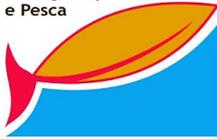


Programa de pós-graduação
Ecologia Aquática
e Pesca



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ECOLOGIA AQUÁTICA E PESCA

RENATA SILVA DE OLIVEIRA

**DESENVOLVIMENTO OVARIANO DO MAPARÁ, *Hypophthalmus marginatus*,
VALENCIENNES, 1840 (SILURIFORME, PIMELODIDAE):
CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL E IMUNOHISTOQUÍMICA**

BELÉM

2018

RENATA SILVA DE OLIVEIRA

**DESENVOLVIMENTO OVARIANO DO MAPARÁ, *Hypophthalmus marginatus*,
VALENCIENNES, 1840 (SILURIFORME, PIMELODIDAE):
CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL E IMUNOHISTOQUÍMICA**



Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ecologia Aquática e Pesca do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Pará, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ecologia Aquática e Pesca.

Orientador (a): Dr^a. **Rossineide Martins da Rocha**
Laboratório de Ultraestrutura celular ICB/UFPA

BELÉM

2018

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal do Pará
Gerada automaticamente pelo módulo Ficat, mediante os dados fornecidos
pelo (a) autor (a)

O48d Oliveira, Renata Silva de

Desenvolvimento ovariano do Mapará, *Hypophthalmus marginatus*, Valenciennes, 1840 (Siluriforme, Pimelodidae): Caracterização estrutural e imunohistoquímica / Renata Silva de Oliveira. – 2018 43 f.: il. Color

Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-graduação em Ecologia Aquática e Pesca (PPGEAP), Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Pará, Belém, 2018. Orientação: Profa. Dra. Rossineide Martins da Rocha

1. Pimelodidae-Tocantins (PA). 2. Maturação ovariana. 3. Apoptose-Proliferação celular. 4. Imunohistoquímica. I. Rocha, Rossineide Martins da, *orient.* II. Título

CDD 597.0929

RENATA SILVA DE OLIVEIRA

**DESENVOLVIMENTO OVARIANO DO MAPARÁ, *Hypophthalmus marginatus*,
VALENCIENNES, 1840 (SILURIFORME, PIMELODIDAE):
CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL E IMUNOHISTOQUÍMICA**

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ecologia Aquática e Pesca do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Pará, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ecologia Aquática e Pesca.

Conceito: EXCELENTE

Data de aprovação: 21 de Fevereiro de 2018

Banca Examinadora:

Dr^a Rossineide Martins da Rocha (ICB/UFPA) – Orientadora/Presidente

Prof^a Dr^a Simone do Socorro Damasceno Santos (ICB/UFPA) – Titular-Membro Externo

Prof^a Dr^a Adriana Guimarães (ICB/UFPA) – Titular-Membro-Externo

Prof^a Dr^a Maria Auxiliadora Pantoja Ferreira (ICB/UFPA) - Titular-Membro Externo

Prof^a Dr^a Diva Anelie de Araujo Guimarães (ICB/UFPA) – Suplente-Membro Externo

Prof^o Dr^o Marcelo Petraco (ICB/UFPA) –Suplente- Membro Externo

DEDICATÓRIA

Dedico à minha família, especialmente aos meus pais, ao meu esposo e aos meus irmãos do Lab que adquiri ao longo dessa jornada pelo apoio, conselhos, força e momentos de descontração...

AGRADECIMENTOS

A vida acadêmica não é uma tarefa fácil. São anos de dedicação e de certa forma, privações, mas o que construí até hoje faço questão de compartilhar com todos aqueles que estiveram e estão em minha vida. Muitas foram aquelas pessoas que de forma direta ou indireta auxiliaram e apoiaram-me na concretização de mais esta etapa de minha vida. E é com imensa alegria que faço questão de dividir esta conquista e expressar minha gratidão a todos por todo o apoio e dedicação que recebi.

Primeiramente, gostaria de agradecer a Deus por me conceder a vida, por me abençoar e me dar forças todos os dias, para superar os obstáculos e também me proporcionar bons momentos e bons amigos ao longo dessa jornada.

Aos meus pais Valda Silva e Odair Oliveira, pelo amor incondicional, pelo apoio, incentivo, paciência, persistência e compreensão. Por todo o esforço e confiança dedicados a mim desde o meu nascimento até o meu ingresso na universidade e durante o decorrer do curso. Por toda dedicação mesmo após minha saída de casa e ter constituído minha família. Tudo isso foi essencial durante todos esses anos para que eu chegasse aqui. Vocês são um exemplo que pretendo seguir até o fim. Amo vocês incondicionalmente!!

Aos meus irmãos, Renan (que mesmo distante está sempre em meu coração e pensamentos), e Reinaldo (que sempre esteve comigo), pelas brincadeiras, companheirismo e briguinhas (rsrs), nos diversos momentos de nossas vidas. Obrigado por me dar forças e apoiar nos momentos em que mais precisei.

Ao meu esposo Ronald, pelo apoio e compreensão, principalmente naqueles momentos de ausência, que não foram e não são poucos. Por sempre apoiar meus estudos. Por me ajudar com as atividades de casa e por me ouvir falar do meu trabalho mesmo sem saber muita coisa sobre o que falo, por me proporcionar bons momentos em todos esses anos. Aprendi muita coisa e também amadureci ao seu lado. Obrigada por tornar os momentos mais descontraídos principalmente nos meus momentos de tensão e de grande mau humor (rsrsrsrs). Obrigada por tudo. Amo você!

À Universidade Federal do Pará, pela concessão de espaço para a realização de minha pesquisa e ainda por nos conceder momentos inesquecíveis que levarei para a vida inteira.

À Professora Rossineide Martins da Rocha, por abrir as portas de seu laboratório e me deixar fazer parte dessa grande família, pelo privilégio de ser uma entre seus orientandos. Agradeço por sua orientação ao longo da graduação (PIBIC/TCC), agora do mestrado e espero que futuramente do doutorado também. De vez em quando, dou uns escorregões pelo meio do caminho, mas tenho a senhora para me orientar e seguir no caminho certo. Obrigada sinceramente por compartilhar do seu conhecimento. Pelos ensinamentos, incentivos, conselhos e puxões de orelha que foram e são essenciais para o meu amadurecimento e nunca serão esquecidos! Todos os momentos vividos no Laboratório de Ultraestrutura Celular propiciaram mais que um crescimento intelectual, me permitiu abrir novos horizontes e vivenciar experiências ímpares.

A professora Maria Auxiliadora, por me acolher em seu laboratório (Imunohistoquímica e Biologia do Desenvolvimento), pela confiança de nos dar

autonomia ao longo da realização de atividades e generosidade de compartilhar todo seu conhecimento com seus orientandos e comigo. Agradeço pelos conselhos, orientações e pela paciência comigo, por ler meus trabalhos algumas vezes e pelas sugestões. Também gostaria de agradecer pela convivência do dia-a-dia e incentivo. Obrigada por tudo!!

Aos membros da banca examinadora, pela revisão do texto e sugestões que certamente serão valiosas.

Aos amigos/IRMÃOS de laboratório: Fernando, Juliana Pantoja, Yanne, Ivana, Breno e Juliana Molica, que mais do que companheiros de trabalho tornaram-se família. Vocês são pessoinhas mais do que especiais em minha vida, desde que entrei no laboratório. Nando, Ju Pantoja e Breno que me aguentaram desde a graduação, me levaram até a Histologia e estou até hoje. Ao longo dessa jornada nos choramos, sofremos e sorrimos juntos. Sempre tentando melhorar e crescer na vida. Nando, amigão, irmão e em algumas horas filho (kkkkk), obrigada por todos os momentos compartilhados, sem você, hoje eu não teria essa nova família. Te admiro pela garra, coragem e companheirismo incondicional. Ju Pantoja, mulher guerreira, pessoa mais forte e persistente que conheço. Amiga, te admiro muito e em muitas vezes nossas mentes parecem estar interconectadas que nos marcamos e pensamos e printar as mesmas coisas (kkkkkk), companheira de tensão. Breno, pessoa mais carrancuda que conheço, mas no fundo, no fundo... Sei que tem um ser amável e carinhoso aí dentro (kkkkkkk), por isso, adoro perturbar a tua vida. Yanne, aquela amiga que adora cuidar e pensa em todos nós. Sei que posso contar contigo, assim como podes contar comigo sempre que precisar. És aquela pessoa que adora desenterrar aquelas músicas da nossa adolescência e nos faz recordar bons momentos. Parece que já nos conhecíamos desde aquela época. Ivana, que compartilhou seu zebrinha desde o início até o último momento comigo. Me ensinou a cortar no micrótomo e hoje já corto melhor que ela (kkkkkkkk). Amiga, obrigada pelos debates sobre a oogênese e em resumo o complexo folicular. Me sinto importante quando você pede minha opinião sobre os novos bichinhos. Ahhh e quero saber qual o sexo do bebê até hoje (kkkkkk). Ju Molica, pessoa de personalidade forte que admiro muito. Lacradora das makes (kkkkkk), queria ter esse seu talento. Mas além disso, tem a habilidade de nos fazer sorrir até naqueles momentos dramáticos, que estamos para baixo. E é dona de uma sinceridade que só você tem. Todos trabalharam comigo na realização de experimentos. Por todas as contribuições, ensinamentos e pelos momentos de descontração no laboratório (e fora dele), que tornam a nossa pesquisa muito mais prazerosa. Sem a motivação e entusiasmo de vocês a produção deste trabalho não seria a mesma. Muito obrigada de coração!! De modo geral, nossas personalidades são muito diferentes e acho que por isso nos completamos em quase tudo!! Admiro muito todos vocês de coração. Amo vocês!!!!

Liziane, pretinha, obrigada por tudo, por compartilhar do seu conhecimento, principalmente sobre o mapará (kkkkkk) que por sinal é uma delícia. Obrigada pelos momentos de descontração e conversas durante as nossas coletas em que literalmente ficamos no meio do pitiú (kkkkk) e pelas palavras de conforto quando necessitei. Muito obrigada por tudo. Agradeço também aos meus novos amigos do lab, Ingridi, Gicelle, Cássio, Andrews e Malu, por compartilharem suas experiências e pelos momentos de descontração e conversas. Espero que esses momentos se prolonguem mais e mais no decorrer de nossas vidas. Não podia esquecer da Lia, nossa querida Técnica, obrigada

pelas conversas, troca de experiências e por me ajudar com a minha montanha de intermináveis bloquinhos. Obrigada por tudo sempre!!!

Ao professor José Antônio e ao Técnico Sanderson, do Laboratório de Microscopia Eletrônica do Instituto Evandro Chagas, que compartilharam de seus laboratórios para que realizássemos parte do trabalho. Agradeço imensamente pela colaboração em fases essenciais da minha pesquisa.

À CAPES pela concessão das bolsas de estudos.

E a todos aqueles que de certa forma contribuíram para o desenvolvimento do meu trabalho e a finalização desta etapa meus sinceros agradecimentos. Muito obrigada!

