MÔNICA CAROLINE PAVAN CASSEL

**DESENVOLVIMENTO DAS MODIFICAÇÕES
MORFOFUNCIONAIS EM OVÁRIOS DE
Astyanax altiparanae GARUTTI E BRITSKI 2000
(TELEOSTEI, CHARACIDAE)**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Tecidual do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Doutor em Ciências.

São Paulo
2017

MÔNICA CAROLINE PAVAN CASSEL

**DESENVOLVIMENTO DAS MODIFICAÇÕES
MORFOFUNCIONAIS EM OVÁRIOS DE
Astyanax altiparanae GARUTTI E BRITSKI 2000
(TELEOSTEI, CHARACIDAE)**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Tecidual do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Doutor em Ciências.

Área de Concentração: Biologia Celular e Tecidual

Orientadora: Prof^a Dr^a Maria Inês Borella

Versão corrigida. A versão original eletrônica, encontra-se disponível tanto na Biblioteca do ICB quanto na Biblioteca Digital de Teses e Dissertações da USP (BDTD).

São Paulo
2017

CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e informação Biomédica
do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

Ficha Catalográfica elaborada pelo(a) autor(a)

Cassel, Monica Caroline Pavan
Desenvolvimento das modificações morfofuncionais
em ovários de *Astyanax altiparanae* Garutti e
Britski 2000 (Teleostei, Characidae) / Monica
Caroline Pavan Cassel; orientadora Maria Inês
Borella. -- São Paulo, 2017.
107 p.

Tese (Doutorado) -- Universidade de São Paulo,
Instituto de Ciências Biomédicas.

1. Teleostei. 2. Morfologia animal. 3. Oogênese.
4. Proliferação e morte celular. 5. Manejo
reprodutivo. I. Borella, Maria Inês, orientador.
II. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Mônica Caroline Pavan Cassel

Título da Tese: Desenvolvimento das modificações morfofuncionais em ovários de *Astyanax altiparanae* Garutti e Britski 2000 (Teleostei, Characidae)

Orientador(a): Profª Drª Maria Inês Borella

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da **Tese de Doutorado**, em sessão pública realizada a/...../....., considerou

() **Aprovado(a)**

() **Reprovado(a)**

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Presidente: Assinatura:
Nome:
Instituição:

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 – CEP. 05508-000 São Paulo, SP Brasil
Telefone :(55) (011) 3091.7733 – e-mail: cep@icb.usp.br

CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo registrado sob nº **022** nas fls. **03** do livro **03** para uso de animais em experimentação, sob a responsabilidade do Prof(a) Dr(a)) **Maria Inês Borella**, Coordenador (a) da Linha de pesquisa "*Desenvolvimento das modificações morfofuncionais em ovário de Astyanax altiparanae* GARUTT & BRITSKI, 2000 (TELEOSTEI, CHARACIDAE)" do qual participam o(s) aluno(s), **Chayrra Chegade Gomes, Giovana Souza Branco, Marília de Paiva Camargo, Monica Carolina Pavan Cassel**, está de acordo com os Princípios Éticos de Experimentação Animal adotado pela Sociedade Brasileira de Ciência de Animais de Laboratório (SBCAL) e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) em **23.04.2013, com validade de 4 anos.**

São Paulo, 25 de abril de 2013.

Prof. Dr. WOTHAN TAVARES DE LIMA
Coordenador-CEUA - ICB/USP

Profa. Dra. ANA PAULA FERIQUE
Secretária- CEUA - ICB/USP

Termo de Outorga

Processo 2012/24434-7

O Conselho Técnico-Administrativo da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, doravante denominada OUTORGANTE , usando das atribuições que lhe confere o Artigo 14, letra "b" da lei Estadual no 5.918, de 18 de outubro de 1960, e de acordo com as especificações, cláusulas e condições descritas a seguir e nos Anexos, que são parte integrante deste Termo, concede:	
OUTORGADO	Monica Caroline Pavan Cassel CPF: 016.032.461-00
Orientador/Supervisor	Maria Ines Borella CPF: 053.810.938-61
Instituição	Instituto de Ciências Biomédicas/IB/USP
Linha de Fomento	Programas Regulares / Bolsas / No País / Doutorado
Projeto	DESENVOLVIMENTO DAS MODIFICAÇÕES MORFOFUNCIONAIS EM OVÁRIO DE <i>Astyanax altiparanae</i> GARUTTI & BRITSKI, 2000 (TELEOSTEI, CHARACIDAE)
Área	Recursos Pesqueiros e Engenharia de Pesca
Grande Área	Ciências Agrárias
Sub-área	Aquicultura
Vigência	01/03/2013 a 29/02/2016
Relatórios Científicos até	10/02/2014, 10/02/2015, 10/03/2016
Ata de Defesa até	15/06/2016
Prestação de Contas até	10/02/2014, 10/02/2015, 10/03/2016

Observações
- Havendo solicitação de renovação da bolsa, a entrega do último relatório científico deverá ser antecipada em dois meses. A não observância deste prazo poderá acarretar a descontinuidade no pagamento da bolsa, caso a concessão seja renovada.

FUNDAÇÃO DE AMPARO À PESQUISA DO ESTADO DE SÃO PAULO
ADITIVO AO TERMO DE OUTORGA E ACEITAÇÃO DE BOLSAS NO PAÍS
PROCESSO 2012/24434-7

Pelo presente instrumento, a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, com sede na Rua Pio XI, nº 1.500, Alto da Lapa, São Paulo, Capital, inscrita no CNPJ/MF sob nº 43.828.151/0001-45, doravante denominada OUTORGANTE, por meio de seu Conselho Técnico-Administrativo, nos termos do Artigo 14, letra "b", da Lei Estadual nº 5.918, de 18 de outubro de 1960, resolve alterar o Termo de Outorga nos termos a seguir especificados, mantidas as cláusulas das "Condições Gerais de Concessão de Benefícios" anteriormente firmadas.

1. OUTORGADOS

1.1 BOLSISTA: Monica Caroline Pavan Cassel
CPF: 016.032.461-00
RG: 581120760-SSP/SP

1.2 ORIENTADOR/SUPERVISOR: Maria Ines Borella
CPF: 053.810.938-61
RG: 5086249-SSP/SP

2. Correspondência

2.1 BOLSISTA: Rua Doutor Cesário Mota Júnior - N. 454, Apto. 703, Vila Buarque, São Paulo/SP, CEP 01221-020
monicassel@hotmail.com

2.2 ORIENTADOR/SUPERVISOR: Av. Professor Lineu Prestes 1524 - Edifício Biomédicas 1, sala 426, Butantã, São Paulo/SP, CEP 05508-900
miborell@usp.br

3. Instituição Sede: Instituto de Ciências Biomédicas/ICB
Universidade de São Paulo/USP

4. Projeto de Pesquisa: DESENVOLVIMENTO DAS MODIFICAÇÕES MORFOFUNCIONAIS EM OVÁRIO DE *Astyanax altiparanae* GARUTTI & BRITSKI, 2000 (TELEOSTEI, CHARACIDAE)

5. Linha de Fomento: Programas Regulares / Bolsas / No País / Doutorado

6. Área/Subárea: Recursos Pesqueiros e Engenharia de Pesca
Aquicultura

7. Coordenação: Agronomia e Veterinária II

8. Período da vigência: 01/03/2013 a 28/02/2017

9. Relatórios Científicos: 10/02/2014, 10/02/2015, 10/03/2016, 10/03/2017

10. Prestações de Contas: 10/02/2014, 10/02/2015, 10/03/2016, 10/03/2017

11. Entrega da Ata de Defesa: 15/09/2017

Dedico esta tese:

Ao meu grande companheiro de aventuras e sonhos, Aly! Entre calmarias e tempestades, o amor sempre vence!

Aos meus pais, Edson e Gladis, e irmãos, Felipe e Rafael! Pois é na nossa família que encontramos nossos melhores amigos, aqueles que permanecerão ao nosso lado para sempre!

AGRADECIMENTOS

Nada mais gratificante do que poder contar com pessoas tão queridas durante a nossa jornada nesse universo desafiador e rigoroso que é a pós-graduação, assim gostaria de agradecer:

A Deus e aos anjos amigos que me iluminaram e guiaram durante todo esse percurso de pós-graduação. Tenho certeza de que sem essa inspiração divina os desafios teriam sido muito mais difíceis!

Ao Aly, meu grande amor e companheiro de todas as horas, por fazer do meu caminho uma rota mais feliz e prazerosa. Obrigada por todos os conselhos, por toda a força, por toda a (ENORME) paciência e por todo o seu amor, sem os quais seria muito difícil fazer tudo o que fiz e superar todos os desafios desse doutorado!

Aos meus pais, Edson e Gladis, que são meus maiores exemplos de disciplina, dedicação, carinho e amorosidade. Muito obrigada por trilharem esse caminho comigo e por sempre me incentivarem a ser melhor, pessoal e profissionalmente. Amo vocês!!!

Aos meus irmãos queridos e às minhas maravilhosas cunhadas, Felipe, Ana, Rafael e Samara, que são luz em meu caminho! Muito obrigada por estarem ao meu lado com palavras de incentivo e de coragem, por fazerem da minha vida um lugar cheio de cor e carinho! Vocês ocupam um lugar muito especial em meu coração!

À minha segunda família, Ilda, Aly, Anuar e Karol, por todo o carinho que vocês tem por mim. Muito obrigada por estarem sempre presentes, solícitos e amorosos, apesar de distantes fisicamente!

A todos os meus familiares, de perto ou de longe, que contribuíram com o meu desenvolvimento no curso de doutorado e que sempre torceram por mim!

Aos amigos de Cuiabá, queridos companheiros de vida científica: Adelina Ferreira, Mahmoud Mehanna, Débora Fabiane Neves da Silva, por todo o carinho, atenção e amizade! Vocês são pessoas muito especiais em minha vida e onde quer que eu esteja vou lembrar de vocês com muito amor e saudade... Mas, ainda temos muitos trabalhos para fazermos juntos (rs...)!

À minha querida orientadora, Prof^a Dr^a Maria Inês Borella, por todo o companheirismo e por toda amorosidade. Muito obrigada por aceitar uma estranha no cardume... Eu cai de paraquedas, mas tenho certeza de que cai no lugar certo! Obrigada por todas as oportunidades, por todo o crescimento e por todo o seu carinho, apesar do meu jeito doido de ser! Enfim, obrigada por ser calma nas minhas tempestades!!!

À Chayrra Chehade Gomes e Giovana Souza Branco, pela recepção calorosa e amizade. Moças lindas que sempre estiveram presentes para mim, que me ajudaram em coletas, processamentos, experimentos... E que me ajudaram também a dar sempre o melhor de mim, seja na minha vida pessoal ou profissional.

À Marília de Paiva Camargo, amiga querida, que foi minha companhia nesse último ano de doutorado. Muito obrigada por estar ao meu lado e por me ajudar a finalizar este trabalho, teria sido muito mais difícil sem você e suas opiniões (super sinceras!), leituras e correções... Muito mais que isso, e antes tarde do que mais tarde, agradeço por essa nossa nova amizade e por todo o carinho que você tem por mim!

Aos queridos colegas Lázaro Wender Oliveira de Jesus e Gisele Melo Dias, por toda a ajuda ao longo do doutorado, seja para entender meus dados malucos ou para auxiliar em novos experimentos... Muito obrigada pela companhia e pelos tantos aprendizados!!!

Aos amigos e técnicos do laboratório, Cruz Alberto Mendoza Rigonati e Gaspar Ferreira de Lima, por toda a ajuda com o processamento do meu material que é infinito e trabalhoso. Além disso, muito obrigada por todos os conselhos, por todo o carinho e por toda atenção que sempre tiveram por mim!

Aos professores Dr^a Fernanda Ortis, Dr^a Marilene Hohmuth Lopes, Dr^a Patrícia Gama, Dr Sérgio Ferreira de Oliveira, Dr Victor Arana, pela ajuda e orientação nos experimentos e pelas sugestões de protocolos e análises. Ainda mais, agradeço por cederem tão gentilmente seus laboratórios e equipamentos para as minhas várias análises.

À todos os funcionários e docentes do departamento e do Instituto de Ciências Biomédicas I, cujo contato e convívio diário fizeram, com toda a certeza, diferença no final desses anos e contribuíram muito para minha formação pessoal e profissional.

Aos colegas de pós-graduação pelos momentos de convivência, risadas, descontração e MUITO café! Agradeço por toda a ajuda que tive, pelas várias horas de conversa, conselhos e sugestões... Agradeço, ainda, pelas pessoas maravilhosas que são e por tornarem meus dias de USP mais alegres e prazerosos!!!

Ao Departamento de Biologia Celular e Tecidual, por todas as oportunidades que me foram dadas de convivência e aprendizado! Saio do programa de doutorado muito mais capacitada, não só profissionalmente.

À CESP, Companhia Energética do Estado de São Paulo, especialmente ao Dr. Danilo Caneppele, que possibilitou a coleta dos espécimes de *Astyanax altiparanae* utilizados neste projeto. Além disso, agradeço por toda a ajuda na manipulação dos peixes e na montagem e manutenção do experimento de manejo reprodutivo.

À FAPESP, Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, pela concessão da bolsa de Doutorado (nº processo #2012/24434-7), e importantíssimo apoio financeiro proveniente da Reserva Técnica, permitindo não só a execução do meu projeto, como a realização de estágios e participação em congressos no exterior.

Por fim, gostaria de agradecer a todos aqueles que passaram na minha vida durante esse tempo e que de uma forma ou de outra tiveram sua contribuição na minha formação pessoal e profissional. Muito obrigada!

Alguns homens vêem as coisas como são, e dizem “Por quê?”; Eu sonho com as coisas que nunca foram e digo “Por que não?”.

George Bernard Shaw

RESUMO

Cassel MCP. Desenvolvimento das modificações morfofuncionais em ovários de *Astyanax altiparanae* Garutti e Britski 2000 (Teleostei, Characidae). [Tese (Departamento de Biologia Celular e do Desenvolvimento)] - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo; 2017.

O estudo da reprodução em peixes vem adquirindo importância nos últimos anos por representar possibilidades de intervenção no processo reprodutivo e por colaborar no entendimento das relações ecológicas, adaptativas e evolutivas. Para fêmeas, o entendimento das características morfológicas dos oócitos parece ser o mais importante, pois possibilita a compreensão da dinâmica da gametogênese. Este estudo teve como primeiro objetivo apresentar uma revisão atualizada sobre o desenvolvimento oocitário em teleósteos, as vias de involução no processo de regressão ovariana e a espécie modelo – *Astyanax altiparanae* (Capítulo 1). Depois, focando na espécie modelo, buscou-se descrever a sua morfologia ovariana e das células germinativas, levando em consideração caracteres macroscópicos, microscópicos e ultraestruturais, e ainda caracterizar o ciclo reprodutivo desta espécie (Capítulo 2). Primeiramente, foram comparadas a coloração dos ovários com o seu peso e a distribuição de frequência dessas colorações ao longo do período de amostragem; ambos os dados parecem ter aplicação na piscicultura, uma vez que facilitam a determinação da etapa de desenvolvimento ovariano pelo produtor. Com relação aos aspectos microscópicos, o desenvolvimento de oogônias a oócitos maduros parece não variar para as diferentes espécies de teleósteos, embora este estudo traga detalhes novos para espécies de *Astyanax*, como a presença da *lamela annulata* em oogônias e o desenvolvimento da zona pelúcida a partir de oócitos em estágio “nucléolo único”. A partir das análises quantitativas, constatou-se que *A. altiparanae* tem um período de desova longo com pico reprodutivo de outubro a fevereiro, e desenvolvimento oocitário assincrônico, indicando que a espécie tem desova parcelada. Pode-se concluir com estes dados que: as variações nos períodos de desova desta espécie e sua capacidade de reproduzir em ambientes lênticos, mesmo que por processo de manejo reprodutivo, sugerem que ela tenha a capacidade de responder rapidamente às mudanças ambientais e alta flexibilidade reprodutiva, o que asseguram o importante papel que esta espécie pode ter na piscicultura. Por fim, o último objetivo deste estudo foi caracterizar morfolologicamente os processos de involução de atresia folicular e complexos pós-ovulatórios usando *A. altiparanae* como um modelo experimental, e ainda investigar a localização de proteínas envolvidas nas vias de apoptose e autofagia ao longo desses processos de involução (Capítulo 3). Apesar de não haver diferenças com relação às principais características morfológicas, foi observado que a autofagia precede a apoptose em ambos os processos de involução, o que pode estar relacionado com a reciclagem energética requerida antes da remoção das células foliculares degeneradas por apoptose. Ainda, parece haver uma interrelação entre as vias de autofagia e apoptose nos processos de involução em ovários.

Palavras-chave: Oogênese. Proliferação celular. Morte celular. Autofagia vs Apoptose. Manejo reprodutivo.

ABSTRACT

Cassel MCP. Development of morphofunctional changes in the ovaries of *Astyanax altiparanae* Garutti and Britski 2000 (Teleostei, Characidae). [Ph.D. thesis (Departamento de Biologia Celular e do Desenvolvimento)] - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo; 2017.

Study on fish reproduction has been acquired great importance in the last years for representing possibilities of intervention in its reproductive process and for collaborating in the understanding of its ecological, adaptive, and evolutionary relationships. For females, the knowledge of the morphological characteristics of the oocytes seems to be the most important aspect, since it allows the understanding of the dynamics of gametogenesis. This study had as its first objective to present an updated review on oocyte development in teleosts, the involution pathways during the process of ovarian regression, and the model species – *Astyanax altiparanae* (Chapter 1). Then, focusing on the model species, it was sought to describe its ovarian and germ cell morphology, taking into account macroscopic, microscopic, and ultrastructural characters, and also to characterize the reproductive cycle of this species (Chapter 2). First of all, it was compared the coloration of the ovaries with their weight and the frequency of distribution of these colorations over the sampling period; both data seem to have application in fish farming since it facilitates the determination of the stage of ovarian development by the producer. Regarding the microscopic characteristics, the development of oogonia to mature oocytes does not seem to vary for different species of teleosts, although this study provides new details to *Astyanax* species, such as the presence of *annulate lamellae* in oogonia and the development of the *zona pellucida* from oocytes in One-Nucleolus step. From the quantitative analyzes, it was found that *A. altiparanae* has a long spawning period, with reproductive peak from October to February, and asynchronous oocyte development, indicating that the species has multiple spawning events. It can be concluded from these data that: variations in reproductive periods and the ability to reproduce in lentic environments, even through reproductive management, suggest that this species has the ability to respond rapidly to environmental changes and high reproductive flexibility, which assures the important role of this species in fish farming. Finally, the last objective of this study was to morphologically characterize the involution processes of follicular atresia and post-ovulatory complexes using *A. altiparanae* as an experimental model, and to investigate the localization of proteins involved in the apoptosis and autophagy pathways throughout these processes (Chapter 3). Although there were no differences in relation to the main morphological characteristics, it was observed that autophagy precedes apoptosis in both involution processes, which may be related to the energy recycle required prior to the removal of degenerated follicular cells by apoptosis. Also, there seems to have a crosstalk between autophagy and apoptosis pathways in ovarian involution processes.

Keywords: Oogenesis. Cell proliferation. Cell death. Autophagy vs Apoptosis. Reproductive management.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1 – Desenho esquemático, adaptado de Quagio-Grassiotto et al. (2011), mostrando o desenvolvimento oocitário, desde a proliferação das oogônias no epitélio germinativo até a ovulação do oócito maduro.	22
Figura 1.2 – Modelo conceitual de características reprodutivas universais em peixes.	24
Figura 1.3 – Estratégias reprodutivas: quantidade de ciclos reprodutivos vs. desenvolvimento ovariano e tipo de desova.	26
Figura 1.4 – Vias de sinalização na apoptose: via extrínseca e via intrínseca.	29
Figura 1.5 – Conexões entre os processos autofágico e apoptótico.	31
Figura 1.6 – Modelo proposto para a interação entre autofagia e apoptose no controle da atresia folicular em ovários de peixe.	33
Figura 1.7 – Modelo da destinação da célula folicular nos ovários de peixes ovíparos após a reprodução.	34
Figura 1.8 – Exemplar fêmea de <i>Astyanax altiparanae</i> (acervo pessoal).	35
Figura 2.1 – Representação esquemática das regiões de uso dos ovários para cada técnica de fixação (áreas delimitadas).	52
Figura 2.2 – Fêmea de <i>Astyanax altiparanae</i>	56
Figura 2.3 – Características macroscópicas dos ovários.	58
Figura 2.4 – Histologia ovariana.	61
Figura 2.5 – Oócitos em etapas Múltiplos Nucléolos e Perinucleolar.	62
Figura 2.6 – Oócitos em etapa Alvéolo Cortical.	63
Figura 2.7 – Oócitos em estágio de crescimento secundário.	65
Figura 2.8 – Maturação e ovulação.	66
Figura 2.9 – Reestruturação tecidual.	67
Figura 2.10 – Ciclo reprodutivo: quantificação da proliferação das oogônias.	69
Figura 2.11 – Ciclo reprodutivo: análise quantitativa das células germinativas.	70
Figura 2.12 – Ciclo reprodutivo: análise da razão gonadossomática (RGS).	71
Figura 3.1 – Exemplo de reconstrução e mapeamento utilizado para a identificação e localização das estruturas em involução durante as análises de imunofluorescência (acervo pessoal).	85
Figura 3.2 – Processo de involução da atresia folicular.	89
Figura 3.3 – Processo de involução do complexo pós-ovulatório (POC).	90
Figura 3.4 – Imunomarcagem de cinco proteínas envolvidas nas vias de morte celular – Bcl-2 (em vermelho), Beclin-1 (em verde), Bax (em verde), Catepsina-D (em verde), Caspase-3 (em vermelho) – durante o processo de involução dos folículos atresícos (os núcleos estão marcados em azul).	93
Figura 3.5 – Imunomarcagem de cinco proteínas envolvidas nas vias de morte celular – Bcl-2 (em vermelho), Beclin-1 (em verde), Bax (em verde), Catepsina-D (em verde), Caspase-3 (em	

vermelho) – durante o processo de involução dos complexos pós-ovulatórios (POCs) (os núcleos estão marcados em azul).	94
Figura 3.6 – Co-localização (em amarelo) das proteínas Caspase-3 (em vermelho) e Beclin-1 (em verde) ao longo dos processos involutivos (os núcleos estão marcados em azul).	95
Figura 3.7 – Modelo proposto para a dinâmica de proteínas autofágicas e apoptóticas nos diferentes tipos de células ao longo do processo involutivo de atresias foliculares e de complexos pós-ovulatórios.	101

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.1 – Correlação entre as terminologias clássicas e a nova terminologia proposta por Brown-Peterson et al. (2011) para as fases do ciclo reprodutivo de fêmeas (tabela adaptada de Brown-Peterson et al., 2011).	25
Tabela 2.1 – Qualidade da água da barragem que abastece os tanques do Setor de Hidrobiologia e Aquicultura da Companhia Energética de São Paulo em Paraibuna, São Paulo, Brasil.	51
Tabela 2.2 – Tamanho (cm) e peso (g) médios ($\pm$ desvio padrão) dos ovários de <i>Astyanax altiparanae</i> agrupados conforme sua coloração.	57
Tabela 3.1 – Anticorpos primários e suas respectivas diluições como utilizado nas reações imuno-histoquímicas; todos os anticorpos usados foram previamente testados e validados para peixes (Morais et al., 2012).	86

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1 – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	19
1.1 BIOLOGIA REPRODUTIVA DE PEIXES: DESENVOLVIMENTO OVARIANO, DESENVOLVIMENTO OOCITÁRIO E CICLO REPRODUTIVO	19
1.2 REMODELAÇÃO OVARIANA: VIAS DE MORTE CELULAR	26
1.3 ESPÉCIE MODELO: <i>Astyanax altiparanae</i> Garutti e Britski 2000	34
REFERÊNCIAS	38
CAPÍTULO 2 – DESENVOLVIMENTO OVARIANO E PERFIL REPRODUTIVO DE <i>Astyanax altiparanae</i> (TELEOSTEI, CHARACIDAE) AO LONGO DE UM ANO E SUA APLICAÇÃO NA PISCICULTURA	48
2.1 INTRODUÇÃO	48
2.2 OBJETIVOS	49
2.3 MATERIAL E MÉTODOS	50
2.3.1 Manutenção dos espécimes e manejo reprodutivo	50
2.3.2 Coleta e análise macroscópica dos ovários	52
2.3.3 Análises morfológicas e ultraestruturais dos ovários	53
2.3.4 Análises do ciclo reprodutivo	54
2.3.5 Análises estatísticas	56
2.4 RESULTADOS	56
2.4.1 Características macroscópicas dos ovários	56
2.4.2 Características microscópicas e ultraestruturais dos ovários	58
2.4.3 Características do ciclo reprodutivo	68
2.5 DISCUSSÃO	71
2.6 CONCLUSÕES	75
REFERÊNCIAS	77
CAPÍTULO 3 – PROCESSO DE INVOLUÇÃO DE FOLÍCULOS ATRÉSICOS E DE COMPLEXOS PÓS-OVULATÓRIOS EM OVÁRIOS DE <i>Astyanax altiparanae</i>: ESTUDO DAS VIAS DE APOPTOSE E AUTOFAGIA	81
3.1 INTRODUÇÃO	81
3.2 OBJETIVOS	83
3.3 MATERIAL E MÉTODOS	83
3.3.1 Coleta dos espécimes	83
3.3.2 Processamento histológico e análises morfológicas	83
3.3.3 Análises imuno-histoquímicas	84
3.4 RESULTADOS	87

<i>3.4.1 Características morfológicas do processo de involução de atresias foliculares e complexos pós-ovulatórios</i>	87
<i>3.4.2 Interrelação entre autofagia e apoptose ao longo dos processos de involução</i>	90
3.4.2.1 Atresia folicular	90
3.4.2.2 Complexo pós-ovulatório	92
3.4.2.3 Co-localização de Caspase-3 e Beclin-1 em ambos os processos de involução	94
3.5 DISCUSSÃO	96
<i>3.5.1 Caracterização morfológica do processo de involução</i>	96
<i>3.5.2 “Crosstalk” entre autofagia e apoptose durante a involução de atresias foliculares e de complexos pós-ovulatórios</i>	98
3.6 CONCLUSÕES	102
REFERÊNCIAS	103

CAPÍTULO 1 – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.1 BIOLOGIA REPRODUTIVA DE PEIXES: DESENVOLVIMENTO OVARIANO, DESENVOLVIMENTO OOCITÁRIO E CICLO REPRODUTIVO

O conhecimento das características reprodutivas de peixes é fundamental para que se entendam as adaptações desenvolvidas pela espécie para maximizar o sucesso reprodutivo em um determinado ambiente, considerando os aspectos da história de vida de cada espécie (Mazzoni et al., 2005). Estudos envolvendo a biologia reprodutiva de peixes possuem diversas possibilidades de abordagem, como o entendimento do desenvolvimento gonadal, do desenvolvimento oocitário e do ciclo reprodutivo da espécie.

Análises da morfologia gonadal são importantes para o entendimento da biologia da espécie e têm sido aplicadas em teleósteos, como em estudos mais recentes sobre espermatogênese (Batlouni et al., 2005; Nóbrega et al., 2008; Schulz et al., 2010), foliculogênese (Lubzens et al., 2010; Martins et al., 2010) e ciclo reprodutivo (Batlouni et al., 2006; Carvalho et al., 2009; Nuñez, Duponchelle, 2009). O desenvolvimento ovariano pode ser analisado macroscopicamente com as alterações de forma, tamanho, cor e textura das gônadas (Vazzoler, 1996; Wallace, Sellman, 1981). Ainda, a principal ferramenta utilizada para a distinção do desenvolvimento ovariano é a razão gonadossomática (RGS). A RGS é uma equação estabelecida por Vazzoler (1996) na qual é calculada a relação do peso dos ovários com o peso total dos espécimes. Dessa forma, espécimes com RGS elevado apresentariam ovários com oócitos em estágios mais avançados de desenvolvimento, enquanto que espécimes com RGS baixo apresentariam ovários com mais células em estágios iniciais da oogênese.

No entanto, mesmo com a aquisição desses dados quantitativos, a análise dos caracteres microscópicos possibilita uma descrição ainda mais detalhada e precisa das transições e transformações morfológicas e estruturais que ocorrem durante o seu desenvolvimento (Honji et al., 2006). Assim, o desenvolvimento do oócito em um ovo maduro é um processo complexo modulado por numerosos fatores ambientais e neuro-endócrinos (Coward, Bromage, 2000). O processo de desenvolvimento oocitário a partir de uma oogônia (primeira célula germinativa da linhagem oogênica) ocorre em quatro estágios principais: foliculogênese, crescimento primário ou pré-vitelogênico, crescimento secundário ou vitelogênico e maturação (Lubzens et al., 2010). Após esses estágios, o oócito estará pronto para ser desovado.

