

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE DARCY  
RIBEIRO**

**JOÃO CARLOS FOSSE FILHO**

**DESCRIÇÃO MORFOLÓGICA DO OVÁRIO DE *Melanotaenia  
praecox* (WEBER & DE BEAUFORT, 1922) E AVALIAÇÃO  
TEMPORAL DOS FOLÍCULOS PÓS OVULATÓRIOS**

**Campos dos Goytacazes - RJ**

**Dezembro 2013**

JOÃO CARLOS FOSSE FILHO

DESCRIÇÃO MORFOLÓGICA DO OVÁRIO DE *Melanotaenia praecox*  
(WEBER & DE BEAUFORT, 1922) E AVALIAÇÃO TEMPORAL DOS  
FOLÍCULOS PÓS OVULATÓRIOS

Dissertação apresentada ao Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Ciência Animal na Área de Concentração em Produção Animal.

Orientador: Dalcio Ricardo de Andrade

Campos dos Goytacazes - RJ

Dezembro 2013

JOÃO CARLOS FOSSE FILHO

DESCRIÇÃO MORFOLÓGICA DO OVÁRIO DE *Melanotaenia praecox*  
(WEBER & DE BEAUFORT, 1922) E AVALIAÇÃO TEMPORAL DOS  
FOLÍCULOS PÓS OVULATÓRIOS

Dissertação apresentada ao Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Ciência Animal na Área de Concentração em Produção Animal.

Aprovado em 9 de Dezembro de 2013.

BANCA EXAMINADORA

---

Prof. Marcelo Fanttini Polese - IFES - Piúma

---

Prof. Leonardo Serafim da Silveira - UENF

---

Prof. Manuel Vazquez Vidal Junior - UENF

---

Prof. Dalcio Ricardo de Andrade - UENF  
(Professor Orientador)

## AGRADECIMENTOS

À Deus, o que seria de mim sem a fé que eu tenho nele.

Ao meu pai, mãe, irmã e avó pela paciência e auxílio nas horas difíceis. Em especial ao meu pai por estar sempre pronto a me ouvir, me acalmar e me orientar a tomar sempre a melhor decisão. E a minha mãe pelo apoio incondicional e amor que está sempre disposta a me oferecer.

Ao professor e orientador Dr. Dalcio Ricardo de Andrade por todo o apoio, incentivo, paciência, ensinamentos e amizade. Agradeço também ao professor e co-orientador Manuel Vazquez Vidal Junior pelo incentivo e por ser o responsável pela minha chegada à UENF em janeiro de 2009, como estagiário.

À Samira Salim Mello Gallo pelo amor, paciência, apoio incondicional, pela dedicação, por compartilhar comigo todos os momentos, bons e difíceis, sendo participativa em muitos deles.

Ao professor Dr. Leonardo Serafim da Silveira pela ajuda, disponibilidade e apoio prestado nesta pesquisa.

Aos meus amigos de laboratório, Rafael Vieira de Azevedo, Douglas da Cruz Mattos, Leonardo Demier Cardoso, João Vitor de Azevedo Manhães e Marcella Costa Radael pela amizade, apoio e por sempre torcerem pelo meu sucesso.

À todos os meus colegas de laboratório, os que concluíram sua formação e seguiram seus caminhos, aos que permaneceram até hoje e aos que chegaram recentemente. Agradeço pela convivência e espero que possamos continuar trabalhando juntos ainda por um longo tempo.

À todos os meus colegas de república, os do passado e presente.

À todos os familiares que torceram e acreditaram na conclusão deste curso, fico muito grato.

À todos aqueles que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho, os meus sinceros agradecimentos.

## RESUMO

FOSSE FILHO, J. C. Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro; Dezembro de 2013; Descrição morfológica do ovário de *Melanotaenia praecox* (WEBER e DE BEAUFORT, 1922) e avaliação temporal dos folículos pós ovulatórios. Orientador: Prof. Dr Dalcio Ricardo de Andrade.

O conhecimento da biologia reprodutiva, bem como do comportamento reprodutivo de cada espécie de peixe é necessário para o domínio de sua reprodução em ambiente artificial. No trabalho, foi realizado um estudo da morfologia ovariana pós desova da *Melanotaenia praecox*. Para realização deste estudo foram coletados os ovários das fêmeas imediatamente após a desova e com 2, 4, 6, 10, 15, 20, 25 e 32 dias após a desova. Os ovários foram fixados em formalina neutra tamponada a 10% por no mínimo 48 horas e a seguir, foram confeccionadas lâminas histológicas coradas em HE para análise de cada fase de desenvolvimento dos ovócitos. Como a análise das lâminas histológicas revelou a presença de todas as fases de desenvolvimento ovocitário no mesmo ovário, este peixe apresentou, portanto, organização de ovário do tipo assincrônico. As fases de desenvolvimento ovocitário foram divididas em: avitelogênica e vitelogênica. A fase avitelogênica foi dividida em duas subfases (ovócitos primários e secundários), ambas foram caracterizadas pela ausência de vitelo em seu citoplasma. Do mesmo modo, a fase vitelogênica também foi dividida em duas subfases (alvéolo cortical e vitelogênica). Essa fase se caracteriza pelo início de inclusão de vitelogenina no citoplasma. Na subfase de alvéolo cortical são imperceptíveis ainda os glóbulos de vitelo, dessa forma, esta fase se caracteriza pela presença de alvéolos corticais e a subfase vitelogênica pelo aparecimento dos glóbulos de vitelo. Além da caracterização ovocitária, as observações histológicas permitiram a descrição dos períodos de reabsorção dos folículos pós ovulatórios. Os principais eventos da reabsorção dos folículos foram: constrição mecânica; invasão de células sanguíneas de defesa; restrição do lúmen; vacuolização e invasão de tecido conjuntivo. Com 32 dias após a desova, devido a redução de seu tamanho os folículos dificilmente eram encontrados, apresentavam aspecto de massa de células amorfa residual e encontravam-se completamente circundado e infiltrado por tecido conjuntivo. Pode-se concluir que *M. praecox* apresenta organização ovariana do tipo assincrônica, seus ovócitos são divididos em quatro subfases de desenvolvimento e os folículos com 32 dias após a desova se apresentam quase totalmente reabsorvidos.

Palavras-chave: Ovócito; Morfologia, Desenvolvimento ovocitário; *Melanotaenia praecox*; apoptose.

## ABSTRACT

FOSSE FILHO, J. C. Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro; December de 2013; Morphological description ovarian *Melanotaenia praecox* (WEBER and DE BEAUFORT, 1922) and temporal evaluation of post ovulatory follicles. Advisor: Prof. Dr Dalcio Ricardo de Andrade.

Knowledge of the reproductive biology and reproductive behavior of each fish species is required for the domain of its reproduction in artificial environment. In this work, it was developed a protocol spawning for *Melanotaenia praecox* allowing the study of ovarian morphology after spawning of this species. In this protocol were collected ovaries of females immediately after spawning and 2, 4, 6, 10, 15, 20, 25 and 32 days after spawning. The ovaries were fixed in buffered neutral formalin 10% for at least 48 hours and then histological slides stained with HE were prepared for analysis of each phase of development of oocytes. As the analysis of histological slides revealed the presence of all stages of oocyte development in the same ovary, this fish presented, therefore, ovarian organizing of asynchronous type. Stages of oocyte development were divided into: avitellogenic and vitellogenic. Avitellogenic phase was divided into two subphases (primary and secondary oocytes), both were characterized by the absence of yolk in the cytoplasm. Similarly, the phase vitellogenic was also divided into two subphases (cortical alveolus and vitellogenic). This phase is characterized by start of the inclusion of vitellogenin in the cytoplasm. In subphase cortical alveolus are imperceptible even yolk globules, thus, this phase is characterized by the presence of cortical alveoli and vitellogenic subphase by the appearance of yolk globules. Besides characterization oocyte, the histological slides allowed the description of the periods of resorption of post ovulatory follicles. The main events of the resorption of follicles were: mechanical constriction, invasion of blood cells of defense; restriction of the lumen, vacuolization and invasion of conjunctive tissue. With 32 days after spawning, due to a reduction of its size follicles were hardly found, had aspect of mass of residual amorphous cells and were completely surrounded and infiltrated by conjunctive tissue. It can be concluded that *M. praecox* shows organization of type asynchronous ovarian, their oocytes are divided into four subphases of development and follicles with 32 days after spawning present almost completely reabsorbed.

