas amigas **Jumma Miranda** e **Cristiane Bashiyo**, que sempre estiveram ao meu lado, me apoiando nos momentos de dificuldade com muito carinho e paciência. Obrigada pelas conversas, “gordices” e conselhos.

Ao meu amigo **Renan Leão**, pela amizade, risadas e companheirismo. Por me dar leveza para que esta caminhada se tornasse mais fácil e divertida com suas brincadeiras e principalmente por me olhar de uma maneira tão carinhosa.

A minha amiga **Valéria Pereira**, pelo carinho, atenção, principalmente pela sinceridade em nossas conversas nem sempre me falando o que eu gostaria de ouvir mas sempre me falando o que era necessário. Obrigada por zelar pelo meu bem-estar.

Aos meus amigos queridos de laboratório **Douglas Ribeiro** e **Raphael Costa**, pelos ensinamentos, conselhos, paciência e amizade.

As minhas amigas de longos anos, **Giuliana Garcia** e **Pâmela Barbosa**, pelo grande carinho, por cultivar nossa amizade mesmo tão distantes e nem sempre podendo estar presente. Obrigada por me ajudar a entender a frase “um dia você entende que grandes amizades continuam mesmo a longas distâncias”.

Aos meus amigos queridos de graduação **Aline Zonatto**, **Ludimila Viana**, **Maria Luana**, **Renan Silva** e **Wanderson Rodrigues**, pelas brincadeiras fazendo das minhas manhãs tão especiais com suas mensagens e principalmente pela amizade e carinho.

A minha prima querida **Rita Lopes**, que se tornou tão especial ao longo destes dois anos. Obrigada por tudo, por todo o carinho, atenção, amor e principalmente por toda sua imensa generosidade, como é bom conhecer pessoas como você.

A minha **tia Laura** e **avó Lúcia**, por serem tão atenciosas, carinhosas e acreditarem em mim.

A **Dona Zilda**, por todo cuidado, carinho e amor. Obrigada por todos os momentos que passamos juntas e principalmente por nunca se esquecer de mim. Sempre me lembrarei da senhora com muito carinho.

A todas as pessoas que passaram pela minha vida e que de alguma contribuíram tanto pelo meu crescimento profissional e pessoal me possibilitando para que eu pudesse concluir mais esta etapa.

“O essencial é invisível aos olhos, só se vê bem com o coração”.
“É preciso que eu suporte duas ou três larvas se quiser conhecer as
borboletas”.

Antoine de Saint-Exupéry

RESUMO

A influência antrópica vem crescendo continuamente no ambiente assim os impactos negativos nos ambientes causam alterações sobre a distribuição e abundância das espécies aquáticas se estendendo de pequenos córregos a grandes rios. Em teleósteos, a gametogênese é um processo altamente complexo, modulado pelas variações ambientais e fisiológicas. Desta forma, o presente estudo teve por objetivo avaliar a influência de três diferentes temperaturas sobre o desenvolvimento ovariano de *Devario aequipinnatus*. Foram utilizadas exemplares fêmeas e adultas de *D. aequipinnatus* e para a condução do experimento foram utilizados 3 aquários com capacidade para 9 L, mantidos a 18°C, 24°C e 30°C, o experimento foi realizado com uma temperatura a cada período. Cinco indivíduos de cada tratamento foram coletados de modo aleatório a cada quatro dias, no período entre o 1° e 37° dia experimental nas temperaturas de 24°C e 30°C e no período entre o 1° e 33° dia na temperatura de 18°C. O material coletado foi processado conforme técnicas usuais para microscopia de luz. Na foliculogênese, as células oogônias, são as menores da linhagem germinativa e passam pelas diferentes fases da profase meiótica. Na oogênese, os estágios foram classificados em previtelogênese inicial e final, vitelogênese inicial e final e por fim maturação. Já as fases reprodutivas foram classificadas em Regeneração, Desenvolvimento inicial e final, Apto à desova e Regressão. Desta forma foi verificado que na temperatura de 24°C (T24) foram observadas as fases de Desenvolvimento final e Apto à desova. Entretanto nas demais temperaturas 18°C (T18) e 30°C (T30) o mesmo padrão não foi observado, já que foram identificadas todas as fases sendo: Desenvolvimento Inicial e Final, Apto à desova, Regressão e Regeneração. Assim podemos concluir que a temperatura influenciou no padrão de desenvolvimento ovariano de *D. aequipinnatus*.

Palavras-chave: Ciprinídeo. Morfologia. Reprodução. Temperatura.

ABSTRACT

The antropogenic influence has grown continuously in the environment, thus negative impacts on the environment cause changes on the distribution and abundance of aquatic species extending from small streams to large rivers. In teleosts, gametogenesis is a highly complex process, modulated by environmental and physiological changes. This study aimed to evaluate the influence of three different temperatures on ovarian development of *Devario aequipinnatus*. They were used adult females specimens, and for the experiment were used three aquariums with a capacity of 9 L, kept at 18°C, 24°C and 30°C, the experiment was conducted with a temperature of each period. Five individuals from each treatment were collected randomly every four days in the period between 1st and 37th experimental day at temperatures of 24°C and 30°C and the period between 1st and 33th day at temperature of 18°C. The material were processed according to the usual techniques for light microscopy. In folliculogenesis, the oogonia, cells are the smallest of the germ line and go through different stages of meiotic prophase. In oogenesis, stages were classified into initial and final previtelogenic, initial and final vitellogenesis and maturation. Already reproductive phases were classified into Regenerating, initial and final Developing, Spawning Capable and Regressing. Thus, it was found that at 24°C (T24) of final Developing and Spawning capable phases were observed. However, in other temperatures, 18°C (T18) and 30°C (T30), the same pattern was not observed, all stages were identified as follows: Initial and Final Developing, Spawning capable, Regressing and Regenerating. So we can conclude that the temperature influenced the ovarian development pattern in *Devario aequipinnatus*.

Keywords: Ciprinid. Morfology. Reproduction. Temperature.

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1 – CONSIDERAÇÕES GERAIS.....	16
1.1 INTRODUÇÃO	16
1.2 OBJETIVO GERAL	22
1.3 REFERÊNCIAS.....	23
CAPÍTULO 2 – CICLO REPRODUTIVO DE <i>Devario aequipinnatus</i> COM ÊNFASE NA FOLICULOGÊNESE E OOGÊNESE.....	28
2.1 INTRODUÇÃO	30
2.2 MATERIAL E MÉTODOS.....	31
2.3 RESULTADOS.....	33
2.4 DISCUSSÃO	48
2.5 REFERÊNCIAS.....	52
CAPÍTULO 3 – A INFLUÊNCIA DAS DIFERENTES TEMPERATURAS NO CICLO REPRODUTIVO DE FÊMEAS DE <i>Devario aequipinnatus</i>.....	56
3.1 INTRODUÇÃO	58
3.2 MATERIAL E MÉTODOS.....	59
3.3 RESULTADOS.....	61
3.4 DISCUSSÃO	70
3.5 CONSIDERAÇÕES GERAIS	72
3.6 REFERÊNCIAS.....	74

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Exemplar fêmea de <i>Devario aequipinnatus</i>	32
Figura 2 - Ovários de <i>Devario aequipinnatus</i>	39
Figura 3 - Foliculogênese em <i>D. aequipinnatus</i>	40
Figura 4 - Oogênese em <i>D. aequipinnatus</i>	41
Figura 5 - Ovários de <i>D. aequipinnatus</i> imaturo	42
Figura 6 - Ovários de <i>D. aequipinnatus</i> em fase de Desenvolvimento	43
Figura 7 - Ovários de <i>D. aequipinnatus</i> em fase de Apto à desova.....	44
Figura 8 - Ovários de <i>D. aequipinnatus</i> em fase de Regressão	45
Figura 9 - Ovários de <i>D. aequipinnatus</i> em fase de Regeneração	46
Figura 10 - Tipo de desova em <i>Devario aequipinnatus</i>	47
Figura 11 - Frequência da porcentagem de indivíduos de <i>D. aequipinnatus</i> por fases reprodutivas em fêmeas ao longo das coletas na temperatura de 24°C	64
Figura 12 - Frequência da porcentagem de indivíduos de <i>D. aequipinnatus</i> por fases reprodutivas em fêmeas ao longo das coletas na temperatura de 18°C	64
Figura 13 - Frequência da porcentagem de indivíduos de <i>D. aequipinnatus</i> por fases reprodutivas em fêmeas ao longo das coletas na temperatura de 30°C	65
Figura 14 - Fases reprodutivas de <i>D. aequipinnatus</i> nas temperaturas de 24°C, 18°C e 30°C	66
Figura 15 - Correlação linear entre as variáveis de distribuição dos valores do índice gonadosomático (IGS) e o tempo ao longo das coletas na temperatura de 24°C em <i>D. aequipinnatus</i>	67

Figura 16 - Correlação linear entre as variáveis de distribuição dos valores do índice gonadosomático (IGS) e o tempo ao longo das coletas na temperatura de 18°C em *D. aequipinnatus*..... 67

Figura 17- Correlação linear entre as variáveis de distribuição dos valores do índice gonadosomático (IGS) e o tempo ao longo das coletas na temperatura de 30°C em *D. aequipinnatus*.....68

Figura 18 - Média do índice gonadosomático (IGS) de *D. aequipinnatus* entre as diferentes temperaturas ao longo do experimento e entre as coletas dentro da mesma temperatura de 18°C, 24°C e 30°C.. 68

Figura 19 – Valores médios do Índice Gonadosomático (IGS) por fase de apto à desova de *D. aequipinnatus* entre as temperaturas de 18°C, 24°C e 30°C ao longo das coletas 69

Figura 20 - Médias das áreas dos oócitos maduros de *D. aequipinnatus* nas diferentes temperaturas ao longo do experimento e nas coletas dentro da mesma temperatura de 18°C, 24°C e 30°C. 69

CAPÍTULO 1 – CONSIDERAÇÕES GERAIS

1.1 INTRODUÇÃO

- CENÁRIO DAS MUDANÇAS CLIMÁTICAS

De acordo com o relatório do *Intergovernmental Panel on Climate Change* – IPCC (2013) a temperatura da superfície global está aumentando desde o final do século 19. As últimas três décadas têm sido sucessivamente mais quentes, sendo que a primeira década do século 21 foi considerada a mais quente desde o início das medições. A média da temperatura mostrou uma tendência linear de aquecimento de 0,85°C durante o período de 1880 a 2002.

Frente a estas mudanças, o ciclo hidrológico também vem sofrendo alterações e causando diversos impactos que são condicionados pela interação de fatores não climáticos, como aumento da densidade populacional e urbanização, desenvolvimento da economia, mudanças geomorfológicas, assim como a gestão dos recursos aquícolas. Estas alterações desafiam a sustentabilidade por diminuir o abastecimento de água ou ainda por aumentarem a demanda da mesma (IPCC, 2014).

A influência antrópica vem crescendo continuamente no ambiente, legitimando a importância de se investigar as causas de estresse aos animais nos sistemas naturais no qual se encontram (WIKELSKI; COOKE, 2006). Os impactos negativos nos ambientes causam alterações sobre a distribuição e abundância das espécies aquáticas (PAUL et al., 2014) se estendendo desde pequenos córregos a grandes rios (ARAUJO, 1998).

As alterações climáticas da temperatura em ecossistemas terrestres e aquáticos causam impactos sobre as espécies como mudanças na reprodução bem como no sucesso reprodutivo, recrutamento, desempenho de crescimento, mortalidade e mudanças na distribuição geográfica (PORTNER, 2002). Cahill et al. (2012) reportam que as respostas frente às mudanças são um dos maiores problemas enfrentados pelos cientistas atualmente. Por isso, para um melhor entendimento é preciso estudar as alterações climáticas sobre as espécies sendo essencial para as pesquisas, políticas e gestão da diversidade biológica (COMTE et al., 2013).

Maitland (1995) ressalta que as atividades antrópicas não estão recebendo a devida atenção, por isso é necessário que as espécies sejam consideradas

por sua importância econômica e científica como parte do recurso sustentável do planeta. Wikelski e Cooke (2006) citam a importância de estudar os animais no ambiente em que estão inseridos, possibilitando a investigação das alterações do habitat e perturbações ambientais incluindo as mudanças climáticas.

Dentro deste contexto, os peixes se tornam ótimos modelos experimentais, já que possuem vantagens como a diversidade de espécies, formato do corpo, aspectos fisiológicos em razão da grande adaptação e das respostas a uma variedade de ambientes naturais e as condições antropogênicas em que se encontram (COSSINS; CRAWFORD, 2005).

Finalmente, diante da crescente demanda dos recursos aquícolas e da disponibilidade de abastecimento para o mundo, a produção de alimentos, como a de peixes, só tende a aumentar. Assim com as mudanças climáticas sobre os afluentes há uma urgente necessidade de se estudar as possíveis alterações da temperatura sobre a reprodução e estoques pesqueiros (DAVIES; BROMAGE, 2002).

- INFLUÊNCIA DA TEMPERATURA

Vários autores relatam sobre a influência da temperatura em ambientes aquáticos, reportando a importância deste fator como ferramenta para avaliação do potencial de sobrevivência, de colonização e mudanças locais e globais (DEBNATH et al., 2006).

A temperatura é um fator importante na fisiologia dos vertebrados (DEVLIN; NAGAHAMA, 2002; SOUZA, 2004) dentre eles, os peixes são considerados animais mais eficientes na conversão de energia quando comparados a outros grupos, pois não necessitam gastar energia para regulação corporal sendo dependentes do meio externo (KUBITZA, 2000).

O desenvolvimento embrionário, na maioria dos peixes, pode acontecer em função das condições ambientais externas onde há uma grande variação de temperatura. Os peixes evoluíram níveis de tolerâncias para tais efeitos da temperatura possibilitando o desenvolvimento dos embriões, uma destas evidências é que a temperatura influencia na determinação sexual (DEVLIN; NAGAHAMA, 2002) assim como na capacidade de crescimento, desenvolvimento e reprodução (BROMAGE; PORTER; RANDALL, 2001;

DAVIES; BROMAGE, 2002). Desta forma cada espécie exige uma faixa específica de temperatura, sendo também denominada de zona de conforto (KUBITZA, 2000).

Os fatores exógenos que atuam na época reprodutiva são denominados de gatilhos. Estão divididos em preditivos, que abrangem o fotoperíodo e a temperatura podendo atuar em diferentes fases do ciclo gonadal; sincronizadores que fornecem condições ideais a desova e operam na maturação final dos gametas e nos aspectos comportamentais de ambos os sexos finalizando com a fertilização; e finalizadores que marcam o final do período reprodutivo ocasionando a regressão gonadal (MUNRO, 1990 citado por VAZOLLER, 1996).

Desta forma, o entendimento da biologia e reprodução de peixes assim como dos fatores externos são essenciais para os estudos laboratoriais, aquarismo e principalmente para contribuir no planejamento do manejo e repovoamento das espécies (DEBNATH et al., 2006). A compreensão da atuação da temperatura sobre os animais aquáticos contribui significativamente para as previsões dos efeitos na população e níveis de comunidades (DORTS et al., 2012).

Neste sentido, várias pesquisas vêm sendo desenvolvidas com o intuito de investigar a influência da temperatura no desenvolvimento gonadal, reversão sexual e depleção das células germinativas, além de outros fatores que afetam a reprodução de peixes. Pankhurst e colaboradores (1996) realizaram um trabalho sobre os efeitos da temperatura no desenvolvimento ovariano em fêmeas de truta arco-íris, *Oncorhynchus mykiss*, utilizando diferentes temperaturas de 9°C, 12°C, 15°C, 18°C, 21°C por três meses, relataram alteração na maturação e desova, sendo que as fêmeas mantidas na última temperatura de 21°C não desovaram e ainda houve baixa produção dos oócitos.

Estudando o salmão do Atlântico, *Salmo salar*, King et al. (2003) relataram que fêmeas maduras mantidas a uma temperatura de 22°C, obtiveram uma significativa redução no diâmetro dos oócitos, na taxa de fecundidade e sobrevivência do ovo-olhado, em comparação àquelas mantidas em 14°C e 18°C.

O efeito da temperatura também foi estudado em machos de robalo flecha, *Centropomus undecimalis*, por Ferraz; Cerqueira (2010), com objetivo de obter machos sexualmente maduros com emprego de duas temperaturas, a primeira foi aumentada naturalmente de acordo com a variação da temperatura da água de abastecimento enquanto a outra foi elevada gradativamente até 26°C, em ambas temperaturas foi observado o aumento do volume de sêmen ao longo do período experimental.

Em contrapartida, o efeito da temperatura também está associado à reversão sexual de machos de tilápias, como alternativa à aplicação de hormônios esteroides. Borges (2004) realizou um experimento que consistiu na utilização de temperaturas de 27°C (controle) e 35°C, em tilápias ainda na fase de indiferenciação larval, por um período 28 dias, e observou que o maior percentual de machos foi encontrado no tratamento (72,39%) em comparação ao controle (62,27%).

De acordo com Nóbrega et al. (2010) a utilização de diferentes temperaturas (20°C, 27°C, 30°C e 35°C) na depleção endógena da espermatogênese de zebrafish (*Danio rerio*) com a droga quimioterápica busulfan, observaram que temperaturas mais altas aceleraram a espermatogênese, entretanto a de 35°C causou anormalidades, como apoptose entre os espermatócitos, ausência de espermatozoides e uma redução do índice gonadosômático.

Em um trabalho realizado por Siqueira-Silva e colaboradores (2015) também associando a temperatura elevada (35°C) com o quimioterápico Busulfan em *Astyanax altiparanae* os autores relataram que houve depleção gonadal com redução no número de espermatogônias, espermatócitos e espermátides.

Deste modo, a temperatura é um fator essencial para a regulação dos processos reprodutivos como a gametogênese, maturação, desova, embriogênese, eclosão e sobrevivência e pode influenciar de maneira significativa estes processos (PANKHURST; PORTER, 2003).

Assim fica claro que a temperatura causa alterações no sistema endócrino, por isso a importância de investigar de que forma estas mudanças modulam as atividades reprodutivas nos peixes (PANKHURST; PORTER, 2003).

- DESENVOLVIMENTO DAS CÉLULAS GERMINATIVAS

Em teleósteos, a gametogênese é um processo altamente complexo, modulado pelas variações ambientais e fisiológicas (COWARD; BROMAGE, 2000). Por isso, o conhecimento das características morfológicas das gônadas constitui uma etapa básica e essencial para o entendimento da biologia reprodutiva das espécies (BAZZOLI; RIZZO, 1990; CREPALDI, 2006; CÁRDENAS et al., 2008).

Os ovários são revestidos externamente por um tecido conjuntivo, denominado de túnica albugínea, a qual emite projeções para o interior deste órgão formando as lamelas ovulíferas, que contêm oogônias e oócitos em diferentes estágios de desenvolvimento (ANDRADE et al., 2001; FRANÇA; GRIER; QUAGIO-GRASSIOTTO, 2010). Desta forma, o desenvolvimento das células germinativas pode ser classificado em foliculogênese, crescimento primário (previtelogênese), crescimento secundário (vitelogênese), maturação e por fim a ovulação (AMORIM, 2007).

Na foliculogênese, ocorre inicialmente a proliferação das oogônias que dão origem aos ninhos de células germinativas. Estas células são gradualmente individualizadas pelas células somáticas epiteliais, as pré-foliculares, que envolvem as oogônias separando-as. As oogônias entram em mitose mantendo esta população de células ou ainda entram em meiose formando os oócitos em diferentes fases da prófase (FRANÇA; GRIER; QUAGIO-GRASSIOTTO, 2010). Ambas as divisões celulares ocorrem no epitélio (GRIER; URIBE; PARENTI, 2007), além disso, todo epitélio compartilha características comuns, pois reveste uma superfície, lúmen ou ducto; repousa sobre uma membrana basal e é avascular (GRIER, 2000).

No crescimento primário, as células foliculares são adjacentes ao oócito, seguido da membrana basal e a teca, sendo uma camada vascularizada (SELMAN; WALLACE, 1989; GUIMARÃES; QUAGIO-GRASSIOTTO, 2001; QUAGIO-GRASSIOTTO; GUIMARÃES, 2003).

A vitelogênese, ou crescimento secundário é marcado pela deposição de grânulos de vitelo no citoplasma (PATIÑO; SULLIVAN, 2002; GONÇALVES; BAZOLLI; BRITO, 2006; MARTINS et al., 2010; SANTOS-SILVA et al., 2015).

Conforme ocorre o avanço desta etapa, o número de alvéolos corticais também aumenta (QUAGIO-GRASSIOTTO; WILDNER; GUIMARÃES-BASSOLI, 2014).

A maturação do oócito é caracterizada pela migração do núcleo para a região da micrópila (HONJI et al., 2009; MORRIS; SULLIVAN; GOVONI, 2011). Já a ovulação é o estágio em que o oócito é liberado para o lúmen ovariano para posterior fertilização, restando no ovário os folículos pós-ovulatórios (FRANÇA; GRIER; QUAGIO-GRASSIOTTO, 2010; QUAGIO-GRASSIOTTO et al., 2011).