De forma simplificada, o desenvolvimento oocitário se inicia quando uma oogônia é individualizada e começa a receber sinalizações específicas para sua diferenciação e crescimento (Grier, 2012). Em contraste com os mamíferos, oogônias continuam proliferando em fêmeas adultas de peixes (Tokarz, 1978), renovando, assim, os estoques de oócitos jovens e folículos (Nakamura et al., 2011). No entanto, a mitose de oogônias em peixes é mais intensa no final de cada ciclo reprodutivo (Krysko et al., 2008), quando os tecidos ovarianos são reorganizados (Sriramulu, Rajalakshmi, 1966).

Com a individualização da oogônia, esta passa a ser chamada de oócito primário e inicia o estágio de foliculogênese. A foliculogênese resulta no afastamento do oócito primário dos ninhos de oogônias e consequente formação dos folículos ovarianos, sendo estes descritos como a associação das células foliculares com o oócito (Coward et al., 2002). Em seguida, inicia-se o estágio de crescimento primário ou pré-vitelogênico, no qual há a formação do complexo folicular. As descrições para o epitélio germinativo feitas por Grier (2000) conceituaram “complexo folicular” como a unidade funcional dos ovários. Este complexo é formado por dois compartimentos separados por uma membrana basal. Um compartimento é o folículo, que consiste no oócito cercado por células foliculares e originado a partir do epitélio germinativo. O segundo compartimento é a teca, formada por células do estroma ovariano.

Além da formação do complexo folicular, no estágio de crescimento pré-vitelogênico o oócito passa por diversas outras modificações morfológicas. De acordo com essas modificações, este estágio pode ser dividido, ainda, em quatro etapas: Nucléolo único, Múltiplos nucléolos, Perinucleolares e Alvéolos corticais. Oócitos em etapa Nucléolo único ainda não apresentam a camada de células da teca, mas se distinguem dos oócitos primários por serem maiores, seu núcleo passa a ser chamado de vesícula germinativa e já começam a apresentar microvilos do oócito em direção às células foliculares (Grier, 2012). Na próxima etapa (Múltiplos nucléolos), há um aumento no número de nucléolos presentes na vesícula germinativa, os quais não se dispõem na sua periferia (Grier et al., 2009). Estes últimos oócitos não são comumente observados em cortes histológicos, uma vez que a passagem para a próxima etapa é bastante rápida. Esses próximos oócitos são chamados de oócitos Perinucleolares, i.e. quando os nucléolos migram para periferia da vesícula germinativa (Grier et al., 2009), além disso há, nesta etapa, a associação da camada de células da teca. Nesta etapa, há, também, a formação da zona pelúcida, uma matriz extra-oocitária complexa que consiste geralmente de duas camadas atravessadas por poros ou canais contendo os microvilos do oócito e das células foliculares (Lubzens et al., 2010; Grier, 2012). Outra característica

desta etapa é a presença de nuages e corpúsculos de Balbiani. As nuages são originadas pela transferência de grande quantidade de RNA heterogêneo e ribossomal sintetizados (Francolini et al., 2003) e associados a proteínas para o citoplasma. Os corpúsculos de Balbiani ou núcleo de vitelo, descritos por Hubbard (1894), foram reconhecidos como aglomerados de organelas localizadas junto ao núcleo, que se proliferam de forma intensa e se espalham por todo o citoplasma. Os próximos são os oócitos em etapa Alvéolo cortical. Nesta etapa há um desenvolvimento mais expressivo da zona pelúcida e há o aparecimento de alvéolos corticais (Grier, 2012). Os alvéolos corticais, como observado por Grier et al. (2009), são vesículas repletas de glicoproteínas, formados por depressões da membrana do oócito, e tornam-se progressivamente maiores, marcando a etapa final do crescimento primário ou pré-vitelogênico.

Estas alterações descritas acima são seguidas por um expressivo crescimento do oócito durante o estágio de crescimento secundário ou vitelogênico, no qual este acumula as reservas nutritivas necessárias para o desenvolvimento do embrião (Grier, 2012). Este estágio também se divide em etapas específicas de crescimento. Assim, oócitos em etapa Inicial apresentam a vesícula germinativa com contorno irregular e algumas pequenas vesículas de vitelo dispersas abaixo dos alvéolos corticais (Grier, 2012). Em seguida, na etapa Avançada do crescimento secundário, observam-se muitas vesículas de vitelo, as quais apresentam diâmetro máximo de incorporação (Grier, 2012). Por fim, na etapa Completo, o crescimento do oócito está finalizado e este apresenta seu citoplasma repleto de vitelo, a zona pelúcida completamente desenvolvida e um aparelho micropilar formado (Grier, 2012).

Durante todo o seu crescimento, o oócito encontra-se estacionado no processo de meiose, no final da prófase I e na fase de diplóteno. Assim, o estágio de maturação é caracterizado pela retomada da meiose, quebra da vesícula germinativa, redução ou parada de endocitose, formação de uma monocamada de alvéolos corticais sob a membrana plasmática do oócito e dissolução das vesículas de vitelo (Grier, 2012). Todas essas modificações morfológicas, de oogônia a oócito maduro e sua ovulação, podem ser vistas na Figura 1.1.

Figura 1.1 – Desenho esquemático, adaptado de Quagio-Grassiotto et al. (2011), mostrando o desenvolvimento oocitário, desde a proliferação das oogônias no epitélio germinativo até a ovulação do oócito maduro. Assim, é possível observar: (1) oogônias indiferenciadas (AUOG) espalhadas no epitélio germinativo (GE); (2) Formação dos ninhos (NE) de oogônias indiferenciadas, delimitado pela membrana basal (BM); (3) Estas oogônias são individualizadas e, então, chamadas de oogônias diferenciadas (ADOG); (4) Formação dos ninhos (NE) de oogônias diferenciadas, também delimitado pela membrana basal (BM); (5) Essa oogônia diferenciada pode se manter no ninho ou (6) pode se comprometer com a foliculogênese, entrando em meiose; (7) As células pré-foliculares (PF) penetram o ninho individualizando esse oócito primário em paquíteno tardio (LPO); (8) As células agora chamadas de foliculares (F) delimitam completamente o oócito diplotênico (DO), caracterizando o estágio de foliculogênese; (9) O oócito diploteno precoce entra em crescimento primário enquanto ainda está dentro de um ninho, do qual é, em seguida, separado; (10) O foliculo ovariano (OF) é, então, progressivamente circundado por células da teca (T). À medida que a teca é formada, o complexo folicular torna-se completo e o oócito avança no crescimento primário (PG). (11) Com o início da captação de vitelogenina com a consequente formação das vesículas de vitelo, o oócito entra no crescimento secundário (SG). (12) Com o término do seu crescimento, os oócitos (FGO) podem entrar em maturação e, posteriormente, (13) ser ovulados (OV), ou seja liberados no lúmen ovariano. BV, vaso sanguíneo; CA, alvéolos corticais; ZP, zona pelúcida; MC, células mesenquimais; N, núcleo; Nu, nucleolo; Y, vesículas de vitelo; FGO, foliculo ovariano em crescimento.

O entendimento destas modificações celulares é utilizado na compreensão do ciclo reprodutivo das espécies. As investigações sobre o ciclo reprodutivo de uma dada espécie ajudam a definir fatores determinantes das etapas de desenvolvimento gonadal, assim como os “gatilhos” que desencadeiam o processo de proliferação e diferenciação celular na formação de gametas (Munro, 1990a,b; Vazzoler, 1996; Suzuki et al., 2004). Isso possibilita o entendimento de qual é o período de reprodução e quais são as mudanças morfológicas gonadais que ocorrem.

Diversos estudos têm sido realizados no intuito de descrever e classificar as fases reprodutivas dos peixes neotropicais. Uma das mais clássicas e utilizadas fontes bibliográficas tem sido Vazzoler (1996). No entanto, outras propostas de descrição já foram feitas por Grier e Taylor (1998), Grier (2002), Lo Nostro et al. (2003), as quais detalham a continuidade e descontinuidade do epitélio germinativo e os tipos celulares presentes nas gônadas. Mais recentemente, Brown-Peterson et al. (2011) trazem uma proposta de homogeneizar os termos utilizados e, assim, desenvolveram uma terminologia mais simples a fim de facilitar a comunicação e comparação dos estudos sobre a biologia reprodutiva dos peixes.

Na figura 1.2 podemos ver as fases do ciclo reprodutivo, que podem se estender por quase toda a vida do animal. Primeiramente há a fase Imatura, na qual o indivíduo ainda não se inseriu nos ciclos reprodutivos e a proliferação e desenvolvimento dos gametas são independentes de gonadotropinas. Nesta fase, em fêmeas, são observados principalmente oogônias e oócitos iniciais. O próximo passo indica a entrada do indivíduo no ciclo reprodutivo, e a partir deste momento o crescimento gonadal e o desenvolvimento gamético se tornam dependentes de gonadotropina. Esta fase de Desenvolvimento gonadal é considerada, ainda, um momento de preparação para a fase reprodutiva, e é caracterizada pela presença, em fêmeas, de oócitos em estágios alvéolo cortical, e vitelogênico 1 e 2. Na fase seguinte o indivíduo encontra-se Apto a reproduzir, apresentando um desenvolvimento avançado dos gametas, tal que em fêmeas os oócitos são capazes de receber sinais hormonais para sua maturação final. O final do ciclo reprodutivo é indicado pela fase de Regressão, a qual é caracterizada principalmente pela presença, em fêmeas, de folículos atrésicos e complexos pós-ovulatórios. Os peixes permanecem nessa fase por um período de tempo relativamente curto e depois passam para a fase de Regeneração. Esta última apresenta-se como uma fase intermediária entre a regressão e o desenvolvimento ovariano, de forma que incluem tanto oócitos iniciais, em proliferação e crescimento independente de gonadotropina, quanto a fase final dos folículos atrésicos. Os peixes nesta fase estão se preparando para o

próximo ciclo reprodutivo, dessa forma são sexualmente maduros, mas reprodutivamente inativos (Brown-Peterson et al., 2011).

Figura 1.2 – Modelo conceitual de características reprodutivas universais em peixes. Todos os peixes atingem a maturidade sexual, passam por um ou mais ciclos reprodutivos, liberam gametas ou prole uma ou mais vezes dentro de um determinado ciclo reprodutivo, atingem a idade máxima reprodutiva, e morrem (adaptado de Brown-Peterson et al., 2011; Lowerre-Barbieri et al., 2011).

Como esta nomenclatura é bastante recente, a maior parte dos trabalhos que apresentam detalhes do ciclo reprodutivo de espécies de peixes ainda utilizam as diversas classificações que já haviam sido propostas. Para se fazer a correlação entre esta nova nomenclatura e aquelas mais clássicas é possível consultar a tabela 1.1. Esta tabela também faz parte do trabalho de Brown-Peterson et al. (2011) e nós traduzimos e adaptamos para esta tese.

O modo como ocorre o desenvolvimento ovariano, o desenvolvimento oocitário e o ciclo reprodutivo das várias espécies de peixes determina as suas estratégias reprodutivas específicas. Assim, como há uma grande diversidade entre as espécies de peixes, há também diversas estratégias reprodutivas. Dentre as estratégias conhecidas, destacamos os conceitos de semelparidade e iteroparidade (Figura 1.3), pois estão mais relacionados com os aspectos citados no início do parágrafo. As espécies semélparas são aquelas que têm um único ciclo reprodutivo ao longo de sua vida, após o qual elas morrem, sendo que estas espécies podem

apresentar ainda desenvolvimento ovariano do tipo sincrônico com desova total, ou então sincrônico em grupo com desova parcelada. Já as espécies iteróparas, as quais são as mais comuns, participam de vários ciclos reprodutivos ao longo do seu tempo de vida. Estas espécies podem apresentar os mesmos tipos de desenvolvimento ovariano que as espécies semélparas, e ainda um tipo de desenvolvimento chamado assincrônico com desovas em mais de duas parcelas, onde estágios contínuos da oogênese estão presentes simultaneamente nos ovários (Lowerre-Barbieri et al., 2011).

Tabela 1.1 – Correlação entre as terminologias clássicas e a nova terminologia proposta por Brown-Peterson et al. (2011) para as fases do ciclo reprodutivo de fêmeas (tabela adaptada de Brown-Peterson et al., 2011).

Fase do ciclo reprodutivo	Terminologias clássicas
Imaturo (nunca reproduziu)	Imaturo; Virgem.
Em desenvolvimento (ovários começam a se desenvolver, mas ainda não estão prontos para desovar)	Em maturação; Desenvolvimento inicial; Maturação inicial; Amadurecimento; Maturação média; Pré-vitelogênico.
Apto a reproduzir (espécimes estão com desenvolvimento ovariano completo e fisiologicamente capazes para reproduzir neste ciclo)	Maduro; Desenvolvimento tardio; Maturação tardia; Amadurecimento tardio; Maturação total; Vitelogênico; Parcialmente desovado; Completamente desenvolvido; Pré-desova; Desova; Desovado.
Regredido (fim da reprodução)	Desovado; Regressão; Pós-desova; Recuperação.
Em regeneração (espécimes sexualmente maduros, mas reprodutivamente inativos)	Em repouso; Regredido; Em recuperação; Inativo.

Semélparas

Iteróparas

Figura 1.3 – Estratégias reprodutivas: quantidade de ciclos reprodutivos vs. desenvolvimento ovariano e tipo de desova. Os padrões de desova se estabelecem ao longo de um *continuum* de (A) espécies semélparas (com um único ciclo reprodutivo em sua vida) com desenvolvimento ovariano sincrônico e desova total a (F) espécies iteróparas (com vários ciclos reprodutivos ao longo de sua vida) com desenvolvimento ovariano assincrônico e desova em múltiplas parcelas (adaptado de Lowerre-Barbieri et al., 2011).

1.2 REMODELAÇÃO OVARIANA: VIAS DE MORTE CELULAR

O desenvolvimento e crescimento ovariano resultam de um balanço positivo entre o desenvolvimento e a atresia folicular (Habibi, Andreu-Vieyra, 2007). Assim, o destino do folículo ovariano depende de um balanço na expressão e ação dos fatores que promovem proliferação, crescimento e diferenciação celular, e dos fatores que induzem a morte celular (Escobar et al., 2013). Assim, os folículos vitelogênicos que não são desovados durante o período reprodutivo tornam-se atresícos e são, então, lentamente reabsorvidos durante a regressão ovariana pós-desova (Rizzo, Bazzoli, 1995; Miranda et al., 1999; Santos et al., 2005).

Atresia é um processo degenerativo pelo qual os folículos ovarianos perdem sua integridade e são eliminados (Byskov, 1978). É um fenômeno comum nos ovários de vertebrados em condições naturais e/ou experimentais (Saidapur, 1978) e pode ser induzida

por fatores como estresse, agentes biológicos, luminosidade, temperatura, confinamento e níveis hormonais inadequados (Nagahama, 1983, 1994; Mylonas et al., 1997; Guimarães, Linden, 2004). Assim, este processo de degeneração oocitária parece se iniciar principalmente como resultado de uma transformação das células da granulosa e da interrupção da síntese de esteroides sexuais necessários para o desenvolvimento reprodutivo normal (Linares-Casenave et al., 2002).

Em teleósteos, a atresia está envolvida no crescimento normal dos ovários (Janz, Van der Kraak, 1997; Wood, Van der Kraak, 2001) e na regressão pós-ovulatória (Thomé et al., 2006; Santos et al., 2008). Assim, a degeneração dos oócitos, ou atresia folicular, é um processo que pode ocorrer antes da desova, nos oócitos que não alcançaram a maturidade, e após a mesma, nos oócitos que deixaram de ser eliminados (Hoar, 1969; Ganeco et al., 2001). Rajalakshmi (1966) fez uma primeira classificação dos processos atrésicos levando em consideração o estágio de desenvolvimento da célula de origem. No entanto, a classificação mais utilizada para os tipos atrésicos é a de Miranda et al. (1999), que separam as atresias em: “inicial”, com a desintegração do núcleo do oócito, liquefação dos grânulos de vitelo, fragmentação da zona pelúcida e hipertrofia das células foliculares; “intermediária”, com a presença de células foliculares fagocitárias que participam da reabsorção do vitelo; “avançada”, com numerosas figuras mielínicas no citoplasma das células foliculares; e, “final”, com a redução no número de células foliculares e da teca, presença de grânulos de lipofusina e granulócitos próximos ao folículo atrésico. Uma vez que os oócitos de teleósteos contêm grande quantidade de vitelo e são produzidos em grande número, a sua fagocitose pelas células da granulosa parece estar envolvida no processo de reciclagem deste estoque valioso de energia produzido pelas fêmeas (Linares-Casenave et al., 2002; Wood, Van der Kraak, 2003; Eykelbosh, Van der Kraak, 2010).

Além dos oócitos atrésicos, ovários desovados apresentam outras estruturas que também serão reabsorvidas, os complexos pós-ovulatórios (POCs). Anteriormente conhecidos como folículos pós ovulatórios (POFs), os POCs são estruturas remanescentes de folículos maduros que foram ovulados durante a estação reprodutiva (Drummond et al., 2000; Grier, 2000; Grier et al., 2009; Morais et al., 2016). São formados pelas camadas de células restantes após a liberação do oócito, i.e. a camada de células foliculares, a membrana basal e a camada de células da teca (Grier, 2012). Já se sabe que estas estruturas têm baixa ou nenhuma atividade hormonal na maioria das espécies de teleósteos estudadas até o momento, de forma que elas não são homólogas ao corpo lúteo de mamíferos (Selman, Wallace, 1989). Embora sejam pouco estudados, os POCs são rapidamente reabsorvidos (Thomé et al., 2006), e sua

remoção parece ser essencial para o recrutamento de novos folículos para a próxima estação reprodutiva (Kumar, Joy, 2015).

Entre os mecanismos envolvidos na remoção e remodelação tecidual em ovários desovados, a apoptose parece ser o mais destacado e estudado. Alguns estudos indicam que a apoptose é o principal mecanismo envolvido na eliminação de células somáticas e germinativas em folículos atrésicos de aves e mamíferos (Janz et al., 1997; Andreu-Vieyra, Habibi, 2000; Hussein, 2005). Já em teleósteos, ela está mais associada com a seleção e recrutamento de folículos para a vitelogênese (Janz, Van der Kraak, 1997) e na regressão pós-ovulatória (Drummond et al., 2000; Santos et al., 2005, 2008; Thomé et al., 2006).

Apoptose é um processo fisiológico controlado por vários hormônios e fatores de crescimento, evolutivamente conservado, envolvido na remodelação, diferenciação e degeneração tecidual em uma variedade de tipos celulares (Janz et al., 1997). É caracterizada por mudanças bioquímicas e morfológicas, como a condensação da cromatina, a fragmentação do DNA e a formação de corpos apoptóticos (Hacker, 2000). Dois mecanismos de sinalização distintos operam na apoptose: via extrínseca e via intrínseca (Hussein et al., 2003; Danial, Korsmeyer, 2004), e estes parecem ser conservados entre mamíferos e teleósteos (Krumshnabel, Podrabsky, 2009).

A via extrínseca (Figura 1.4) é geralmente desencadeada pela ativação de receptores de morte celular na superfície da célula (Takle, Andersen, 2007; Krumshnabel, Podrabsky, 2009). Dessa forma, esta via medeia a apoptose em resposta aos ligantes de Fas (FasL) e Apo2L/TRAIL (ligante Apo2 ou ligante indutor de apoptose relacionado ao fator de necrose tumoral [TNF]), os quais sinalizam, respectivamente, através do domínio de morte (DD – *death domain*) e recrutam as proteases iniciadoras caspase-8 e -10 para o complexo de sinalização de indução à morte (DISC – *death-inducing signaling complex*), onde elas são ativadas (Ashkenazi, Dixit, 1998; Ashkenazi, 2002). A ativação da via intrínseca (Figura 1.4), ou via apoptótica mitocondrial, é iniciada por diversos estímulos diferentes detectados no interior celular, como danos no DNA, função comprometida do retículo endoplasmático ou limitações energéticas (Takle, Andersen, 2007; Krumshnabel, Podrabsky, 2009). Esta via desencadeia a apoptose através da família de genes Bcl-2 e da protease iniciadora caspase-9 (Puthalakath, Strasser, 2002). Assim, a liberação subsequente de fatores pró-apoptóticos das mitocôndrias resulta na estimulação da caspase-9, e na clivagem e ativação de caspases efetoras tais como a caspase-3, -6 e -7 (Kratz et al., 2006).

Vale ressaltar que as caspases são uma família de proteases de cisteína altamente conservadas que medeiam o curso da morte celular por apoptose (Krumshnabel, Podrabsky,

2009). As caspases são as principais proteínas efetoras da apoptose, e são as caspases que ativam as endonucleases dependentes de $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$, que por sua vez fragmentam o DNA (Huettenbrenner et al., 2003). Nos ovários, a caspase-3 é a principal caspase efetora e é expressa nas células da granulosa de folículos atreéticos, mas está ausente nestas células em folículos saudáveis. Esta expressão é regulada por gonadotropinas e pode ser alterada como parte do processo apoptótico nas células da granulosa (Boone, Tsang, 1998). Além das caspases, uma outra família de proteases, chamadas catepsinas, parecem estar implicadas na regulação da apoptose (Castino et al., 2009). Embora muitas vezes elas tenham sido consideradas proteases intracelulares capazes de mediar a morte celular independente de caspase, há também evidência de que estas proteases, incluindo a catepsina-D, podem atuar conjuntamente com as caspases na morte celular por apoptose (Castino et al., 2009; Morais et al., 2012; Repnik et al., 2012).

Figura 1.4 – Vias de sinalização na apoptose: via extrínseca e via intrínseca (adaptado de Takle, Andersen, 2007). Os detalhes das vias podem ser consultados no texto.

Além da apoptose, Thomé et al. (2009) trazem uma nova rota precursora de morte celular que pode ser observada na regressão ovariana de teleósteos, a autofagia. Essa rota, na sua definição clássica, diferencia-se da apoptose pela finalidade a que estão destinados os processos, sendo que a apoptose é a morte celular programada e a autofagia é a adaptação ao estresse para evitar a morte celular. No entanto, a relação funcional entre apoptose e autofagia é complexa, uma vez que em alguns casos a autofagia constitui uma forma de adaptação ao estresse suprimindo a apoptose, enquanto em outros casos a autofagia constitui uma via alternativa de eliminação celular, denominada morte celular autofágica ou do tipo II (Maiuri et al., 2007, 2010; Eisenberg-Lerner et al., 2009).

O processo de autofagia começa com o engolfamento gradual de material citoplasmático (citosol e/ou organelas) pelo fagofóro (também chamado de membrana de isolamento), que sequestra o material em vesículas de dupla membrana chamadas autofagossomos. Em muitos contextos celulares, o primeiro processo regulatório envolve a de-repressão do mTOR Ser/Thr quinase, que inibe a autofagia por fosforilação da proteína autofágica-13 (Atg13). Esta fosforilação conduz à dissociação da Atg13 de um complexo proteico que contém Atg1 quinase e Atg17, e assim atenua a atividade da Atg1 quinase. Quando mTOR é inibida, a re-associação da Atg13 desfosforilada com a Atg1 estimula sua atividade catalítica e induz a autofagia. Entre os passos iniciais da nucleação vesicular está a ativação da Vps34, uma fosfatidilinositol 3-quinase classe III (PI3K), para gerar o fosfatidilinositol-3-fosfato (PtdIns3P). A ativação da Vps34 depende da formação de um complexo multiproteico no qual há a participação de beclin-1, UVRAG e Vps15 (Maiuri et al., 2007).

Dois sistemas de conjugação do tipo ubiquitina fazem parte do processo de alongamento da vesícula. Uma via envolve a conjugação covalente de Atg12 e Atg5, com a ajuda das enzimas Atg7 e Atg10. A segunda via envolve a conjugação de fosfatidiletanolamina (PE) a LC3/Atg8 pela ação sequencial das proteases Atg4, Atg7 e Atg3. A conjugação lipídica leva à conversão da forma solúvel de LC3 (denominado a LC3-I) para a forma associada à vesícula autofágica (LC3-II). Autofagossomos sofrem maturação por fusão com lisossomos para criar autolisossomos. Nos autolisossomos, a membrana interior, bem como o conteúdo luminal dos vacúolos autofágicos, é degradada por enzimas lisossomais que atuam de forma ótima dentro deste compartimento ácido (Levine, Klionsky, 2004; Shintani, Klionsky, 2004; Maiuri et al., 2007).

Assim, apoptose e autofagia constituem os dois processos através dos quais células e/ou organelas supérfluas e danificadas são eliminadas (Maiuri et al., 2007). No entanto, a

conexão entre autofagia e apoptose é uma área de pesquisa emergente (Gump, Thorburn, 2011) e o conhecimento atual sobre as interações moleculares entre estas vias ainda é incompleto e fragmentado (Habibi, Andreu-Vieyra, 2007). Entre as proteínas envolvidas nos processos apoptóticos e autofágicos, algumas interações já foram constatadas e parecem ser essenciais na determinação do destino das células e no “crosstalk” entre autofagia e apoptose, como (Klionsky, 2007; Maiuri et al., 2007, 2010; Gump, Thorburn, 2011): (a) ativação do DISC via interação da Atg5 com o FADD; (b) FLIP inibe a associação Atg3-LC3, e portanto inibe a indução à autofagia; (c) conjugação de Atg12-Atg3 inibe a fissão e apoptose mitocondrial, independente do processo de autofagia; (d) p62 promove a agregação e ativação da caspase-8 a qual, paradoxalmente, é degradada por autofagia por meio da sua interação com p62; (e) fosforilação de beclin-1 pela Dap-quinase (DAPK) promove autofagia; (f) interação de beclin-1 com a proteína anti-apoptótica bcl-2 inibe a autofagia; (g) p53 pode tanto promover como inibir a autofagia, dependendo do contexto celular; (h) autofagia pode promover a morte celular independente da apoptose (Figura 1.5).

Figura 1.5 – Conexões entre os processos autofágico e apoptótico. Ligações bem estabelecidas são retratadas com linhas sólidas, e ligações pouco estabelecidas são representadas com linhas pontilhadas. A descrição de cada interação está apresentada no texto (adaptado de Gump, Thorburn, 2011).

O processo de atresia ovariana em vertebrados não mamíferos tem recebido muito menos atenção do que em mamíferos, embora folículos atrésicos tenham sido morfológica e histologicamente descritos nos ovários de espécies de répteis, anfíbios e peixes (Saidapur, 1978; Kennedy, 2002). Ainda menos atenção tem sido dirigida a fim de identificar os mecanismos celulares e moleculares básicos em atresias de teleósteos (Wood, Van der Kraak, 2001), cujas informações são bastante limitadas (Kennedy, 2002). A partir do início dos anos 2000 esse cenário tem se alterado aos poucos, com estudos sendo dirigidos para o entendimento dos mecanismos de autofagia e apoptose em folículos atrésicos e complexos pós-ovulatórios em ovários de teleósteos.

Estudos recentes mostram que, em teleósteos (inclusive em espécies nativas), proteínas autofágicas (beclin-1, Atg, LC3, Lamp) e apoptóticas (bax e bad) podem ser ativadas de maneira coordenada dependendo do estágio da atresia folicular, estabelecendo uma relação entre autofagia e apoptose (Santos et al., 2005, 2008; Thomé et al., 2009; Morais et al., 2012, 2016). Dentre essas, a família Bcl-2 é composta por proteínas intracelulares que ajudam a regular a ativação das pro-caspases. Alguns membros dessa família, como a própria bcl-2 e bcl-x, inibem a apoptose, enquanto outros como bad e bax promovem a apoptose. A inibição do fator anti-apoptótico da via bcl-2 induz apoptose em células foliculares de folículos atrésicos de mamíferos, aves e peixes (Morais et al., 2012). Ainda, em ovários de peixe, evidências sugerem que a catepsina-D pode desempenhar um papel no complexo “crosstalk” entre autofagia e apoptose das células foliculares durante a atresia folicular (Morais et al., 2012; Figura 1.6).

Estes estudos parecem indicar também que a apoptose e autofagia podem agir cooperativamente, nos ovários de peixes, e uma dupla função, na sobrevivência e na morte celular, foi atribuída à autofagia para garantir uma regressão ovariana mais eficiente após a desova (Thomé et al., 2009). Em termos gerais, parece que estímulos semelhantes podem induzir tanto apoptose quanto autofagia. Mas, se um fenótipo misto de autofagia e apoptose pode ser algumas vezes detectado em resposta a estes estímulos comuns, em muitos outros casos autofagia e apoptose se desenvolvem de uma forma mutuamente exclusiva, talvez como resultado de variáveis limitantes de ambos os processos, ou como um resultado de uma “decisão” celular entre as duas respostas que pode estar ligada a uma inibição mútua dos dois fenômenos (Maiuri et al., 2007). Assim, entende-se que a apoptose é o principal mecanismo envolvido na involução dos complexos pós-ovulatórios (Santos et al., 2005, 2008), uma vez que esta aumenta rapidamente na células foliculares logo após a desova. No entanto, os limites e as inter-relações entre estes dois processos não foram ainda investigados nestes

complexos. Já na regressão dos folículos atresícos, parece que inicialmente a autofagia é predominante e a taxa de apoptose só aumenta na fase final do processo (Santos et al., 2008; Thomé et al., 2009; Figura 1.7).