Keywords: Oocyte development; *Melanotaenia neon*; apoptosis.

## LISTA DE QUADRO

<b>Quadro 1</b>	Descrições morfológicas dos folículos pós ovulatórios de <i>M. praecox</i> em diferentes estágios de reabsorção.....	40
-----------------	--	----

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b>	Exemplar adulto de <i>M. praecox</i> .....	15
<b>Figura 2</b>	Aquários experimentais do setor de piscicultura do Laboratório de Zootecnia e Nutrição Animal/CCTA/UENF .....	25
<b>Figura 3</b>	Fêmea de <i>M. praecox</i> com cavidade celômica aberta. Seta indicando a posição do ovário (Ov). Ovário em destaque.....	30
<b>Figura 4</b>	Fotomicrografia do ovário de <i>M. praecox</i> com diferentes tipos ovocitários.. .....	30
<b>Figura 5</b>	Ovócito avitelogênico em crescimento primário (O1) e ninho de ovogônias (Og).....	31
<b>Figura 6</b>	Ovócito em crescimento secundário (O2). .....	32
<b>Figura 7</b>	Ovócitos em diferentes etapas de visualização do alvéolo cortical, formado pelas vesículas corticais (setas). .....	33
<b>Figura 8</b>	Ovócitos vitelogênicos em diferentes estágios de desenvolvimento. A: Ovócito vitelogênico em início de formação de glóbulos. Glóbulos de vitelo destacados dentro dos círculos. B: Ovócito vitelogênico com maior inclusão de vitelo. Glóbulo de vitelo destacado dentro do círculo. C: Ovócito vitelogênico com fusão avançada dos glóbulos de vitelo. ....	35
<b>Figura 9</b>	Desenho esquemático das características morfológicas do ovócito de <i>M. praecox</i> . Setas pretas internas indicam alvéolos corticais na periferia do citoplasma. Filamentos de adesividade indicados por setas vermelhas na camada da granulosa. G: camada da granulosa; Zr: Zona radiata; Gv: glóbulo de vitelo; Ac: Alvéolo cortical. ....	36
<b>Figura 10</b>	Fotomicrografia de lâmina histológica do ovário de <i>M. praecox</i> em aumento de 40x. Ilustração das camadas que rodeiam o ovócito de dentro para fora: Zona Radiata (ZR); Granulosa (Gr); Núcleo das células da granulosa (N); Vacúolos (V); Filamentos de adesão (Fa); Teca (Tc); Células sanguíneas na teca (Cs). .....	37

<b>Figura 11</b>	Desenho esquemático das características morfológicas das camadas do ovócito de <i>M. praecox</i> . Zona Radiata (ZR); Granulosa (Gr); Núcleo das células da granulosa (N); Teca (Tc); Células sanguíneas na teca (Cs); Vacúolos (V); Filamentos de adesão (Fa). .....	37
<b>Figura 12</b>	Visão temporal da reabsorção dos folículos pós ovulatórios (estrela). A: folículo recém formado. B: Folículo com 6 dias após a desova. C: Folículos com 15 dias após a desova. D: Folículo com 32 dias após a desova. ....	39

## LISTA DE TABELA

<b>Tabela 1</b>	Níveis nutricionais da ração utilizada no experimento. ....	26
-----------------	---	----

## SUMÁRIO

1.	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	12
2.	<b>REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	14
2.1	<i>Melanotaenia praecox</i> .....	14
2.1.1	<b>Características morfológicas da espécie</b> .....	14
2.1.2	<b>Reprodução da espécie</b> .....	15
2.2	ASPECTOS GERAIS DA REPRODUÇÃO DE PEIXES TELEÓSTEOS.....	15
2.2.1	<b>Estrutura ovariana</b> .....	16
2.2.1.1	Fase avitelogênica.....	17
2.2.1.2	Fase vitelogênica.....	18
2.3	ENERGIA DENTRO DA REPRODUÇÃO.....	19
2.4	FOLÍCULO PÓS OVULATÓRIO (FPO).....	20
2.5	ATRESIA .....	21
3.	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	23
3.1	AMBIENTE EXPERIMENTAL .....	23
3.2	BIOMETRIA .....	24
3.3	ALIMENTAÇÃO .....	25
3.4	COLETAS .....	25
3.5	ANÁLISES HISTOLÓGICAS .....	26
3.6	ESTATÍSTICA .....	27
4.	<b>RESULTADOS</b> .....	28
4.1	FATORES FISIOLÓGICOS E AMBIENTAIS.....	28
4.2	MORFOLOGIA DO OVÁRIO .....	28
4.3	OVOGÔNIAS (Og) E OVÓCITOS EM CRESCIMENTO PRIMÁRIO (O1).....	30
4.4	OVÓCITOS EM CRESCIMENTO SECUNDÁRIO (O2).....	31
4.5	OVÓCITOS EM ESTÁGIO DE ALVÉOLO CORTICAL (O3).....	32
4.6	OVÓCITOS VITELOGÊNICOS (O4) .....	34

4.7	REABSORÇÃO DOS FOLÍCULOS PÓS OVULATÓRIOS.....	38
5	<b>DISCUSSÃO</b> .....	41
6	<b>CONCLUSÕES</b> .....	47
7	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	48

## 1. INTRODUÇÃO

Os membros da Família Melanotaeniidae, conhecidos popularmente como melanotaenia, são peixes exóticos muito apreciados como peixes ornamentais. Estes peixes tem recebido grande atenção desde quando foram importados para o Brasil e se adaptaram muito bem às nossas condições de cultivo (SOUZA, 1996).

A *Melanotaenia praecox* ou melanotaenia neon como é popularmente conhecida, é um animal que apresenta dimorfismo sexual. Os machos são maiores e mais coloridos, com coloração vermelha nas nadadeiras dorsal, anal e caudal, ao passo que nas fêmeas são amarelo-alaranjadas (FISHBASE, 2013).

A estação de desova da *M. praecox* em seu ambiente natural é de outubro a dezembro, mas em condições laboratoriais ou sistemas de cultivo que apresentem condições de qualidade de água favoráveis, a desova ocorre ao longo de todo o ano, sem necessidade de indução hormonal (VIDAL Jr., 2005).

Ainda assim, lacunas a respeito do conhecimento da sua biologia reprodutiva minimizam o sucesso na produção destes peixes. As informações existentes para outros peixes nem sempre podem ser utilizadas, pois há uma grande diversidade de espécies e uma vasta diferença entre elas.

Na literatura se pode encontrar informações a respeito da reprodução de peixes teleósteos que em linhas gerais apresentam aspectos fisiológicos comuns e que podem servir de base para o conhecimento do funcionamento do ovário de *M. praecox*.

Tyler e Sumpter (1996) observaram que para todos os peixes teleósteos estudados, os ovócitos possuem o mesmo padrão de crescimento. Os maiores eventos de desenvolvimento que ocorrem, podem ser amplamente classificados em seis fases ou períodos acordando com o estado de crescimento do ovócito, sendo eles: ovogênese, crescimento primário do ovócito, estágio de alvéolo cortical, vitelogênese, maturação e ovulação (BROMAGE e CUMARANATUNGA, 1988).

A ovulação é um processo que se inicia através de estímulos ambientais desencadeando uma reação hormonal que irá deflagrar este processo e posteriormente a desova (NAGAHAMA, 1983). A ovulação acontece quando o ovócito, na lamela ovulígera, é expulso do seu revestimento ovocitário (teca e granulosa) para o lúmen do ovário, ficando assim pronto para ser desovado

(STEQUERT et al., 2003). O revestimento ovocitário remanescente, formado pela teca e pelas células foliculares (granulosa), é denominado de folículo pós ovulatório (FPO), que após a desova passará por um processo de reabsorção, este processo é necessário para posterior reorganização do ovário e início do desenvolvimento de novos ovócitos, dando continuidade a um novo ciclo de desova.

