UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE MORFOLOGIA

Morfologia do epitélio germinativo do ovário de *Trachelyopterus galeatus* (Linnaeus, 1756), um peixe de inseminação interna, e suas interações com as ovogônias e os espermatozóides durante diferentes períodos do ano.

Mestrando: Francisco de Oliveira Vieira

Orientador: Prof. Dr. Hélio Chiarini-Garcia
Co-orientador: Prof. Dr. Hugo Pereira Godinho

Belo Horizonte
2010

Livros Grátis

http://www.livrosgratis.com.br

Milhares de livros grátis para download.

Francisco de Oliveira Vieira

Morfologia do epitélio germinativo do ovário de *Trachelyopterus galeatus* (Linnaeus, 1756), um peixe de inseminação interna, e suas interações com as ovogônias e os espermatozóides durante diferentes períodos do ano.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular, Departamento de Morfologia - ICB/UFMG, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre.

Área de concentração: Biologia Celular
Orientador: Prof. Dr. Hélio Chiarini-Garcia
Co-orientador: Prof. Dr. Hugo Pereira Godinho

Belo Horizonte
2010

Vieira, Francisco de Oliveira
Morfologia do epitélio germinativo do ovário de *Trachelyopterus galeatus* (Linnaeus, 1756), um peixe de inseminação interna, e as suas interações com a ovogônias e os espermatozóides durante diferentes períodos do ano. [manuscrito] / Francisco de Oliveira Vieira. – 2010.
54 f. : il. ; 29,5cm.

Orientador: Hélio Chiarini-Garcia. Co-orientador: Hugo Pereira Godinho.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Departamento de Morfologia.

1. Peixe – Morfologia – Teses. 2. Peixe – Reprodução – Teses. 3. Peixe – Teses. 4. Peixe – Espermatozóides – Teses. 5. Biologia celular – Teses. I. Chiarini-Garcia, Hélio. II. Godinho, Hugo Pereira. III. Universidade Federal de Minas Gerais. Departamento de Morfologia. IV. Título.

CDU: 597

Dedico este trabalho aos meus pais
e a minha namorada Fabiana.

Agradeço a todos/as os que com a
sua ajuda grande ou pequena, segundo
as suas possibilidades me ajudaram de
alguma forma na conclusão deste trabalho.

Essa dissertação foi desenvolvida no Laboratório de Biologia Estrutural e Reprodução (Laber) do Departamento de Morfologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, sob orientação do Prof. Dr. Hélio Chiarini-Garcia e parte no Programa de Pós-Graduação em Zoologia de Vertebrados da Pontifícia Universidade Católica (PUC-Minas) sob co-orientação do Prof. Dr. Hugo Pereira Godinho, e com o financiamento das seguintes instituições:

- Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)

- Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq)

- Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG)

A nossa maior glória não reside no fato
de nunca cairmos, mas sim em levantarmo-
nos sempre depois de cada queda. Por isso,
não te preocupes com os que não te conhecem,
mas esforça-te por seres digno de ser conhecido.

Confúcio

SUMÁRIO

1. Resumo..... 01
2. Introdução..... 03
2.1. Objetivo Geral..... 04
2.2. Objetivos Específicos..... 05
3. Revisão da literatura..... 06
3.1. Estrutura do ovário em teleósteos..... 07
3.2. Epitélio germinativo em teleósteos..... 08
3.3. Inseminação em teleósteos..... 10
4. Material e Métodos..... 13
4.1. Animais..... 13
4.2. Coleta do Material..... 13
4.3. Microscopia de luz..... 13
4.4. Microscopia eletrônica de transmissão..... 14
4.5. Microscopia eletrônica de varredura..... 15
4.6. Análise Estatística..... 15
5. Resultados..... 16
5.1. Características histológicas gerais dos ovários..... 16
5.1.1 Túnica ovariana..... 16
5.1.2 Lamelas ovulígeras..... 17
5.1.3 Ovócitos..... 17
5.2. Variações das características histológicas dos ovários durante o ciclo reprodutivo..... 18
5.2.1. Características histológicas dos ovários em repouso..... 18
5.2.2. Características histológicas dos ovários em maturação inicial..... 19
5.2.3. Características histológicas dos ovários em maturação avançada..... 19
5.3. Relação espacial entre ovogônias e membrana basal..... 19
5.4. Ultraestrutura do epitélio germinativo..... 20
5.4.1. Ultraestrutura do epitélio germinativo em repouso..... 20
5.4.2. Ultraestrutura do epitélio germinativo em maturação inicial..... 22
5.4.3. Ultraestrutura do epitélio germinativo em maturação avançada..... 23
5.5. Epitélio germinativo sob microscopia eletrônica de varredura..... 24
6. Discussão..... 25
7. Conclusão..... 29
8. Ilustrações..... 30
9. Referências Bibliográficas..... 47

LISTA DE FIGURAS

1 - Diagrama demonstrativo do epitélio germinativo..... 09
2 - Fotomicrografia do ovário do cangati..... 31
3 - Detalhes morfológicos dos ovócitos do cangati..... 32
4 - Detalhes morfológicos da túnica ovariana..... 33
5 - Fotomicrografias dos ovários em repouso..... 34
6 - Vista panorâmica dos ovários em maturação inicial..... 35
7 - Fotomicrografias dos ovários em maturação avançada..... 36
8 - Fotomicrografias dos ovários de maio pela técnica PAS..... 37
9 - Eletromicrografia do epitélio germinativo..... 38
10 - Eletromicrografias do epitélio no mês em repouso..... 39
11 - Eletromicrografias mostrando detalhes do epitélio..... 40
12 - Eletromicrografias apresentando ninhos de ovogônias..... 41
13 - Eletromicrografias com detalhes do ninho de ovogônias..... 42
14 - Eletromicrografias do epitélio em maturação inicial..... 43
15 - Eletromicrografias com detalhes do epitélio em maturação inicial..... 44
16 - Eletromicrografias do epitélio em maturação avançada..... 45
17 - Eletromicrografias de varredura do ovário do cangati..... 46

LISTA DE TABELA

1. Dados biométricos do cangati obtidos ao longo de 2009..... 16

1. Resumo

Peixes, em sua maioria, reproduzem-se por fertilização externa, na qual os gametas são liberados no meio externo, onde os ovócitos são fertilizados pelos espermatozóides. No entanto, em algumas espécies ocorre o processo de inseminação no qual machos depositam seus espermatozóides no interior do lúmen ovariano. Estes espermatozóides podem ficar estocados por poucas horas, dias ou até vários anos, dependendo da espécie, antes da fertilização. Alguns estudos descreveram as interações morfológicas entre os espermatozóides e o trato reprodutivo feminino, inclusive para *T. galeatus,* espécie por nós selecionada para este estudo. Mas estas investigações avaliaram as interações apenas no período reprodutivo e os resultados obtidos apresentavam limitações impostas pela resolução da microscopia de luz convencional. No presente trabalho, propomos avaliar as interações morfofuncionais entre os espermatozóides e o ovário desta espécie durante diferentes períodos do ano e utilizando como ferramentas a microscopia de luz em resina plástica e as microscopias eletrônicas de transmissão e varredura. Foram utilizadas 12 fêmeas de *T. galeatus* capturadas em diferentes períodos do ano e fase reprodutiva: maio, setembro e fevereiro. Considerando o peso das gônadas e parâmetros histológicos, determinou-se que no mês de maio os ovários encontravam-se em repouso reprodutivo, no mês de setembro em maturação inicial e em fevereiro em maturação avançada. Observou-se que as fêmeas eram inseminadas ainda no período de repouso e que os espermatozóides se encaixavam em depressões profundas no epitélio de revestimento das lamelas ovulígeras até o período próximo da ovulação, quando então foram observados principalmente na forma livre, no lúmen ovariano. A interação entre os espermatozóides e o epitélio de revestimento aparentemente era intermediada por um glicocálix, que se apresentava mais espesso no período de repouso, quando as fêmeas eram inseminadas. As células epiteliais de revestimento das lamelas ovulígeras eram unidas por junções intercelulares ápico-laterais, que eram mais desenvolvidos durante o período em que os espermatozóides estavam mais profundamente encaixados no ápice destas células. Estes complexos juncionais possivelmente funcionam tanto como barreira para proteção do organismo da fêmea em relação aos espermatozóides, quanto também protegendo os espermatozóides do ataque do sistema imunológico da fêmea. Constatou-se que além das células epiteliais de revestimento, o epitélio que reveste as lamelas ovulígeras também possuía células germinativas tronco, as ovogônias, por este motivo sendo chamado de epitélio germinativo. Estas ovogônias se distribuíam em ninhos localizados principalmente na base das lamelas ovulígeras. Apesar de serem mais facilmente visualizadas no período de repouso, foram encontradas durante todo o período reprodutivo. Os resultados obtidos neste trabalho nos permitem concluir que os espermatozóides estão presentes dentro do ovário de *T. galeatus* durante todo o ano, apresentando diferentes adaptações morfofuncionais dependendo da fase do ciclo reprodutivo, interações estas que os mantém viáveis e aptos para, no momento oportuno, fertilizar os ovócitos.

Abstract

The fertilization process in fish usually occurs in the external environment, where the female ejaculates the oocytes, the male ejaculates the sperm, and the germ cells will be combined in eggs. But, in some species, the male inject the sperm inside the female oviduct, and the fertilization process happens within the female body. In these animals, the spermatozoa can be stored inside the female for hours, days or even years, until the fertilization. Studies have described the connections established between the spermatozoa and the female reproductive tract for several species, including the *T. galeatus*, the specie chosen for our research. However, the past investigations evaluated the connections during the reproductive period only, and with restrictions imposed by the conventional light microscopy. In the present study, we evaluate the morphofunctional interactions between the spermatozoa and the ovary epithelium, for *T. galeatus*, during different times of the year, and using the light microscopy in plastic resin, and the scanning and transmission electron microscopy as tools to better understand the mechanism. We analyzed 12 females, captured in different times of the year, suggesting different reproductive phases: May, September and February. Considering the gonads weight and histological parameters, it was found that in May the ovaries are in reproductive rest phase, in September the reproduction starts and in February the ovaries are in late reproduction/ regression phase. We observed that the insemination happens during the rest phase, and the spermatozoa are attached to depressions in the epithelial coating from the ovary lamellae until the ovulation phase, when they were observed free in the ovary lumen. The connection between the spermatozoa and the lamellae epithelium is established by the glycocalyx that seems to be thicker during the rest phase, when the female were inseminated. The epithelial cells covering the ovary lamellae are connected by tight-junctions located on the upper side of the cells, and the junctions seem to be more developed when the spermatozoa are located deeply inside the epithelium. The junction complexes possibly work as a protection barrier for the female body against the male spermatozoa, and also protect the spermatozoa from the female immune system. We have found that the epithelial tissue covering the ovary lamellae has, besides epithelial cells, stem cells, the oogonia, for the reason being called germinal epithelium. The oogonia are distributed in niches, located mainly in the basal area of the lamellae. Though these cells are better seen during the rest phase, they could be observed during all the reproductive period. The information obtained in the present study allow the conclusion that the spermatozoa are present in the *T. galeatus* female ovary during the whole year, and that different morphofunctional characteristics can be found, depending on the phase of the reproductive cycle, that allow the spermatozoa to be capable of fertilizing the oocytes when required.

2. Introdução e Justificativa

A região neotropical possui a ictiofauna conhecida mais rica do mundo, com cerca de 4. 475 espécies; este número pode ultrapassar 6.000 espécies (Reis *et al*., 2003). Dentro dessa região, a América do Sul concentra a maior parte das espécies, com cerca de 3.300 e é nela que se encontra a maior diversidade de peixes de água doce do mundo (Smith *et al*., 2003). Os peixes são formas de vida dominante no meio aquático. Colonizam todos os tipos de habitat, mostram uma profusão de formas, tamanhos e padrões de ciclo de vida (Wootton, 1991).

Os teleósteos desenvolveram diferentes estratégias reprodutivas, ligadas a diferentes funções vitais e aos distintos habitat para a conquista do meio aquático. A diversidade de mecanismos reprodutivos dos teleósteos é maior do que qualquer outro grupo de vertebrados (Hoar 1969, Wourms *et al.,* 1988). De fato, esta diversidade de longe excede aquelas encontradas em pássaros, mamíferos, répteis ou anfíbios (Forsgren *et al.,* 2002). Potts & Wootton (1984) e Vazzoler (1996) mencionam inclusive que o sucesso dos teleósteos em distintos ambientes é reflexo das várias estratégias reprodutivas apresentadas pelo grupo, as quais englobam táticas extremas, que permitiram sua adaptação a ambientes nos quais tanto as condições bióticas, como disponibilidade de alimento e pressão de predação, quanto a abióticas, como temperatura, fotoperíodo, oxigênio disponível, dentre outras, variam amplamente no espaço e no tempo.

Comumente, a fertilização em peixes ocorre no meio externo onde as fêmeas eliminam os ovócitos e os machos, os espermatozóides. Mas, em algumas espécies, os machos inseminam as fêmeas depositando os espermatozóides no lúmen do ovário. Os espermatozóides podem ficar estocados por poucas horas ou dias ou até vários anos, dependendo da espécie (Birkhead & Moller, 1992). Os mecanismos de interação entre espermatozóides e o trato reprodutivo feminino são considerados peculiares, particularmente, devido à capacidade do ovário destas espécies de estocar e manter espermatozóides viáveis por longos períodos (Hunter & Rodriguez-Martinez, 2004). Vários indícios mostram que a estocagem dos espermatozóides no ovário da fêmea está envolvida com seleção evolutiva (Smith & Yanagimachi 1991, Fazeli *et al.,* 1999). A estocagem de espermatozóides na cavidade ovariana de teleósteos tem sido observada através da microscopia de luz (Tateishi *et al.,* 1958, Moser 1967, Shinomiya 1985, Takemura *et al.,* 1987, Koya *et al.,* 1994, Burns *et al*., 1995), mas, poucas espécies são estudadas ao nível ultra-estrutural (Gardiner 1978, Hayashi 1990, Koya *et al.,* 1997). Devido às limitações impostas pela resolução da microscopia de luz, os

detalhes das interações entre espermatozóides e epitélio germinativo estão ainda pouco esclarecidos.

Trabalho desenvolvido recentemente por nosso grupo (Parreira *et al.,* 2009) pesquisou as interações ultra-estruturais entre espermatozóides e o epitélio das lamelas ovulígeras de fêmeas do cangati *Trachelyopterus galeatus*. Foi possível observar adaptações morfofuncionais do epitélio germinativo para suportar e sustentar os espermatozóides, como, presença de especializações de membrana e morfologia das células de suporte se adaptando para a manutenção da sobrevida dos espermatozóides. Como o estudo desenvolvido por Parreira *et al.,* (2009) avaliou as interações entre espermatozóides e o epitélio germinativo em apenas uma época do ano, propomos, no presente trabalho, estender os estudos morfofuncionais destas interações durante diferentes períodos do ano utilizando microscopia de luz e microscopias eletrônicas de transmissão e varredura.

O epitélio que reveste as lamelas ovulígeras pode ser considerado como um epitélio germinativo (Grier, 2000). Isto é, um epitélio que pode manter como estoque as células-tronco germinativas, ou ovogônias, as quais, quando sob estímulo adequado, iniciam o processo de foliculogênese. A literatura registra trabalhos relativos as características deste epitélio em peixes de inseminação interna as quais, além da sua possível capacidade de produzir as células germinativas, teria ainda a função de sustentar e manter viáveis os espermatozóides (Muñoz *et al*., 2000; Vila *et al*., 2007). O estudo dos aspectos morfofuncionais das interações entre espermatozóides e o epitélio germinativo, bem como entre esse epitélio e as ovogônias, poderia trazer novas informações sobre as estratégias de diferentes espécies em relação às suas adaptações, distribuição e sobrevivência nos diferentes habitats. Além disto, conhecer as características morfológicas e funcionais do sistema reprodutor de peixes pode ser importante para auxiliar na produção em cativeiro destas espécies, assim como, para o desenvolvimento de técnicas dirigidas à conservação de espécies nativas.

2.1. Objetivo Geral

Avaliar a morfologia do epitélio germinativo do cangati *Trachelyopterus galeatus* e as inter-relações deste epitélio com ovogônias e com espermatozóides durante diferentes períodos do ano.

2.2. Objetivos Específicos

- Avaliar, sob a microscopia de luz e as microscopias eletrônicas de transmissão e varredura, a morfologia do epitélio germinativo;
- Descrever a morfologia das ovogônias bem como a associação destas com o epitélio germinativo;
- Estabelecer as interações morfofuncionais entre os espermatozóides e o epitélio germinativo em diferentes períodos do ano e estádios de maturação gonadal.

3. Revisão da literatura

As respostas que as espécies apresentam às pressões seletivas impostas pelo seu ambiente podem ser evidenciadas pelas estratégias exibidas nas diferentes funções vitais. Essas estratégias visam reduzir os custos energéticos para a manutenção do indivíduo, aumentar a eficiência na obtenção de energia e assim maximizar a eficiência reprodutiva. O sucesso da estratégia pode ser aferido pela capacidade individual de se fazer representar geneticamente nas próximas gerações (Agostinho & Júlio Júnior, 1999).

Algumas espécies de peixes são conhecidas pela elevada fecundidade, com indivíduos liberando centenas a milhões de ovos durante o período reprodutivo. A estabilidade populacional, que pressuporia inicialmente desovas anuais igualmente intensas, raramente é atingida, e os números aumentam ou diminuem dependendo da pressão dos fatores ambientais. As flutuações podem ser irregulares ou cíclicas, dependendo da forma de variação desses fatores, e nem todas as espécies em uma determinada área são igualmente afetadas pelas mesmas mudanças ambientais (Bond, 1979).

Os fatores com maior relevância como força adaptativa, nas grandes bacias hidrográficas brasileiras, parecem ser aqueles relacionados com o regime de cheias. Agostinho (1995) relata, entretanto, que as variações anuais no ciclo hidrológico afetam de maneiras diferentes, algumas vezes antagônicas, o sucesso reprodutivo de espécies com diferentes estratégias. Assim os modos reprodutivos são extremamente diversificados entre os peixes, incluindo variações no meio pelo qual eles encontram e atraem os parceiros, nos locais onde desovam e nos cuidados que dispensam à prole.

A maioria das espécies apresenta sexos separados, mas existem aquelas que são sequencialmente hermafroditas e, mesmo, há algumas poucas que, ambos os sexos se mostram simultaneamente funcionais (Wootton, 1991). A maior parte dos teleósteos é *ovípara* com fecundação e desenvolvimento externos. Esse é o padrão dominante para a maioria dos teleósteos; neste caso, os ovos possuem os nutrientes apropriados para o desenvolvimento dos embriões. A *oviparidade* pode ser sub-classificada em ovulíparos e zigoparos. Peixes *ovulíparos* são aqueles em que os ovos são liberados pelas fêmeas e fertilizados/ativados no meio externo. Peixes *zigoparos*, em outro aspecto, conservam o ovo fertilizado dentro da fêmea por um curto período antes de liberá-lo para o meio externo; estas espécies, portanto, realizam fertilização interna que incluem alguns tubarões e um pequeno número de teleósteos (Hoar, 1969). Em espécies *ovovivíparas*, os ovos se desenvolvem em uma área modificada do oviduto da fêmea onde são retidos e incubados. Os nutrientes são obtidos através

do vitelo do ovo e o oxigênio através da parede do oviduto da fêmea, que é altamente vascularizado. Os peixes *vivíparos* produzem ovos que se desenvolvem no ovário ou útero. A nutrição é dada em parte pelo vitelo do ovo e adicional secreção materna. Algumas espécies apresentam uma placenta primitiva para permitir transferência eficiente de nutrientes maternos (Hoar, 1957; Amoroso, 1960; Hogarth, 1976; Wourms, 1981).

3.1. Estrutura do ovário em teleósteos

Os ovários de teleósteos podem ser divididos em dois tipos: gimnovário e cistovário. No primeiro tipo, os ovócitos são liberados diretamente na cavidade celômica, para então, serem eliminados. No segundo tipo, os ovócitos são conduzidos ao exterior pelo oviduto (Hoar, 1969). Comumente, os ovários de teleósteos são caracterizados como órgãos pares, geralmente de igual tamanho. Apresentam forma ovóide alongada, com a extremidade anterior romba e a posterior adelgaçada, formando um oviduto que desemboca no poro urogenital, posteriormente ao ânus. Localizam-se na cavidade celomática, presos à linha sagital mediana pelo mesovário, dorsalmente ao intestino. O tamanho, peso e coloração variam de acordo com o período reprodutivo (Santos *et al*., 1991).