Figura 1.6 – Modelo proposto para a interação entre autofagia e apoptose no controle da atresia folicular em ovários de peixe. A autofagia é a resposta primária a fim de manter a viabilidade das células foliculares durante a reabsorção do vitelo, sendo desencadeada quando a ligação de beclin-1 para bcl-2 é clivada. A Catepsina-D lisossômica contribui para a degradação de estruturas celulares durante a autofagia; no entanto, quando dispersa no citosol pode induzir à morte celular por apoptose. A acumulação de vacúolos autofágicos no citoplasma das células foliculares (macroautofagia dependente de beclin-1) também pode conduzir a vias alternativas de morte celular não apoptótica (adaptado de Morais et al., 2012).

Figura 1.7 – Modelo da destinação da célula folicular nos ovários de peixes ovíparos após a reprodução. Nos complexos pós-ovulatórios, a apoptose ou morte celular do tipo I é a principal via de morte celular contribuindo grandemente para a remoção das células foliculares, apesar de que o envolvimento de autofagia não é rejeitado. No folículo atrésico, a autofagia parece ser a resposta primária tendo por fim a manutenção da viabilidade da célula folicular. No entanto, algumas células podem também comprometer-se a morrer por apoptose, de forma independente ou dependente de caspase (adaptado de Thomé et al., 2009).

1.3 ESPÉCIE MODELO: *Astyanax altiparanae* Garutti e Britski 2000

O gênero de peixes de água doce *Astyanax* (Characiformes, Characidae) é amplamente distribuído na região Neotropical. É composto por mais de 100 espécies e subespécies, muitas das quais até o momento não descritas (Garutti, Britski, 1997; Fernandes, Martins-Santos, 2004). Tendo em vista o número de espécies, a distribuição e a taxonomia, *Astyanax* tem sido considerado um dos gêneros de caracídeos mais complexos na América do Sul, ainda havendo dúvidas quanto a sua monofilia (Weitzman, Malabarba, 1998; Rossini et al., 2016) e qualquer informação sobre a caracterização e o relacionamento das espécies pode ajudar em uma melhor compreensão do grupo.

Baseado em características cromossômicas, três complexos de espécies foram identificados dentro de *Astyanax*: grupo *Astyanax scabripinnis*, grupo *Astyanax bimaculatus* e grupo *Astyanax fasciatus* (Moreira-Filho, Bertollo, 1991; Fernandes, Martins-Santos, 2004; Pazza et al., 2006). Apesar da ausência de características morfológicas distintas entre os grupos, as diferenças no número de cromossomos e fórmulas cariotípicas, além de outras características macroestruturais, são facilmente identificados entre citótipos distintos (Kavalco

et al., 2009). Assim, o gênero *Astyanax* pode ser considerado como um dos grupos melhor documentado do ponto de vista citogenético, e os grupos *A. scabripinnis*, *A. bimaculatus* e *A. fasciatus* são aqueles que apresentam o maior número de populações analisadas (Pazza, Kavalco, 2007).

Os indivíduos identificados como *Astyanax bimaculatus* do Alto Rio Paraná foram descritos como *A. altiparanae* por Garutti e Britski, em 2000 (Figura 1.8). Por causa de sua importância ecológica, o conhecimento básico da variabilidade genética de populações de *A. altiparanae* é fundamental para ajudar na construção de diretrizes ecológicas de conservação para a bacia do Paraná (Peres et al., 2005). Da mesma forma, o conhecimento aprofundado dos períodos reprodutivos, suas características de desenvolvimento e sítios de desova podem auxiliar no entendimento das adaptações populacionais de acordo com as características ambientais e, conseqüentemente, na orientação de medidas de conservação e manejo dos organismos e de seus ambientes (Garutti, 1989; Vazzoler, 1996).

Figura 1.8 – Exemplar fêmea de *Astyanax altiparanae* (acervo pessoal).

Em Characidae, os estudos mostram que as espécies apresentam, predominantemente, o período reprodutivo situado entre setembro e abril, com duração variando de quatro a seis meses (Vazzoler, Menezes, 1992; Gelain et al., 1999; Azevedo et al., 2000; Oliveira et al., 2002; Lampert et al., 2004, 2007; Gonçalves et al., 2005). Especificamente em relação às espécies de *Astyanax*, estudos sobre biologia reprodutiva vêm mostrando que existe certa variação na duração do período reprodutivo, com extremos variando desde apenas dois meses (e.g. Godoy, 1975) até nove meses de duração (e.g. Veregue, Orsi, 2003; Mazzoni et al., 2005).

A estratégia reprodutiva de espécies de *Astyanax* inclui longo período reprodutivo, maturação rápida, múltiplas desovas, ovos pequenos, fecundidade elevada e ausência de

cuidado parental (Suzuki et al., 2005). Garutti (1989) e Peres et al. (2005) constataram que, em ambientes naturais, há variação no período reprodutivo de *A. altiparanae*, sendo que nas águas de cabeceira têm um período de acasalamento prolongado, com vários picos de reprodução, enquanto os de água profunda em rios tendem a ter um período reprodutivo curto. As variações nos períodos de desova e na capacidade de desovar em ambientes lênticos permitem sugerir que esta espécie tem a capacidade de responder rapidamente a mudanças ambientais e possui alta flexibilidade reprodutiva, contribuindo para o seu sucesso na colonização de novos ambientes (Dias et al., 2005).

Astyanax altiparanae tem sido empregado, ainda, como modelo de estudo em diversas pesquisas realizadas pelo Laboratório de Endocrinologia de Peixes, ICB-USP. Diferentes aspectos morfológicos, celulares, moleculares e hormonais do eixo hipotálamo-hipófise-gônadas já foram abordados, como: (a) caracterização da distribuição de GnRH no encéfalo (Gomes, 2010; Gomes et al., 2013); (b) isolamento e caracterização molecular dos *gnrh2* e *gnrh3*, bem como análise de suas expressões temporais após estímulo reprodutivo (Gomes, 2015); (c) caracterização da diferenciação celular durante a morfogênese da hipófise (Branco, 2016); (d) caracterização molecular das gonadotropinas e seus receptores, e sua expressão espaço-temporal durante o ciclo reprodutivo da espécie em cativeiro (Jesus, 2016; Jesus et al., 2017); (e) descrição da morfologia testicular, com ênfase nos caracteres ultraestruturais e imuno-histoquímicos da espermatogênese semi-cística (Costa, 2011; Costa et al., 2014); (f) caracterização das espermatogônias indiferenciadas e dos nichos espermatogoniais (Camargo, 2016; Camargo et al., 2017); (g) clonagem e caracterização dos genes *dmrt1* e *sox9*, bem como o envolvimento desses genes na diferenciação testicular e na espermatogênese (Adolfi et al., 2015); (h) caracterização da dinâmica ovariana durante a reprodução induzida pela redução do nível de água (Chehade et al., 2015).

Apesar destes trabalhos publicados anteriormente, os estudos sobre a reprodução de *Astyanax altiparanae* não apresentaram análises com enfoque ovariano com o detalhamento histológico e ultraestrutural necessários, o que pode ter ocasionado interpretações incompletas do modo reprodutivo da espécie. Como esta espécie tem se tornado um peixe comercial atraente para os piscicultores, principalmente devido a facilidades associadas com a produção de alevinos, crescimento rápido, resistência e manuseio simples dessa espécie (Gonçalves et al., 2014), dados recentes e mais completos podem colaborar no desenvolvimento e melhoria de técnicas de produção.

Por fim, estudos da gametogênese em peixes podem colaborar no entendimento das relações ecológicas, adaptativas e evolutivas, principalmente quando as estruturas oocitárias

são analisadas em caráter ultraestrutural. Da mesma forma, estudos envolvendo estruturas intracelulares e sua distribuição ao longo do desenvolvimento gamético e gonadal em espécies de peixes são pontuais ou restritos a uma fase do desenvolvimento. O entendimento desses processos se dá, então, pela soma de diversos trabalhos em diferentes fases do desenvolvimento, mas que não representam necessariamente as mesmas pressões ambientais, comportamentais e populacionais que estão sendo dirigidas aos indivíduos de uma determinada espécie. Assim, o estudo contínuo dessas variáveis ao longo do ciclo reprodutivo de uma espécie pode possibilitar parâmetros mais reais sobre a dinâmica das estruturas intracelulares em células germinativas e foliculares.

REFERÊNCIAS¹

- Adolfi MC, Carreira AC, Jesus LW, Bogerd J, Funes RM, Scharl M, Sogayar MC, Borella MI. Molecular cloning and expression analysis of *dmrt1* and *sox9* during gonad development and male reproductive cycle in the lambari fish, *Astyanax altiparanae*. *Reprod Biol Endocrinol*. 2015; 13:2.
- Agostinho AA, Mendes VP, Suzuki HI, Canzi C. Avaliação da atividade reprodutiva da comunidade de peixes dos primeiros quilômetros a jusante do reservatório de Itaipu. *Rev UNIMAR*. 1993; 15(Suppl.):175-89.
- Agostinho AA, Suzuki HI, Sampaio AA, Borges JD. Índice de atividade reprodutiva: uma proposta para avaliação da atividade reprodutiva em peixes [CD-ROM]. In: IX Encontro Brasileiro de Ictiologia; 1991; Maringá. Paraná (Brasil): Editora da UEM. p. 53.
- Andreu-Vieyra CV, Habibi HR. Factors controlling ovarian apoptosis. *Can J Physiol Pharmacol*. 2000; 78(12):1003-12.
- Ashkenazi A. Targeting death and decoy receptors of the tumournecrosis factor superfamily. *Nat Rev Cancer*. 2002; 2(6):420-30.
- Ashkenazi A, Dixit VM. Death receptors: signaling and modulation. *Science*. 1998; 281(5381):1305-08.
- Azevedo MA, Malabarba LR, Fialho CB. Reproductive biology of the inseminated Glandulocaudine *Diapoma speculiferum* Cope (Actinopterygii: Characidae). *Copeia*. 2000; 2000(4):983-9.
- Batlouni SR, Carreño FR, Romagosa E, Borella MI. Cell junctions in the germinal epithelium may play an important role in spermatogenesis of the catfish *P. fasciatus* (Pisces, Siluriformes). *J Mol Histol*. 2005; 36(1-2):97-110.
- Batlouni SR, Romagosa E, Borella MI. The reproductive cycle of male catfish *Pseudoplatystoma fasciatus* (Teleostei, Pimelodidae) revealed by changes of the germinal epithelium: an approach addressed to aquaculture. *Anim Reprod Sci*. 2006; 96(1-2):116-32.
- Boone DL, Tsang BK. Caspase-3 in the rat ovary: localization and possible role in follicular atresia and luteal regression. *Biol Reprod*. 1998; 58(6):1533-39.
- Branco GS. Caracterização da diferenciação celular durante a morfogênese da hipófise em *Astyanax altiparanae* Garutti & Britski 2000. [dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Tecidual)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2016.
- Brown-Peterson NJ, Wyanski DM, Saborido-Rey F, Macewicz BJ, Lowerre-Barbieri SK. A standardized terminology for describing reproductive development in fishes. *Mar Coast Fish*. 2011; 3(1):52-70.

¹ De acordo com: International Committee of Medical Journal Editors. [Internet]. Uniform requirements for manuscripts submitted to biomedical journals. [2011 Jul 15]. Available from: http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.html

Byskov AG. Follicular atresia. In: Jones RE (ed.). The vertebrate ovary: Comparative Biology and Evolution. New York: Plenum Press; 1978. p. 533-62.

Camargo MP. Caracterização das espermatogônias indiferenciadas e dos nichos espermatogoniais em *Astyanax altiparanae* Garutti e Britski, 2000 (Teleostei, Characidae). [dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Tecidual)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2016.

Camargo MP, Cassel M, Jesus LWO, Nóbrega RH, Borella MI. Characterization of undifferentiated spermatogonia and the spermatogonial niche in the lambari fish *Astyanax altiparanae*. Theriogenology. 2017; 96:97-102.

Carvalho PA, Paschoalini AL, Santos GB, Rizzo E, Bazzoli N. Reproductive biology of *Astyanax fasciatus* (Pisces: Characiformes) in a reservoir in southeastern Brazil. J Appl Ichthyol. 2009; 25(3):306-13.

Castino R, Peracchio C, Salini A, Nicotra G, Trincheri NF, Démoz M, Valente G, Isidoro C. Chemotherapy drug response in ovarian cancer cells strictly depends on a cathepsin D-Bax activation loop. J Cell Mol Med. 2009; 13(6):1096-109.

Cehade C, Cassel M, Borella MI. Induced reproduction in a migratory teleost species by water level drawdown. Neotrop Ichthyol. 2015; 13(1):205-12.

Costa FG. Testículo de *Astyanax altiparanae* Garutti e Britski, 2000. Estudo morfológico, ultraestrutural e imuno-histoquímico. [tese (Doutorado em Biologia Celular e Tecidual)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2011.

Costa FG, Adolphi MC, Gomes CC, Jesus LWO, Batlouni SR, Borella MI. Testes of *Astyanax altiparanae*: the Sertoli cell functions in a semicystic spermatogenesis. Micron. 2014; 61:20-7.

Coward K, Bromage NR. Reproductive physiology of female tilapia broodstock. Rev Fish Biol Fisher. 2000; 10(1):1-25.

Coward K, Bromage NR, Hibbitt O, Parrington J. Gamete physiology, fertilization and egg activation in teleost fish. Rev Fish Biol Fisher. 2002; 12(1):33-58.

Danial NN, Korsmeyer SJ. Cell death: critical control points. Cell. 2004; 116(2):205-19.

Dias RM, Baially D, Antônio RR, Suzuki HI, Agostinho AA. Colonization of the Corumbá Reservoir (Corumbá River, Paraná River Basin, Goiás State, Brazil) by the “lambari” *Astyanax altiparanae* (Tetragonopterinae; Characidae). Braz Arch Biol Technol. 2005; 48(3):467-76.

Drummond CD, Bazzoli N, Rizzo E, Sato Y. Postovulatory follicle: a model for experimental studies of programmed cell death or apoptosis in teleosts. J Exp Zool. 2000; 287(2):176-82.

Eisenberg-Lerner A, Bialik S, Simon H-U, Kimchi A. Life and death partners: apoptosis, autophagy and the cross-talk between them. Cell Death Differ. 2009; 16(7):966-75.

Escobar ML, Echeverría OM, Casasa AS, García G, Aguilar SJ, Vázquez-Nin GH. Involvement of pro-apoptotic and pro-autophagic proteins in granulosa cell death. *Cell Biol.* 2013; 1(1):9-17.

Eykelbosh AJ, Van der Kraak G. A role for the lysosomal protease cathepsin B in zebrafish follicular apoptosis. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol.* 2010; 156(2):218-23.

Fernandes CA, Martins-Santos IC. Cytogenetic studies in two populations of *Astyanax altiparanae* (Pisces, Characiformes). *Hereditas.* 2004; 141(3):328-32.

Francolini M, Lora Lamia C, Bonsignorio C, Cotelli F. Oocyte development and egg envelope formation in *Oreochromis niloticus*, a mouth-brooding cichlid fish. *J Submicrosc Cytol Pathol.* 2003; 35(1):49-60.

Ganeco LN, Nakaghi LSO, Urbinati EC, Dumont Neto R, Vasques LH. Análise morfológica do desenvolvimento ovocitário de piracanjuba, *Brycon orbignyanus*, durante o ciclo reprodutivo. *Bol Inst Pesca.* 2001; 27(2):131-8.

Garutti V. Contribution to the knowledge of the reproduction of *Astyanax bimaculatus* (Ostariophysi, Characidae), in waters of the Paraná River basin. *Rev Bras Biol.* 1989; 49(2):489-95.

Garutti V, Britski HA. Descrição de uma espécie nova de *Astyanax* (Teleostei, Characidae), com mancha umeral horizontalmente ovalada, da bacia do rio Guaporé, Amazônia. *Pap Avulsos Zool.* 1997; 40(14):217-29.

Garutti V, Britski HA. Descrição de espécie nova de *Astyanax* (Teleostei: Characidae) da bacia do alto rio Paraná e considerações sobre as demais espécies do gênero na bacia. *Comun Mus Ciênc Tecnol PUCRS.* 2000; 13:65-88.

Gelain D, Fialho CB, Malabarba LR. Biologia reprodutiva de *Serrapinnus calliurus* (Characidae, Cheirodontinae) do arroio Ribeiro, Barra do Ribeiro, Rio Grande do Sul, Brasil. *Comun Mus Ciênc Tecnol PUCRS.* 1999; 12:71-82.

Godoy MP. Peixes do Brasil: subordem Characoidei; bacia do rio Mogi Guassu. São Paulo: Franciscana; 1975. 857 p.

Gomes, CC. Localização das diferentes formas de GnRH no encefálo de *Astyanax altiparanae* (Garutti e Britski, 2000) e *Danio rerio* (Hamilton, 1822). dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Tecidual)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2010.

Gomes, CC. Caracterização molecular dos GnRHs de *Astyanax altiparanae* (Garutti e Britski, 2000), seu efeito *in vivo*, e sua expressão temporal ao longo do estímulo reprodutivo. [tese (Doutorado em Biologia Celular e Tecidual)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2015.

Gomes CC, Costa FG, Borella MI. Distribution of GnRH in the brain of the freshwater teleost *Astyanax altiparanae* (Garutti & Britski, 2000). *Micron.* 2013; 52-53:33-8.

Gonçalves LU, Parisi G, Bonelli A, Sussel FR, Viegas EMM. The fatty acid compositions of total, neutral and polar lipids in wild and farmed lambari (*Astyanax altiparanae*) (Garutti & Britski, 2000) broodstock. *Aquacult Res.* 2014; 45(2):195-203.

Gonçalves TK, Azevedo MA, Malabarba LR, Fialho CB. Reproductive biology and development of sexually dimorphic structures in *Aphyocharax anisitsi* (Ostariophysi: Characidae). *Neotrop Ichthyol.* 2005; 3(3):433-8.

Grier HJ. Ovarian germinal epithelium and folliculogenesis in the common snook, *Centropomus undecimalis* (Teleostei: Centropomidae). *J Morphol.* 2000; 243(3):265-81.

Grier HJ. The germinal epithelium: its dual role in establishing male reproductive classes and understanding the basis for indeterminate egg production in female fishes. In: Creswell RL (ed.). *Proceedings of the fifty-third annual Gulf and Caribbean Fisheries Institute*. Fort Pierce: Mississippi/Alabama Sea Grant Consortium; 2002. p. 537-52.

Grier HJ. Development of the follicle complex and oocyte staging in red drum, *Sciaenops ocellatus* Linnaeus, 1776 (Perciformes, Sciaenidae). *J Morphol.* 2012; 273(8):801-29.

Grier HJ, Taylor RG. Testicular maturation and regression in the common snook. *J Fish Biol.* 1998; 53(3):521-42.

Grier JH, Uribe-Aranzábal MC, Patiño R. The ovary, folliculogenesis and oogenesis in teleosts. In: Jamieson BJM (ed.). *Reproductive Biology and Phylogeny of Fishes (Agnathans and Bony Fishes): Phylogeny Reproductive System Viviparity Spermatozoa*. Enfield: Science Publishers; 2009. p. 25-84.

Guimarães CA, Linden R. Programmed cell deaths: Apoptosis and alternative deathstyles. *Eur J Biochem.* 2004; 271(9):1638-50.

Gump JM, Thorburn A. Autophagy and apoptosis: what is the connection? *Trends Cell Biol.* 2011; 21(7):387-92.

Habibi HR, Andreu-Vieyra CV. Hormonal regulation of follicular atresia in teleost fish. In: Babin PJ, Cerdà J, Lubzens E (eds.). *The fish oocyte: from basic studies to biotechnological applications*. Netherlands: Springer; 2007. p. 235-53.

Hacker G. The morphology of apoptosis. *Cell Tiss Res.* 2000; 301(1):5-17.

Hoar WS. Reproduction. In: Hoar W, Randall DJ (eds.). *Fish physiology*. London: Academic Press; 1969. p. 1-72.

Honji RM, Vaz-Dos-Santos AM, Rossi-Wongtschowski CLDB. Identification of the stages of ovarian maturation of the argentine hake *Merluccius hubbsi* Marini, 1933 (Teleostei: Merlucciidae): advantages and disadvantages of the use of the macroscopic and microscopic scales. *Neotrop Ichthyol.* 2006; 4(3):329-37.

Hubbard JW. The yolk nucleus in *Cymatogaster aggregatus* Gibbons. *P Am Philos Soc.* 1894; 33(144):74-83.

Huettenbrenner S, Maier S, Leisser C, Polgar D, Strasser S, Grusch M, Krupitza G. The evolution of cell death programs as prerequisites of multicellularity. *Mutat Res.* 2003; 543(3):235-49.

Hussein MR. Apoptosis in the ovary: molecular mechanisms. *Hum Reprod Update.* 2005; 11(2):162-77.

Hussein MR, Haemel AK, Wood GS. Apoptosis and melanoma: molecular mechanisms. *J Pathol.* 2003; 199(3):275-88.

Janz DM, McMaster ME, Munkittrick KR, Van der Kraak G. Elevated ovarian follicular apoptosis and heat shock protein-70 expression in white sucker exposed to bleached kraft pulp mill effluent. *Toxicol Appl Pharmacol.* 1997; 147(2):391-98.

Janz DM, Van der Kraak G. Suppression of apoptosis by gonadotropin 17beta-estradiol and epidermal growth factor in rainbow trout preovulatory ovarian follicles. *Gen Comp Endocrinol.* 1997; 105(2):186-93.

Jesus, LWO. Gonadotropinas e seus receptores em *Astyanax altiparanae* (teleostei, characiformes): caracterização molecular e expressão espaço-temporal durante o ciclo reprodutivo em cativeiro. [tese (Doutorado em Biologia Celular e Tecidual)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2016.

Jesus LWO, Bogerd J, Vieceli FM, Branco GS, Camargo MP, Cassel M, Moreira RG, Yan CYI, Borella MI. Gonadotropin subunits of the characiform *Astyanax altiparanae*: Molecular characterization, spatiotemporal expression and their possible role on female reproductive dysfunction in captivity. *Gen Comp Endocr.* 2017; 246:150-63.

Kavalco KF, Brandão KO, Pazza R, Almeida-Toledo LF. *Astyanax hastatus* Myers, 1928 (Teleostei, Characidae): A new species complex within the genus *Astyanax*? *Genet Mol Biol.* 2009; 32(3):477-83.

Kennedy AM. Reproduction of striped bass *Morone saxatilis*; a structural, biochemical and functional characterization of atresia. [Masters thesis (Science)]. Raleigh: Department of Zoology, North Carolina State University; 2002.

Klionsky DJ. Autophagy: from phenomenology to molecular understanding in less than a decade. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2007; 8(11):931-7.

Kratz E, Eimon PM, Mukhyala K, Stern H, Zha J, Strasser A, Hart R, Ashkenazi A. Functional characterization of the Bcl-2 gene family in the zebrafish. *Cell Death Differ.* 2006; 13(10):1631-40.

Krumschnabel G, Podrabsky JE. Fish as model systems for the study of vertebrate apoptosis. *Apoptosis.* 2009; 14(1):1-21.

Krysko DV, Diez-Fraile A, Criel G, Svistunov AA, Vandenabeele P, D'Herde K. Life and death of female gametes during oogenesis and folliculogenesis. *Apoptosis.* 2008; 13(9):1065-87.

- Kumar R, Joy KP. Melanins as biomarkers of ovarian follicular atresia in the catfish *Heteropneustes fossilis*: biochemical and histochemical characterization, seasonal variation and hormone effects. *Fish Physiol Biochem*. 2015; 41(3):761-72.
- Lampert VR, Azevedo MA, Fialho CB. Reproductive biology of *Bryconamericus iheringii* (Ostariophysi: Characidae) from rio Vacacaí, RS, Brasil. *Neotrop Ichthyol*. 2004; 2(4):209-15.
- Lampert VR, Azevedo MA, Fialho CB. Reproductive Biology of *Bryconamericus stramineus* Eigenmann, 1908 (Ostariophysi: Characidae) from rio Ibicuí, RS, Brazil. *Braz Arch Biol Technol*. 2007; 50(6):995-1004.
- Levine B, Klionsky DJ. Development by self-digestion: molecular mechanisms and biological functions of autophagy. *Dev Cell*. 2004; 6(4):463-77.
- Linares-Casenave J, Van Eenennaam JP, Doroshov SI. Ultrastructural and histological observations on temperature-induced follicular ovarian atresia in the white sturgeon. *J Appl Ichthyol*. 2002; 18(4-6):382-90.
- Lo Nostro F, Grier H, Andreone L, Guerrero GA. Involvement of the gonadal germinal epithelium during sex reversal and seasonal testicular cycling in the protogynous swamp eel, *Synbranchus marmoratus* Bloch 1795 (Teleostei, Synbranchidae). *J Morphol*. 2003; 257(1):107-26.
- Lowerre-Barbieri SK, Brown-Peterson NJ, Murua H, Tomkiewicz J, Wyanski DM, Saborido-Rey F. Emerging issues and methodological advances in fisheries reproductive biology. *Mar Coast Fish*. 2011; 3(1):32-51.
- Lubzens E, Young G, Bobe J, Cerdà J. Oogenesis in teleosts: How fish eggs are formed. *Gen Comp Endocr*. 2010; 165(3):367-89.
- Maiuri MC, Criollo A, Kroemer G. Crosstalk between apoptosis and autophagy within the Beclin 1 interactome. *EMBO J*. 2010; 29(3):515-6.
- Maiuri MC, Zalckvar E, Kimchi A, Kroemer G. Self-eating and self-killing: crosstalk between autophagy and apoptosis. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2007; 8(9):741-52.
- Martins YS, Moura DF, Santos GB, Rizzo E, Bazzoli N. Comparative folliculogenesis and spermatogenesis of four teleost fish from a Reservoir in south-eastern Brazil. *Acta Zool*. 2010; 91(4):466-73.
- Mazzoni R, Mendonça RS, Caramaschi EP. Reproductive biology of *Astyanax janae* (Osteichthyes, Characidae) from the Ubatiba River, Maricá, RJ, Brazil. *Braz J Biol*. 2005; 65(4):643-9.
- Miranda ACL, Bazzoli N, Rizzo E, Sato Y. Ovarian follicular atresia in two teleost species: a histological and ultrastructural study. *Tissue Cell*. 1999; 31(5):480-8.

Morais RDVS, Thomé RG, Lemos FS, Bazzoli N, Rizzo E. Autophagy and apoptosis interplay during follicular atresia in fish ovary: a morphological and immunocytochemical study. *Cell Tissue Res.* 2012; 347(2):467-78.

Morais RDVS, Thomé RG, Santos HB, Bazzoli N, Rizzo E. Relationship between bcl-2, bax, beclin-1, and cathepsin-D proteins during postovulatory follicular regression in fish ovary. *Theriogenology.* 2016; 85(6):1118-31.

Moreira-Filho O, Bertollo LAC. *Astyanax scabripinnis* (Pisces, Characidae): A species complex. *Rev Bras Genet.* 1991; 14(2):331-57.

Munro AD. General introduction. In: Munro AD, Scott AP, Lam TJ (eds.). *Reproductive seasonality in teleosts: environmental influences*. Florida: CRC Press; 1990a. p. 1-11.

Munro AD. Tropical freshwater fish. In: Munro AD, Scott AP, Lam TJ (eds.). *Reproductive seasonality in teleosts: environmental influences*. Florida: CRC Press; 1990b. p. 145-239.

Mylonas CC, Woods III LC, Zohar Y. Cyto-histological examination of post-vitellogenesis and final oocyte maturation in captive-reared striped bass. *J Fish Biol.* 1997; 50(1):34-49.

Nagahama Y. The functional morphology of the teleost gonad. In: Hoar WS, Randall DJ, Donaldson EM (eds.). *Fish Physiology*, vol IX, Part A. 6. *Reproduction: Endocrine Tissues and Hormones*. New York: Academic Press. 1983. p. 223-75.

Nagahama Y. Endocrine regulation of gametogenesis in fish. *Int J Dev Biol.* 1994; 38(2):217-29.

Nakamura S, Kobayashi K, Nishimura T, Tanaka M. Ovarian germline stem cells in the teleost fish, medaka (*Oryzias latipes*). *Int J Biol Sci.* 2011; 7(4):403-9.

Nóbrega RH, Batlouni SR, França LR. An overview of functional and stereological evaluation of spermatogenesis and germ cell transplantation in fish. *Fish Physiol Biochem.* 2008; 35(1):197-206.

Núñez K, Duponchelle F. Towards a universal scale to assess sexual maturation and related life history traits in oviparous teleost fishes. *Fish Physiol Biochem.* 2009; 35(1):167-80.

Oliveira CLC, Fialho CB, Malabarba LR. Período reprodutivo, desova e fecundidade de *Cheirodon ibicuiensis* Eigenmann, 1915 (Ostariophysi: Characidae) do arroio Ribeiro, Rio Grande do Sul, Brasil. *Comun Mus Ciênc Tecnol PUCRS.* 2002; 15(1):3-14.