Como o processo de reabsorção de folículos pós ovulatórios também chamados de folículos vazios é pouco conhecido em seus aspectos temporais e morfológicos, informações a respeito deste e outros aspectos da biologia reprodutiva da *M. praecox* são importantes para a otimização de sua produção em cativeiro. Estes estudos são relevantes para o aumento do conhecimento a respeito da espécie e irá trazer informações valiosas sobre a recuperação do ovário para um novo ciclo reprodutivo.

O presente trabalho visa descrever a morfologia pós desova dos ovários de *M. praecox* mantidas sob condições controladas. Para isso, através de lâminas histológicas foram feitas descrições da morfologia do ovário de *M. praecox* em processo de reabsorção dos folículos pós ovulatórios, identificação do padrão temporal de reabsorção dos folículos pós ovulatórios e descrição do padrão morfométrico e morfológico dos ovócitos encontrados nos ovários analisados.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 *Melanotaenia praecox*

A *Melanotaenia praecox* é uma espécie de peixe pertencente à Ordem Atheriniformes e Família Melanotaeniidae. São encontrados naturalmente no continente asiático (FISHBASE, 2013). A Família na qual esta espécie pertence possui sete gêneros e 66 espécies (MCGUIGAN et al., 2000; ALLEN et al., 2002).

Segundo Hunter (1997), estes animais têm hábito alimentar onívoro com preferência para alimentos de origem animal. Sua alimentação em cativeiro não é um problema, devido ao ato reflexo de abocanhar qualquer coisa que caia na superfície da água. Dessa forma, estes animais podem ser alimentados facilmente com dietas artificiais extrusadas.

#### 2.1.1 Características morfológicas da espécie

Os animais da Família Melanotaeniidae apresentam corpo coberto de escamas grandes com formato fusiforme e comprido lateralmente. As nadadeiras posteriores são pouco desenvolvidas, mas alongadas, o que significa que são excelentes e rápidos nadadores. A nadadeira dorsal é dupla (vestígio de sua origem marinha). A nadadeira anal se estende desde a região pélvica até a região caudal (ALLEN e NORBERT, 1982).

A *M. praecox* ou melanotaenia neon como é popularmente conhecida apresenta uma coloração corporal com intenso brilho azul, o que a torna muito apreciável para aquariofilia. Essa espécie é sexualmente dimórfica, os machos são maiores, mais coloridos e com as nadadeiras vermelhas, ao passo que as nadadeiras das fêmeas são amarelo-alaranjadas (Figura 1) (FISHBASE, 2013).



**Figura 1.** Exemplos adultos de *M. praecox*. Macho a direita e fêmea a esquerda.

### 2.1.2 Reprodução da espécie

Esses peixes apresentam comportamento de nado em cardumes, não apresentam territorialismo, permanecendo sempre em grupo. Quando se tem a presença de apenas um membro da espécie no tanque, nota-se a introdução do indivíduo em cardumes de outras espécies (HUNTER, 1997). Em alguns animais da mesma família os machos dominantes apresentam características que os distinguem dos outros no cardume, como coloração mais acentuada. Dessa forma, os outros machos do cardume apresentam uma coloração mais atenuada ou possuem coloração semelhante a das fêmeas (VIDAL Jr, 2005).

A *M. praecox* apresenta desova natural, portanto, não é necessária a indução através de injeções hormonais (REID e HOLDWAY, 1995). Apesar da facilidade aparente na obtenção de larvas, é preciso substratos como: plantas, folhas finas ou fibras sintéticas (TAYLOR, 1999). Os ovos apresentam adesividade, ficando aderidos ao substrato utilizado para desova, essa adesividade ocorre por filamentos de fixação presentes no córion (REID e HOLDWAY, 1995; HUMPHREY et al., 2003).

## 2.2 ASPECTOS GERAIS DA REPRODUÇÃO DE TELEÓSTEOS

O crescente interesse pelo cultivo de peixes teleósteos tem gerado o incentivo para o conhecimento da reprodução natural dos diferentes tipos de peixes,

que apesar de apresentarem características em comum, mostram grande variabilidade comportamental e morfofuncional que não permite generalizações (BENJAMIN, 2004). Essas diferenças são resultados das estratégias reprodutivas, meios que os animais obtiveram para garantir a perpetuação da espécie em diferentes ambientes (VAZZOLER, 1996). A reprodução dos peixes em sua grande maioria ocorre de forma sazonal, ou seja, estes requerem certo período para desenvolver seus gametas e liberá-los de forma gradual ou total, podendo ocorrer variações na morfologia do ovário, na composição do vitelo dos gametas, no tempo de maturação, no tamanho e no tempo de reabsorção das estruturas remanescentes, entre outras (AMORIM, 2007).

### 2.2.1 Estrutura ovariana

Na maioria dos peixes teleósteos, o ovário é um órgão par que se estende no sentido crânio-caudal e se funde na região caudal formando o ducto ovocitário comum. Contudo, podem ocorrer distinções dentre algumas espécies, em que os ovários podem se fundir ou um deles pode se degenerar e em ambos os casos permanecer um órgão único (NAGAHAMA, 1983).

A espécie estudada se encontra no grupo dos peixes teleósteos que tem seus ovários fundidos e assim formando um órgão único. A desova ocorre de forma parcelada e por um longo período, podendo desovar por todo o ano em condições de qualidade da água e nutrição adequadas. Portanto o ovário apresenta sempre (após sua maturação) ovócitos em todos os estádios de desenvolvimento ovocitário (REID e HOLDWAY, 1995).

Segundo a descrição histológica de Guimarães-Cruz et al. (2005) os ovários de *Loricaria letiginosa* são revestidos por uma túnica albugínea de tecido conjuntivo. Essa túnica tem prolongamentos de septos para o lúmen do ovário formando as lamelas ovígeras que vão conter as células da linhagem ovogênica. A mesma formação de lamela foi observada em *Oncorhynchus mykiss* por Grier et al. (2007) e em *Pimelodus maculatus* por Amorim (2007). Segundo Nagahama (1983) esta organização é conhecida como tipo cisto-ovariana.

Dentro das lamelas ocorre o desenvolvimento dos ovócitos. Este se dá inicialmente com as oogônias que são as menores células da linhagem ovogênica, também conhecidas como células primordiais. Essas células estão presentes em ninhos nas lamelas e se dividem por mitose, dessa forma, uma célula fica no ninho como reserva para o próximo ciclo, já a outra entra em meiose dando origem aos ovócitos e iniciando assim o processo de ovogênese. Durante a ovogênese os ovócitos derivados da mitose das oogônias se completam formando o complexo ovocitário. Este é constituído pelo ovócito, circundado por uma camada de células foliculares, rodeado pela membrana basal e células da teca, que possuem natureza conjuntiva (BENJAMIN, 2004; AMORIM, 2007). Após o término da ovogênese se dá o início da maturação, que é dividida em duas fases principais: fase avitelogênica e fase vitelogênica.

#### 2.2.1.1 Fase avitelogênica

Essa fase também pode ser conhecida como crescimento primário (AMORIM, 2007) ou pré-vitelogênica (CHINI et al, 2001; GARCIA et al., 2001). Esse processo se inicia quando as camadas foliculares completam sua formação. A zona radiata, uma das camadas que constituem o complexo ou envelope folicular, apresenta múltiplas funções, como: passagem de substâncias para o interior do ovócito; proteção contra injúrias mecânicas e patógenos; e promove a adesão dos ovos ao substrato (NAGAHAMA, 1983; AGOSTINHO et al., 1987).

As camadas externas do envelope folicular apresentam diferença em sua espessura de acordo com a espécie e fase de maturação do ovócito (NAGAHAMA, 1983). O aparecimento das camadas externas do envelope folicular também pode acontecer em momentos distintos, de acordo com a espécie. Como em Çakici e Üçüncü (2007) e Shabanipour e Hossayni (2010) em estudos com *Danio rerio* e *Cyprinus carpio*, respectivamente, onde não foi observado o surgimento destas camadas na fase avitelogênica. Já em Guimarães e Quagio-Grassiotto (2001), no estudo com *Serrasalmus spilopleura*, o surgimento das camadas externas ocorreu durante a fase avitelogênica.