Assim, a caracterização morfométrica e morfológica dos estágios de desenvolvimento das células germinativas bem como as fases reprodutivas é fundamental para a compreensão de que forma a temperatura atua nestes processos.

- CARACTERIZAÇÃO DO GRUPO

A ordem Cypriniformes é um grande grupo de peixes de água doce que estão distribuídos na América do Norte, África e Eurásia (MAYDEN, 2007). A maior diversidade destes animais está no sudeste da Ásia. Estão ausentes na Austrália e na América do Sul. Os membros desta ordem são popularmente conhecidos como peixes de aquário, especialmente os “minnows” e “loaches” (NELSON, 2006).

Dentro da família Cyprinidae existem vários membros que são importantes na aquariofilia, sendo muito coloridos e com enorme potencial ornamental (FANG; KULLANDER, 2009) também são utilizados como alimento de outros peixes e pesquisas biológicas. Algumas espécies são particularmente utilizadas, como a carpa comum (*Cyprinus carpio*), “goldfish” (*Carassius auratus*), e dânio ou zebrafish (*Danio rerio*). Esta última espécie tem sido usada largamente em pesquisas de desenvolvimento embrionário e na genética (NELSON, 2006).

Segundo Lele e Krone (1996), os “dânios” como são chamados popularmente, possuem inúmeras vantagens para serem utilizados em pesquisas laboratoriais como o baixo custo de manutenção, baixa exigência de espaço e rápido ciclo reprodutivo

Considerando o exposto acima, pretendeu-se estudar os efeitos da temperatura no ciclo ovariano de *D. aequipinnatus*, pois a exemplo do zebrafish

(*Danio rerio*), também é considerado um modelo experimental que está exposto a condições ambientais externas.

1.2. OBJETIVO GERAL

- Avaliar a influência de três diferentes temperaturas sobre o desenvolvimento ovariano de *Devario aequipinnatus*.

- **Objetivos específicos:**

- Descrever as fases reprodutivas com base nas alterações do epitélio germinativo;
- Descrever morfologicamente a foliculogênese e a oogênese;
- Determinar o comprimento médio da primeira maturação gonadal;
- Avaliar o tipo de desova;
- Comparar o desenvolvimento ovariano nas temperaturas de 18°C e 30°C (tratamento) com a temperatura de 24°C (controle);
- Avaliar o índice gonadosomático;
- Mensurar a área dos oócitos maduros.

1.3 REFERÊNCIAS

AMORIM, J. P. A. **Foliculogênese e caracterização celular das classes reprodutivas em *Pimelodus maculatus* (Siluriformes: Pimelodidae)**. 2007. 109 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) – Faculdade de Ciências Agrárias, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2007.

ANDRADE, R. F.; BAZZOLI, N.; RIZZO, E.; SATO, Y. Continuous gametogenesis in the neotropical freshwater teleost, *Bryconops affinis* (Pisces:Characidae). **Tissue & Cell**, London, v. 33, p. 524-532, 2001.

ARAÚJO, F. G. Adaptação do índice de integridade biótica usando a comunidade de peixes para o rio Paraíba do Sul. **Revista Brasileira de Biologia**, Rio de Janeiro, v. 58, p. 547-558, 1998.

BAZZOLI, N.; RIZZO, E. A comparative cytological and cytochemical study of the oogenesis in the Brazilian teleost fish species. **European Archives of Biology**, Leige, v. 101, p. 399-410, 1990.

BORGES, A. M. **Efeito da temperatura da água na produção de populações monossexo de tilápia do nilo (*Oreochromis niloticus*) da linhagem chitralada**. 2004. 65 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Agrárias) – Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília, Brasília, DF, 2004.

BROMAGE, N.; PORTER, M.; RANDALL, C. The environmental regulation of maturation in farmed finfish with special reference to the role of photoperiod and melatonin. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 197, p. 63-98, 2001.

CAHILL, A. E.; AIELLO-LAMMENS, M. E.; FISHER-REID, M. C.; HUA, X.; KARANEWSKY, C. J.; RYU, H. Y.; SBEGLIA, G. C.; SPAAGNOLO, F. WALDRON, J. B.; WARSI, O.; WIENS, J. J. How does climate change cause extinction?. **Biological Sciences**, New York, v. 280, p. 1 - 9, 2012.

CARDENAS, R.; CHÁVEZ, M.; GONZÁLEZ, J. L.; ALEY, P. ESPINOSA, J.; JIMENEZ-GARCIA, L. F. Oocyte structure and ultrastructure in the Mexican silverside fish *Chirostoma humboldtianum* (Atheriniformes: Atherinopsidae). **Revista Biologia Tropical**, v. 56, p. 1825-1835, 2008.

COMTE, L.; BUISSON, L.; DAUFRESNE, M.; GRENOUILLET, G. Climate-induced changes in the distribution of freshwater fish: observed and predicted trends. **Freshwater Biology**, Oxford, v. 58, p. 625-639, 2013.

COSSINS, A.; CRAWFORD, D. L. Fish as models for environmental genomics. **Nature**, Washington, v. 6, p. 324- 340, 2005.

COWARD, K.; BROMAGE, N. R. Reproductive physiology of female tilapia broodstock. **Fish Biology and Fisheries**, London, v. 10, p. 1-25, 2000.

CREPALDI, D. V.; FARIA, P. M. C.; TEIXEIRA, E. A.; RIBEIRO, L. P.; COSTA, A. A. P.; MELO, D. C.; CINTRA, A. P. R.; PRADO, S. A.; COSTA, F. A. A.; GRUMOND, M. L.; LOPES, V. E.; MORAES, V. E. **Biologia reprodutiva do surubim (*Pseudoplatystoma coruscans*). Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v. 30, p. 159-167, 2006.

DAVIES, B.; BROMAGE, N. The effects of fluctuating seasonal and constant water temperatures on the photoperiodic advancement of reproduction in female rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 205, p. 183– 200, 2002.

DEBNATH, D.; PAL, A. K.; SAHU, N. P.; BARUAH, K.; YENGKOKPAM, T. D.; MANUSH, S. M. Thermal tolerance and metabolic activity of yellowtail catfish *Pangasius pangasius* (Hamilton) advanced fingerlings with emphasis on their culture potential. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 258, p. 606-610, 2006.

DEVLIN, R.; NAGAHAMA, Y. Sex determination and sex differentiation in fish: an overview of genetic, physiological, and environmental influences. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 208, p. 191-364, 2002.

DORTS, J.; GRENOUEILLET, G.; DOUXFILS, J.; MANDIKI, S. N. M., MILLA, S.; SILVESTRE, F.; KESTEMONT, P. Evidence that elevated water temperature affects the reproductive physiology of the European bullhead *Cottus gobio*. **Fish Physiology and Biochemistry**, Dordrecht, v. 38, p. 389-399, 2012.

FANG, F.; KULLANDER, S.O. *Devario xyrops*, a new species of danionine fish from southwestern Myanmar (Teleostei: Cyprinidae). **Zootaxa**, Auckland, v. 2164, p.33–40, 2009.

FRANÇA, G. F.; GRIER, H. J.; QUAGIO-GRASSIOTTO. A new vision of the origin and the oocyte development in the ostariophysii applied to *Gymnotus sylvius* (Teleostei, Gymnotiformes). **Neotropical Ichthyology**, São Paulo, v. 8, p. 787-804, 2010.

FERRAZ, F. M.; CERQUEIRA, V. R. – Influência da temperatura na maturação gonadal de machos do robalo-flecha, *Centropomus undecimalis*. **Boletim do Instituto de Pesca**, São Paulo, v. 32, p. 73-83, 2010.

GONÇALVES, T. L.; BAZZOLI, N.; BRITO, M. F. G. Gametogenesis and reproduction of the matrinxã *Brycon orthotaenia* (GÜNTHER, 1864) (pisces: characidae) in the São Francisco river, Minas Gerais, Brazil. **Brazilian Journal of Biology**, São Carlos, v. 66, p. 513-522, 2006.

GRIER, H. J. Ovarian germinal epithelium and folliculogenesis in the common snook *Centropomus undecimalis* (Teleostei: Centropomidae). **Journal of Morphology**, New York, v. 243, p. 265–281, 2000.

GRIER, H. J.; URIBE, M. C.; PARENTI, L. R. Germinal Epithelium, Folliculogenesis, and Postovulatory Follicles in Ovaries of Rainbow Trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum, 1792) (Teleostei, Protacanthopterygii, Salmoniformes). **Journal of Morphology**, New York, v. 268, p. 293-310, 2007.

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

HONJI, R. M.; NARCIZO, A. M.; BORELLA, M. I.; ROMAGOSA, E.; MOREIRA, R. G. Patterns of oocyte development in natural habitat and captive *Salminus hilarii* Valenciennes, 1850 (Teleostei: Characidae). **Fish Physiology and Biochemistry**, Dordrecht, v. 35, p.109–123, 2009.

IPCC. INTERGOVERNMENTAL PANEL ON CLIMATE CHANGE. ATMOSPHERE AND SURFACE. In: **Climate change: the physical science Basis**. 2013. Cap. 2, p. 22. Disponível em < http://www.climatechange2013.org/images/report/WG1AR5_Chapter02_FINAL.pdf>. Acesso em: 01 maio 2014.

IPCC. INTERGOVERNMENTAL PANEL ON CLIMATE CHANGE. FRESHWATER RESOURCES. In: **Climate change, Impacts, adaptation and vulnerability**. 2014. Cap. 3, p. 4. Disponível em < http://ipcc-wg2.gov/AR5/images/uploads/WGIIAR5-Chap3_FGDall.pdf>. Acesso em: 01 maio 2014.

KING, H. R.; PANKHURST, N. W.; WATTS, M.; PANKHURST, P. M. Effect of elevated summer temperatures on gonadal steroid production, vitellogenesis and egg quality in female Atlantic salmon. **Journal of Fish Biology**, Chichester, v. 63, p. 153-167, 2003.

KUBITZA, F. **Tilápia: tecnologia e planejamento na produção comercial**. Jundiaí: F. Kubitza, 2000. 285 p.

LELE, Z.; KRONE, P. H., The zebrafish as a model system in developmental, toxicological and transgenic research. **Biotechnology Advances**, New York, v. 14, n. 1, p. 57-72, 1996.

MAITLAND, P. The conservation of freshwater fish: past and present experience. **Biological Conservation**, v. 72, p. 259- 270, 1995.

MARTINS, Y. S.; MOURA, D. F.; SANTOS, G. B.; RIZZO, E.; BAZZOLI, N. Comparative folliculogenesis and spermatogenesis of four teleost fish from a Reservoir in south-eastern Brazil. **Acta Zoologica**, Stockholm, v. 91, p. 466 – 473, 2010.

MAYDEN, R. L., TANG, K. L.; CONWAY, K. W.; FREYHOF, J.; CHAMBERLAIN, S., HASKINS, M.; SCHNEIDER, L.; SUDKAMP, M.; WOOD, R. M.; AGNEW, M., BUFALINO, A., SULAIMAN, Z., MIYA, M.; SAITOH, K.; HE, S. Phylogenetic relationships of danio within the order cypriniformes: a

framework for comparative and evolutionary studies of a model species.

Journal of experimental zoology, Hoboken, v. 308B, p. 642–654, 2007.

MORRIS-JUNIOR, J. A.; SULLIVAN, C. V.; GOVONI, J. J. Oogenesis and spawn formation in the invasive lionfish, *Pterois miles* and *Pterois volitans*.

Scientia Marina, Madrid, v. 75, p.147-154, 2011.

NELSON J. S. **Fishes of the world**. Hoboken: John Wiley, 2006. 601 p.

NÓBREGA R. H.; GREEBE C. D.; KANT H. V.; BOGERD J.; FRANCA L. R.; SCHULZ R. W. Spermatogonial Stem Cell Niche and Spermatogonial Stem Cell Transplantation in Zebrafish. **Plos One**, v. 5, e12808, 2010.

PANKHURST, N. W.; PURSER, G.J.; VAN DER KRAAK, G.; THOMAS, P. M.; FORTEATH, G. N. R. Effect of holding temperature on ovulation, egg fertility, plasma levels of reproductive hormones and in vitro ovarian steroidogenesis in the rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 146, p. 277-290, 1996.

PANKHURST, N. W.; PORTER, M. J. R. Cold and dark or warm and light: variations on the theme of environmental control of reproduction. **Fish Physiology and Biochemistry**, New York, v. 28, p. 385-389, 2003.

PATÍÑO, R.; SULLIVAN, C. V. Ovarian follicle growth, maturation, and ovulation in teleost fish. **Fish Physiology and Biochemistry**, Dordrecht, v. 26, p. 57–70, 2002.

PAUL, B.; FARUQUE, MD. H.; AHSAN, A. D. Consequences of climate change on fish biodiversity in the River Turag, Bangladesh: a community perception study. **World Journal of Fish and Marine Sciences**, Dubai, v.6, n. 2, p. 136-141, 2014.

PORTNER, H. O. Climate variations and the physiological basis of temperature dependent biogeography: systemic to molecular hierarchy of thermal tolerance in animals. **Comparative Biochemistry and Physiology**, Philadelphia, v. 132, p. 739-761, 2002.

QUAGIO-GRASSIOTO, I.; GUIMARÃES A. C. D. Follicular epithelium, theca and egg envelope formation in *Serrasalmus spilopleura* (Teleostei, Characiformes, Characidae). **Acta Zoological**, v. 84, p. 121-129, 2003.

QUAGIO-GRASSIOTTO, I.; GRIER, H.; MAZZONI, T. S.; NOBREGA, R. H.; AMORIM, J. P. A. Activity of the ovarian germinal epithelium in the freshwater catfish, *Pimelodus maculatus* (Teleostei : Ostariophysi: Siluriformes) : Germline Cysts, Follicle Formation and Oocyte Development. **Journal of Morphology**, New York, v. 272, p. 1290-1306, 2011.

QUAGIO-GRASSIOTTO, I.; WILDNER, D. D.; GUIMARÃES-BASSOLI, A. C. D. A cytochemical approach to describe oocyte development in the freshwater

ostariophysan, *Serrasalmus maculatus* (Characiformes). **Micron**, Oxford, v. 60, p. 18-28, 2014.

SANTOS- SILVA, A.; SIQUEIRA-SILVA, D.; SILVEIRA-NINHAUS, A.; SILVERIA-VERÍSSIMO, R. Oogenesis in *Laetacara araguaiae* (Ottoni and Costa, 2009) (Labriformes: Cichlidae). **Zygote**, p. 1-9, 2015

SELMAN, K.; WALLACE, R.A. Cellular aspects of oocyte growth in teleosts. **Zoological Science**, Tokyo, v. 6, p. 211-231, 1989.

SIQUEIRA-SILVA, D.; SILVA, A.; SILVEIRA-NINHAUS, A.; SILVEIRA-VERÍSSIMO, R. The effects of temperature and busulfan (Myleran) on the yellowtail tetra *Astyanax altiparanae* (Pisces, Characiformes) spermatogenesis. **Theriogenology**, v. 84, p. 1033–1042, 2015.

SOUZA, F.L. Uma revisão sobre padrões de atividade, reprodução e alimentação de cágados brasileiros (Testudines, Chelidae). **Phyllomedusa**, v. 3, p. 15-27, 2004

VAZZOLER, A. E. A. M. **Biologia da reprodução de peixes teleósteos: teoria e prática**. Maringá: Ed da UEM, 1996.

WIKELSKI, M; COOKE, S. J. Trends in ecology and evolution. **Conservation physiology**, v. 21, p. 38-46, 2006.

CAPÍTULO 2 – CICLO REPRODUTIVO DE *Devario aequipinnatus* COM ÊNFASE NA FOLICULOGÊNESE E OOGÊNESE.

RESUMO:

Dentro da família Cyprinidae existem várias espécies importantes na culinária, aquarismo e em pesquisas biológicas. Como representante desta família, *Devario aequipinnatus* possui inúmeras vantagens como baixo custo de manutenção, baixa exigência de espaço e rápido ciclo reprodutivo, podendo ser usado em diversas áreas da biologia. Desta forma, o presente estudo teve como objetivo descrever morfolologicamente a foliculogênese, oogênese e fases reprodutivas. Foram utilizadas exemplares fêmeas e adultas de *D. aequipinnatus*, os ovários foram coletados e processados conforme técnicas usuais para microscopia de luz. Na foliculogênese, as oogônias, são as menores células da linhagem germinativa, podem permanecer quiescentes no epitélio ou entrar em divisão mitótica originando novas células, dando continuidade a esta população ou ainda podem entrar em divisão meiótica passando pelas diferentes fases da prófase I. No estágio de previtelogênese, os oócitos foram caracterizados principalmente pela intensa síntese de RNA, perda gradual da basofilia e aumento no diâmetro dos oócitos. Já o estágio de vitelogênese foi marcado principalmente pela incorporação dos grânulos de vitelo. Os oócitos maduros foram caracterizados pela migração do núcleo para a região da micrópila. Também foram observados folículos pós-ovulatórios e atresícos. As fases reprodutivas foram classificadas em Regeneração, Desenvolvimento inicial e final, Apto à desova e Regressão. Desta forma, o processo de formação das células germinativas torna-se essencial para o entendimento da biologia reprodutiva dos organismos fornecendo conhecimento do ciclo reprodutivo e servindo de subsídios para propostas de gestão das espécies.

PALAVRAS-CHAVE: Reprodução. Danio. Morfologia.

ABSTRACT:

Within the Cyprinidae family there are several important species in culinary, aquarium and biological researches. As a representative of this family, *Devario aequipinnatus* present numerous advantages as low maintenance costs, low space requirement and fast reproductive cycle and can be used in many areas of biology. Thus, this study aimed to describe morphologically folliculogenesis, oogenesis and reproductive phases. Females and adult specimens of *D. aequipinnatus* were used, the ovaries were collected and processed according to usual techniques for light microscopy. The collected material was processed as usual for light microscopy techniques. In folliculogenesis, the oogonia, are the smaller cells the germ line, which can remain quiescent in the epithelium or enter in mitotic division originating new cells, continuing to population them or they may enter meiotic division going through prophase I phases. The previtellogenesis stage, oocytes were mainly characterized by intense RNA synthesis, gradual loss of basophily and increase in the diameter of the oocytes. The vitellogenesis stage was mainly marked by the incorporation of yolk granules. The mature oocytes were defined by migration to the nucleus region of the micropyle. It was also observed post-ovulatory follicles and atresia. Reproductive phases were classified as Regenerating, Initial and Final Developing, Spawning capable and Regressing. Thus, the process of formation of germ cells it is essential to understand the reproductive biology of organisms providing knowledge of the reproductive cycle and serving as subsidies for species management proposals.

Keywords: Reproduction. Danio. Morphology.

2.1 INTRODUÇÃO

A família Cyprinidae possui a maior diversidade de peixes dulcícolas do mundo (NELSON, 1994; FU et al., 2003) em torno de 3.008 espécies (ESCHMEYER; FONG, 2015), sendo distribuídos em quase todo o mundo e ausentes na Austrália e Antártica (MAYDEN, 1991). Dentro da família existem várias espécies importantes na culinária, aquarismo e pesquisas biológicas. Algumas espécies são amplamente usadas como a carpa comum (*Cyprinus carpio*), goldfish (*Carassius auratus*) e zebra fish (*Danio rerio*) (NELSON, 2006) sendo esta última espécie um excelente modelo biológico utilizado nas áreas de genética, embriologia (NELSON, 2006), toxicologia (LELE; KRONE, 1996; ARUNACHALAM et al., 2013) biologia molecular, neurociência e biomedicina (ARUNACHALAM et al., 2013). Desta forma a espécie *Devario aequipinnatus* pertencente à mesma família possui inúmeras vantagens para ser utilizada como baixo custo de manutenção, baixa exigência de espaço e rápido ciclo reprodutivo (LELE; KRONE, 1996) sendo assim torna-se também um importante modelo biológico para pesquisas científicas, no entanto pouco se tem conhecimento sobre sua biologia reprodutiva em relação a descrição morfológica das células.

Desta forma, o estudo e caracterização das células germinativas em seus diferentes estágios assim como a distribuição e frequência nos ovários permitem inferir de forma ocorre o desenvolvimento ovariano e tipo de desova da espécie (LIMA et al., 1991) tornando a histologia uma importante ferramenta para o conhecimento da biologia reprodutiva (WEST, 1990). Segundo Selman; Wallace (1989) o crescimento destas células ocorre de maneira diferente nos diversos grupos de peixes assim a compreensão do desenvolvimento do processo de gametogênese possibilita o entendimento de maturação e fertilização.

Portanto, o presente estudo teve como objetivo compreender de que forma ocorre o desenvolvimento das células germinativas em fêmeas de *D. aequipinnatus*, descrevendo morfológicamente a foliculogênese, oogênese e fases reprodutivas.