Pazza R, Kavalco KF. Chromosomal evolution in the neotropical characin *Astyanax* (Teleostei, Characidae). *Nucleus.* 2007; 50(3):519-43.

Pazza R, Kavalco KF, Bertollo LAC. Chromosome polymorphism in *Astyanax fasciatus* (Teleostei, Characidae). 1 - Karyotypic analysis, Ag-NORs and mapping of the 18S and 5S ribosomal genes in sympatric karyotypes and their possible hybrid forms. *Cytogenet Genome Res.* 2006; 112(3-4):313-9.

- Peres MD, Vasconcelos MS, Renesto E. Genetic variability in *Astyanax altiparanae* Garutti & Britski, 2000 (Teleostei, Characidae) from the Upper Paraná River basin, Brazil. *Genet Mol Biol*. 2005; 28(4):717-24.
- Puthalakath H, Strasser A. Keeping killers on a tight leash: transcriptional and post-translational control of the pro-apoptotic activity of BH3-only proteins. *Cell Death Differ*. 2002; 9(5):505-12.
- Quagio-Grassiotto I, Grier H, Mazzoni TS, Nóbrega RH, Amorim JPA. Activity of the ovarian germinal epithelium in the freshwater catfish, *Pimelodus maculatus* (Teleostei: Ostariophysi: Siluriformes): germline cysts, follicle formation and oocyte development. *J Morphol*. 2011; 272(11):1290-1306.
- Rajalakshmi M. Atresia of oocytes and ruptured follicles in *Gobius giuris* (Hamilton-Buchanan). *Gen Comp Endocrinol*. 1966; 6(3):378-85.
- Repnik U, Stoka V, Turk V, Turk B. Lysosomes and lysosomal cathepsins in cell death. *Biochim Biophys Acta*. 2012; 1824(1):22-33.
- Rizzo E, Bazzoli N. Follicular atresia in curimatá-pioa *Prochilodus affinis* Reinhardt, 1874 (Pisces, Characiformes). *Rev Bras Biol*. 1995; 55(4):697-703.
- Rossini BC, Oliveira CAM, Melo FAG, Bertaco VA, Astarloa JMD, Rosso JJ, Foresti F, Oliveira C. Highlighting *Astyanax* species diversity through DNA barcoding. *PLoS One*. 2016; 11(12):e0167203.
- Saidapur SK. Follicular atresia in the ovaries of non mammalian vertebrates. *Int Rev Cytol*. 1978; 54:225-44.
- Santos HB, Rizzo E, Bazzoli N, Sato Y, Moro L. Ovarian regression and apoptosis in the South American teleost *Leporinus taeniatus* Lütken (Characiformes, Anostomidae) from the São Francisco Basin. *J Fish Biol*. 2005; 67(5):1446-59.
- Santos HB, Thomé RG, Arantes FP, Sato Y, Bazzoli N, Rizzo E. Ovarian follicular atresia is mediated by heterophagy, autophagy, and apoptosis in *Prochilodus argenteus* and *Leporinus taeniatus* (Teleostei: Characiformes). *Theriogenology*. 2008; 70(9):1449-60.
- Schulz RW, França LR, Lareyre JJ, Legac F, Chiarini-Garcia H, Nóbrega RH, Miura T. Spermatogenesis in fish. *Gen Comp Endocrinol*. 2010; 165(3):390-411.
- Selman K, Wallace RA. Review cellular aspects of oocyte growth in teleosts. *Zool Sci*. 1989; 6:211-31.
- Shintani T, Klionsky DJ. Autophagy in health and disease: a double-edged sword. *Science*. 2004; 306(5698):990-5.
- Sriramulu V, Rajalakshmi M. Origin of a new crop of oocytes in *Gobius giuris* (Hamilton-Buchanan). *Z Mikrosk Anat Forsch*. 1966; 75(1):64-73.
- Suzuki HI, Bulla CK, Agostinho AA, Gomes LC. Estratégias reprodutivas de assembleias de peixes em reservatórios. In: Rodrigues L, Thomaz SM, Agostinho AA, Gomes LC (eds.).

Biocenose em reservatórios: padrões espaciais e temporais. São Carlos: Rima Editora; 2005. p. 223-36.

Suzuki HI, Vazzoler AEAM, Marques EE, Lizama MAP, Inada P. Reproductive ecology of the fish assemblages. In: Thomaz SM, Agostinho AA, Hahn NS (eds.). The upper Paraná River and its floodplain: physical aspects, ecology and conservation. Leiden: Backhuys Publishers; 2004. p. 271-91.

Takle H, Andersen Ø. Caspases and apoptosis in fish. J Fish Biol. 2007; 71(Suppl. C):326-49.

Thomé RG, Santos HB, Arantes FP, Domingos FFT, Bazzoli N, Rizzo E. Dual roles for autophagy during follicular atresia in fish ovary. Autophagy. 2009; 5(1):117-9.

Thomé RG, Santos HB, Arantes FP, Prado PS, Domingos FFT, Sato Y, Bazzoli N, Rizzo E. Regression of post-ovulatory follicles in *Prochilodus costatus* Valenciennes, 1850 (Characiformes, Prochilodontidae). Braz J Morphol Sci. 2006; 23(3-4):495-500.

Tokarz RR. Oogonial proliferation, oogenesis and folliculogenesis in nonmammalian vertebrates. In: Jones RE (ed.). The vertebrate ovary: Comparative Biology and Evolution. New York: Plenum Press; 1978. p. 145-79.

Tyler CR, Sumpter JP. Oocyte growth and development in teleosts. Rev Fish Biol Fisher. 1996; 6(3):287-318.

Vazzoler AEAM. Biologia da reprodução de peixes teleósteos: teoria e prática. Maringá: Eduem; 1996. 169 p.

Vazzoler AEAM, Menezes NA. Síntese dos conhecimentos sobre o comportamento reprodutivo dos Characiformes da América do Sul (Teleostei, Ostariophysi). Rev Bras Biol. 1992; 52(4):627-40.

Veregue AML, Orsi ML. Biologia reprodutiva de *Astyanax scabripinnis paranae* (Eigenmann) (Osteichthyes, Characidae), do ribeirão das Marrecas, bacia do rio Tibagi, Paraná. Rev Bras Zool. 2003; 20(1):97-105.

Wallace RA, Sellman K. Cellular and dynamic aspects of oocyte growth in teleosts. Am Zool. 1981; 21(2):325-43.

Weitzman SH, Malabarba LR. Perspectives about the phylogeny and classification of the Characidae (Teleostei, Characiformes). In: Malabarba LR, Reis RE, Vari RP, Lucena ZMS, Lucena CAS (eds.). Phylogeny and Classification of Neotropical Fishes. Porto Alegre: Edipucrs; 1998. p. 161-70.

Wood AW, Van der Kraak GJ. Apoptosis and ovarian function: novel perspectives from the teleosts. Biol Reprod. 2001; 64(1):264-71.

Wood AW, Van der Kraak G. Yolk proteolysis in rainbow trout oocytes after serum-free culture: evidence for a novel biochemical mechanism of atresia in oviparous vertebrates. Mol Reprod Dev. 2003; 65(2):219-27.

Yamamoto K. Studies on the formation of fish eggs. I. Annual cycle in the development of the ovarian eggs in the flounder, *Lipsetta obscura*. J Fac Sci Hokkaido Univ. 1956; 12(3):362-73.

CAPÍTULO 2 – DESENVOLVIMENTO OVARIANO E PERFIL REPRODUTIVO DE *Astyanax altiparanae* (TELEOSTEI, CHARACIDAE) AO LONGO DE UM ANO E SUA APLICAÇÃO NA PISCICULTURA

2.1 INTRODUÇÃO

O conhecimento das características reprodutivas de peixes é fundamental para que se entendam as adaptações desenvolvidas pela espécie para maximizar o sucesso reprodutivo em um determinado ambiente (Mazzoni et al., 2005). Estudos envolvendo a biologia reprodutiva de peixes possuem diversas possibilidades de abordagem, como o entendimento do desenvolvimento gonadal e do ciclo reprodutivo da espécie. O desenvolvimento gonadal pode ser analisado macroscopicamente com as alterações de forma, tamanho, cor e textura das gônadas (Wallace, Sellman, 1981; Vazzoler, 1996). No entanto, a análise dos caracteres microscópicos possibilita uma descrição mais detalhada e precisa das transições e transformações morfológicas e estruturais que acontecem durante esse desenvolvimento (Kjesbu et al., 2003; Honji et al., 2006). Para fêmeas, o entendimento das características morfológicas dos oócitos é importante para a compreensão da dinâmica da oogênese, e, por consequência, do ciclo reprodutivo (Tyler, Sumpter, 1996).

Os ciclos reprodutivos representam o desenvolvimento gonadal necessário para que peixes adultos desovem no tempo apropriado; também incluem a remoção de oócitos residuais por atresia e regeneração do epitélio germinativo para o próximo período de desova (Lowerre-Barbieri et al., 2011). E a compreensão do desenvolvimento gonadal em diferentes escalas de tempo e suas interações podem melhorar o entendimento que se tem sobre a reprodução de peixes (Lowerre-Barbieri et al., 2011). Ainda, as investigações sobre o ciclo reprodutivo de uma dada espécie ajudam a definir fatores determinantes para as diferentes fases de desenvolvimento gonadal, assim como os “gatilhos” que desencadeiam o processo de proliferação e diferenciação celular na formação de gametas (Vazzoler, 1996).

O mecanismo de proliferação celular é um processo altamente regulado e essencial para a manutenção da homeostase ovariana (Krysko et al., 2008). Em contraste com os mamíferos, oogônias continuam proliferando em fêmeas adultas de peixes (Tokarz, 1978), renovando, assim, os estoques de oócitos jovens e folículos (Jalabert, 2005; Nakamura et al., 2011). No entanto, a mitose de oogônias em peixes é mais intensamente constatada no final de cada ciclo reprodutivo (Krysko et al., 2008), quando os tecidos ovarianos são reorganizados (Billard, 1987). Esta característica marca o início de um novo ciclo.

Durante o ciclo reprodutivo, o crescimento do oócito é iniciado e modificado de várias maneiras, visando o sucesso reprodutivo da espécie (Mazzoni et al., 2005). Neste sentido, a ordem Characiformes compreende um grupo de espécies de grande importância para estudos sobre sucesso reprodutivo e relacionados com as estratégias reprodutivas em piscicultura: a maioria das espécies desta ordem precisam realizar migração reprodutiva e a desova tende a não ocorrer quando os mesmos estão confinados, apesar das fêmeas apresentarem o desenvolvimento oocitário normal (Mylonas, Zohar, 2007)

A ordem Characiformes é composta de pelo menos 24 famílias, cerca de 520 gêneros e 2300 espécies (Nelson et al., 2016). Apresenta grande importância comercial relacionada com alimentação humana, a exemplo das espécies do gênero *Astyanax* (Porto-Foresti et al., 2005), além de ter importância ecológica e acadêmica. O gênero *Astyanax* compreende peixes de água doce e é amplamente distribuído na região Neotropical. Das espécies que compõem este gênero, *Astyanax altiparanae*, popularmente conhecido como lambari-do-rabo-amarelo ou tambuí, tornou-se um peixe comercial atraente para os piscicultores por causa da facilidade associada à produção de alevinos, rápido crescimento, resistência e simples manipulação desta espécie (Gonçalves et al., 2014). Dada a sua importância, o estudo aprofundado dos caracteres ovarianos nesta espécie pode auxiliar no desenvolvimento biotecnológico aplicado à reprodução de teleósteos em cativeiro.

2.2 OBJETIVOS

Este estudo teve como objetivos:

- (1) descrever a morfologia ovariana de *Astyanax altiparanae*, levando em consideração caracteres macro e microscópicos;
- (2) caracterizar o desenvolvimento das células germinativas, bem como as células foliculares associadas a estas, presentes nos ovários de *Astyanax altiparanae*, considerando aspectos estruturais e ultraestruturais;
- (3) caracterizar o ciclo reprodutivo desta espécie em cativeiro, com base nas variações quantitativas da razão gonadossomática, dos tipos celulares germinativos e da proporção de oogônias em proliferação;
- (4) relacionar esses dados com as exigências de produção e manejo existentes na piscicultura.

2.3 MATERIAL E MÉTODOS

2.3.1 *Manutenção dos espécimes e manejo reprodutivo*

Foram realizadas coletas de março/2013 a fevereiro/2014 no Setor de Hidrobiologia e Aquicultura da Companhia Energética de São Paulo, em Paraibuna (CESP – Paraibuna), São Paulo, Brasil (23°24'51''S, 45°35'59''O). Os espécimes utilizados eram parte de um lote produzido a partir de um manejo reprodutivo feito anteriormente na própria CESP. Os indivíduos tinham um ano de idade, com comprimento padrão entre 7,6 – 11,7 cm ($9,94 \pm 0,49$) e peso total entre 12,94 – 49,87 g ($30,15 \pm 4,73$). O material testemunho foi depositado no Museu de Zoologia da Universidade de São Paulo (MZUSP 113746).

Espécimes machos e fêmeas foram mantidos em tanque de cimento de 200 m³ (20 x 10 x 1 m) numa densidade de 10-15 peixes m⁻³ ou $\approx 500\text{g m}^{-3}$ com iluminação natural e arraçoados diariamente, duas vezes ao dia, com ração comercial (Nutripiscis, 32% P.B.). Estes tanques apresentavam renovação de água constante, com a água da própria represa. A qualidade da água da represa foi aferida em dois pontos, bimensalmente, durante o período de coleta. Assim, os parâmetros médios de qualidade da água no tanque foram: condutividade elétrica = $30,07 \pm 2,91 \mu\text{S cm}^{-1}$; oxigênio dissolvido = $6,80 \pm 1,12 \text{ mg L}^{-1}$; pH = $7,11 \pm 0,40$; temperatura da água = $22,93 \pm 3,28 ^\circ\text{C}$; turbidez = $4,56 \pm 1,52 \text{ UNT}$. Os dados detalhados são apresentados na Tabela 2.1. O número amostral foi de 15 fêmeas por mês, deste tanque.

Durante o período reprodutivo desta espécie, que ao que se sabe se estende de outubro a fevereiro, foram selecionados lotes de reprodutores. Estes lotes foram separados em três tanques de 10 m³ (2 x 5 x 1 m): dois tanques com espécimes fêmeas (n = 120, cada) e um tanque com espécimes machos (n = 200). A diferenciação entre fêmeas e machos foi feita com base no seu dimorfismo sexual, sendo que os machos apresentam espículas na nadadeira anal (Garutti, Britski, 2000). Os espécimes nesses tanques receberam o mesmo suprimento de água (i.e. água da própria represa) e o mesmo regime de arraçoamento que aqueles que tinham sido mantidos no tanque de 200 m³.

O manejo reprodutivo foi feito uma vez por mês e somente um tanque de fêmeas foi utilizado. O outro tanque com fêmeas foi mantido como grupo controle, o qual não foi manejado para reproduzir em nenhum momento durante o período de coletas. O manejo reprodutivo utilizado neste estudo já foi brevemente descrito por Chehade et al. (2015), no entanto, o método exato utilizado é descrito aqui pela primeira vez.

Na proporção de dois machos para cada fêmea, os espécimes destinados ao manejo reprodutivo foram transferidos para o laboratório onde foram colocados em um aquário de 1 m³ parcialmente cheio (40% do seu volume). Nesse aquário, os indivíduos foram mantidos por períodos mínimos de 20 horas, sem arraçoamento, com renovação constante de água (10 L min⁻¹, aproximadamente) e com entrada d'água distante da superfície em 1 m. Os parâmetros médios de qualidade da água mantidos no aquário durante o manejo foram: condutividade elétrica = $37,80 \pm 2,40$ $\mu\text{S cm}^{-1}$; oxigênio dissolvido = $6,46 \pm 0,20$ mg L⁻¹; pH = $6,88 \pm 0,25$; temperatura da água = $23,50 \pm 1,14$ °C. Estas condições culminaram com a desova semi-natural no aquário.

O número amostral foi de 15 fêmeas do grupo sem manejo e 15 fêmeas do grupo com manejo reprodutivo. Estes grupos de fêmeas foram mantidos separados para a coleta de fevereiro/2014 para a verificação do processo de recuperação dos ovários. Neste mês, não foi feito manejo reprodutivo com nenhum dos grupos.

Tabela 2.1 – Qualidade da água da barragem que abastece os tanques do Setor de Hidrobiologia e Aquicultura da Companhia Energética de São Paulo em Paraibuna, São Paulo, Brasil.

Características	Pontos de coleta	Data da coleta						
		Fev. 2013	Abr. 2013	Jun. 2013	Ago. 2013	Out. 2013	Dez. 2013	Fev. 2014
Condutividade elétrica ($\mu\text{S cm}^{-1}$)	IUNA 00850	34,00	33,00	34,00	33,00	33,00	31,00	32,00
	IUNA 00950	27,00	28,00	26,00	28,00	27,00	27,00	28,00
Oxigênio dissolvido (mg L ⁻¹)	IUNA 00850	7,50	6,70	7,10	7,30	8,40	7,30	4,50
	IUNA 00950	7,40	6,80	6,80	6,20	7,70	7,30	4,20
pH	IUNA 00850	7,60	7,40	6,50	6,80	6,70	6,70	7,70
	IUNA 00950	7,20	7,30	6,60	7,00	7,40	6,90	7,70
Temperatura da água (°C)	IUNA 00850	26,00	22,00	19,00	18,00	22,00	26,00	28,00
	IUNA 00950	26,00	22,00	20,00	18,00	22,00	25,00	27,00
Turbidez (UNT)	IUNA 00850	7,00	7,00	4,00	3,00	3,00	5,00	6,30
	IUNA 00950	4,00	5,90	3,00	6,00	3,00	3,00	3,70

O ponto de coleta IUNA 00850 está localizado em um dos braços do rio Paraitinga, perto da área de recreação da CESP; e, o ponto de coleta IUNA 00950 está localizado em um dos braços do rio Paraibuna, na junção dos braços do rio Paraibuna e os rios da Serra.

2.3.2 Coleta e análise macroscópica dos ovários

Antes de qualquer procedimento de dissecação, todos os animais foram eutanasiados com dose excessiva de anestésico (solução aquosa de benzocaina a 0,1%) até cessarem os batimentos operculares, de acordo com o procedimento aprovado pela Comissão de Ética em Experimentação Animal do ICB, USP Proc. 2013/022. Os espécimes foram fotografados e mensurados sob os valores de comprimento padrão em centímetros e peso total em gramas.

Em seguida, ambos os ovários foram dissecados, fotografados, medidos [nos eixos X e Y] e pesados separadamente. Assim, a caracterização morfológica macroscópica dos ovários foi estabelecida de acordo com os critérios de peso, comprimento e coloração, e suas variações mensais. Além disso, foi estimada a razão gonadossomática (RGS) de todas as fêmeas, que é a porcentagem que os ovários representam do peso total do indivíduo de acordo com a equação estabelecida por Vazzoler (1996): $RGS = (Po \ Pt^{-1}) \times 100$. Nesta equação, Po é o peso dos ovários (como os ovários foram pesados separadamente, o peso individual dos ovários esquerdo e direito foi somado e o valor total foi utilizado nesta fórmula) e Pt é o peso total do espécime. A variação da RGS foi comparada entre os meses, auxiliando na caracterização do ciclo reprodutivo da espécie. Após o registro macroscópico, os ovários foram fixados em Karnovsky [glutaraldeído 2% e paraformaldeído 4% em tampão Sorensen (0,1M a pH 7,2)] por 24 horas ou Paraformaldeído 4% [tamponado com solução de fosfato de sódio (0,1M a pH 7,4)] por 8 horas, sendo que estes últimos foram posteriormente mantidos em Álcool 70%. Vale ressaltar que foram usados sempre os mesmos pontos para cada técnica, conforme ilustrado na Figura 2.1.

Figura 2.1 – Representação esquemática das regiões de uso dos ovários para cada técnica de fixação (áreas delimitadas). Siglas: OE – Ovário esquerdo; OD – Ovário direito; X / Y – Eixos para medição dos ovários.

2.3.3 Análises morfológicas e ultraestruturais dos ovários

A porção dos ovários fixada em Karnovsky foi fragmentada e parte dos fragmentos foi lavada em água, desidratada em etanol 70% por 1 hora, etanol 95% por 2 horas e etanol 100% por 1 hora. Em seguida, o material foi colocado em etanol 100% adicionado à resina plástica do tipo metacrilato glicol (Historesin, Leica) na proporção de 1:1 por 2 horas, iniciando o processo de infiltração. Esse processo continuou com a troca da solução anterior por outra de resina pura sem catalisador, por uma semana. Finalmente, os fragmentos foram incluídos na mesma resina adicionada de catalisador e emblocados em moldes plásticos.

Os blocos de resina produzidos foram cortados de modo semi-seriado, a 3 µm de espessura, com aproximadamente 300 µm de distância entre cada corte, a fim de evitar a observação das mesmas estruturas entre os mesmos. Os cortes foram corados com Ácido periódico - Reativo de Schiff (PAS) + Hematoxilina férrica + Metanil Yellow (Quintero-Hunter et al., 1991) e, então, desidratados em estufa 60 °C overnight e montados com lamínula e goma de Damar. Por fim, as lâminas foram examinadas e foto-documentadas ao microscópio de luz Axioskop 2 (Zeiss Inc., EUA), acoplado com câmera AxioCam MRC5 (Zeiss Inc., EUA), e equipado com o dispositivo de captura de imagem digital ZEN 2012.

A coloração PAS + Hematoxilina férrica + Metanil Yellow foi utilizada com o intuito de observar a maior quantidade de características possíveis na microscopia de luz e facilitar a identificação das estruturas em microscopia eletrônica. Assim, na reação do método do PAS, o ácido periódico oxida grupos hidroxila em glicogênio, mucoproteínas e glicoproteínas, convertendo-os a grupamentos aldeídicos que, por sua vez, combinam com o reagente de Schiff (incolor) formando um complexo colorido (em magenta), destacando principalmente estruturas como a membrana basal, fibrinas, muco, coloides. Já a hematoxilina férrica segue a regra básica de coloração com hematoxilina: faz parte de um grupo de corantes que se comportam como cátions e tem caráter básico, assim os componentes dos cortes que contêm muitos grupos ácidos tem afinidade por estes corantes, como as proteínas, ricas em radicais amina, o núcleo e o retículo endoplasmático rugoso. No entanto, devido à associação da hematoxilina com o óxido de ferro, observa-se uma coloração castanha, em vez de púrpura. Por fim, o metanil yellow é um contra corante ácido utilizado com a finalidade de contrastar os componentes basófilos corados anteriormente com a hematoxilina férrica, com aqueles acidófilos, agora corados em amarelo ou alaranjado (Quintero-Hunter et al., 1991).

Para a análise dos caracteres microscópicos foi considerada, então, a identificação e descrição dos tipos celulares germinativos e somáticos, e suas respectivas características com

base nas afinidades tintoriais, como proposto por Grier (2012). Além disso, foi medido o eixo de maior comprimento celular (CC) e nuclear (CN) de 50 células germinativas por estágio de desenvolvimento, e, então, calculado o valor médio e o desvio padrão em micrômetros. Para um detalhamento estrutural mais pormenorizado dos tipos celulares foi utilizada a microscopia eletrônica de transmissão (MET).

Assim, outros fragmentos dos ovários fixados em Karnovsky foram preparados para MET. Os fragmentos foram pós-fixados por 2h no escuro em 1% de tetróxido de ósmio em tampão Sorensen (0,1M a pH 7,2), contrastados com solução aquosa de 5% de uranila por 2 horas, desidratados em acetona e embebidos em resina Epon. Primeiramente os blocos foram utilizados para a confecção de cortes semi-finos, a fim de selecionar uma área mais específica para a observação ao microscópio eletrônico de transmissão. Após seleção das áreas, as amostras foram seccionadas em ultramicrotomo equipado com navalha de diamante, contrastadas com solução saturada de acetato de uranila em 50% de etanol e citrato de chumbo. Finalmente, o material foi foto-documentado ao microscópio eletrônico de transmissão Jeol 1010 (Jeol Inc., Japão) equipado com dispositivo de captura de imagem digital Gatan, com câmera SC1000 Orius acoplada (Gatan Inc., EUA).

2.3.4 Análises do ciclo reprodutivo

Para o estabelecimento das fases do ciclo reprodutivo foi utilizada a análise quantitativa das células germinativas por meio do cálculo de proporção das classes celulares, mensalmente, de acordo com Quagio-Grassiotto et al. (2011). Para a contagem das células germinativas, todas as células foram contadas em seis cortes histológicos, por indivíduo, para todos os indivíduos e todos os meses. A nomenclatura adotada para descrever o ciclo reprodutivo está de acordo com o trabalho de Brown-Peterson et al. (2011).

Além disso, foi comparada a proporção de oogônias imunomarcadas, ao longo dos meses, a partir de um ensaio de imunoperoxidase para a proliferação celular, a fim de determinar o período de repovoamento dos ovários. Nesta técnica de imunoperoxidase foram contadas todas as oogônias presentes em quatro cortes por indivíduo, e foram selecionados aleatoriamente cinco indivíduos por mês. Para os meses com o processo de manejo reprodutivo, foram selecionados cinco indivíduos de cada grupo.

Para preparar as lâminas do teste de imunoperoxidase, os fragmentos de ovário utilizados foram fixados em Paraformaldeído 4%. Estes fragmentos foram transferidos para cassetes de processamento histológico e lavados em água corrente por 4 horas para tirar o

excesso de fixador. Depois, foram desidratados duas vezes em etanol 70% por 1 hora e meia cada, uma vez em etanol 95% por 1 hora, duas vezes em etanol 100% por 1 hora cada. O material foi então diafanizado em xilol, duas vezes de 1 hora cada, e infiltrado em paraplast em três turnos de 12 horas cada. Por fim, os fragmentos foram incluídos em paraplast com o auxílio de moldes metálicos.

Os blocos foram cortados de modo semi-seriado, a 5 µm de espessura, com aproximadamente 300 µm de distância entre cada um a fim de evitar a observação das mesmas estruturas entre os cortes. Os cortes foram dispostos em lâminas pré-preparadas com Poli-L-Lisina e deixados secar em estufa a 37 °C por um dia, a fim de garantir a fixação dos mesmos na lâmina. Estas lâminas foram mantidas a -20 °C e, quando separadas para a técnica, foram deixadas 24 horas em estufa a 60 °C para o início do processo de desparafinização.

Em seguida, os cortes foram desparafinizados em xilol, duas vezes de 20 minutos cada, hidratados em série alcoólica [etanol 100% por 20 minutos, etanol 95% por 10 minutos e etanol 70% por 10 minutos], lavados em água corrente por 10 minutos e em tampão tris salino com Tween-20 0,05% (TBS-T pH 7,2) por mais 10 minutos. Posteriormente, foi feita recuperação antigênica em tampão citrato pH 6,0 por 20 minutos a 90 °C em banho-maria, os cortes foram deixados na mesma solução para esfriar por mais 10 minutos e então foram lavados novamente em TBS-T por 5 minutos.

Os cortes foram, então, secos em seu entorno e circulados com caneta hidrofóbica (Kyota, K-600). Para os bloqueios de peroxidase endógena e dos sítios inespecíficos, foram utilizadas as soluções Hydrogen peroxidase block e Protein block, respectivamente, do Kit Spring Reveal - Biotin-Free Polyvalent DAB (SPD-125). Os bloqueios foram de 2 horas cada e entre eles foi feita uma lavagem com TBS-T por 5 minutos.

As lâminas foram, então, incubadas overnight, em câmara úmida a 4 °C utilizando o anticorpo primário Anti-PCNA (1:10.000) [clone PC10: ab29, Abcam]. Após a incubação, as lâminas foram lavadas em TBS-T por 5 minutos e foi realizado o tratamento [Complement + Conjugate], conforme estabelecido na bula do Kit Spring Reveal. Os cortes foram novamente lavados em TBS-T por 5 minutos e revelados com 3-3' diaminobenzidina (DAB). Em seguida, as lâminas reveladas foram contra-coradas com Hematoxilina de Mayer por 3 minutos, lavadas em água corrente por 1 minuto, diferenciadas em carbonato de lítio, e lavadas novamente em água corrente por 1 minuto. As lâminas foram desidratadas em concentrações crescentes de etanol, etanol+xilol e xilol, e montadas com lamínula e goma de Damar. Por fim, as lâminas foram analisadas ao microscópio de luz (Axioskop 2, Zeiss Inc.,

EUA). Para o controle negativo, o anticorpo primário foi substituído por TBS-T em alguns cortes.

2.3.5 Análises estatísticas

Todos os resultados quantitativos obtidos foram testados para verificação de distribuição normal com o teste de Lilliefors. Para dados com distribuição normal foi utilizado o teste ANOVA e o teste t de Student. Já para os dados com distribuição não-normal foi utilizado o teste de Kruskal-Wallis e o teste pareado de Wilcoxon, para cada tratamento. Os testes foram realizados no programa Systat 10, e o valor de significância foi determinado em $p \leq 0,05$.