Esta fase é caracterizada pela ausência de vitelo, sendo assim, histologicamente os ovócitos apresentam características tais como: núcleo esférico e intensamente basofílico; inicialmente redondo e mais tarde torna-se disforme, devido a pressão aplicada pelo preenchimento do citoplasma; presença do núcleo vitelínico ou de Balbiani, aumento progressivo do volume do citoplasma e dessa forma, diminuição da relação núcleo-plasmática; o núcleo origina muitos outros nucléolos pequenos e periféricos. Em algumas descrições os autores dividem este período avitelogênico em duas subfases ovocitárias (NAGAHAMA, 1983; CHINI et al, 2001; GARCIA et al., 2001; STEQUERT et al., 2003).

#### 2.2.1.2 Fase vitelogênica

Os alvéolos corticais (AC) são, geralmente, as primeiras estruturas observadas microscopicamente na área citoplasmática do ovócito (NAGAHAMA, 1983). Bazzoli e Godinho (1994) constataram em 102 espécies de peixes teleósteos que os AC surgem inicialmente rodeando a periferia do citoplasma e gradualmente aumentam em número e volume, até preencherem quase por completo o citoplasma do ovócito. Estes mesmos autores sugerem que as variações na morfologia e na composição química do alvéolo cortical das diferentes espécies estudadas podem expressar diferentes mecanismos de bloqueio de polispermia, dessa forma, tendo função direta na fecundação. Segundo Tyler e Sumpter (1996), o AC libera o seu conteúdo (glicoproteínas e enzimas associadas) no espaço perivitelino durante a fertilização, este conteúdo tem a função de endurecer o córion (zona radiata) após a ovulação e, assim, impedir que múltiplos espermatozoides fecundem o ovócito.

Menn et al. (2007) relatou que o início da inclusão de vitelogenina no citoplasma do ovócito ocorre durante a fase de alvéolo cortical, e que este ocorrido só pode ser visualizado em microscopia eletrônica. Este mesmo autor afirma ainda que, quando no citoplasma, a vitelogenina se funde com lisossomos, conhecidos como corpo multivesicular (CMV), proveniente do aparelho de Golgi (núcleo vitelínico). O CMV contém enzimas lisossomais, incluindo catepsina D, que possibilita clivar a vitelogenina em pequenas proteínas do vitelo. O CMV aumenta em tamanho e são gradualmente transformados em pequenos grânulos de vitelo,

em seguida grandes glóbulos de vitelo. Essa deposição se intensifica até o citoplasma ser tomado quase por completo pelo conteúdo vitelínico, o que provoca um aumento considerável no seu volume (BENJAMIN, 2004). Neste estágio as camadas foliculares do ovócito começam a ficar claramente perceptíveis. Com o aumento na deposição de vitelo o ovócito cresce, as vesículas vitelínicas aumentam em tamanho e número, e ficam visíveis por todo o citoplasma, por fim, os glóbulos vão se aglutinando até se tornar uma massa homogênea. Quando há a migração do núcleo para a periferia, os ovócitos são considerados como maduros (CHINI et al, 2001; GARCIA et al., 2001; STEQUERT et al., 2003).

Ao atingir a maturação os peixes necessitam de estímulos ambientais para desovar, esses estímulos irão provocar uma reação hormonal que irá desencadear a hidratação nos ovócitos (principalmente em peixes marinhos) e em seguida ovulação (NAGAHAMA, 1983). Em seguida, o ovócito é expulso das camadas foliculares e liberado no lúmen do ovário, para posteriormente sair através da desova (STEQUERT et al., 2003). As camadas foliculares remanescentes e que permaneceram na lamela ovígera são os folículos pós ovulatórios (FPO), sua presença em *Pseudoplatystoma fasciatum* pode ser facilmente observada entre 0 e 24 horas após a segunda aplicação hormonal (ROMAGOSA et al., 2000). Após a desova, essas estruturas remanescentes (os folículos pós ovulatórios) não tem função endócrina e são absorvidas, o que envolve morte celular programada ou apoptose das células foliculares (DRUMMOND et al., 2000).

### 2.3 ENERGIA DENTRO DA REPRODUÇÃO

Analisando o conteúdo dos glóbulos de vitelo de *Leporinus striatus*, foi encontrado por Chini et al. (2001) a presença de polissacarídeos e proteínas neutras, já Bazzoli et al. (1996) encontraram glicoproteínas neutras e lipídeos neutros em *Hemigrammus marginatus*, *Moenkhausia costae* e *Roeboides xenodon*.

Segundo Chapovetsky et al. (2007), em diferentes espécies com distintos estágios de maturação, as proteínas mais presentes no ovócito são provenientes da vitelogenina. Essa presença vai aumentando no decorrer do desenvolvimento e a vitelogenina se torna proteína do vitelo. Durante essa transformação as proteínas

são transportadas de seus locais de síntese no fígado até receptores específicos no ovócito. A vitelogenina é proteolizada no ovócito em derivados de proteína do vitelo (em teleósteos, essas proteínas incluem lipovitelina e fosvitina). Estas mudanças são necessárias para o acúmulo e armazenamento de proteínas, lipídeos, açúcares e fosfato dentro do ovócito (SELMAN et al., 1993).

Segundo Sawaguchi et al. (2005) a vitelogenina é uma glicophospholipoproteína, que é sintetizada no fígado através de estímulos via estrogênio. Dessa forma, após o estímulo deste hormônio produzido no ovário, a vitelogenina é liberada na corrente sanguínea e é transportada para o ovário onde é incorporada no ovócito (BUN NG e IDLER, 1983). A vitelogenina penetra no folículo ovariano através dos capilares da camada da teca, atinge a granulosa e entra em contato com a superfície do ovócito, onde, através dos canais de poros da zona radiata serão inclusos como glóbulos de vitelo no citoplasma do ovócito (BABIN et al., 2007).

#### 2.4 FOLÍCULO PÓS OVULATÓRIO (FPO)

Os folículos pós ovulatórios são constituídos pelas camadas mais externas do envelope folicular, que são as camadas de células da granulosa e da teca (FITZHUGH e HETTLER, 1995; FÁVARO e CHAVES, 1999; ROMAGOSA et al., 2000; GUIMARÃES-CRUZ et al., 2005; GRIER et al., 2007). São estruturas com lúmen, que direcionam sua abertura ao lúmen do ovário, para onde os ovócitos partem ao serem ovulados. Dentro do lúmen destes folículos pós ovulatórios permanecem as células micropilares remanescentes da ovulação (HUNTER e MACEWICZ, 1983; GRIER et al., 2007). Segundo Grier et al. (2007) os folículos são altamente vascularizados, contendo hemácias e leucócitos, também observado em *Pseudoplatystoma fasciatum* (ROMAGOSA et al., 2005), *Astyanax bimaculatus lacustris* (DRUMMOND et al., 2000) e *Brevoortia tyrannus* (FITZHUGH e HETTLER, 1995).

Segundo Drummond et al. (2000) o processo de absorção destas estruturas remanescentes ocorre por morte das células foliculares, processo que se inicia após a desova. Ainda segundo estes autores, essas estruturas não apresentam função

endócrina e são rapidamente absorvidas. Inicialmente o processo de absorção é mecânico, os folículos diminuem e se tornam enrugados ocorrendo conseqüentemente a redução do lúmen (FITZHUGH e HETTLER, 1995). Já na fase final de absorção esse processo se intensifica tornando mais evidente a hipertrofia das células e intensa vascularização dos folículos. As células da teca e da camada folicular se apresentam desordenadas e penetram cada vez mais no lúmen (ROMAGOSA et al., 2005).

A duração para absorção destas estruturas pode variar entre espécies e estratégias reprodutivas apresentadas pelas mesmas e por fatores exógenos presentes no ambiente. Dentre os fatores ambientais a temperatura é a mais relatada como fator determinante no tempo de absorção, alguns autores relataram diferença significativa nesse processo em *Brevoortia tyrannus* (FITZHUGH e HETTLER, 1995) com variação de 5°C na temperatura.

Segundo Hunter e Macewicz (1983) através da definição de períodos de absorção do folículo pós-ovulatório é possível analisar a frequência de desova e conseqüentemente a biomassa e, por fim, estimar a produção.