2.2 MATERIAL E MÉTODOS

Exemplares fêmeas e adultas (n=70) de *Devario aequipinnatus* (Fig. 1a), foram obtidas a partir de atacadistas de peixes ornamentais da região de Uberlândia - MG, posteriormente encaminhados para o Laboratório de Ictiologia Neotropical – Lineo, Unesp, Ilha Solteira, SP, onde permaneceram durante 30 dias em fase de aclimação. Os animais foram alimentados diariamente com ração comercial Super Red composta por 38% de proteína bruta, 16% de matéria mineral e 10% de umidade. Os animais foram mantidos em fotoperíodo 12C:12E e foi realizada a limpeza dos aquários diariamente, com troca de 10 a 20% da água. Como procedimento para a manutenção da temperatura e qualidade da água, foram utilizados chillers, aeradores, termostatos e filtros.

Os animais foram coletados, anestesiados e eutanasiados com solução alcoólica com 0,2g/l de benzocaína de acordo com o Protocolo aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (11/2013/CEUA). Após a anestesia os animais tiveram a massa (g), comprimento total (cm) e padrão (cm) aferidos. Posteriormente foi realizada uma incisão na região ventral do animal, no sentido pôstero – anterior expondo toda a cavidade abdominal para a retirada dos ovários.

Os ovários coletados foram seccionados transversalmente na região mediana e os fragmentos foram fixados em solução de paraformaldeído a 4% e glutaraldeído a 2% em tampão fosfato Sorensen, 0,1M a pH 7,2, por pelo menos 24 horas. Após a fixação, os fragmentos ovarianos foram desidratados em solução alcoólica, em série crescente de concentração e embebidos em glicol metacrilato (Technovit 7100/historesina), seccionados a 3,0 µm de espessura em micrótomo equipado com navalha de vidro LEICA RM 2245 e corados com Hematoxilina e Eosina. Para a medição do diâmetro dos oócitos e fotoprocessamento foi utilizado microscópio óptico Zeiss equipado com câmera AXIOCAM-MRc5. O processamento e a análise foram realizados no Laboratório de Ictiologia Neotropical, Departamento de Biologia e Zootecnia – UNESP/FEIS.

A classificação das fases de desenvolvimento ou ciclo ovariano foi realizada com base nas características macroscópicas e microscópicas dos ovários e das células germinativas presentes segundo critérios estabelecidos por Brown-Peterson et al. (2011).

O comprimento médio da primeira maturação gonadal foi estimado através do comprimento padrão do menor indivíduo dentre as coletas considerado apto a se reproduzir, com exceção dos animais imaturos.

O tipo de desova foi determinado de acordo com os estágios das células presentes seguindo a classificação proposta por Murua; Saborido-Rey (2003).

Figura 1 - a) Exemplar fêmea de *Devario aequipinnatus*.



Fonte: Raphael Costa

2.3 RESULTADOS

Os ovários de *D. aequipinnatus* são órgãos pares, com coloração que pode variar conforme a fase de desenvolvimento (Fig. 2b). Estes órgãos se unem na porção caudal e são irrigados pelos vasos sanguíneos, localizados na cavidade celomática, sendo envolvidos pelo tecido conjuntivo, denominada de túnica albugínea, que se funde a cavidade celomática formando uma só camada (Fig. 2a).

Os ovários são compostos por células somáticas e células germinativas. Estas células somáticas são inicialmente denominadas de pré-foliculares (Fig. 3a-c, e-h) somente após as sucessivas divisões mitóticas e formação do folículo ovariano serão chamadas de células foliculares (Fig. 3i) e darão suporte a todo desenvolvimento ovariano. As células germinativas passarão por diferentes estágios de desenvolvimento e até o momento da liberação para o lúmen ovariano (Figs.3 e-f) também denominado de oocitação.

- **Foliculogênese:**

O processo de foliculogênese inicia-se com as primeiras e menores células da linhagem germinativa que são as oogônias que podem ser identificadas de três formas de acordo com alterações das características morfológicas.

Desta forma, as oogônias A-indiferenciadas são definidas como células com núcleo claro e alongado e nucléolo descentralizado e fortemente basófilo, podem permanecer quiescentes no epitélio ou ainda entrar no processo mitótico (Fig. 3b) originando as oogônias A-diferenciadas. Este segundo tipo de células, podem ser encontradas de forma isolada (Fig. 3a) ou em cistos (Fig. 3b) caracterizadas pelo núcleo bem arredondado e nucléolo também fortemente basófilo. Estas células posteriormente proliferam se em oogônias B-diferenciadas sendo células arredondadas, com núcleo menos basófilo e podendo apresentar um ou dois nucléolos (Fig. 3c).

As oogônias-B se diferenciam em oócitos que iniciam o processo meiótico estando dentro dos cistos. Nos cistos, os oócitos podem ser encontradas na mesma fase da prófase meiótica (Fig. 3d).

Os oócitos são diferenciados pela compactação da cromatina, sendo classificados em leptóteno, com nucléolo descentralizado, núcleo claro e inicia-se a condensação da cromatina (Fig. 3e); em zigóteno ocorre uma maior pigmentação da cromatina tornando-se mais evidente, o nucléolo pode estar central ou na periferia (Fig. 3f); em paquíteno pode ter um ou mais nucléolos, o núcleo é mais claro destacando o pareamento dos cromossomos homólogos com uma coloração mais evidente (Fig. 3g) e na última fase da prófase meiótica, os oócitos em diplóteno são envolvidos pelas células pré – foliculares que individualiza-os.

Os oócitos em diplóteno com inúmeros nucléolos na periferia nuclear, são circundados pelas células pré-foliculares, isolando-os do cisto, nesta etapa já é possível observar a membrana basal (Fig. 3h) assim passam a ser denominados de folículo ovariano e são circundados pelas células agora denominadas de foliculares, o citoplasma é mais basófilo do que a fase de diplóteno e núcleo bem evidenciado (Fig. 3i) desta forma o folículo dá prosseguimento ao ciclo reprodutivo.

- **Estágios das células germinativas:**

Com o término da foliculogênese, as células germinativas entram propriamente em crescimento primário ou previtelogênese em seguida crescimento secundário ou vitelogênese e por fim maturação final. Também são encontrados folículos pós ovulatórios e oócitos atrésicos. Os estágios das células germinativas estão descritos abaixo:

a) Oócitos previtelogênicos iniciais: as células possuem o citoplasma intensamente basófilo devido à proliferação de organelas, o núcleo redondo com coloração rósea e clara e os inúmeros nucléolos são dispostos na periferia. As células foliculares são pavimentosas devido ao formato do núcleo ser achatado e encontram-se distantes umas das outras, além de serem escassas (Fig. 4a-b). Os oócitos ainda são pequenos com diâmetro de $118,6 \mu\text{m} \pm 20,5$ quando comparados ao final do desenvolvimento e podem ser observados os corpúsculos de Balbiniani que tem aparência de fissuras (Fig. 4b).

b) Oócitos previtelogênicos finais: Com o avanço do desenvolvimento celular, o citoplasma torna-se menos basófilo, com inúmeros nucléolos (Fig. 4c). Neste estágio há o aparecimento dos alvéolos corticais em diferentes tamanhos, encontrando-se em grande número e dispostos por todo o citoplasma (Fig. 4c). E também há surgimento da zona radiata que é uma camada estriada e acelular com coloração rósea medindo $4,1 \mu\text{m}$ (Fig. 4d). Inúmeras células foliculares pavimentosas são observadas, entretanto diferente da etapa anterior, estão mais próximas umas das outras (Fig. 4d). Estes oócitos medem em torno de $246,4 \mu\text{m} \pm 42,2$ de diâmetro sendo que também estão presentes as células da teca (Fig. 4 b).

c) Oócitos vitelogênicos iniciais: As células aumentam em tamanho cada vez mais, medindo em torno de $421,1 \mu\text{m} \pm 63,3$ de diâmetro. Há a deposição dos grânulos de vitelo ocupando o centro do citoplasma, concomitantemente os alvéolos corticais em grande número também se encontram presentes e se dispõem migrando para periferia celular (Fig. 4e). As células foliculares ainda permanecem pavimentosas, porém mais próximas e a zona radiata mede $4,5 \mu\text{m}$ (Fig. 4 f).

d) Oócitos vitelogênicos finais: Neste estágio, o núcleo é central, os grânulos de vitelo ocupam o citoplasma e os alvéolos corticais se concentram na periferia do oócito (Fig. 4g). Os oócitos aumentam em tamanho com média de $590,4 \mu\text{m} \pm 108,3$ de diâmetro e os nucléolos que anteriormente se encontravam na posição periférica começam a ocupar todo o núcleo (Fig. 4g). A zona radiata torna-se mais espessa $4,67 \mu\text{m}$ (Fig. 4h) e as células foliculares permanecem pavimentosas (Fig. 4h).

e) Oócitos maduros: Por fim, este é o último estágio de desenvolvimento assim como o máximo de tamanho no qual as células podem atingir o comprimento de $721,1 \mu\text{m} \pm 59,8$ e largura de $586,2 \mu\text{m} \pm 57,2$ desta forma os grânulos de vitelo ocupam todo o espaço citoplasmático, os alvéolos permanecem na periferia (Fig. 4i-j) e a zona radiata atinge sua máxima espessura $6,81 \mu\text{m}$ (Fig. 4j). As células foliculares tornam-se cuboides (Fig. 4j).

O evento característico deste estágio é a migração da vesícula germinativa (núcleo) em direção à micrópila (Fig. 4i e k).

f) Oócitos atrésicos: Estes oócitos tornam-se flácidos e podem ser encontrados em qualquer momento do ciclo reprodutivo. Eles são caracterizados pela desorganização do citoplasma no qual ocorre a liquefação dos grânulos de vitelo e dos alvéolos corticais, também há a descontinuidade da zona radiata que se torna mais fina. As células foliculares se hipertrofiam apresentando um aspecto mais espesso desta camada (Fig. 4l). Posteriormente estes oócitos serão reabsorvidos.

g) Folículos pós ovulatórios: Estes folículos são formados pelo conjunto de células foliculares, células da teca e a membrana basal. Após a liberação dos oócitos maduros no processo de oocitação, permanecem estas camadas nas lamelas ovulíferas formando uma só camada devido ao lúmen ovariano se tornar irregular e podem ser observados os vasos sanguíneos ao redor (Fig. 4l).

- **Fases reprodutivas:**

As estruturas dos ovários sofrem modificações de acordo com o desenvolvimento das células germinativas por isso podem ser encontrados oócitos nos estágios de previtelogênese, vitelogênese, maduros, atrésicos e folículos pós ovulatórios. Desta forma as fases reprodutivas são classificadas conforme as alterações que o epitélio germinativo associado aos estágios de desenvolvimento ovariano como também as modificações que ocorrem nas lamelas ovulíferas.

a) Imaturo: Os ovários são espessos (Fig. 5a) há somente oócitos previtelogênicos iniciais com citoplasma intensamente basófilo, núcleo claro e nucléolos na periferia, como também oogônias em cistos ou isoladas e também as lamelas ovulíferas em formação (Fig. 5b). Nota-se poucas oogônias e oócitos profásicos nesta etapa.

b) Desenvolvimento: Para melhor entendimento e detalhamento desta fase, subdividimos as em duas:

- **Desenvolvimento inicial:** Os ovários apresentam apenas oócitos em crescimento primário, como oócitos previtelogênicos iniciais e previtelogênicos finais (Fig. 6 a-c). Esta fase é marcada pelo aparecimento dos alvéolos corticais nos oócitos previtelogênicos finais que estão distribuídos no citoplasma (Fig. 6c).

- **Desenvolvimento final:** Nesta subfase, inicia-se o crescimento secundário com oócitos vitelogênicos iniciais, ou seja, há o início da incorporação de pequenos grânulos de vitelo no centro do citoplasma enquanto os alvéolos migram para a periferia (Fig. 6d-e), observa-se oócitos em vitelogênese final (Fig. 6f). Também estão presentes oócitos previtelogênicos iniciais e finais (Fig. 6d).

c) Apto à desova: Nos ovários podem ser encontrados oócitos de reserva como previtelogênicos iniciais e finais, oócitos maduros e oócitos atrésicos, os quais podem ser identificados em qualquer fase de desenvolvimento (Fig. 7a-b). Observa-se nos oócitos maduros o máximo crescimento destas células (Fig. 7d) e também podem estar presentes os folículos pós ovulatórios, estes folículos indicam que o animal está pronto para reprodução e já desovou.

d) Regressão: Nesta fase, os ovários tornam-se flácidos e há um maior espaço entre lamelas ovulíferas devido a liberação dos oócitos maduros. Os ovários têm oócitos previtelogênicos mas principalmente há uma grande quantidade de oócitos atrésicos e folículos pós-ovulatórios (Fig. 8a). Esta fase marca o fim do ciclo reprodutivo (Fig. 8c-d).

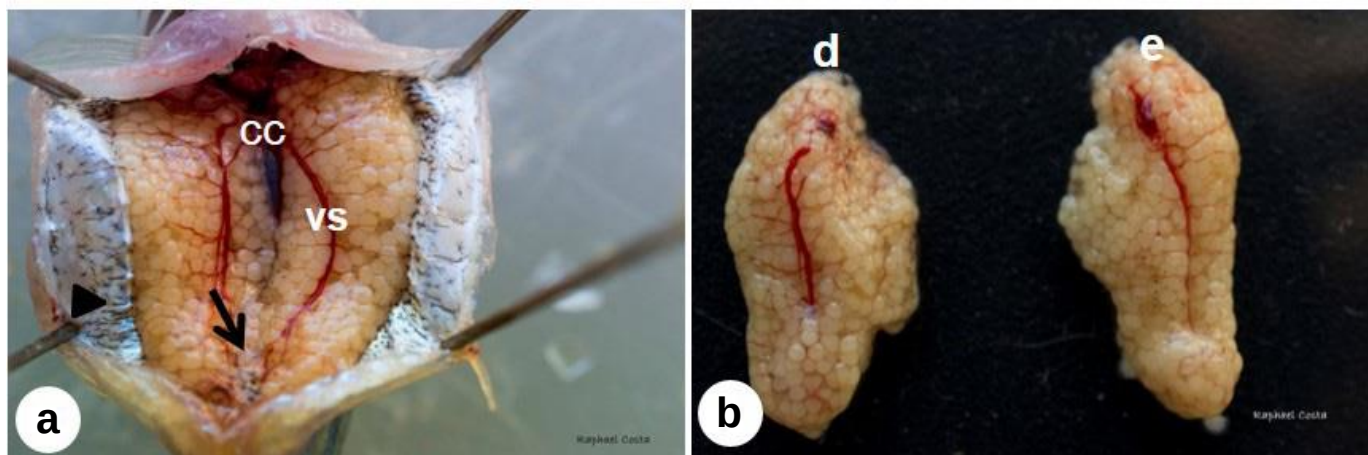
e) Regeneração: Nesta fase, nos ovários ocorrem a reestruturação das lamelas ovulíferas (Fig. 9a) e há uma grande quantidade de ninhos e cistos com células germinativas (Fig. 9b-d). Há a proliferação mitótica de oogônias e formação dos oócitos profásicos, para a renovação do novo ciclo reprodutivo. Observa-se inúmeras oogônias (Fig. 9b-c) além de predominar apenas oócitos previtelogênicos iniciais (Fig. 9a-c).

- **Tipo de desova e comprimento médio da primeira maturação gonadal.**

O tipo de desova em *D. aequipinnatus* é classificado como desova parcelada aos lotes, pois dentro do mesmo ovário existem diferentes estágios de desenvolvimento das células germinativas, como observado podem ser identificados tanto oócitos em previtelogênese como em vitelogênese e maduros. A presença dos folículos pós ovulatórios indica que a espécie já desovou um lote de oócitos maduros e já possui oócitos em estágio anterior (vitelogênicos) para a próxima desova desta forma a desova ocorre de acordo com o amadurecimento dos oócitos (Fig. 10 a-d).

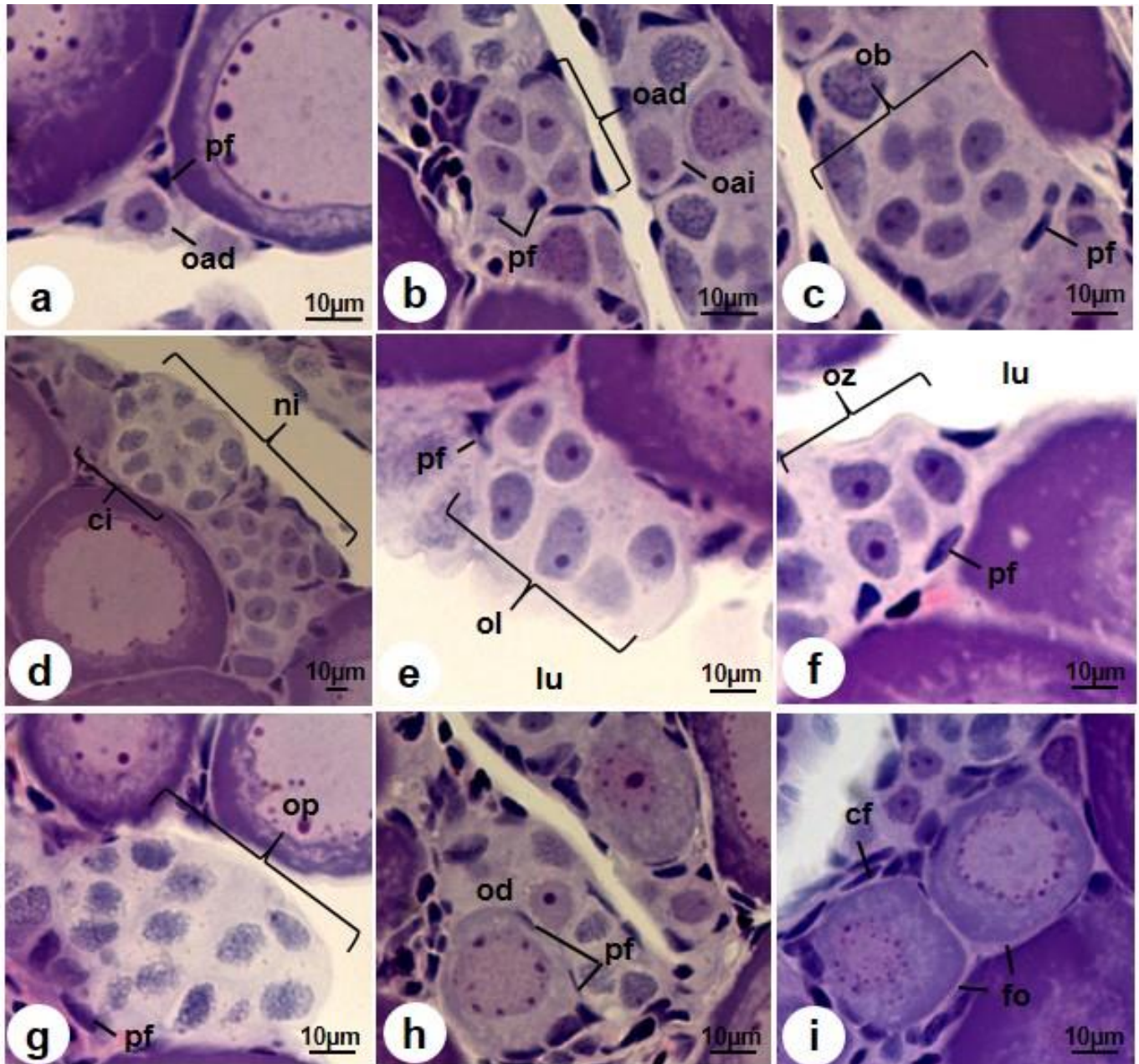
O comprimento médio da primeira maturação gonadal da espécie, ou seja, a determinação do comprimento total em que todos os indivíduos já iniciaram o ciclo reprodutivo foi de 4,2 centímetros.

Figura 2 - Ovários de *Devario aequipinnatus*. a) Ovários localizados na cavidade celomática; b) Ovários: lado direito (D) e lado esquerdo (E). **Legenda:** cc: cavidade celomática; vs: vasos sanguíneos; Seta: ovários fundidos na porção caudal; Cabeça de seta: cavidade celomática.