SUMÁRIO

DEDICATÓRIA	V
AGRADECIMENTOS	VI
RESUMO	10
INTRODUÇÃO GERAL	11
OBJETIVOS	15
Geral	15
Específicos	15
REFERÊNCIAS	16
ARTIGO I. DESENVOLVIMENTO OVARIANO DO MAPARÁ, <i>Hypophthalmus marginatus</i>, VALENCIENNES, 1840 (SILURIFORME, PIMELODIDAE): CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL E IMUNOHISTOQUÍMICA	19
RESUMO	20
1.INTRODUÇÃO	21
2. MATERIAL E MÉTODOS	23
2.1 Coleta das amostras.....	23
2.2 Microscopia de luz.....	23
2.3 Análises estatísticas.	23
2.4 Microscopia eletrônica de transmissão (MET).....	23
2.5 Microscopia eletrônica de varredura (MEV).....	24
2.6 Imunohistoquímica	24
3. RESULTADOS	25
3.1 Características morfológicas dos ovários.....	25
3.2 Características das células germinativas dos ovários	28
3.3 Imunohistoquímica.....	31
DISCUSSÃO	33
REFERÊNCIAS	37

RESUMO

Em peixes a maturação gonadal envolve mecanismos que desencadeiam a proliferação e a morte de células a fim de garantir a homeostase tecidual. Para este estudo foi utilizada a espécie *Hypophthalmus marginatus*, um siluriforme de médio porte pertencente à família Pimelodidae. É um peixe muito apreciado e comercializado na Amazônia Oriental. Deste modo, torna-se necessário estudos que promovam a compreensão do ciclo reprodutivo, produção e preservação da espécie. Portanto, o trabalho tem por objetivo descrever características estruturais, ultraestruturais e investigar os mecanismos de proliferação e a apoptose celular, durante o desenvolvimento ovariano de *H. marginatus*. Para isso, foram realizadas coletas no período de janeiro de 2016 a janeiro de 2017 a jusante da Usina Hidrelétrica de Tucuruí. Em campo foi realizado a biometria dos exemplares e remoção das gônadas para identificação do sexo (machos e fêmeas), em seguida fragmentos da região mediana dos ovários foram fixados e processados pela Microscopia de Luz (ML), MEV, MET e imunohistoquímica para verificar a imunolocalização de Caspase-3 clivada, Bcl-2 e PCNA nos ovários da espécie. A análise macroscópica dos ovários sugere que o padrão de vascularização, coloração e volume variam de acordo com o desenvolvimento. Histologicamente caracterizamos cinco estágios de maturação para os ovários e os tipos celulares evidentes ao longo do ciclo reprodutivo. Através da morfometria verificou-se diferenças no diâmetro dos oócitos ao longo do processo de maturação. Pela imunohistoquímica observou-se que houve marcação positiva das proteínas PCNA, Bcl-2 e caspase-3 em todos os estágios da maturação ovariana. Onde a imunolocalização de PCNA foi mais evidente em células foliculares, oogônias e núcleo de oócitos. Bcl-2 foi positivo no núcleo de oogônias e oócitos. Já a Caspase-3 teve reação positiva no citoplasma, núcleo de oócitos e em oócitos atresícos. Dessa forma, concluímos que as proteínas proliferativas (PCNA), apoptóticas (Caspase-3) e anti-apoptóticas (Bcl-2) desempenham importante papel durante o processo de remodelação gonadal, possibilitando a proliferação, reparo e eliminação de células defeituosas ao longo da maturação ovariana. Estes estudos fornecem informações a respeito dos eventos que permeiam a maturação ovariana e produção de gametas que posteriormente podem auxiliar no manejo e preservação de espécies nativas tanto em ambiente natural quanto em cativeiro.

Palavras-chave: Peixe, ovário, proliferação, apoptose

INTRODUÇÃO GERAL

O ambiente influencia as características ecológicas e reprodutivas das espécies e molda a história de vida dos organismos, afetando principalmente a atividade reprodutiva que está associada aos estímulos ambientais através da ação de um conjunto de fatores abióticos, que desencadeiam a maturação gonadal (RIBEIRO & MOREIRA, 2012).

O desenvolvimento ovariano de peixes é caracterizado por processos transicionais, alterações morfológicas e estruturais. Os ovários são formados pela túnica albugínea, originam as lamelas ovígeras, onde estão presentes as oogônias e folículos ovarianos em desenvolvimento e maturação (BAZZOLI, 2003).

A oogênese tem início no epitélio germinativo a partir das oogônias (GRIER, 2002), distribuídas de forma descontínua ao longo do epitélio germinativo. Posteriormente sucessivas divisões mitóticas darão origem a novas oogônias, o que garante uma produção contínua de gametas femininos em peixes teleósteos, posteriormente, entram em meiose originando oócitos. O processo meiótico progride até que as pontes citoplasmáticas sejam quebradas pelas células pré-foliculares, desencadeando a individualização dos oócitos, originando os folículos ovarianos (QUAGIO-GRASSIOTTO et al., 2011).

Fatores ambientais e neuroendócrinos modulam o processo de desenvolvimento e maturação oocitária (THOMÉ et al., 2012). A partir da individualização da oogônia, esta passa a ser chamada de oócito e inicia o estágio de foliculogênese, caracterizado inicialmente pela intensa proliferação de organelas, diferenciação das células foliculares e surgimento de alvéolos corticais (QUAGIO-GRASSIOTTO et al., 2011), formando o complexo folicular, unidade funcional dos ovários (GRIER, 2012; 2017). Na fase posterior, o núcleo, apresenta nucléolos dispersos, ocorre a associação da camada da teca e formação da zona radiata, uma matriz extra-oocitária formada por poros ou canais contendo microvilos que partem dos oócitos em direção as células foliculares (LUBZENS et al., 2010; GRIER, 2012).

As nuagens e corpúsculos de Balbiani já descritos nessa fase de desenvolvimento são originados respectivamente a partir da síntese de RNA e dos aglomerados de organelas localizadas próximo ao núcleo, que se espalham por todo o citoplasma.

Posteriormente, ocorre o desenvolvimento mais expressivo da zona radiata e os alvéolos corticais tornando os oócitos progressivamente maiores, que acumularão reservas nutritivas necessárias para o desenvolvimento do embrião (GRIER, 2012). Com o final do crescimento oocitário o seu citoplasma encontra-se repleto de vitelo, zona radiata completamente desenvolvida e um aparelho micropilar formado (GRIER, 2012). Há redução ou interrupção da endocitose de vitelogenina, retomada da meiose e segmentação do núcleo desencadeando a desova (LUBZENS et al., 2010).

Em ovários desovados é comum observar oócitos atrésicos e os POCs (complexos pós-ovulatórios), que serão reabsorvidas pelo organismo. Os POCs são formados pela camada de células foliculares, zona radiata e camada da teca, tornando-se estruturas remanescentes de folículos maduros que foram desovados durante o período reprodutivo (MORAIS et al., 2016; GRIER et al., 2017).

Durante a maturação ovariana, mecanismos de proliferação e morte celular determinam o destino do folículo ovariano para ovulação ou para atresia folicular (KRYSKO et al., 2008). Dentre esses mecanismos o antígeno nuclear de proliferação celular (PCNA), é uma proteína não histônica, que destac-se em função da sua importância na regulação do ciclo celular, atua como co-fator da DNA-polimerase delta, está envolvido em processos celulares essenciais como replicação e reparo de DNA (STOIMENOV & HELLEDAY, 2009). Estudos evidenciaram que o PCNA também participa da regulação dos processos apoptóticos durante a oogênese (XU et al., 2011).

Dentre os mecanismos envolvidos na remodelação e remoção tecidual ovariana a apoptose é indicada como principal ativo quer seja, atuando em folículos atrésicos ou POCs. A morte celular programada ou apoptose é um processo que desempenha papel fundamental ao longo do desenvolvimento e homeostasia de organismos pluricelulares (JENKINS et al., 2013). Apresenta como características morfológicas a perda de adesão célula-célula e célula-matriz extracelular, retração celular, fragmentação do DNA, seguida pela fragmentação celular, formando corpos apoptóticos que serão fagocitados pelas demais células, sem ocasionar inflamação (BAUM et al., 2005). Os principais efetores da apoptose são as Caspases, entre elas a Caspase-3, uma molécula chave, principal efetora do processo apoptótico, sendo responsável pela clivagem proteolítica de proteínas celulares que desencadeiam as alterações típica da apoptose (BRENTNALL et al., 2013).

A Caspase-3 está presente nas células sob a forma de pró-enzimas inativas, ou seja, enquanto as células estão em vida útil ao organismo esse mecanismo de “autodestruição” permanece inativo. No entanto, quando essas células comprometem a saúde do organismo ou não são mais necessárias para ao mesmo, a apoptose é desencadeada, ocasionando a morte celular (ANDREU- VIEYRA et al., 2005).

No entanto, esses processos apoptóticos apresentam como reguladores cruciais, proteínas como Bcl-2, uma proteína anti-apoptótica presente na membrana mitocondrial externa, onde se ligam às proteínas pró-apoptóticas e impedem a permeabilização da membrana mitocondrial externa, a liberação do citocromo C e a ativação das caspases, inviabilizando a morte celular (LLAMBI et al., 2011).

Visto que o ambiente exerce forte influência no ciclo reprodutivo de peixes, modificações antrópicas podem interferir no sucesso reprodutivo de espécies (AGOSTINHO et al., 1993). A construção de barramentos em rios causa impactos na dinâmica do sistema fluvial em regiões a montante e a jusante da barragem (JUNK & MELLO, 1990), culminando com alterações físicas e químicas da água, o que pode modificar o ciclo de vida de muitas espécies. Algumas espécies podem encontrar condições favoráveis para a propagação, assim como, pode ocorrer extinção das menos adaptadas (MAZONNI & PEPITO, 2012). No entanto, algumas espécies que realizam migração reprodutiva, apresentam desenvolvimento oocitário normal, porém a desova tende a não ocorrer quando os mesmos estão confinados (MYLONAS, ZOAR, 2007; CASSEL et al., 2017).

A Hidrelétrica de Tucuruí foi a primeira barragem construída em um grande rio da Amazônia, o rio Tocantins. O rio Tocantins possui águas claras, localizado na porção leste da Bacia amazônica. Dentre as espécies encontradas destaca-se *Hypophthalmus marginatus*, popularmente conhecido como mapará, um siluriforme, pertencente à família Pimelodidae que está distribuído em rios da amazônica Oriental (FERRARIS, 2007). A espécie possui três pares de barbilhões, coloração acinzentada e apresenta hábito alimentar planctófago (MARTINS et al., 2011). É um peixe muito apreciado, devido à alta qualidade de sua carne e abundância na região (MARTINS et al., 2011).

H. marginatus é uma das principais espécies exploradas na região do reservatório e pouco se conhece sobre suas características reprodutivas. Estudos envolvendo a biologia podem ser evidenciados pela macroscopia, contudo a microscopia possibilita uma

descrição mais detalhada das mudanças morfológicas e estruturais de um ciclo reprodutivo (HONJI et al., 2006). Portanto, estudos sobre as características ovarianas desta espécie habitante de reservatório podem auxiliar no desenvolvimento de biotecnicas aplicadas à reprodução do mesmo e de outros teleósteos em cativeiro.

OBJETIVOS

GERAL

Descrever a maturação ovariana e a oogênese de *H. marginatus*.