Microscopicamente, o ovário é envolvido por cápsula de tecido conjuntivo denso, vasos sanguíneos e tecido muscular que constituem a túnica albugínea. Esse tecido emite projeções para o interior do órgão, formando as lamelas ovulígeras que sustentam as células germinativas em diferentes fases do desenvolvimento. As lamelas ovulígeras apresentam grandes variações na sua morfologia, dependendo da fase do ciclo reprodutivo em que o peixe se encontra. Dentro destas lamelas são vistos ovócitos em diferentes fases de desenvolvimento, circundados por envoltórios celulares e formando os folículos ovarianos (Ganeco *et al*., 2001). Revestindo as lamelas ovulígeras, e fazendo parte dela, há um epitélio denominado epitélio germinativo (Grier, 2000). Este epitélio é constituído de células epiteliais de revestimento, células pré-foliculares e células da teca interna além de ovogônias, que serão responsáveis pela formação folículos ovarianos e, por consequência, dos gametas femininos.

3.2. Epitélio germinativo em teleósteos

Segundo Grier (2000), as lamelas ovulígeras de *Centropomus undecimalis* são revestidas por epitélio que ele denominou de epitélio germinativo. Este epitélio é composto de dois tipos celulares: células somáticas e células germinativas.

As células somáticas constituem um epitélio formado por células justapostas, intimamente unidas entre si através de junções intercelulares. As principais junções são os desmossomos, zônulas de aderência, zônulas de oclusão ou *tight junctions*, junções comunicantes ou *gap* e os hemidesmossomos, que ligam as células epiteliais à lâmina basal.

As células germinativas não estão diretamente expostas ao lúmen ovariano. Usualmente, apresentam-se separadas do lume por interdigitações citoplasmáticas das células pré-foliculares ou epiteliais que estão sobre a lâmina basal. As ovogônias podem ser vistas dividindo-se mitoticamente mantendo sua população, por auto-renovação, ou entrando em meiose para se tornar ovócito (Fig. 1). Do ponto de vista ultra-estrutural, as ovogônias caracterizam-se por possuir núcleo ovóide com cromatina descondensada e um único nucléolo. Seu citoplasma é pobre em organelas podendo possuir grande número de mitocôndrias e um retículo endoplasmático pouco desenvolvido, sendo também possível observar as nuages, organelas polimórficas formadas por aglomerados de RNA e usualmente associadas às mitocôndrias (Grier, 2000).

A morfologia das células epiteliais é variável, elas ocorrem isoladas ou em grupos associadas às ovogônias. As células epiteliais que estão em íntima associação com os ovócitos se transformam em células pré-foliculares, e parte dessas células pré-foliculares darão origem às células da teca interna (Fig.1). Já as células da teca externa têm origem de células indiferenciadas que se localizam no espaço extravascular do estroma logo abaixo ao epitélio germinativo de acordo com a (Fig. 1) (Grier, 2000).

Segundo Tyler & Sumpter (1996), os ovócitos e as células da teca podem possuir duas origens diferentes: A primeira teoria defende que as ovogônias e as células tecais são derivadas do epitélio que cobre as lamelas ovulígeras como em (*Phoxinus laevis* Bullough, 1942; *Clarius batrachus* Lehri, 1968; *Neotoca bilineata* Mendoza, 1943; *Centropomus undecimalis,* Grier 2000). No entanto, Brummet *et al.* (1982) demonstraram em *Fundulus heteroclitus* que as ovogônias originam-se de um tecido abaixo do epitélio luminal. Begovac & Wallace (1987) e Selman *et al.* (1991) observaram, respectivamente, em *Sygnathus scovelli* e *Hippocampus erectus* que os

ovócitos e as células tecais destas espécies também são de origens diferentes do epitélio luminal.

Muñoz *et al.* (2000) observou, através de análises ultraestruturais, diferenças nas lamelas ovulígeras em *Helicolenus dactylopterus,* durante seu ciclo reprodutivo. Durante a época de desova, as células epiteliais que revestem estas lamelas apresentam núcleo proeminente e com pouco elétron densidade e a presença de dois nucléolos periféricos associados à eucromatina granulada, além de escassa heterocromatina. O citoplasma é rico em miofilamentos que estão densamente organizados na região perinuclear. Este autor também observou diversas zônulas de oclusão e desmossomos entre estas células.

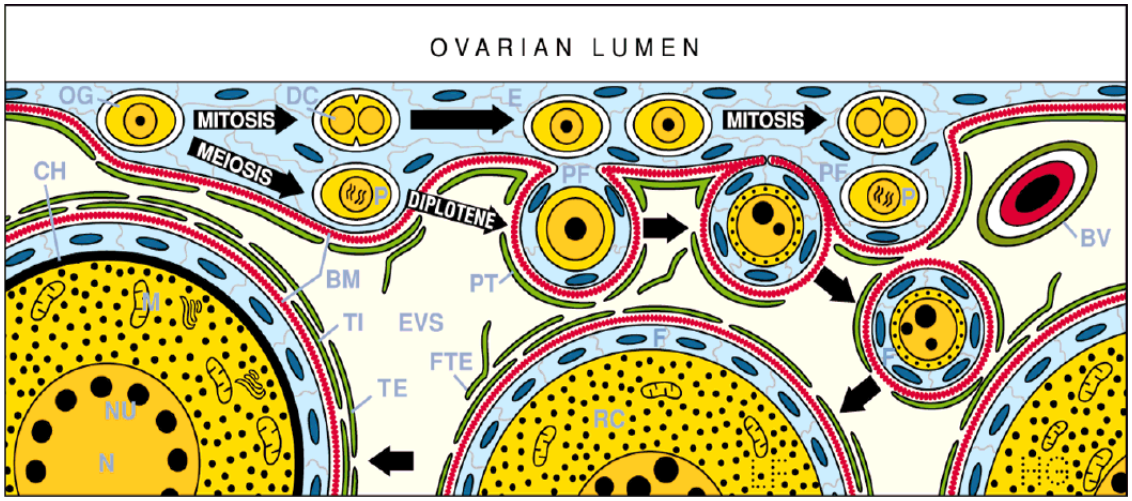

Fig.1. Diagrama demonstrativo do epitélio germinativo apresentando as duas linhagens das células germinativas. Uma das linhagens se constitui das ovogônias que por divisão mitótica se mantém em processo constante de autorenovação, enquanto a outra entra em processo de meiose formando os ovócitos. Essas células são envoltas por outros tipos celulares que, descem para o estroma das lamelas ovulígeras no processo da foliculogênese da espécie *Centropomus undecimalis*. Abreviações: (BM) Membrana basal, (OL) Lúmen ovariano, (E) célula epitelial, se transformando em (PF) célula pré-folicular, (OG) ovogônias em (P) paquíteno, células pré-foliculares se convertendo em, (F) células foliculares, (RC) citoplasma rico em RNA, (nu) múltiplos nucléolos, (N) núcleo em estágio pré-nucleolar, (M) mitocôndrias, (PT) células pré-tecais, (EVS) espaço extravascular, (TE) teca externa, (BV) vasos sanguíneos. Adaptado de Grier (2000).

Nesta espécie, durante a época de pós-desova, o epitélio de revestimento apresenta-se simples e polarizado, com sua porção apical mais vesicular que a basal. O núcleo, de forma esférica, apresenta profundas endentações com nucléolo localizado na posição paracentral envolvido por eucromatina dispersa homogeneamente por todo nucleoplasma e heterocromatina associada à lâmina nuclear. O citoplasma apresenta lisossomos, fagossomos, corpos residuais, mitocôndrias de forma esférica, complexo de Golgi e cisternas do retículo endoplasmático dispersas no citoplasma. A membrana celular apresenta, no período de pós-desova, menor número de especializações de membrana, como zônulas de

oclusão e desmossomos. Muñoz *et al*. (2000) observou também que durante este período, adjacente as células epiteliais havia diversos macrófagos que eram facilmente identificados por sua alta elétron-densidade e a presença de seus numerosos pseudópodes e seu citoplasma rico em ribossomos, cisternas do retículo endoplasmático rugoso, vesículas e mitocôndrias. Muñoz *et al.* (2000) correlaciona as alterações no complexo juncional, que conectam as células adjacentes no epitélio germinativo, como uma forma de proteção dos espermatozóides durante o ciclo reprodutivo de *Helicolenus dactylopterus.* Achados semelhantes foram observados por Koya *et al.* (1997) em *Alcichthys alcicornis*, Kobayashi & Iwamatsu (2002) em *Poecilia reticulata* e Vila *et al*. (2007) em *Helicolenus dactylopterus dactylopterus.* Esses autores atribuíram às especializações de membrana dessas espécies, como sendo parte responsável da formação de uma barreira que protege os espermatozóides do ataque do sistema imune da fêmea.

Vila *et al*. (2007) demonstraram haver similaridades citológicas entre as células do epitélio germinativo da fêmea e células de Sertoli do macho de *Helicolenus dactylopterus dactylopterus*. Seus núcleos possuem forma e posição semelhantes. Já as interações celulares por especializações de membrana como desmossomos, zônulas de aderência, zônulas de oclusão e junções comunicantes apresentam-se similares, e as organelas citoplasmáticas, dentre elas, mitocôndrias, retículo endoplasmático rugoso, lisossomos e corpos lipídicos são encontradas nos dois tipos celulares. Apenas o nucléolo não apresentou similaridade, pois nas células de Sertoli, eles apresentam-se na posição periférica e nas células do epitélio germinativo não são evidentes. Vila *et al*. (2007) correlacionam as características morfofisiológicas em comum dos tipos celulares citados para defender a idéia das possíveis semelhanças funcionais atribuídas às células de Sertoli, dentre elas o papel de barreira imunológica que o epitélio germinativo promove aos espermatozóides durante o período em que eles ficam estocados e viáveis para fertilização.

3.3. Inseminação em teleósteos

O processo de inseminação ocorre quando os espermatozóides são introduzidos no trato reprodutivo da fêmea, processo esse, ainda pouco conhecido entre os teleósteos (Burns *et al*., 1995, 2002, 2005; Parreira *et al*., 2009). No presente trabalho optamos seguir a classificação de Meisner (2005), que faz uma distinção entre inseminação e fertilização interna. Essa designação tem sido usada pelo fato de algumas espécies apresentarem fêmeas inseminadas, ou seja, com espermatozóides

dentro do trato reprodutivo e ausência de ovócitos fertilizados, caracterizado pelo contato entre espermatozóide e ovócito (Javonillo *et al*., 2009; Parreira *et al*., 2009).

Sabe-se que o processo de inseminação também confere vantagens em relação às pressões do ambiente. Os peixes que utilizam este mecanismo reprodutivo de inseminação apresentam diversas especializações que estão associadas com o processo de inseminação. Uma delas seria a forma do espermatozóide que nesta situação possui núcleo e peça intermediaria alongados, e machos por possuir órgão copulador (Burns & Weitzman, 2005; Meisner, 2005; Parreira *et al*., 2009). Em machos adultos da família Auchenipteridae, o órgão copulador ou gonopódio é uma modificação da nadadeira anal (Meisner *et al*., 2000; Burns *et al*., 2002; Ihering, 1937; Chacon & Mendes Filho, 1972). O gonopódio tem a função de transferir o sêmen para o trato reprodutor da fêmea (Ihering, 1937; Chacon & Mendes Filho, 1972; Grier *et al.,* 1981; Meisner *et al.,* 2000; Burns *et al.,* 2002; Parreira *et al*., 2009). Este órgão também pode ser derivado da nadadeira peitoral ou pélvica, como nos Phallostethidae, ou ainda se desenvolver como um alongamento da papila genital, como em espécies dos gêneros *Labidesthes* (Atherinidae) e *Hemirhamphodon* (Hemiramphidae) (Meisner, 2005).

Em *Alcichthys alcicornis* (Koya *et al.*, 1997) são encontrados espermatozóides livres dentro da cavidade ovariana. Koya e colaboradores (1997) relatam que a estrutura ovariana desta espécie é pouco especializada, fato este que contribui para o curto período que os espermatozóides ficam estocados dentro do ovário. Nesta espécie, os espermatozóides podem ser mantidos dentro do ovário por devido ao fato do órgão possuir estruturas diferenciadas, tais como formação de depressões epitélio germinativo, que promovem a sobrevida dos espermatozóides. Em vivíparos, como *Cymatogaster aggregata*, os espermatozóides são estocados dentro de pequenas bolsas no epitélio germinativo ovariano por vários meses após a inseminação até o momento da fertilização (Gardiner, 1978). Em *Sebastes taczanowskii,* Takemura *et al., (*1987) verificaram que os gametas masculinos são estocados por vários meses no ovário e Hayashi (1990), posteriormente, verificou que estes espermatozóides estão aderidos ao epitélio germinativo. Segundo Ferraris Jr (2003), dentre os Siluriformes, os membros da família Auchenipteridae, na qual se inclui a espécie objeto de nosso estudo, são os únicos que possuem inseminação. Em menos de 10% dos auchenipterideos a presença de espermatozóides tem sido histologicamente registrada, como em, *Trachelyopterus striatulus* (= *Trachycorystes striatulus*) (Ihering, 1937); *Ageneiosus inermis* (= A. brevifilis), *Auchenipterus nuchalis, Tatia brunnea*, *Pseudauchenipterus nodusus* (Loir *et al.,* 1989); *Trachelyopterus galeatus* (=

Parauchenipterus galeatus) (Chacon & Mendes Filho, 1971; Loir *et al.,*1989; Meisner *et al.,* 2000; Parreira *et al*., 2009) e *Trachelyopterus lucenai* (Meisner *et al.,* 2000).

Parreira *et al.* (2009) investigaram as interações ultra-estruturais entre espermatozóides e o epitélio germinativo de fêmeas do cangati *Trachelyopterus galeatus*, observando adaptações morfofuncionais do epitélio germinativo que sustentam os espermatozóides, como, a presença de especializações de membrana que formam uma barreira de proteção imune e morfologia celular adaptada para manutenção da sobrevida dos espermatozóides. Esses são encontrados fixos no epitélio germinativo ou livres no lúmen formando grupos organizados de espermatozóides denominados espermatozeugmata. Parreira e colaboradores também fizeram a caracterização do espermatozóide do cangati *T. galeatus* que apresenta núcleo e peça intermediaria longos e flagelos similares a espécie *Trachelyopterus lucenai* (Burns *et al*., 2002, 2009), características essas encontradas em espermatozóides de várias espécies de inseminação interna.

4. Material e Métodos

4.1. Animais

Para o presente trabalho, foram utilizados 12 cangatis fêmeas *Trachelyopterus galeatus* Linnaeus, 1766 (Siluriformes, Auchenipteridae) em diferentes períodos do ano. Estes peixes foram capturados no rio São Francisco, município de Três Marias, nos meses de maio, setembro e fevereiro de 2009. As coletas foram feitas nestes meses levando em consideração estudos prévios por (Silva & Viana, 2003) que demonstraram em estudos realizados com *T. galeatus* que a maioria das fêmeas estudadas apresenta os ovários em repouso gonadal no mês de maio, em maturação inicial em setembro e em maturação avançada em fevereiro. Dados também descritos por (Araújo *et al*., 2000) estudando *Parauchenipterus striatulus* e (Ganeco *et al*., 2001) estudando *Brycon orbignyanus*. Foram utilizados quatro animais em repouso gonadal, seis em maturação inicial e três em maturação avançada.

A coleta e preparação das amostras e análise sob microscopia de luz foram realizadas no Laboratório de Biologia Estrutural e Reprodução (Laber) do Departamento de Morfologia ICB/UFMG. Já as avaliações ultra-estruturais sob microscopias eletrônicas de transmissão e varredura, foram feitas no Cemel – Centro de Microscopia Eletrônica do ICB/UFMG.

4. 2. Coleta do material

Após anestesia dos animais com Quinaldina (2-4-metilquinolina, Merck), numa proporção de 0,1mL/L de água, os animais foram pesados e medidos para obtenção dos dados biométricos (Tabela: 1) e sacrificados por transecção da medula cranial para coleta dos ovários que foram processados para microscopia de luz e eletrônica de transmissão e varredura. Os procedimentos adotados estão de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal do CETEA/UFMG, sob protocolo nº 119/2009.

4. 3. Microscopias de luz

Para as avaliações histológicas, os fragmentos das gônadas foram fixadas por imersão em solução de glutaraldeído a 5% em tampão fosfato a 0,05M pH e 7,2, por 24 horas, a 4ºC. Após este período, as amostras foram lavadas por várias vezes com tampão fosfato a 0,05M e pH 7,2, e armazenadas a 4ºC. Os fragmentos foram

desidratados em série crescente de alcoóis, infiltrados em resina plástica a base de glicol metacrilato (Historesin, Leica) para posterior inclusão. Após polimerização dos blocos, foram obtidos cortes histológicos de 3 e 5 μm de espessura, utilizando-se navalhas de vidro (preparadas em *Knife maker* da LKB, modelo 7880B), no micrótomo Reichert Jung (mod. 1140 / Autocut). Após terem sido distendidos em água destilada, foram colocados em lâminas histológicas e secos em chapa quente a 60°C. Os mesmos foram submetidos às técnicas de coloração histológicas com azul de toluidina-borato de sódio (Chiarini-Garcia & Meistrich, 2008) para avaliação morfológica e com ácido periódico-Schiff - PAS (Pearse, 1960) para identificação de carboidratos neutros com objetivo de visualizar a membrana basal do epitélio germinativo. O material foi analisado no microscópio CX31 e fotografado no microscópio BX51 (ambos Olympus) no qual estava acoplada uma câmera fotográfica digital Q-Color 3 (Olympus). As imagens digitais obtidas foram tratadas para ajuste de tons de cinza, contraste, brilho e foco, utilizando-se o programa Adobe Photoshop CS4. Em seguida, essas imagens foram montadas em pranchas e legendadas utilizando-se o programa Adobe Illustrator CS4.

Para determinação das fases do período reprodutivo em que o animal se encontrava avaliou-se a morfologia dos diferentes tipos de ovócitos intra-lamelares classificando-os em: (1) perinucleolares, (2) alvéolo-corticais, (3) vitelogênicos, (4) pós-vitelogênicos e (5) atrésicos, conforme descrito anteriormente por Chaves & Vazzoler (1984) e Lima *et al.* (1991).

4. 4. Microscopia eletrônica de transmissão

Logo após a coleta, fragmentos das gônadas foram também fixados por imersão em solução de glutaraldeído a 5% em tampão fosfato a 0,05M e pH 7,2, por 24 horas, a 4ºC. Após este período, as amostras foram lavadas várias vezes no mesmo tampão e armazenadas a 4ºC até o momento da inclusão. Previamente à inclusão, os tecidos foram pós-fixados em ósmio reduzido (1% tetroxido de ósmio e 1.5% ferrocianeto de potássio) por 90 minutos. Em seguida, o processo de inclusão iniciou-se com a desidratação das amostras em série crescente de alcoóis, seguida de infiltração e inclusão em resina araldite 502 (Electron Microscopy Sciences, Hatfield, PA), segundo Chiarini-Garcia & Meistrich (2008). Após polimerização dos blocos, foram obtidos cortes histológicos semifinos de 1 μm de espessura, utilizando-se navalhas de vidro (preparadas em *Knife maker* da LKB, modelo 7880B), no micrótomo Reichert Jung (mod. 1140 / Autocut). Destes cortes, foram selecionadas área para obtenção dos cortes ultrafinos de 60-80 nanômetros de espessura utilizando-se

navalha de diamante instalada no ultra-micrótomo Reichert-Jung Du Pont Instruments Sorvall MT2-B. Os cortes foram coletados em telas de cobre de 200 mesh e corados com acetato de uranila a 2% (Watson, 1958) e citrato de chumbo a 3% (Reynolds, 1963). As análises ultra-estruturais foram realizadas no microscópio eletrônico, EM-10 da Carl Zeiss do Cemel – ICB/UFMG. As imagens fotográficas foram obtidas empregando-se filme PSD/4 lito-ortocromático (Instituto Brasileiro de Filmes, IBF) que foram revelados com solução Kodak D-19 (1:2) por 3 minutos a 21ºC. Os negativos foram digitalizados com o escaner Epson Perfection 4780 em uma resolução de no mínimo 1200dpi e as imagens digitais obtidas foram posteriormente tratadas com os programas Adobe Photoshop e Illustrator CS4.