2.4 RESULTADOS

2.4.1 Características macroscópicas dos ovários

Os ovários são órgãos pares, ovóides e altamente vascularizados, localizados na cavidade celomática (Figura 2.2). Não houve diferença em relação ao desenvolvimento macroscópico dos ovários entre os grupos com e sem manejo reprodutivo.

Figura 2.2 – Fêmea de *Astyanax altiparanae*. (A) Espécime adulto coletado na CESP-Paraibuna; (B) Espécime dissecado com ovário aparente (seta); (C) Ovário em vista dorsal e ventral: destaque para sua extensa vascularização (vc) e oócitos (oc) visíveis a olho nu. Barras: 1 cm.

No entanto, a coloração parece variar de acordo com o tamanho e o peso dos ovários, e estes parecem se alterar ao longo do desenvolvimento ovariano. Assim, ovários apresentavam-se primeiramente com coloração castanha e tamanho intermediário (Tabela 2.2). Conforme os ovários se desenvolviam, estes apresentavam-se mais cinzas e consideravelmente maiores que os demais, enquanto que após a desova os mesmos estavam vermelhos e notadamente menores que os anteriores (Tabela 2.2; Figura 2.3A).

Os dados de tamanho e peso (Tabela 2.2) corroboram com a delimitação dos grupos acima. A análise de variância das cores dos ovários com relação ao seu peso também confirma a separação por este critério ($H = 112,140$; $p < 0,001$). Assim, ovários castanhos, cinzas e vermelhos formam grupos de pesos diferentes entre si ($p < 0,001$) (Figura 2.3C). Ainda, a ordenação do progresso do desenvolvimento ovariano a partir das colorações dos ovários pode ser corroborada com a representação de frequência (Figura 2.3B). Neste gráfico é possível observar que:

- Ovários castanhos estiveram mais presentes no período de março a agosto/2013;
- Houve um pico de ovários cinzas em setembro/2013, logo antes de se iniciar o processo de manejo reprodutivo, e também em picos alternados para os espécimes que não foram manejados;
- Os picos de ovários cinzas foram alternados com picos de ovários vermelhos dos espécimes manejados para reproduzir, e portanto desovados;
- Por fim, houve um último pico de ovários cinzas para ambos os grupos; estes grupos foram mantidos separados, mas nenhum dos dois grupos foi manejado para reproduzir.

Tabela 2.2 – Tamanho (cm) e peso (g) médios ($\pm$ desvio padrão) dos ovários de *Astyanax altiparanae* agrupados conforme sua coloração.

Coloração	Ovário esquerdo			Ovário direito		
	Peso	Comprimento	Largura	Peso	Comprimento	Largura
Castanho	2,02	2,89	1,76	2,13	3,02	1,83
	($\pm 1,14$)	($\pm 0,65$)	($\pm 0,57$)	($\pm 1,10$)	($\pm 0,66$)	($\pm 0,59$)
Cinza	2,90	3,38	2,20	3,08	3,54	2,27
	($\pm 1,05$)	($\pm 0,49$)	($\pm 0,38$)	($\pm 1,16$)	($\pm 0,54$)	($\pm 0,46$)
Vermelho	0,51	1,78	1,13	0,55	2,01	1,14
	($\pm 0,13$)	($\pm 0,29$)	($\pm 0,21$)	($\pm 0,12$)	($\pm 0,34$)	($\pm 0,14$)

Figura 2.3 – Características macroscópicas dos ovários. A) Progressão do desenvolvimento ovariano observado pela variação na coloração dos ovários: primeiramente castanhos (Ct), depois cinzas (Cz) e, por fim, vermelhos (Vm) (* - evidencia a grande vascularização do órgão ao longo do seu desenvolvimento); B) Frequência total dos ovários, conforme sua cor, ao longo dos meses de coleta separando os grupos com (+) e sem (-) manejo reprodutivo; C) Variação das cores dos ovários com relação ao peso ($H = 112,140$; $p < 0,001$): ovários de diferentes colorações formam grupos de pesos completamente diferentes entre si (+ e ++ representam a diferença estatística de $p < 0,001$ entre os grupos).

2.4.2 Características microscópicas e ultraestruturais dos ovários

Como não houve diferença em relação às características microscópicas dos ovários entre os grupos com e sem manejo reprodutivo, a descrição de tipos celulares é apresentada de acordo com o seu desenvolvimento. Assim, os ovários são do tipo cistovário, cavitários, com o compartimento germinativo em forma de lamelas que se projetam em direção à luz do órgão

(Figura 2.4A). Margeando as lamelas ovígeras e delimitando o lúmen ovariano, o epitélio germinativo apresenta dois tipos celulares: as células germinativas e as células somáticas (Figura 2.4B). As oogônias ($CC = 11,6 \pm 2,3 \mu\text{m}$; $CN = 7,2 \pm 1,6 \mu\text{m}$) são as primeiras células germinativas da linhagem oogênica e podem apresentar-se isoladas ou em ninhos, conforme o avanço das divisões mitóticas (Figura 2.4C). Elas caracterizam-se por possuir núcleo esférico, um ou dois nucléolos e citoplasma acidófilo (Figura 2.4C). Em microscopia eletrônica, estas células são mais eletrôn-lúcidas que as demais células germinativas e seu citoplasma apresenta-se repleto de mitocôndrias, diversas nuages próximas à membrana nuclear, um complexo de Golgi proeminente e a *lamela annulata* (Figura 2.4D).

Com a formação dos ninhos, é possível observar a associação de células pré-foliculares, as quais acompanharão as oogônias ao longo do seu desenvolvimento (Figura 2.4C-D). Nesses ninhos algumas células podem permanecer indiferenciadas ou se comprometer com a foliculogênese, iniciando o processo de meiose e dando origem aos oócitos iniciais (Figura 2.4C).

O oócito inicia seu crescimento primário e encontra-se na etapa de Nucléolo Único ($CC = 19,3 \pm 4,7 \mu\text{m}$; $CN = 10,5 \pm 3,5 \mu\text{m}$). Nessa etapa, eles apresentam o núcleo esférico e citoplasma levemente basófilo (Figura 2.4E). A partir desse momento, o núcleo passa a ser chamado de vesícula germinativa e as células do entorno passam a ser chamadas de células foliculares. Estas células constituem, juntamente com o oócito, o folículo ovariano inicial que permanece conectado ao epitélio germinativo (Figura 2.4E-F). Em microscopia eletrônica, o oócito apresenta citoplasma com grupos de mitocôndrias e nuages espalhados próximos à vesícula germinativa (Figura 2.4G). É possível constatar também o início do desenvolvimento de pequenos microvilos que se estendem do oócito em direção às células foliculares, as quais possuem núcleo e citoplasma afilado (Figura 2.4H).

A próxima etapa de desenvolvimento se caracteriza pelo aparecimento de Múltiplos Nucléolos centrais ($CC = 67,7 \pm 21,1 \mu\text{m}$; $CN = 27,2 \pm 9,1 \mu\text{m}$), citoplasma altamente basófilo e a vesícula germinativa com contorno regular (Figura 2.5A). Esta etapa é logo substituída pela seguinte, no qual os vários nucléolos apresentam-se deslocados para a periferia da vesícula germinativa e caracterizam os oócitos Perinucleolares ($CC = 139,5 \pm 40,3 \mu\text{m}$; $CN = 59,4 \pm 21,3 \mu\text{m}$; Figura 2.5B). Nesta etapa, a vesícula germinativa passa a apresentar um contorno irregular e é possível observar diversas nuages e o aparecimento de corpúsculos de Balbiani (Figura 2.5B-D). As nuages aparecem como áreas de coloração menos intensa no citoplasma e têm um aspecto granular e altamente eletrôn-denso quando em microscopia eletrônica, normalmente associadas com mitocôndrias (Figura 2.5B-C). Já os

corpúsculos de Balbiani aparecem como áreas menos eletrôn-densas associadas a mitocôndrias e retículo endoplasmático rugoso (Figura 2.5D).

A etapa Perinucleolar abrange, também, o início do desenvolvimento da zona pelúcida (Figura 2.5B). Assim, é possível observar o desenvolvimento de microvilos a partir do oócito em direção às células foliculares, apesar destas ainda não apresentarem estas extensões (Figura 2.5E). No entorno do oócito, nota-se a associação de uma nova camada de células somáticas, a camada da teca (Figura 2.5B e F), acima da membrana basal sintetizada pelas células foliculares. Estas novas células, conforme se associam com os oócitos em desenvolvimento, apresentam membrana plasmática repleta de vesículas (Figura 2.5F).

Em sequência, o oócito passa para a etapa Alvéolo Cortical ($CC = 246,6 \pm 44,0 \mu\text{m}$; $CN = 98,6 \pm 27,5 \mu\text{m}$), na qual a vesícula germinativa apresenta um contorno ainda mais irregular; há o aparecimento de alvéolos e um desenvolvimento mais expressivo da zona pelúcida na periferia do oócito (Figura 2.6A). Esta última passa a apresentar camadas distintas de microvilos, uma camada mais numerosa e desenvolvida partindo do oócito e outra mais curta a partir das células foliculares, mas já em contato com os microvilos do oócito (Figura 2.6B-C). A superfície oocitária também apresenta características próprias desta etapa, como a presença de numerosas vesículas para a incorporação de substâncias pelo oócito, a partir das células foliculares (Figura 2.6C-D). Ainda, os alvéolos corticais encontram-se margeando a superfície oocitária, onde se tornam progressivamente mais numerosos constituindo múltiplas vesículas, apresentando frequentemente corpos lamelares em seu interior (Figura 2.6A e D-E). Além disso, o citoplasma começa a apresentar diversas mitocôndrias, complexos de Golgi e retículo endoplasmático rugoso (Figura 2.6B e D-E).

Observa-se, ainda nesta etapa, a estruturação de uma pequena abertura no oócito, conhecida como aparelho micropilar (Figura 2.6A e F), através da qual o espermatozoide poderá penetrar o oócito. Assim, é possível constatar uma região côncava na zona pelúcida que se afunila em direção à membrana plasmática. Nota-se, ainda, uma célula altamente especializada e hipertrofiada na camada folicular recobrimdo esta concavidade, que se denomina célula micropilar, por vedar o poro ou canal micropilar. Estas características marcam o final do estágio de crescimento primário.

Figura 2.4 – Histologia ovariana. A) Os ovários são do tipo cistovário, cavitários, com o compartimento germinativo sob a forma de lamelas (linha tracejada), que se projetam em direção à luz do órgão (seta); B) Epitélio germinativo composto por células germinativas (setas duplas) e células somáticas (setas); C) Oogônias: núcleo esférico (N), um ou dois nucléolos (NI) e citoplasma acidófilo, podem se apresentar isoladas (círculo) ou em ninhos (retângulo) formados por células pré-foliculares (Pfc), e ainda algumas podem comprometer com a foliculogênese e iniciar o processo de meiose (Mei); D) Em microscopia eletrônica, oogônias são células eletron-lúcidas e seu citoplasma tem abundantes mitocôndrias (Mi), várias nuages (Ng) próximas ao núcleo (N), complexo de Golgi (CG) proeminente e lamela annulata (circulado), e é circundada por células pré-foliculares (Pfc) e membrana basal (Mb); E-F) Em microscopia de luz e eletrônica na sequência, oócitos em etapa Nucléolo Único: vesícula germinativa esférica (VG), um nucléolo (NI) e citoplasma ligeiramente basófilo, e as células circundantes são agora chamadas células foliculares (Fc); G) Em maior aumento, é possível observar grupos de mitocôndrias (Mi) e nuages (Ng) dispersos perto da vesícula germinativa (VG); H) Desenvolvimento inicial de pequenos microvilos (Mv) que se estendem a partir do oócito em direção às células foliculares (Fc). (A-C, E) Coradas com PAS + Hematoxilina férrica + Metanil Yellow; (D, F-H) Microscopia Eletrônica de Transmissão.

Figura 2.5 – Oócitos em etapas Múltiplos Núcleolos e Perinucleolar. A) Oócito em Múltiplos Núcleolos (NI): citoplasma altamente basófilo e vesícula germinativa (VG) com contorno regular; B) Oócitos em Perinucleolar: vesícula germinativa (VG) com contorno irregular, no qual vários núcleolos (NI) estão apoiados, presença de várias nuages (Ng) e aparecimento do corpúsculo de Balbiani (área tracejada), a zona pelúcida (ZP) parece mais proeminente e observa-se uma nova camada de células, chamadas células da teca (Tc); C) Nuage (Ng) com aspecto granular e altamente eletrondensa em microscopia eletrônica, normalmente associada a mitocôndrias (Mi); D) Corpúsculo de Balbiani (área tracejada) associado ao retículo endoplasmático rugoso (RER); E) Início do desenvolvimento da zona pelúcida com microvilos (Mv) partindo do oócito em direção às células foliculares (Fc); F) Nova camada de células somáticas acima da membrana basal (Mb) sintetizada pelas células foliculares (Fc): camada de células da teca (Tc), esta por sua vez apresenta uma membrana plasmática com várias vesículas (V). (A-B) Coradas com PAS + Hematoxilina férrica + Metanil Yellow; (C-F) Microscopia Eletrônica de Transmissão.

Figura 2.6 – Oócitos em etapa Alvéolo Cortical. A) Vesícula germinativa (VG) com contorno irregular, aparecimento de alvéolos (Al) na periferia do oócito, desenvolvimento expressivo da zona pelúcida (ZP), e o início da estruturação do aparelho micropilar (área tracejada); B) Em microscopia eletrônica: células da teca (Tc), membrana basal (Mb) e células foliculares (Fc), estas últimas compõe juntamente com o oócito a zona pelúcida (ZP), que apresenta uma camada mais numerosa e desenvolvida de microvilos a partir da oócito (co) e outra mais curta das células foliculares (cf), ainda o citoplasma do oócito apresenta alvéolos corticais (Al), várias mitocôndrias (Mi) e um retículo endoplasmático rugoso bem desenvolvido (RER); C) Ênfase na zona pelúcida (ZP) com as duas camadas de microvilos (co e cf), e a superfície do oócito também apresenta numerosas vesículas (V); D-E) Ênfase nos alvéolos corticais (Al) que se tornam progressivamente mais numerosos e muitas vezes têm corpos lamelares (Cl) no interior, e o citoplasma do oócito está repleto de vesículas (V), mitocôndrias (Mi), complexos de Golgi (CG) e retículo endoplasmático rugoso (RER); F) Início da estruturação do aparelho micropilar (área tracejada). (A, F) Coradas com PAS + Hematoxilina férrica + Metanil Yellow; (B-E) Microscopia Eletrônica de Transmissão.

O oócito inicia o estágio de crescimento secundário com um novo aumento de volume que se deve à incorporação de vitelo que, a princípio, é observado como pequenas vesículas esféricas dispersas abaixo dos alvéolos corticais (CC = $335,7 \pm 34,9 \mu\text{m}$; CN = $124,9 \pm 26,7 \mu\text{m}$; Figura 2.7A). A vesícula germinativa possui contorno altamente irregular (Figura 2.7A), a zona pelúcida fica mais espessa e as microvilosidades do oócito e das células foliculares alongam-se (Figura 2.7B). Oócitos em crescimento secundário em etapa Avançada (CC = $460,0 \pm 66,6 \mu\text{m}$; CN = $148,8 \pm 26,8 \mu\text{m}$) apresentam vesículas de vitelo com diâmetro máximo, apesar de ser possível observar vesículas com diversos tamanhos (Figura 2.7C-D). Por fim, quando o crescimento secundário está em etapa Completa (CC = $643,5 \pm 133,0 \mu\text{m}$; CN = $157,9 \pm 41,6 \mu\text{m}$), o oócito tem o citoplasma repleto de vesículas de vitelo (Figura 2.7E), a zona pelúcida está com seu desenvolvimento completo (Figura 2.7F) e o aparelho micropilar apresenta-se totalmente formado (Figura 2.7G).

No estágio de maturação, foi possível observar a quebra da vesícula germinativa e a coalescência das vesículas de vitelo (CC = $685,0 \pm 117,1 \mu\text{m}$; Figura 2.8A). Na ovulação, a camada de células foliculares, a membrana basal e a camada de células da teca se partem coordenadamente, criando uma abertura através da qual o oócito se move do folículo para o lúmen ovariano (Figura 2.8B). As camadas de células remanescentes após a liberação do oócito formam o complexo pós-ovulatório. O complexo pós-ovulatório (Figura 2.8C-D) involui gradualmente até constituir um aglomerado maciço de células e restos celulares e, no processo, características específicas e progressivas estão presentes, tais como: células foliculares colunares, com núcleo periférico e muitos vacúolos; acúmulo de um pigmento amarelo-acastanhado (grânulos de lipofuscina); aumento da vascularização na camada de células da teca; e fragmentação da membrana basal. Da mesma forma, os oócitos atresícos (Figura 2.8E-F), que são aqueles que não foram desovados durante a estação reprodutiva, também passam por fases de degeneração e reabsorção, as quais apresentam características como: ruptura do envelope nuclear; cisão da zona pelúcida e extravasamento do vitelo; células foliculares colunares com características fagocíticas; aumento da vascularização da camada de células da teca; e redução progressiva do volume do oócito.

Figura 2.7 – Oócitos em estágio de crescimento secundário. A-B) Etapa Inicial: vesículas de vitelo (Vt) são vistas como pequenas vesículas esféricas dispersas abaixo dos alvéolos corticais (Al), vesícula germinativa (VG) com contorno altamente irregular, a zona pelúcida (ZP) espessa e os microvilos do oócito e das células foliculares (Fc) se alongam; C-D) Etapa Avançada: vesículas de vitelo (Vt) com diâmetro máximo, embora seja possível observar vesículas com tamanhos diferentes; E) Etapa Completa: oócitos com citoplasma preenchido por vesículas de vitelo (Vt); F) Zona pelúcida (ZP) totalmente desenvolvida; G) Aparelho micropilar (área tracejada) completamente formado. (A, C, E, G) Coradas com PAS + Hematoxilina férrica + Metanil Yellow; (B, D, F) Microscopia Eletrônica de Transmissão.

Figura 2.8 – Maturação e ovulação. A) Quebra da vesícula germinativa (QVG) e coalescência das vesículas de vitelo (Cvt); B) Rompimento das camadas de células foliculares (Fc), membrana basal e células da teca (Tc), criando uma abertura (seta) através da qual há a liberação do oócito; C-D) Complexo pós-ovulatório: involui gradualmente apresentando células foliculares colunares (Fc) com núcleo periférico e vacúolos (vc), acúmulo de pigmento amarelo-acastanhado (Pg), aumento da vascularização (cabeça de seta) na camada de células da teca, e fragmentação da membrana basal (Bm); E-F) Oócitos atresícos: também passam por estágios de involução apresentando ruptura do envelope nuclear (Ren), cisão da zona pelúcida (seta) e extravasamento do vitelo (Vt), células foliculares colunares (Fc) com características fagocíticas, aumento da vascularização (cabeça de seta) da camada de células da teca, e redução progressiva do volume do oócito (oc). Todas as imagens foram coradas com PAS + Hematoxilina férrica + Metanil Yellow.

Estes processos de reestruturação tecidual parecem contar com a presença de diversas células de defesa (granulócitos) provenientes dos capilares sanguíneos (Figura 2.9A). Estes granulócitos estão presentes durante todo o ciclo reprodutivo, seja próximo de capilares e no tecido conjuntivo (Figura 2.9B), seja nas proximidades dos oócitos (Figura 2.9C). Ainda, quanto ao sistema vascular, além dos capilares, observa-se que há um conjunto de grandes vasos associados [artéria + veia + vasos linfáticos] e, então, diversos vasos menores distribuídos pelo tecido (Figura 2.9D). É importante considerar que o padrão de distribuição dos vasos (vasos grandes associados e vasos menores distribuídos no tecido) e do tecido conjuntivo parecem não variar ao longo do desenvolvimento dos ovários.

Figura 2.9 – Reestruturação tecidual. A) Granulócitos (Gr) em microscopia eletrônica; B-C) Estes granulócitos (Gr) estão presentes durante todo o ciclo reprodutivo, perto de capilares (Cp) e tecido conjuntivo (TC), tanto quanto perto do oócito (oc); D) Sistema vascular: conjunto de grandes vasos associados [artéria (At) + veia (Ve) + vasos linfáticos (Vl)], e então vários vasos menores (vm) distribuídos pelo tecido. (A) Microscopia Eletrônica de Transmissão; (B-D) Coradas com PAS + Hematoxilina férrica + Metanil Yellow.

2.4.3 Características do ciclo reprodutivo

Observou-se imunomarcção nuclear evidente contra PCNA em oogônias, e também houve marcação nas células pré-foliculares (Figura 2.10A). Houve variação significativa na proporção de oogônias imunomarcadas ao longo do ano ($F = 4,649$; $p < 0,001$; Figura 2.10B). Os espécimes coletados antes da estação reprodutiva (março a setembro) apresentaram menor proporção de oogônias imunomarcadas. Por outro lado, espécimes coletados durante a estação reprodutiva (outubro a fevereiro), independentemente de manejo reprodutivo, apresentaram maior proporção de oogônias imunomarcadas, apesar de alguma redução no seu número total a partir de dezembro.

Esta mesma variação do número de oogônias pôde ser constatada na análise quantitativa de células germinativas (Figura 2.11): antes da estação reprodutiva, os ovários tinham poucas oogônias, oócitos pré-vitelogênicos abundantes, alguns oócitos vitelogênicos, ausência de complexos pós-ovulatórios e algumas atresias. Quando na estação reprodutiva, os espécimes apresentaram várias mudanças na proporção destas estruturas, mesmo quando não manejados para reproduzir. Assim, o grupo sem manejo reprodutivo apresentou ovários com muitas oogônias, oócitos pré-vitelogênicos e vitelogênicos abundantes, complexos pós-ovulatórios escassos e algumas atresias. Quando manejados para reproduzir, os espécimes apresentaram aumento no número de oogônia e oócitos pré-vitelogênicos, oócitos vitelogênicos escassos, muitos complexos pós-ovulatórios e algumas atresias.

Essas proporções celulares corroboram com os resultados encontrados na análise da razão gonadossomática (RGS). Os valores da RGS tiveram variações ao longo do período do estudo ($H = 151,827$; $p < 0,001$). Esta variação pode ser vista na Figura 2.12, de modo que os pontos na mesma altura representam valores que são estatisticamente iguais, de acordo com o teste pareado de Wilcoxon. Assim, observou-se que os ovários aumentaram de peso gradualmente, aumentando o valor da RGS. Ovários mais pesados, ou seja aqueles com células maiores e em estágio mais avançado de desenvolvimento, foram observados desde o início da estação reprodutiva (setembro) em espécimes sem manejo reprodutivo. Os menores valores da RGS, representando os ovários mais leves (aqueles com células em estágio inicial de desenvolvimento ou então desovados) foram constatados em espécimes fora da estação reprodutiva (maio a julho) e em espécimes na estação reprodutiva e manejados para reproduzir.

Figura 2.10 – Ciclo reprodutivo: quantificação da proliferação das oogônias. A) Oogônias imunomarcadas contra PCNA com marcação nuclear evidente, e houve marcação nas células pré-foliculares (Pfc) também. *Inset* apresenta o controle negativo; B) Gráfico da proporção de oogônias imunomarcadas ($F = 4,649$; $p < 0,001$), e a variação do número total de oogônias, ao longo dos meses, enfatizando a separação dos grupos com (+) e sem (-) manejo reprodutivo.

Figura 2.11 – Ciclo reprodutivo: análise quantitativa das células germinativas. Gráfico da proporção de células germinativas ao longo dos meses, enfatizando a separação dos grupos com (+) e sem (-) manejo reprodutivo. Vale ressaltar que a proporção de oócitos maduros contados no período de estudo foi tão baixa que seus valores não ficam evidentes no gráfico.

Figura 2.12 – Ciclo reprodutivo: análise da razão gonadosomática (RGS). Gráfico com a variação da RGS ao longo de meses ($H = 151,827$; $p < 0,001$), de modo que pontos na mesma altura representam valores que são estatisticamente iguais, incluindo grupos com (+) e sem (-) manejo reprodutivo. Os asteriscos e os círculos brancos identificam os outliers de menor e maior intensidade, respectivamente.

Ao somarem-se todas as características observadas para o ciclo reprodutivo, pode-se inferir que esta espécie esteve na fase Apto a Reproduzir durante todo o ano, seja em sua estação reprodutiva padrão ou fora dela, e ainda após o manejo reprodutivo. De modo que, quando manejados para reproduzir, os espécimes apresentaram em seus ovários grandes quantidades de complexos pós-ovulatórios e oócitos em crescimento primário, como esperado, mas ainda foi possível observar a presença de oócitos vitelogênicos que não foram desovados, incluindo oócitos em etapa Completa de crescimento.

2.5 DISCUSSÃO

A partir das análises reprodutivas, verificou-se que os ovários de *Astyanax altiparanae* são órgãos pares e ovoides, como já descrito para outras espécies deste gênero (Mazzoni et al., 2005; Melo et al., 2005; Rodrigues et al., 2005). No entanto, dois aspectos parecem variar

não só em relação à estação reprodutiva, mas entre as espécies de *Astyanax*: o padrão de vascularização e a coloração dos ovários, ao longo do seu desenvolvimento.

Neste estudo, os ovários apresentaram-se muito vascularizados ao longo do ano, com destaque para aqueles desovados. Em um estudo realizado com espécimes de *Astyanax scabripinnis* e *A. paranae* (= *A. scabripinnis paranae*) os ovários apresentaram pouca vascularização quando em desenvolvimento, aumentando em intensidade quando maduro e em desova, e com características hemorrágicas após a desova (Veregue, Orsi, 2003; Veloso-Júnior et al., 2009). Exceto o fato de que não foram observados ovários de *A. altiparanae* em fase inicial de desenvolvimento neste estudo, estes resultados são consistentes com as descrições feitas para as outras espécies do mesmo gênero.

Além disso, a coloração dos ovários nos espécimes deste estudo variou de castanho a cinza e, finalmente, para o vermelho, em conjunto com o seu peso. Veregue e Orsi (2003) descreveram que espécimes de *Astyanax paranae* apresentaram ovários com coloração de alaranjado a branco-acinzentado na etapa de maturação, marrom-esverdeado para aqueles em desova, e marrom-avermelhada em ovários desovados. Esta variação na coloração dos ovários pode ser espécie-específico, ou mesmo devido ao tipo alimentação dos espécimes e diferenças de habitat (Honji et al., 2009). Vale ressaltar, também, que as colorações dos ovários observadas ao longo do seu desenvolvimento e as variações entre espécies podem ser influenciadas pela pessoa que analisa este parâmetro, uma vez que a interpretação da coloração ovariana pode ser muito subjetiva. A cor avermelhada dos ovários em espécimes após a desova pode ser causada por processos hemorrágicos derivados deste ato ou pela grande presença de vasos contrastados pelo decréscimo do número de células germinativas. Ainda, é interessante ressaltar que nenhum outro estudo comparou a coloração dos ovários com o seu peso, nem mesmo a distribuição de frequência dessas colorações ao longo do período de amostragem. Ambos os dados possibilitam uma correlação mais direta com a RGS e podem ser relevantes quando aplicados à piscicultura, uma vez que facilitam a determinação da etapa de desenvolvimento gonadal pelo produtor.

Em relação às características microscópicas, os ovários de *Astyanax altiparanae* são do tipo cistovário, cavitário, como proposto na descrição revista pelo Grier et al. (2007). As células germinativas estão dispostas ao longo de toda a lamela e presentes em vários estágios de desenvolvimento. O desenvolvimento de oogônias a oócitos maduros parece não variar para as diferentes espécies de teleósteos (Grier, 2012), embora este estudo traga muitos detalhes ainda não relatados para espécies de *Astyanax*. Entre estes detalhes destacam-se: (1) a presença da *lamela annulata* em oogônias, que são poros citoplasmáticos cuja função ainda

não foi estabelecida, embora se saiba que não tem relação com transporte intracelular (Kessel, 1989); e, (2) o desenvolvimento da zona pelúcida a partir de oócitos em etapa Nucléolo Único, começando com microvilos do oócito em direção às células foliculares até apresentar-se completamente formada em oócitos com crescimento secundário em etapa Completa. A zona pelúcida é uma estrutura complexa que consiste de uma matriz extra-oocitária na qual há o desenvolvimento de microvilos entre o oócito e as células foliculares; a produção e organização desses microvilos dá suporte para o desenvolvimento de junções comunicantes heterólogas que são necessárias para a comunicação fisiológica durante a maturação do oócito (Andrade et al., 2001; Lubzens et al., 2010).