ESPECÍFICOS

- Descrever a morfologia do ovário durante a maturação gonadal;
- Caracterizar através da MET e da MEV os tipos celulares presentes no ovário;
- Realizar a morfometria das células de linhagem germinativa durante a oogênese;
- Verificar a imunolocalização de Caspase-3, Bcl-2 e PCNA nas células germinativas em relação ao desenvolvimento gonadal;

REFERÊNCIAS

- AGOSTINHO, A. A. et al, (1993). Avaliação da atividade reprodutiva da comunidade de peixes dos primeiros quilômetros a jusante do reservatório de Itaipu. **Revista Unimar**, v. 15, n. s Suplemento.
- ANDREU-VIEYRA CV, HABIBI HR (2000). Factors controlling ovarian apoptosis. **Can J Physiol Pharmacol** 78:1003–1012
- BAUM, J. S.; GEORGE, JP St; MCCALL, K. (2005). Programmed cell death in the germline. In: **Seminars in cell & developmental biology**. Academic Press. p. 245-259.
- BAZZOLI, N. (2003). Parâmetros reprodutivos de peixes de interesse comercial do rio São Francisco, região de Pirapora, MG. In: **Águas, peixes e pescadores do São Francisco das Minas Gerais** (Godinho HP, Godinho AL eds). pp. 286-300. CNPq/PADCT, Editora PUC Minas, Inc.: Belo Horizonte.
- CASSEL, M. et al. (2017). Ovarian development and the reproductive profile of *Astyanax altiparanae* (Teleostei, Characidae) over one year: Applications in fish farming. **Theriogenology**, v. 98, p. 1-15.
- CHAVES et al., (2017). Distribuição de larvas de Pimelodidae (Pisces, Siluriformes) no trecho inferior do Rio Amazonas, Santarém, Pará. **Scientia Amazonia**, v. 6, n. 1, p. 19-30.
- FERRARIS JR., C.J. (2007). Checklist of catfishes, recent and fossil (Osteichthyes: Siluriformes), and catalogue of siluriform primary types. **Zootaxa**, 1418: 1-628.
- GRIER HJ. (2002). The germinal epithelium: Its dual role in establishing male reproductive classes and understanding the basis for indeterminate egg production in female fishes. In: Creswell RL (Ed.). Proceedings of the Fifty-third Annual Gulf and Caribbean Fisheries Institute, 2000, Biloxi, Mississippi. Fort Pierce, FL: Gulf and Caribbean Fisheries Institute, p.537-552
- GRIER, H J.; NEIDIG, C. L.; QUAGIO-GRASSIOTTO, I., (2017). Development and fate of the postovulatory follicle complex, postovulatory follicle, and observations on folliculogenesis and oocyte atresia in ovulated common snook, *Centropomus undecimalis* (Bloch, 1792). **Journal of Morphology**, v. 278, n. 4, p. 547-562.

HONJ, R. M. et al. (2006). Identification of the stages of ovarian maturation of the argentine hake *Merluccius hubbsi* Marini, 1933 (Teleostei: Merlucciidae): advantages and disadvantages of the use of the macroscopic and microscopic scales. **Neotropical Ichthyology**, v. 4, n. 3, p. 329-337.

JENKINS, V.K., TIMMONS, A.K., MCCALL, K. (2013). Diversity of cell death pathways:insight from the fly ovary. **Trends Cell Biol.** 332, 159–170.

JUNK, W. J.; MELLO, J. A. S (1990). Impactos ecológicos das represas hidrelétricas na bacia amazônica brasileira. *Estudos avançados*, v. 4, n. 8, p. 126-143.

KRYSKO, D.V. et al. (2008). Life and death of female gametes during oogenesis and folliculogenesis. **Apoptosis** 13: 1065-1087.

LUBZENS, E.; YOUNG, G.; BOBE, J.; CERDÀ, J. (2010). Oogenesis in teleosts: how fish eggs are formed. *Gen. Comp. Endocrinol.* 165: 367-389.

LLAMBI, F. M. et al. (2011). A unified model of mammalian BCL-2 protein family interactions at the mitochondria. **Mol Cell** 44:517–531.

MAZZONI, R. & PETITO J. T (2012). Distribuição, abundância e estrutura das populações de peixes antes e depois do represamento. Cap. 4. In R. Mazzoni, E. Pellegrini-Caramaschi & R. Iglesias-Rios (Eds.) *Ictiofauna do alto rio Tocantins: um estudo de caso e subsídios para o manejo no reservatório de Serra da Mesa*. Ciência e Paz, Rio de Janeiro, 2003.

MARTINS, J. C. et al. (2011). Seletividade da rede malhadeira-fixa para a captura do mapará, *Hypophthalmus marginatus*, no reservatório da usina hidrelétrica de Tucuruí, Estado do Pará, Brasil. **Bol Inst Pesca**, 37(2), 123-133.

MORAIS, RDVS et al. (2016). Relationship between bcl-2, bax, beclin-1, and cathepsin-D proteins during postovulatory follicular regression in fish ovary. **Theriogenology**, v. 85, n. 6, p. 1118-1131.

MYLONAS, C C.; ZOHAR, Y (2007). Promoting oocyte maturation, ovulation and spawning in farmed fish. In: *The Fish Oocyte*. Springer, Dordrecht. p. 437-474.

QUAGIO-GRASSIOTTO I, GRIER HJ, MAZZONI TS, NÓBREGA RH, AMORIM JP. (2011) Activity of the ovarian germinal epithelium on the follicle formation and the

oocyte development in the freshwater catfish *Pimelodus maculatus* (Teleostei: Ostariophysi: Siluriformes). **J Morphol**, v.8, p.1290-1306.

RIBEIRO, C. S. & MOREIRA, R. G. (2012). Fatores ambientais e reprodução dos peixes. **Revista da Biologia**. 8, p. 58-61

STOIMENOV, I., HELLEDAY, T., (2009). PCNA on the crossroad of cancer. **Biochem. Soc. Trans.** 37, 605–613.

THOMÉ, R. G., D et al. (2012). .Apoptosis, cell proliferation and vitellogenesis during the folliculogenesis and follicular growth in teleost fish. **Tissue and Cell**, 44(1), 54-62,

VAZZOLER, A. E. A. M. et al. (1996). Biologia da reprodução de peixes teleósteos: teoria e prática. Maringá: Eduem, v. 169.

XU, B. et al. (2011). Proliferating cell nuclear antigen (PCNA) regulates primordial follicle assembly by promoting apoptosis of oocytes infetal and neonatal mouse ovaries. **PLOS ONE** 6, e16046.

ARTIGO I

**DESENVOLVIMENTO OVARIANO DO MAPARÁ, *Hypophthalmus marginatus*,
VALENCIENNES, 1840 (SILURIFORME, PIMELODIDAE):
CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL E IMUNOHISTOQUÍMICA**

O artigo será submetido à *Journal of anatomy* (ISSN: 1469-7580)

**DESENVOLVIMENTO OVARIANO DO MAPARÁ, *Hypophthalmus marginatus*,
VALENCIENNES, 1840 (SILURIFORME, PIMELODIDAE): CARACTERIZAÇÃO
ESTRUTURAL E IMUNOHISTOQUÍMICA**

RESUMO

H. marginatus é um siluriforme de médio porte pertencente à família Pimelodidae, espécie de importância socioeconômica para a região, mas com poucos estudos sobre a sua reprodução. Este trabalho fornece informações sobre a morfologia do ovário de *Hypophthalmus marginatus*, características estruturais, ultraestruturais e morfometria das células germinativas e a presença de PCNA, Bcl-2 e Caspase-3, estabelecendo suas relações desde a maturação da gônada até a desova. Foram utilizados 276 exemplares capturados a jusante da Usina Hidrelétrica de Tucuruí, no período de janeiro de 2016 a janeiro de 2017. Os ovários apresentaram um padrão de vascularização, coloração e volume que variam de acordo com o estágio gonadal. Foram caracterizados os estágios imaturo, em maturação, maturo, desova e repouso e descritos cinco tipos celulares as oogônias, oócitos dos tipos I, II, III, IV, complexo pós-ovulatório e folículo atresio. Foi encontrado diferenças significativas no diâmetro dos oócitos. Foi observada a imunomarcagem de PCNA, Caspase-3 e Bcl-2 em todos os estágios da maturação, tanto nos folículos em crescimento quanto nos atresicos. Dessa forma, PCNA, Caspase-3 e Bcl-2 atuam em conjunto para formação e desenvolvimento das células germinativas, possibilitando a proliferação, reparo e eliminação de células defeituosas ao longo da maturação ovariana. Os estudos detalhados das características ovarianas desta espécie fornecem informações a respeito dos eventos que permeiam a produção de gametas em animais que habitam ambiente de reservatório e pode auxiliar no desenvolvimento biotecnológico aplicado à reprodução de teleósteos em cativeiro.

Key-words: Peixe, ovários, histologia, PCNA e Apoptose

1. INTRODUÇÃO

Em peixes o conhecimento da maturação ovariana é fundamental para compreender e as estratégias reprodutivas que o animal utiliza, mediante aos impactos ambientais que lhe são atribuídos. Nesse sentido, o ambiente influencia as características ecológicas dos organismos e molda a história de vida das espécies, afetando principalmente a atividade reprodutiva que está associada aos estímulos ambientais através da ação de um conjunto de fatores abióticos, que desencadeiam a maturação gonadal (RIBEIRO & MOREIRA, 2012).

A construção de barramentos em rios causa impactos na dinâmica do sistema fluvial em regiões a montante e a jusante da barragem (JUNK & MELLO, 1990), culminando com alterações físicas e químicas da água, o que pode modificar o ciclo de vida de muitas espécies, até limitar a reprodução de peixes (MAZONNI & PETITO, 2012). Estudos afirmam que peixes migradores completam o ciclo de desenvolvimento ovariano mesmo quando o processo de migração é interrompido e a maturação final do oócito é limitada em alguns períodos não ocorrendo a desova, permanecendo em estágio de repouso (ZOAR & MILONAS, 2001; PEREIRA ARANTES et al., 2011).

O teleósteo *Hypophthalmus marginatus* (Fig. 1-A), é um siluriforme amplamente explorado pela pesca artesanal com importância socioeconômica para a região Amazônica (MARTINS et al., 2011). Como outros pimelodídeos possui comportamento migratório, e realiza sua desova próximo as margens dos rios (CHAVES et al., 2017). Porém, informações sobre o desenvolvimento ovariano dessa espécie proveniente de reservatório são escassos na literatura.

A oogênese é um processo biológico complexo que envolve mudanças morfológicas e fisiológicas nas oogônias originando oócitos que se mantem interligados por pontes citoplasmáticas, até alcançarem o processo de individualização, que ocorre pela quebra destas pontes citoplasmática e culminam na formação dos folículos ovarianos (QUAGIO-GRASSIOTTO et al., 2011). Ao término da foliculogênese, o oócito está envolto pelo complexo folicular onde matura até o momento da ovulação (GRIER et al., 2017).

Em peixes o desenvolvimento e crescimento oocitário ocorre a partir da proliferação de organelas, mudanças nucleares, formação da zona radiata e diferenciação das células foliculares e tecais (LUBZENS et al., 2010; GRIER et al., 2017). Por influência dos hormônios sexuais ainda ocorre o acúmulo de glóbulos de vitelo no citoplasma dos oócitos e o aumento do diâmetro dos folículos em torno da célula. Ao final da maturação do oócito é descrita a segmentação do núcleo e a desova (PATIÑO & SULLIVAN, 2002; LUBZENS et al., 2010;

MELO et al., 2014). Após a desova, os ovários de peixes exibem o complexo pós-ovulatório (POC), constituído pela camada de células foliculares, membrana basal e camada da teca (GRIER et al., 2017). Há relatos que esta estrutura é reabsorvida via apoptose (THOMÉ et al., 2012; MORAIS et al., 2016). Os folículos que não finalizam o processo de crescimento ou que não ovularam, tornam-se folículos atrésicos (GRIER et al., 2017).