## 2.5 ATRESIA FOLICULAR

Atresia diz respeito à reabsorção de ovócitos que interromperam seu desenvolvimento e ocorre principalmente após a desova quando os ovócitos não ovulados remanescentes necessitam ser reabsorvidos para reorganização do ovário e início do novo ciclo de desova (CHINI et al., 2001; GARCIA et al., 2001). Os ovócitos não ovulados que entram em atresia passam pelas seguintes mudanças durante este período: surgimento de fendas na zona radiata, o citoplasma da periferia torna-se liquefeito, hipertrofia das células foliculares que se tornam vacuolizadas devido a digestão do vitelo e dos resquícios da zona radiata e invasão do citoplasma pelas células foliculares, que acumulam pigmento castanho-amarelado. Estas características são similares para algumas espécies de peixes teleósteos (CHINI et al., 2001; GARCIA et al., 2001; BENJAMIN, 2004; AMORIM, 2007).

As células foliculares são responsáveis pela digestão destas estruturas, além delas, os vasos sanguíneos da teca aumentam em número durante este processo, o que pode indicar a participação de suas células (BENJAMIN, 2004). Vários fatores como estresse ambiental, jejum, agentes tóxicos, fotoperíodo, temperatura, confinamento e níveis hormonais inadequados podem induzir a atresia durante o desenvolvimento ovariano e conseqüentemente reduzir a fecundidade (NAGAHAMA, 1983; FITZHUGH e HETTLER, 1995; LEONARDO et al., 2006)

A atresia folicular é mais frequentemente encontrada em ovócitos vitelogênicos, mas é possível observá-la em ovócitos em todas as fases de desenvolvimento (RIZZO e BAZZOLI, 1995; MIRANDA et al., 1999).

Normalmente essas estruturas em degeneração são características de peixes em final do período reprodutivo, mas é comum encontra-las por todo período reprodutivo (HUNTER e MACEWICZ, 1983). A atresia pode gerar marcas de desova que vão durar até a próxima estação de desova (RIZZO e BAZZOLI, 1995; MIRANDA et al., 1999).

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 AMBIENTE EXPERIMENTAL

O experimento foi conduzido no setor de Aquicultura da Unidade de Apoio à Pesquisa em Zootecnia do Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias (CCTA) da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro (UENF) em Campos dos Goytacazes-RJ. O processamento do material foi realizado no Laboratório de Zootecnia e Nutrição Animal (LZNA) situado no CCTA e no Laboratório de Morfologia e Patologia Animal (LMPA) do Hospital Veterinário da UENF.

Os animais utilizados no experimento foram provenientes do plantel de *Melanotaenia praecox* do setor de piscicultura do LZNA/CCTA. Foi preparado um lote de peixes jovens e de mesma idade proveniente de desovas das matrizes do laboratório. Para impedir que houvesse reprodução nos tanques de cultivo, quando estes animais atingiram a maturidade sexual foram separados em dois tanques, sendo um contendo apenas machos e outro fêmeas. Dessa forma, os folículos pós ovulatórios observados foram provenientes das desovas programadas durante o experimento, e não remanescente do período em que os animais estiveram nos tanques de cultivo.

Os animais foram distribuídos em 27 aquários experimentais, sendo que foi acondicionado um casal de *M. praecox* por aquário experimental. Os aquários experimentais foram compostos por caixas de material plástico transparente (Figura 2), com volume útil de 40 litros. Cada aquário continha uma entrada e uma saída de água, e estavam interligados a uma caixa com filtro mecânico e biológico e à outra com uma bomba subaquática que proporcionava o retorno da água para os aquários, assim, permitindo a circulação entre eles.



**Figura 2.** Aquários experimentais do setor de piscicultura do Laboratório de Zootecnia e Nutrição Animal/CCTA/UENF.

A qualidade da água do sistema foi monitorada diariamente através de medições de pH, oxigênio dissolvido e temperatura, e semanalmente por medições de amônia. Para evitar variações nestes parâmetros foi feita limpeza dos aquários com troca de água periódica, evitando assim sobrecarga de matéria orgânica no sistema.

### 3.2 BIOMETRIA

Ao término do experimento foi feita biometria dos animais para obtenção dos seguintes dados: comprimento total (CT); comprimento padrão (CP); altura (A); peso (P). Antes da biometria, os animais foram submetidos à eutanásia por choque térmico em água a 0°C, e posteriormente a aferição dos dados foi realizada dissecção e fixação do ovário em formalina neutra tamponada a 10%. Os pesos dos ovários e fígados foram mensurados em balança analítica com precisão de 0,0001 gramas para obtenção dos índices gonadossomáticos e hepatossomáticos.

### 3.3 ALIMENTAÇÃO

Para alimentação dos animais durante o período experimental foi utilizada a ração “Soma Peixe Juvenil 42” (Tabela 1) com 4 milímetros de diâmetro. Esta foi moída e peneirada para retirada do farelo proveniente da moagem. Essa ração é recomendada pelo fabricante para alimentação de juvenis, entretanto, como matrizes em período reprodutivo tem uma maior demanda nutricional, essa ração foi considerada apropriada. Os animais foram alimentados à vontade, três vezes ao dia, por todo o período experimental. Os horários de alimentação foram às 09:00, 13:00 e 17:00 horas. Duas vezes por semana foi feita limpeza mediante sifonamento além de troca de água dos aquários para retirada de fezes e restos de ração, assim, impedindo que ocorresse sobrecarga no sistema e variação dos parâmetros de qualidade de água.

**Tabela 1.** Níveis nutricionais da ração utilizada no experimento.

<b>Componentes</b>	<b>UN<sup>1</sup></b>	<b>Valores</b>
Proteína Bruta	%	42
Extrato Etéreo	%	9
Energia Digestível	Kcal/kg	3.800
Cálcio	%	3
Fósforo	%	1,5
Vitamina	mg	525

<sup>1</sup> Unidades de medidas

### 3.4 COLETAS

Para avaliação do tempo de reabsorção dos folículos pós ovulatórios (FPO), após um período de 20 dias de alimentação, os animais foram induzidos à desova por estímulo ambiental, para isso, foram colocados substratos naturais (aguapés) em cada aquário experimental para receberem os ovos adesivos. Esses substratos foram colocados durante a madrugada, já que esses animais apresentam estímulos

para desova durante o nascer do sol. Na primeira hora após o amanhecer, os substratos foram vistoriados à procura de ovos. Caso houvesse desova, este momento foi considerado dia 0 (D0) e deste momento em diante se fez a contagem dos dias para coleta das matrizes. Em caso de não desova, os aguapés eram retirados e após um período de descanso era feita nova tentativa de desova com recolocação dos substratos. Os animais que desovaram foram submetidos à biometria e dissecação para coleta do ovário. Posteriormente, os ovários foram submetidos a processamento histológico para confecção de lâminas permanentes coradas em hematoxilina e eosina (HE) para análise dos folículos pós ovulatórios bem como para descrição histológica dos mesmos e do ovário.

A partir das lâminas histológicas foi avaliado no ovário o tempo (em dias) necessário para a reabsorção dos FPOs. Para isso, houve uma determinação de dias de coleta após a desova, sendo que, para cada dia foram coletados ovários de três fêmeas. Os períodos de coleta foram os seguintes: D0 (primeiros momentos após a confirmação da desova), D2 (dois dias após confirmação da desova) e assim sucessivamente, D4, D6, D10, D15, D20, D25, D32. Dessa forma, ao todo foram coletados ovários de 27 fêmeas. Foram observados, portanto, nove tempos pós desova para a reabsorção de FPOs com três repetições para cada tempo.

Além da avaliação do tempo de reabsorção dos folículos, as lâminas histológicas foram utilizadas para análise morfométrica e morfológica dos ovários e dos estágios ovocitários de *M. praecox*.

### 3.5 ANÁLISES HISTOLÓGICAS

Assim que as fêmeas foram coletadas, as mesmas foram insensibilizadas em água à zero grau Celsius e após serem sacrificadas, foi realizada a coleta de material (ovário e fígado) para pesagem e posterior processamento histológico no Laboratório de Morfologia e Patologia Animal da UENF.

Durante a necrópsia os órgãos alvo foram avaliados macroscopicamente quanto à forma, textura, consistência e coloração das superfícies. O ovário foi coletado inteiro, pesado em balança analítica com precisão de 0,0001g e

imediatamente fixado em formalina neutra tamponada a 10%. Cada ovário foi fixado por um período mínimo de 24 horas. O fígado dos peixes foi apenas pesado.