Outra característica microscópica importante é o desenvolvimento do aparelho micropilar. Neste estudo, a micrópila foi observada a partir de oócitos em etapa Alvéolo Cortical, apesar de ser mais frequente em oócitos em estágio de crescimento secundário. O mesmo foi observado em *Astyanax scabripinnis* (Melo et al., 2005; Pereira Filho et al., 2011), enquanto em *Brycon orbignyanus* e *Salminus hilarii* (outros caracídeos) o aparelho micropilar só foi observado em oócitos em estágio de crescimento secundário (Ganeco et al., 2001; Honji et al., 2009). Em peixes, o aparelho micropilar é uma estrutura em forma de funil através do qual a fertilização ocorre, assim, um único espermatozoide passa através da micrópila após o que esta se fecha e impede a polispermia (Lubzens et al., 2010).

Ao longo deste processo de desenvolvimento oocitário, a mudança que mais impressiona o observador é a do diâmetro dos oócitos. Em *Astyanax altiparanae* a oogênese começa com as oogônias que tem em média 11,6 µm de diâmetro, passa ao o estágio de crescimento primário no qual atinge 139,5 µm, e na etapa Alvéolo Cortical com 246,6 µm, chegando ao estágio de crescimento secundário com 634,5 µm, e finalmente quando da quebra da vesícula germinativa, atinge 685,0 µm de diâmetro. Entre os caracídeos, o diâmetro de oócitos maduros para a maioria das espécies varia entre 650 e 1.500 µm (Winemiller, 1989). Estes valores estão de acordo com os encontrados para *A. altiparanae* e outras espécies de *Astyanax* (Barbieri, 1992; Santos et al., 1996), como *A. henseli*, cujo diâmetro dos oócitos não-vitelogênicos variou de 40 a 320 µm e o de oócitos vitelogênicos entre 800 e 1.120 µm (Dala-Corte, Azevedo, 2010), e *A. scabripinnis* com o diâmetro de oócitos iniciais de 100,69 µm, oócitos pré-vitelogênicos de 168,79 µm, oócitos Alvéolo Cortical de 394,59 µm, e oócitos vitelogênicos de 620,39 µm (Melo et al., 2005; Pereira Filho et al., 2011).

A partir da caracterização da morfologia das células germinativas em diferentes estágios de desenvolvimento foi possível analisar a distribuição e frequência destes nos ovários, permitindo estimar o período de reprodução e o tipo de desova da espécie. Assim,

considerando a taxa de proliferação das oogônias, a análise quantitativa dos ovários, e a razão gonadossomática ao longo dos meses, constatou-se que *Astyanax altiparanae* tem um período de desova longo com pico reprodutivo de outubro a fevereiro. O desenvolvimento oocitário assincrônico, com complexos de pós-ovulatórios e oócitos vitelogênicos presentes nos ovários ao mesmo tempo, indica que a espécie tem desova parcelada. O mesmo período reprodutivo foi observado por Viana et al. (2014) para *A. altiparanae*, bem como *A. scabripinnis* (Melo et al., 2005; Veloso-Júnior et al., 2009; Pereira Filho et al., 2011) e *A. paranae* (Veregue, Orsi, 2003; Abelha, Goulart, 2008). Para *A. henseli* o período reprodutivo foi mais curto, de agosto a dezembro (Dala-Corte, Azevedo, 2010), e *A. bimaculatus* apresentou atividade reprodutiva contínua ao longo do ano, com redução da atividade gonadal de maio a julho (Barreto et al., 1998).

Como já descrito na literatura, especificamente com relação às espécies de *Astyanax*, estudos sobre a biologia reprodutiva têm mostrado que há alguma variação na duração do período reprodutivo (Dala-Corte, Azevedo, 2010). No entanto, a maioria dos estudos com este gênero descreve uma reprodução sazonal que ocorre na primavera e verão no hemisfério sul (de setembro a março), com sua duração variando entre quatro e seis meses (Nomura, 1975; Agostinho et al., 1984; Barbieri et al., 1996; Braga, 2001; Abilhoa, 2007; Veloso-Júnior et al., 2009; Pereira Filho et al., 2011; Viana et al., 2014), como também observado neste estudo.

Da mesma forma, parece que não há nenhuma uniformidade no tipo de desova para as espécies de *Astyanax*. Para *A. altiparanae* constatou-se, neste estudo, o tipo de desova parcelada, como em vários outros estudos com *A. bimaculatus* (Agostinho et al., 1984; Barreto et al., 1998), *A. scabripinnis* (Barbieri, 1992; Melo et al., 2005; Veloso-Júnior et al., 2009; Pereira Filho et al., 2011) e *A. fasciatus* (Carvalho et al., 2009). No entanto, outros estudos descreveram desova total para as espécies *A. schubarti* (Nomura, 1975), *A. fasciatus* (Nomura, 1975; Gurgel, 2004), *A. henseli* (Dala-Corte, Azevedo, 2010) e *A. bimaculatus* (Nomura, 1975; Santos et al., 1996).

Ainda, estes peixes parecem ser capazes de passar de desova total para desova parcelada (e vice-versa) como resultado de alterações fisiológicas ou ambientais. Isto pode levar a vários tipos de desova em diferentes populações ou diferentes períodos de tempo. Garutti (1989) estudou a espécie *Astyanax bimaculatus* (= *A. altiparanae*) em diferentes ambientes de um curso de água na bacia do rio Paraná, e encontrou evidências de diferentes tipos de desova nesta única espécie, a qual apresentou desova parcelada na nascente e no curso médio do rio e desova total nas regiões do estuário.

Interessante notar que, em estudos anteriores feitos por membros do nosso grupo de pesquisa (Costa et al., 2014), observou-se que machos de *Astyanax altiparanae* também parecem apresentar espermição parcelada. Os testículos *Astyanax altiparanae* apresentaram uma distinção de áreas durante as diferentes etapas do ciclo reprodutivo, e a manutenção destas regiões testiculares através do ciclo parece permitir que os espécimes produzam esperma e tenham reservas de gametas no interior dos testículos por quase todo o ano. Isso possibilita a esta espécie executar múltiplas liberações de esperma, provavelmente de acordo com as condições ambientais mais favoráveis (Costa et al., 2014).

As variações nos períodos de desova e espermição de *Astyanax altiparanae* e sua capacidade de reproduzir em ambientes lênticos, mesmo que por processo de manejo reprodutivo, sugerem que esta espécie tem a capacidade de responder rapidamente às mudanças ambientais e alta flexibilidade reprodutiva (Dias et al., 2005). Todas estas características somadas reforçam o importante papel que esta espécie pode ter na piscicultura. Ainda, o fato de que o lambari apresenta gônadas masculinas e femininas em fase Apto a Reproduzir ao longo de todo o ano indica a possibilidade de realizar o manejo reprodutivo em outros períodos além da estação reprodutiva, aumentando a disponibilidade de larvas e juvenis na piscicultura.

2.6 CONCLUSÕES

- Os ovários de *Astyanax altiparanae* apresentaram características macroscópicas similares a outras espécies do mesmo gênero, e o desenvolvimento de oogônias a oócitos maduros parece não variar comparando com as diferentes espécies de teleósteos.

- Este estudo apresenta novos detalhes celulares para espécies de *Astyanax*, como a presença da *lamela annulata* em oogônias, o desenvolvimento da zona pelúcida a partir de oócitos em etapa Nucléolo Único e a primeira observação do aparelho micropilar em oócitos em etapa Alvéolo Cortical.

- A partir das análises quantitativas feitas neste estudo, constatou-se que *Astyanax altiparanae* tem um período de desova longo com pico reprodutivo de outubro a fevereiro, e desenvolvimento oocitário assincrônico indicando que a espécie tem desova parcelada.

- Com relação à aplicação dos dados obtidos nos processos de produção e manejo reprodutivo, nenhum outro estudo que se conheça comparou a coloração dos ovários com o seu peso, nem mesmo a distribuição de frequência dessas colorações ao longo do período de

amostragem; e ambos os dados parecem facilitar para o produtor a determinação do melhor momento para o manejo reprodutivo desta espécie.

REFERÊNCIAS²

- Abelha MCF, Goulart E. Population structure, condition factor and reproductive period of *Astyanax paranae* (Eigenmann, 1914) (Osteichthyes: Characidae) in a small and old brazilian reservoir. *Braz Arch Biol Techn.* 2008; 51(3):503-12.
- Abilhoa V. Aspectos da história natural de *Astyanax scabripinnis* Jenyns (Teleostei, Characidae) em um riacho de floresta com araucária no sul do Brasil. *Rev Bras Zool.* 2007; 24(4):997-1005.
- Agostinho CA, Molinari SL, Agostinho AA, Verani JR. Ciclo reprodutivo e primeira maturação sexual de fêmeas do lambari *Astyanax bimaculatus* (Osteichthyes, Characidae) do rio Ivaí, Estado do Paraná. *Rev Bras Biol.* 1984; 44(1):31-6.
- Andrade RF, Bazzoli N, Rizzo E, Sato Y. Continuous gametogenesis in the neotropical freshwater teleost, *Bryconops affinis* (Pisces: Characidae). *Tissue Cell.* 2001; 33(5):524-32.
- Barbieri GM. Biologia de *Astyanax scabripinnis paranae* (Characiformes, Characidae) do ribeirão do Fazzari. São Carlos. Estado de São Paulo. II. Aspectos quantitativos da reprodução. *Rev Bras Biol.* 1992; 52(1):589-96.
- Barbieri GM, Hartz SM, Verani JR. O fator de condição e índice hepatossomático como indicadores do período de desova de *Astyanax fasciatus* da represa do Lobo, São Paulo (Osteichthyes, Characidae). *Iheringia, Sér Zool.* 1996; 81:97-100.
- Barreto BP, Ratton TF, Ricardo MCP, Alves CBM, Vono V, Rizzo E, Bazzoli N. Biologia reprodutiva do lambari *Astyanax bimaculatus* (Pisces, Characidae) no rio do Carmo, bacia do rio Grande, São Paulo. *BIOS.* 1998; 6(6):121-30.
- Billard R. The reproductive cycle of male and female brown trout (*Salmo trutta fario*): a quantitative study. *Reprod Nutr Develop.* 1987; 27(1A):29-44.
- Braga FMS. Reprodução de peixes (Osteichthyes) em afluentes do reservatório de Volta Grande, Rio Grande, sudeste do Brasil. *Iheringia, Sér Zool.* 2001; (91):67-74.
- Brown-Peterson NJ, Wyanski DM, Saborido-Rey F, Macewicz BJ, Lowerre-Barbieri SK. A standardized terminology for describing reproductive development in fishes. *Mar Coast Fish.* 2011; 3(1):52-70.
- Carvalho PA, Paschoalini AL, Santos GB, Rizzo E, Bazzoli N. Reproductive biology of *Astyanax fasciatus* (Pisces: Characiformes) in a reservoir in southeastern Brazil. *J Appl Ichthyol.* 2009; 25(3):306-13.
- Cehade C, Cassel M, Borella MI. Induced reproduction in a migratory teleost species by water level drawdown. *Neotrop Ichthyol.* 2015; 13(1):205-12.

² De acordo com: International Committee of Medical Journal Editors. [Internet]. Uniform requirements for manuscripts submitted to biomedical journals. [2011 Jul 15]. Available from: http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.html

- Costa FG, Adolphi MC, Gomes CC, Jesus LWO, Batlouni SR, Borella MI. Testes of *Astyanax altiparanae*: the Sertoli cell functions in a semicystic spermatogenesis. *Micron*. 2014; 61:20-7.
- Dala-Corte RB, Azevedo MA. Biologia reprodutiva de *Astyanax henseli* (Teleostei, Characidae) do curso superior do rio dos Sinos, RS, Brasil. *Iheringia, Sér Zool*. 2010; 100(3):259-66.
- Dias RM, Baially D, Antônio RR, Suzuki HI, Agostinho AA. Colonization of the Corumbá Reservoir (Corumbá River, Paraná River Basin, Goiás State, Brazil) by the “lambari” *Astyanax altiparanae* (Tetragonopterinae; Characidae). *Braz Arch Biol Technol*. 2005; 48(3):467-76.
- Ganeco LN, Nakaghi LSO, Urbinati EC, Dumont Neto R, Vasques LH. Análise morfológica do desenvolvimento ovocitário de piracanjuba, *Brycon orbignyanus*, durante o ciclo reprodutivo. *Bol Inst Pesca*. 2001; 27(2):131-8.
- Garutti V. Contribution to the knowledge of the reproduction of *Astyanax bimaculatus* (Ostariophysi, Characidae), in waters of the Paraná River basin. *Rev Bras Biol*. 1989; 49(2):489-95.
- Garutti V, Britski HA. Descrição de espécie nova de *Astyanax* (Teleostei: Characidae) da bacia do alto rio Paraná e considerações sobre as demais espécies do gênero na bacia. *Comun Mus Ciênc Tecnol PUCRS*. 2000; 13:65-88.
- Gonçalves LU, Parisi G, Bonelli A, Sussel FR, Viegas EMM. The fatty acid compositions of total, neutral and polar lipids in wild and farmed lambari (*Astyanax altiparanae*) (Garutti & Britski, 2000) broodstock. *Aquac Res*. 2014; 45(2):195-203.
- Grier HJ. Development of the follicle complex and oocyte staging in red drum, *Sciaenops ocellatus* Linnaeus, 1776 (Perciformes, Sciaenidae). *J Morphol*. 2012; 273(8):801-29.
- Grier HJ, Uribe MC, Parenti LR. Germinal epithelium, folliculogenesis, and postovulatory follicles in ovaries of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum, 1792) (Teleostei, Protacanthopterygii, Salmoniformes). *J Morphol*. 2007; 268(4):293-310.
- Gurgel HCB. Estrutura populacional e época de reprodução de *Astyanax fasciatus* (Cuvier) (Characidae, Tetragonopterinae) do Rio Ceará Mirim, Poço Branco, Rio Grande do Norte, Brasil. *Rev Bras Zool*. 2004; 21(1):131-5.
- Honji RM, Narcizo AM, Borella MI, Romagosa E, Moreira RG. Patterns of oocyte development in natural habitat and captive *Salminus hilarii* Valenciennes, 1850 (Teleostei: Characidae). *Fish Physiol Biochem*. 2009; 35(1):109-23.
- Honji RM, Vaz-Dos-Santos AM, Rossi-Wongtschowski CLDB. Identification of the stages of ovarian maturation of the argentine hake *Merluccius hubbsi* Marini, 1933 (Teleostei: Merlucciidae): advantages and disadvantages of the use of the macroscopic and microscopic scales. *Neotrop Ichthyol*. 2006; 4(3):329-37.

- Jalabert B. Particularities of reproduction and oogenesis in teleost fish compared to mammals. *Reprod Nutr Develop*. 2005; 45(3):261-79.
- Kessel RG. The annulate lamellae – from obscurity to spotlight. *Electron Microsc Rev*. 1989; 2(2):257-348.
- Kjesbu OS, Hunter JR, Witthames PR. Report of the working group on modern approaches to assess maturity and fecundity of warm- and cold-water fish and squids. Norway: Institute of Marine Research; 2003. Vol. 12; 140 p.
- Krysko DV, Diez-Fraile A, Criel G, Svistunov AA, Vandenabeele P, D’Herde K. Life and death of female gametes during oogenesis and folliculogenesis. *Apoptosis*. 2008; 13(9):1065-87.
- Lowerre-Barbieri SK, Brown-Peterson NJ, Murua H, Tomkiewicz J, Wyanski DM, Saborido-Rey F. Emerging issues and methodological advances in fisheries reproductive biology. *Mar Coast Fish*. 2011; 3(1):32-51.
- Lubzens E, Young G, Bobe J, Cerdà J. Oogenesis in teleosts: How fish eggs are formed. *Gen Comp Endocr*. 2010; 165(3):367-89.
- Mazzoni R, Mendonça RS, Caramaschi EP. Reproductive biology of *Astyanax janae* (Osteichthyes, Characidae) from the Ubatuba River, Maricá, RJ, Brazil. *Braz J Biol*. 2005; 65(4):643-9.
- Melo FCSA, Maldonado IRSC, Benjamin LA, Matta SLP. Biologia reprodutiva de fêmeas de lambari-prata (*Astyanax scabripinnis*) (Characidae, Tetragonopterinae) em tanques de piscicultura. *Rev Ceres*. 2005; 52(304):811-29.
- Mylonas CC, Zohar Y. Promoting oocyte maturation, ovulation and spawning in farmed fish. In: Babin PJ, Cerdà J, Lubzens E (eds.). *The fish oocyte: From basic studies to biotechnological applications*. Netherlands: Springer; 2007. p. 437-74.
- Nakamura S, Kobayashi K, Nishimura T, Tanaka M. Ovarian germline stem cells in the teleost fish, medaka (*Oryzias latipes*). *Int J Biol Sci*. 2011; 7(4):403-9.
- Nelson JS, Grande TC, Wilson MVH. *Fishes of the world* (5th edition). New Jersey: Wiley; 2016. 711 p.
- Nomura H. Fecundidade, maturação sexual e índice gonadossomático de lambaris do gênero *Astyanax* Baird e Girard, 1854 (Osteichthyes, Characidae), relacionados com fatores ambientais. *Rev Bras Biol*. 1975; 35(4):775-98.
- Pereira Filho HP, Andrade DR, Tonini WCT, Vidal Júnior MV. Biologia reprodutiva de fêmeas de lambari-prata, *Astyanax scabripinnis* Jenyns, 1842 (Characidae; Tetragonopterinae; Teleostei) em condições de cativeiro. *Ci Anim Bras*. 2011; 12(4):626-34.
- Porto-Foresti F, Castilho-Almeida RB, Foresti F. Biologia e criação do lambari-do-rabo-amarelo (*Astyanax altiparanae*). In: Baldissseroto B, Gomes LC (eds.). *Espécies Nativas para Piscicultura no Brasil*, vol 2. Santa Maria: Editora UFSM; 2005. p. 101-15.

Quagio-Grassiotto I, Grier H, Mazzoni TS, Nóbrega RH, Amorim JPA. Activity of the ovarian germinal epithelium in the freshwater catfish, *Pimelodus maculatus* (Teleostei: Ostariophysi: Siluriformes): germline cysts, follicle formation and oocyte development. J Morphol. 2011; 272(11):1290-1306.

Quintero-Hunter I, Grier H, Muscato M. Enhancement of histological detail using metanil yellow as a counterstain in periodic acid/Schiff's hematoxylin staining of glycol methacrylate tissue sections. Biotech Histochem. 1991; 66(4):169-72.

Rodrigues LP, Querol E, Braccini MC. Descrição morfo-histológica do ovário de *Acestrorhynchus pantaneiro* (Menezes, 1992) (Teleostei, Characidae), em seus diferentes estágios de desenvolvimento na bacia do rio Uruguai médio, Uruguai, RS. Biodivers Pampeana. 2005; 3(1):11-8.

Santos GB, Barros LNV, Menezes MU. Fecundity of the *Astyanax bimaculatus* (Reinhardt, 1874) (Teleostei, Characidae) from upper rio São Francisco basin, Brasil. Arq Bras Med Vet Zootec. 1996; 48(Suppl 1):101-8.

Tokarz RR. Oogonial proliferation, oogenesis and folliculogenesis in nonmammalian vertebrates. In: Jones RE (ed.). The vertebrate ovary: Comparative Biology and Evolution. New York: Plenum Press; 1978. p. 145-79.

Tyler CR, Sumpter JP. Oocyte growth and development in teleosts. Rev Fish Biol Fisher. 1996; 6(3):287-318.

Vazzoler AEAM. Biologia da reprodução de peixes teleósteos: teoria e prática. Maringá: Eduem; 1996. 169 p.

Veloso-Júnior VC, Guimarães-Cruz RJ, Barros MDM, Barata RSL, Santos JE. Reproduction of the lambari *Astyanax scabripinnis* (Jenyns, 1842) (Pisces: Characidae) in a small stream in Southeastern Brazil. J Appl Ichthyol. 2009; 25(3):314-20.

Veregue AML, Orsi ML. Biologia reprodutiva de *Astyanax scabripinnis paranae* (Eigenmann) (Osteichthyes, Characidae), do ribeirão das Marrecas, bacia do rio Tibagi, Paraná. Rev Bras Zool. 2003; 20(1):97-105.

Viana LF, Tondato KK, Suárez YR, Lima-Júnior SE. Influence of environmental integrity on the reproductive biology of *Astyanax altiparanae* Garutti & Britski, 2000 in the Ivinhema river basin. Acta Sci, Biol Sci. 2014; 36(2):165-73.

Wallace RA, Sellman K. Cellular and dynamic aspects of oocyte growth in teleosts. Am Zool. 1981; 21(2):325-43.

Winemiller KO. Patterns of variation in life history among South American fishes in seasonal environments. Oecologia. 1989; 81(2):225-41.

CAPÍTULO 3 – PROCESSO DE INVOLUÇÃO DE FOLÍCULOS ATRÉSICOS E DE COMPLEXOS PÓS-OVULATÓRIOS EM OVÁRIOS DE *Astyanax altiparanae*: ESTUDO DAS VIAS DE APOPTOSE E AUTOFAGIA

3.1 INTRODUÇÃO

O desenvolvimento e crescimento ovariano dependem de um balanço na expressão e ação de fatores que promovem a proliferação, crescimento e diferenciação das células do folículo, e de fatores que induzem a morte celular (Habibi, Andreu-Vieyra, 2007; Escobar et al., 2013). Quando os fatores que induzem a morte celular são dominantes, os folículos ovarianos perdem sua integridade e são eliminados em um processo conhecido como atresia folicular (Byskov, 1978). Em teleósteos, a atresia folicular ocorre durante o crescimento normal dos oócitos (Janz, Van der Kraak, 1997; Wood, Van der Kraak, 2001) e na regressão pós-ovulatória (Miranda et al., 1999; Thomé et al., 2006; Santos et al., 2008). Ainda, a reabsorção dos oócitos parece ser mais importante em teleósteos do que em outros vertebrados, uma vez que esses produzem oócitos com grande quantidade de vitelo, e este processo possibilita a reciclagem desse valioso estoque energético produzido pelas fêmeas (Linares-Casenave et al., 2002; Wood, Van der Kraak, 2003; Eykelbosh, Van der Kraak, 2010).

Além dos oócitos atrésicos, ovários desovados apresentam outras estruturas que sofrem processo de reabsorção – os complexos pós-ovulatórios (POCs). Previamente chamados de folículos pós-ovulatórios (POFs), os POCs são estruturas remanescentes de folículos maduros que foram desovados durante a estação reprodutiva (Drummond et al., 2000; Morais et al., 2016). Eles são compostos pelas camadas de células que permanecem após a liberação do oócito, i.e., a camada de células foliculares, a membrana basal e a camada de células da teca (Grier, 2012). Estas estruturas têm baixa ou nenhuma atividade hormonal na maioria das espécies de teleósteos estudadas até o momento, e além disso elas não são homólogas ao corpo lúteo de mamíferos (Selman, Wallace, 1989). No entanto, a remoção dos POCs parece ser essencial para o recrutamento de novos folículos para a próxima estação reprodutiva (Kumar, Joy, 2015).

Dentre os mecanismos envolvidos na remodelação e remoção tecidual em ovários desovados, sejam folículos atrésicos ou POCs, a apoptose parece ser o mais proeminente e, consequentemente, o mais estudado. Apoptose é um processo fisiológico, evolutivamente conservado, controlado por vários hormônios e fatores de crescimento e envolvido na remodelação, diferenciação e degeneração tecidual em uma variedade de tipos celulares (Janz

et al., 1997). É caracterizado por mudanças bioquímicas e morfológicas, como a condensação da cromatina, a fragmentação do DNA e a formação de corpos apoptóticos (Hacker, 2000). As principais proteínas efetoras na apoptose são as caspases, uma família de proteases de cisteína altamente conservadas (Huettenbrenner et al., 2003; Krumschnabel, Podrabsky, 2009). Dentre as caspases, a Caspase-3 é a principal caspase efetora, inclusive no tecido ovariano no qual apresenta-se expressa nas células foliculares de folículos atresícos de mamíferos (Boone, Tsang, 1998).

Em 2009, no entanto, Thomé et al. propuseram que a autofagia pode levar à morte das células foliculares nos folículos atresícos e, portanto, podem também contribuir para o processo de regressão ovariana. Vale ressaltar que a autofagia, em seu conceito mais clássico, difere da apoptose pela sua finalidade: a apoptose é a morte celular programada, enquanto a autofagia é um ajuste ao estresse, no nível celular, a fim de evitar a morte celular. Porém, a relação funcional entre apoptose e autofagia é complexa. Em alguns casos a autofagia é uma forma de ajuste ao estresse suprimindo a apoptose, enquanto em outros casos a autofagia constitui uma via alternativa de eliminação celular, denominada morte celular autofágica ou do tipo II (Maiuri et al., 2007, 2010; Eisenberg-Lerner et al., 2009).

Estudos mais recentes também parecem indicar que a apoptose e autofagia podem agir cooperativamente, nos ovários de peixes, e uma dupla função, na sobrevivência e na morte celular, foi atribuída à autofagia a fim de garantir uma regressão ovariana mais eficiente após a desova (Thomé et al., 2009). Assim, em teleósteos, proteínas autofágicas (Beclin-1, Atg, LC3, Lamp) e apoptóticas (Bax e Bad), principalmente as da família Bcl-2, podem ser ativadas de maneira coordenada dependendo do estágio da atresia folicular (Santos et al., 2005, 2008; Thomé et al., 2009; Morais et al., 2012, 2016). Além dessas proteínas, evidências sugerem que a Catepsina-D, uma protease lisossomal, pode desempenhar um papel no complexo “crosstalk” entre autofagia e apoptose de células foliculares durante a atresia folicular (Morais et al., 2012).

O teleósteo *Astyanax altiparanae* (Characiformes: Characidae) é uma espécie de pequeno porte nativa da Bacia do Alto Rio Paraná (Garutti, Britski, 2000). Esta espécie tem grande importância comercial, ecológica e acadêmica (Gonçalves et al., 2014). Sua estratégia reprodutiva inclui um longo período reprodutivo, com pico de outubro a fevereiro, rápida maturação, desova múltipla, ovos pequenos, alta fertilidade e ausência de cuidado parental (Suzuki et al., 2005; Cassel et al., 2017). Como diversas outras espécies da ordem Characiformes, *A. altiparanae* tende a não desovar quando confinado, apesar das fêmeas apresentarem desenvolvimento oocitário normal (Mylonas, Zohar, 2007; Chehade et al., 2015;

Cassel et al., 2017); então, o manejo ou indução à reprodução se fazem necessários para completar o seu ciclo reprodutivo em pisciculturas. Assim, considerando a importância da remodelação tecidual para a função ovariana, este estudo apresenta as vias de morte celular de uma forma comparada entre os processos de involução de atresias foliculares e de complexos pós-ovulatórios.

3.2 OBJETIVOS

Este estudo teve como objetivos:

- (1) caracterizar morfológicamente os processos de involução de atresias foliculares e de complexos pós-ovulatórios nos ovários de *Astyanax altiparanae*;
- (2) investigar, por imuno-histoquímica, a localização de proteínas envolvidas nas vias de apoptose e autofagia ao longo desses processos de involução.

3.3 MATERIAL E MÉTODOS

3.3.1 Coleta dos espécimes

Em outubro de 2013 foram coletadas e analisadas 15 fêmeas adultas de *Astyanax altiparanae*, com aproximadamente 18 meses de idade. A coleta foi feita logo após o manejo reprodutivo (descrito no item 2.3.1), pois foi observado anteriormente (Capítulo 2) que ovários pós-desova apresentam um maior número de estruturas em processo de involução. As fêmeas foram eutanasiadas com dose excessiva de anestésico (solução aquosa de benzocaina a 0,1%) até cessarem os batimentos operculares, de acordo com o procedimento aprovado pela Comissão de Ética em Experimentação Animal do ICB, USP Proc. 2013/022. Uma vez que as estruturas estão distribuídas uniformemente nos ovários, conforme constatado em estudo anterior (Capítulo 2), a parte central do ovário esquerdo de cada fêmea foi dissecada e fixada em Paraformaldeído 4% [tamponado com solução de fosfato de sódio (0,1M a pH 7,4)].

3.3.2 Processamento histológico e análises morfológicas

Após 8 horas no fixador, os fragmentos dos ovários foram transferidos para cassetes de processamento histológico e lavados em água corrente por 4 horas para tirar o excesso de fixador. Depois, foram desidratados duas vezes em etanol 70% por 1 hora e meia cada, uma vez em etanol 95% por 1 hora e duas vezes em etanol 100% por 1 hora cada. O material foi

então diafanizado em xilol, duas vezes de 1 hora cada, e infiltrado em paraplast em três turnos de 12 horas cada. Por fim, os fragmentos foram incluídos em paraplast com o auxílio de moldes metálicos.

Os blocos foram cortados de modo seriado, a 5 µm de espessura, e os cortes foram dispostos em lâminas pré-preparadas com Poli-L-Lisina e deixados para secar em estufa a 37 °C por um dia, a fim de garantir a fixação dos mesmos na lâmina. Foi utilizado o método de cortes seriados a fim de se observar a sequência da mesma estrutura ao longo dos cortes subsequentes, permitindo desta forma a realização de diferentes análises da mesma estrutura. Assim, para a descrição morfológica do processo de involução de folículos atresícos e de complexos pós-ovulatórios, a primeira de cada cinco lâminas foi corada com Ácido periódico – Reativo de Schiff (PAS) + Hematoxilina férrica + Metanil Yellow (Quintero-Hunter et al., 1991). Em seguida, as lâminas foram montadas com lamínula e goma de Damar, e, então, examinadas e foto-documentadas ao microscópio de luz Axioskop 2 (Zeiss Inc., EUA), acoplado com câmera AxioCam MRC5 (Zeiss Inc., EUA), e equipado com o dispositivo de captura de imagem digital ZEN 2012.