Durante a oogênese e crescimento folicular, os processos de proliferação e morte celular determinam o destino do folículo ovariano para ovulação ou para atresia folicular (KRYSKO et al., 2008; ESCOBAR et al., 2013). Nesse contexto, destaca-se o Antígeno Nuclear de Proliferação Celular (PCNA) que é uma proteína não histônica importante ao controle do ciclo celular, e está envolvida nos processos de síntese e reparo do DNA (STOIMENOV & HELLEDAY, 2009) além de regular a apoptose durante a oogênese (XU et al., 2011).

A apoptose é um programa de morte celular que desempenha papel fundamental ao longo do desenvolvimento, promovendo a homeostasia tecidual nos organismos pluricelulares (JENKINS et al., 2013). Esse processo envolve a participação de proteínas apoptóticas como a Caspase-3 que é uma proteína efetora nesta via de morte celular (BRETNALL et al., 2013) e Bcl-2, que atua como proteína antiapoptótica, regulando os sinais de sobrevivência e morte celular que são gerados dentro ou fora da célula (OLA, NAWAZ, AHSAN, 2011). Ambos os processos estão presentes no desenvolvimento ovariano de teleósteos, como exemplo na formação do complexo pós-ovulatório e folículos atrésicos observados em *P. argenteus*, em *L. taeniatus* (THOMÉ et al., 2012), em *A. bimaculatus* e em *L. obtusidens* (MORAIS et al., 2012).

Desse modo o objetivo deste estudo é descrever a morfologia do ovário durante a maturação gonadal, caracterizar as células germinativas em nível estrutural, ultraestrutural, e morfometricamente, e investigar a participação dos mecanismos proliferativos e apoptóticos por meio da atividade das proteínas PCNA, Caspase-3 e Bcl-2, durante o desenvolvimento ovariano de *Hypophthalmus marginatus* provenientes da jusante da Hidrelétrica de Tucuruí, a fim de fornecer dados acerca da biologia reprodutiva desta espécie e auxiliar no desenvolvimento biotecnológico aplicado à reprodução induzida da espécie em cativeiro.

2. Material e Métodos

2.1. Coleta de amostras

Foram capturadas em coletas mensais no período de janeiro de 2016 a janeiro de 2017 no reservatório da Usina Hidrelétrica de Tucuruí (03°49'55''S e 49°39'9''W) um total de 276 fêmeas de *H. Marginatus*. Os animais foram anestesiados com benzocaína (0.1g.L⁻¹) e eutanasiados de acordo com as Diretrizes de Experimentação Animal, estabelecidos pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA). Em seguida foi realizada uma incisão ventral para a remoção das gônadas, que foram mensuradas.

2.2. Microscopia de Luz (ML)

Fragments de ovários foram fixadas em solução de Bouin por 24 horas e submetidas ao processamento histológico de rotina para inclusão em parafina (PROPHET et al., 1995). Cortes de 5µm foram corados com Hematoxilina e Eosina e analisados em fotomicroscópio (NIKON Eclipse Ci-E, Nikon Corporation, Tóquio, Japão) acoplado à uma câmera digital (NIKON DS-Ri1, Nikon Corporation, Tóquio, Japão). A classificação dos estádios gonadais foi adaptada conforme proposto por NUNEZ & DUPPONCHELLE, (2009). Réplicas de lâminas previamente identificadas por estágio de maturação foram utilizadas para a análise morfométrica das células: oogônias, oócitos dos tipos I, II, III, IV e complexo pós-ovulatório.

2.3. Análises estatísticas

Os resultados foram expressos como média ± SEM e a comparação dos diâmetros dos folículos e das células em relação ao estágio de maturação, foi realizada por ANOVA seguida pelo teste t de Student utilizada para dados paramétricos. Para os dados não paramétricos, o teste de Kruskal-Wallis foi aplicado, seguido de análise de distribuição em pares com o teste de Wilcoxon. Todas as análises estatísticas foram realizadas utilizando o software BioEstat 5.0 (IDSM, MCT, CNPq, Belém, Pará, Brasil) (Ayres et al., 2007) e o valor de significância foi definido em $P \leq 0,05$.

2.4. Microscopia Electronica de Transmissão (MET)

Fragments de ovários foram fixados em solução de Karnovsky (paraformaldeído 4%, glutaraldeído 2% em tampão cacodilato de sódio (0.1M PH 7.4) por 24 horas a 4°C. Após os fragmentos foram lavados com tampão cacodilato de sódio (0.1M PH 7.4), pós fixados em tetróxido de ósmio 1% em tampão cacodilato de sódio (0.1M PH 7.4), por 2 horas em temperatura ambiente, desidratados em concentrações crescentes de acetona e incluídos em

epon 812. Cortes ultrafinos de 70nm foram contrastados com acetato de Uranila e Citrato de chumbo e analisados em TEM JEOL (JEM-100CXII).

2.5. Microscopia Electronica de Varredura (MEV)

Fragmentos de ovários foram fixados em solução de Karnovsky (paraformaldeído 4%, glutaraldeído 2% em tampão cacodilato de sódio (0.1M PH 7.4) por 24 horas a 4°C. Após os fragmentos foram lavados com tampão cacodilato de sódio (0.1M PH 7.4), pós fixados em tetróxido de ósmio 1% em tampão cacodilato de sódio (0.1M PH 7.4), por 2 horas em temperatura ambiente, desidratados em concentrações crescentes de etanol e submetidos a secagem a ponto crítico em CO². Posteriormente, colocadas em stubs e submetidas a metalização com cobertura de ouro com 10 nm de espessura para análise em microscópio eletrônico de varredura LEO 1430.

2.6. Imunohistoquímica

Para identificar as imunomarcações de Caspase-3 clivada, Bcl-2 e PCNA, réplicas de lâminas previamente identificadas foram desparafinizadas em xilol, reidratadas em soluções decrescentes de etanol, lavadas em tampão fosfato salino (PBS) e em seguida imersas em tampão citrato de sódio aquecido a 70 °C. Posteriormente as amostras foram permeabilizadas com PBS tween 0,05% e incubadas em peróxido de hidrogênio a 3 % em metanol por 30 minutos e bloqueadas com soro normal de cabra a 10% por uma hora. As amostras foram incubadas nos anticorpos primários anti-caspase-3 (AB3623, Merck KGaA, Darmstadt, Germany) 1: 200, anti-Bcl-2 (SAB 4500005, Sigma-Aldrich Co. LLC, St. Louis, MO, USA) 1:100 e anti-PCNA (AB 18197, Abcan, Cambridge, MA, USA) 1:500 respectivamente por 12 horas a 4° C. Em seguida as amostras foram lavadas em PBS e incubadas em anticorpo secundário anticorpo IgG anti-coelho incubado com peroxidase (1:500) por 2 horas. Em seguida as lâminas foram reveladas em solução de DAB (3,3 Diaminobenzidina) (750118, Invitrogen, Burlington, ONT, Canada), por cinco minutos, lavados em água destilada e contrastadas com hematoxilina. Posteriormente as lâminas foram analisadas e fotografadas em fotomicroscópio (NIKON Eclipse Ci-E, Nikon Corporation, Tóquio, Japão) acoplado à uma câmera digital (NIKON DS-Ri1, Nikon Corporation, Tóquio, Japão). Para o controle negativo não foi utilizado anticorpo primário e em substituição, as lâminas foram incubadas em PBS.

3. Resultados

3.1. Características morfológicas dos ovários

O aparelho reprodutor da espécie é composto por ovários pares, saculiformes e alongados, localizados na cavidade celomática. A partir da extremidade caudal os ovários unem-se formando um gonoducto, que está projetado em direção à papila urogenital (Fig.1 B). Os ovários são do tipo cistovariano e apresentam uma superfície lisa, com coloração e vascularização que se modificaram de acordo com o estágio de maturação gonadal. Morfologicamente foram estabelecidos cinco estádios de maturação ovariana: imatura (Fig. 2 A-B), em maturação (Fig. 2 F-G), madura (Fig. 2 I-J), desova (Fig. 2 M-N) e repouso (Fig. 2 P-Q) como representado na tabela 1.

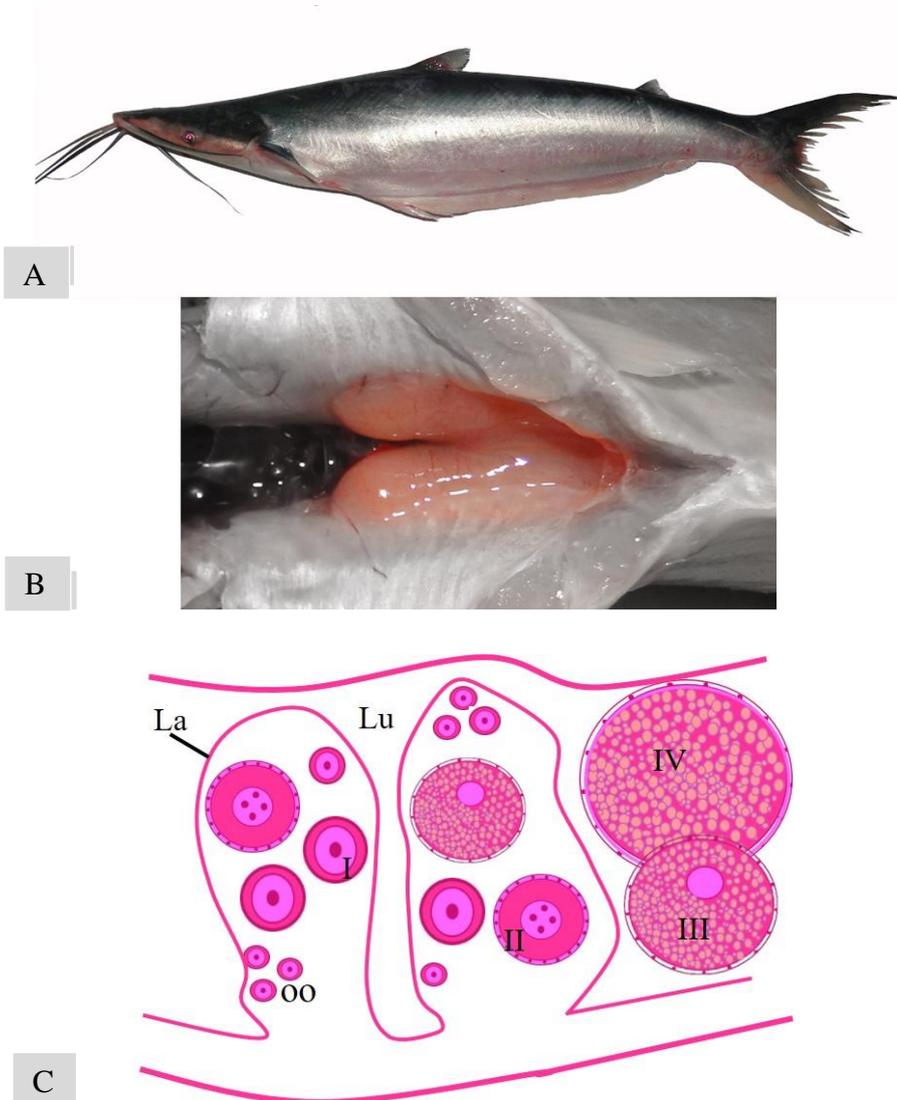


Figura 01- A: Exemplar de *Hypophthalmus marginatus*. B: Disposição da gônada na cavidade celomática. C: Desenho esquemático da organização interna da gônada.

