

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

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 teleosteos, 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 teleosteos, 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 assíncrono, 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 morfológicamente 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.

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.

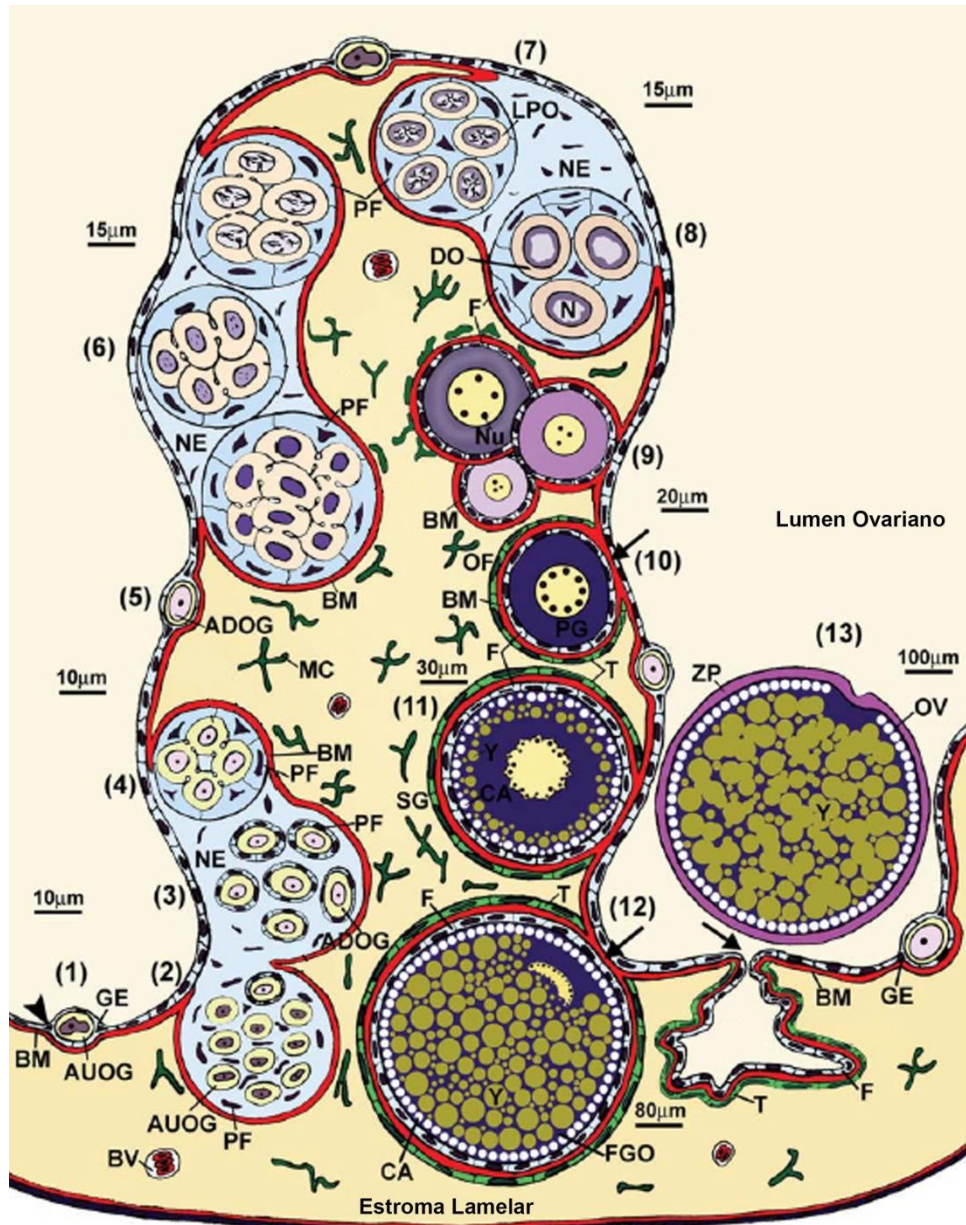


Figura 1.1 – Desenho esquemático, adaptado de Quagio-Grassioto et al. (2011), mostrando o desenvolvimento oocitário, desde a proliferação das oogônias no epitélio germinativo até a ovulação do oócito maduro. Assim, é possível observar: (1) oogônias indiferenciadas (AUOG) espalhadas no epitélio germinativo (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, posteriormete, (13) ser ovulados (OV), ou seja liberados no lúmen ovariano. BV, vaso sanguíneo; CA, alvéolos corticais; MC, células mesenquimais; N, núcleo; Nu, nucleolo; Y, vesículas de vitelo; ZP, zona pelúcida.

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).