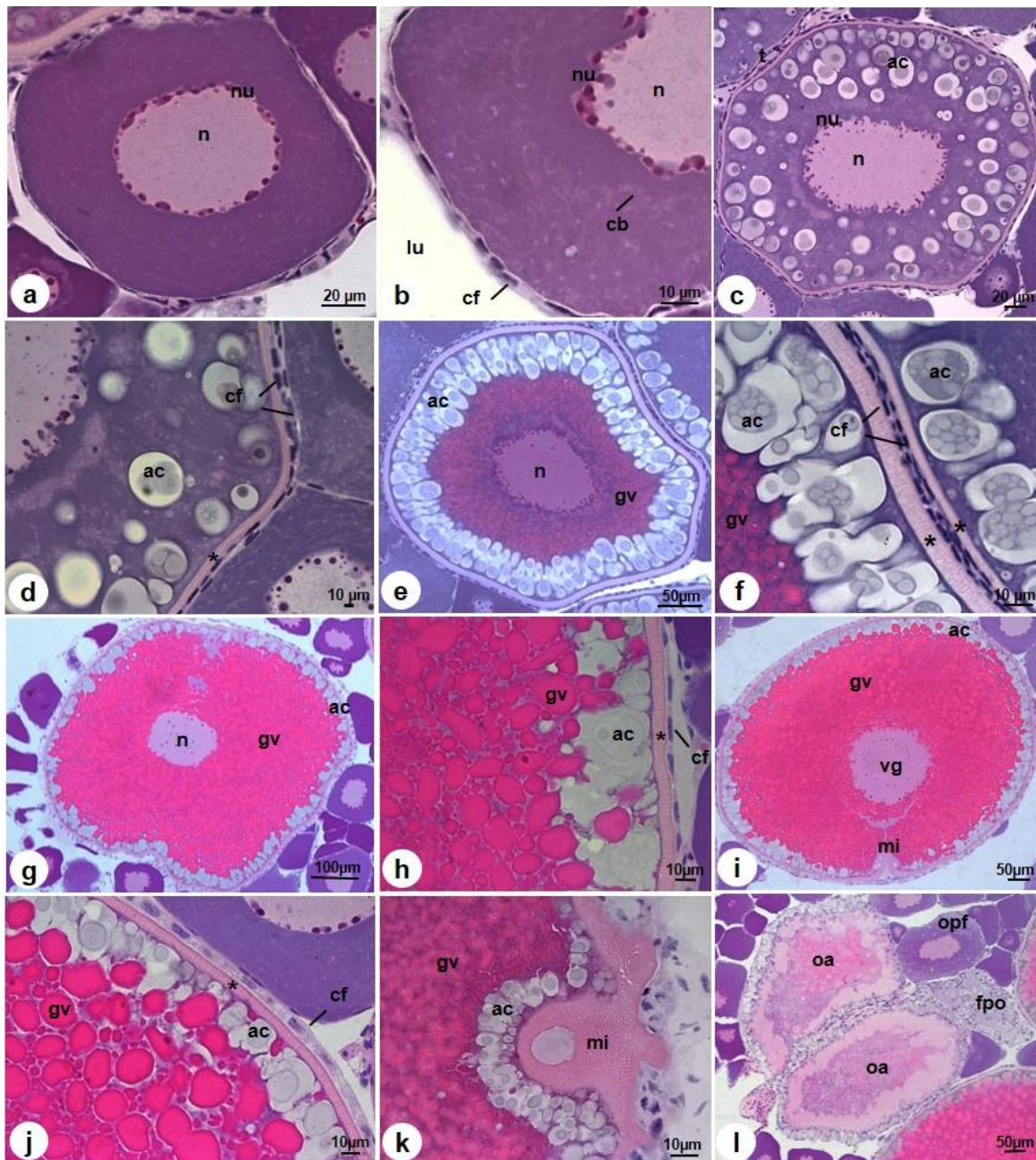
Fonte: Raphael Costa

Figura 3 - Folliculogênese em *D. aequipinnatus*. a) Oogônia A-diferenciada (oad); b) Cisto de oogônias A- diferenciadas (oad) e oogônia A-indiferenciada isolada (oai); c) Cisto de oogônias B-diferenciadas (ob); d) Cistos (ci) dentro dos ninhos germinativos (ni); e) Cisto com oócitos em leptóteno (ol); f) Oócitos em zigóteno (oz); g) Oócitos em paquíteno (op); h) Oócitos em diplóteno (od); i) Folículo ovariano (fo). **Legendas:** pf: células pré-foliculares; lu: lúmen. **Coloração:** hematoxilina/eosina.



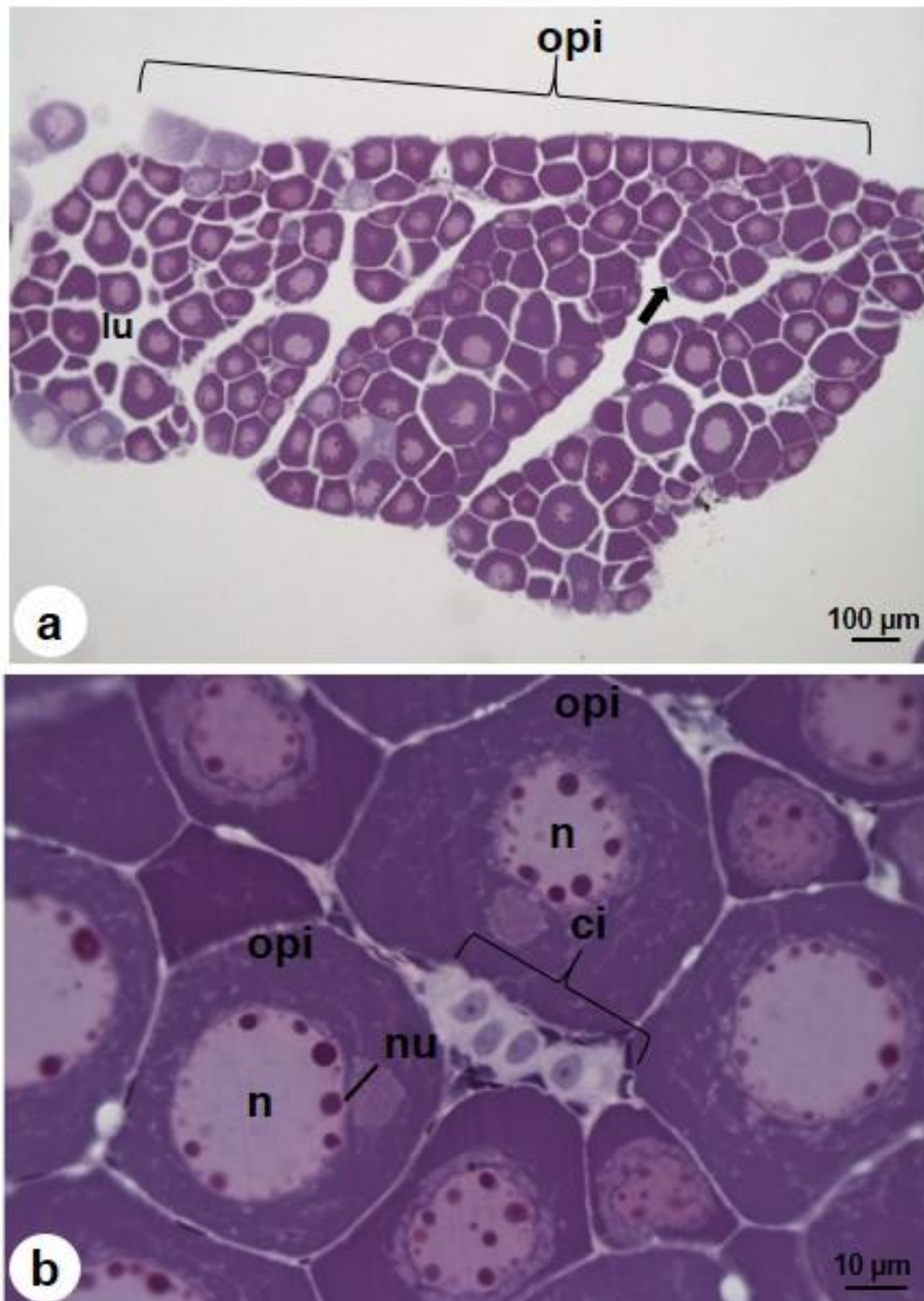
Fonte: própria autora

Figura 4 - Oogênese em *D. aequipinnatus*. a) Oócito previtelogênico inicial com nucléolos (nu) dispostos na periferia; b) Células foliculares pavimentosas (cf); c) Oócito previtelogênico final com os alvéolos corticais (ac) em todo o citoplasma; d) Comparação das celulares foliculares entre o oócito previtelogênico final e inicial que permanecem pavimentosas; e) Oócito vitelogênico inicial com alvéolos corticais na periferia (ac) e grânulos de vitelo centralizados (gv); f) Comparação das células foliculares e zona radiata entre o oócito vitelogênico inicial e previtelogênico final ; g) Oócito vitelogênico final com núcleo central (n) e acúmulo dos grânulos de vitelo (gv); h) Células foliculares pavimentosas; i) Oócito maduro com migração da vesícula germinativa (vg) em direção à micrópila (mi); j) Células foliculares cuboides; k) detalhe da micrópila; l) Oócitos atresícos (ao) e folículo pós ovulatório (fpo). **Legendas:** lu: lúmen ovariano; cb; Corpúsculos de Balbiani; t: teca; asterisco: zona radiata; opf: oócito previtelogênico final. **Coloração:** hematoxilina/eosina.



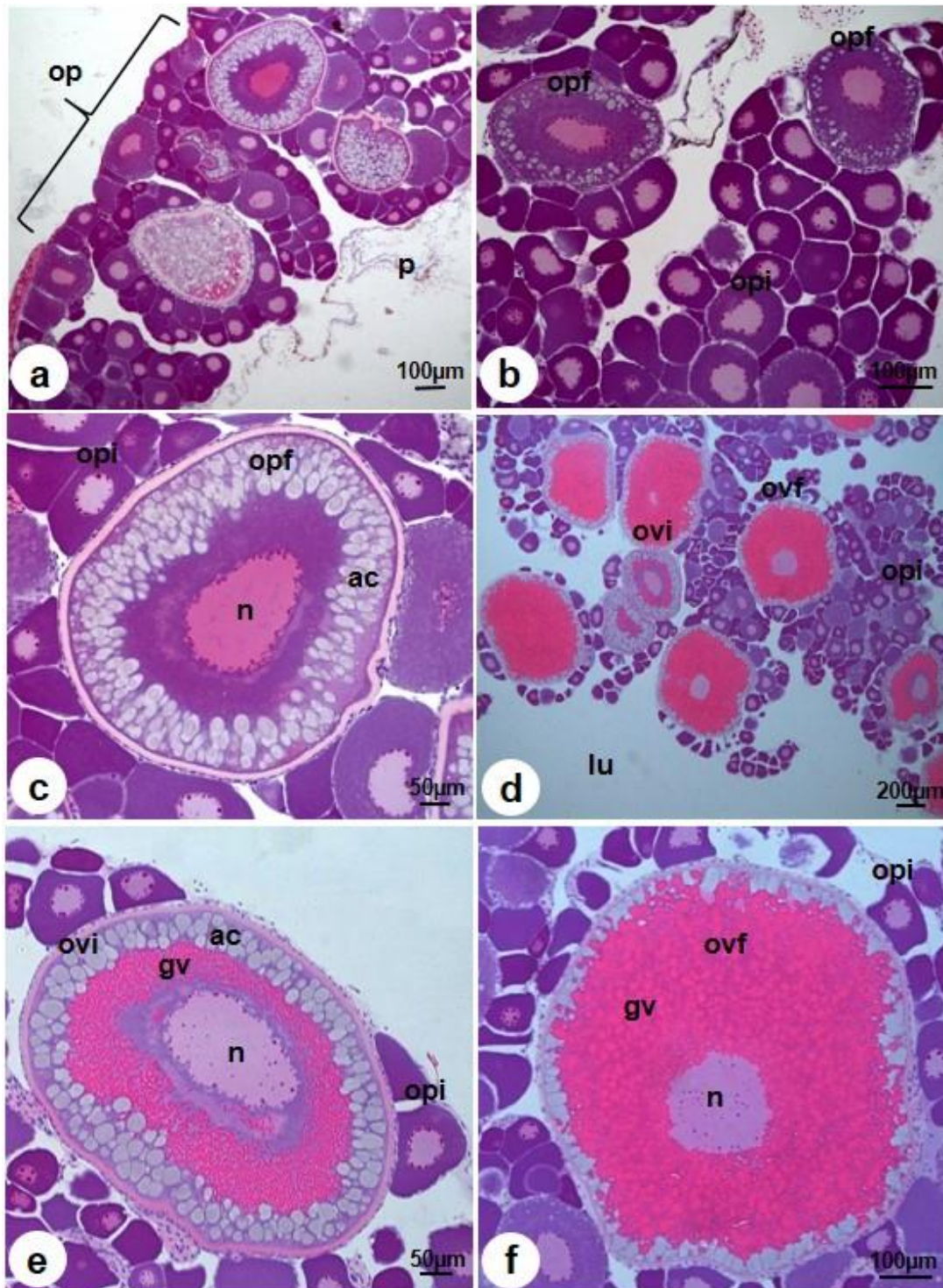
Fonte: própria autora

Figura 5 - Ovários de *D. aequipinnatus* em fase Imatura. a) Ovário somente com oócitos previtelogênicos (opi) com organização das lamelas ovulíferas (seta grossa); b) Detalhe dos oócitos previtelogênicos iniciais (opi) com nucléolos (nu) na periferia do núcleo (n) e cisto com oogônias (ci). **Legendas:** lu (lúmen ovariano). **Coloração:** hematoxilina/eosina.



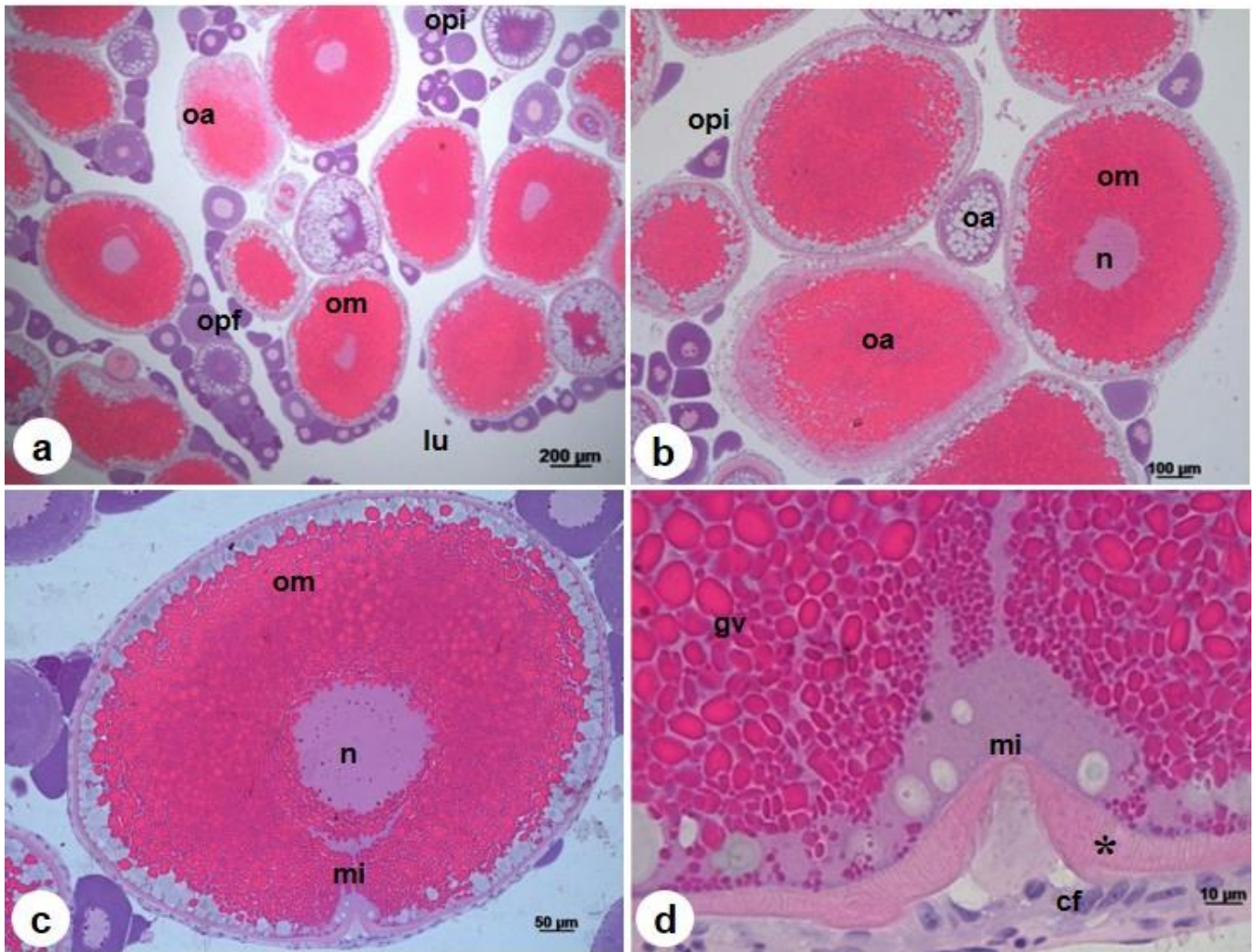
Fonte: própria autora

Figura 6 - Ovários de *D. aequipinnatus* em fase de Desenvolvimento. (a-c) Ovário em subfase de Desenvolvimento inicial. Ovário com oócitos previtelogênicos iniciais (opi) e finais (opf); (d-f) Ovário em subfase de Desenvolvimento final; Ovário com oócitos previtelogênicos iniciais (opi); oócito vitelogênico inicial (ovi) e final (ovf). **Legendas: lu (lúmen ovariano); p: parede ovariana. **Coloração:** hematoxilina/eosina.**



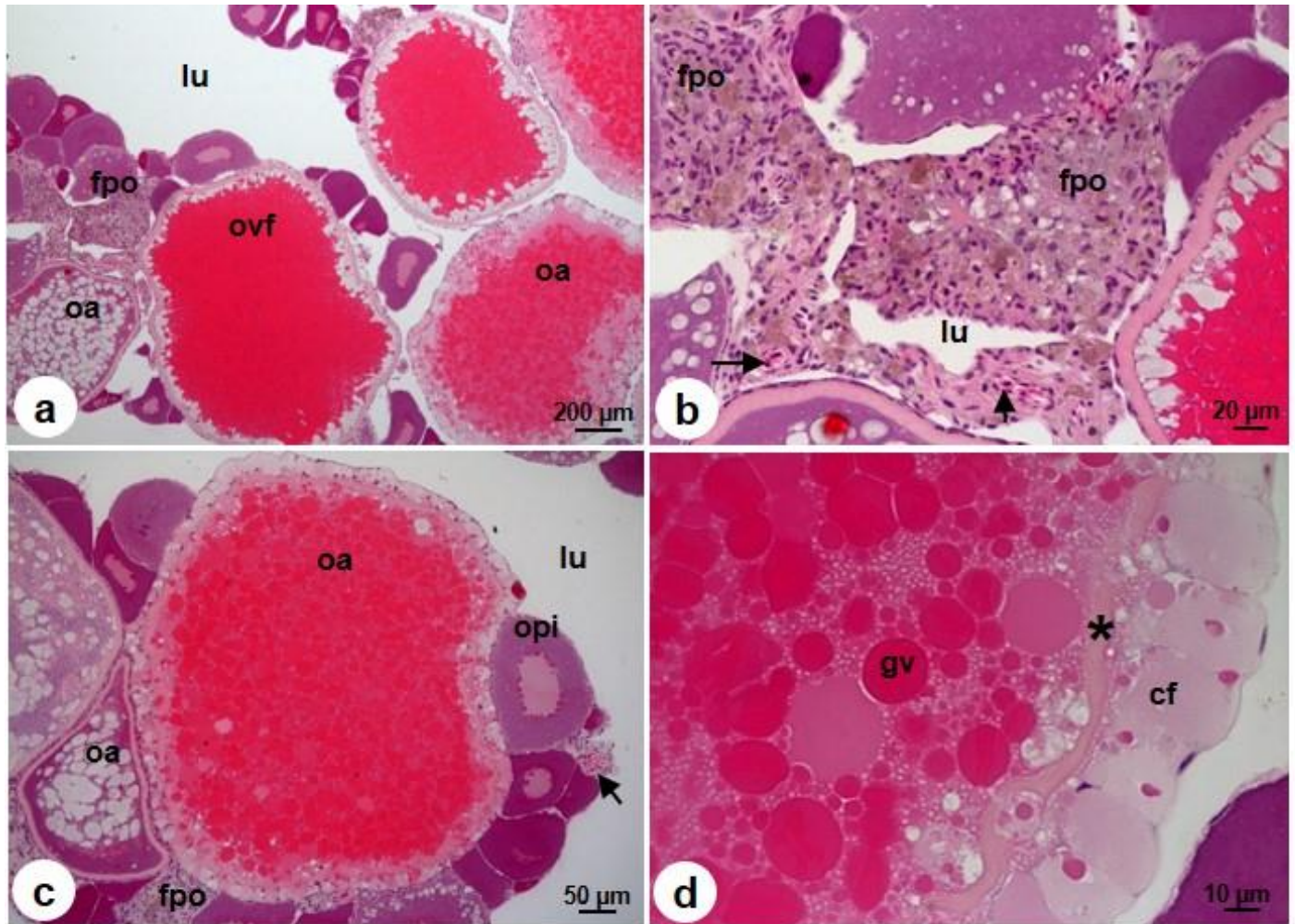
Fonte: própria autora

Figura 7 - Ovários de *D. aequipinnatus* em fase de Apto à desova. (a-b) Ovário repleto de oócitos maduros, oócitos previtelogênicos iniciais (OPi); oócitos previtelogênicos finais (OPf); oócito atrésico (OA); c) Oócito maduro (OM) característico desta fase com migração do núcleo em direção a micrópila (Mi); d) Detalhamento da micrópila (Mi). **Legendas:** n: núcleo; gv: grânulos de vitelo, seta: células foliculares; asterisco: zona radiata. **Coloração:** hematoxilina/eosina.