3.3.3 Análises imuno-histoquímicas

Após as descrições morfológicas, foram selecionadas lâminas para as análises de imunofluorescência. Para as lâminas selecionadas, a lâmina imediatamente anterior corada para microscopia de luz foi fotografada, o corte foi remontado inteiro e mapeado. O mapeamento auxiliou no processo de encontrar a localização exata das estruturas, uma vez que não é possível observar as características microscópicas que as diferenciam no microscópio de fluorescência. Um exemplo do mapeamento feito nos cortes histológicos pode ser observado na figura 3.1.

Figura 3.1 – Exemplo de reconstrução e mapeamento utilizado para a identificação e localização das estruturas em involução durante as análises de imunofluorescência (acervo pessoal). Estruturas identificadas com (A) indicam folículos atrésicos e com (P) indicam complexos pós-ovulatórios. Já os números após as letras (A) e (P) indicam os estágios dos processos de involução, sendo 1 o número indicativo do início das involuções e os números subsequentes indicam a progressão da involução.

As lâminas reservadas para as análises de imunofluorescência foram mantidas a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ e, quando separadas para a técnica, foram deixadas overnight em estufa a $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ para o início do processo de desparafinização. Em seguida, os cortes foram desparafinizados em xilol, duas vezes de 20 minutos cada, hidratados em série alcoólica [etanol 100% por 20 minutos, etanol 95% por 10 minutos e etanol 70% por 10 minutos], lavados em água corrente por 10 minutos e em tampão tris salino com Tween-20 0,05% (TBS-T pH 7,2) por mais 10 minutos. Posteriormente, foi feita recuperação antigênica em tampão citrato pH 6,0 com Tween-20 0,05% por 30 minutos a $90\text{ }^{\circ}\text{C}$ em banho-maria, e então os cortes foram lavados novamente em TBS-T por 5 minutos.

Em seguida, foi feito o bloqueio da peroxidase endógena com solução de peróxido de hidrogênio 3% em metanol por 1 hora, no escuro. Os cortes foram, então, lavados com TBS-T por 5 minutos, e depois secos em seu entorno e circulados com caneta hidrofóbica (Kyota, K-

600). Para o bloqueio dos sítios inespecíficos e permeabilização do tecido foi aplicado o tampão de bloqueio (TBS-T + albumina bovina 1% + Triton X-100 1%) com soro de cabra 10% por 1 hora, no escuro.

As lâminas foram, então, incubadas overnight em câmara úmida a 4 °C utilizando diferentes anticorpos primários para a detecção de proteínas das vias apoptótica e autofágica (Tabela 3.1). Após a incubação, as lâminas foram lavadas duas vezes em TBS-T por 5 minutos, cada. Em seguida, as lâminas foram incubadas com anticorpo secundário fluorescente verde ou vermelho, Alexa fluor 488 anti-coelho (1:200) ou Alexa fluor 594 anti-coelho (1:200), respectivamente, por 1 hora, no escuro. Após a segunda incubação, as lâminas foram lavadas duas vezes em TBS-T por 5 minutos, cada. Por fim, as lâminas foram montadas com meio de montagem para fluorescência VectaShield com DAPI e vedadas. Para o controle negativo, o anticorpo primário foi substituído por TBS-T em alguns cortes. Os cortes foram examinados e foto-documentados ao microscópio de fluorescência Zeiss Vert.A1 (Zeiss Inc., EUA) equipado com dispositivo de captura de imagem digital ZEN 2012 Software (Zeiss Microscopy).

Tabela 3.1 – Anticorpos primários e suas respectivas diluições como utilizado nas reações imuno-histoquímicas; todos os anticorpos usados foram previamente testados e validados para peixes (Moraes et al., 2012).

Anticorpos primários	Via de morte celular	Diluições
Beclin-1 (H-300), policlonal de coelho, sc-11427	Autofagia	1:50
Bcl-2 (N-19), policlonal de coelho, sc-492	Autofagia	1:150
Catepsina-D (H-75), policlonal de coelho, sc-10725	Autofagia / Apoptose	1:25
Bax (P-19), policlonal de coelho, sc-526	Apoptose	1:100
Caspase-3 (P42574), policlonal de coelho, ab13847	Apoptose	1:150

Além disso, foi feita uma dupla marcação para verificar se houve co-localização de Caspase-3 e Beclin-1 ao longo dos processos de involução. Assim, seguindo o protocolo de imunofluorescência descrito acima, os cortes histológicos foram desparafinados e hidratados, seguido de recuperação antigênica e dos dois bloqueios. Em seguida, as lâminas foram incubadas overnight em câmara úmida a 4 °C utilizando o anticorpo primário Caspase-3 (1:150). No dia seguinte, as lâminas foram lavadas duas vezes em TBS-T e incubadas com o anticorpo secundário fluorescente vermelho, Alexa fluor 594 anti-coelho (1:200). Após lavagem em TBS-T, o bloqueio de sítios inespecíficos foi realizado novamente e as lâminas foram incubadas overnight em câmara úmida a 4 °C com o anticorpo primário Beclin-1

(1:50). No terceiro dia, as lâminas foram lavadas duas vezes em TBS-T e incubadas com o anticorpo secundário fluorescente verde, Alexa fluor 488 anti-coelho (1:200). Finalmente, as lâminas foram lavadas em TBS-T, montadas e analisadas como descrito anteriormente.

3.4 RESULTADOS

Após a desova, os ovários de *Astyanax altiparanae* apresentaram maior número de oogônias e oócitos pré-vitelogênicos, raros oócitos vitelogênicos, muitos complexos pós-ovulatórios e algumas atresias foliculares. Para efeito de comparação, folículos vitelogênicos apresentam núcleo com múltiplos nucléolos, vesículas de vitelo preenchendo todo o citoplasma, zona pelúcida espessa, células foliculares pavimentosas e uma camada delgada de células da teca (Figura 3.2A e *inset*).

3.4.1 Características morfológicas do processo de involução de atresias foliculares e complexos pós-ovulatórios

Oócitos vitelogênicos que não foram ovulados durante a estação reprodutiva se tornam folículos atrésicos (Figura 3.2). Os primeiros sinais de atresia em oócitos vitelogênicos são a cisão da zona pelúcida e a liquefação das vesículas de vitelo (Figura 3.2B e *inset*). Em seguida, há uma cisão mais expressiva, em número e tamanho, da zona pelúcida que apresenta-se altamente irregular e o início do extravasamento do vitelo por suas fendas (Figura 3.2C e *inset*). Além disso, há o início da hipertrofia das células foliculares que têm forma cuboide e características fagocíticas, como a presença de grânulos de vitelo e vacúolos no seu citoplasma (Figura 3.2C e *inset*).

À medida que o processo de involução progride, há a retração dos fragmentos da zona pelúcida e as células foliculares ficam colunares, ainda com características fagocíticas (Figura 3.2D e *inset*). Num próximo momento, é possível observar grande perda do volume do oócito (pelo menos metade do volume), e um aumento da vascularização na camada de células da teca (Figura 3.2E). Em seguida, não há quase mais nenhum vitelo para ser digerido e os fragmentos restantes da zona pelúcida se agregam em uma grande massa no centro da atresia folicular (Figura 3.2F). Neste ponto, as células foliculares ainda contêm grânulos de vitelo no seu citoplasma que serão digeridos, mas começam a apresentar também alguns vacúolos vazios, e a camada de células da teca ainda é muito vascularizada (Figura 3.2F).

Após a digestão completa de componentes do oócito, as células foliculares formam um agregado celular vacuolizado ainda limitado pela camada de células da teca (Figura 3.2G).

Há, subsequentemente, uma redução gradual de vacúolos no citoplasma das células foliculares e também um acúmulo de estruturas semelhantes a corpos apoptóticos (Figura 3.2H). Ainda, há a infiltração de vasos sanguíneos na camada de células foliculares (Figura 3.2H). Seguindo no processo de involução, já não é possível distinguir as camadas de células foliculares e da teca, há muitos vasos sanguíneos dentro da atresia e um aumento na quantidade de corpos apoptóticos (Figura 3.2I). As células foliculares restantes não apresentam mais o citoplasma vacuolizado (Figura 3.2I). Por fim, esta estrutura reduz gradualmente seu tamanho, até ser completamente reabsorvida.

No entanto, se o oócito for ovulado, as camadas de células restantes, i.e. camada de células foliculares, membrana basal e camada de células da teca, compõem o complexo pós-ovulatório (POC) (Figura 3.3). Após a ovulação, as células foliculares do POC são cúbicas e apresentam projeções citoplasmáticas em direção ao lúmen; a membrana basal e a camada de células da teca não apresentam mudanças morfológicas (Figura 3.3A e *inset*). Em seguida, as células foliculares apresentam pouca ou nenhuma projeção citoplasmática, e passam a ter vacúolos em seu citoplasma (Figura 3.3B). Neste momento, há um aumento no número de vasos sanguíneos na camada de células da teca e também uma leve diminuição do lúmen do POC (Figura 3.3B). Com o avanço do processo de involução, POCs têm grande redução do lúmen (Figura 3.3C); as células foliculares ficam colunares, vacuoladas e PAS-positivas, a membrana basal é espessada, e há um aumento na vascularização da camada de células da teca (Figura 3.3C).

Em seguida, ocorre novamente uma grande redução do lúmen e uma redução progressiva no número de células no POC, além disso as células foliculares estão dispostas em agregados, dando uma aparência estratificada para a estrutura (Figura 3.3D). A membrana basal ainda se apresenta espessa e a camada de células da teca ainda está muito vascularizada (Figura 3.3D). Por fim, há uma oclusão quase total do lúmen que é ocupado por restos celulares, e a camada de células da teca somada à membrana basal quase se funde com o tecido conjuntivo adjacente (Figura 3.3E). Neste momento, poucas células foliculares permanecem (Figura 3.3E) e estas serão, em seguida, completamente reabsorvidas.

Figura 3.2 – Processo de involução da atresia folicular. A) Folículo vitelogênico apresenta núcleo com múltiplos nucléolos, vesículas de vitelo preenchendo todo o citoplasma, zona pelúcida espessa, células foliculares pavimentosas e camada delgada de células da teca; B) A atresia folicular começa com a cisão da zona pelúcida e a liquefação das vesículas de vitelo; C) Em seguida, há uma cisão mais expressiva da zona pelúcida que se apresenta altamente irregular, há o início do extravasamento do vitelo por suas fendas e início da hipertrofia das células foliculares que tem forma cúbica e características fagocíticas; D) Depois, há a retração dos fragmentos da zona pelúcida e as células foliculares fagocíticas tornam-se colunares; E) É possível observar grande perda do volume do oócito, mas há células foliculares colunares e muitos vasos sanguíneos na camada de células da teca; F) Em seguida, não há quase mais nenhum vitelo para ser digerido, os fragmentos remanescentes da zona pelúcida se agregam numa grande massa no centro da atresia folicular, e as células foliculares começam a exibir alguns vacúolos vazios; G) Após a digestão completa dos componentes do oócito, as células foliculares formam um agregado de células vacuolizadas ainda limitado pela camada de células da teca; H) Há uma diminuição gradual dos vacúolos nas células foliculares e também um acúmulo de estruturas semelhantes a corpos apoptóticos, ainda há a infiltração de vasos sanguíneos na camada de células foliculares; I) Por fim, já não é possível distinguir as camadas de células foliculares e da teca, há muitos vasos sanguíneos na atresia folicular e um aumento na quantidade de corpos apoptóticos. Siglas: núcleo (N); vitelo (Vt); zona pelúcida (zp); células foliculares (fc); células da teca (tc); cisão da zona pelúcida (seta); liquefação das vesículas de vitelo (Vt-liq); oócito (Oo); vasos sanguíneos (vs); vacúolos (*); corpos apoptóticos (†). Barras: A-F 20 μm; G-I 10 μm.

Figura 3.3 – Processo de involução do complexo pós-ovulatório (POC). A) Após a ovulação, células foliculares apresentam-se cúbicas e têm projeções citoplasmáticas em direção ao lúmen, a membrana basal e a camada de células da teca não apresentam modificações morfológicas; B) Em seguida, as células foliculares tornam-se vacuoladas, há um aumento no número de vasos sanguíneos na camada da teca e, também, há uma leve diminuição do lúmen; C) Com o avanço da involução, os POCs têm grande redução do lúmen, suas células foliculares são colunares, vacuoladas e PAS-positivas, a membrana basal apresenta-se espessada e a camada de células da teca apresenta ainda mais vasos sanguíneos; D) Depois, há uma nova redução do lúmen e uma redução progressiva do POC, além disso, as células foliculares estão dispostas em agregados; E) Por fim, existe uma oclusão quase total do lúmen que é ocupado por restos celulares. A camada de células da teca somada à membrana basal quase se fundem com o tecido conjuntivo adjacente, e as poucas células foliculares restantes serão totalmente reabsorvidas. Siglas: ovulação (seta dupla); lúmen (L); células foliculares (fc); projeções citoplasmáticas (seta); membrana basal (mb); células da teca (tc); vacúolos (*); vasos sanguíneos (vs); restos celulares (rc); tecido conjuntivo adjacente (conj). Barras: 10 µm.

3.4.2 Interrelação entre autofagia e apoptose ao longo dos processos de involução

3.4.2.1 Atresia folicular

As análises de imunofluorescência demonstraram que a proteína Bcl-2 (em vermelho) esteve presente ao longo de todo o processo de involução dos folículos atresícos, principalmente no citoplasma das células foliculares. A marcação apresentou-se mais intensa nas células foliculares nos estágios iniciais de atresia folicular (Figura 3.4A-B), em especial na região mais próxima da zona pelúcida, até a eliminação completa do oócito (Figura 3.4C-E), com a marcação observada por todo o citoplasma da célula. Após este ponto, essa marcação fica menos intensa (Figura 3.4F). Já em células da teca, observou-se uma marcação evidente no seu citoplasma para Bcl-2 apenas quando o oócito já tinha sido praticamente todo

digerido (Figura 3.4D-E), e quando as células foliculares formaram um agregado a intensidade dessa marcação diminuiu (Figura 3.4F).

Em relação às marcações observadas para a proteína Beclin-1 (em verde), estas tornaram-se mais intensas no citoplasma das células foliculares com o início do extravasamento do vitelo em sua direção (Figura 3.4B). Ao contrário do que foi observado para Bcl-2, esta intensidade é mantida até os últimos momentos do processo de involução (Figura 3.4C-F). O mesmo padrão de marcação no citoplasma de células da teca encontrado para Bcl-2 foi também observado para Beclin-1 (Figura 3.4D-F). Vale ressaltar que uma marcação fraca foi observada no oócito tanto para Bcl-2 como para Beclin-1 quando este começa a ser fagocitado pelas células foliculares (Figura 3.4B-C).

Ainda em referência às proteínas da família Bcl-2, as marcações para Bax (em verde) foram sutis nos estágios iniciais do processo de involução (Figura 3.4A) e tornaram-se mais evidentes quando as células foliculares ficaram colunares e altamente fagocíticas. Estas marcações estão presentes na região das células foliculares mais próximas da zona pelúcida e também nos vacúolos fagocíticos, num primeiro momento (Figura 3.4B), e em seguida foram observadas por todo o citoplasma das células e não nos vacúolos (Figura 3.4C-F). Nas células da teca foi observada uma marcação citoplasmática fraca para Bax após a digestão completa do oócito (Figura 3.4D-E), e uma marcação intensa somente foi constatada no último momento do processo de involução (Figura 3.4F). Observou-se também fraca marcação para Bax no citoplasma do oócito (Figura 3.4A-B).

A proteína lisossomal Catepsina-D (em verde) foi vista nas células foliculares com uma marcação citoplasmática muito sutil nos primeiros momentos de atresia (Figura 3.4A), mas a marcação aumenta de intensidade gradualmente até apresentar-se muito evidente quando as células foliculares estão numa conformação colunar (Figura 3.4B-C). Essa marcação intensa permanece nas células foliculares até ao final do processo de involução (Figura 3.4D-F). Na camada de células da teca, uma marcação citoplasmática para Catepsina-D foi observada apenas após a digestão completa do oócito (Figura 3.4D-F). Observou-se também a marcação desta proteína no citoplasma do oócito: inicialmente a marcação foi fraca (Figura 3.4A), aumentando a sua intensidade quando as células foliculares tornam-se altamente colunares e fagocíticas (Figura 3.4B-C), e, em seguida, reduzindo a sua intensidade novamente (Figura 3.4D).

Para Caspase-3 (em vermelho) houve forte marcação no citoplasma das células foliculares já no momento do extravasamento do vitelo (Figura 3.4B), especialmente nos pontos de limite celular e na região perto da zona pelúcida. Esta marcação manteve-se muito

evidente até ao final do processo de involução (Figura 3.4C-F), espalhando por todo o citoplasma das células, mas ainda mais evidente na região mais próxima da zona pelúcida. Verificou-se também uma marcação citoplasmática fraca nas células da teca no mesmo tempo da primeira marcação das células foliculares (Figura 3.4B-C), mas esta marcação tornou-se evidente apenas quando o oócito já estava quase completamente digerido (Figura 3.4D-F). A marcação mais intensa vista no citoplasma do oócito foi para Caspase-3. Esta marcação foi intensa no início da atresia folicular (Figura 3.4A) e diminuiu quando houve um aumento da atividade fagocítica das células foliculares (Figura 3.4B-C).

3.4.2.2 Complexo pós-ovulatório

A proteína Bcl-2 (em vermelho) esteve presente durante todo o processo de involução, principalmente no citoplasma das células foliculares. Esta marcação tornou-se mais intensa nas células foliculares no início do processo de involução (Figura 3.5A), diminuiu quando as células foliculares tornaram-se colunares e PAS-positivas (Figura 3.5B), e manteve essa intensidade com a formação da agrupamento destas células (Figura 3.5C). Já nas células da teca, só foi observada marcação citoplasmática evidente para Bcl-2 no momento em que as células foliculares estiveram colunares (Figura 3.5B-C), e essa marcação prosseguiu até o final do processo involutivo. Este mesmo padrão de marcação citoplasmática, tanto para as células foliculares como para as da teca, foi observado com a proteína lisossomal Catepsina-D (em verde) (Figura 3.5A-C).

A marcação observada para as proteínas Beclin-1 (em verde), Bax (em verde) e Caspase-3 (em vermelho) foi intensa no citoplasma das células foliculares ao longo de todo o processo involutivo do POC (Figura 3.5A-C). Além disso, a marcação citoplasmática das células da teca para Beclin-1 e Bax foi observada apenas quando as células foliculares apresentaram-se colunares (Figura 3.5B-C) e esta marcação foi mantida até o final do processo de involução. Ao passo que, para Caspase-3, a marcação nas células da teca esteve muito evidente ao longo de todo o processo involutivo (Figura 3.5A-C).

Figura 3.4 – Imunomarcação de cinco proteínas envolvidas nas vias de morte celular – Bcl-2 (em vermelho), Beclin-1 (em verde), Bax (em verde), Cathepsina-D (em verde), Caspase-3 (em vermelho) – durante o processo de involução dos folículos atresícos (os núcleos estão marcados em azul). Na primeira linha são apresentadas as imagens de fase de cada estágio de involução imunomarcado. Nessas imagens, o formato de cada tipo celular é destacado: o oócito está abaixo da linha pontilhada vermelha, a zona pelúcida está entre as linhas pontilhadas vermelhas, as células foliculares estão entre a linha pontilhada vermelha e a linha sólida azul e também estão delimitadas pela linha pontilhada azul, por fim as células da teca estão acima da linha sólida azul. A) Início da atresia folicular: marcação evidente no citoplasma das células foliculares para Bcl-2, e sutil para Beclin-1, Bax e Cathepsina-D. Marcação fraca no citoplasma dos oócitos para Bax e Cathepsina-D, e forte para Caspase-3; B) Extravasamento do vitelo em direção às células foliculares: marcação evidente em células foliculares para Bcl-2, Beclin-1, Bax, Cathepsina-D e Caspase-3, principalmente na região da célula mais próxima da zona pelúcida, e para Bax a marcação também é vista nos vacúolos fagocíticos. Marcação fraca nas células da teca para Caspase-3, e também marcação fraca no citoplasma do oócito para Bcl-2, Beclin-1, Bax e Caspase-3, e forte para Cathepsina-D; C) Células foliculares altamente colunares com grande atividade fagocítica: marcação forte por todo o citoplasma das células foliculares e da teca para Bcl-2, Beclin-1, Bax e Caspase-3. Marcação evidente por todo o citoplasma de células foliculares para Cathepsina-D, mas nenhuma marcação nas células da teca. E, ainda, marcação fraca no citoplasma do oócito para Bcl-2, Beclin-1 e Caspase-3, e forte para Cathepsina-D; D) Oócito praticamente todo digerido e células foliculares muito vacuoladas: marcações evidentes em todo o citoplasma das células foliculares e da teca para Bcl-2, Beclin-1 e Caspase-3. Marcação forte nas células foliculares e fraca nas células da teca para Bax e Cathepsina-D; E) Formação do agregado de células foliculares: o mesmo padrão de marcações descrito anteriormente foi observado também neste estágio; F) As camadas foliculares e da teca não são mais distinguíveis e há o acúmulo de corpos apoptóticos: marcação fraca em células foliculares e da teca para Bcl-2, e forte para Beclin-1, Bax, Cathepsina-D e Caspase-3. Siglas: oócito (Oo); zona pelúcida (zp); células foliculares (fc); vacúolos fagocíticos (*); células da teca (tc); corpos apoptóticos (†). Barras: 10 µm.

Figura 3.5 – Imunomarcacão de cinco proteínas envolvidas nas vias de morte celular – Bcl-2 (em vermelho), Beclin-1 (em verde), Bax (em verde), Catepsina-D (em verde), Caspase-3 (em vermelho) – durante o processo de involução dos complexos pós-ovulatórios (POCs) (os núcleos estão marcados em azul). Na primeira linha são apresentadas as imagens de fase de cada estágio de involução imunomarcado. Nessas imagens, o formato de cada tipo celular é destacado: o lúmen está abaixo da linha pontilhada vermelha, as células foliculares estão entre a linha pontilhada vermelha e a linha sólida azul e também estão delimitadas pela linha pontilhada azul, por fim as células da teca estão acima da linha sólida azul. A) Células foliculares vacuoladas margeando o lúmen: marcação forte no citoplasma das células foliculares para todas as proteínas, mas a marcação em células da teca foi observada apenas para Caspase-3; B) Grande redução do lúmen e as células foliculares apresentam-se colunares, vacuoladas e PAS-positivas: marcação no citoplasma das células foliculares e da teca para Bcl-2 e Catepsina-D, mas uma marcação forte foi apenas observada para Beclin-1, Bax e Caspase-3; C) Oclusão quase total do lúmen e aumento do número de vasos sanguíneos: marcação no citoplasma das células foliculares e da teca para Bcl-2 e Catepsina-D, mas uma marcação forte foi apenas observada para Beclin-1, Bax e Caspase-3. Siglas: lúmen (L); células foliculares (fc); células da teca (tc); vacúolos (*); vasos sanguíneos (vs). Barras: 10 µm.

3.4.2.3 Co-localização de Caspase-3 e Beclin-1 em ambos os processos de involução

Quando analisada a dupla marcação de Beclin-1 (em verde) e Caspase-3 (em vermelho), foi observado no processo involutivo dos folículos atresicos a co-localização (em amarelo) dessas proteínas nas células foliculares, na região próxima à zona pelúcida, enquanto o citoplasma dessas células apresentou marcação evidente para Beclin-1 (Figura 3.6A). Conforme o oócito vai sendo digerido, essa co-localização pode ser observada em pontos

dispersos no citoplasma das células foliculares, apesar de ser ainda mais evidente na região próxima à zona pelúcida, e com menor intensidade nas células da teca (Figura 3.6B). Após a digestão do oócito, a co-localização dessas proteínas é muito evidente e está presente em todo o citoplasma das células foliculares e da teca (Figura 3.6C). No final do processo involutivo, apesar de ainda se observar a dupla marcação, a reação com Caspase-3 foi mais evidente nas células remanescentes do folículo atrésico (Figura 3.6D).

A co-localização de Beclin-1 (em verde) e Caspase-3 (em vermelho) em POCs foi detectada principalmente nas células foliculares, ficando mais evidente ao longo do processo de involução (Figura 3.6A-C). Num primeiro momento há dupla marcação (em amarelo) na região próxima à zona pelúcida, e o restante do citoplasma das células foliculares apresenta marcação evidente para Beclin-1 (Figura 3.6A). Depois, as duas proteínas vão gradualmente se co-localizando no citoplasma das células foliculares (Figura 3.6B-C). Para as células da teca observou-se marcação predominante para Beclin-1 ao longo de todo o processo involutivo (Figura 3.6A-C).

Figura 3.6 – Co-localização (em amarelo) das proteínas Caspase-3 (em vermelho) e Beclin-1 (em verde) ao longo dos processos involutivos (os núcleos estão marcados em azul). Para uma maior correlação morfológica, as imagens de fase correspondentes de cada estágio de involução analisado na dupla-marcação pode ser consultadas nas Figuras 3.4B-D, 3.4F e 3.5A-C. Em atresia folicular: A) Co-localização dessas proteínas nas células foliculares na região próxima a zona pelúcida; B) Conforme o oócito é digerido, essa co-localização pode ser observada em pontos dispersos no citoplasma das células foliculares e com menor intensidade nas células da teca; C) Após a digestão do oócito, a co-localização de Caspase-3 e Beclin-1 é muito evidente e está presente em todo o citoplasma das células foliculares e da teca; D) No final do processo involutivo, apesar de ainda se observar a dupla marcação, a reação com Caspase-3 foi mais evidente. Em POCs: A) Num primeiro momento há dupla marcação nas células foliculares na região próxima a zona pelúcida; B) Depois, as duas proteínas vão gradualmente se co-localizando no citoplasma das células foliculares; C) Por fim, a co-localização de Caspase-3 e Beclin-1 é muito evidente e está presente nas células foliculares. Siglas: oócito (Oo); células foliculares (fc); células da teca (tc); lúmen (L); vasos sanguíneos (vs). Barras: 5 μ m.

3.5 DISCUSSÃO

3.5.1 Caracterização morfológica do processo de involução

Atresia folicular é um fenômeno comum nos ovários de vertebrados em condições naturais e/ou experimentais (Saidapur, 1978), e pode ser induzida por fatores como estresse, agentes biológicos, luminosidade, temperatura, confinamento e níveis hormonais inadequados (Mylonas et al., 1997; Linares-Casenave et al., 2002; Guimarães, Linden, 2004). Sabe-se que a atresia folicular pode ocorrer em qualquer estágio do desenvolvimento e crescimento folicular e que este processo auxilia na manutenção da homeostase ovariana (Kumar, Joy, 2015). Nas espécies de peixes, a atresia folicular de oócitos pré-vitelogênicos foi observada em *Theragra chalcogramma* no período pós-desova (Privalikhin et al., 2015) e também em *Prochilodus affinis* (Rizzo, Bazzoli, 1995). Janz e Van der Kraak (1997) observaram atresia folicular de oócitos pré-vitelogênicos e vitelogênicos em truta arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*) e sugeriram que, em folículos pré-vitelogênicos, a apoptose pode ser importante na seleção e recrutamento de um grupo de folículos para a vitelogênese. No entanto, em *Astyanax altiparanae* foi observada atresia folicular somente em oócitos vitelogênicos. Com relação à isso, Wood e Van der Kraak (2001), e também Üçüncü e Çakici (2009), sugerem que, como a atresia folicular em teleósteos ovíparos é um processo envolvido na conversão energética, o fato dos oócitos vitelogênicos serem os que contém a maior quantidade de vitelo explica porque são eles que normalmente se tornam atrésicos.

Com relação à sua caracterização morfológica, a primeira descrição morfológica feita para atresia folicular em espécies de peixes foi a de Rajalakshmi, em 1966. No entanto, com o passar dos anos, diversas descrições e classificações foram propostas para o processo de reabsorção dos oócitos, sendo estas cada vez mais detalhadas. As classificações mais citadas são a de Saidapur (1978) que estabelece 4 estágios de atresia folicular, e a de Miranda et al. (1999) que detalham ainda mais esses 4 estágios, incluindo estruturas e processos até então não observados. A caracterização feita por Miranda et al. (1999) é corroborada em diversos estudos (Rizzo, Bazzoli, 1995; Mylonas et al., 1997; Senarat et al., 2015) e simplificada em tantos outros (Linares-Casenave et al., 2002; Santos et al., 2005, 2008; Morais et al., 2012; Quintana et al., 2012). Em *Astyanax altiparanae* foi observado que os principais eventos da atresia folicular são similares aos descritos nos estudos anteriores. No entanto, há certas particularidades que não parecem ter sido descritas para nenhuma outra espécie até o momento, como: a retração dos fragmentos remanescente da zona pelúcida com a subsequente

agregação destes em uma grande massa no centro da atresia; e, após a digestão completa dos componentes do oócito, a formação de um agregado de células foliculares vacuolizadas ainda limitado pela camada de células da teca.