A seguir as amostras inteiras foram acondicionadas em histossetes plásticos para posterior processamento em processador automático (Leica® TP1020), onde foram desidratadas em cinco banhos sequenciais de álcool etílico, sendo o primeiro banho em álcool a 70%, o segundo em álcool a 90% e os seguintes em álcool absoluto, com duração de uma hora cada. A seguir procedeu a clarificação das amostras por imersão em dois banhos de xilol, de uma hora cada e embebição por imersão das amostras em dois banhos, de 30 minutos cada, em parafina histológica a 60°C. Em sequência o material foi incluído no próprio histossete em que foi acondicionado.

Após a solidificação, os blocos foram resfriados e cortados em seções de cinco micrômetros de espessura, em micrótomo semi-automático (Leica® RM2145). Os cortes foram colocados em banheira histológica, de onde foram coletados com lâminas de vidro e corados manualmente, pelo método hematoxilina e eosina (HE) para análise microscópica.

As fotomicrografias obtidas foram documentadas e arquivadas utilizando máquina fotográfica digital INFINITY1 e software INFINITY ANALYZE, adaptada em microscópio óptico (Nikon® ECLIPSE E2000).

### 3.6 ESTATÍSTICA

Os dados das variáveis obtidos a cada coleta foram submetidos à análise de variância em nível de 5% de significância. Em caso de diferenças, aplicou-se teste de Tukey, utilizando o programa estatístico SAS 9.0 (SAS Inc., Cary, NC, USA).

## 4. RESULTADOS

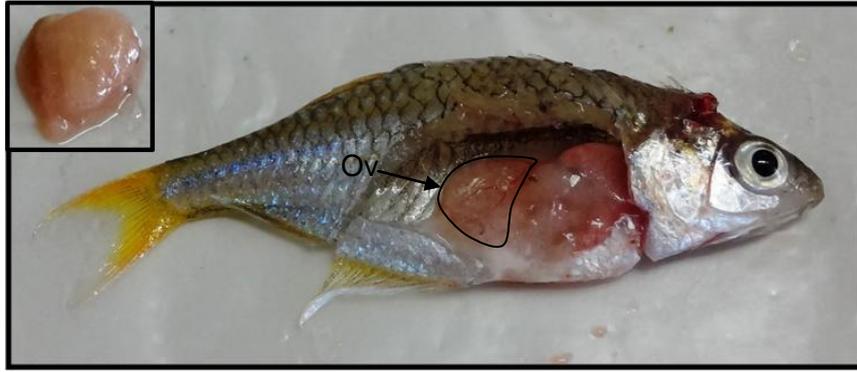
### 4.1 FATORES FISIOLÓGICOS E AMBIENTAIS

O resultado do teste de médias para os índices gonadossomático, hepatossomático e fator de condição durante cada período de reabsorção dos folículos pós ovulatórios não apresentaram diferença. Estes resultados indicam que os animais trabalhados estavam em estágios semelhantes de desenvolvimento gonadal.

As variáveis oxigênio, pH e temperatura apresentaram médias e desvio padrão de  $5,83 \pm 0,15$  mg/L,  $6,91 \pm 0,21$  e  $28,64 \pm 1,11$  °C, respectivamente. Os valores de amônia total se apresentaram durante todo o período experimental nas condições ideais para peixes tropicais.

### 4.2 MORFOLOGIA DO OVÁRIO

O ovário de *M. praecox* é um órgão único, arredondado que ocupa a parte anterior da cavidade celômica e apresenta coloração amarelada (Figura 3). Este órgão é revestido pela serosa peritoneal que o prende a cavidade abdominal e ao intestino pelo mesovário. Logo abaixo desta serosa se encontra uma conjuntiva, a albugínea ovariana, que delimita o parênquima do ovário. A albugínea emite, para o interior do órgão, septos conjuntivos incompletos, as lamelas ovulíferas, que suportam e envolvem ovogônias e ovócitos. A albugínea e, conseqüentemente, as lamelas ovulíferas possuem fibras conjuntivas, nervos, vasos sanguíneos, células do conjuntivo e células musculares lisas.



**FIGURA 3.** Fêmea de *M. praecox* com cavidade celômica aberta. Seta indicando a posição do ovário (Ov). Ovário em destaque.

Microscopicamente foi observado ovogônias geralmente agrupadas em ninhos e ovócitos em todos os estágios (1, 2, 3 e 4) de desenvolvimento ovocitário, (Figura 4 e 5). Estes estágios vão desde ovócitos primários até ovócitos vitelogênicos avançados. Esta característica se deve ao comportamento reprodutivo da espécie estudada, que se dá de forma intermitente, ou seja, desovas repetidas ao longo do período reprodutivo. A denominação usada para esse tipo de organização ovariana é assincrônica.



**FIGURA 4.** Lâmina histológica do ovário de *M. praecox* com diferentes tipos ovocitários, em coloração de H/E. O1: Ovócito em crescimento primário; O2: Crescimento secundário; O3: Fase de alvéolo cortical; O4: Vitelogênico.

Através da análise histológica dos ovários de *M. praecox* foram determinados quatro estádios de desenvolvimento ovocitário. Sendo eles definidos como: ovócitos em crescimento primário (O1); crescimento secundário (O2); em fase de alvéolo cortical (O3); e por último, vitelogênico (O4).

#### 4.3 OVOGÔNIAS (O<sub>g</sub>) E OVÓCITOS EM CRESCIMENTO PRIMÁRIO (O1)

Em *M. praecox* ovogônias são pequenas células com citoplasma escasso e finamente granular, núcleo grande, ovóide e centralmente localizado com um nucléolo único, proeminente e esférico. Seu núcleo claro tem cromatina em grumos pequenos na periferia da carioteca.

Os ovócitos em crescimento primário são pequenos em sua maioria com diâmetro médio de  $65,48 \pm 19,35 \mu\text{m}$  (Figura 5). Seu citoplasma apresenta-se vítreo e basófilo, característica esta que foi diminuindo com o crescimento da área citoplasmática. Seu núcleo é grande, arredondado, posicionado ao centro e com nucléolos aderidos a face interna do envoltório nuclear. Nesta fase de desenvolvimento ovocitário o núcleo ocupa a maior parte do ovócito em relação ao citoplasma. A zona radiata não foi perceptível nestes ovócitos, assim como as camadas foliculares externas constituídas pela granulosa e a teca.



**FIGURA 5.** Ovócito avitelogênico em crescimento primário (O1) e ninho de ovogônias (Og).

#### 4.4 OVÓCITOS EM CRESCIMENTO SECUNDÁRIO (O2)

A zona radiata já pode ser vista nesta fase, porém, as camadas foliculares externas não são ainda claramente perceptíveis. O citoplasma ainda basófilo tem agora aspecto granular; a relação núcleo plasmática nitidamente diminuiu, entretanto, o núcleo permanece grande, com cromatina na forma de granulações finas (Figura 6). O diâmetro médio destes ovócitos foi de  $116,52 \pm 17,3 \mu\text{m}$ . O