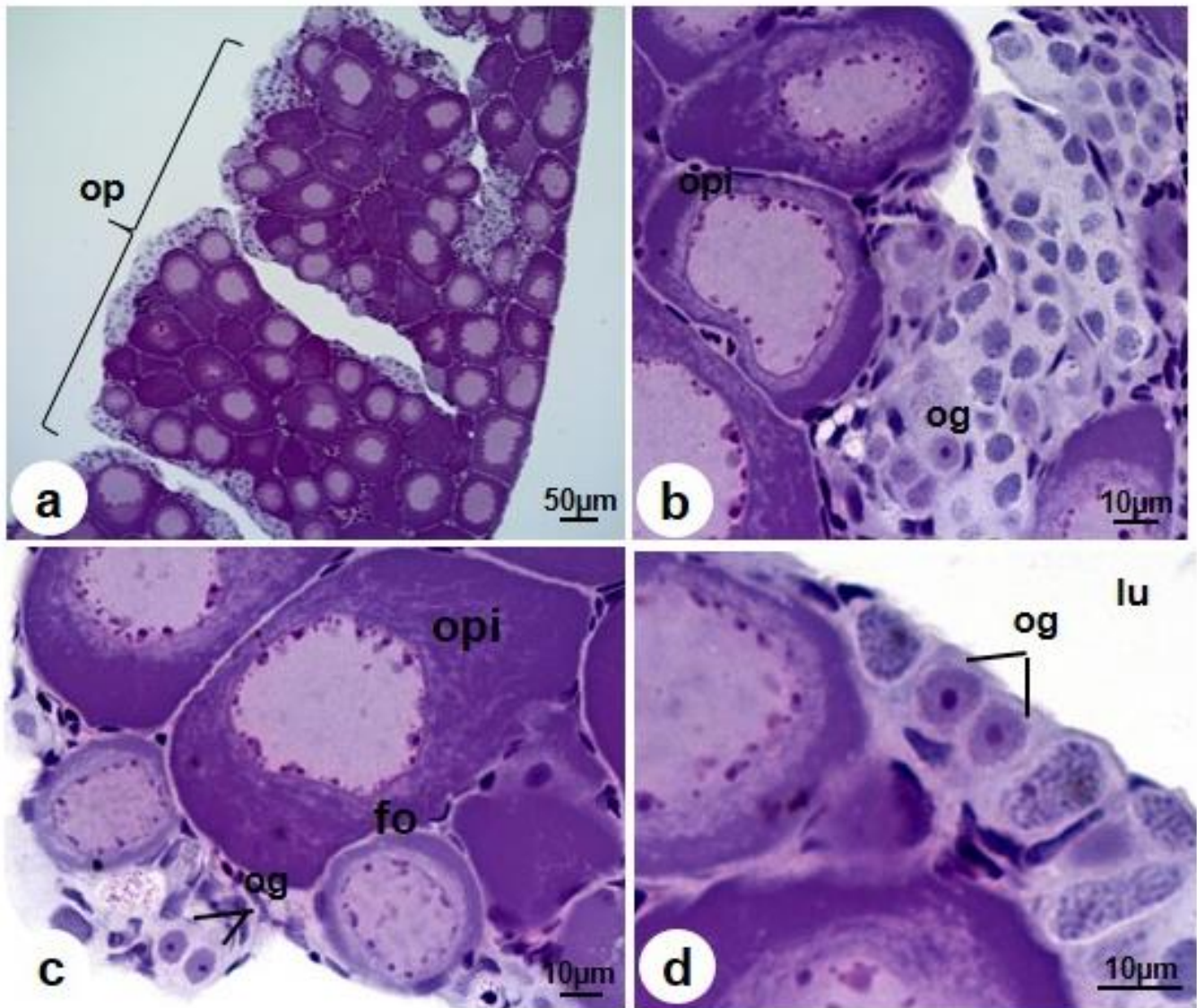
Fonte: própria autora

Figura 8 - Ovários de *D. aequipinnatus* em fase de Regressão. a) Ovário com oócitos previtelogênicos (op), oócitos em vários estágios de atresia (oa), folículo pós ovulatório (fpo); b) Folículo pós ovulatório em processo de degeneração; c) Oócito atrésico (oa); d) Detalhe da hipertrofia das células foliculares, desintegração da zona radiata (*) e dos grânulos de vitelo (gv). **Legendas:** lu: lúmen ovariano, SETA: vasos sanguíneos. **Coloração:** hematoxilina/eosina.



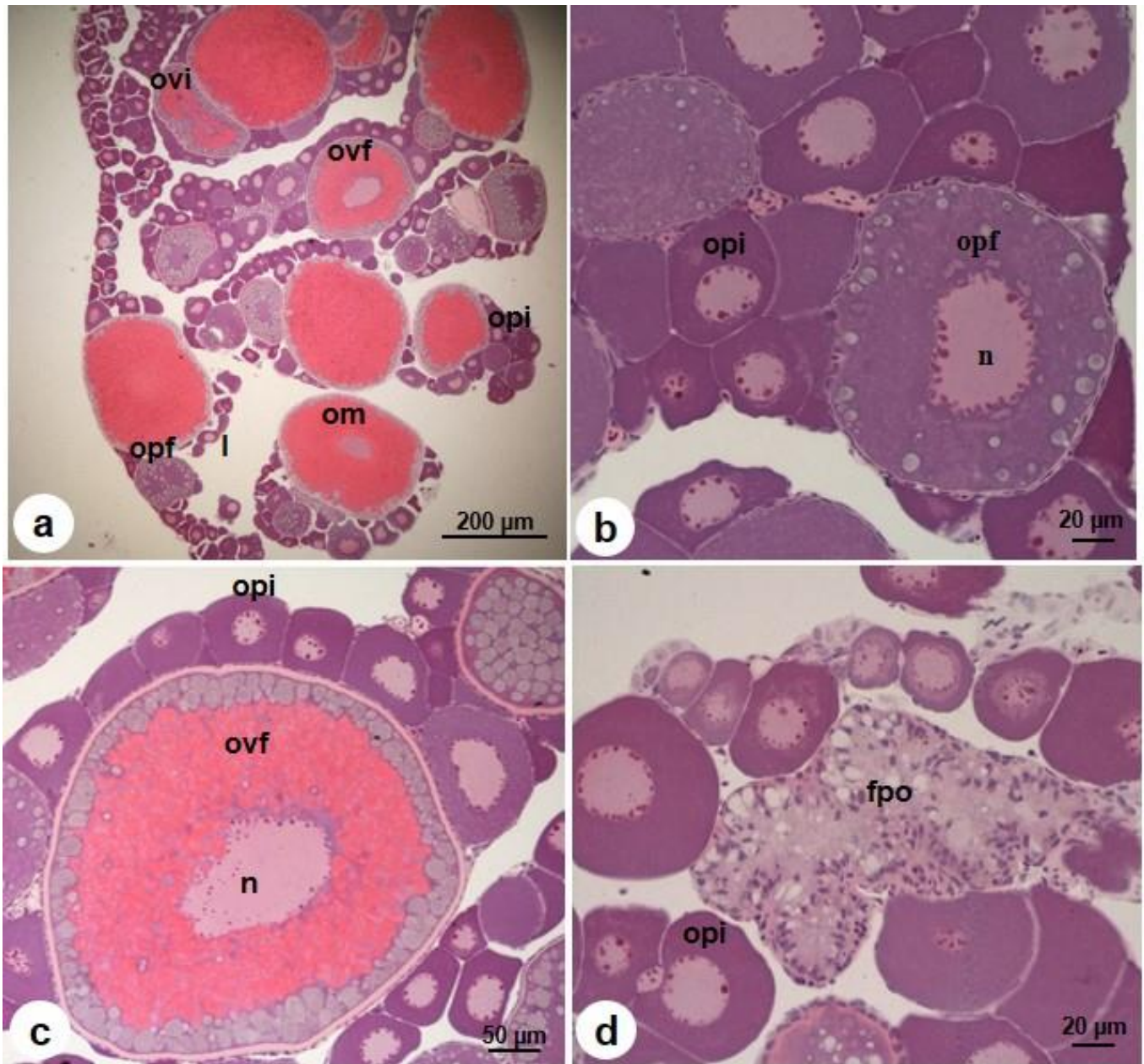
Fonte: própria autora

Figura 9 - Ovários de *D. aequipinnatus* em fase de Regeneração. a) Ovário com oócitos previtelogênicos (op); b) Detalhe da proliferação de oogônias (og); oócito previtelogênico inicial (opi) e oócitos profásicos; c) Cisto com oogônias tipo A-diferenciadas, folículo ovariano (fo) e oócito previtelogênico (opi); d) Cisto com oogônias (og). **Legendas:** lu: lúmen. **Coloração:** hematoxilina/eosina.



Fonte: própria autora

Figura 10 - Tipo de desova em *Devario aequipinnatus*. (a-d) Ovário com diferentes estágios de desenvolvimento das células germinativas evidenciando a desova aos lotes com oócitos previtelogênicos iniciais (opi) e finais (opf), oócitos vitelogênicos iniciais (ovi) e finais (ovf), oócitos maduros (om) e folículo pós ovulatório (fpo), nota se os espaços entre as lamelas mostrando que uma parte dos oócitos já foi liberada para o lúmen ovariano (l). **Coloração:** hematoxilina/eosina.



Fonte: própria autora

2.4 DISCUSSÃO

Em *D. aequipinnatus* a formação das lamelas ovulíferas nos ovários dão suporte a todo desenvolvimento das células germinativas. Estas lamelas formam projeções que são direcionadas ao estroma assim como visto em outros teleósteos como em *Brycon orbignyianus*, *Acestrorhynchus pantaneiro* e *Pimelodus maculatus* (GANECO et al., 2001; RODRIGUES; QUEROL; BRACCINI, 2005; AMORIM, 2007), além disso estas lamelas podem apresentar aspectos morfológicos diferentes dependendo do estágio de desenvolvimento dos oócitos (GANECO et al., 2001) tal fato também foi observado ao longo da oogênese na presente espécie.

A foliculogênese inicia-se com as divisões mitóticas devido a proliferação das oogônias e meióticas com a diferenciação dos oócitos (MAZZONI et al., 2011; GRIER, 2000; ANDRADE et al., 2001; GRIER; URIBE; PARENTI, 2007). Em *D. aequipinnatus* estas divisões celulares iniciam-se dentro dos ninhos, com as oogônias, precursoras de todo desenvolvimento ovariano, são classificadas em oogônias A-indiferenciadas e A-diferenciadas; e B-diferenciadas e após as divisões meióticas se diferenciam em oócitos profásicos. Estas distinções dos diferentes tipos de oogônias também foram descritas para outras ordens como Siluriformes e Labriformes (QUAGIO-GRASSIOTTO et al., 2011; SANTOS-SILVA et al., 2015). De acordo com Santos-Silva e colaboradores (2015) a classificação desta etapa inicial é essencial, pois permite um melhor entendimento desde a proliferação das oogônias até o momento da formação do folículo ovariano.

Dentro dos cistos, os oócitos são individualizados pelas células epiteliais e se desenvolvem de forma sincrônica (QUAGIO-GRASSIOTTO et al., 2011) estas células circundam os oócitos diplótenos (FRANÇA; GRIER; QUAGIO-GRASSIOTTO, 2010) e posteriormente ocorre a síntese da membrana basal formando o folículo ovariano. Para *D. aequipinnatus*, estas células pré-foliculares no final da prófase meiótica, individualizam os oócitos e posteriormente continuarão a circundá-los nos próximos estágios de desenvolvimento e possuem diferentes formatos conforme o avanço da oogênese.

O crescimento dos oócitos é classificado de acordo com as alterações morfológicas das células considerando características como núcleo, nucléolos,

basofilia do citoplasma, zona radiata. Na presente espécie os estágios da oogênese são identificados de acordo com estes critérios sendo que estas mesmas considerações foram utilizadas na classificação dos estágios de outros ciprínídeos como *Puntius conchoni*, *Ctenopharyngodon idella* e *Danio rerio* também descrevendo os estágios de crescimento primário, secundário e maturação (ÇEK et al., 2001; GLASSER et al., 2003; ÇAKICI; UÇUNCU, 2007).

Na presente espécie, o estágio de previtelogênese é caracterizado de acordo com estruturas muito importantes que aparecem e dão suporte a todo desenvolvimento ovariano a exemplo da zona radiata e dos alvéolos corticais (SELMAN; WALLACE, 1989; PATIÑO; SULLIVAN, 2002). Assim como visto na Ordem Cypriniformes como em *Danio rerio* e *Cyprinus carpio*, a zona radiata também surge no estágio de alvéolos corticais e torna-se mais espessa e mais desenvolvida conforme o crescimento ovariano (YÖN; AYTEKIN; YÜCE, 2008; SHABANIPOUR; HOSSAYNI, 2010). Já os alvéolos corticais têm como função atuar como uma barreira a polispermia migrando para a periferia celular (WALLACE; SELMAN, 1981; OHTA, 1990; RODRIGUES; QUEROL; BRACCINI, 2005) em *D. aequipinnatus* estes alvéolos são organizados como uma fina camada na região periférica do citoplasma no final da vitelogênese.

No estágio de vitelogênese em *D. aequipinnatus* ocorre a incorporação dos grânulos de vitelo no citoplasma, que aos poucos ocupa todo o espaço celular, de acordo com Rodrigues; Querol; Braccini (2005) estes grânulos posteriormente servirão como fonte de reserva energética para o embrião. E por fim, no estágio de maturação observa-se a migração do núcleo em direção a micrópila sendo que esta característica é comum a outras espécies de peixes como *Merluccius hubbsi* e *Pimelodus maculatus* (HONJI et al., 2006; QUAGIO-GRASSIOTTO et al., 2011).

Os folículos pós-ovulatórios encontrados em *D. aequipinnatus* indicam que os oócitos foram liberados para o lúmen ovariano no processo denominado oocitação por isso as estruturas restantes são as camadas da teca, folicular e membrana basal estas mesmas características morfológicas foram semelhantes a descritas por Amorim (2007).

Já os oócitos atrésicos apresentaram células foliculares hipertrofiadas e descontinuidade da camada folicular e zona radiata sendo reabsorvidas pelos ovários. Em *Danio rerio* estudado por Üçüncü; Çakıcı (2009); *Prochilodus*

argenteus e *Leporinus taeniatus* relatado por Santos et al. (2008) e Thomé et al. (2012) houve também hipertrofia das células foliculares e desintegridade da zona radiata, para *D. aequipinnatus*, a zona radiata se mostrou também uma camada descontínua e com formato irregular e de acordo com Amorim (2007) estas células atresicas entram em processo de regressão, degeneração e absorção. Para a presente espécie o processo de atresia foi mais comumente visto em oócitos em estágio mais avançado de desenvolvimento como na vitelogênese esta constatação também foi relatada para outros teleósteos (MIRANDA; BAZOLLI; SATO, 1999; AMORIM, 2007).

As fases reprodutivas do ciclo em *D. aequipinnatus* foram descritas de acordo com Brown-Peterson e colaboradores (2011) na qual padronizaram uma classificação para fêmeas de acordo com as alterações morfológicas das células sendo denominadas de imaturo, desenvolvimento, apto à desova, regressão e regeneração. Embora esta padronização tenha sido desenvolvida para peixes marinhos, a nomenclatura mostrou se perfeitamente cabível a ordem Cypriniformes, atual ordem da presente espécie desta forma outros autores como Wildner; Grier; Quagio-Grassiotto (2013) também a utilizaram para Siluriformes e Characiformes assim como Quagio-Grassiotto; Wildner; Ishiba (2013) para as mesmas ordens.

A primeira maturação determinou o comprimento no qual a espécie está apta à reprodução, tal informação também foi descrita por Araújo et al. (2012) para *Crenicichla menezesi* e Santos-Silva et al. (2015) para *Laetacara araguaiae*. Assim sendo o presente trabalho corrobora conforme Gurgel et al. (2011) para o estudo de uma série de métodos que contribuem com o manejo tendo como finalidade a sustentabilidade da exploração da pesca como também uma medida que garante que o animal se reproduza pelo menos uma vez antes de ser capturado.

O tipo de desova em *D. aequipinnatus* é parcelada e o desenvolvimento dos oócitos sincrônico em grupo pois são encontrados diversos estágios de desenvolvimento este padrão foi descrito conforme Murua; Saborido-Rey (2003) na qual a desova parcelada há predominância de pelo menos duas populações de oócitos em que uma está mais desenvolvida e segue até o fim do ciclo reprodutivo e outra população que tem função de estoque (reserva), indicando que são encontrados vários estágios dos oócitos dentro de um

mesmo ovário em que há liberação das células germinativas conforme seu desenvolvimento.

Desta forma o entendimento das modificações das células que ocorrem desde a foliculogênese a oogênese é uma etapa básica e essencial para contribuir na descrição da biologia reprodutiva de *D. aequipinnatus* visto que as informações sobre seus aspectos reprodutivos são escassas. Como descrito por Marques; Rosa; Gurgel (2000) as alterações em nível nuclear, citoplasmático e folicular demonstram processos muito importantes reforçando o estudo destas mudanças ao longo do desenvolvimento contribuindo para o aprimoramento do conhecimento da reprodução das espécies.

2.5 REFERÊNCIAS

- AMORIM, J. P. A. **Foliculogênese e caracterização celular das classes reprodutivas em *Pimelodus maculatus* (Siluriformes: Pimelodidae)**. 2007. 109 f. Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2007.
- ANDRADE, R. F.; BAZZOLI, N.; RIZZO, E.; SATO, Y. Continuous gametogenesis in the neotropical freshwater teleost, *Bryconops affinis* (Pisces: Characidae). **Tissue & Cell**, London, v. 33, n. 5, p. 524-532, 2001.
- ARAUJO, A. S., NASCIMENTO, W. S., YAMAMOTO, M. E., CHELLAPPA, S. Temporal Dynamics of Reproduction of the Neotropical Fish, *Crenicichla menezesi* (Perciformes: Cichlidae). **The Scientific World Journal**, New York, p.1-10, 2012.
- ARUNACHALAM, M.; MANICKAM, R.; MANICKAM, C.; MALAIAMMAL, P.; MAYDEN, R. Natural History of Zebrafish (*Danio rerio*) in India. **Zebrafish**, New Rochelle, v. 10, n. 1. P. 1-14, 2013.
- BROWN-PETERSON, N. J.; WYANSKI, D. M.; SABORIDO-REY, F.; MACEWICZ, B. J.; LOWERRE-BARBIERI, S. K. A Standardized terminology for describing reproductive development in fishes. **Marine and Coastal Fisheries: Dynamics, Management, and Ecosystem Science**, p. 52-70, 2011.
- ÇAKICI, Ö; ÜÇÜNCÜ, S. İ. Oocyte development in the zebrafish, *Danio rerio* (Teleostei: Cyprinidae). **European Journal Fish Aquatic Scientific**, v. 24, n.1-2, p. 137–141 , 2007.
- CÉK, S.; BROMAGE, N.; RANDALL, C.; RANA, K. – Oogenesis, hepatosomatic and gonadosomatic indexes, and sex ratio in Rosy Barb (*Puntius conchonius*). **Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences**, Singapore, n. 1, p. 33-41, 2001.
- ESCHMEYER, W.; FONG, J. **Catalog of fishes**, 2015. Disponível em < <http://researcharchive.calacademy.org/research/ichthyology/catalog/SpeciesByFamily.asp> >. Acesso em: 25 set.2015
- FRANÇA, G. F.; GRIER, H. J.; QUAGIO-GRASSIOTTO, I. A new vision of the origin and the oocyte development in the Ostariophysi applied to *Gymnotus sylvius* (Teleostei: Gymnotiformes). **Neotropical Ichthyology**, São Paulo, v. 8, n. 4, p. 787-804, 2010.
- FU, C. Z.; WU, J. H.; CHEN, J. K.; QU, Q. H.; LEI, G. C. Freshwater Wsh diversity in the Yangtze River basin in China: patterns, threats and conservation. **Biodiversity Conservation**, Dordrecht, v. 12, p. 1649–1685, 2003.
- GANECO, L. N.; NAKAGHI, L. S. O.; URBINATI, E. C.; NETO, R. D.; VASQUES, L. H. Análise morfológica do desenvolvimento ovocitário de

pirancajuba, *Brycon orbignyanus*, durante o ciclo reprodutivo. **Boletim do Instituto de Pesca**, São Paulo, n. 2, p. 131-138, 2001.