Apesar da involução dos folículos atrésicos ser um processo muito conhecido e abordado, o mesmo não parece acontecer com o estudo dos complexos pós-ovulatórios (POCs). As primeiras descrições da involução de POCs em espécies de peixes são de Lang (1981) e Goldberg et al. (1984). No entanto, os estudos dessa estrutura só se tornaram mais expressivos após o trabalho de Drummon et al., em 2000. Dentre as características observadas em *Astyanax altiparanae*, e em outros estudos mais recentes (Romagosa et al., 2005; Santos et al., 2005, 2008; Murua et al., 2006; Morais et al., 2016), destacam-se: hipertrofia e vacuolização das células foliculares, aumento da vascularização da camada da teca e progressiva oclusão do lúmen. Além disso, foi observada neste estudo a presença de projeções citoplasmáticas das células foliculares em direção ao lúmen, em seguida as células foliculares apresentaram-se PAS-positivas e houve um espessamento da membrana basal, e por fim houve a formação de agregados de células foliculares que já não estavam mais PAS-positivas. Essa conformação das células foliculares ao longo do processo de involução de POCs foi observada também em *Perca fluviatilis* (Lang, 1981), mas não nos demais estudos supracitados.

Com relação à PAS-positividade das células foliculares, o mesmo foi observado em *Perca fluviatilis* (Lang, 1981) e parece estar relacionado com uma distinta atividade de síntese e secreção de glicoproteínas (Lang, 1981), de forma que os processos de auto-desintegração e secreção em POCs parecem ocorrer simultaneamente nessas duas espécies. A atividade de síntese e secreção de substâncias já foi observada em complexos pós-ovulatórios de algumas espécies de teleósteos por meio de técnicas ultraestruturais e/ou histoquímicas (Nagahama et al., 1976; Smith, Haley, 1987; Lang, 1981). Assim, apesar de já se ter estabelecido que estas estruturas têm baixa ou nenhuma atividade hormonal na maioria das espécies de teleósteos, isso não parece ser regra para todas as espécies, sendo que algumas delas produzem glicoproteínas. As funções destas proteínas e glicoproteínas devem ser determinadas, uma vez que podem estar envolvidas em atividade hormonal ou mesmo na composição das máquinas de autofagia e/ou apoptose que são necessárias antes do início da morte celular programada.

3.5.2 “Crosstalk” entre autofagia e apoptose durante a involução de atresias foliculares e de complexos pós-ovulatórios

Apesar da quantidade crescente de informações sobre os reguladores pró-sobrevivência nas funções ovarianas em mamíferos, muito pouco é conhecido sobre os fatores envolvidos na modulação dos processos involutivos ovarianos em peixes (Andreu-Vieyra, Habibi, 2000). E, apesar de estudos morfológicos já terem constatado estruturas apoptóticas e inferido sobre a possível regulação desta rota no processo involutivo de folículos atrésicos e complexos pós-ovulatórios (ver item 3.5.1), estudos mostrando a imunolocalização de proteínas envolvidas nas rotas de morte celular ao longo desses processos, em peixes, são poucos e muito recentes (Moraes et al., 2012, 2016). Dessa forma, este estudo é uma importante adição à descrição da distribuição dessas proteínas e seus papéis nos processos involutivos ovarianos em uma outra espécie de peixe, *Astyanax altiparanae*.

Neste estudo observamos, em folículos atrésicos, uma dinâmica nas imunomarcações similar ao descrito por Moraes et al. (2012). Dessa forma, observou-se em *Astyanax altiparanae* uma forte marcação em células foliculares para as proteínas anti-apoptóticas Bcl-2 e Beclin-1 logo no início do processo involutivo, uma marcação evidente nas células da teca em um segundo momento, e, apesar de diminuírem em intensidade, essas marcações estiveram presentes até o fim do processo. Em contrapartida, as proteínas pró-apoptóticas Catepsina-D, Bax e Caspase-3 são destacadas por suas marcações no oócito no início da atresia folicular e por um gradual aumento na marcação em células foliculares e da teca, até apresentarem-se muito fortes no final do processo involutivo. Essa dinâmica das imunomarcações pode ser observada na Figura 3.7.

De acordo com a dinâmica observada para estas proteínas das vias de morte celular, é possível inferir que a permanência de Bcl-2 ao longo do processo de involução parece estar relacionada com a diminuição da susceptibilidade à apoptose das células foliculares e da teca, garantindo a eficiência na reabsorção dos componentes do oócito. Essa função da proteína Bcl-2 ocorre devido à formação de heterodímeros com os membros pró-apoptóticos da família Bcl-2, Bax e Bad (Oltvai et al., 1993). Dessa forma, mesmo que haja marcação fraca para Bax no início da atresia, sua ação é limitada pela grande quantidade de Bcl-2 presente nas células foliculares e da teca, como observado em *Astyanax altiparanae*.

Ainda, Choi et al. (2011) observaram, em um modelo mamífero modificado, que a indução da autofagia em células da granulosa, por exemplo via Beclin-1, pode desencadear a iniciação da apoptose; sugerindo que ambos os processos estão envolvidos na regulação da

morte das células da granulosa. No entanto, sabe-se que, para mamíferos, é necessária a liberação do fator mitocondrial citocromo c para que o fator seguinte, APAF-1, possa agir (Adams, Cory, 1998; Green, 1998); e, enquanto Bcl-2 e Bcl-xL inibem a liberação de citocromo c, Bax e outros membros pró-apoptóticos da família Bcl-2 estimulam a sua liberação através da permeabilização da membrana externa da mitocôndria (Green, Reed, 1998; Jurgensmeier et al., 1998; Mairui et al., 2007).

Quando na presença de citocromo c, APAF-1 sofre mudanças conformacionais que permitem sua interação com a pro-caspase-9 iniciando a ativação da cascata das caspases (Zou et al., 1997; Green, 1998). Esse parece ser o caso no processo involutivo de atresia folicular em *Astyanax altiparanae*, pois Beclin-1 está constantemente presente no processo atrésico, além de haver uma diminuição na marcação de Bcl-2 concomitantemente com um aumento na marcação de Bax e de Caspase-3.

Observou-se, também, uma expressiva liquefação das proteínas vitelínicas durante os primeiros estágios da atresia folicular em *Astyanax altiparanae*, o que parece estar relacionado com a marcação da proteína Catepsina-D. Esta liquefação do vitelo, muito recorrente nos processos de involução em espécies de peixes, levou alguns pesquisadores a postularem que os estágios iniciais da atresia folicular em teleósteos podem exigir enzimas proteolíticas, como as Catepsinas-B, -D e -L, a fim de que ocorra a clivagem das proteínas vitelínicas antes que a atresia folicular possa prosseguir (Wood, Van der Kraak, 2003; Carnevali et al., 2006). Esse processo está relacionado com a facilitação na digestão do vitelo pelas células foliculares, acelerando o processo de involução (Eykelbosh, Van der Kraak, 2010). Além da proteólise do vitelo, estudos recentes com espécies de mamíferos indicam que a Catepsina-D pode apresentar vários papéis fisiológicos relacionados com a regulação da apoptose e da autofagia (Hasui et al., 2011), como a permeabilização da membrana lisossomal e a translocação de enzimas lisossomais para o citoplasma, liberando fatores apoptogênicos e induzindo a apoptose via Bax (Bidère et al., 2003).

Quanto à dupla marcação de Beclin-1 e Caspase-3 em *Astyanax altiparanae*, num primeiro momento foi observada marcação evidente para Beclin-1 e marcação discreta para Caspase-3; no entanto, com o avanço do processo involutivo, a marcação para Caspase-3 foi ficando mais evidente e sobrepondo à de Beclin-1, até a predominância de Caspase-3 no final da involução. A dinâmica dessas imunomarcações está também reunida na Figura 3.7. Escobar et al. (2013) observaram que algumas células foliculares de folículos atrésicos de camundongos apresentam-se simultaneamente positivas para ambos os marcadores (Caspase-3 e Beclin-1), e então sugeriram que proteínas de ambos os processos de morte celular já estão

presentes nos folículos quando ocorre o processo de morte celular. Além disso, essas proteínas parecem se regular ao longo do processo involutivo, assim já foi descrita a habilidade da Caspase-3, -7 e -8 em clivar Beclin-1 (como observado em ovários de mamíferos), comprometendo sua atividade pró-autofágica e liberando fragmentos capazes de se translocar até à mitocôndria e sensibilizar a célula aos sinais apoptóticos (Kang et al., 2011). Logo, esses aspectos implicam numa ativação coordenada das vias de morte celular de acordo com os estágios da atresia folicular.

Com relação aos complexos pós-ovulatórios (POCs), em *Astyanax altiparanae* foi observada uma dinâmica das proteínas anti- e pró-apoptóticas muito parecida com a da atresia folicular, de forma que há uma marcação mais evidente de Bcl-2, Beclin-1 e Catepsina-D no início da involução, seguida de um aumento gradual na marcação de Bax e Caspase-3 até o fim do processo involutivo. Com relação à co-localização de Caspase-3 e Beclin-1, esta foi detectada em POCs principalmente nas células foliculares, com uma marcação mais acentuada para Beclin-1 no início, mas com a marcação de Caspase-3 ficando mais evidente ao longo do processo de involução. Essa dinâmica das proteínas das vias de morte celular em POCs (representada graficamente na Figura 3.7) também foi observada para *Prochilodus argenteus*, *Leporinus obtusidens* e *Astyanax bimaculatus* (Morais et al., 2016).

Observou-se, em *Astyanax altiparanae*, que a autofagia também precede a apoptose na involução de complexos pós-ovulatórios, assim como o observado para a atresia folicular (consulte a Figura 3.7 para observar todas essas características em conjunto). Esse mecanismo parece ocorrer nos estágios iniciais da involução de POCs, assim como para a involução da atresia folicular, com a finalidade de reciclagem energética antes da remoção das células foliculares degeneradas por apoptose (Choi et al., 2013; Moraes et al., 2016). Além disso, a autofagia ocorrendo antes da apoptose pode facilitar a liberação de sinais quimiotáticos, os quais medeiam o recrutamento de células fagocíticas (Drummond et al., 2000; Moraes et al., 2016), como observado em *Astyanax altiparanae* com a associação de granulócitos nas proximidades de folículos atrésicos e POCs (dados não mostrados).

Figura 3.7 – Modelo proposto para a dinâmica de proteínas autofágicas e apoptóticas nos diferentes tipos de células ao longo do processo involutivo de atresias foliculares e de complexos pós-ovulatórios. No oócito, foi observada marcação citoplasmática fraca para Bax e Catepsina-D e marcação forte para Caspase-3 no início da atresia folicular, e essas marcações diminuíram gradualmente em intensidade à medida que o oócito foi reabsorvido pelas células foliculares. A marcação nas células foliculares foi fraca para Bcl-2, Beclin-1, Bax e Catepsina-D no início da atresia folicular, e estas aumentaram de intensidade conforme o oócito era digerido, inclusive para Caspase-3 numa fase posterior. Todas essas marcações foram observadas no citoplasma das células foliculares, particularmente na região mais próxima à zona pelúcida, e nos vacúolos fagocíticos para Bax. Conforme aumentou o número de corpos apoptóticos, a marcação para Bcl-2, Beclin-1 e Cathepsin-D diminuiu. Em complexos pós-ovulatórios, as células foliculares apresentaram-se intensamente marcadas para todas as proteínas analisadas logo no início do processo de involução. As marcações para Bcl-2, Beclin-1 e Catepsina-D diminuíram gradualmente, enquanto as marcações para Bax e Caspase-3 permaneceram intensas até o final do processo de involução. Finalmente, as células de teca apresentaram-se fracamente marcadas para Bcl-2, Beclin-1, Bax e Caspase-3 após o início da reabsorção do oócito, e essa marcação aumentou em intensidade à medida que aumentou a atividade fagocitária das células foliculares. A Caspase-3 permaneceu intensamente marcada até o final da involução da atresia folicular, enquanto as outras proteínas diminuíram em intensidade após a formação do agregado de células foliculares vacuolizadas. Nos complexos pós-ovulatórios, a marcação das células de teca tornou-se evidente para Caspase-3 no início do processo de involução, enquanto a marcação para as outras proteínas foi fraca. Estas marcações aumentaram em intensidade até ao final do processo de involução, no qual houve marcação evidente para Bcl-2 e Catepsina-D e marcação forte para Beclin-1, Bax e Caspase-3. Por fim, observou-se que a autofagia precede a apoptose em ambos os processos de involução, sugerindo uma relação entre as vias de autofagia e apoptose nos processos de involução ovariana.

Por fim, tomando como base os resultados morfológicos e imuno-histoquímicos apresentados, pode-se sugerir que em *Astyanax altiparanae*, assim como em outras espécies de teleosteos estudadas (Morais et al., 2012, 2016), há uma interrelação entre as vias de

autofagia e apoptose nos processos de involução em ovários (Figura 3.7). Ademais, um balanço refinado entre os sinais de sobrevivência e morte celular parece ser essencial na determinação do destino das células foliculares, principalmente na atresia folicular, mas também em complexos pós-ovulatórios. Ainda, os resultados deste estudo corroboram o proposto por Moraes et al. (2012, 2016) de que as reações imuno-histoquímicas para as proteínas das vias de morte celular apresentam um padrão similar de expressão molecular entre as espécies de peixes, sugerindo que os processos involutivos não estão diretamente relacionados com as suas estratégias reprodutivas. Aliás, as vias regulatórias dos processos de involução parecem ser conservadas entre as espécies de teleósteos com fertilização externa.

3.6 CONCLUSÕES

- Os principais eventos dos processo involutivo de atresias foliculares parecem ser similares aos descritos em estudos anteriores; porém, há certas particularidades morfológicas observadas nesse estudo que não parecem terem sido descritas para nenhuma outra espécie até o momento, como a retração dos fragmentos remanescentes da zona pelúcida com sua subsequente agregação em uma grande massa no centro da atresia folicular e a formação de uma agregado de células foliculares vacuolizadas..

- As características do processo involutivo em POCs em *Astyanax altiparanae* foram similares aos já descritos na literatura; no entanto, parece que algumas poucas espécies, inclusive *A. altiparanae*, os POCs produzem glicoproteínas, cuja função ainda deve ser verificada.

- Conforme foi observado nos resultados das reações imuno-histoquímicas, a autofagia precede a apoptose em ambos os processos de involução, atresias foliculares e complexos pós-ovulatórios, o que pode estar relacionado com a reciclagem energética requerida antes da remoção das células foliculares degeneradas por apoptose.

- Em *Astyanax altiparanae*, assim como em outras espécies estudadas, parece haver uma interrelação entre as vias de autofagia e apoptose nos processos de involução em ovários, e as vias regulatórias dos processos de involução parecem ser conservadas entre as espécies de teleósteos com fertilização externa.

REFERÊNCIAS³

- Adams JM, Cory S. The Bcl-2 protein family: arbiters of cell survival. *Science*. 1998; 281(5381):1322-6.
- Andreu-Vieyra CV, Habibi HR. Factors controlling ovarian apoptosis. *Can J Physiol Pharmacol*. 2000; 78(12):1003-12.
- Bidère N, Lorenzo HK, Carmona S, Laforge M, Harper F, Dumont C, Senik A. Cathepsin D triggers bax activation, resulting in selective apoptosis-inducing factor (AIF) relocation in T lymphocytes entering the early commitment phase to apoptosis. *J Biol Chem*. 2003; 278(33):31401-11.
- Boone DL, Tsang BK. Caspase-3 in the rat ovary: localization and possible role in follicular atresia and luteal regression. *Biol Reprod*. 1998; 58(6):1533-9.
- Byskov AG. Follicular atresia. In: Jones RE (ed.). *The vertebrate ovary: Comparative Biology and Evolution*. New York: Plenum Press; 1978. p. 533-62.
- Carnevali O, Cionna C, Tosti L, Lubzens E, Maradonna F. Role of cathepsins in ovarian follicle growth and maturation. *Gen Comp Endocrinol*. 2006; 146(3):195-203.
- Cassel M, Chehade C, Branco GS, Caneppele D, Romagosa E, Borella MI. Ovarian development and the reproductive profile of *Astyanax altiparanae* (Teleostei, Characidae) over a year: Applications in fish farming. *Theriogenology*. 2017; 98:1-15.
- Chehade C, Cassel M, Borella MI. Induced reproduction in a migratory teleost species by water level drawdown. *Neotrop Ichthyol*. 2015; 13(1):205-12.
- Choi J, Jo M, Lee E, Choi D. Induction of apoptotic cell death via accumulation of autophagosomes in rat granulosa cells. *Fert Steril*. 2011; 95(4):1482-6.
- Choi J, Jo M, Lee E, Choi D. AKT is involved in granulosa cell autophagy regulation via mTOR signaling during rat follicular development and atresia. *Reproduction*. 2013; 147(1):73-80.
- Drummond CD, Bazzoli N, Rizzo E, Sato Y. Postovulatory follicle: a model for experimental studies of programmed cell death or apoptosis in teleosts. *J Exp Zool*. 2000; 287(2):176-82.
- Eisenberg-Lerner A, Bialik S, Simon H-U, Kimchi A. Life and death partners: apoptosis, autophagy and the cross-talk between them. *Cell Death Differ*. 2009; 16(7):966-75.
- Escobar ML, Echeverría OM, Casasa AS, García G, Aguilar SJ, Vázquez-Nin GH. Involvement of pro-apoptotic and pro-autophagic proteins in granulosa cell death. *Cell Biol*. 2013; 1(1):9-17.

³ De acordo com: International Committee of Medical Journal Editors. [Internet]. Uniform requirements for manuscripts submitted to biomedical journals. [2011 Jul 15]. Available from: http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.html

Eykelbosh AJ, Van der Kraak G. A role for the lysosomal protease cathepsin B in zebrafish follicular apoptosis. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol*. 2010; 156(2):218-23.

Garutti V, Britski HA. Descrição de espécie nova de *Astyanax* (Teleostei: Characidae) da bacia do alto rio Paraná e considerações sobre as demais espécies do gênero na bacia. *Comun Mus Ciênc Tecnol PUCRS*. 2000; 13:65-88.

Goldberg SR, Alarcon VH, Alheit J. Postovulatory follicle histology of the pacific sardine, *Sardinops sagax*, from Peru. *Fish Bull*. 1984; 82(2):443-5.

Gonçalves LU, Parisi G, Bonelli A, Sussel FR, Viegas EMM. The fatty acid compositions of total, neutral and polar lipids in wild and farmed lambari (*Astyanax altiparanae*) (Garutti & Britski, 2000) broodstock. *Aquacult Res*. 2014; 45(2):195-203.

Green DR. Apoptotic pathways: the roads of ruins. *Cell*. 1998; 94(6):695-8.

Green DR, Reed JC. Mitochondria and apoptosis. *Science*. 1998; 281(5381):1309-12.

Grier HJ. Development of the follicle complex and oocyte staging in red drum, *Sciaenops ocellatus* Linnaeus, 1776 (Perciformes, Sciaenidae). *J Morphol*. 2012; 273(8):801-29.

Guimarães CA, Linden R. Programmed cell deaths: Apoptosis and alternative deathstyles. *Eur J Biochem*. 2004; 271(9):1638-50.

Habibi HR, Andreu-Vieyra CV. Hormonal regulation of follicular atresia in teleost fish. In: Babin PJ, Cerdà J, Lubzens E (eds.). *The fish oocyte: from basic studies to biotechnological applications*. Netherlands: Springer; 2007. p. 235-53.

Hacker G. The morphology of apoptosis. *Cell Tiss Res*. 2000; 301(1):5-17.

Hasui K, Wang J, Jia X, Tanaka M, Nagai T, Matsuyama T, Eizuru Y. Enhanced autophagy and reduced expression of cathepsin-D are related to autophagic cell death in Epstein-Barr virus-associated nasal natural killer/T-cell lymphomas: an immunohistochemical analysis of beclin-1, LC3, mitochondria (AE-1), and cathepsin-D in nasopharyngeal lymphomas. *Acta Histochem Cytochem*. 2011; 44(3):119-31.

Huettenbrenner S, Maier S, Leisser C, Polgar D, Strasser S, Grusch M, Krupitza G. The evolution of cell death programs as prerequisites of multicellularity. *Mutat Res*. 2003; 543(3):235-49.

Janz DM, McMaster ME, Munkittrick KR, Van der Kraak G. Elevated ovarian follicular apoptosis and heat shock protein-70 expression in white sucker exposed to bleached kraft pulp mill effluent. *Toxicol Appl Pharmacol*. 1997; 147(2):391-8.

Janz DM, Van der Kraak G. Suppression of apoptosis by gonadotropin 17beta-estradiol and epidermal growth factor in rainbow trout preovulatory ovarian follicles. *Gen Comp Endocrinol*. 1997; 105(2):186-93.

- Jurgensmeier JM, Xie Z, Deveraux Q, Ellerby L, Bredesen D, Reed J. Bax directly induces release of cytochrome c from isolated mitochondria. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1998; 95(9):4997-5002.
- Kang R, Zeh HJ, Lotze MT, Tang D. The Beclin-1 network regulates autophagy and apoptosis. *Cell Death Differ*. 2011; 18(4):571-80.
- Krumschnabel G, Podrabsky JE. Fish as model systems for the study of vertebrate apoptosis. *Apoptosis*. 2009; 14(1):1-21.
- Kumar R, Joy KP. Melanins as biomarkers of ovarian follicular atresia in the catfish *Heteropneustes fossilis*: biochemical and histochemical characterization, seasonal variation and hormone effects. *Fish Physiol Biochem*. 2015; 41(3):761-72.
- Lang I. Electron microscopic and histochemical study of the postovulatory follicles of *Perca fluviatilis* L. (Teleostei). *Gen Comp Endocrinol*. 1981; 45(2):219-33.
- Linares-Casenave J, Van Eenennaam JP, Doroshov SI. Ultrastructural and histological observations on temperature-induced follicular ovarian atresia in the white sturgeon. *J Appl Ichthyol*. 2002; 18(4-6):382-90.
- Maiuri MC, Criollo A, Kroemer G. Crosstalk between apoptosis and autophagy within the Beclin 1 interactome. *EMBO J*. 2010; 29(3):515-6.
- Maiuri MC, Zalckvar E, Kimchi A, Kroemer G. Self-eating and self-killing: crosstalk between autophagy and apoptosis. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2007; 8(9):741-52.
- Miranda ACL, Bazzoli N, Rizzo E, Sato Y. Ovarian follicular atresia in two teleost species: a histological and ultrastructural study. *Tissue Cell*. 1999; 31(5):480-8.
- Morais RDVS, Thomé RG, Lemos FS, Bazzoli N, Rizzo E. Autophagy and apoptosis interplay during follicular atresia in fish ovary: a morphological and immunocytochemical study. *Cell Tissue Res*. 2012; 347(2):467-78.
- Morais RDVS, Thomé RG, Santos HB, Bazzoli N, Rizzo E. Relationship between bcl-2, bax, beclin-1, and cathepsin-D proteins during postovulatory follicular regression in fish ovary. *Theriogenology*. 2016; 85(6):1118-31.
- Murua H, Lucio P, Santurtún M, Motos L. Seasonal variation in egg production and batch fecundity of European hake *Merluccius merluccius* (L.) in Bay of Biscay. *J Fish Biol*. 2006; 69(5):1304-16.
- Mylonas CC, Woods III LC, Zohar Y. Cyto-histological examination of post-vitellogenesis and final oocyte maturation in captive-reared striped bass. *J Fish Biol*. 1997; 50(1):34-49.
- Mylonas CC, Zohar Y. Promoting oocyte maturation, ovulation and spawning in farmed fish. In: Babin PJ, Cerdà J, Lubzens E (eds.). *The fish oocyte: From basic studies to biotechnological applications*. Netherlands: Springer; 2007. p. 437-74.

- Nagahama Y, Chan K, Hoar WS. Histochemistry and ultrastructure of pre- and post-ovulatory follicles in the ovary of the goldfish, *Carassius auratus*. Can J Zool. 1976; 54(7):1128-39.
- Oltvai ZN, Milliman CL, Korsmeyer SJ. Bcl-2 heterodimerizes in vivo with a conserved homolog Bax, that accelerates programmed cell death. Cell. 1993; 74(4):609-19.
- Privalikhin AM, Zhukova KA, Poluektova OG. Atresia of developing oocytes in walleye Pollock *Theragra chalcogramma*. J Ichthyol. 2015; 55(5):664-70.
- Quintana CF, Cohene TB, Arbués R, Domitrovic H, González J. Follicular atresia in ovaries of *Prochilodus lineatus*. Int J Morphol. 2012; 30(4):1301-8.
- Quintero-Hunter I, Grier H, Muscato M. Enhancement of histological detail using metanil yellow as a counterstain in periodic acid/Schiff's hematoxylin staining of glycol methacrylate tissue sections. Biotech Histochem. 1991; 66(4):169-72.
- Rajalakshmi M. Atresia of oocytes and ruptured follicles in *Gobius giuris* (Hamilton-Buchanan). Gen Comp Endocrinol. 1966; 6(3):378-85.
- Rizzo E, Bazzoli N. Follicular atresia in curimatá-pioa *Prochilodus affinis* Reinhardt, 1874 (Pisces, Characiformes). Rev Bras Biol. 1995; 55(4):697-703.
- Romagosa E, Batlouni SR, Borella MI, Leonardo AFG. Involução dos folículos pós-ovulatórios em *Pseudoplatystoma fasciatum* (Pisces, Teleostei). B Inst Pesca. 2005; 31(2):129-35.
- Saidapur SK. Follicular atresia in the ovaries of non-mammalian vertebrates. Int Rev Cytol. 1978; 54:225-44.
- Santos HB, Rizzo E, Bazzoli N, Sato Y, Moro L. Ovarian regression and apoptosis in the South American teleost *Leporinus taeniatus* Lütken (Characiformes, Anostomidae) from the São Francisco Basin. J Fish Biol. 2005; 67(5):1446-59.
- Santos HB, Thomé RG, Arantes FP, Sato Y, Bazzoli N, Rizzo E. Ovarian follicular atresia is mediated by heterophagy, autophagy, and apoptosis in *Prochilodus argenteus* and *Leporinus taeniatus* (Teleostei: Characiformes). Theriogenology. 2008; 70(9):1449-60.
- Selman K, Wallace RA. Review cellular aspects of oocyte growth in teleosts. Zool Sci. 1989; 6:211-31.
- Senarat S, Kettratad J, Jiraungkoorskul W. Classification stages of novel atretic structure in short mackerel *Rastrelliger brachysoma* (Bleeker, 1851) from the Upper Gulf of Thailand. Songklanakarin J Sci Technol. 2015; 37(5):569-73.
- Smith CJ, Haley SR. Evidence of steroidogenesis in postovulatory follicles of the tilapia, *Oreochromis mossambicus*. Cell Tissue Res. 1987; 247(3):675-87.
- Suzuki HI, Bulla CK, Agostinho AA, Gomes LC. Estratégias reprodutivas de assembléias de peixes em reservatórios. In: Rodrigues L, Thomaz SM, Agostinho AA, Gomes LC (eds.).

Biocenose em reservatórios: padrões espaciais e temporais. São Carlos: Rima Editora; 2005. p. 223-36.

Thomé RG, Santos HB, Arantes FP, Domingos FFT, Bazzoli N, Rizzo E. Dual roles for autophagy during follicular atresia in fish ovary. *Autophagy*. 2009; 5(1):117-9.

Thomé RG, Santos HB, Arantes FP, Prado PS, Domingos FFT, Sato Y, Bazzoli N, Rizzo E. Regression of post-ovulatory follicles in *Prochilodus costatus* Valenciennes, 1850 (Characiformes, Prochilodontidae). *Braz J Morphol Sci*. 2006; 23:495-500.

Üçüncü SI, Çakici Ö. Atresia and apoptosis in preovulatory follicles in the ovary of *Danio rerio* (zebrafish). *Turk J Fish Aquat Sci*. 2009; 9(2):215-21.

Wood AW, Van der Kraak GJ. Apoptosis and ovarian function: novel perspectives from the teleosts. *Biol Reprod*. 2001; 64(1):264-71.

Wood AW, Van der Kraak G. Yolk proteolysis in rainbow trout oocytes after serum-free culture: evidence for a novel biochemical mechanism of atresia in oviparous vertebrates. *Mol Reprod Dev*. 2003; 65(2):219-27.

Zou H, Henzel WL, Liu X, Lutschg A, Wang X. Apaf-1, a human protein homologous to *C. elegans* CED-4 participates in cytochrome c-dependent activation of caspase-3. *Cell*. 1997; 90(3):405-13.