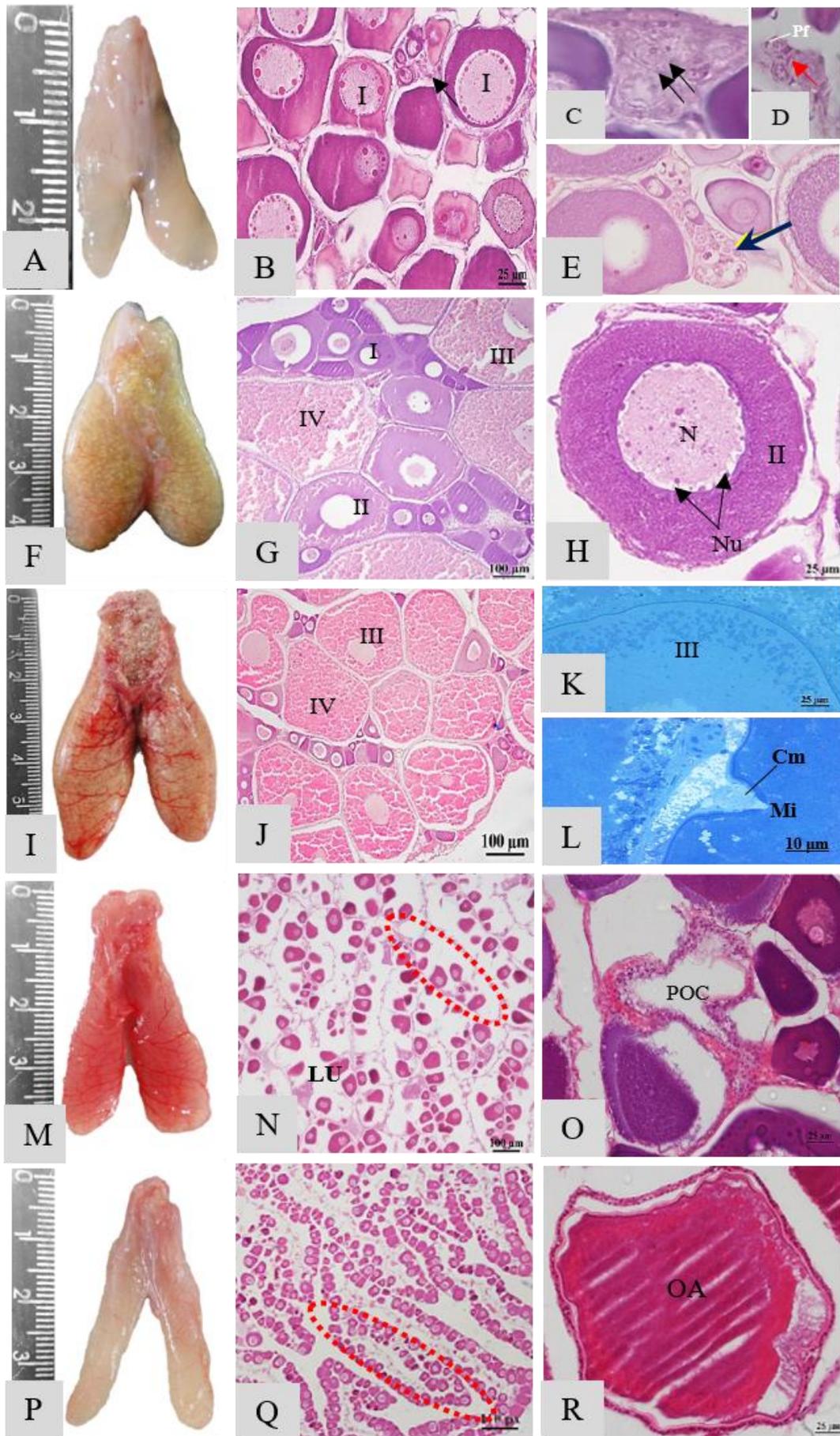


Figura 02 - Características Macro e Microscópicas dos ovários de *H. marginatus*. **A:** Ovario imaturo. **B:** Oócitos tipo I, ninho de oogônias (seta preta). **C:** Oogônias indiferenciadas (setas duplas pretas). **D:** Oogônia-A diferenciada (seta vermelha), pf: célula pré-folicular. **E:** Oogônias –B diferenciadas (seta amarela). **F:** Ovario em maturação. **G:** Oócito tipo I (I), Oócito tipo II (II), Oócito tipo III (III), Oócito tipo IV (IV). **H:** Detalhe do oócito tipo II, N: núcleo, Nu: nucléolo. **I:** Ovario maturo. **J:** Oócito tipo III (III), Oócito tipo IV (IV). **K:** Detalhe do oócito tipo III. **L:** Detalhe Célula micropilar (Cm) e Micrópila (Mi). **M:** Ovario em desova. **N:** Lúmen (LU), detalhe da lamela flácida (linha vermelha tracejada). **O:** Folículo Pós-ovulatório (POF). **P:** Ovario em repouso. **Q:** Lamelas delineadas (linhas tracejadas em vermelho). **R:** Oócito atrésico (OA). Coloração utilizada: Hematoxilina e Eosina, Azul de metileno.

Tabela 1. Descrição morfológica dos estádios de maturação ovariana de *H. marginatus*

ESTÁDIO	(X ± DP) Comprimento do Ovário (cm)	COLORAÇÃO	VASCULARIZAÇÃO	CARACTERIZAÇÃO MICROSCÓPICA
Imaturo	2,30 ± 0,33	Claro	-	Sem delimitação de lamelas ovígeras. Predomínio de oogônias e oócitos do tipo I.
Em maturação	4,14 ± 0,41	Amarelada	++	Com lamelas ovígeras delineadas e visíveis contendo oogônias, oócitos dos tipos I, II, III e IV.
Maturo	6,02 ± 0,77	Avermelhada	+++	Com lamelas pouco evidentes, pois as células maduras atingem diâmetro máximo. Predomínio de oócitos dos tipos III e IV.
Desova	4,51 ± 0,32	Avermelhada	++	Com lamelas flácidas, desalinhas. Predomínio de oócitos dos tipos I e II. Presença de POC e oócitos atrésicos.
Repouso	4,25 ± 0,20	Claro	+	Aspecto delgado, lamelas flácidas e predominância de oócitos dos tipos I e II.

Intensidade da vascularização: ausente (-), leve (+), moderada (++), acentuada (+++), POC: complexo pós ovulatório.

3.2. Características das células germinativas do ovário

O parênquima ovariano é composto por lamelas ovígeras constituídas por oogônias e oócitos em diferentes fases de maturação (Fig. 1-C). No epitélio germinativo são evidentes três tipos de oogônias: oogônia indiferenciada, A-diferenciada e B-diferenciada. A oogônia indiferenciada é alongada contendo núcleo basófilo (Fig. 2-C). As oogônias do tipo A-diferenciada possuem formato arredondado, com núcleo esférico (Fig. 2D). As oogônias do tipo B-diferenciadas são menores que as células anteriores, com núcleo evidente (Fig. 2E). Estes tipos celulares encontravam-se envoltos por células pré-foliculares (Fig. 2E).

Os oócitos do tipo I ou pré-vitelogênico apresentam citoplasma basófilo, núcleo centralizado com um nucléolo (Fig. 2B). Essas células eram envoltas por células da teca e células foliculares. Foram observadas nuagens e pequenas projeções que se estendem do citoplasma em direção as células foliculares (Fig. 3C-D). Os oócitos dos tipos II ou vitelogênese inicial, foram caracterizados pela presença de alguns grânulos de vitelo e alvéolos corticais no citoplasma (Fig. 2H). Essas células apresentam microvilosidades que partem do citoplasma em direção a células foliculares, zona radiata e camada da teca. Os oócitos do tipo III ou vitelogênico (Fig. 1K), contém citoplasma preenchido por grânulos de vitelo, com membrana nuclear (vesícula germinal) irregular. Apresentam se envoltos pelo complexo folicular (Fig. 3 I-J). Os oócitos do tipo IV apresentam superfície irregular (Fig. 3 K-N), e citoplasma preenchido por grânulos corticais (Fig. 3N). A partir do oócito tipo III, foi observada a presença micropila e da célula micropilar (Fig. 2L; 3 L).

Foi observado o crescimento das células ao longo do desenvolvimento ovariano. As oogônias (I) indiferenciadas, A-diferenciadas e B-diferenciadas apresentaram diferenças significativas nos diâmetros celulares, mas não diferiram entre os estádios de maturação. Enquanto os oócitos dos tipos I, II, III e IV apresentaram diferenças estatisticamente significativas entre os diâmetros celulares e entre os estádios gonadais (Tabela 2).

Tabela 2. Média (\pm SD) diâmetro (μm) de células germinativas em cinco estágios de maturação ovariana de *H. marginatus*.

ESTÁDIO	TIPOS CELULARES							
	OG I	OG A	OG B	OO I	OO II	OO III	OO IV	POC
IM	10.9 \pm	8.1 \pm	4.7 \pm	20.7 \pm	n	n	n	n
	0.7 ^{aA}	0.5 ^{bA}	0.6 ^{cA}	2.1 ^{dA}				
EM	11.8 \pm	8.4 \pm	5.1 \pm	28.0 \pm	84.0	136.9 \pm	415.1 \pm	n
	1.1 ^{aBCD}	0.5 ^{aBD}	0.5 ^{aB}	6.1 ^{bBC}	\pm 18.3 ^{cA}	28.0 ^{dA}	74.3 ^{eA}	
MAT	11.9 \pm	8.0 \pm	4.8 \pm	26.8 \pm	109.5 \pm	317.3 \pm	447.0 \pm	n
	1.6 ^{aCDE}	0.6 ^{aA}	0.7 ^{aA}	4.6 ^{bC}	14.5 ^{cB}	73.3 ^{dB}	52.7 ^{eB}	
DES	11.7 \pm	7.6 \pm	4.0 \pm	24.8 \pm	80.9 \pm	n	n	64.0 \pm
	1.0 ^{aD}	0.6 ^{bcC}	0.9 ^{cC}	10.6 ^{dD}	17.9 ^{eA}			12.6 ^{fA}
REP	12.4 \pm	8.3 \pm	4.4 \pm	18.5 \pm	80.8 \pm	n	n	n
	1.7 ^{aE}	0.8 ^{abD}	0.8 ^{bD}	2.6 ^{cA}	30.1 ^{dA}			

Estádio: Imaturo (IM), Em maturação (EM), Maduro (MAT), Desova (DS), REP (Repouso); Tipo celular: oogônia indiferenciada (OGI), oogônia diferenciada-A (OGA), oogônia diferenciada (OGB), oócito tipo pré-vitelogênicos (OOI), oócito tipo vitelogênese inicial (OOII), oócito tipo vitelogenese avançada (OOIII), oócito tipo maduro (OOIV), complexo pós-ovulatório (POC).