4. 5. Microscopia eletrônica de varredura

Fragmentos das gônadas foram fixadas em solução de glutaraldeído a 5% em tampão fosfato a 0,05M e pH 7,2 por 24 horas à 4ºC. Em seguida, as amostras foram submetidas à dupla pós-fixação com tetróxido de ósmio a 1% durante 2h à temperatura ambiente, intercaladas com solução de ácido tânico a 1%, como mordente, durante 20 minutos (Silveira, 2007). Os fragmentos foram desidratados em série crescente de alcoóis e armazenados em álcool absoluto. Alguns fragmentos foram submetidos à fratura após congelamento em nitrogênio líquido. Em seguida, os fragmentos foram secos em aparelho de ponto crítico de CO_2 (CPD-020 da Balzers), montados em suportes de alumínio, com cola metálica. Posteriormente, os fragmentos foram recobertos com ouro, em acessório para metalização no equipamento Edwards Scancoat six, do Laboratório de Microanálises (Departamento de Física, ICEX/UFMG), por 60 segundos. O material foi analisado no Microscópio Eletrônico de Varredura DSM 950 da Zeiss do Cemel - ICB/UFMG. Esse microscópio possui placa de transferência de imagem (DITI- *digital interface transfer image*), que transfere a imagem da tela do microscópio para o computador. As imagens obtidas também foram ajustadas com os programas do sistema Adobe CS4.

4.6. Análise Estatística

Os dados biométricos foram expressos como média ± erro padrão da média (EPM). As médias entre os grupos estudados foram comparadas através do teste Tukey e a variabilidade foi analisada por meio de análise de variância (ANOVA). Estes testes estatísticos foram realizados utilizando-se o programa SAEG. O nível de significância considerado foi de $P<0,05$.

5. Resultados

Aspectos de reprodução de peixes, baseados na maturação gonadal e na utilização de indicadores quantitativos, tem servido de parâmetros para o entendimento ecológico do papel desempenhado pelas espécies de um ambiente aquático. A gônada, ao amadurecer, passa por profundas modificações no peso corporal, peso gonadal e índice gonadossomático, podendo caracterizar diferentes fases durante o seu desenvolvimento (Tab. 1). Nas fases finais, verifica-se um marcado aumento no volume e, consequentemente, no peso dos ovários, e o índice gonadossomático que foi calculado por meio da expressão: peso da gônada x 100/ peso corporal, é um indicador quantitativo utilizado para avaliar o período de reprodução da espécie. Nossos resultados demonstram que, os meses escolhidos para a coleta dos animais, coincidem com as fases do ciclo reprodutivo, tal como observado na Tabela 1.

Tabela 1. Dados biométricos do cangati obtidos ao longo de 2009[1]

Fase do ciclo reprodutivo	Animais (n)	Mês	Peso corporal (g)	Peso gonadal (g)	Índice gonadossomático (IGS)	Comprimento total (cm)
Repouso	4	Maio	27,73 ± 2,49 ^{a}	0,16 ± 0,09 ^{a}	0,56 ± 0,30 ^{a}	13,43 ± 0,77 ^{a}
Maturação inicial	6	Setembro	43,48 ± 4,73 ^{b}	1,42 ± 0,27 ^{b}	3,26 ± 0,64 ^{b}	14,25 ± 0,62 ^{ab}
Maturação avançada	3	Fevereiro	60,43 ± 8,22 ^{c}	3,70 ± 1,0 ^{c}	5,96 ± 0,94 ^{c}	15,5 ± 0,40 ^{b}

[1] Médias seguidas de letras diferentes na coluna diferem-se estatisticamente pelo teste Tukey ($P<0,05$).

5.1. Características histológicas gerais dos ovários

5.1.1 Túnica ovariana

As análises microscópicas revelaram que a parede do ovário de *T. galeatus* era constituída de três túnicas distintas: serosa, adventícia e interna. A túnica serosa, a mais externa, compunha-se de epitélio simples pavimentoso apoiado sobre delgada camada de tecido conjuntivo, a lâmina própria (Fig. 2A). Adjacente, seguiu-se a adventícia (túnica albugínea) bastante desenvolvida, rica em fibras musculares lisas dispostas em camadas alternadas nos planos longitudinais, transversais e oblíquos (Fig. 2A). Entre as camadas musculares, foi possível observar a presença de tecido conjuntivo frouxo, cuja vascularização variou com a fase do ciclo reprodutivo. A túnica

interna constituída por camada única de células cúbicas com citoplasma escasso, núcleo arredondado e nucléolo evidente. Essas células encontravam-se apoiadas sobre delgada camada de tecido conjuntivo frouxo, contínuo com a túnica albugínea (Fig. 2A).

5.1.2 Lamelas ovulígeras

Da túnica interna partiam delicados septos de tecido conjuntivo, originando lamelas ovulígeras em direção ao lúmen ovariano (Fig. 2B). Essas lamelas apresentaram grandes variações morfológicas ao longo dos meses de estudo e da fase do ciclo reprodutivo em que o peixe se encontrava. Nas lamelas ovulígeras, observaram-se ovócitos em diferentes fases de desenvolvimento. Esses ovócitos eram envoltos por células foliculares e tecais, formando os folículos ovarianos (Fig. 2C).

O epitélio que revestia as lamelas ovulígeras era constituído por dois tipos celulares: células somáticas e células germinativas (Fig. 2D). As células somáticas possuíam camada única, formando um epitélio simples. A morfologia do epitelio variou de pavimentoso para cúbico, cilíndrico ou colunar. As ovogônias eram as menores células germinativas do epitélio e se encontravam geralmente agrupadas em ninhos nas criptas das lamelas ovulígeras (Fig. 2D). Elas se caracterizam por apresentar citoplasma pouco corado, núcleo grande com cromatina dispersa e, geralmente, um nucléolo bem evidente (Fig. 2E).

5.1.3 Ovócitos

Avaliando, sob microscopia de luz, a morfologia dos diferentes tipos de ovócitos presentes nas lamelas ovulígeras de *T. galeatus*, foi possível classificá-los em: (1) perinucleolares, (2) alvéolo-corticais, (3) vitelogênicos, (4) pós-vitelogênicos e (5) atrésicos (Figs. 3A-3E).

Nos ovócitos perinucleolares, o núcleo era central, com vários nucléolos de tamanhos diferentes, arredondados distribuídos na periferia da membrana nuclear. O citoplasma possuía contorno arredondado ou oval apresentando maior afinidade tintorial. Camada de células foliculares, de aspecto pavimentoso (Fig. 3A), envolvia esses ovócitos. Os ovócitos do tipo alvéolo-cortical mostraram núcleo central e citoplasma com grande quantidade de alvéolos corticais em sua periferia. Revestindo esses ovócitos, observaram-se a zona radiada, a camada de células foliculares, e externamente, as células da teca (Fig. 3B). Os ovócitos vitelogênicos apresentavam núcleo central e citoplasma repletos de glóbulos de vitelos. Os grânulos de vitelo eram

quase sempre esféricos, porém de tamanhos variados (Fig. 3C). Seu núcleo apresentou-se com contorno irregular e posição central ou levemente excêntrica e o citoplasma continha delgada camada periférica de alvéolos corticais. Revestindo os ovócitos vitelogênicos, verificou-se a presença de zona radiata, da camada de células foliculares e células tecais (Fig. 3C). Os ovócitos pós-vitelogênicos, caracterizavam-se por seu núcleo excêntrico, sem contorno nítido e nucléolos evidentes, envolvidos por uma zona radiata delgada e camada de células foliculares espessa (Fig. 3D). Os ovócitos atrésicos apresentavam grânulos de vitelo em fusão com aspecto de desintegração, concomitante com degradação da cromatina nuclear. Apresentavam também zona radiata fragmentada e grânulos de vitelo desorganizados (Fig. 3E).

5.2. Variações das características histológicas dos ovários durante o ciclo reprodutivo

As análises dos ovários coletados em repouso gonadal, maturação inicial e maturação avançada mostraram diferenças quanto ao seu peso (Tab.1), e ocorrência e proporções dos distintos tipos de ovócitos. Considerando os vários parâmetros histológicos, determinou-se que no mês de maio os ovários encontravam-se em repouso em comparação aos meses de setembro que estavam em início de reprodução, e de fevereiro que se encontravam em reprodução avançada/regressão.

A túnica ovariana apresentou variação morfológica evidente durante o período de estudo. No mês de maio, a túnica ovariana apresentou-se menos desenvolvida que nos outros meses (Fig. 4A). No entanto, naquelas fêmeas que foram inseminadas no mês de maio e que estavam em repouso gonadal (Fig. 4B) foi evidente o inicio do processo de espessamento da túnica ovariana, principalmente da túnica albugínea. A túnica serosa apresentou-se mais espessa no período de repouso inicial (Fig. 4A) quando comparado com o período reprodutivo (Figs. 4B-D). A túnica albugínea era mais desenvolvida no período reprodutivo (Figs. 4C-D) apresentando espessos feixes de fibras musculares que se distribuíam em várias camadas e uma vascularização mais intensa. Quanto à túnica interna, apresentava-se mais espessa no período de repouso quando comparado aos demais períodos avaliados (Fig. 4A-B).

5.2.1. Características histológicas dos ovários em repouso gonadal

Neste período, os ovários apresentaram-se menos pesados do que os naqueles de reprodução (Tab. 1). Suas lamelas ovulígeras eram mais delgadas, permitindo visualizar o lúmen do ovário (Fig. 5A). Nos ovários de menor peso (0,06g e

0,10g), o epitélio germinativo tinha aspecto baixo, em sua maioria pavimentoso (Fig. 5B). Nesses ovários não foi observada a presença de espermatozóides. Nos ovários mais pesados (0,17g e 0,31g) apresentavam epitélio mais alto variando de cúbico a prismático (Fig. 5C). Nesses ovários, foram vistos espermatozeugmas e espermatozóides fixos no epitélio germinativo e livres no lúmen ovariano (Fig. 5D). Foram visualizadas, livres no lúmen ovariano, células com morfologia de células germinativas associadas a um material amorfo. O núcleo destas células era semelhante aos de espermatócitos (Fig. 6E) e de espermátides arredondadas (Fig. 5F).

5.2.2. Características histológicas dos ovários em maturação inicial

Neste período, os ovários apresentavam-se maiores e mais pesados 1,42 ± 0,29 g (Tab. 1) do que naqueles em repouso gonadal. Suas lamelas ovulígeras continham ovócitos perinucleolares, alvéolo-corticais e vitelogênicos (Fig. 6A) o que torna difícil a visualização do lúmen ovariano. O epitélio germinativo apresentava-se prismático associado a grande número de espermatozóides, que se mantinham arranjados em espermatozeugmas (Fig. 6B). Também foram vistos espermatozóides livres no lúmen (Fig. 6C). Neste período reprodutivo, as ovogônias não foram abundantes no epitélio germinativo, como observado no período de repouso gonadal.

5.2.3. Características histológicas dos ovários em maturação avançada

Os cangatis capturados neste período apresentavam ovários em maturação avançada. Estes eram mais pesados, em relação aos outros períodos estudados, alcançando 3,11 ± 0,75g (Tab. 1). As lamelas ovulígeras encontravam-se completamente preenchidas por ovócitos vitelogênicos, pós-vitelogênicos e atrésicos (Fig. 7A). O epitélio germinativo se apresentava, em sua maioria, prismático e aderidos a ele foi observado um vasto número de espermatozóides que se dispunham na forma de feixes (Fig. 7B). Espermatozóides também foram encontrados livres no lúmen ovariano (Fig. 7C). As ovogônias foram raramente observadas neste estádio do ciclo reprodutivo.

5.3. Relação espacial entre ovogônias e membrana basal

Utilizando a técnica do PAS foi possível evidenciar com nitidez a membrana basal do epitélio de revestimento das lamelas ovulígeras. Observou-se que acima

desta membrana além das células epiteliais somáticas de revestimento também estavam presentes células germinativas tronco, as ovogônias (Fig. 8A). Associado a estas estavam presentes outros tipos celulares somáticos, as células pré-foliculares que vão constituir os ninhos de ovogônias. Por estes motivos este epitélio tem sido denominado de epitélio germinativo. Constatou-se que a membrana basal deste epitélio envolve progressivamente estes ninhos (Figs. 8B-C) Quando estes ninhos estão completamente envolvidos pela membrana basal, se destacam do epitélio e se deslocam para o interior das lamelas ovulígeras (Fig. 8D). Estes ninhos sob estímulos adequados vão formar os folículos ovarianos. As ovogônias e seus ninhos foram encontrados por todo o epitélio germinativo, mas foram predominantes na base das lamelas ovulígeras, no fundo das criptas. Elas foram mais facilmente visualizadas no período de repouso gonadal, quando o ovário estava menos desenvolvido por apresentar apenas ovócitos perinucleolares. No entanto, as ovogônias foram vistas em pequeno número em todas as fases do ciclo reprodutivo.

5.4. Ultraestrutura do epitélio germinativo

O epitélio germinativo era composto de dois tipos celulares: as células somáticas e as células germinativas (Fig. 9). As células somáticas estavam intimamente unidas entre si através de junções intercelulares. Estas junções apresentavam o padrão clássico observado em outros epitélios com a tríade formada de (1) zônulas de oclusão ou *tight junctions,* (2) zônulas de aderência e, numa posição mais basal, os desmossomos. Estas células apresentavam forma variada dependendo do período reprodutivo analisado, como observado na análise sob microscopia de luz. Ao nível ultraestrutural detectou-se, durante os diferentes períodos reprodutivos, alterações morfológicas evidentes quanto ao núcleo e às suas organelas citoplasmáticas. Já as ovogônias, que foram mais facilmente observadas no epitélio germinativo no período de repouso gonadal, apresentavam núcleo grande, eucromático e nucléolo único e condensado. No seu citoplasma foram poucas as organelas visualizadas, tais como reticulo endoplasmático liso, complexo de Golgi e mitocôndrias.

5.4.1. Ultraestrutura do epitélio germinativo em repouso gonadal

Tal como já descrito na avaliação sob microscopia de luz, apesar de no repouso os 4 exemplares apresentarem características histológicas de ovário em repouso gonadal, em dois deles (de maior peso) foram encontrados espermatozóides

dentro do lúmen ovariano e nos outros dois (de menor peso) não foram vistos espermatozóides. Nas gônadas de maior peso, apesar de estarem histologicamente em repouso e com todos os seus ovócitos na fase perinucleolar, vários ovócitos já iniciavam seu desenvolvimento para formação dos ovócitos alvéolos-corticais. Desta forma, denominamos, no presente trabalho, como ovário em repouso avançado em contraposição ao outro grupo que denominamos de ovário em repouso inicial.

Componentes somáticos

O epitélio germinativo dos ovários dos animais em repouso inicial e avançado apresentaram morfologia distinta. A diferença mais evidente entre estes dois grupos foi à altura do epitélio, como registrado na análise sob microscopia de luz. No repouso inicial, a superfície apical das células epiteliais apresentava-se rica em glicocálix quando comparada à das gônadas em repouso avançado (Figs. 10A-B). Da mesma forma, o complexo de Golgi e suas vesículas estavam mais desenvolvidos no repouso inicial. Em ambos os grupos os filamentos intermediários, que mediam cerca de 10 nm de espessura, foram vistos aderidos aos desmossomos. Quando distribuídos aleatoriamente no citoplasma, foram mais freqüentes no citoplasma das células epiteliais dos ovários em repouso avançado.

Quanto às outras organelas ou estruturas celulares não foram encontradas diferenças entre as células somáticas do epitélio germinativo nos ovários em repouso inicial e avançado. A superfície ápico-lateral era unida por complexos juncionais (Figs. 10A-B) e dentre eles foi possível observar desmossomos associados a elementos do citoesqueleto. No pólo basal, a membrana celular possuía muitas interdigitações e o citoplasma grande quantidade de filamentos intermediários. Especializações de membrana na superfície basal não foram vistas. As mitocôndrias eram grandes, de forma circular apresentando dupla membrana que envolvia um espaço interno, as cristas mitocondriais. Foram também encontradas mitocôndrias degradadas e de aspecto tumefeito (Fig. 10B). O retículo endoplasmático apresentava-se escasso. Em ambos os grupos, observou-se grande quantidade de interdigitações entre as membranas citoplasmáticas (Fig. 10A). Estas interdigitações foram mais evidentes na porção latero-basal destas células.

O núcleo das células somáticas possuía formas irregulares e apresentava profundas endentações (Figs. 10A-B). O envoltório nuclear era constituído por duas unidades de membrana concêntricas, que limitavam a cisterna perinuclear. A membrana interna apresentava-se associada a uma rede de filamentos constituindo a lâmina nuclear. Na membrana nuclear externa não foi possível observar ribossomos

associados à face citoplasmática e também não foi observada continuidade entre esta membrana com o retículo endoplasmático. A cromatina apresentava-se descompactada, e uniformemente distribuída no nucleoplasma. Pequenos aglomerados de heterocromatina foram vistos associados à lâmina nuclear. O nucléolo era único e apresentava os mesmos componentes descritos na literatura, isto é, regiões granular e fibrilar.

Componentes germinativos

As ovogônias, por sua vez, eram células grandes, de núcleo ovóide, cromatina descompactada e com pouca heterocromatina (Figs. 11A-B). Foram vistos até dois nucléolos que possuíam forma arredondada, de aspecto compactado e pouco eletron-denso. Foi difícil a distinção entre as regiões fibrilar e granular nos nucléolos das ovogônias analisadas. Foi possível observar no citoplasma outra organela usualmente considerada marcadora de células germinativas, as nuages. Sob a microscopia eletrônica, estas organelas eram arredondas e se apresentavam de forma granular. Podendo ser vistas isoladas ou associadas a mitocôndrias que se distribuem uniformemente ao seu redor (Fig. 11B).

Em determinadas regiões, o epitélio germinativo encontrava-se espessado e nele foram observados, além das células somáticas de revestimento, agrupamento destas ovogônias e de outras células somáticas formando ninhos de ovogônias (Fig. 12A). As células somáticas que estavam justapostas às ovogônias eram células que davam origem às células foliculares e/ou tecais que formavam os folículos ovarianos (Fig. 12A). A presença desses ninhos dentro do epitélio germinativo foi determinada pelo seu posicionamento sobre a membrana basal deste epitélio, facilmente identificada pela microscopia eletrônica de transmissão (Figs. 12A-B). Em determinadas áreas do epitélio germinativo, esses ninhos eram envolvidos pela membrana basal e passaram para dentro das lamelas ovulígeras. Ultraestruturalmente confirmou-se que a membrana basal recobria o ninho de ovogônias separando-o das células somáticas de revestimento (Figs. 12A e 13A-B).

5.4.2. Ultraestrutura do epitélio germinativo em maturação inicial

Neste período, as células somáticas do epitélio germinativo apresentavam-se polimórficas, variando de aspecto cilíndrico a cúbico com seus respectivos núcleos acompanhando a morfologia celular (Fig. 14A). Sobre a superfície apical da membrana

celular das células de revestimento, observou-se escasso glicocálix, quando comparado ao repouso gonadal. A região ápico-lateral destas células possuíam junções intercelulares visivelmente maiores em número e tamanho quando comparadas com aquelas do período de repouso (Fig. 14B). Enquanto os complexos de Golgi foram de difícil localização, o retículo endoplasmático foi mais facilmente evidenciado. O núcleo neste grupo apresentava-se oval e com endentações contendo nucléolos com morfologia de difícil distinção entre as porções, fibrilar e granular.

Neste período, foi possível observar grande número de espermatozóides tanto no lúmen, como em íntima relação com as células somáticas (Figs. 14A-B). Os espermatozóides estavam ligados mais profundamente ao epitélio germinativo causando depressões na membrana celular (Fig. 14A). No citoplasma das células de revestimento, foi possível observar filamentos intermediários com disposição aleatória (Fig. 14B) e associados aos espermatozóides que estavam encaixados no epitélio germinativo. Os espermatozóides foram vistos dispostos paralelamente formando feixes que se encaixam profundamente entre as células epiteliais (Figs. 15A-B). Estes feixes de espermatozóides não mostraram junções intercelulares com as células epiteliais. Aparentemente, as junções celulares da porção ápico/lateral das células epiteliais foram empurradas para baixo dando espaço para o feixe de espermatozóides (Figs. 15C-D). Dentro deste espaço, entre as células epiteliais e os espermatozóides, registrou-se substância elétron-densa de aspecto granuloso (Figs.15C-D). Os complexos juncionais que, nesta situação foram deslocados mais profundamente para a região basal, apresentavam-se nitidamente bem desenvolvidos. Em alguns locais foram encontradas sequências de vários desmossomos enfileirados num mesmo contato entre duas células (Fig. 15D). Ovogônias não foram encontradas no material preparado para avaliação ultraestrutural deste período reprodutivo.

5.4.3. Ultraestrutura do epitélio germinativo em maturação avançada

Em fevereiro, cujos ovários encontravam-se em maturação avançada, as células somáticas apresentavam-se de forma muito variada. A superfície apical destas células apresentou-se pobre em glicocálix. Elas possuíam junções intercelulares ápico-laterais menos desenvolvidas que no período de maturação inicial (Fig. 16A). Uma das principais características ultraestruturais encontradas neste período foi a presença de grande quantidade de vesículas envoltas por membrana quando comparado aos outros períodos analisados. Estas vesículas apresentavam tamanho variado e seu conteúdo era heterogêneo com algumas completamente elétron-densas enquanto outras elétron-lúcidas (Fig. 16B).