GLASSER, F.; CAUTY, C.; MOUROT, B.; BRETON, B. – Disrupted sexual cycles in female grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) raised in tropical conditions. **Aquaculture**, Amsterdam, p. 857-868, 2003.

GRIER, H. J. Ovarian germinal epithelium and folliculogenesis in the common snook *Centropomus undecimalis* (Teleostei: Centropomidae). **Journal of Morphology**, New York, v. 243, p. 265–281, 2000.

GRIER, H. J.; URIBE-ARANZABAL, M. C.; PARENTI, L. R. Germinal epithelium, folliculogenesis, and postovulatory follicles in ovaries of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum, 1792) (Teleostei, Protacanthopterygii, Salmoniformes). **Journal of Morphology**, Hoboken, n. 268, p. 293–310, 2007.

GURGEL, L. L.; VERANI, J. R.; CÂMARA, F. R. A.; BARROS, N. H. H.; CHELLAPA, S. Ecologia reprodutiva de *Cichlasoma orientale* (Osteichthyes: Cichlidae), um peixe endêmico do semi-árido brasileiro. **Biota Amazônica**, Macapá, v. 1, n. 2, p. 36-44, 2011.

HONJI, R. M.; VAZ-DOS-SANTOS, A. M.; ROSSI-WONGTSCHOWSKI, C. L. D. B. Identification of the stages of ovary maturation of the Argentine hake *Merluccius hubbisi* Marini, 1933 (Teleostei: Merlucciidae): advantages and disadvantages of the use of the macroscopic and microscopic scales. **Neotropical Ichthyology**, São Paulo, p. 329-337, 2006.

LELE, Z.; KRONE, P. H. The zebrafish as a model system in developmental, toxicological and transgenic research. **Biotechnology Advances**, New York, v. 14, n. 1, p. 57-72, 1996.

LIMA, R. V. A.; BERNARDINO, G.; VAL-SELLA, M. V.; FAVA-DE-MORAES, F.; BORELLA, M. I. **Boletim técnico**, Pirassununga, v. 4, n. 1, p. 1-46, jan/jun, 1991.

MARQUES, D. K. S.; ROSA, I. L.; GURGEL, H. C. B. Descrição histológica de gônadas de traíra *Hoplias malabaricus* (Bloch) (Osteichthyes, Erythrinidae) da barragem do rio Gramame, Alhandra, Paraíba, Brasil. **Revista Brasileira de Zoologia**, São Paulo, v. 17, n. 3, p. 573–582, 2000.

MAZZONI, T. S.; GRIER, H. J.; QUAGIO-GRASSIOTTO, I. Germline cysts and the formation of the germinal epithelium during female morphogenesis in *Cyprinus carpio* (Teleostei: Ostariophysi: Cypriniformes). **The Anatomical Record**, Utah, n. 293, p. 1581–1606, 2010.

MAYDEN, R. L. New world cyprinids. In: WINFIELD, I. J.; NELSON, J. S. (Ed.). **Biology of cyprinids**. London: Chapman and Hall, 1991. p. 240–263.

MIRANDA, A. C. L.; BAZZOLI, N.; RIZZO, E.; SATO, Y. Ovarian follicular atresia in two teleost species: a histological and ultrastructural study. **Tissue & Cell**, London, v. 31, n. 5, p. 480-488.

MURUA, H.; SABORIDO-REY, F. Female reproductive strategies of marine fish species of the North Atlantic. **Journal of Northwest Atlantic Fishery Science**, Canadá, v. 33, p. 23-31, 2003.

OHTA, T.; IWAMATSU, M.; TANAKA, Y.; YOSHIMOTO, Y. Cortical alveolus breakdown in the eggs of the freshwater teleost *Rhodeus ocellatus ocellatus*. **The Anatomical Record**, Utah, v. 227, n. 4, p. 486-496, 1990.

PATÍÑO, R.; SULLIVAN, C. V. Ovarian follicle growth, maturation, and ovulation in teleost fish. **Fish Physiology and Biochemistry**, Dordrecht, n. 26, p. 57-70, 2002.

QUAGIO-GRASSIOTTO, I.; GRIER, H.; MAZZONI, T. S.; NOBREGA, R. H.; AMORIM, J. P. A. Activity of the ovarian germinal epithelium in the freshwater catfish, *Pimelodus maculatus* (Teleostei : Ostariophysi: Siluriformes) : Germline Cysts, Follicle Formation and Oocyte Development. **Journal of Morphology**, New York, v. 272, p. 1290-1306, 2011.

QUAGIO-GRASSIOTTO, I.; WILDER, D. D.; ISHIBA, R. Gametogênese de peixes: aspectos relevantes para o manejo reprodutivo. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v. 37, n. 2, p. 181-191, 2013.

RODRIGUES, L. P.; QUEROL, E.; BRACCINI, M. C. Descrição morfo-histológica do ovário de *Acestrorhynchus pantaneiro* (Menezes, 1992) (Teleostei, Characidae), em seus diferentes estádios de desenvolvimento, na bacia do rio Uruguai médio, Uruguiana, RS. **Biodiversidade Pampeana**, Porto Alegre, n. 3, p.11-18, 2005.

SANTOS, H. B.; THOMÉ, R. G.; ARANTES, F. P.; SATO, Y.; BAZZOLI, N.; RIZZO, E. Ovarian follicular atresia is mediated by heterophagy, autophagy, and apoptosis in *Prochilodus argenteus* and *Leporinus taeniatus* (Teleostei: Characiformes). **Theriogenology**, Philadelphia, n. 70, p. 1449-1460, 2008.

SANTOS- SILVA, A.; SIQUEIRA-SILVA, D.; SILVEIRA-NINHAUS, A.; SILVERIA-VERÍSSIMO, R. Oogenesis in *Laetacara araguaiae* (Ottoni and Costa, 2009) (Labriformes: Cichlidae). **Zygote**, Cambridge, p. 1-9, 2015.

SHABANIPOUR, N; HOSSAYNI, S. N.- Histological and ultrastructural study of Zona Radiata in oocyte of common carp *Cyprinus carpio* (Linnaeus 1758). **Micron**, n. 41, p. 877-881, 2010.

SELMAN, K.; WALLACE, R. A. Cellular aspects of oocyte growth in teleosts. **Zoological Science**, Tokyo, n. 6, p. 211-231, 1989.

THOMÉ, R. G.; DOMINGOS, F. F. T.; SANTOS, H. B.; MARTINELLI, P. M.; SATO, Y. RIZZO, E., BAZZOLI, N. Apoptosis, cell proliferation and vitellogenesis during the folliculogenesis and follicular growth in teleost fish. **Tissue and Cell**, London, n. 44, p. 54– 62, 2012.

WALLACE, R. A.; SELMAN, K. Cellular and dynamic aspects of oocyte growth in teleosts. **American Zoologist**, Washington, v. 21, n. 2, p. 325-343, 1981.

WEST, G. Methods of assessing ovarian development in fishes: a review. **Marine and Freshwater Research**, Clayton, n. 41, p. 199–222, 1990.

WILDNER, D. D.; GRIER, H. J.; QUAGIO-GRASSIOTTO, I. Female germ cell renewal during the annual reproductive cycle in Ostariophysians fish. **Theriogenology**, Philadelphia, p. 709-724, 2013.

YON, N. D. K., AYTEKIN, Y., YUCE, R. Ovary maturation stages and histological investigation of ovary of Zebrafish (*Danio rerio*). **Brazilian Archives of Biology and Technology**, Curitiba, v. 51, n. 3, p. 513-522, 2008.

CAPÍTULO 3 – A INFLUÊNCIA DAS DIFERENTES TEMPERATURAS NO CICLO REPRODUTIVO DE FÊMEAS DE *Devario aequipinnatus*.

RESUMO

A temperatura é um fator importante na vida dos peixes e atua na regulação dos processos reprodutivos como no desenvolvimento e maturação dos gametas, embriogênese, eclosão e sobrevivência das larvas e juvenis. Desta forma, o presente estudo teve por objetivo avaliar a influência de três diferentes temperaturas de 18°C, 24°C e 30°C no ciclo reprodutivo de fêmeas de *Devario aequipinnatus*. Para a condução do experimento foram utilizados 3 aquários com capacidade para 9 L, mantidos a 18°C, 24°C e 30°C, sendo coletados 50 peixes nas temperaturas de 24°C e 30°C e 45 peixes na temperatura de 18°C, o experimento foi realizado com uma temperatura a cada período. Cinco indivíduos de cada tratamento foram coletados de modo aleatório a cada quatro dias, no período entre o 1° e 37° dia experimental nas temperaturas de 24°C e 30°C e no período entre o 1° e 33° dia na temperatura de 18°C. Os dados biométricos foram aferidos, os ovários removidos e processados para análise histológica e morfométrica em microscopia de luz. Nos ovários dos exemplares de *D. aequipinnatus* mantidos na temperatura de 24°C (T24) foram observadas as fases de Desenvolvimento final e Apto à desova. O mesmo não foi observado nas temperaturas de 18°C (T18) e 30°C (T30), pois foram encontradas todas as fases reprodutivas: Desenvolvimento inicial e final, Apto à desova, Regressão e Regeneração. Assim a temperatura influenciou o desenvolvimento ovariano de fêmeas de *D. aequipinnatus* tanto em temperaturas mais altas (30°C) como mais baixas (18°C), contudo a T18 causou atresia em uma porcentagem maior de indivíduos, mostrando esta ser mais prejudicial a espécie.

Palavras-chave: Ciprínideo. Temperatura. Reprodução.

ABSTRACT

Temperature is an important factor in the fish live and participates in the regulation of reproductive processes as development and maturation of gametes, embryogenesis, hatching and survival of larvae and juveniles. Thus, this study aimed to evaluate the influence of three different temperatures: 18°C, 24°C and 30°C in the reproductive cycle of *Devario aequipinnatus* females. For the experiment were used three aquariums with a capacity of 9 L kept at 18°C, 24°C and 30°C being collected 50 individuals at temperatures of 24°C and 30°C and 45 individuals at 18°C, the experiment was carried out a temperature in each period. Five individuals from each treatment were randomly collected every four days in the period between 1st and 37th experimental day at temperatures of 24°C and 30°C and the period between 1 st and 33 th day the temperature of 18°C. Biometric data were measured, the ovaries removed and processed for histological and morphometric analysis in light microscopy. In the ovaries of *D. aequipinnatus* kept at a temperature of 24°C were observed predominantly animals in final development and Spawning capable phases. The same was not observed at temperatures of 18°C and 30°C, where we found all reproductive phases follows: initial and final Developing, Capable Spawning, Regressing and Regenerating. Thus the temperature influenced the ovarian development of females *D. aequipinnatus* both at higher temperatures (30°C) and lower (18°C), however the lower temperature caused atresia in a higher percentage of individuals demonstrating to be more detrimental to the specie.

Keywords: Cyprinid. Temperature. Reproduction.

3.1 INTRODUÇÃO

A influência antrópica nos sistemas naturais está aumentando de forma contínua legitimando a importância de estudar de que forma as ações humanas causam estresse no ambiente em que os animais estão inseridos. Assim o estudo da interação animal-ambiente torna-se essencial para o entendimento das alterações do habitat incluindo as mudanças climáticas que podem ter consequências devastadoras sobre a fauna (WIKELSKI; COOKE, 2006).

As previsões das mudanças climáticas preveem diversos impactos sobre a distribuição e abundância das espécies aquáticas (BIJOYA; FARUQUE; AHASAN, 2014), por isso o conhecimento dos efeitos da temperatura pode contribuir significativamente para medidas que preveem as consequências destas mudanças nas populações e comunidades (DORTS et al., 2012).

Neste contexto, a temperatura é um fator importante na vida dos peixes e atua na regulação dos processos reprodutivos (VAN DER KRAAK; PANKHURST, 1997; PANKHURST; PORTER, 2003) como no desenvolvimento e maturação dos gametas, embriogênese, eclosão e sobrevivência das larvas e juvenis (PANKHURST; PORTER, 2003). Assim, diante das mudanças climáticas e alterações antrópicas sobre o ciclo hidrológico pesquisadores vem ressaltando a importância de investigar de que forma estas mudanças podem influenciar na reprodução e no desenvolvimento (BURT; HINCH; PATTERSON, 2011).

Por isso, levando-se em consideração que os peixes são animais mais eficientes na conversão de energia e não precisam gastar energia para a regulação corpórea sendo dependentes da temperatura (BOUEF; BAIL, 1999) eles se tornam ótimos modelos experimentais por estarem sujeitos as condições ambientais antropogênicas e naturais (COSSINS; CRAWFORD, 2005).

Desta forma, o presente estudo teve por objetivo avaliar a influência de três diferentes temperaturas de 18°C, 24°C e 30°C no ciclo ovariano de *Devario aequipinnatus*.

3.2 MATERIAL E MÉTODOS

3.2.1 Delineamento experimental

Exemplares fêmeas e adultas (n=145) de *Devario aequipinnatus* foram obtidos a partir de atacadistas de peixes ornamentais da região de Uberlândia - MG, posteriormente encaminhados para o Laboratório de Ictiologia Neotropical – Lineo, Unesp, Ilha Solteira, SP, onde permaneceram durante 30 dias em fase de aclimação na temperatura de 24°C (T° de conforto da espécie). Os animais foram mantidos em fotoperíodo 12C:12E e foi realizada a limpeza dos aquários diariamente com troca de 10 a 20% da água. Como procedimento para a manutenção da temperatura e qualidade da água foram utilizados chillers, aeradores, termostatos e filtros.

Para a condução do experimento foram utilizados 3 aquários com capacidade para 9 L, mantidos nas temperaturas de 18°C, 24°C e 30°C, sendo coletados 50 peixes nas temperaturas de 24°C e 30°C e 45 peixes na temperatura de 18°C, o experimento foi realizado com uma temperatura por período.

A temperatura de 24°C é considerada por Riehl; Baensch (1991) como a zona de conforto para esta espécie em ambiente natural e as demais temperaturas foram adotadas para avaliar a sua influência de 6°C, superiores e inferiores à temperatura de conforto. Após o período de aclimação dos animais, a temperatura da água do aquário foi alterada gradativamente, com a utilização de um chiller durante uma semana (aproximadamente 1°C por dia) até atingir a temperatura estipulada no experimento e foi monitorada com auxílio de data loggers (Hobbo UA-0002) com intervalo a cada 1 hora entre as medições. A média dos valores e o desvio padrão nas temperaturas de 24°C foram $24,26 \pm 0,22$; em 18°C $18,37 \pm 0,36$ e em 30°C $30,15 \pm 0,21$ respectivamente.

Cinco indivíduos de cada tratamento foram coletados de modo aleatório a cada quatro dias no período entre o 1º e 37º dia experimental nas temperaturas de 24°C e 30°C e no período entre o 1º e 33º dia na temperatura de 18°C. Os dados biométricos foram aferidos, os ovários removidos e processados para análise histológica e morfométrica em microscopia de luz.

3.2.2 Coleta do material biológico

Após serem coletados os exemplares de *D. aequipinnatus* foram anestesiados e eutanasiados com solução alcoólica com 200mg/l de benzocaína. Após a anestesia os animais foram aferidos a massa (g), comprimento total (cm) e padrão (cm). Posteriormente foi realizada uma incisão na região ventral do animal, no sentido pôstero – anterior expondo toda a cavidade abdominal para a retirada dos ovários que foram pesados e imediatamente processados.

Para o processamento de microscopia de luz, fragmentos dos ovários foram fixados “overnight” em 4% de paraformaldeído e glutaraldeído a 2% em tampão fosfato de Sorensen, pH 7.4. Os fragmentos foram desidratados em série crescente de concentração de álcool e incluídos em historesina (Technovit 7100). Cortes histológicos (3µm) foram submetidos a colorações de hematoxilina/eosina no Laboratório de Ictiologia Neotropical, Departamento de Biologia e Zootecnia, da Faculdade de Engenharia da UNESP, Campus de Ilha Solteira, São Paulo, Brasil.

A classificação das fases de desenvolvimento ou ciclo ovariano foi realizada com base nas características macroscópicas e microscópicas dos ovários e das células germinativas presentes segundo critérios estabelecidos por Brown-Peterson et al. (2011).

Índice Gonadossomático (IGS):

A massa dos ovários foi utilizada para o cálculo do índice gonadossomático (IGS), que determina a relação da massa gonadal com a massa corpórea do animal, indicando seu estágio reprodutivo. Este índice representa a porcentagem das gônadas em relação à massa corporal, obtido pela expressão [$IGS = (massa\ das\ gônadas / massa\ corpórea) \times 100$] (VAZZOLER, 1981; 1996).

Mensuração dos oócitos:

Foram medidos todos os oócitos maduros de cada animal em fase de apto à desova nas coletas 8, 9 e 10 nas temperaturas de 24°C e 30°C, e nas coletas 8 e 9 na temperatura de 18°C com microscópio óptico Zeiss equipado com

câmera AXIOCAM-MRc5. Foi realizada a medida do comprimento e largura dos oócitos posteriormente calculou se a área de uma esfera através da fórmula:

$$A = r_1 \cdot r_2 \cdot \pi$$

Onde $r_1 = r/2$ e $r_2 = r/2$ são os valores da largura e comprimento e $\pi=3,14$

Análises dos dados:

O experimento foi realizado ao acaso, no total de 10 coletas nas temperaturas de 24°C e 30°C e 9 coletas na temperatura de 18°C. Foram realizadas análises comparativas de médias entre as coletas na mesma temperatura e entre os tratamentos de 18°C, 24°C e 30°C para avaliação do índice gonadosomático e área dos oócitos maduros. Utilizou se o software “R” aplicando inicialmente os Testes de Bartlett e Shapiro-Wilk assim para dados paramétricos utilizou se ANOVA ($p= 0,05$) e para não paramétricos utilizou se Kruskal Wallis. Aplicou-se Correlação Linear de Pearson entre os valores do Índice Gonadosomático e o tempo ao longo das coletas nas diferentes temperaturas.

3.3 RESULTADOS

Nos ovários dos exemplares de *D. aequipinnatus* mantidos na temperatura de 24°C (T24) foram observadas predominantemente as fases de Desenvolvimento final e Apto à desova, com exceção de um indivíduo em regressão e maior porcentagem de indivíduos Aptos à desova (Fig. 11). O mesmo não foi observado nas temperaturas de 18°C (T18) e 30°C (T30), pois foram encontradas todas as fases reprodutivas: Desenvolvimento inicial e final, Apto à desova, Regressão e Regeneração. Na T18 estas fases foram observadas nas primeiras coletas, porém nas coletas de 5 (17ºdia) a 8 (21ºdia) houve uma maior porcentagem de indivíduos em Regressão e também indivíduos Apto à desova como na T24, porém na coleta 9 (33ºdia) houve um indivíduo em Regeneração (Fig.11).

A característica histológica da fase de Regressão ovariana na T18 ocorreu de maneira diferente daquela observada na T24, devido à presença de inúmeros oócitos atrésicos desta forma os ovários apresentaram oócitos maduros em processo de atresia com grânulos de vitelo irregulares, hipertrofia

das células foliculares e descontinuidade da zona radiata. Também estão ausentes os folículos pós ovulatórios, indicando a ausência de oocitação (Fig. 14 j). Já a Regressão na T24 foi caracterizada por apresentar oócitos em atresia porém tanto em estágios iniciais como finais de desenvolvimento das células germinativas, mas principalmente pela presença dos folículos pós-ovulatórios (Fig. 14 i).

Já na temperatura de 30°C (T30) todas as fases reprodutivas foram encontradas da coleta 1 a 6 (1° ao 21° dia) sendo que nas coletas de 2 a 4 (5° ao 13° dia) foram observados indivíduos em Regressão por atresia (Fig. 14 k) assim como observado na T18. Na coleta 7 (25° dia) todos os animais estavam aptos à desova e a partir da coleta 8 (29° dia) foram identificados apenas indivíduos em Desenvolvimento final e Apto à desova como na T24 (Fig. 13).

As demais fases foram morfológicamente similares nas três temperaturas sendo Desenvolvimento Final descrita principalmente pelos oócitos vitelogênicos finais com deposição dos grânulos de vitelo e núcleo centralizado (Fig. 14 c-e); Apto à desova também apresentou a incorporação destes grânulos de vitelo, porém o núcleo encontrou-se deslocado em direção à micrópila (Fig. 14 f-h).

As fases de Desenvolvimento Inicial e Regeneração foram encontradas apenas na T18 e T30, sendo descritas em desenvolvimento inicial por conter somente oócitos previtelogênicos iniciais e finais, caracterizados pelo início do aparecimento dos alvéolos corticais (Fig. 14 a-b) e Regeneração caracterizada principalmente por conter apenas oócitos previtelogênicos iniciais (Fig. 14 l-m). As fases reprodutivas já foram descritas com maior detalhamento no capítulo 2.