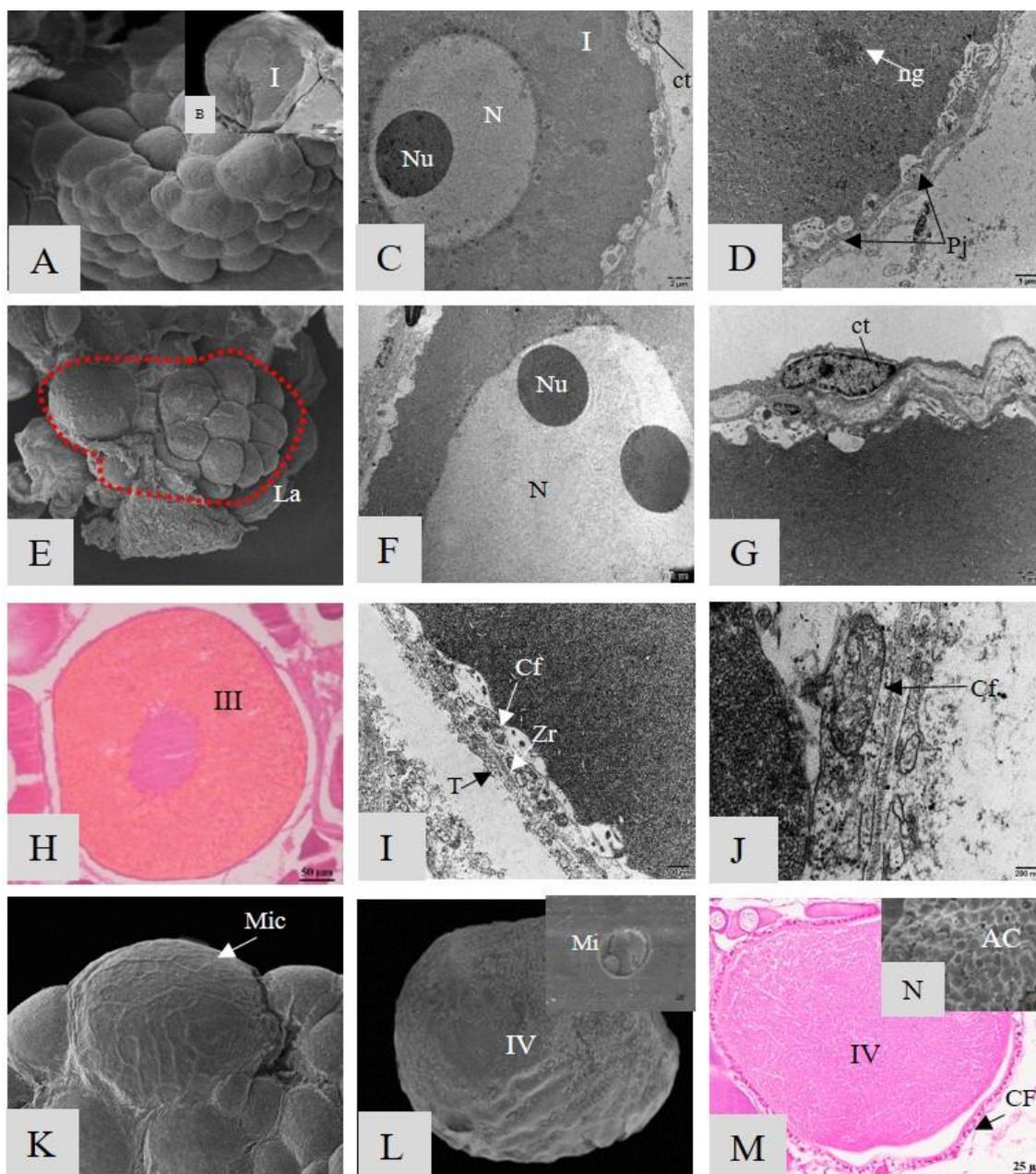


Figura 03- Eletromicrografias dos ovários de *H. marginatus*. **A:** Microscopia eletrônica de varredura evidenciando o estágio imaturo com aglomerado de células em processo de maturação. **B:** Detalhe do ócito tipo I, predominante no estágio. **C:** Microscopia eletrônica de transmissão, evidenciando o oócito tipo I, contendo núcleo (N), um nucléolo (Nu), cromatina condensada (cc) e célula da teca (ct). **D:** Em destaque a presença de nuagem (ng) e projeções (pj) que saem do citoplasma em direção a camada de células foliculares. **E:** Lamela contendo células em diferentes fases de crescimento (tracejado em linha vermelha). **F:** Oócitos do tipo II, núcleo proeminente (N), dois nucléolos (Nu). **G:** Em detalhe a célula da teca (ct) e o delineamento das camadas que circundam o ócito. **H:** Oócito tipo III. **I:** Complexo folicular no oócito tipo III; T: teca, Zr: zona radiata. **J:** cf: célula folicular. **K:** Evidência de oócito em expansão, com microvilos (Mic). **L:** Oócito tipo IV com superfície rugosa. **M:** Oócito tipo IV, com detalhe da sua região interna repleta de alvéolos corticais feita através da microscopia eletrônica de varredura.

3.3 Imunohistoquímica

As Imunomarcações das proteínas PCNA, Bcl-2 e Caspase-3 foram observadas em todos os estádios da maturação ovariana. No estágio imaturo a imunolocalização para o PCNA foi evidente em ninhos de oogônias, no núcleo de oócitos do tipo I e nas células foliculares (Fig. 4-A). No estágio em maturação, a reação positiva ocorreu em todos os tipos oocitários (Fig.4-B), e no estágio maturo somente nos oócitos I, II, III (Fig.4-C). Enquanto, nos estádios desovado a imunomarcação para PCNA foi limitada a oócitos do tipo I (Fig.4-D) e no repouso nos oócitos I, II e nas células foliculares (Fig.4-E).

Os oócitos tipo I (Fig.4-F) foram as células que apresentaram maior positividade na reação para Bcl-2 em todos os estádios de maturação ovariana. Enquanto, os oócitos II apresentaram reação somente nos estádios em maturação (Fig.4-G) e maturo (Fig.4-H). Porém, houve reação acentuada para Bcl-2 em oogônias e células foliculares, no estágio desovado (Fig.4-I) e durante o repouso (Fig.4-J). O perfil de análise da imunomarcação para as proteínas estão descritas na tabela 3.

A maior imunopositividade da proteína apoptótica Caspase-3 foi observada no citoplasma dos oócitos I no estágio imaturo (Fig.4-K), nos oócitos do tipo I e oócitos atrésicos no estágio em maturação (Fig.4-L). Nos demais estádios (Fig.4-M, N, O) a reação foi observada somente em oócitos atrésicos.

Tabela 3. Perfil da presença de imunomarcação para anti-PCNA, anti-Caspase-3 e anti-Bcl-2 no ovário de *H. marginatus*

	Imunomarcação de acordo com estágio de maturação														
	PCNA					Bcl-2					Caspase-3				
	IM	EM	MT	DS	RP	IM	EM	MT	DS	RP	IM	EM	MT	DS	RP
OG	+++	+	+	-	-	-	-	-	+	+++	-	-	-	-	-
I	++	+++	+++	++	++	+++	++	-	++	+++	++	-	+++	-	-
II	N	+++	+++	++	++	n	++	+	n	+++	n	-	-	-	-
III	N	+++	+++	-	-	n	++	++	n	n	n	-	-	+++	-
IV	N	+	++	-	-	n	-	+++	n	n	n	-	-	-	-
At	N	-	-	-	-	n	-	-	n	n	n	+++	+++	+++	+++

Estádio: Imaturo (IM), Em maturação (EM), Maturo (MT), Desova (DS); **Tipo celular:** oogônia (OG), oócito tipo pré-vitelogênicos (I), oócito tipo vitelogenese inicial (II), oócito tipo vitelogenese avançada (III), oócito tipo maduro (IV), oócitos atrésicos (At), ausência da célula (n). **Intensidade da reação:** ausente (-), leve (+), moderada (++), acentuada (+++).

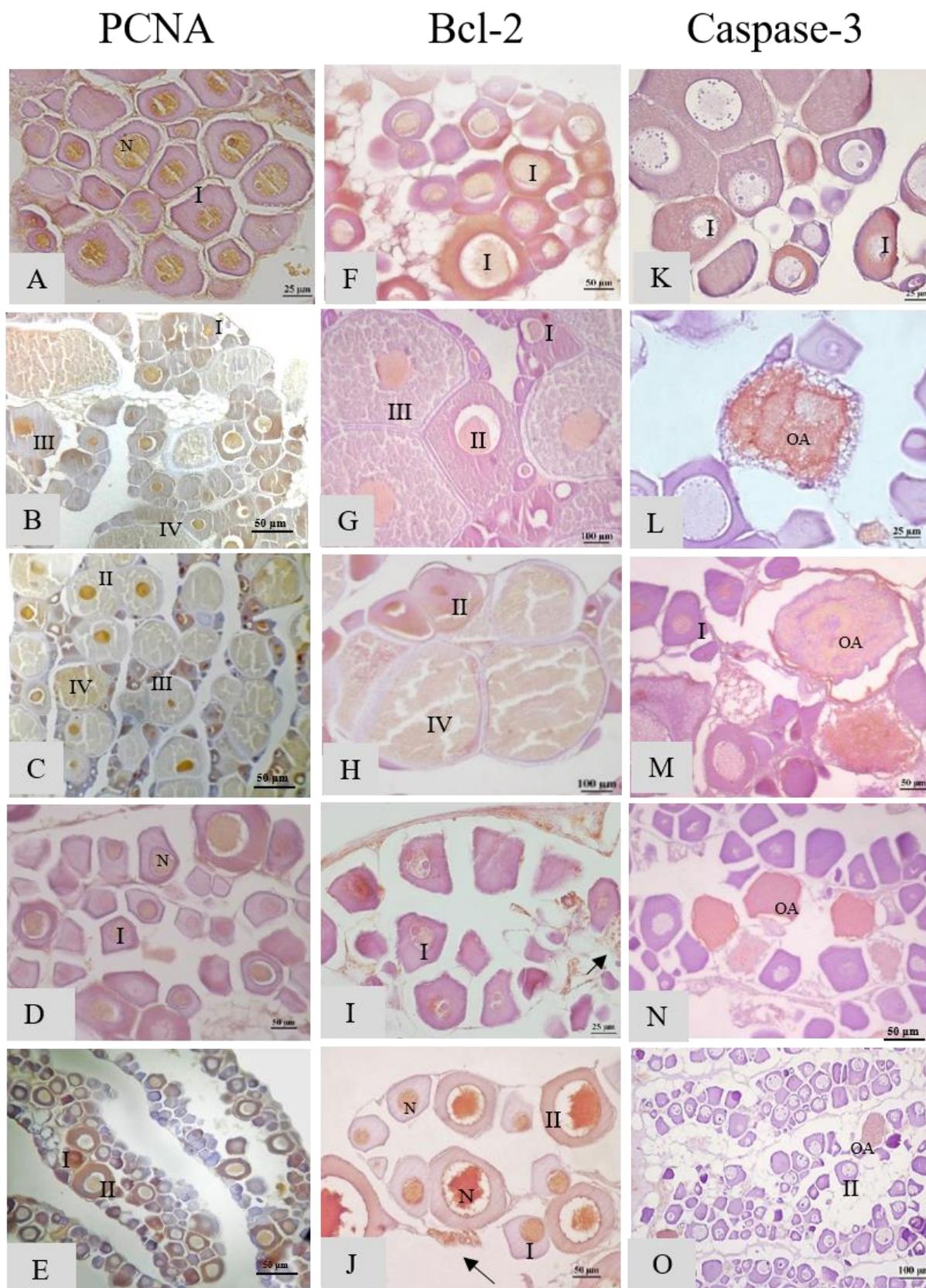


Figura 04 – Imunomarcção de PCNA, Caspase-3 e Bcl-2 em ovários de *H. marginatus* em diferentes estádios de maturação. **Imunorreatividade positiva para PCNA.** **A:** No estágio imaturo ocorreu principalmente em oogonias (seta preta) e no núcleo de oócitos tipo I (I). **B-C:** Nos estádios em maturação e maduro a reação ocorreu

em oócitos dos tipos I, II, III. **D-E:** Nos estádios desova e repouso foi evidente em oócitos dos tipos I e II. **Imunorreatividade para Caspase-3 clivada. F:** Estádio imaturo, oócitos do tipo I. **G:** Estádio em maturação com a reação positiva em oócitos atrésicos (OA). **H:** No estágio maturo a reação ocorreu em oócitos tipo I e oócitos atrésicos (OA). **I-J:** Desova e repouso evidenciaram reação em oócitos atrésicos (OA). **Para Bcl-2 a reação K:** No estágio imaturo, oócitos tipo I (I). **L:** Estádio em maturação a reação ocorreu no núcleo de oócitos tipo I (I), oócitos tipo II (II) e oócitos tipo III (III). **M:** No maturo, a reação ocorreu em oócitos tipo II (II) e tipo IV (IV). **N:** Na desova, a imunorreatividade foi positiva em oogônias (seta preta) e núcleo de oócitos tipo I (I). **O:** No Repouso, a reação foi evidente em em oogônias (seta preta) e no núcleo de oócitos tipo I (I) e oócitos tipo II (II). As lâminas utilizadas para a técnica de imunohistoquímica foram contrastadas com Hematoxilina.