As mitocôndrias neste período eram principalmente alongadas, mais elétron-densas e possuíam um maior número de cristas que nos outros períodos reprodutivos investigados. Elas foram encontradas em maior número na superfície apical das células epiteliais (Fig. 16B). Neste grupo, o complexo de Golgi localizava-se predominantemente no pólo apical. O reticulo endoplasmático e os filamentos intermediários foram evidentes, apresentando as características observadas nos grupos anteriores. O núcleo destas células possuía profundas endentações e estava localizado no pólo basal (Fig. 16A). Em sua maioria, não apresentavam nucléolo visível. A cromatina apresentava-se descompactada, e era uniformemente distribuída no nucleoplasma. Era possível observar heterocromatina associada à lâmina nuclear. Também neste período não foram encontradas, nos estudos ultraestruturais, ovogônias sobre a lâmina basal.

5.5. Epitélio germinativo sob microscopia eletrônica de varredura

Sob microscopia eletrônica de varredura, foram avaliados apenas os cangatis em maturação avançada. As criptas ovarianas possuíam grande número de espermatozóides que se apresentavam fixos ao epitélio ou livres no lúmen (Figs. 17A-B). Adjacente ao lúmen foi possível observar o epitélio germinativo com vários espermatozóides aderidos, e sua interface com o ovócito (Figs. 17B-D). Os espermatozóides apresentavam núcleo alongado e cauda fina sem peça intermediária evidente (Figs. 17C-D). Eles se encontravam isolados ou agrupados formando espermatozeugmas que se encontravam encaixados no epitélio germinativo (Figs. 17E-F).

6. Discussão

Nossos estudos mostraram diversas peculiaridades do ovário do cangati em diferentes períodos do ano. Dentre elas, a intrínseca relação entre espermatozóides e o epitélio germinativo e as interações celulares que promovem e mantém os espermatozóides dentro do ovário por longo período.

São poucas as espécies de peixes que apresentam inseminação interna, sendo que na ordem Siluriforme a família Auchenipteridae, escolhida por nós para este estudo, é a única que possui inseminação interna (Ferraris Jr, 2003). Além disto, a presença de espermatozóides no lúmen ovariano foi detectada em apenas 10% das espécies dessa família. Espermatozóides foram histologicamente encontrados em *Trachelyopterus striatulus* (=*Trachycorystes striatulus*) (Ihering, 1937); *Ageneiosus inermis* (= *A. brevifilis*), *Auchenipterus nuchalis, Tatia brunnea*, *Pseudauchenipterus nodusus* (Loir *et al.,* 1989) e *Trachelyopterus galeatus* (= *Parauchenipterus galeatus*) (Chacon & Mendes Filho, 1971; Loir *et al.,*1989; Meisner *et al.,* 2000; Parreira *et al*., 2009). Estudos desenvolvidos recentemente mostraram que os espermatozóides armazenados no lúmen do ovário do cangati *T. galeatus* interagem com o epitélio germinativo que o reveste (Parreira *et al*., 2009). No entanto, essas interações foram avaliadas exclusivamente no período reprodutivo.

No presente trabalho, verificamos que estes espermatozóides foram encontrados aderidos ao epitélio germinativo ou livres no lúmen ovariano durante quase todo o ciclo reprodutivo. No período de repouso gonadal verificamos que algumas fêmeas apresentavam ovários com características de repouso reprodutivo, sem a presença de espermatozóides no lume. No entanto, os ovários de outras fêmeas capturadas na mesma época se apresentavam mais desenvolvidos, sendo mais pesados, com epitélio germinativo prismático e com espermatozóides no lúmen ovariano. Este achado indica uma relação morfofuncional entre a presença de espermatozóides no lúmen ovariano e o início do processo reprodutivo.

No grupo de peixes analisados no período de maturação inicial observamos que os ovários do cangati apresentavam-se em início do período reprodutivo, exibindo espermatozóides mergulhados no epitélio germinativo. Ao contrário, quando em maturação avançada, próximo à ovulação, os espermatozóides foram encontrados predominantemente livres no lúmen ovariano.

Estes achados sugerem uma relação morfofuncional mais direta entre as células epiteliais de revestimento das lamelas ovulígeras com os espermatozóides nos meses que antecedem a ovulação. Esta maior interação entre espermatozóides e epitélio lamelar pode estar relacionada com a manutenção destes espermatozóides

viáveis no ovário por longo período de tempo. De fato, nossos estudos ultra-estruturais mostraram depressões profundas nas células epiteliais que continham material secretado. A grande quantidade de vesículas citoplasmáticas e de complexo de Golgi desenvolvido nessas células demonstram sua capacidade secretora. Tais condições são similares às reportadas em *Sygnathus scovelli* (Begovac & Wallace, 1987) e *Alcichtys alcicornis* (Koya *et al*., 1995). Esses autores observaram que, nas espécies alvo de seus estudos, o epitélio participava da secreção de material de origem glicoprotéica que enchia toda a cavidade ovariana durante o período de desova. Essas células epiteliais possuíam todas as características morfológicas de células secretórias, apresentando núcleo basal e citoplasma contendo retículo endoplasmático desenvolvido, ribossomos, vesículas e grânulos citoplasmáticos.

É possível que as células epiteliais que revestem as lamelas ovulígeras exerçam funções semelhantes às das células epiteliais de revestimento dos ductos testiculares. Isto é, possam atuar na nutrição e produção de fatores para manutenção da viabilidade dos espermatozóides por longo período de tempo.

Tal como já demonstrado em mamíferos (Zeh & Zeh, 2001), sabe-se que também em peixes (Hogarth & Sursham, 1972) os espermatozóides são antigênicos para o organismo por expressarem o complexo de histocompatibilidade e que podem ser reconhecidos pelo sistema imune da fêmea. No entanto, devido ao fato de não haver ativação do sistema imune, Hogrth & Sursham (1972) acreditam que o aparelho reprodutor feminino de peixes possui adaptações estruturais e bioquímicas que privilegiam a sobrevida do sêmen estocado no ovário. Nos vertebrados, existem diversas regiões do corpo que possuem status de áreas imunologicamente privilegiadas. Essas regiões permitem a sobrevida de enxertos sem desenvolverem resposta imune. Exemplos destas áreas protegidas incluem os olhos (Fawcett, 1994), o cérebro, e os testículos (Beer & Billingham, 1976).

Uma característica morfológica do epitélio lamelar foi a presença de complexos juncionais mais desenvolvidos justamente nos períodos em que os ovários se encontravam no início do período reprodutivo, ocasião em que os espermatozóides estavam profundamente encaixados no epitélio germinativo. Nesse período, as células epiteliais apresentavam-se unidas por complexos juncionais longos que, além de formarem uma barreira física, possivelmente formavam uma barreira imunológica. Esta também seria uma função semelhante àquela conferida às células de Sertoli que possuem junções celulares que protegem o animal dos efeitos imunes que as células haplóides podem causar no organismo do próprio animal (França e Chiarini-Garcia, 2005). Muñoz (2000), Koya *et al*. (1997) e Vila *et al*. (2007) relatam que durante a época de desova, as células epiteliais apresentavam diversas especializações de

membrana como, zônulas de oclusão, desmossomos. No entanto, no período pós-desova, as junções celulares apresentavam-se escassas com células polimorfonucleares localizadas abaixo das células epiteliais. Esses autores relatam que, durante o período pós-desova, com a diminuição das junções celulares entre as células epiteliais, os espermatozóides são degradados por células do sistema imune que migram para esse epitélio.

Espermatozeugmas são encontrados em diversos gêneros de teleósteos, tais como *Lophiobrycon, Glandulocauda*, e *Mimagoniates,* (Pecio & Rafinski, 1994, 1999; Burns *et al*., 1995), *Scopaeocharax, Tyttocharax* e *Xenurobrycon* (Burns *et al*., 1995; Pecio *et al*., 2005) e em quatro espécies da família Auchenipteridae (Loir *et al*., 1989; Meisner *et al*., 2000; Burns *et al.,* 2002, 2009; Mazzoldi *et al.,* 2007), inclusive no cangati *Trachelyopterus galeatus* (Parreira *et al*., 2009). O fato de os espermatozóides se encontrarem predominantemente livres no lume ovariano durante o período reprodutivo sugere que a sua liberação do epitélio germinativo possa estar relacionada com o período da ovulação, quando eles então estariam disponíveis para a fertilização.

Várias hipóteses têm sido levantadas para explicar as interações entre espermatozóides e o epitélio germinativo ovariano. Segundo Zeh & Zeh (2001), o epitélio germinativo ovariano poderia selecionar os espermatozóides mais viáveis que então se fixariam a ele, permitindo sua sobrevida no trato genital feminino e ainda eliminaria os riscos associados à incompatibilidade imunológica. A fêmea esperaria a melhor época para fertilizar seus ovos com aqueles espermatozóides que foram previamente selecionados, evitando assim as incertezas do meio ambiente (Pizzari & Birkhead, 2002). A possibilidade de inseminação da fêmea por vários machos seria biologicamente interessante, pois aumentaria a competição entre os espermatozóides que se fixariam no epitélio germinativo do ovário, selecionando assim os mais bem adaptados (Watson, 1991, 1998). Todavia, o tampão genital (Chacon & Mendes Filho, 1972), inserido provavelmente por um macho durante a cópula, impediria inseminações subseqüentes.

As membranas plasmáticas das células epiteliais podem possuir em sua superfície uma camada de carboidratos, com cerca de 10 a 20 nm de espessura, conhecida como cobertura celular ou glicocálix, que é de grande importância biológica. Uma das funções mais importantes deste glicocálix seria a do reconhecimento molecular permitindo a comunicação intercelular (Santos & Carvalho, 2007). Observamos que o glicocálix, presente na superfície do epitélio germinativo, possui espessura variável durante o ciclo reprodutivo. Nos ovários em repouso, e sem a presença de espermatozóides no lúmen ovariano, o glicocálix apresentou-se mais

espesso que nos outros períodos avaliados. A presença de um glicocálix mais espesso neste período pode estar relacionado com a receptividade desse epitélio aos espermatozóides que ainda serão introduzidos no lúmen ovariano, facilitando seu reconhecimento e permitindo a interação entre estes dois tipos celulares.

Quando avaliamos as ovogônias desta espécie, só conseguimos fazê-lo durante o período de maio, quando os ovários apresentavam-se menos pesados que nos outros períodos avaliados; com suas lamelas mais delgadas permitindo a visualização do lúmen mais facilmente. Quanto aos meses de setembro e fevereiro apresentavam os maiores valores relacionados ao peso das gônadas, com lamelas completamente preenchidas por ovócitos maduros dificultando assim a visualização das ovogônias. Observamos que o epitélio germinativo em repouso, continha grupos de células somáticas e germinativas que eram envolvidas por células pré-foliculares formando ninhos celulares que sob estímulo adequado dariam origem aos folículos ovarianos. Nos outros períodos foram raros os ninhos de ovogônias, mas estavam presentes como estoque de células-tronco, que seriam responsáveis pelo desenvolvimento dos ovários nos próximos períodos reprodutivos.

São vários os elementos que caracterizam um epitélio e, dentre eles, a presença de uma membrana basal no qual as células estão apoiadas (Grier, 2002). Através de avaliação ultra-estrutural e da identificação histoquímica da membrana basal, verificamos que, além das células epiteliais somáticas, ovogônias também estão presentes nesse epitélio de revestimento do cangati. Grier (2000) já havia descrito detalhes sobre este epitélio em outra espécie de teleósteo. Considerando a presença desses dois tipos celulares, este epitélio então é chamado de epitélio germinativo.

Estes achados, em conjunto, demonstram que os espermatozóides ficam armazenados livres ou aderidos ao epitélio germinativo do ovário de cangati durante parte do ano e que as interações entre os espermatozóides e esse epitélio sofrem modificações morfofuncionais dependendo da fase do ciclo reprodutivo.

7. Conclusões

As ponderações, em conjunto, dos vários parâmetros estudados, permitiram-nos chegar às seguintes conclusões:

1. Os espermatozóides estão presentes no lúmen ovariano durante praticamente todo o ciclo reprodutivo, de repouso gônada à maturação avançada, aguardando as condições adequadas para fertilização dos ovócitos;

2. O epitélio que recobre as lamelas ovulígeras é firmemente unido por junções intercelulares que impedem o contato dos espermatozóides com o organismo da fêmea e vice-versa;

3. A interação entre o espermatozóide e o epitélio germinativo parece ser inicialmente mediada por um glicocálix, que está mais espesso no período em que as fêmeas são inseminadas.

4. Os espermatozóides se relacionam de forma diferente com o epitélio germinativo nas várias fases do ciclo reprodutivo que foram avaliadas, encaixados profundamente no epitélio no período de maturação inicial e mais superficialmente durante o repouso gonadal e maturação avançada.

5. Durante o período de maturação inicial os espermatozóides livres no lúmen ovariano encontravam-se principalmente em feixes formando espermatozeugmas enquanto na maturação avançada, e próxima da ovulação, encontravam-se principalmente na forma livre.

8. Ilustrações

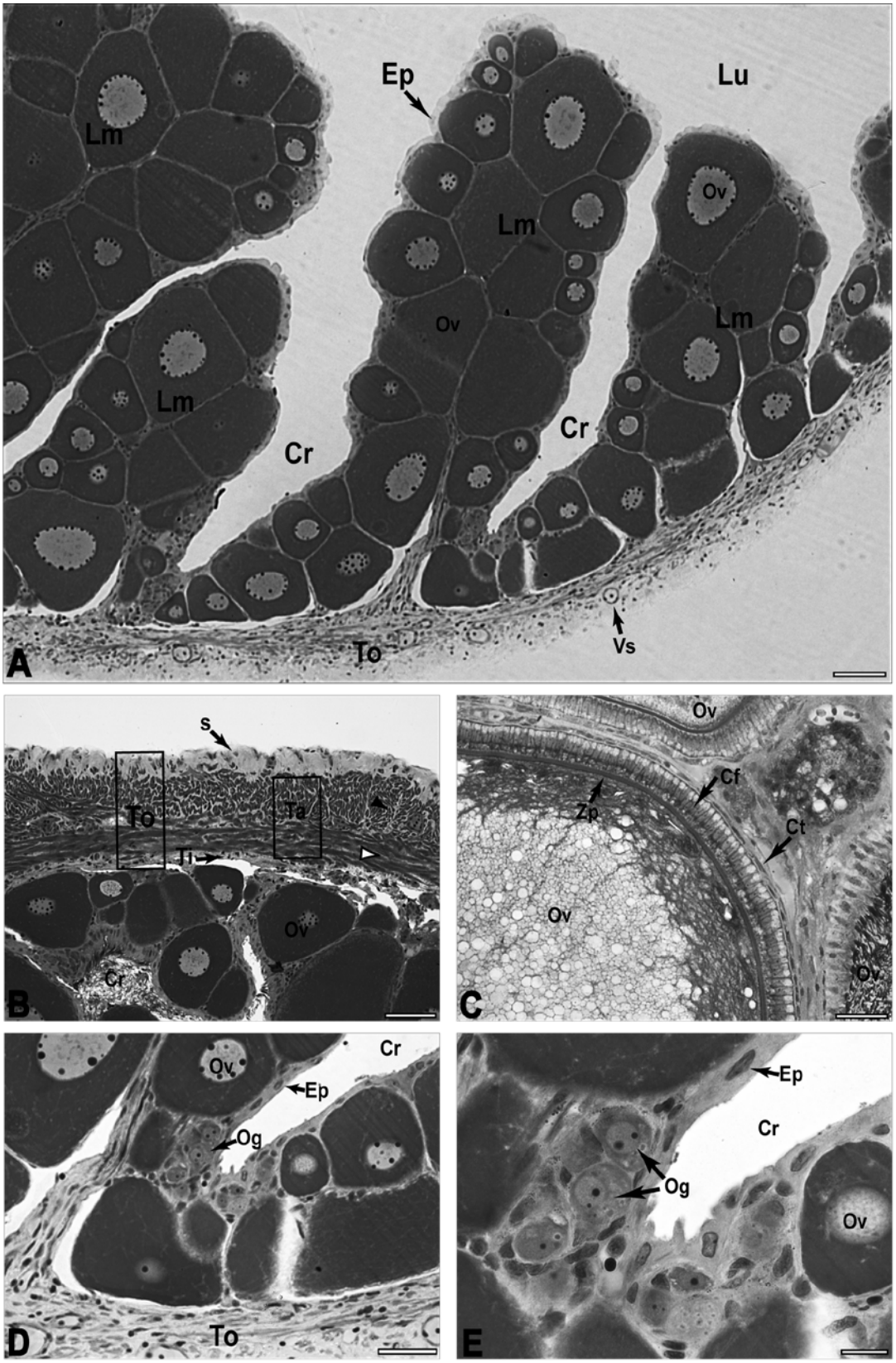

Figura 2. Fotomicrografias de corte transversal do ovário da espécie *Trachelyopterus galeatus*. Em A, pode ser visto: lúmen (Lu), lamelas ovulígeras (Lm), criptas (Cr), ovócitos (Ov), epitélio (Ep), túnica ovariana (To) e vasos sanguíneos (Vs). Em B, observa-se detalhe da túnica ovariana (To), constituída por túnica serosa (S), túnica albugínea (Ta), apresentando camada muscular transversal (seta preta) e longitudinalmente (seta branca) e túnica interna (Ti); Cr, criptas; Ov, ovócitos. Em C, observsa-se folículo ovariano com seus envoltórios: zona pelúcida (Zp), células foliculares (Cf) e células tecais (Ct). Em D, vê-se o epitélio germinativo constituído de células epiteliais de revetimento somáticas (Ep) e ovogônias (Og). A fotomicrografia E é um detalhe da D. Cortes corados com azul de toluidina borato de sódio. Barras equivalentes a: A-D, 8 µm; E, 7 µm.

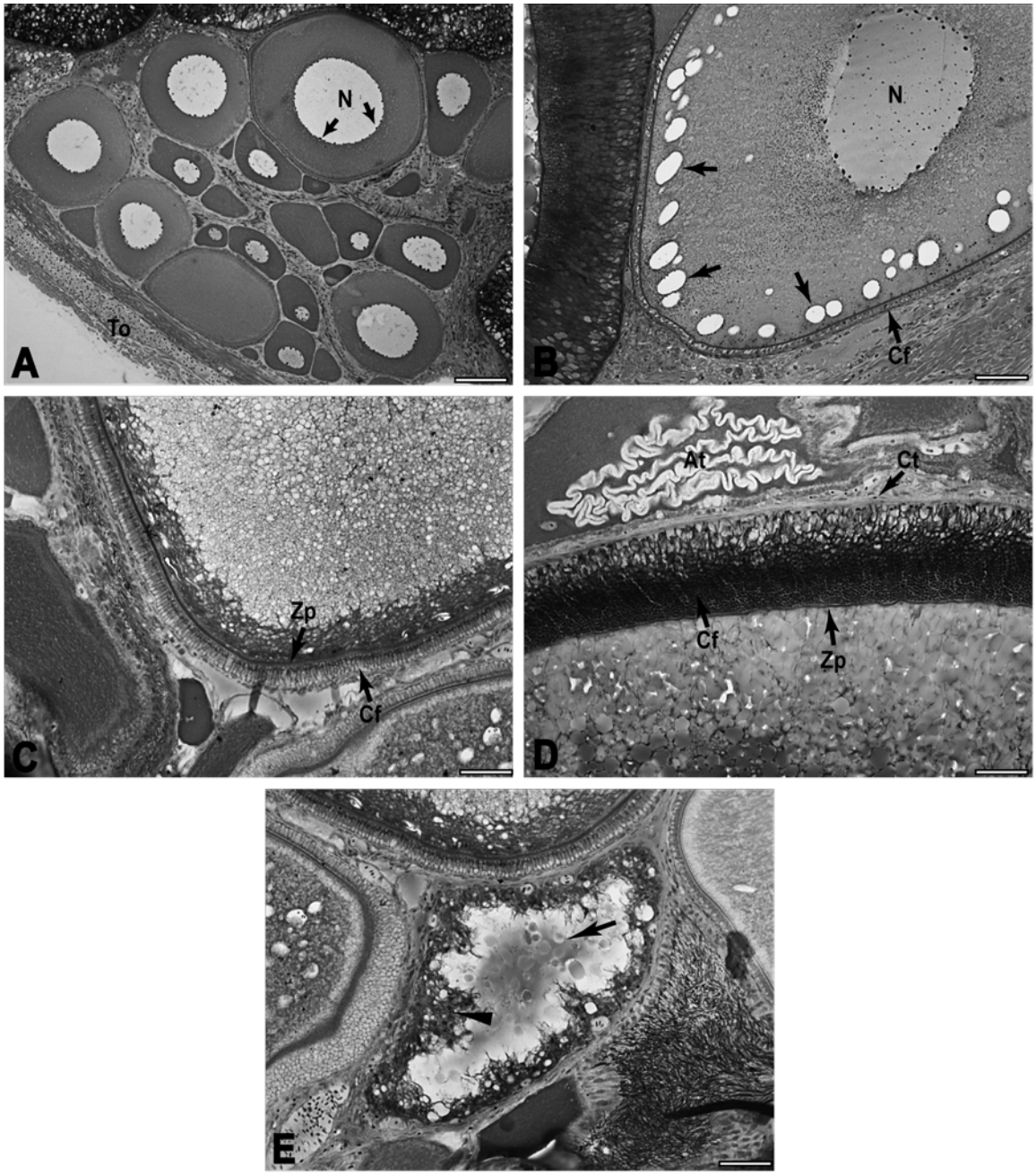

Figura 3. Fotomicrografias apresentando detalhes morfológicos de ovócitos de *T. galeatus* em diferentes fases de desenvolvimento. (A) Todos são ovócitos perinucleolares; setas pretas indicam nucléolos dispostos na superfície interna da membrana do núcleo (N) de um ovócito perinucleolar mais desenvolvido; To, túnica ovariana. (B) Ovócito alvéolos-corticais; setas pretas apontam para vesículas claras localizadas na região cortical do citoplasma do ovócito denominadas de vesículas alvéolos-corticais; camada de células foliculares (Cf) é evidente. (C) Ovócito vitelogênico com zona pelúcida (Zp), células foliculares (Cf) e células tecais (Ct) mais evidentes. At, folículo atrésico em fase avançada de regressão. (D) Ovócito pós-vitelogênico apresentando camada de células foliculares (Cf) espessa. (E) Ovócito atrésico; apresentando grânulos de vitelo em fusão com aspecto de desintegração (seta preta) e degradação dos envoltórios do ovócito (ponta de seta preta). Coloração com azul de toluidina borato de sódio. Barras equivalentes a: A-E, 7 µm.