A correlação linear entre o IGS e o tempo nas T24 e T30 não mostrou relação entre estas duas variáveis, pois tanto em T24 (Fig. 15) como em T30 (Fig. 17) o $p > 0,05$. No entanto na T18 houve uma correlação linear negativa entre as variáveis dado por $p = 0,0002$ e o coeficiente de Correlação de Pearson = -0,52. Desta forma houve uma diminuição do IGS ao longo do tempo das coletas, provavelmente em função da temperatura (Fig. 16).

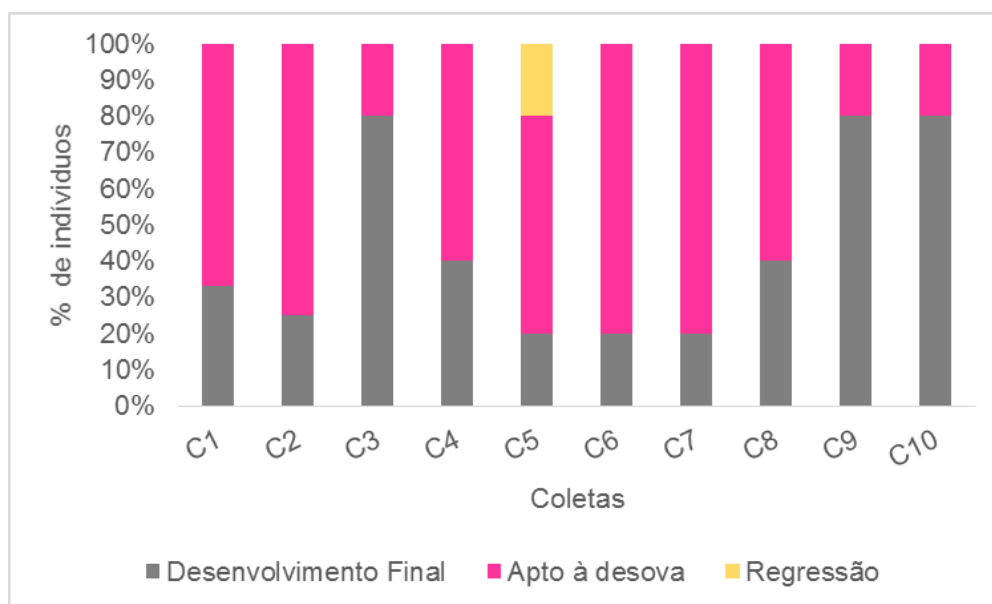
A análise dos valores das médias do IGS entre as diferentes temperaturas mostrou que na T24 todas as médias foram menores que as demais temperaturas, com exceção da coleta 7 (25° dia), além disso as médias foram diferentes estatisticamente nas coletas 2 (5° dia), 5 (17° dia), 8 (29° dia) e

9 (33° dia) quando comparadas a T18 e T30. Também houve diferença estatística dentro da T30 entre as coletas 4 e 8 em relação as demais coletas (Fig. 18).

Na fase de Apto à desova, os valores médios do IGS na T18 e T30 tiveram as maiores médias quando comparados a T24, com exceção da coleta 9 (29°dia) na T18 e das coletas 3 (9° dia) e 7 (25° dia) na T30. Desta forma observou-se que as maiores médias foram obtidas nos tratamentos (T18 e T30) sendo que a partir da coleta 8 (29° dia) o IGS mostrou uma tendência de aumento na T30 e diminuição na T18 (Fig. 19).

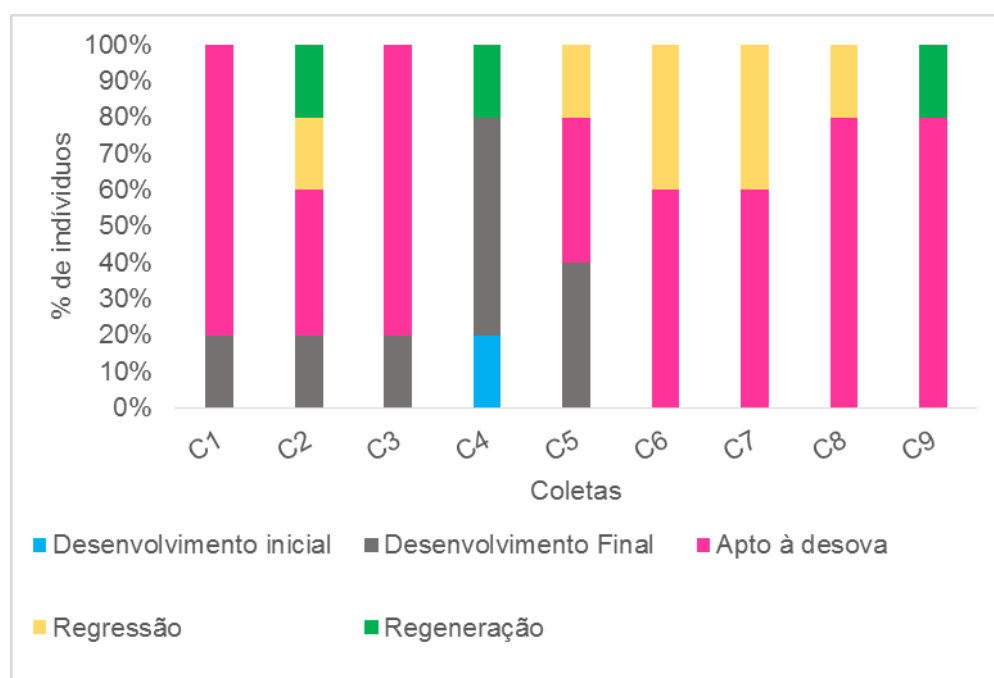
A média da área dos oócitos maduros mostrou que houve diferença estatística nas coletas 10 (37°dia) quando comparados a T24 com a T30 sendo que o maior valor de média foi na T30 (Fig. 20).

Figura 11 - Frequência da porcentagem de indivíduos de *D. aequipinnatus* por fases reprodutivas em fêmeas ao longo das coletas na temperatura de 24°C. **Legendas:** C1 – coleta1, C2- coleta 2, C3- coleta 3, C4 – coleta 4, C5- coleta 5, C6- coleta 6, C7- coleta 7, C8- coleta 8, C9- coleta 9, C10- coleta 10.



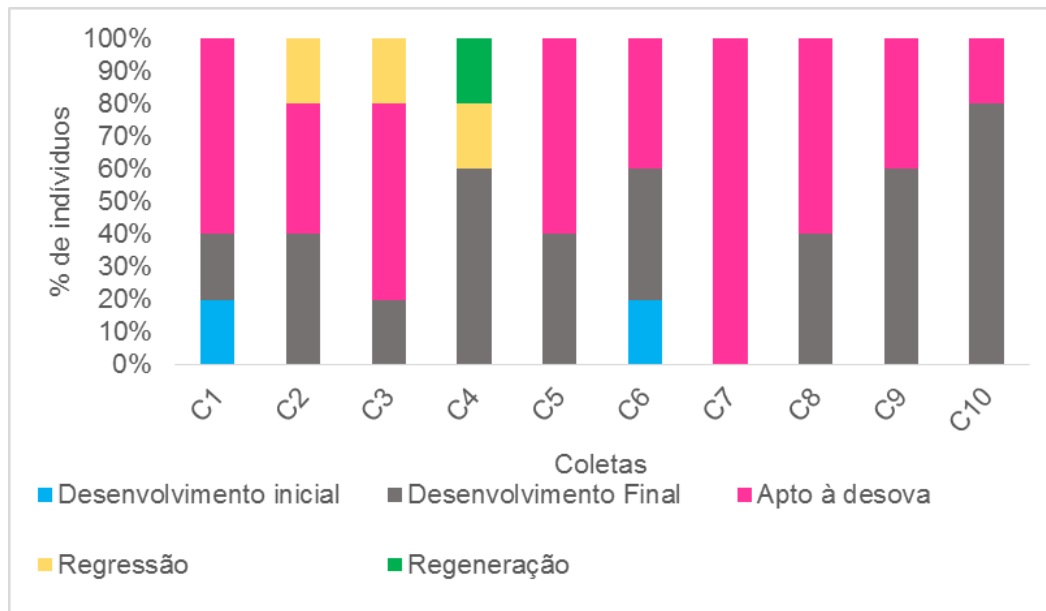
Fonte: própria autora

Figura 12- Frequência da porcentagem de indivíduos de *D. aequipinnatus* por fases reprodutivas em fêmeas ao longo das coletas na temperatura de 18°C. **Legendas:** C1 – coleta1, C2- coleta 2, C3- coleta 3, C4 – coleta 4, C5- coleta 5, C6- coleta 6, C7- coleta 7, C8- coleta 8, C9- coleta 9, C10- coleta 10.



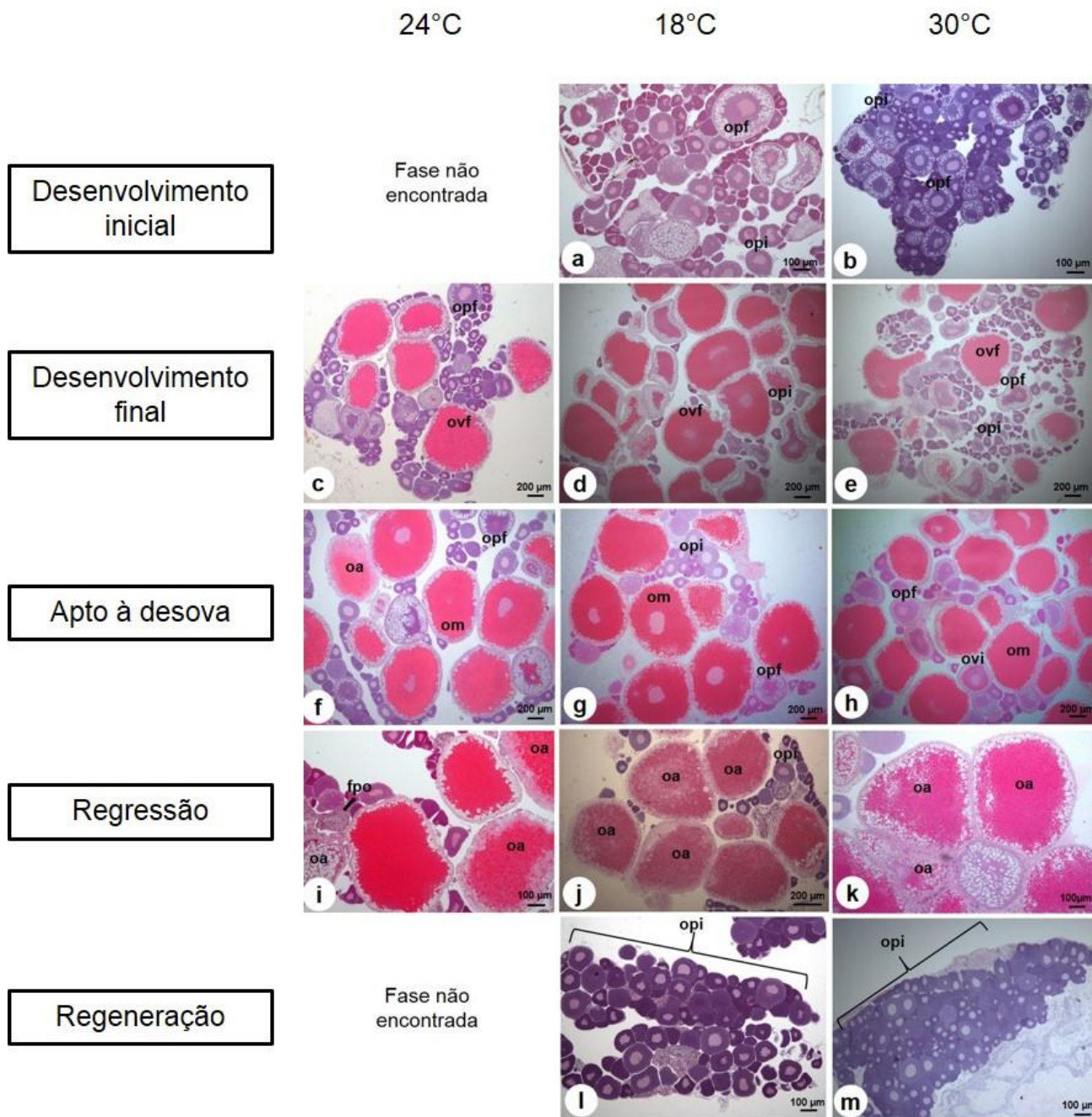
Fonte: própria autora

Figura 13 - Frequência da porcentagem de indivíduos de *D. aequipinnatus* por fases reprodutivas em fêmeas ao longo das coletas na temperatura de 30°C. **Legendas:** C1 – coleta1, C2- coleta 2, C3- coleta 3, C4 – coleta 4, C5- coleta 5, C6- coleta 6, C7- coleta 7, C8- coleta 8, C9- coleta 9, C10- coleta 10.



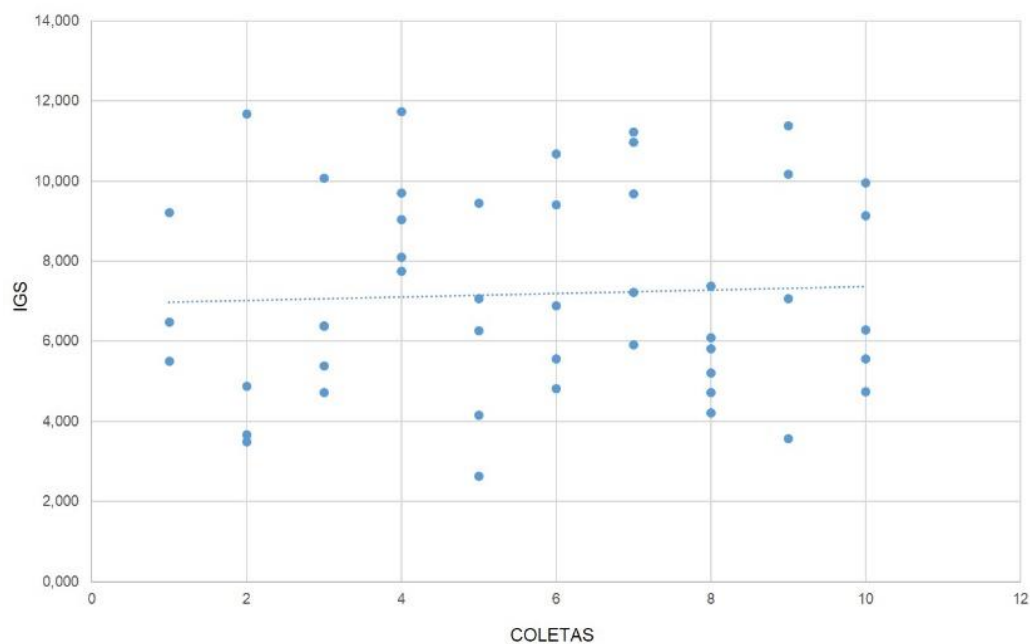
Fonte: própria autora

Figura 14 - Fases reprodutivas de *D. aequipinnatus* nas temperaturas de 24°C, 18°C e 30°C. a) e b) Ovários em fase de desenvolvimento inicial com oócitos previtelogênicos iniciais (opi) e finais (opf); c - e) Ovários em fase de desenvolvimento final com oócitos vitelogênicos finais (ovf); f - h) Ovários em fase de apto à desova com oócitos maduros (om); i-j) Ovários em regressão por desova evidenciando na T24 folículo pós-ovulatório (fpo) e regressão por atresia evidenciando os oócitos maduros atresícos (oa); l-m) Ovários em fase de regeneração somente com oócitos previtelogênicos iniciais (opi). **Coloração:** Hematoxilina/Eosina.



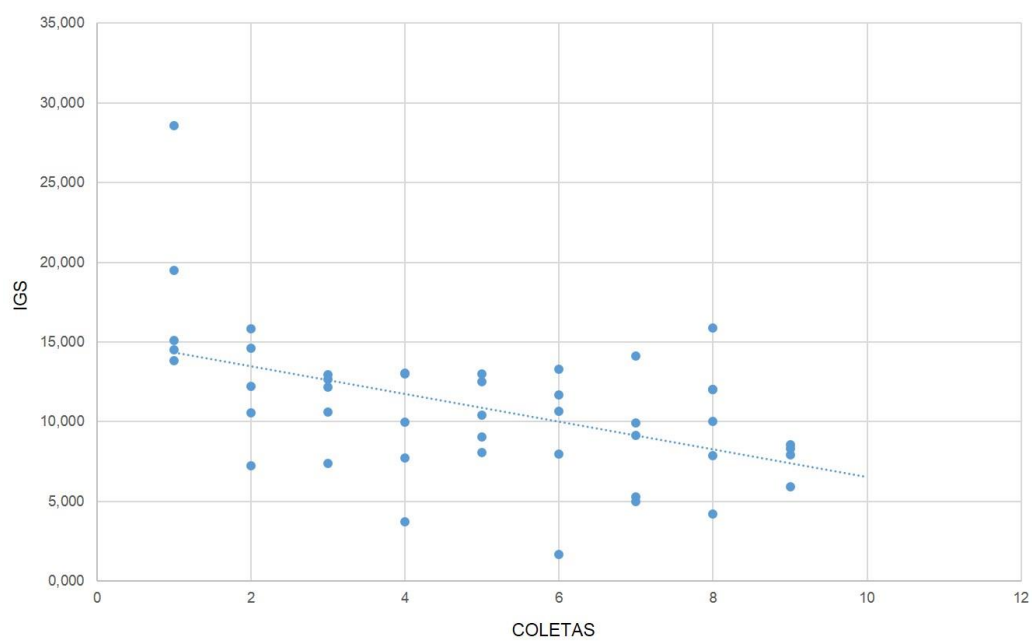
Fonte: própria autora

Figura 15 - Correlação linear entre as variáveis de distribuição dos valores do índice gonadosomático (IGS) e o tempo ao longo das coletas na temperatura de 24°C em *D. aequipinnatus*.



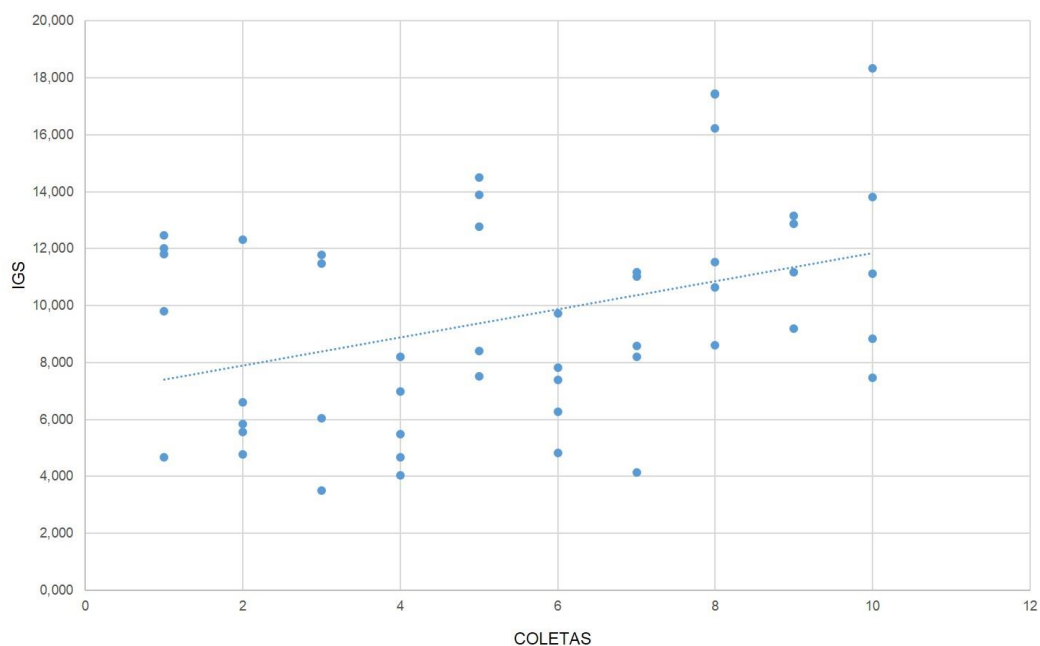
Fonte: própria autora

Figura 16 - Correlação linear entre as variáveis de distribuição dos valores do índice gonadosomático (IGS) e o tempo ao longo das coletas na temperatura de 18°C em *D. aequipinnatus*.