4. Discussão

Neste estudo observamos mudanças morfológicas e a atividade das proteínas PCNA Bcl-2 e Caspase-3 clivada durante a maturação ovariana de *H. marginatus*. As características anatômicas ovarianas observadas na espécie mostraram um padrão similar à maioria das descritas para outras espécies siluriformes como *P. fasciatum* e *Hatcheria macraei* (VALENTIN et al., 2016; CHIARELLO-SOSA, BATTINI, BARRIGA, 2016). Porém, difere de espécies migradoras cujo ambiente foi modificado por barramentos como *P. argenteus*, *P. costatus* que não apresentam indícios de desova (ARANTES, 2011), no entanto, no presente estudo foi evidenciado o estágio de desova, o que indica que a espécie reproduz normalmente.

Os ovários de *H. marginatus* apresentaram diferentes colorações durante os estádios de maturação, e ainda maior vascularização principalmente nos estádios maturo e desovado. Esse aspecto, assemelha-se a informações descritas para outras espécies como em *Astyanax altiparanae* onde a coloração variou em todos os estádios e a vascularização aumentou durante a desova (CASSEL et al., 2017). Acredita-se que em *H. marginatus* essa organização dos vasos sanguíneos ocorre em função da modificação e expansão oocitária no órgão. Essa organização é essencial para uma identificação prévia do estágio de maturação gonadal (CASSEL et al. (2017).

Observamos que o desenvolvimento ovariano e maturação oocitária de *H. marginatus* foi similar a outras espécies migratórias como em *P. corruscans*, em *P. maculatus*, em *C. conirostris* e em *P. vittata* (RIZZO et al., 2002; SATO et al., 2003; SALES et al., 2013). Essas características podem estar associadas as estratégias reprodutivas, para manutenção da espécie no ambiente. Os diferentes tipos de oogônia observados no epitélio germinativo de *H. marginatus* indicam a intensa atividade mitótica dessas células. Esse aspecto também foi observado em *P. maculatus* (QUAGGIO-GRASSIOTTO et al., 2011) e em *G. sylvius* (FRANÇA

et al., 2010), estabelecendo indícios de que o epitélio germinativo permanece ativo ao longo dos ciclos reprodutivos (GRIER, 2002).

O aumento do diâmetro das células germinativas em especial dos oócitos I, II estão associados ao surgimento de componentes citoplasmáticos, o que indica a síntese de proteínas nessa fase (SELMAN & WALLACE, 1989). O fato dessas células serem observadas em todos os estádios de maturação, (exceto o oócito tipo II no estágio imaturo), sugerem um padrão de desenvolvimento oocitário de *H. marginatus* do tipo assíncrono, com presença de estoque reserva para as próximas populações de células em um novo ciclo reprodutivo.

Os oócitos maduros destacam-se pela presença tanto de grânulos de vitelo, como dos alvéolos corticais, que são componentes celulares que previnem a poliespermia (NAGAHAMA, 1983), enrijecem a zona radiata e protegem os futuros embriões contra possíveis choques mecânicos (GRIER et al., 2009). Acredita-se que em *H. marginatus* esses componentes desempenhem a mesma função, como uma adaptação as condições ecológicas em que os ovos destes animais são submetidos.

Uma característica marcante nos oócitos foi a presença do complexo folicular como uma estrutura tri-laminar composta por zona radiata, camada de células foliculares e teca. *H. marginatus* apresentou zona radiata estreita, semelhante a algumas espécies de siluriformes como em *T. galeatus*, em *P. corruscans*, em *P. maculatus* (MELO et al., 2011), e em *P. vittata* (SALES et al., 2013). Esse arranjo pode garantir a proteção, resistência ao ovo e o desenvolvimento do embrião, pois não apresenta característica adesiva e os animais não possuem o cuidado parental.

Em *H. marginatus* o surgimento do aparelho micropilar ocorreu a partir do oócito do tipo III com uma depressão em forma de funil (vestíbulo), na superfície do oócito, levando a um canal curto que se abre na superfície interna. O canal é protegido pela célula micropilar, uma célula modificada da camada de células foliculares. Kuns (2004) descreveu quatro tipos de micrópila para peixes baseado na análise de sua estrutura, padrão da superfície e profundidade do canal micropilar. O arranjo encontrado nesta espécie em estudo caracteriza-se como a micrópila do tipo I.

Além disso, outros dois elementos foram encontrados nos ovários: folículos atrésicos, presentes ao longo do processo de maturação ovariana e em animais desovados havia o predomínio do Complexo Pós-ovulatório (POC), que foi encontrado com frequência, sugerindo a liberação de gametas. Estudos sobre a frequência e o número de POC no ovário durante o ciclo reprodutivo podem determinar a fecundidade anual em peixes (GRIER et al., 2007; URIBE et al., 2016). Em função das características observadas em *H. marginatus* no estágio

desova, acredita-se que o animal se reproduza, visto que, há liberação de vários oócitos maduros, indicando uma adaptação da espécie à jusante do reservatório da Usina Hidrelétrica de Tucuruí.

Enquanto a atresia folicular predominou em folículos maduros, há relatos de que as células foliculares apresentem atividade fagocítica e promovam degeneração do vitelo (URIBE et al. 2016). Nesse caso, acredita-se que os processos apoptóticos observados ao longo da maturação ovariana de *H. marginatus* sejam ativados a fim de manter a homeostase tecidual (MATSUDA et al., 2012), atuando na eliminação de células residuais e preparando a gônada para um novo ciclo reprodutivo.

No ovário de *H. marginatus* foi observada uma intensa atividade de PCNA nas oogônias, células foliculares e oócitos I, II e III. A reação positiva associa-se à intensa síntese de DNA que ocorre durante a fase de desenvolvimento e transição de oogônias em oócitos (THOMÉ et al., 2012). Dados semelhantes foram obtidos em estudos sobre a remodelação ovariana de *Oreochromis niloticus* (MELO et al., 2015). Sugerimos que a presença de PCNA em oócitos em fases de maturação avançada relaciona-se ao reparo e revisão de danos no DNA (STORMENOV & HELLEDAY, 2009). Este aspecto demonstra a dinâmica celular durante a produção e amadurecimento da população de oócitos para o ciclo reprodutivo. Além disso, PCNA também participa da regulação dos processos apoptóticos durante a oogênese, através do recrutamento de proteínas pró-apoptóticas ou da supressão de proteínas anti-apoptóticas (XU et al., 2011).

Bcl-2 apresentou distribuição subcelular incomum, pois esteve presente no citoplasma e no núcleo. Estudos apontam que embora Bcl-2 seja uma proteína mitocondrial, também está presente no núcleo em níveis mais baixos e ainda, que a proteína aumente o estado de defesa antioxidante na célula (LEE et al., 2001; KUMAR et al., 2010). Membros anti-apoptóticos da família Bcl-2 desempenham um papel central na regulação da apoptose, quer seja antagonizando a morte celular, ou exibindo atividades pro-apoptóticas (WEI-XING ZONG et al., 2017). Sugerindo assim, que em resposta a baixos níveis de danos o processo apoptótico seja suprimido para permitir o reparo e evite uma destruição celular desnecessária.

Ainda observamos a ocorrência de apoptose nos ovários de *H. marginatus* em diferentes estádios de maturação evidenciados pela imunomarcagem de Caspase-3 clivada, principalmente em folículos em crescimento e atresicos. Esse aspecto pode atuar como um mecanismo de controle da população celular em face à intensa proliferação e diferenciação de células da linhagem germinativa durante a maturação ovariana. Uma intensa atividade de marcadores apoptóticos também foi observada durante a maturação gonadal de *Axtianax*

bimaculatus, *Leporinus obtusidens*, *Prochilodus argenteus* (MORAIS et al., 2012), e *Axtianax altiparanae* (CASSEL et al., 2017). Ocorreu intensa atividade apoptótica nos oócitos em vitelogênese e vitelogênicos, atribuímos esse comportamento ao processo de atresia folicular, no qual a apoptose pode estar promovendo a remodelação da gônada e preparando o animal para um novo ciclo reprodutivo. No presente estudo, sugere-se um equilíbrio entre processos proliferativos, apoptóticos e anti-apoptóticos na regulação da dinâmica celular, a fim de manter a população de gametas e reprodução da espécie.

Desse modo, concluímos que *H. marginatus* apresenta ovários do tipo cistovariano e apresentou cinco estádios de maturação: imaturo, em maturação, maturo, desova e repouso. Ainda foram descritos três tipos de oogônias, quatro tipos oocitários com desenvolvimento do tipo assíncrono, oócitos atrésicos e POC. Além disso, a formação do aparelho micropilar ocorreu a partir do oócito em fase de vitelogenese avançada. Durante o estudo verificamos que PCNA, Bcl-2 e Caspase-3 promovem a remodelação ovariana a partir da proliferação, reparo e eliminação de células defeituosas ao longo da maturação ovariana. Estes estudos fornecem informações a respeito dos eventos que permeiam a maturação ovariana e produção de gametas que posteriormente podem auxiliar na reprodução induzida e em cativeiro.