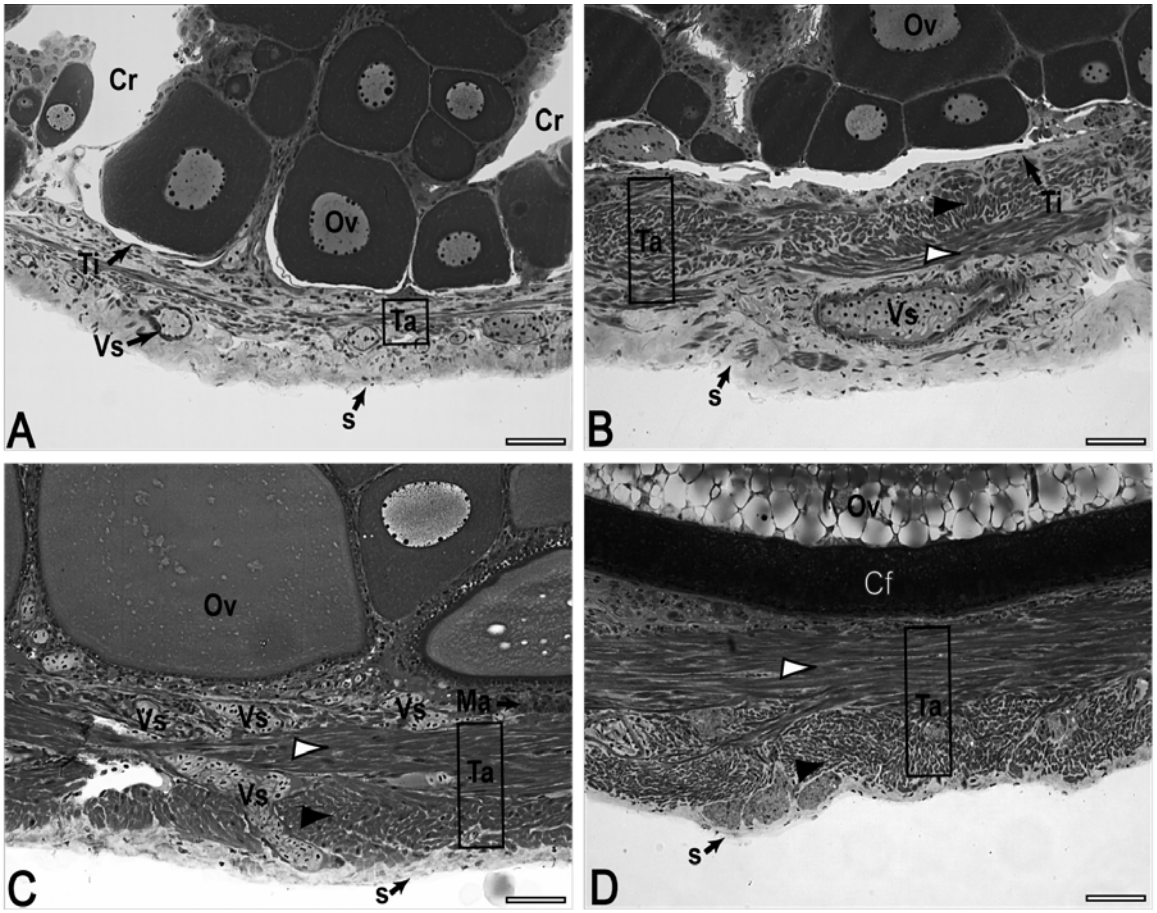

Figura 4. Fotomicrografias mostrando detalhes morfológicos da túnica ovariana de *T. galeatus* nos meses de maio (A, repouso inicial e B, repouso avançado), setembro (C, reprodução inicial) e fevereiro (D, reprodução avançada/regressão). S, túnica serosa; Ta, túnica albugínea e Ti, túnica interna; As cabeças-de-seta branca mostram a camada muscular circular da túnica albugínea enquanto as cabeças-de-seta pretas mostram a camada muscular longitudinal. Cr, criptas; Ov, ovócitos; Vs, vasos sanguíneos; Cf, camada folicular. No período de repouso inicial (A) as camadas musculares da túnica albugínea são menos desenvolvidas. A túnica interna é de difícil visualização no período de reprodução (C e D). Coloração com azul de toluidina borato de sódio. Barras equivalentes a: A-D, 7 µm.

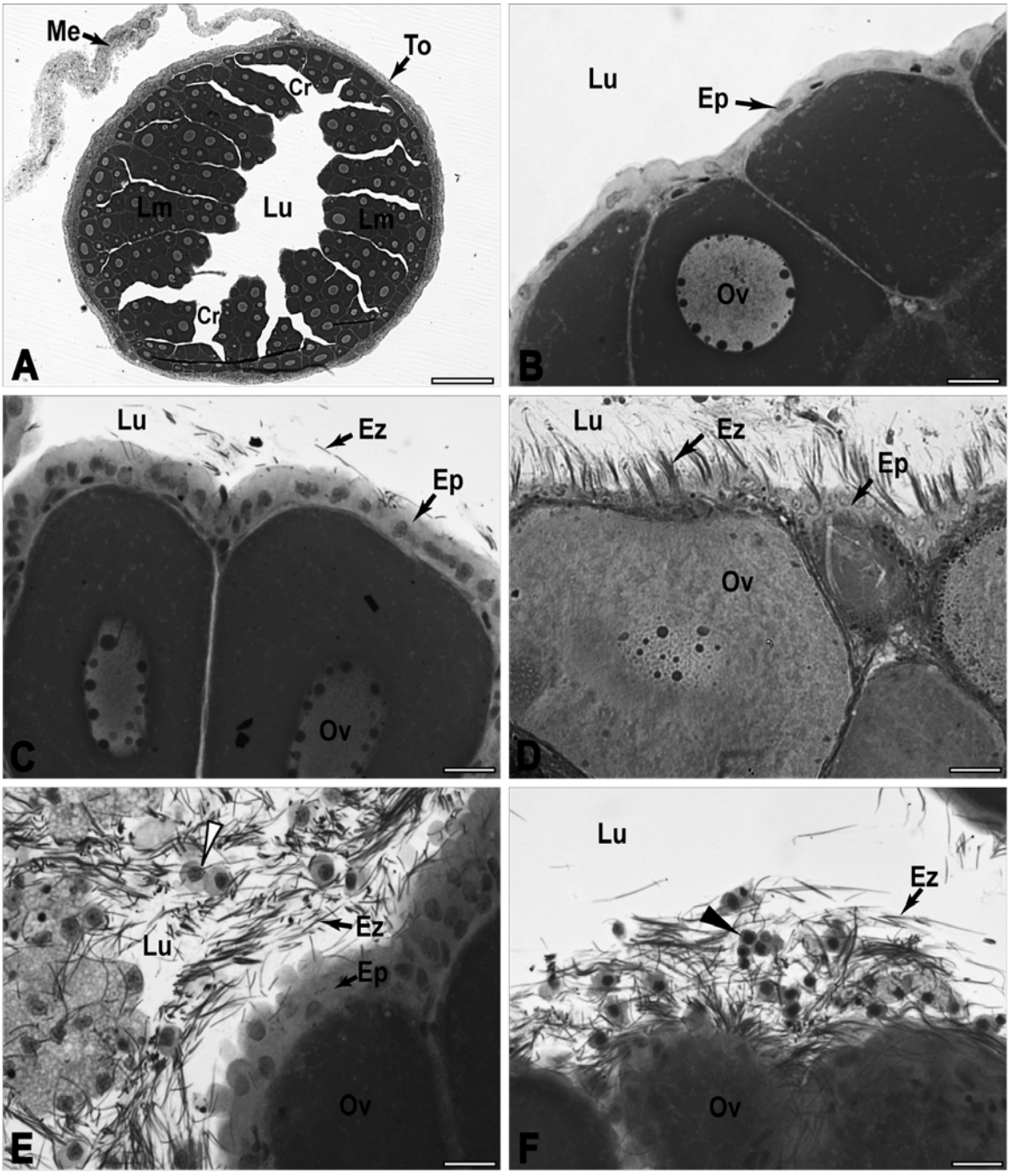

Figura 5. Fotomicrografias mostrando detalhes morfológicos do ovário de *T. galeatus* no período de repouso gonadal quando foram encontradas fêmeas em repouso inicial (A-B) e em repouso avançado (C-F). Em A, vista panorâmica de corte transversal de ovário em repouso mostrando as lamelas ovulígeras (Lm), as criptas (Cr), a túnica ovariana (To), o mesovário (Me) e um lúmen (Lu) evidente. Fotomicrografias B e C comparam a altura do epitélio de revestimento (Ep) de fêmeas em repouso inicial (B) com a de repouso avançado (C). No repouso avançado foram vistos espermatozóides (Ez) aderidos ao epitélio (D) e livres no lúmen ovariano (C, E-F). Junto com os espermatozóides foram encontradas células livres no lúmen ovariano que se assemelhavam com espermatócitos (cabeça-de-seta branca) e espermátides arredongadas (cabeça-de-seta preta). Ov, ovócito. Corados com azul de toluidina borato de sódio, A-C e E-F; corado com PAS, D. Barras equivalentes a: A, 9 µm; B-F, 7 µm.

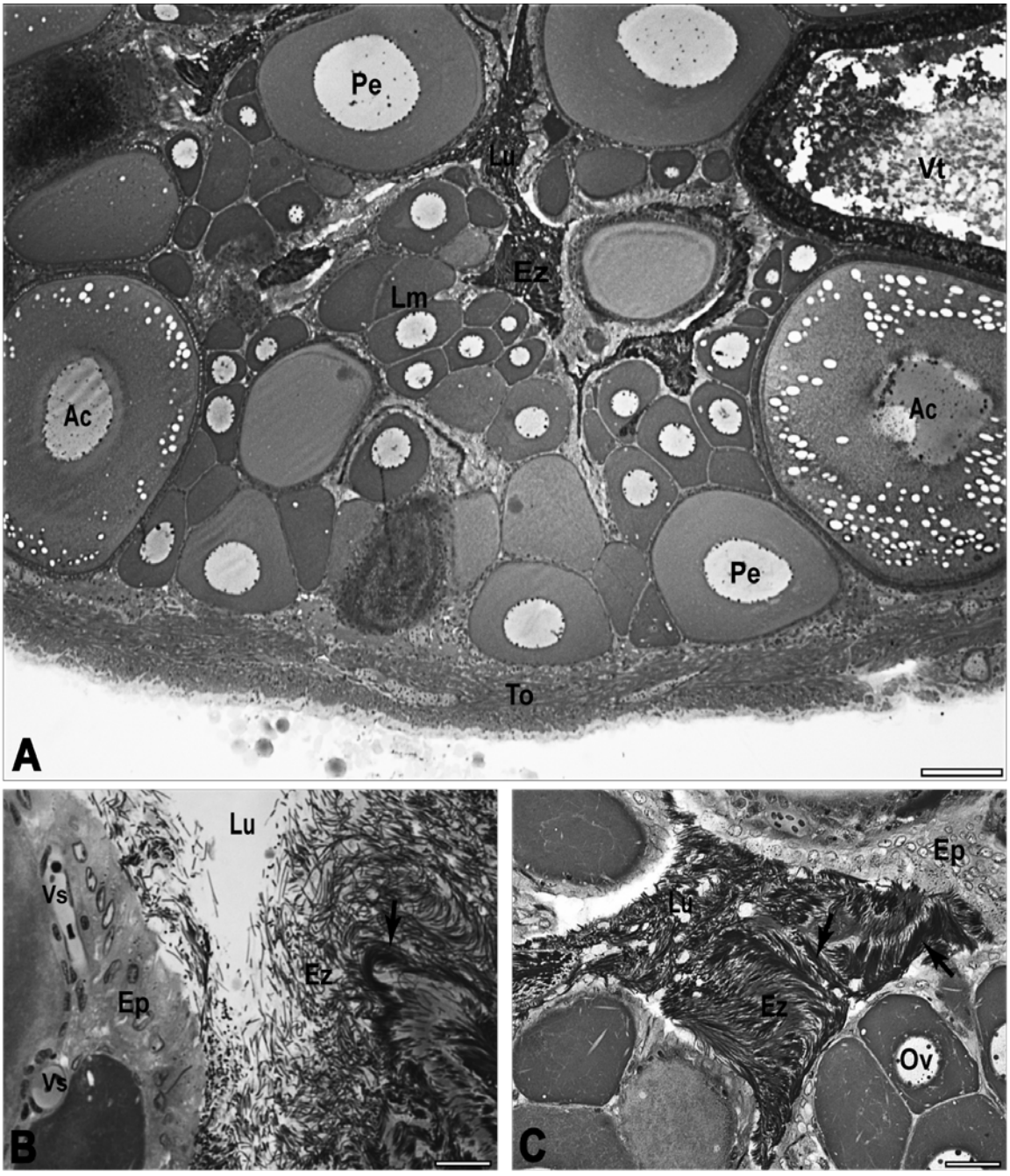

Figura 6. Em A, vista panorâmica do ovário de fêmeas capturadas em maturação inicial, quando podem ser observados ovócitos perinucleolares (Pe), alvéolos-corticais (Ac) e vitelogênicos (Vt). O epitélio de revestimento neste período foi principalmente prismático (B-C). No lúmen ovariano (Lu), espermatozóides (Ez) foram encontrados em grande quantidade (A-C) alguns livres mas principalmente agrupados em espermatozeugmas (seta). Ov, ovócitos; Vs, vaso sanguíneo. Coloração com azul de toluidina borato de sódio. Barras equivalentes a: A, 11 µm; B-C, 8 µm.

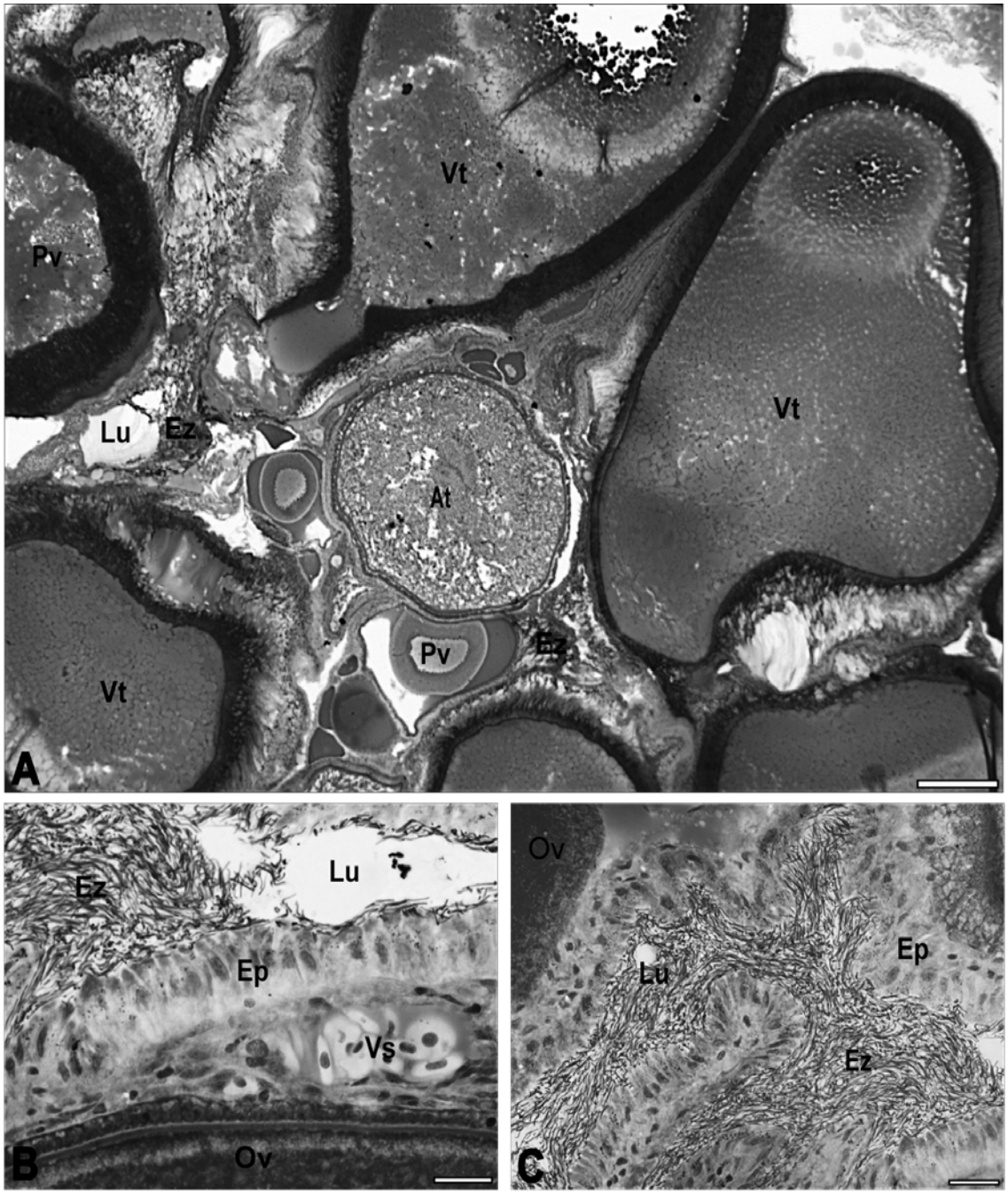

Figura 7. Fotomicrografias do ovário de fêmeas capturadas em maturação avançada. Neste período estavam presentes principalmente os ovócitos pré-vitelogênicos (Pv), vitelogênicos (Vt) e atrésicos (At). B e C mostram que o epitélio de revestimento (Ep) é prismático e que os espermatozóides (Ez) estão presentes em grande quantidade no lúmen (Lu), principalmente na forma livre. Ov, ovócitos; Vs, vaso sanguíneio. Corados com azul de toluidina borato de sódio. Barras equivalentes a: A, 11 µm; B, 8 µm; C, 7 µm.