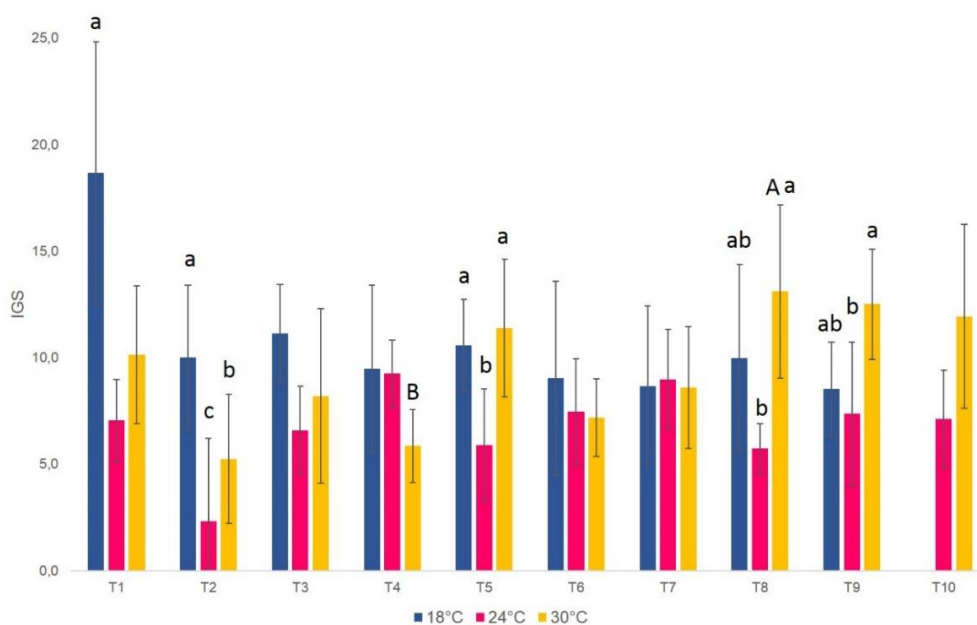
Fonte: própria autora

Figura 17- Correlação linear entre as variáveis de distribuição dos valores do índice gonadosomático (IGS) e o tempo ao longo das coletas na temperatura de 30°C em *D. aequipinnatus*.



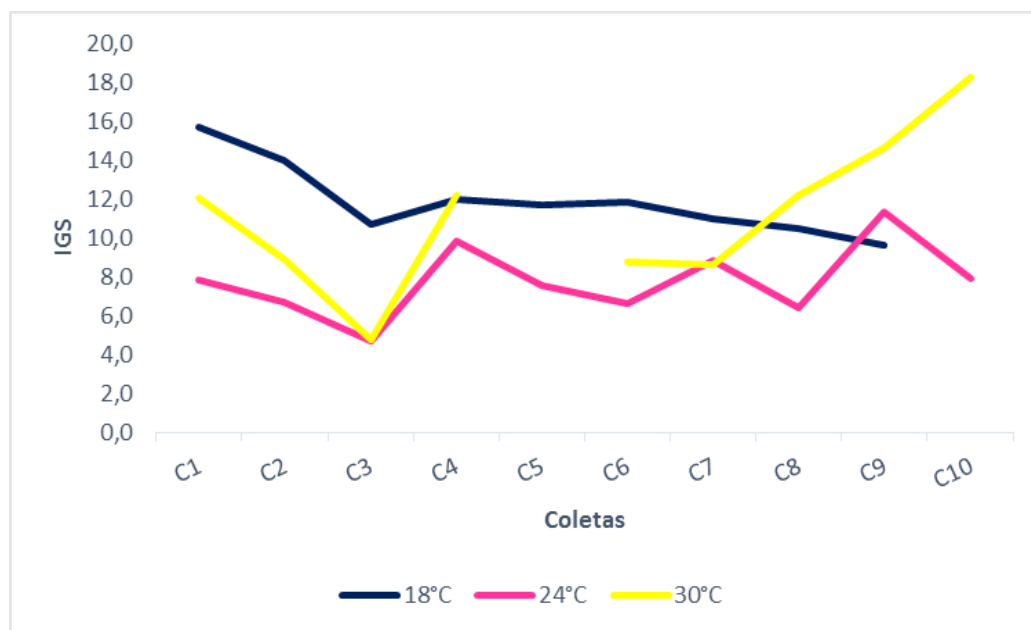
Fonte: própria autora

Figura 18 - Média do índice gonadosomático (IGS) de *D. aequipinnatus* entre as diferentes temperaturas ao longo do experimento e entre as coletas dentro da mesma temperatura de 18°C, 24°C e 30°C. As diferenças significativas são representadas por letras maiúsculas e minúsculas (as letras maiúsculas se referem as diferenças significativas dentre as coletas na mesma temperatura de 30°C e letras minúsculas são diferenças significativas entre as diferentes temperaturas de 18°C (T18), 24°C (T24) e 30°C (T30)).



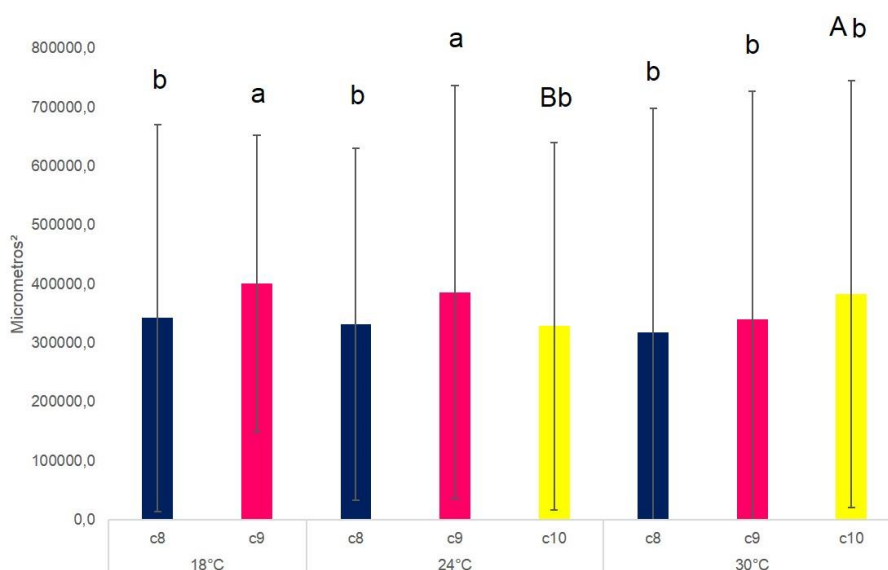
Fonte: própria autora

Figura 19– Valores médios do Índice Gonadossomático (IGS) por fase de apto à desova de *D. aequipinnatus* entre as temperaturas de 18°C, 24°C e 30°C ao longo das coletas. **Legendas:** C1 – coleta1, C2- coleta 2, C3- coleta 3, C4 – coleta 4, C5- coleta 5, C6- coleta 6, C7- coleta 7, C8- coleta 8, C9- coleta 9, C10- coleta 10.



Fonte: própria autora

Figura 20 - Médias das áreas dos oócitos maduros de *D. aequipinnatus* nas diferentes temperaturas ao longo do experimento e nas coletas dentro da mesma temperatura de 18°C, 24°C e 30°C. As diferenças significativas são representadas por letras maiúsculas e minúsculas (letras maiúsculas se referem as diferenças significativas entre as coletas 10 nas temperaturas de 24°C e 30°C, respectivamente e letras minúsculas são diferenças significativas dentro das temperaturas de 18°C, 24°C e 30°C).



Fonte: própria autora

3.4 DISCUSSÃO

Em *D. aequipinnatus* a temperatura é um fator modulador na reprodução de fêmeas quando submetidas a diferentes temperaturas. As temperaturas de 18°C e 30°C em relação àquela considerada como zona de conforto da espécie modificou o padrão de desenvolvimento das fases reprodutivas ao longo do experimento. De acordo com Baldisserotto (2013) as variações da temperatura nos peixes podem afetar diretamente os tecidos, células e moléculas podendo desencadear dois grandes efeitos: as taxas de todo o processo biológico são influenciadas dentro de uma faixa normal de temperatura e também as temperaturas extremas causam distúrbios ou até mesmo efeitos letais.

Neste sentido, o presente trabalho corrobora com outros autores que reportam que os fatores ambientais como a temperatura influenciam nos aspectos reprodutivos (BOEUF; PAYAN, 2000; DORTS et al., 2012; GILLET; QUÉTTIN, 2006; SHIMIZU, 2003; ZIEBA; FOX; COPP, 2010) principalmente considerando o fato de que os peixes são animais mais eficientes na conversão de energia (MOHNEN; WANG, 1992; KUBITZA, 2000) e dependem do meio externo para a regulação do seu metabolismo.

Na T24 foram encontradas com maior frequência a fase de apto à desova. Esta fase foi identificada ao longo de todas as coletas e pode estar relacionada ao fato da espécie ter um rápido ciclo reprodutivo como observado em machos da mesma espécie descrito por Chagas (2014) e em *Danio rerio* também ciprínideo descrito por Huszno; Klag (2012) que reportam que nesta espécie o ciclo em machos tem duração em torno de 10 semanas.

A temperatura de 24°C em *D. aequipinnatus* é tida como a zona de conforto para estes animais em ambiente natural (RIEHL; BAENSCH, 1991). Desta forma, esta temperatura em que os animais são encontrados no ambiente favorece o desenvolvimento ovariano, a exemplo do salmonídeo *Thymalus thymallus*, em que a maioria das fêmeas ovularam na temperatura natural e nas demais consideradas como tratamento esta taxa de ovulação foi drasticamente reduzida (LAHNSTEINER; KLETZL, 2012).

Na T18 foi observado muitos indivíduos em regressão com aspectos morfológicos diferentes da T24, esta fase continha muitos oócitos maduros atresícos indicando que esses animais não desovaram e que a reabsorção destas células poderia estar relacionada a redução do gasto energético. Da

mesma forma como foi verificado em nosso trabalho, em *Cottus gobio* a frequência destas células está ligada ao comprometimento do desenvolvimento gonadal (DORTS et al., 2012) ocasionando atraso na ovulação, como visto em *Anarhichas lupus*, sendo assim poderia refletir uma aclimatação a fim de evitar a desova em temperaturas que são prejudiciais aos gametas, causando falhas na reprodução (TVEITEN; JOHNSEN, 1999). Estas informações concordam com as premissas de Davies e Bromage (2002) de que animais submetidos a temperaturas baixas podem atrasar a desova devido redução na produção e captação da vitelogenina.

Na T30 também foi observado indivíduos em Regressão com as mesmas características morfológicas como supracitado em T18, no entanto em menor porcentagem. Embora tenha sido identificado todas as fases reprodutivas no início das coletas, no final do experimento foi observado somente as fases de Desenvolvimento final e Apto à desova possivelmente estes animais se ajustaram a esta temperatura, pois o mesmo foi observado em T24. Alguns autores relatam na literatura que altas temperaturas podem tanto atrasar ou inibir a maturação gonadal (PANKHURST et al., 1996; PANKHURST; THOMAS, 1998; TARANGER et al., 2004) ou acelerar o desenvolvimento (KING et al., 2003). Segundo estes mesmos autores o efeito da temperatura elevada poderia agir diretamente nos diferentes níveis da cascata endócrina reprodutiva, portanto este efeito reduziria significativamente a viabilidade dos oócitos durante a vitelogênese e de acordo com Dorts et al. (2012) poderia causar mudanças no tempo de maturação das gônadas. Assim em *D. aequipinnatus* foi verificado que nas ultimas coletas houve um atraso no ciclo reprodutivo, pois a porcentagem de indivíduos em Desenvolvimento Final aumentou no decorrer das coletas.

A maior incorporação de vitelo está relacionada aos maiores valores de IGS em *Fundulus heteroclitus* (SHIMIZU, 2003) o que contribui para tamanhos maiores das células, tal fato foi verificado nos oócitos maduros na T30 em *D. aequipinnatus* sendo que a coleta 10 teve a maior média e foi diferente estatisticamente da T24 em termos de área das células. Entretanto, em espécies de clima temperado como *Salmo salar* (WATTS et al. 2004; KING et al., 2003) e em *Cottus gobio* (DORTS et al., 2012), a média dos diâmetros das

células na temperatura considerada como mais alta foram menores em comparação ao controle.

A análise do IGS com a histologia quando utilizadas em conjunto, mostrou que estas duas ferramentas fornecem uma interpretação mais precisa dos dados (HONJI et al., 2006; BARROS et al., 2011) assim a média dos dados do IGS nas últimas coletas diminuiu na T18 enquanto na T30 aumentou pois foram encontrados indivíduos em Regressão como Regeneração na temperatura mais baixa e em fase mais avançada de Desenvolvimento na temperatura mais alta.

Assim na T18 os valores do IGS mostrou uma diminuição ao decorrer do experimento, tal relato foi observado em *Oncorhynchus mykiss* (Pankhurst et al., 1996). Entretanto em temperaturas mais elevadas, Watts e colaboradores (2004) relataram que o IGS diminuiu comparada ao controle e também na temperatura alta tiveram os menores diâmetros dos oócitos. Da mesma forma Dorts et al. (2012) reportaram que a temperatura elevada também decresceu o IGS e ainda houve ausência de pico, desta forma esses resultados poderiam confirmar os efeitos deletérios das variáveis ambientais no processo de oogênese. Esses dados diferem dos resultados encontrados em *D. aequipinnatus* no qual a T30 comparado com T24 teve os maiores valores de IGS principalmente nas últimas coletas.

3.5 CONSIDERAÇÕES GERAIS

Desta forma, podemos concluir que a descrição morfológica ovariana de *D. aequipinnatus* é essencial para determinar o seu ciclo ovariano e segue os padrões de desenvolvimento estabelecidos por Brown-Peterson et al. (2011) sendo uma ferramenta importante para o entendimento da atuação da temperatura na reprodução.

Assim a temperatura influenciou o desenvolvimento ovariano de fêmeas de *D. aequipinnatus* tanto em temperaturas mais altas (30°C) como mais baixas (18°C), contudo a T18 causou atresia em uma porcentagem maior de indivíduos, mostrando esta ser mais prejudicial a espécie.

AGRADECIMENTOS:

Gostaríamos de agradecer a Raphael Costa pelas imagens e auxílio com os dados estatísticos; Amanda Pereira, Douglas Ribeiro, Jumma Miranda, Pricila de Oliveira e Prof^a Dr^a Cristiële Ribeiro pelo auxílio nas coletas e manutenção dos animais contribuindo no desenvolvimento deste trabalho.

3.6 REFERÊNCIAS

- BALDISSEROTTO, B. **Fisiologia de peixes aplicada à piscicultura**. 3. ed. Santa Maria: Ed. UFSM, 2013.
- BARROS, N. H. C.; NASCIMENTO, W. S.; ARAÚJO, A. S.; GURGEL, L. L., CHELLAPPA, S. Aspectos reprodutivos de *Pimelodella gracilis* (Valenciennes, 1835) (Osteichthyes: Pimelodidae) do açude da Ecoregião Caatinga. **Biota Amazônia**, Amapá, v. 1, n. 2, p. 53-59, 2011.
- BIJOYA, P.; FARUQUE, H.; AHSAN, D. Consequences of climate change on fish biodiversity in the river turag, bangladesh: a community perception study. **World Journal of Fish and Marine Sciences**, Dubai, v. 6, n. 2, p. 136-141, 2014, 2014.
- BOEUF, G.; PAYAN, P. Does salinity have an influence on fish growth? **Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology**, Philadelphia, v. 126, p. 15 , 2000.
- BURT, J.; HINCH, S.; PATTERSON, D. The importance of parentage in assessing temperature effects on fish early life history: a review of the experimental literature. **Fish Biology Fisheries**, v. 21, p. 377-406, 2011.
- CHAGAS, J. M. A. **Os efeitos da alta temperatura e do Myleran (Busulfan) na espermatogênese de *Devario aequipinnatus* (Teleostei: Cyprinidae)**. 2015. 69f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia Animal) – Faculdade de Engenharia de Ilha Solteira, Ilha Solteira, 2015.
- COSSINS, A.; CRAWFORD, D. L. Fish as models for environmental genomics. **Nature**, Washington, v. 6, p. 324- 340, 2005.
- DAVIES, B; BROMAGE, N. The effects of fluctuating seasonal and constant water temperatures on the photoperiodic advancement of reproduction in female rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 205, p. 183– 200, 2002.
- DORTS, J.; GRENOUEILLET, G.; DOUXFILS, J.; MANDIKI, S. N. M., MILLA, S.; SILVESTRE, F.; KESTEMONT, P. Evidence that elevated water temperature affects the reproductive physiology of the European bullhead *Cottus gobio*. **Fish Physiology and Biochemistry**, Dordrecht, v. 38, p. 389-399, 2012.
- GILLET, C.; QUÉTIN, P. Effect of temperature changes on the reproductive cycle of roach in Lake Geneva from 1983 to 2001. **Journal of Fish Biology**, West Sussex, v. 69, n. 2, p. 518–534 , 2006.
- HONJI, R. M.; VAZ-DOS-SANTOS, A. M.; ROSSI-WONGTSCHOWSKI, C. L. D. B. Identification of the stages of ovary maturation of the Argentine hake

Merluccius hubbisi Marini, 1933 (Teleostei: Merlucciidae): advantages and disadvantages of the use of the macroscopic and microscopic scales. **Neotropical Ichthyology**, Porto Alegre, v. 4, n. 3, p. 329-337, 2006.

HUSZNO, J.; KLAG, J. The reproductive cycle in the male gonads of *Danio rerio* (Teleostei, Cyprinidae). Stereological analysis. **Micron**, v. 43, n. 5, p. 666–672, 2012.

KING, H. R.; PANKHURST, N. W.; WATTS, M.; PANKHURST, P. M. Effect of elevated summer temperatures on gonadal steroid production, vitellogenesis and egg quality in female Atlantic salmon. **Journal of Fish Biology**, West Sussex, v. 63, 153–167, 2003.

KUBITZA, F. **Tilápia: tecnologia e planejamento na produção comercial**. Jundiaí: F. Kubitza, 2000. 285 p.

LAHNSTEINER, F.; KLETZL, M. The effect of Water Temperature on Gamete Maturation and Gamete Quality in the European Grayling (*Thymalus thymallus*) Based on Experimental Data and on Data from Wild Populations. **Fish Physiology and Biochemistry**, Dordrecht, v. 38, n. 2, p. 455–467.

MOHNEN, V. A.; WANG, W. C. An overview of global warming. **Environmental Toxicology and Chemistry**, Hoboken, v. 1, p. 1051–1059, 1992.

PANKHURST, N. W.; PURSER, G.J.; VAN DER KRAAK, G.; THOMAS, P. M.; FORTEATH, G. N. R. Effect of holding temperature on ovulation, egg fertility, plasma levels of reproductive hormones and in vitro ovarian steroidogenesis in the rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 146, p. 277-290, 1996.

PANKHURST, N. W.; THOMAS, P. M. Maintenance at elevated temperature delays the steroidogenic and ovulatory responsiveness of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* to luteinizing hormone releasing hormone analogue. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 166, 163–177, 1998.

PANKHURST, N.; PORTER, M. Cold and dark or warm and light: variations on the theme of environmental control of reproduction. **Fish Physiology and Biochemistry**, Dordrecht, v. 28, 385–389, 2003.

SHIMIZU, A. Effect of photoperiod and temperature on gonadal activity and plasma steroid levels in a reared strain of the mummichog (*Fundulus heteroclitus*) during different phases of its annual reproductive cycle. **General and Comparative Endocrinology**, Maryland Heights, v. 131, n. 3, p. 310–324, 2003.

RIEHL, W.; BAENSCH, H. A. **Auqarien atlas**. Melle: Mergus, Verlag fur Natur- und himtierkunde. 1991. 992p.

TARANGER, G. L.; VIKINGSTAD, E. KLENKE, U.; MAYER, I.; STEFANSSON, S. O; NORBERG, B.; HANSEN, T.; ZOHAR, Y.; ANDERSSON, E. Effects of

photoperiod , temperature and GnRHa treatment on the reproductive physiology of Atlantic salmon (*Salmo salar* L .) broodstock. **Fish Physiology and Biochemistry**, Dordrecht, v. 28, p. 403–406 , 2004.

TVEITEN, H.; JOHNSEN, H. K. Temperature experienced during vitellogenesis influences ovarian maturation and the timing of ovulation in common wolffish. **Journal of Fish Biology**, Birmingham, v. 55, n. 4, p. 809–819 , 1999.

VAN DER KRAAK, G.; PANKHURST, N. **Temperature effects on the reproductive performance of fish**. Cambridge: Cambridge University Press, 1997.

WATTS, M.; PANKHURST, N. W.; KING, H. R. Maintenance of Atlantic salmon (*Salmo salar*) at elevated temperature inhibits cytochrome P450 aromatase activity in isolated ovarian follicles. **General and Comparative Endocrinology**, Maryland Heights, v. 135, n. 3, p. 381–390 , 2004.

WIKELSKI, M.; COOKE, S. J. Trends in ecology and evolution. **Conservation Physiology**, Oxford, v. 21, p. 38-46, 2006.

ZIEBA, G.; FOX, M. G.; COPP, G. H. The effect of elevated temperature on spawning of introduced pumpkinseed *Lepomis gibbosus* in Europe. **Journal of Fish Biology**, Birmingham, v. 77, n. 8, p. 1850–1855 , 2010.