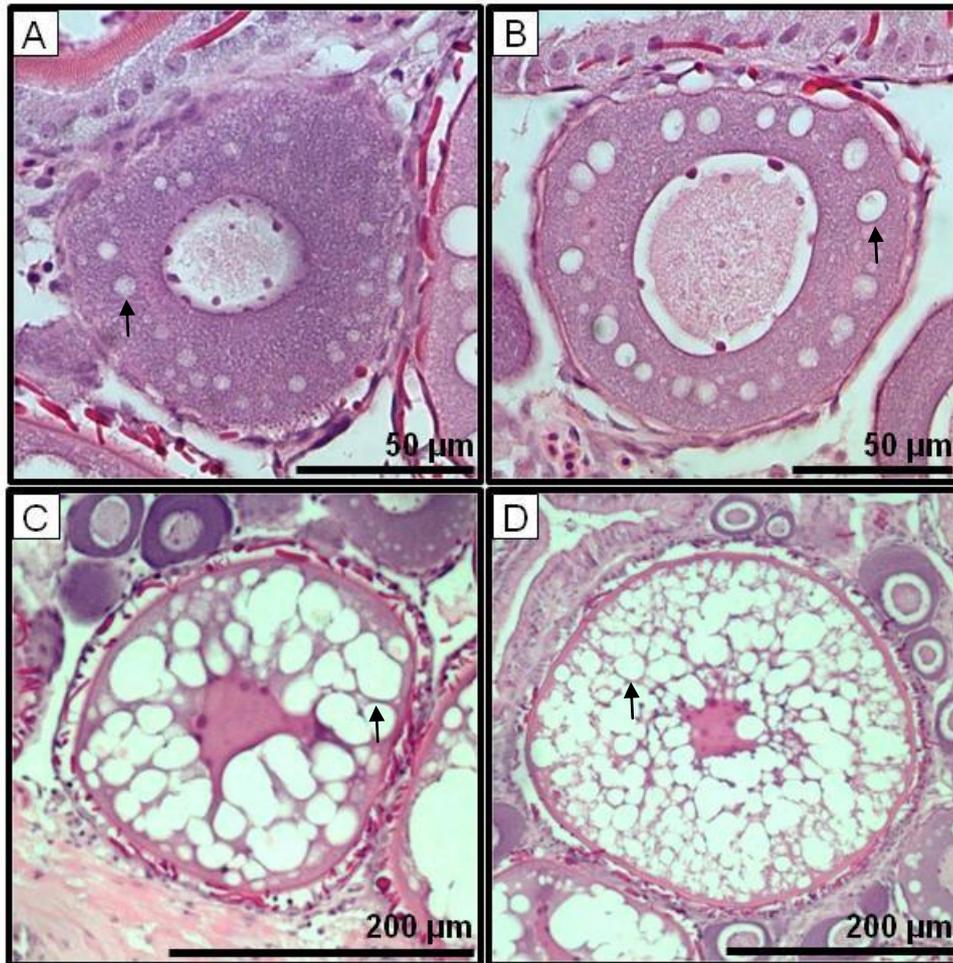
núcleo vitelínico, geralmente presente nestes ovócitos nesta fase de desenvolvimento, não foi observado.



**FIGURA 6.** Ovócito em crescimento secundário (O2).

#### 4.5 OVÓCITOS EM ESTÁGIO DE ALVÉOLO CORTICAL (O3)

Os alvéolos corticais (AC), que caracterizam este estágio ovocitário, surgiram primeiramente como pequenos vacúolos, quase que imperceptíveis, na zona periférica do citoplasma do ovócito 3 (Figura 7A) e com o decorrer de seu desenvolvimento foram se tornando maiores em tamanho e em número (Figura 7B). A medida que aumentavam, os AC preenchiam cada vez mais o citoplasma, tornando os ovócitos maiores e se direcionando para o núcleo (Figura 7C). Este que, antes era grande, de formato circular, claro, com cromatina em granulações finas e nucléolos irregulares, foi se tornando disforme, pequeno em relação ao citoplasma e fortemente corado pela eosina. A fase final de alvéolo cortical se dá quando estas estruturas preenchem quase por completo o citoplasma (Figura 7D).



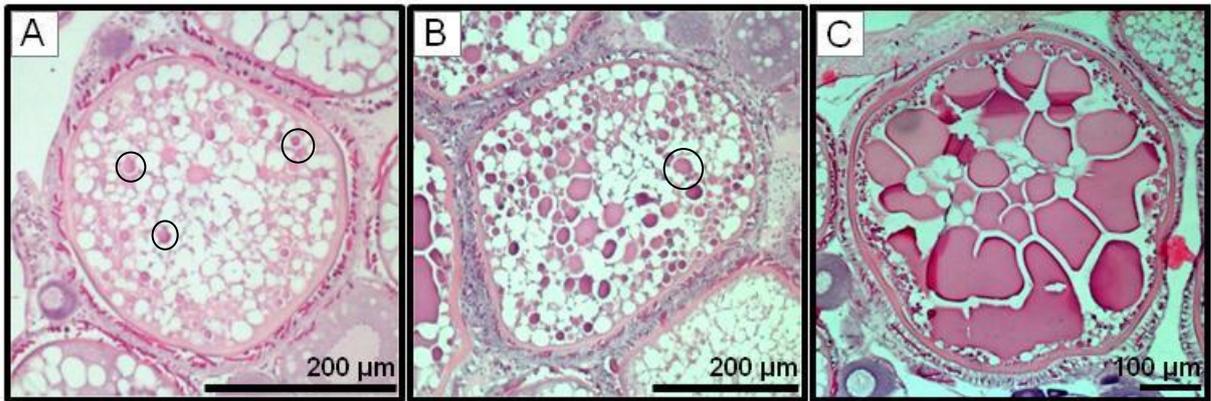
**FIGURA 7.** Ovócitos em diferentes etapas de visualização do alvéolo cortical, formado pelas vesículas corticais (setas).

Essa fase ovocitária apresentou diâmetro médio de  $230,83 \pm 77,47 \mu\text{m}$ . Os ovócitos em início de formação de alvéolos corticais já apresentavam zona radiata mais perceptível e formação das camadas foliculares externas. No decorrer do crescimento do ovócito estas camadas se diferenciaram, se tornando mais espessas e visíveis. A zona radiata, ainda com pequena espessura, foi visualizada como uma camada com coloração fortemente eosinófila e destacada em relação ao citoplasma. Em meio às células da granulosa surgiram estruturas filamentosas com aspecto proteico (Figura 10), as quais, devido à tática reprodutiva desta espécie de depositar ovos adesivos, foram caracterizadas como filamentos de adesividade ou de fixação.

#### 4.6 OVÓCITOS VITELOGÊNICOS (O4)

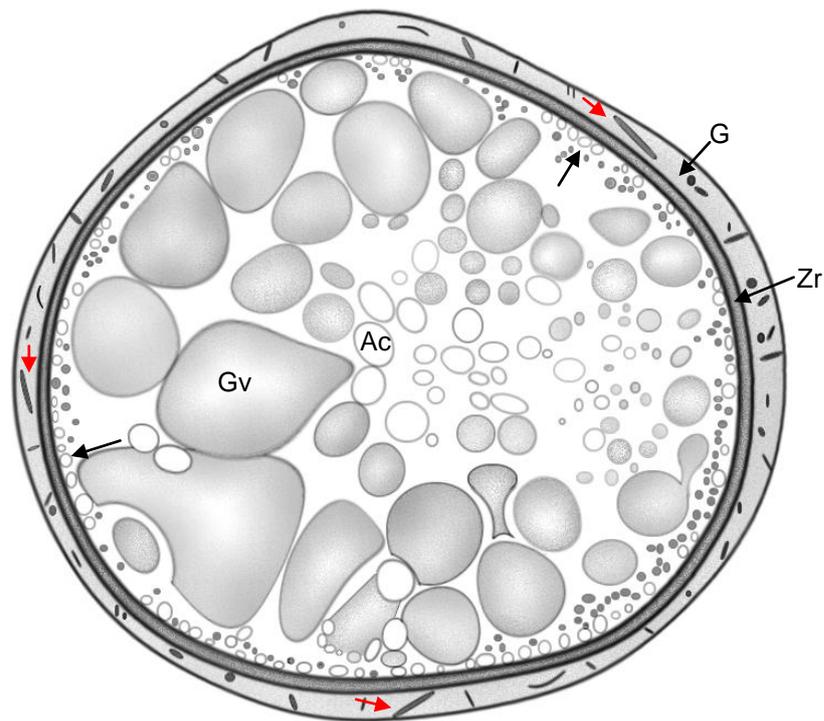
O início da fase de ovócito vitelogênico ocorre quando, ainda com uma grande presença de alvéolos corticais nos ovócitos, surgem glóbulos/grânulos de vitelo que apresentam coloração acidófila de tonalidade róseo-avermelhada (Figura 8A). Essa coloração surge em lâminas coradas com hematoxilina/eosina em consequência da afinidade tintorial de proteínas pela eosina. Como a vitelogenina (substância componente do conteúdo vitelínico) pode apresentar característica proteica semelhante à observada, os glóbulos foram definidos como sendo glóbulos de vitelo, sendo assim, os ovócitos com estas características foram considerados como em início de vitelogênese.