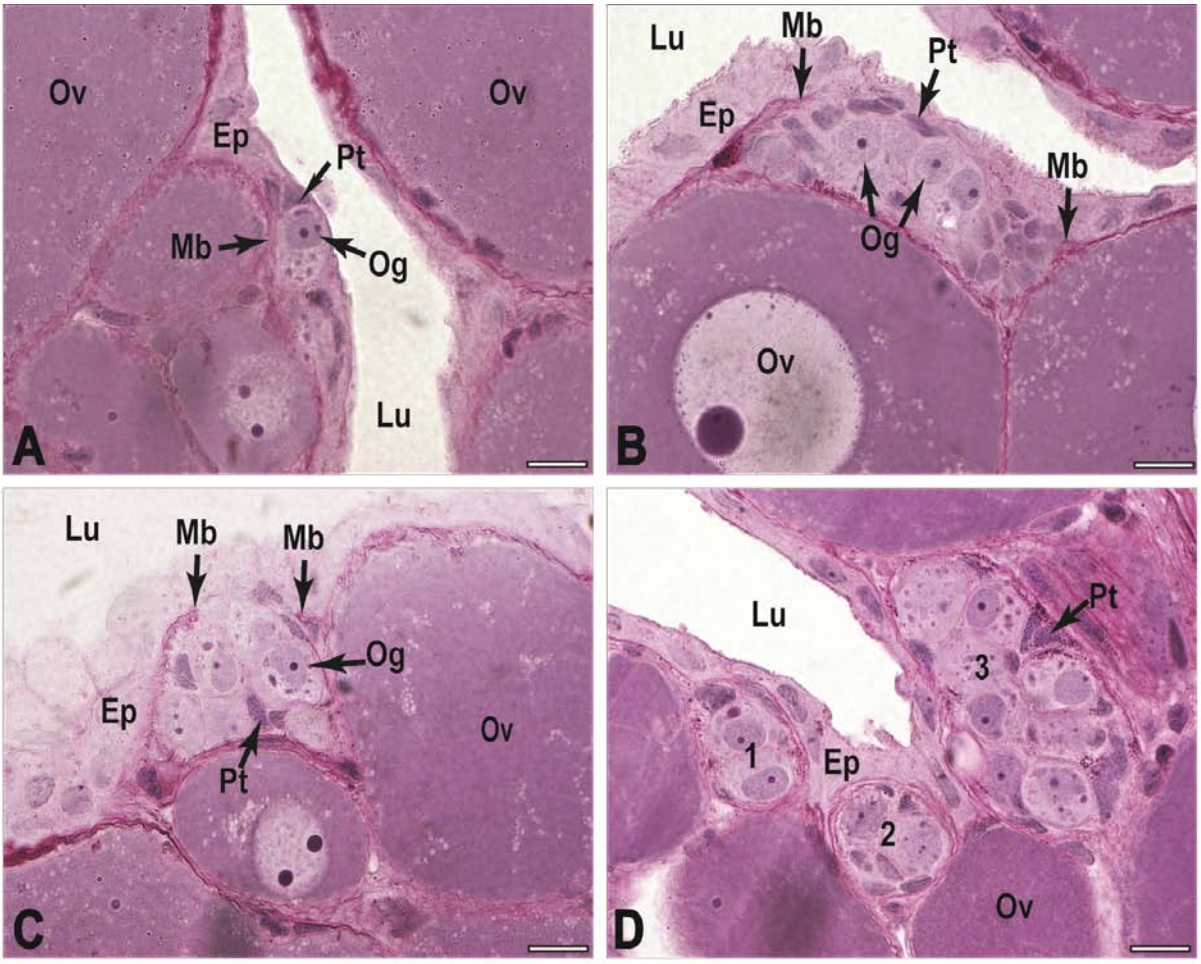

Figura 8. Fotomicrografias do epitélio germinativo de fêmeas de *T. galeatus* capturadas, quando estavam em repouso reprodutivo. As imagens de A a D mostram, progressivamente, o processo de interiorização dos ninhos de ovogônias (Og) de dentro do epitélio germinativo (Ep) para dentro da lamela ovulígera. Em A, as ovogônias estão totalmente acima da membrana basal (Mb), que pela técnica do PAS se apresenta como uma linha de cor púrpura. Em B, o processo de interiorização se inicia mostrando projeção da membrana basal que começa a envolver o ninho de ovogônias (Mb). Em C, vê-se o ninho quase que completamente envolvido pela Mb, restando apenas uma pequena abertura e em D, os ninhos (1 a 3) já estão completamente envolvidos pela Mb e isolados do epitélio germinativo. Ov, ovogônias; Pt, células somáticas pré-tecais. Coloração pelo PAS. Barras equivalentes a: A-D, 7 µm.

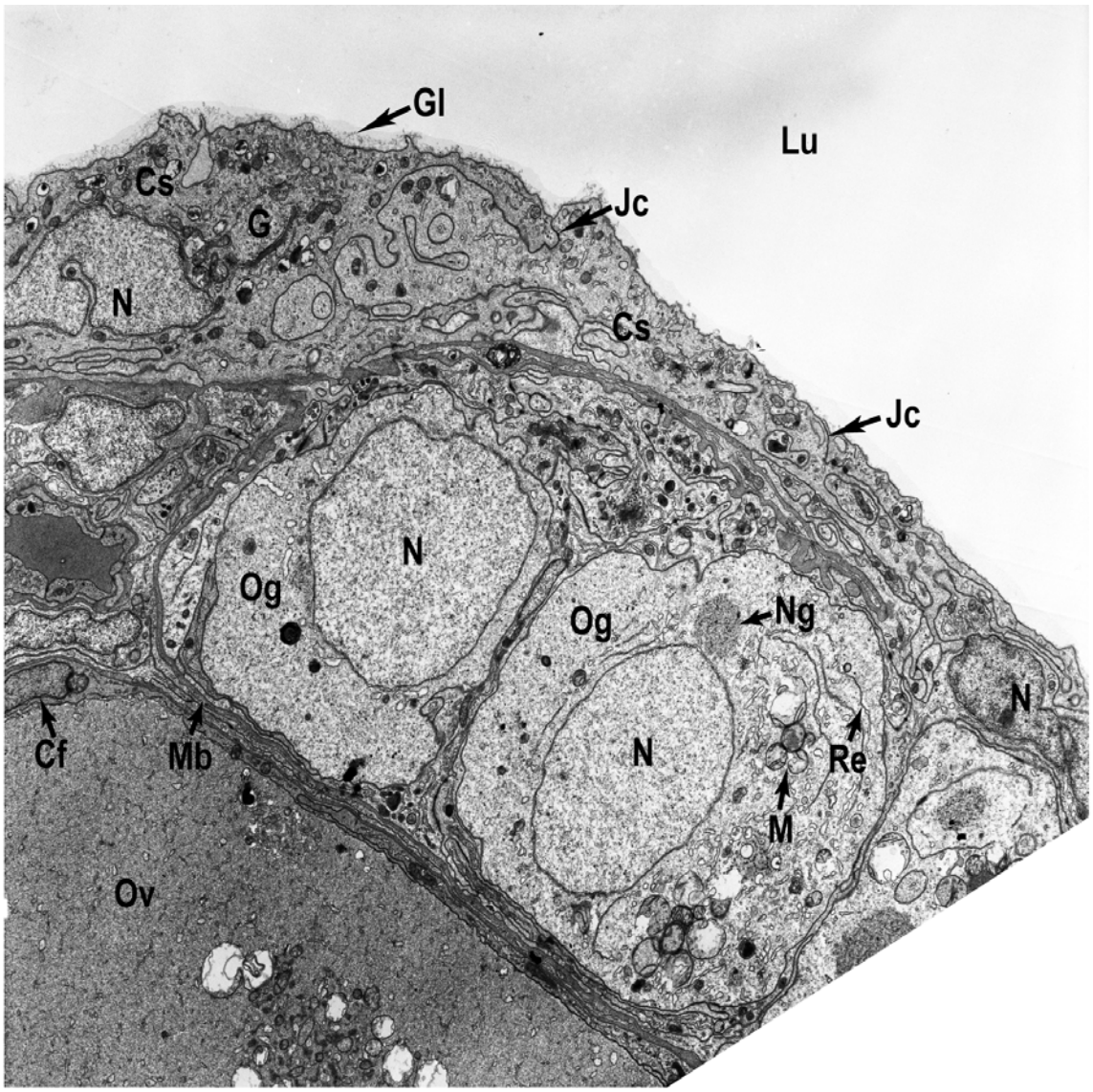

Figura 9. Eletromicrografia de transmissão do epitélio germinativo que reveste as lamelas ovulígeras do ovário do teleósteo *T. galeatus*, separado da lamela ovulígera pela membrana basal (Mb). A imagem mostra dois dos seus tipos celulares, as células somáticas de revestimento (Cs) e as ovogônias (Og) e alguns de seus componentes ao nível ultra-estrutural: núcleo (N), nuage (Ng); complexo de Golgi (G); reticulo endoplasmático (Re); mitocôndrias (M); complexos juncionais (Jc) e glicocálix (Gl). Observa-se, dentro da lamela ovulígera, a presença de ovócito (Ov) e célula folicular (Cf). Aumento: 4.400X.

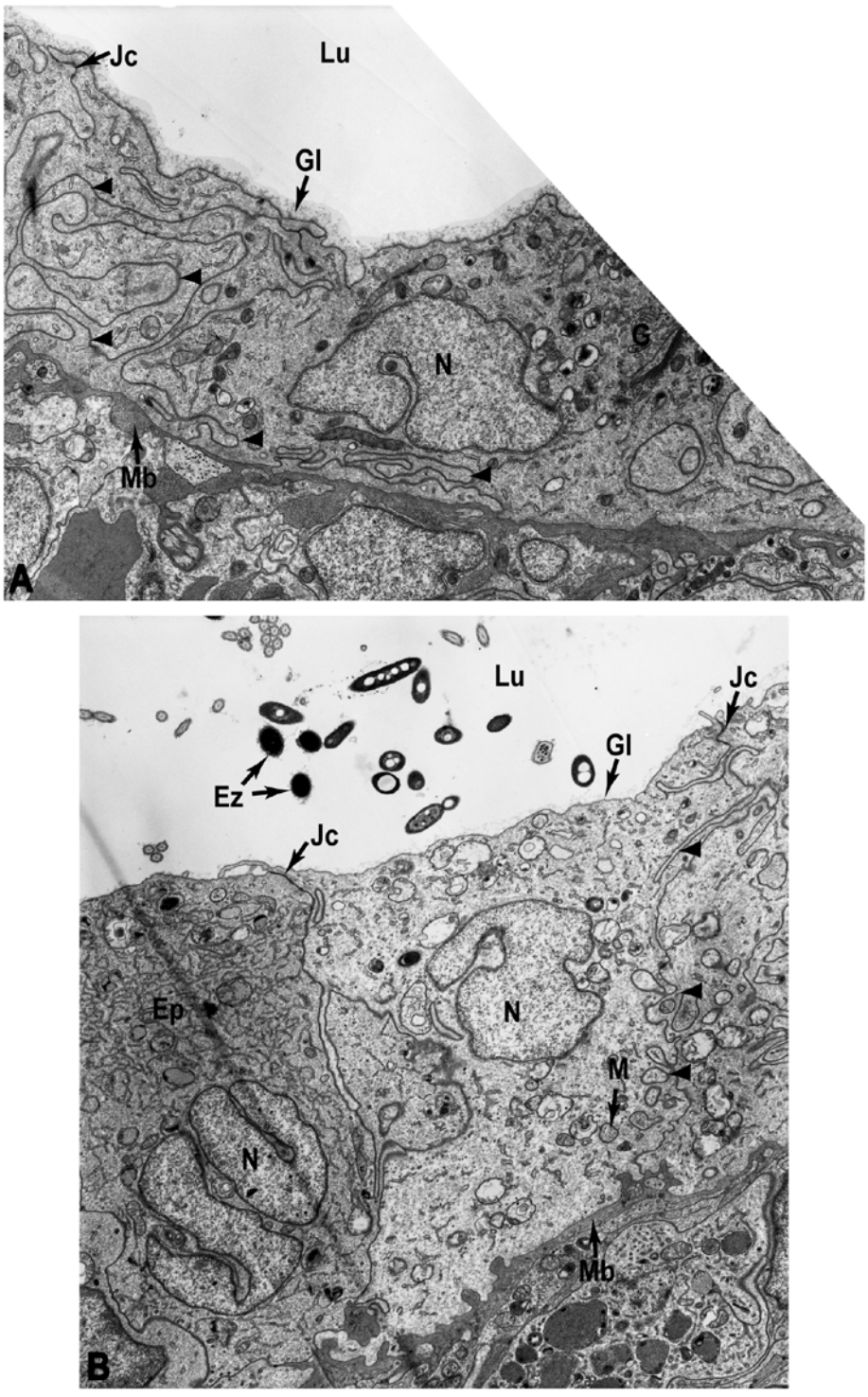

Figura 10. Eletromicrografias mostrando diferenças morfológicas das células epiteliais de revestimento do epitélio germinativo do ovário em dois diferentes grupos de *T. galeatus* avaliados no repouso inicial (A) e repouso avançado (B). As diferenças mais marcantes foram vistas na altura do epitélio, maior no período de repouso avançado, e na presença de glicocálix (Gl), mais evidente na repouso incial. Vê-se ainda: núcleo (N); complexo de Golgi (G); mitocôndria (M); junções celulares (Jc); membrana basal (Mb) e lúmen (Lu). As interdigitações entre as membranas de duas células epitteliais adjacentes são evidenciadas por cabeças-de-seta. Aumentos: A, 7.000X; B, 7.700X.

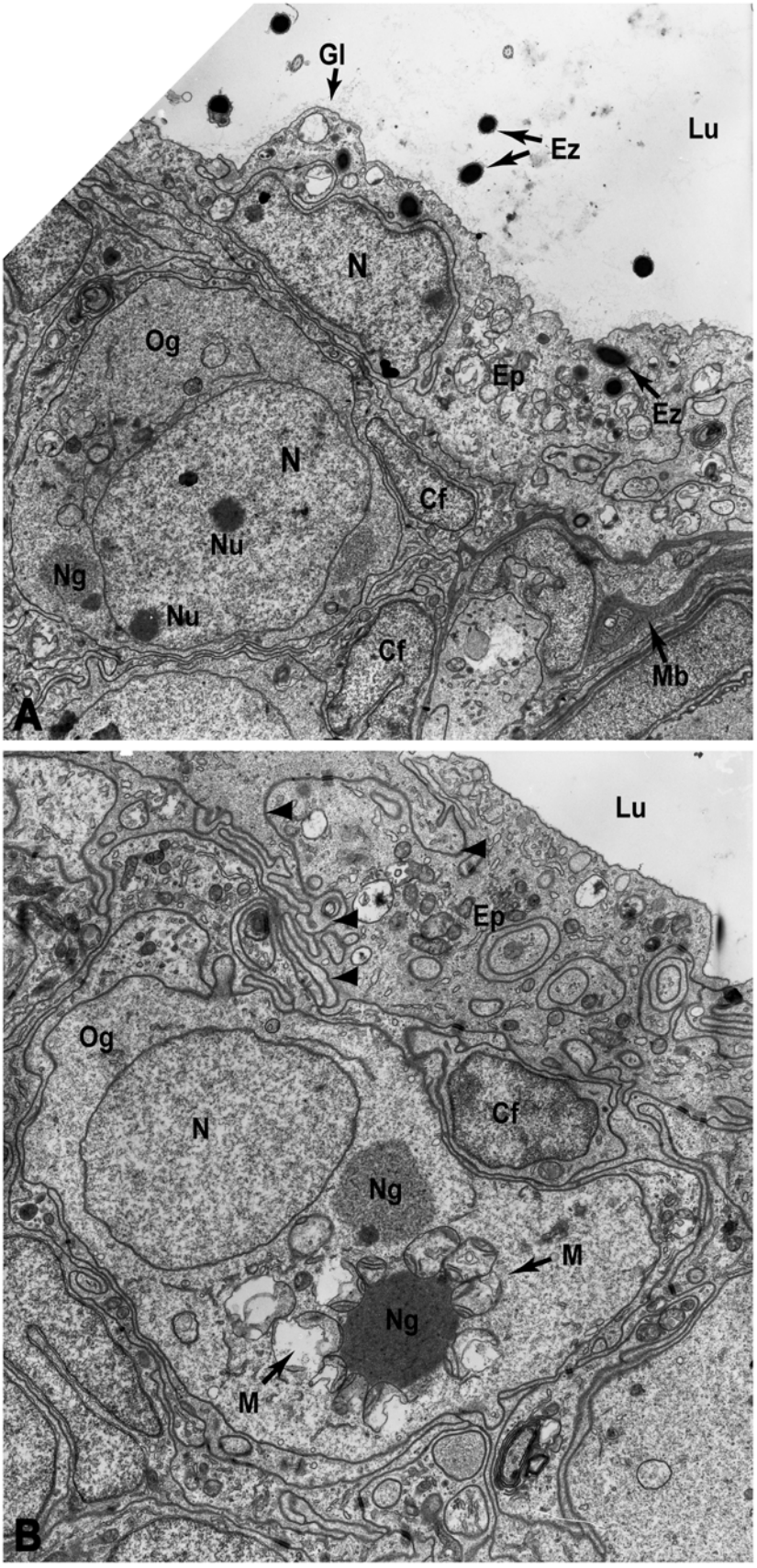

Figura 11. Eletromicrografias do epitélio germinativo que recobre as lamelas ovulígeras do ovário de *T. galeatus*, em repouso gonadal, mostrando detalhes das células epiteliais de revestimento (Ep) e das ovogônias (Og). Visualizam-se núcleo (N); nucléolo (Nu), nuage (Ng), mitocôndrias (M); membrana basal (Mb), glicocálix (Gl) e lúmen (Lu). lúmen. Também fazendo parte deste epitélio estão presentes as células foliculares (Cf). Associado à célula epitelial vê-se espermatozóides (Ez), alguns deles encaixados dentro das células epiteliais. Aumentos: A, 6.600X; B, 8.100X.

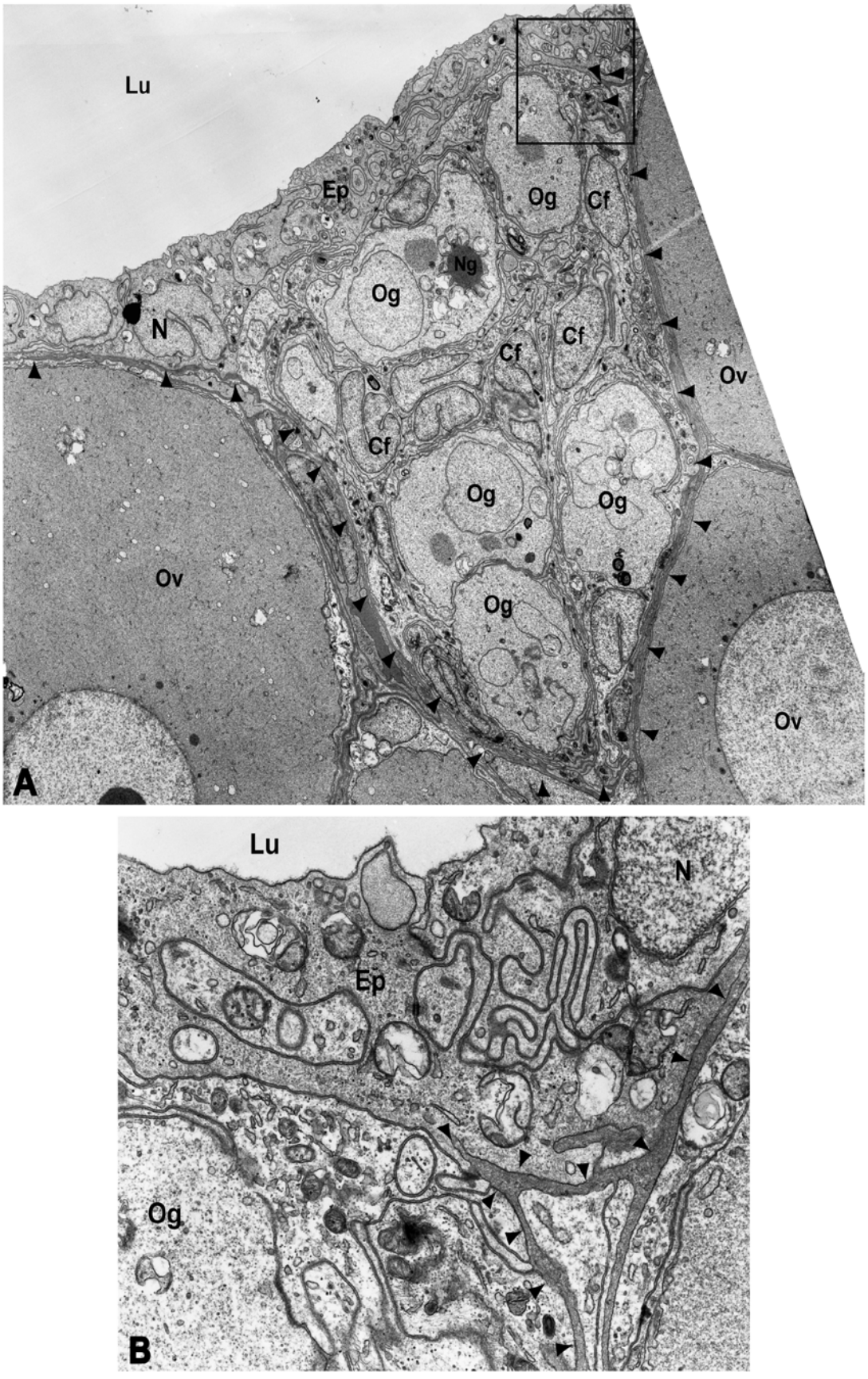

Figura 12. Eletromicrografias mostrando ninho de ovogônias no epitélio germinativo do ovário de *T. galeatus* em repouso gonadal. O ninho contém células epiteliais de revestimento (Ep), ovogônias (Og) e células foliculares (Cf). Abaixo deste ninho, e separando-o da lamela ovulígera, vê-se membrana basal, delimitada por sequência de cabeças-de-seta. A figura B é um detalhe do retângulo no quadrante superior direito da figura A. Observa-se que a membrana basal começa a se estender sobre o ninho de ovogônias. Observa-se também ovócitos (Ov) e lúmen (Lu). Aumentos: A, 6.200X; B, 15.700X.