5. REFERENCIAS

- AKAO, Y. et al. (1994). Multiple subcellular localization of bcl-2: detection in nuclear outer membrane, endoplasmic reticulum membrane, and mitochondrial membranes. **Cancer research**, 54: 9, p. 2468-2471.
- BAUM, J. S.; GEORGE, J. P. St.; MCCALL, K. (2005). Programmed cell death in the germline. *In: Seminars in cell & developmental biology*. Academic Press. p. 245-259.
- BRENTNALL, M. et al. (2013). Caspase-9, caspase-3 and caspase-7 have distinct roles during intrinsic apoptosis. **BMC Cell Biology**. 14, 32.
- CASSEL, M. et al. (2017). Ovarian development and the reproductive profile of *Astyanax altiparanae* (Teleostei, Characidae) over one year: Applications in fish farming. **Theriogenology**, 98, p. 1-15.
- CHAVES, et al. (2017). Distribuição de larvas de Pimelodidae (Pisces, Siluriformes) no trecho inferior do Rio Amazonas, Santarém, Pará. **Scientia Amazonia**, 6: 1, p. 19-30.
- CHIARELLO-SOSA, J. M.; BATTINI, M. A.; BARRIGA, J. P. (2016). Reproductive strategy of the Patagonian catfish *Hatcheria macraei*. **Journal of fish biology**, 89: 3, p. 1810-1827.
- ESCOBAR, M. L. et al. (2013) Involvement of pro-apoptotic and proautophagic proteins in granulosa cell death. **Cell Biology**, 1, p. 9–17. doi:10.11648/j.cb.20130101.12
- FERREIRA, E. J. G.; ZUANON, J. A. S.; SANTOS, G. M. (1998). **Peixes comerciais do médio Amazonas: Região de Santarém-PA**. IBAMA/Pró-Várzea, Brasília, Distrito Federal. 211 pp.
- FRANÇA, G. F.; GRIER, H. J.; QUAGIO-GRASSIOTO, I. (2010). A new vision of the origin and the oocyte development in the ostariophysi applied to *Gymnotus sylvius* (Teleostei, Gymnotiformes). **Neotropical Ichthyology**. 8, p. 787–804.
- GRIER, H. J. (2002). The germinal epithelium: Its dual role in establishing male reproductive classes and understanding the basis for indeterminate egg production in female fishes. *In: Proceedings of the Fifty-third Annual Gulf and Caribbean Fisheries Institute*, Creswell

RL (Ed.). Biloxi, Mississippi. Fort Pierce, FL: Gulf and Caribbean Fisheries Institute, pp.537-552.

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

GRIER, H. J.; URIBE-ARANZÁBAL, M. C.; PATIÑO, R. (2009). The ovary, folliculogenesis, and oogenesis in teleost. *In: Reproductive Biology and Phylogeny of Fishes (Agnathans and Neoteleostomi)*, Jamieson, BGM (Ed.) Enfield: Science Publishers. pp. 25–84.

GRIER, H. J.; NEIDIG, C. L.; QUAGIO-GRASSIOTTO, I. (2017). Development and fate of the postovulatory follicle complex, postovulatory follicle, and observations on folliculogenesis and oocyte atresia in ovulated common snook, *Centropomus undecimalis* (Bloch, 1792). **Journal of Morphology**, 278: 4, p. 547-562.

HONJI, R. M.; VAZ-DOS-SANTOS, A. M.; ROSSI-WONGTSCHOWSK, C. L. D. B. (2006). Identification of the stages of ovarian maturation of the argentine hake *Merluccius hubbsi* Marini, 1933 (Teleostei: Merlucciidae): advantages and disadvantages of the use of the macroscopic and microscopic scales. **Neotropical Ichthyology**, 4: 3, p. 329-337.

JENKINS, V. K.; TIMMONS, A. K.; McCALL, K. (2013). Diversity of cell death pathways: insight from the fly ovary. **Trends in Cell Biology**. 332, p. 159–170.

JUNK, W. J.; & MELLO, J. A. S (1990). Impactos ecológicos das represas hidrelétricas na bacia amazônica brasileira. **Estudos avançados**, 4: 8, p. 126-143.

KRYSKO, D. V. et al. (2008). Life and death of female gametes during oogenesis and folliculogenesis. **Apoptosis**, 13: p. 1065-1087.

KUMAR, T. S. et al. (2010). Anti-apoptotic protein BCL2 down-regulates DNA end joining in cancer cells. **Journal of Biological Chemistry**, v. 285, n. 42, p. 32657-32670, 2010.

KUNZ, Y. W. (2004). **Developmental biology of teleost fishes**. Springer Science & Business Media. 645 pp. DOI 10.1007/978-1-4020-2997-4

LEE, M. et al. (2001). Effect of overexpression of BCL-2 on cellular oxidative damage, nitric oxide production, antioxidant defenses, and the proteasome. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 31, n. 12, p. 1550-1559.

LLAMBI, F. M. et al. (2011). A unified model of mammalian BCL-2 protein family interactions at the mitochondria. **Mol Cell** 44:517–531.

LUBZENS, E. et al.(2010). Oogenesis in teleosts: how fish eggs are formed. **General and Comparative Endocrinology**. 165, p. 367-389.

MARTINS, J. C. et al. (2011). Seletividade da rede malhadeira-fixa para a captura do mapará, *Hypophthalmus marginatus*, no reservatório da usina hidrelétrica de Tucuruí, Estado do Pará, Brasil. **Boletim do Instituto de Pesca**, 37: 2, p. 123-133.

MATSUDA, F. et al. (2012). Follicular growth and atresia in mammalian ovaries: regulation by survival and death of granulosa cells. **Journal of Reproduction and Development**. **58**, p.44–50.

MAZZONI, R. & PETITO, J. T. (2003). Distribuição, abundância e estrutura das populações de peixes antes e depois do represamento. *In: Ictiofauna do alto rio Tocantins: um estudo de caso e subsídios para o manejo no reservatório de Serra da Mesa*. Mazzoni, R.; Pellegrini-Caramaschi, E. & Iglesias-Rios, R. (Eds.). Ciência e Paz, Rio de Janeiro.

MELO, R. M. C. et al. (2011). Comparative morphology of the gonadal structure related to reproductive strategies in six species of neotropical catfishes (Teleostei: Siluriformes). **Journal of Morphology**. 272, p. 525–535.

MELO, R.M.C. et al., (2014). Morphological and quantitative evaluation of the ovarian recrudescence in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) after spawning in captivity. **Journal of Morphology**. 275, p. 348–356.

MELO, R. M. C. et al. (2015). PCNA and apoptosis during post-spawning ovarian remodeling in the teleost *Oreochromis niloticus*. **Tissue and Cell**, 47: 6, p. 541-549.

MORAIS, R. D. V. S. et al. (2012). Autophagy and apoptosis interplay during follicular atresia in fish ovary: a morphological and immunocytochemical study. **Cell and tissue research**, 347: 2, p. 467-478.

MORAIS, R. D. V. S. et al. (2016). Relationship between bcl-2, bax, beclin-1, and cathepsin-D proteins during postovulatory follicular regression in fish ovary. **Theriogenology**, 85: 6, p. 1118-1131.

MYLONAS, C. C. & ZOHAR, Y. (2007). Promoting oocyte maturation, ovulation and spawning in farmed fish. *In: The Fish Oocyte*. Babin, P.J (Ed.) Springer, Dordrecht, pp. 437-474.

NAGAHAMA, Y. (1983). The functional morphology of teleost gonads. *In: Fish Physiology*. Hoar, W.S.; Randall, D.J.; Donaldson, E.M. (Eds.) Academic Press, New York. pp. 233-273.

NÚÑEZ, J; DUPONCHELLE, F. (2009). Towards a universal scale to assess sexual maturation and related life history traits in oviparous teleost fishes. **Fish Physiology and Biochemistry**, 35: 1, p. 167-180.

OLA, M.S.; NAWAZ, M.; AHSAN, H. (2011). Role of Bcl-2 family proteins and caspases in the regulation of apoptosis. **Molecular and Cellular Biochemistry**. 351, p. 41–58. doi:10.1007/s11010-010-0709-x

PATIÑO, R. & SULLIVAN, C. V. (2002). Ovarian follicle growth, maturation, and ovulation in teleost fish. **Fish Physiology Biochemistry**. 26, p. 57–70.

- PEREIRA ARANTES, F. et al. (2011). Collapse of the reproductive process of two migratory fish (*Prochilodus argenteus* and *Prochilodus costatus*) in the Três Marias Reservoir, São Francisco River, Brazil. **Journal of Applied Ichthyology**. 27: 3, p. 847-853.
- PROPHET, E. B. et al. (1995). **Métodos Histotécnicos**, Washington, D.C.: Instituto de Patologia de Las Fuerzas Armadas de Los Estados.
- QUAGIO-GRASSIOTTO, I. et al. (2011) Activity of the ovarian germinal epithelium on the follicle formation and the oocyte development in the freshwater catfish *Pimelodus maculatus* (Teleostei: Ostariophysi: Siluriformes). **Journal Morphology**. 8, p.1290-1306.
- RIBEIRO, C. S. & MOREIRA, R. G. (2012). Fatores ambientais e reprodução dos peixes. **Revista da Biologia**. 8, p. 58-61
- RIZZO, E.; SATO, Y.; BARRETO, B. P.; GODINHO, H. P. (2002). Adhesiveness and surface patterns of eggs in neotropical freshwater teleosts. **Journal of Fish Biology**. 61, p. 615–632.
- SALES, N. G. et al. (2013). Ovarian structure and oogenesis of catfish *Pimelodella vittata* (Lütken, 1874) (Siluriformes, Heptapteridae). **Anatomia, histologia, embryologia**. 42: 3, p. 213-219.
- SATO, Y. & GODINHO, H. P. (2003). Migratory fishes of the São Francisco River. *In*: Migratory Fishes of South America: Biology, Fisheries and Conservation Status. Carolsfeld, J.; Harvey, B.; Ross, C.; Baer, A. (Eds.). Development Research Centre, Victoria, pp. 195–222.
- SELMAN, K. & WALLACE, R.A. (1989). Cellular aspects of oocyte growth in teleosts. **Zoological Science**. 6, p. 211–31.
- STOIMENOV, I. & HELLEDAY, T. (2009). PCNA on the crossroad of cancer. **Biochemical Society Transactions**. 37, p. 605–613.
- THOMÉ, R. G. et al., (2012). Apoptosis, cell proliferation and vitellogenesis during the folliculogenesis and follicular growth in teleost fish. **Tissue and Cell**. 44: 1, p. 54-62.

- URIBE, M. et al. (2016). Oogenesis: From Oogonia to Ovulation in the Flagfish, *Jordanella floridae* Goode and Bean, 1879 (Teleostei: Cyprinodontidae). **Journal of morphology**. 277: 10, p. 1339-1354.
- VALENTIN, F. N. et al. (2016). Ovarian differentiation and development in cachara *Pseudoplatystoma fasciatum*. **Journal of Fish Biology**. 89: 1, p. 445-466.
- XU, B. et al. (2011). Proliferating cell nuclear antigen (PCNA) regulates primordial follicle assembly by promoting apoptosis of oocytes infetal and neonatal mouse ovaries. **PLOS ONE**. 6, e16046.
- WALLACE, R. A. & SELLMAN, K. (1981). Cellular and dynamic aspects of oocyte growth in teleosts. **American Zoologist**. 21, p. 325-43.
- WILDNER, D. D.; GRIER, H.; QUAGIO-GRASSIOTTO, I. (2012). Female germ cell renewal during the annual reproductive cycle in Ostariophysians fish. **Theriogenology**. 79: 4, p.709-24. doi: 10.1016/j.theriogenology.2012.11.028.
- WEI-XING, Z. et al. (2003). Bax and Bak can localize to the endoplasmic reticulum to initiate apoptosis. **The Journal of cell biology**. 162: 1, p. 59-69.
- YARON, Z. & LEVAVI-SIVAN, B. (2011). Endocrine regulation of fish reproduction. *In: Encyclopedia of fish physiology: from genome to environment*. Farrel, A.P (Ed.). Academic in press, Elsevier. pp. 1500-1508.
- ZOHAR, Y. & MYLONAS, C. C. (2001). Endocrine manipulations of spawning in cultured fish: from hormones to genes. *In: Reproductive Biotechnology in Finfish Aquaculture*. pp. 99-136.