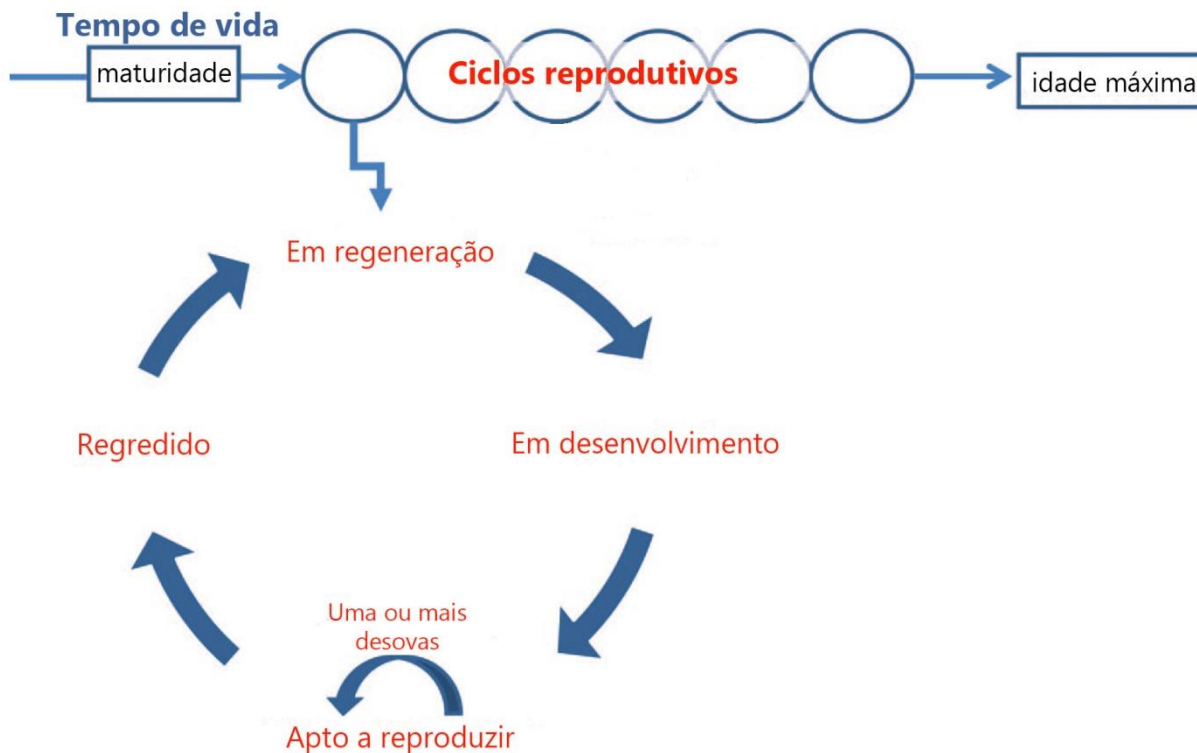


Figura 1.2 – Modelo conceitual de características reprodutivas universais em peixes. Todos os peixes atingem a maturidade sexual, passam por um ou mais ciclos reprodutivos, liberam gametas ou prole uma ou mais vezes dentro de um determinado ciclo reprodutivo, atingem a idade máxima reprodutiva, e morrem (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.

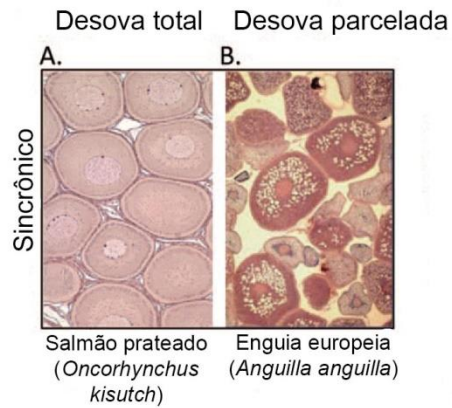
O modo como ocorre o desenvolvimento ovariano, o desenvolvimento oocitário e o ciclo reprodutivo das várias espécies de peixes determina as suas estratégias reprodutivas específicas. Assim, como há uma grande diversidade entre as espécies de peixes, há também diversas estratégias reprodutivas. Dentre 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 semélpas 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

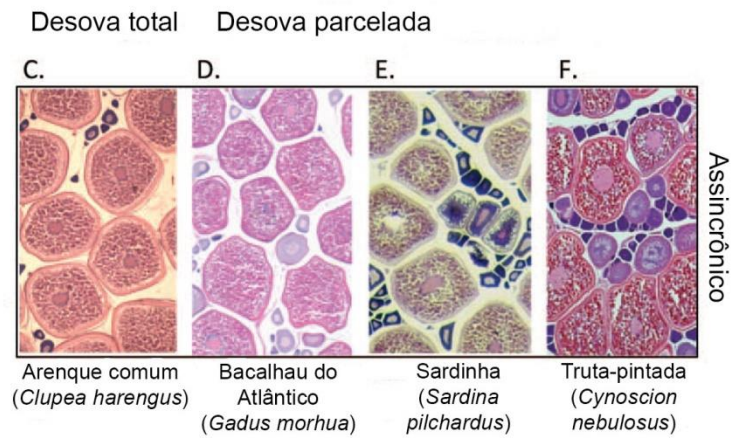


Figura 1.3 – Estratégias reprodutivas: quantidade de ciclos reprodutivos vs. desenvolvimento ovariano e tipo de desova. Os padrões de desova se estabelecem ao longo de um *continuum* de (A) espécies semélparas (com um único ciclo reprodutivo em sua vida) com desenvolvimento ovariano sincrônico e desova 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).

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.

2.6 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.

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, conseqüentemente, 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 têm 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.

3.6 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.

REFERÊNCIAS CAPÍTULO 1*

- 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.

* 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 semicyclic 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.

Nuñez 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.

REFERÊNCIAS CAPÍTULO 2*

- 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.

* 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 semicyclic 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 Ubatiba River, Maricá, RJ, Brazil. *Braz J Biol*. 2005; 65(4):643-9.

Melo FC, Maldonado IR, 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: Baldisseroto 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, Uruguaiana, 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.

REFERÊNCIAS CAPÍTULO 3*

- 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.

* 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 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.

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.