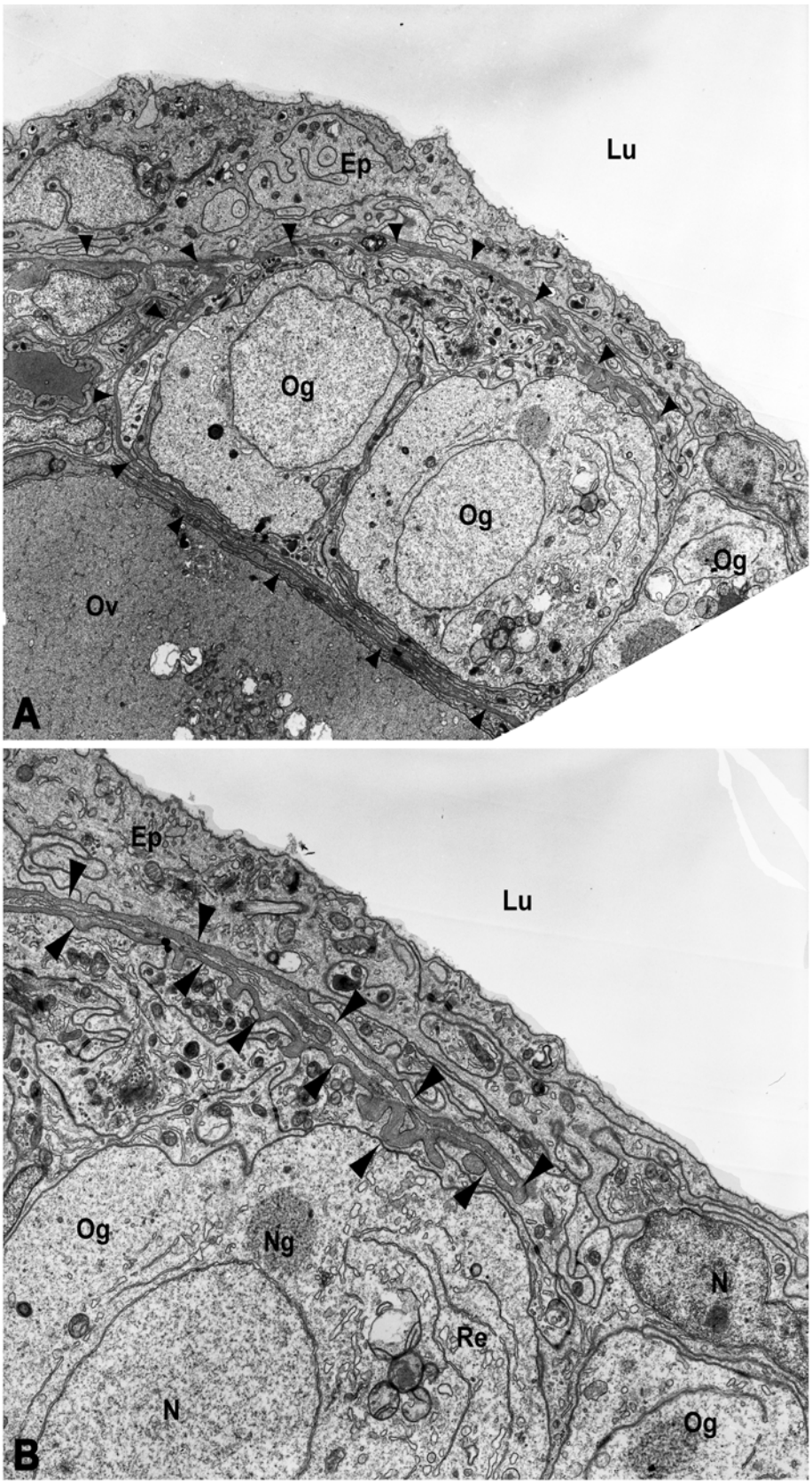

Figura 13. Eletromicrografias mostrando ninho de ovogônias (Og) no período de repouso gonadal em processo de envolvimento pela membrana basal (cabeças-de-seta), mais avançado que aquele observado na Figura 13. A Figura B é uma ampliação de parte da A e mostra com mais detalhe o percurso da Mb que está em processo de cobertura do ninho ovogônias. Observam-se também núcleo (N); nuage (Ng); retículo endoplasmático (Re) e lúmen (Lu). Aumentos: A, 3.600X; B, 5.700X.

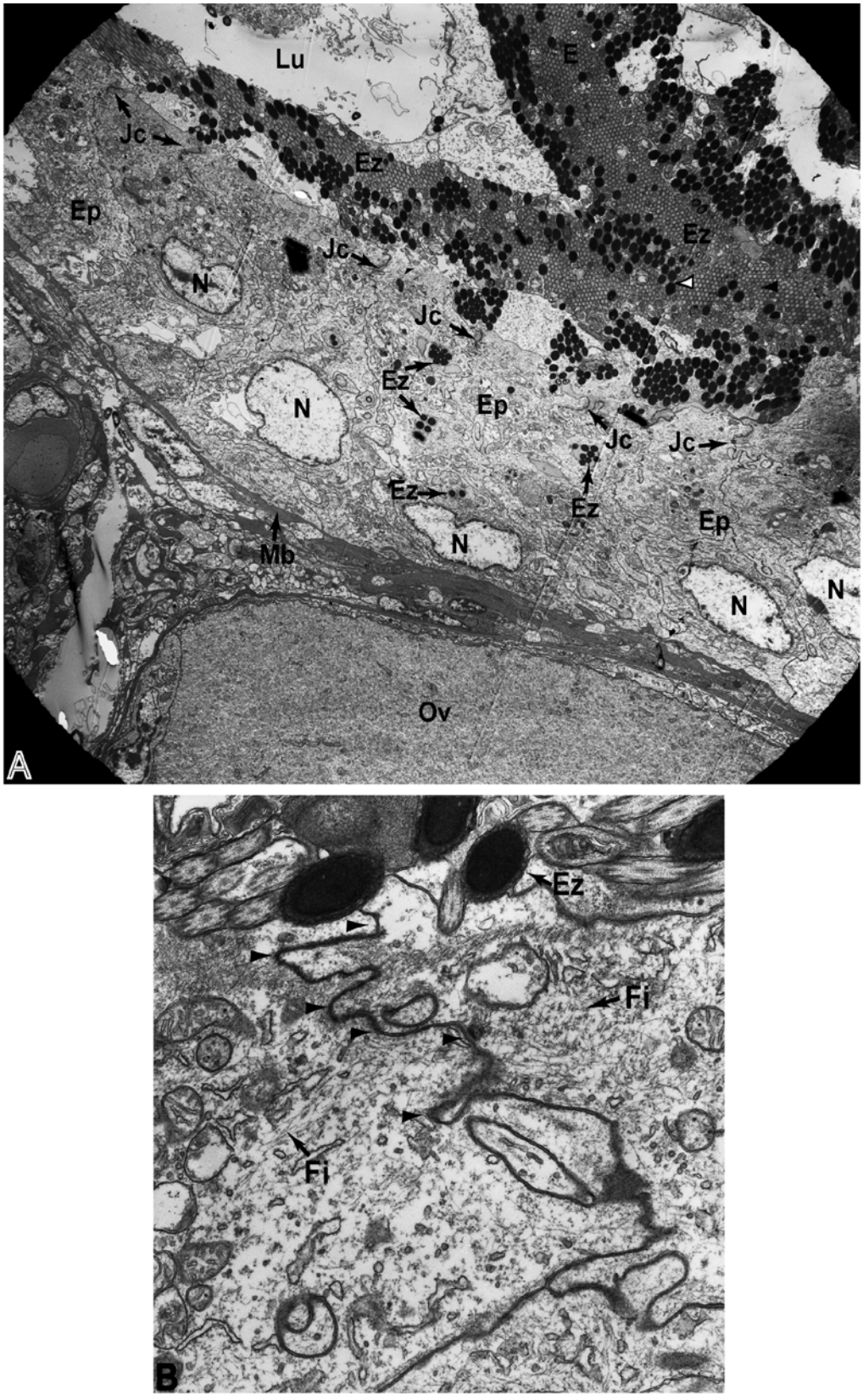

Figura 14. Eletromicrografias do epitélio germinativo do ovário de *T. galeatus* capturados no período de maturação inicial. Em A, observe a presença de células epiteliais prismáticas (Ep) e na presença de grande quantidade de espermatozóides (Ez) encaixados profundamente neste epitélio. As células epiteliais são unidas por longas junções celulares (cabeças-de-seta), que é mostrada com detalhes na figura B. Na região das Jc foi observada grande quantidade de filamentos intermediários (Fi). Ov, ovogônia; N, núcleo; Mb, membrana basal; Lu, lúmen. Aumentos: A, 2.100X; B, 19.300X.

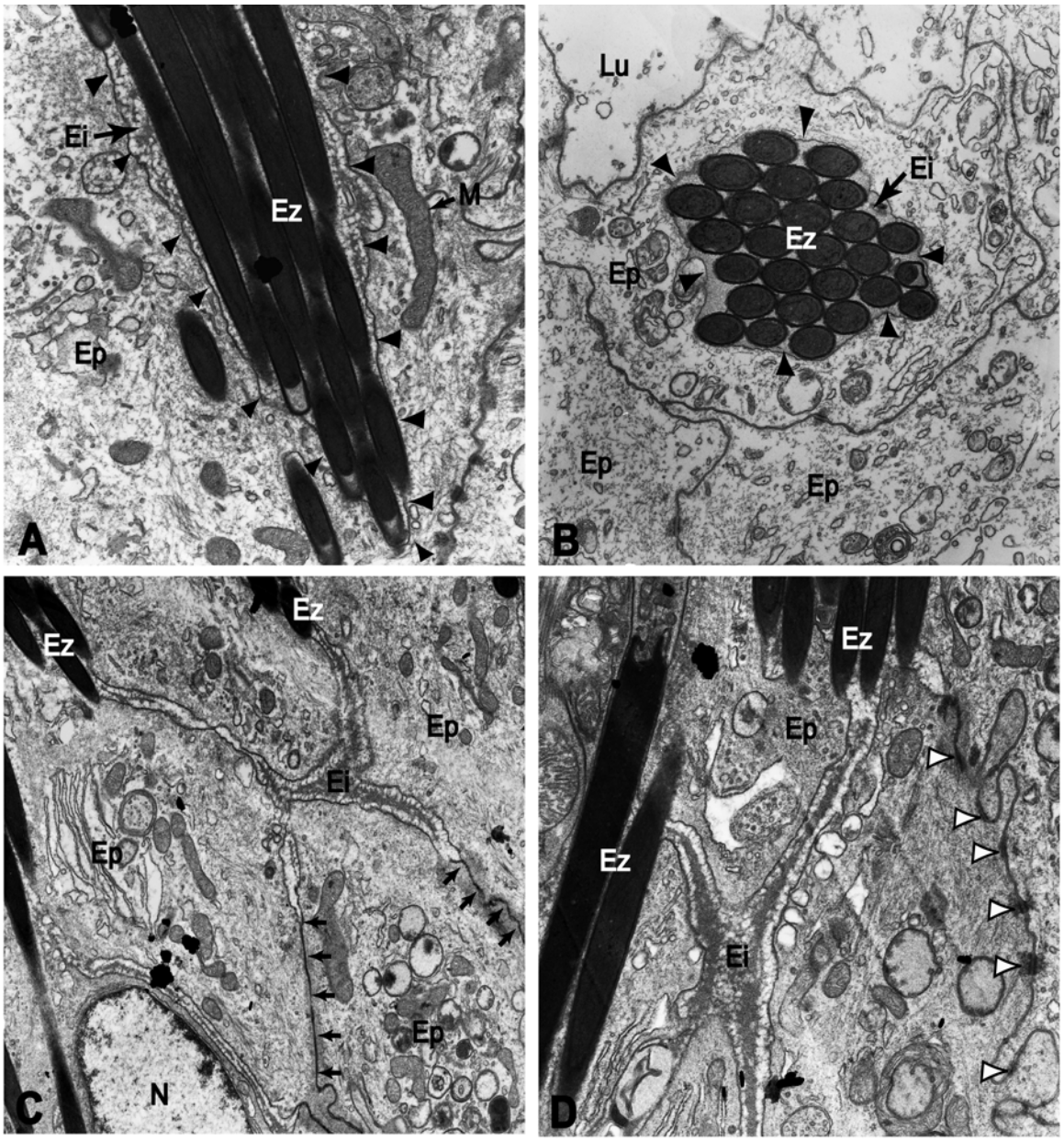

Figura 15. Eletromicrografias do epitélio germinativo do ovário de *T. galeatus*, capturadas em maturação inicial. Encaixados nas células epiteliais de revestimento (Ep), vê-se, em corte longitudinal (A) e transversal (B), grande quantidade de de espermatozóides (Ez) dispostos em feixes. As cabeças-de-seta contornam a membrana citoplasmática da célula epitelial, limitando o espaço inter-celula (Ei) onde estão encaixados os feixes de espermatozóides. Em C, observe que estes espaços intercelulares são fechados por longas junções intercelulares (fileiras de setas) e, em algumas junções (figura D) encontra-se sequência de vários desmossomos enfileirados (cabeças-de-setas brancas). Aumentos: A, 12.500X; B, 11.900X; C, 7.630X; D, 12.370X.

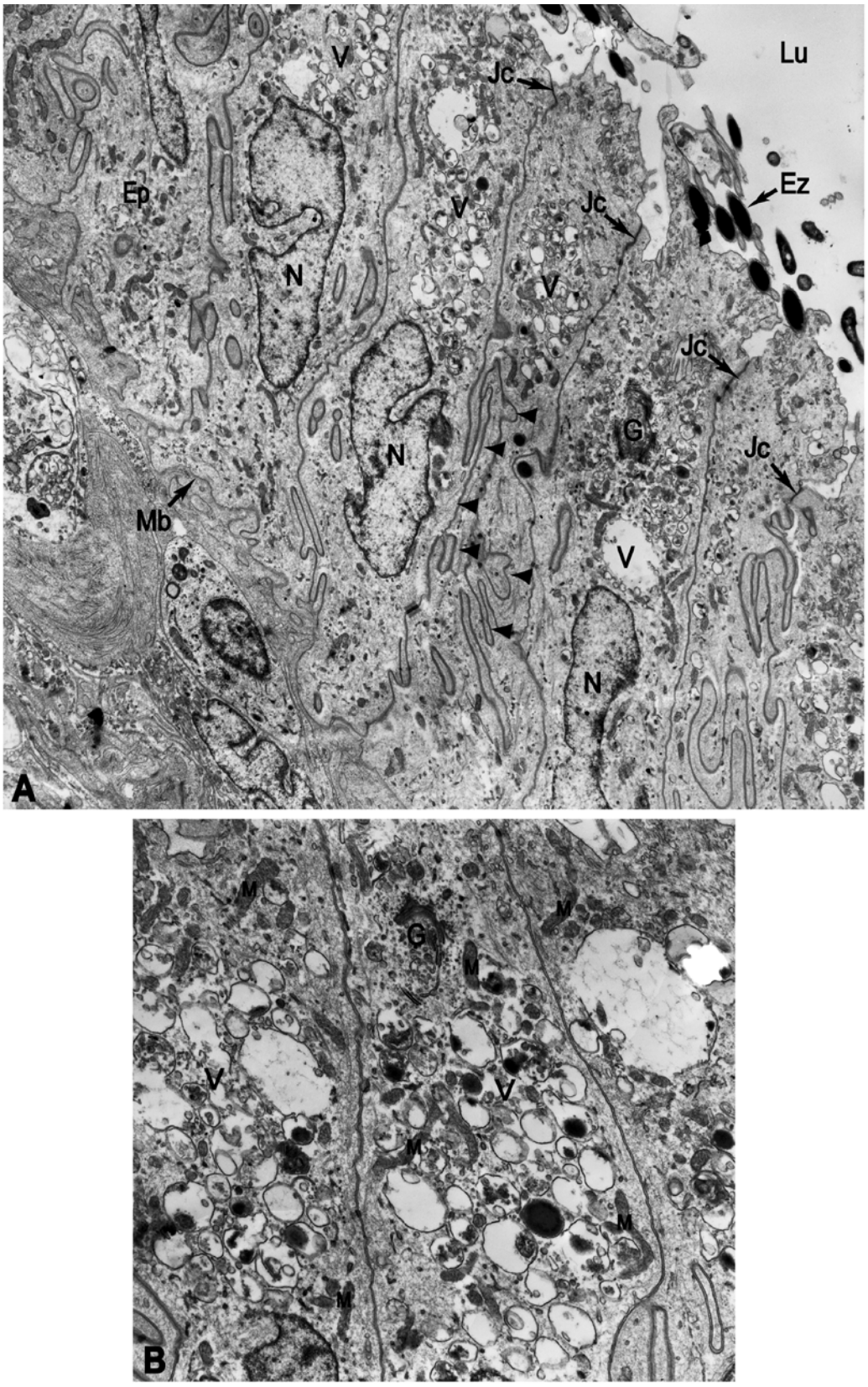

Figura 16. Eletromicrografias mostrando detalhes das células epitélio de revestimento das lamelas ovulígeras do ovário de *T. galeatus* capturados no período de maturação avançada. Observa-se que as células epiteliais (Ep) são prismáticas altas, com intensa interdigitação entre as membranas citoplasmáticas de células vizinhas na sua porção basal (cabeças-de-seta). São evidentes as junções intercelulares (Jc), na região ápico-lateral das células, e foi grande o número de vesículas citoplasmáticas (V), na região supra-nuclear, apresentando tamanho e elétron-densidade bastante variados. Vê-se também: N, núcleo; G, complexo de Golgi; M, mitocôndria; Mb, membrana basal; Lu, lúmen e Ez, espermatozóides. Aumentos: A, 7.000X; B, 12.300X.

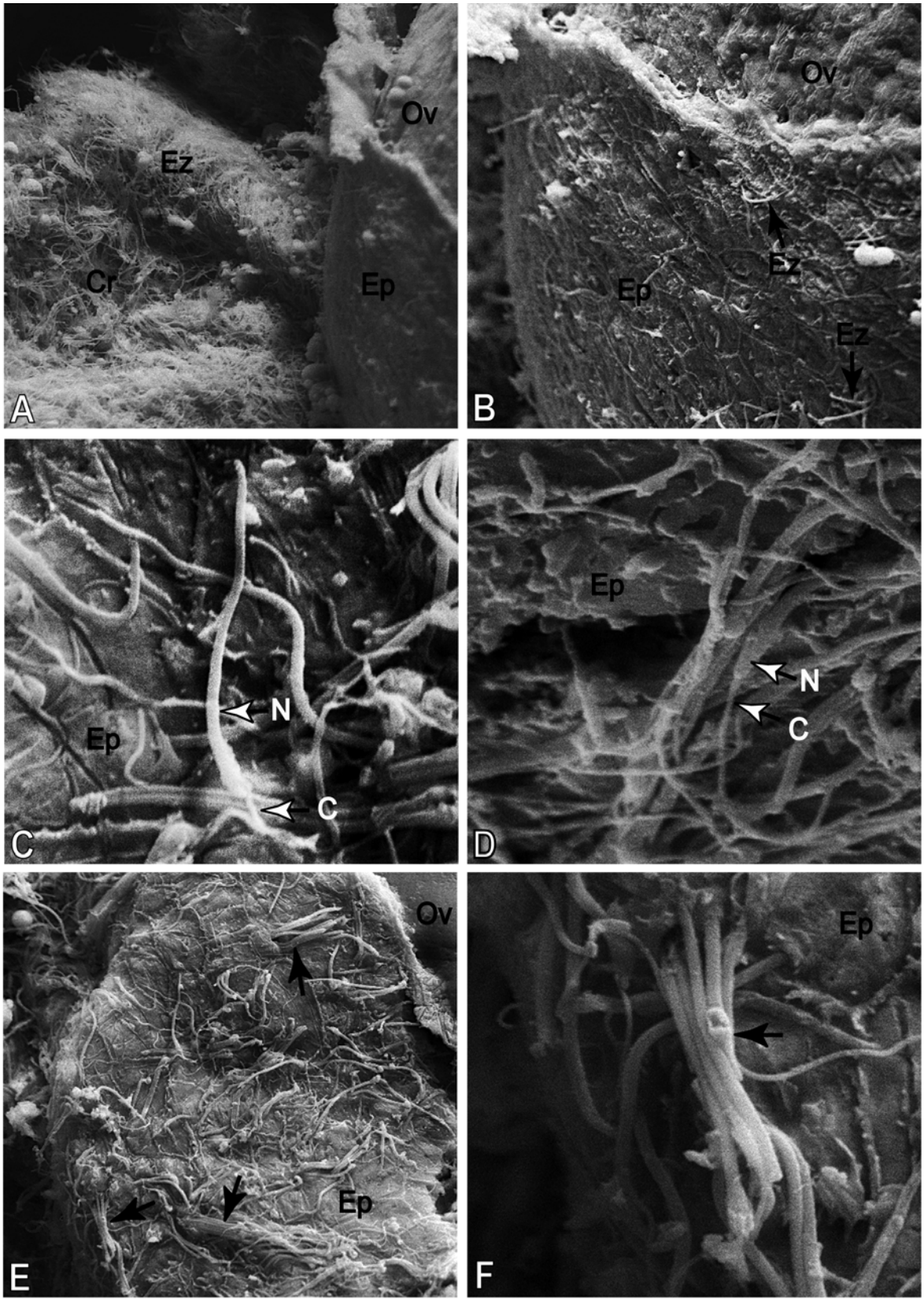

Figura 17. Eletromicrografias de varredura da superfície do ovário de *T. galeatus* capturados no período de maturação avançada. Na figura A, observe grande quantidade de espermatozóides (Ez) dentro das criptas ovarianas (Cr) e em B, estes aderidos ao epitélio de revestimento (Ep). C e D mostram o núcleo (N) e a cauda (C) de espermatozóides livres no lúmen ovariano. Em E, observe encaixado no epitélio a presença de feixes de espermatozóides (setas). A imagem F mostra detalhe de um destes feixes de espermatozóides (seta). Ov, ovócito. Aumentos: A, 470X; B, 860X; C, 4.100X; D, 4.600X; E, 940X; F, 4600X.

9. Referências Bibliográficas

AGOSTINHO, A. A. **Considerações sobre a atuação do setor elétrico na preservação da fauna aquática e dos recursos pesqueiros.** ***In:*** COMASE; ELETROBRÁS. **Seminário sobre fauna aquática e o setor elétrico Brasileiro.** RJ. p. 08-19. 1995.

AGOSTINHO, A. A; JÚNIOR, H. F. **Peixes da Bacia do Alto Rio Paraná.** *In:* LOWE-McCONNELL, R. H. **Estudos ecológicos de comunidades de peixes tropicais.** Traduação: Anna Emilia A. de M. Vazzoler; Ângelo Antônio Agostinho; Patrícia T. M. Cunningham. São Paulo: Ed. da USP. Cap. 16, p. 374-400. 1999.

AMOROSO, E.C. **Viviparity in fishes**. *Symp. Zool. Soc. London*. v. 1, p. 153-181. 1960.

ARAÚJO, F. G; DUARTE, R. S; GOLDEBERG, I; FICHEBERG, I. **Ciclo reprodutivo de Parauchenipterus striatulus (Pisces . Auchenipteridae) na represa de Ribeirão das Lajes . RJ.** *Arquivo Brasileiro de Medicina Zootécnica*. v. 52, n.1, p. 276-284. 2000.

BEER, A.E; BILLINGHAM, R.E. **The immunobiology of mammalian reproduction.** Englewood Cliffs, NJ: *Prentice-Hall*. p. 240. 1976.

BEGOVAC, P. C. & WALLACE, R. A. **Ovary of the pipefish, *Syngnathus scovelli*.** *J. Morphol.* v. 193, p.117-133. 1987.

BIRKHEAD, T. R & A. P. MOLLER. **Sperm competition *in* birds: evolutionary causes and consequences.** New York. *Academic Press.* 1992.

BOND, C. E. **Biology of fishes**. *Saunders College*. p. 514. 1979.

BRUMMETT, AR; DUMONT, JN; LARKIN, JR. **The ovary of *Fundulus heteroclitus*.** *J. Morphol.* v. 173, p. 1–16. 1982.

BURNS J.R.; MEISNER A.D.; WEITZMAN S.H.; MALABARBA L.R. **Sperm and spermatozeugma ultrastructure in the inseminat inseminating catfish.**

***Trachelyopterus lucenai* (Ostariophysi: Siluriformes, Auchenipteridae).** *Copeia.* v. 1, p.173–179. 2002.

BURNS, J.R.; S.H. WEITZMAN, H.J. **Insemination in ostariophysan fishes**. In: Grier HJ, Uribe MC, editors. Viviparous fishes. Homestead: *New Life Publications*. p. 107–134. 2005.

BURNS, J.R; S.H. WEITZMAN, H.J; GRIER & N.A. MENEZES. **Internal fertilization, testis and sperm morphology in glandulocaudine fishes (Teleostei: Characidae: Glandulocaudinae)**. *J. Morphol*. v. 224, p. 131–145. 1995.

BURNS, JR; QUAGIO-GRASSIOTTO, I; JAMIESON, B.G.M. **Ultrastructure of spermatozoa: Ostariophysi. In: Jamieson BGM, editor. Reproductive biology and phylogeny of fishes (Agnathans and bony fishes), Part 8A. Enfield, NH:** *Science Publishers.* p. 287–388. 2009.

CARVALHO, H.F & SANTOS JR, A.R. **Biomembranas. *In: A célula.*** Ed. Carvalho, H.F. & Recco-Pimentel, S.M. Malone: Barueri, Brasil. p. 74-88. 2007.

CHACON, J.O & FILHO, A. M. **Morphological study of the genital apparatus of Cangati, *Trachycorystes galeatus*, Linnaeus. 1756. (Fishes: Actinopterigii, Nematognathi, Achenipteridae.** *Rev. Ciência e Cultura.* v. 24, p. 505-517. 1971.

CHAVES, P. T. C. & VAZZOLER, A. E. A. M. **Aspectos biológicos de peixes amazônicos. II. Anatomia microscópica de ovários, escala de maturidade e tipo de desova das espécies do gênero *Semaprochilodus*.** *Revta. Brasil. Biol*. v. 44, n. 3, p. 347-359. 1984.

CHIARINI-GARCIA, H; MEISTRICH, M. L. **High-resolution light microscopic characterization of spermatogonia.** *Methods Mol Biol.* v. 450, p. 95-107. 2008.

FAWCETT, D.W. **Bloom and Fawcett: textbook of histology.**12th ed. New York: *Chapman and Hall*. p. 964. 1994.

FAZELI, A; EA, DUNCAN; PF, WATSON; WV, HOLT. **Sperm-oviduct interaction: Induction of capacitation and preferential binding of uncapacitated spermatozoa to oviductal epithelial cells in porcine species.** *Biol Reprod.* v. 60, p. 879-886. 1999.

FERRARIS, Jr. C.J. **Family Auchenipteridae (Driftwood catfishes). In: Check list of the freshwater fishes of South and Central America**. Reis RE, Kullander SO, Ferraris Jr, editors. EDIPUCRS, Porto Alegre, p. 470-486. 2003**.**

FORSGREN, E; REYNOLDS, J. D; BERGLUND, A. **Behavioral ecology of reproduction in fish.** ***In:*** HART, P.J.B., REYNOLDS, J.D. (Ed.). **Handbook of fish biology and fisheries**: Blackwell Publishing, United Kingdom. *Fish Biology*. v. 1, p. 225-247. 2002.

FRANÇA, L.R; CHIARINI-GARCIA, H. **Célula de Sertoli.** ***In: Células – Uma abordagem multidisciplinar*****.** Ed. Carvalho, H.F. & Collares-Buzato, C.B. Manole: Barueri, Brasil. p.302-324**.** 2005.

GANECO, L. N; NAKAGHI, L. S. O; URBINATI, E. C; DUMONT NETO, R; VASQUES, L. H. **Morphological analysis of oocyte development of piracanjuba, *Brycon orbignyanus,* during the reproductive cycle.** Boletim do Instituto de Pesca, São Paulo. v. 27, n. 2, p. 131 – 138. 2001.

GARDINER, D.H. **Cyclic changes in fine structure of the epithelium lining the ovary of the viviparous teleost, *Cymatogaster aggregata* (Perciformes: Embiotocidae)**. *J. Morphol.* v.156, p. 367–380. 1978.

GRIER, H. J. **Cellular organization of the testis and spermatogenesis in fishes. Amer. Zool**. v. 21, p. 345-357. 1981.

GRIER, H. J. **The Germinal Epithelium: Its dual role in Establishing Male Reproductive Classes and Understanding the Basis for Indeterminate Egg Production Female Fishes.** Florida Marine Institute Stock Enhancement Research Facility. p. 44. 2000.

HAYASHI, S. **Studies of the ultrastructural changes of ovarian tissue with oogenesis and pregnancy in white-edge rockfish**. *Sebastes taczanowskii*. Master's Thesis, Hokkaido University, Hakodate. p. 39. (in Japanese). 1990.

HOAR, W. S. Reproduction. *In:* HOAR, W. S. and RANDALL, D. J. (eds.), **Fish Physiology Volume III Reproduction and Growth, Bioluminescence, Pigments and Poisons.** New York/London. *Academic Press*. v. 3, p. 1-72. 1969.

HOAR, W. S. **The gonads and reproduction**. *In.:* BROWN, M. E. (ed.), **the Physiology of Fishers.** New York. *Academic Press.* v. 1, p. 287-321. 1957.

HOGARTH, P. J. **Viviparity. Studies in Biology.** Arnold, London. N. 75. 1976.

HOGARTH, PJ; SURSHAM, CM. **Antigenicity of *Poecilia* sperm**. *Experientia*. v. 28, p.463. 1972.

HUNTER R H F; RODRIGUEZ-MARTINEZ H. **Capacitation of mammalian spermatozoa in vivo, with a specific focus on events in the Fallopian tubes.** *Molecular reproduction and development.* v. 67, p. 243-50. 2004.

IHERING, R. **Oviducal fertilization in the South American catfish, *Trachycorystes*.** *Copeia* v.4, p. 2001-2005. 1937.

JAVONILLO, R; BURNS, JR; WEITZMAN, SH. **Sperm modifications related to insemination, with examples from the Ostariophisi. *In:* Jamieson BGM, editor. Reproductive biology and phylogeny of fishes (Agnathans and bony fishes), Part 8A. Enfield, NH***: Science Publishers*. p. 723–763. 2009.

KOBAYASHI, H & IWAMATSU, T**. Fine structure of the storage micropocket of spermatozoa in the ovary of the guppy *Poecilia reticulata***. *Zoolog Sci*. v. 19, p. 545–555. 2002.

KOYA, Y; H. MUNEHARA & K. TAKANO. **Reproductive cycle and spawning ecology in elkhorn sculpin, *Alcichthys alcicornis*. Japan**. *J. Ichthyol*. v. 41, p. 39–45 (in Japanese). 1994.

KOYA, Y; H. MUNEHARA & K. TAKANO. **Sperm storage and degradation in the ovary of a marine copulating sculpin, *Alcichthys alcicornis* (Teleostei: Scorpaeniformes): role of intercellular junctions between inner ovarian epithelial cells.** *J. Morphol.* v. 233, p. 153–163. 1997.

LIMA, R. L. V. A; BERNARDINO, G; VAL-SELLA, M. V; FAVA DE MORAES, F; SCHEMY, R. A; BORELLA, M. I. **Tecido germinativo ovariano e ciclo reprodutivo de pacus (*Piaractus mesopotamicus* Holmberg, 1887) mantidos em cativeiro.** *Bol. Tec. CEPTA*. v. 4, n.1, p. 1-46. 1991.

LOIR, M; CAUTY, C; PLANQUETTE, P; LE BAIL, PY. **Comparative study of the male reproductive tract in seven families of South-American catfishes**. *Aquat Living Resour.*v. 2, p. 45-56. 1989.

MAZZOLDI, C; LORENZI, V; RASOTTO, MB. **Variation of male reproductive apparatus in relation to fertilization modalities in the catfish families Auchenipteridae and Callichthyidae (Teleostei: Siluriformes).** *J.Fish.Biol*. v. 70, p. 243–256. 2007.

MEISNER, AD. **Male modifications associated with insemination in teleosts**. In: Grier HJ, Uribe MC, editors. Viviparous fishes. Homestead: *New Life Publications*. p. 165–189. 2005.

MEISNER, AD; BURNS, JR; WEITZMAN, SH; MALABARBA, LR. **Morphology and histology of the male reproductive system in two species on internally inseminating South American catfishes, *Trachelyopterus lucenai* and *T. galeatus* (Teleostei: Auchenipteridae).** *J. Morphol*. v. 246, p.131-141. 2000.

MOSER, H.G. **Seasonal histological changes in the gonads of *Sebastodes paucispinis*Ayres, an ovoviviparous teleost (family Scorpaenidae).** *J. Morphol*. v. 123, p. 329–354. 1967.

MUÑOZ, M; CASADEVALL, M; BONET, S & QUAGIO-GRASSIOTTO, IRANI. **Sperm storage structures in the ovary of *Helicolenus dactylopterus dactylopterus* (Teleostei: Scorpaenidae): an ultrastuctural study**. *Environmental Biology of Fishes*. v. 58, p. 53-59. 2000.

PARREIRA, G. G; CHIARINI-GARCIA, H; MELO, R.C.N; VIEIRA, F.O; GODINHO, H. P. **Spermatozoon and its relationship with the ovarian lamellae in the internally inseminating catfish *Trachelyopterus galeatus*.** *Microscopy Research and Technique*. v. 72, n.11, p. 889 – 897. 2009.

PECIO, A. & J. RAFINSKI. **Structure of the testis, spermatozoa and spermatozeugmata of *Mimagoniates barberi* Regan, 1907 (Teleostei: Characidae), an internally fertilizing, oviparous fish.** *Acta Zoologica*, v. 75, p.179-185. 1994.

PECIO, A; J. R. BURNS & S. H. WEITZMAN. **Sperm and spermatozeugma ultrastructure in the inseminating species *Tyttocharax cochui, T. tambopatensis* and *Scopaeocharax rhinodus* (Pisces:Teleostei: Characidae: Glandulocaudinae: Xenurobryconini)**. *Journal of Morphology*. v. 263, p. 216-226. 2005.

PIZZARI, T; BIRKHEAD, TR. **The sexually-selected sperm hypothesis: sex-biased inheritance and sexual antagonism.** *Biol Rev Camb Philos Soc.* v. 77, n. 2, p.183–209. 2002.

POTTS, G.W; WOOTTON, R.J. **Fish reproduction: strategies and tactics**. *London: Academic Press.* p. 410. 1984.

REIS, R.E; KULLANDER, S.O; FERRARIS JR, C. J. **Check List of the Freshwater Fishes of South and Central América.** Porto Alegre: EDIPUCRS. p. 742. 2003.

SANTOS, R.A.; E.C. CAMPOS, E.C.; J.J.C. CAMARA & J. MANDELLI JÚNIOR. **Curvas de maturação gonadal e crescimento de fêmeas de tambiú, *Astyanax bimaculatus* Linnaeus, 1758 (Characiformes, Characidae), na represa de Ibitinga, Estado de São Paulo, Brasil.** *Boletim do Instituto de Pesca*, *São Paulo*. v. 18, p. 1-11. 1991.

SILVA, A.C; VIANA, M.S.R. **Spawn period of the cangati, Trachycorystes galeatus (Linnaeus, 1756), into Pereira de Miranda reservoir (Pentecoste - Ceará - Brazil).** *Revista Ciência Agronômica*. v. 34, n.1, p. 5-10. 2003.

SELMAN, K; WALLACE, R. A; PLAYER, D. **Ovary of the seahorse. *Hippocampus erectus.*** *J. Morphol.* v. 209, p. 285–304. 1991.

SHINOMIYA, A. **Studies on the reproductive physiology and ecology in three marine cottid fish.** Ph. D. Thesis, Hokkaido University, Hakodate. p. 145. (in Japanese). 1985.

SILVEIRA, M. **Preparo de amostras biológicas para microscopia eletrônica de varredura*. In*: Técnicas Básicas de Microscopia Eletrônica Aplicadas às Ciências Biológicas.** Ed. Souza, W. Sociedade Brasileira de Microscopia: Rio de Janeiro, Brasil. p. 47-59. 2007.

SMITH, TT; R, YANAGIMACHI. **Attachment and release of spermatozoa from the caudal isthmus of the hamster oviduct.** *J. Reprod Fertil* v. 91, p. 567-573. 1991.

SMITH, W.S; PETRERE JR, M; BARRELLA, W. **The fish fauna in tropical rivers: The case of the Sorocaba river basin, SP, Brazil.** *Rev. Biol. Trop.* v. 51, n. 3, p. 769-782. 2003.

TAKEMURA, A; K. TAKANO & H. TAKAHASHI. **Reproductive cycle of a viviparous fish, white-edged rockfish, *Sebastes taczanowskii*. Bull.** *Fac. Fish. Hokkaido Univ*. v. 38, p. 111–125. 1987.

TATEISHI, S; K. MIZUE & T. INAO. **Histological study about the ovaries of several kinds of ovoviviparous teleost. Bull.** *Fac. Fish. Nagasaki Univ.* v. 7, p. 47–52 (in Japanese). 1958.

TYLER, C.R; SUMPTER, J.P. **Oocite growth and development in teleosts. Reviews in.** *Fish Biology and Fisheries*. v. 6, p. 287-318. 1996.

VAZZOLER, A. E. A. de M. **Biologia da reprodução de peixes Teleósteos: teoria e prática.** Maringá: Eduem. 1996.

VILA, S; MUÑOZ, M; SABAT, M; CASADEVALL, M. **Annual cycle of stored spermatozoawithin the ovaries of Helicolenus dactylopterus dactylopterus (Teleostei. Scorpaenidae).** *J. Fish Biol* . v.71, p. 596–609. 2007.

WATSON, PJ. **Multiple paternity as genetic bet-hedging in female sierra dome spiders, *Linyphia litigosa* (Linyphiidae).** *Animal Behaviour*. v. 41, p. 343–360.1991.

WATSON, PJ. **Multi-male mating and female choice increase offspring growth in the spider *Neriene litigiosa* (Linyphiidae).** *Animal Behaviour*. v. 55, p. 387–403. 1998.

WOURMS, J. P. **Viviparity. Maternal - fetal relationships in fishes.** *American Zoologist*. v. 21, p. 473-515. 1981.

WOURMS, J. P. **Viviparity: The maternal-fetal relationship in fishers**. *Am. Zool*. v. 21, p. 473-515. 1988.

Zeh, J.A & Zeh, D.W. **Reproductive mode and the genetic benefits of polyandry**. *Animal Behaviour*. v. 61, p. 1051-1063. 2001.

Livros Grátis

(http://www.livrosgratis.com.br)

Milhares de Livros para Download:

Baixar livros de Administração
Baixar livros de Agronomia
Baixar livros de Arquitetura
Baixar livros de Artes
Baixar livros de Astronomia
Baixar livros de Biologia Geral
Baixar livros de Ciência da Computação
Baixar livros de Ciência da Informação
Baixar livros de Ciência Política
Baixar livros de Ciências da Saúde
Baixar livros de Comunicação
Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE
Baixar livros de Defesa civil
Baixar livros de Direito
Baixar livros de Direitos humanos
Baixar livros de Economia
Baixar livros de Economia Doméstica
Baixar livros de Educação
Baixar livros de Educação - Trânsito
Baixar livros de Educação Física
Baixar livros de Engenharia Aeroespacial
Baixar livros de Farmácia
Baixar livros de Filosofia
Baixar livros de Física
Baixar livros de Geociências
Baixar livros de Geografia
Baixar livros de História
Baixar livros de Línguas

Baixar livros de Literatura
Baixar livros de Literatura de Cordel
Baixar livros de Literatura Infantil
Baixar livros de Matemática
Baixar livros de Medicina
Baixar livros de Medicina Veterinária
Baixar livros de Meio Ambiente
Baixar livros de Meteorologia
Baixar Monografias e TCC
Baixar livros Multidisciplinar
Baixar livros de Música
Baixar livros de Psicologia
Baixar livros de Química
Baixar livros de Saúde Coletiva
Baixar livros de Serviço Social
Baixar livros de Sociologia
Baixar livros de Teologia
Baixar livros de Trabalho
Baixar livros de Turismo