De acordo com que os ovócitos se desenvolvem o número de glóbulos de vitelo aumenta (Figura 8B), dessa forma, o ovócito aumenta de tamanho consideravelmente atingindo diâmetro médio de  $579,33 \pm 126,1 \mu\text{m}$ . Durante o processo final de vitelogênese, os glóbulos de vitelo do mesmo ovócito se fundem para formar grandes plaquetas de vitelo (Figura 8C) ao redor do núcleo, nem sempre visível em meio ao vitelo. Com o preenchimento do citoplasma por grânulos de vitelo o alvéolo cortical, antes bem visível no citoplasma, agora passa a ser evidente apenas na periferia do citoplasma (Figura 9). Em conjunto com esse crescimento e desenvolvimento, as camadas (envelope folicular) que rodeiam o ovócito vão se diferenciando e tomando forma. Essas camadas são distinguidas como zona radiata, granulosa e teca.



**FIGURA 8.** Ovócitos vitelogênicos em diferentes estágios de desenvolvimento. A: Ovócito vitelogênico em início de formação de glóbulos. Glóbulos de vitelo destacados dentro dos círculos. B: Ovócito vitelogênico com maior inclusão de vitelo. Glóbulo de vitelo destacado dentro do círculo. C: Ovócito vitelogênico com fusão avançada dos glóbulos de vitelo.

A zona radiata, que, nesta fase de desenvolvimento ovocitário, é mais grossa e fortemente corada pela eosina, pode ser observada como uma camada única e estriada, estas estrias são responsáveis pela passagem da vitelogenina para o interior do ovócito, o que explica seu desenvolvimento nesta fase, que é caracterizada pelo acúmulo de vitelo no citoplasma do ovócito.

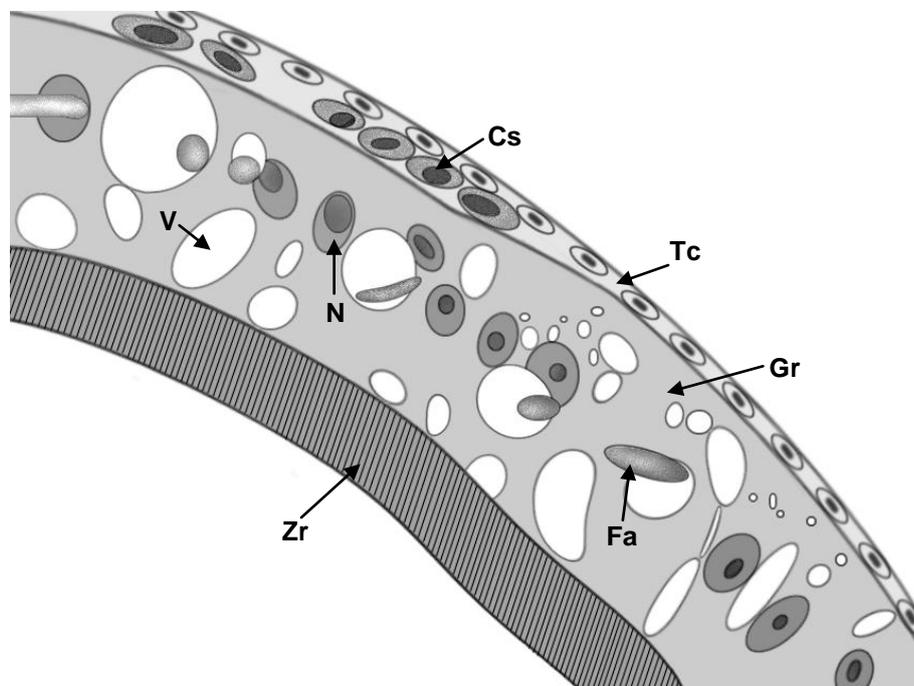


**FIGURA 9.** Desenho esquemático das características morfológicas do ovócito de *M. praecox*. Setas pretas internas indicam alvéolos corticais na periferia do citoplasma. Filamentos de adesividade indicados por setas vermelhas na camada da granulosa. G: camada da granulosa; Zr: Zona radiata; Gv: glóbulo de vitelo; Ac: Alvéolo cortical.

A granulosa e a teca também apresentaram mudanças nesta fase, com aumento de sua espessura e desenvolvimento celular. As células foliculares, que formam a camada granulosa, variaram seu formato de cúbica para cilíndrica de acordo com o crescimento deste ovócito. O núcleo das células foliculares apresentava-se basófilo com nucléolo evidente ao centro e citoplasma sem limite citoplasmático nítido. Além destas mudanças, foram observados vacúolos presentes por toda a camada granulosa. Os filamentos adesivos (proteicos), agora em maior número que na fase anterior, foram vistos cortados longitudinalmente ou transversalmente, entre as células foliculares, assim como ilustrado na figura 10 e 11.



**FIGURA 10.** Fotomicrografia de lâmina histológica do ovário de *M. praecox* em aumento de 40x. Ilustração das camadas que rodeiam o ovócito de dentro para fora: Zona Radiata (ZR); Granulosa (Gr); Núcleo das células da granulosa (N); Vacúolos (V); Filamentos de adesão (Fa); Teca (Tc); Células sanguíneas na teca (Cs).



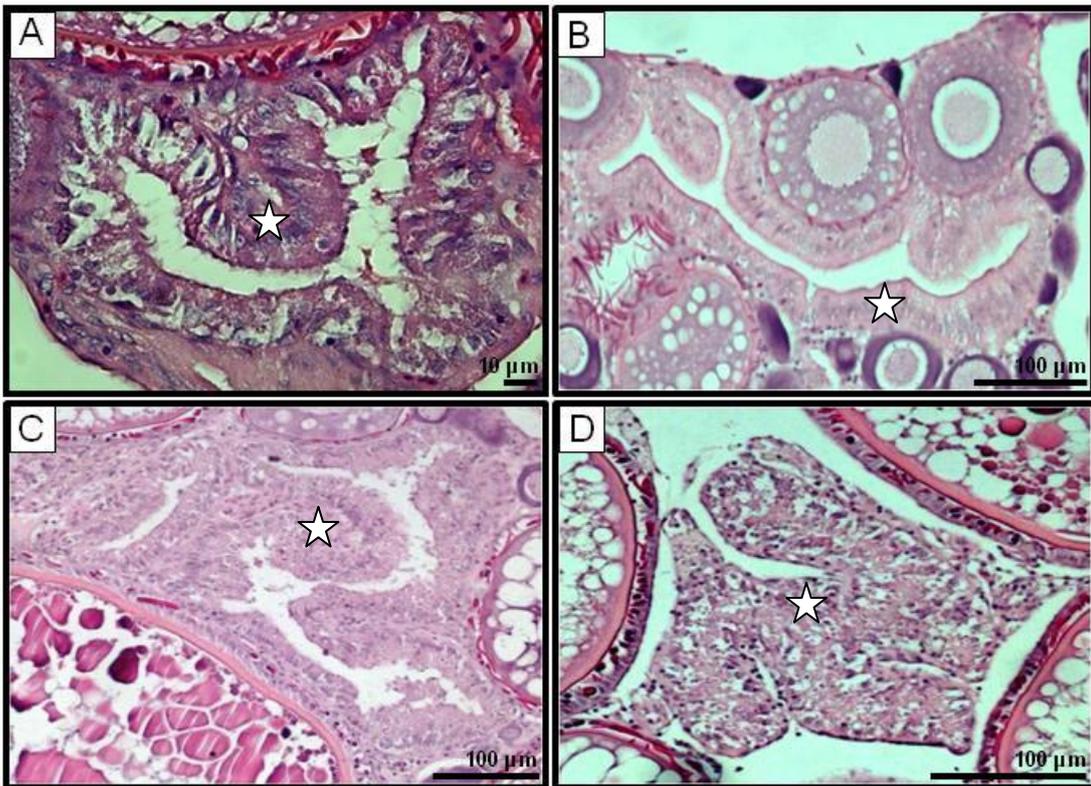
**FIGURA 11.** Desenho esquemático das características morfológicas das camadas do ovócito de *M. praecox*. Zona Radiata (ZR); Granulosa (Gr); Núcleo das células da granulosa (N); Teca (Tc); Células sanguíneas na teca (Cs); Vacúolos (V); Filamentos de adesão (Fa).

#### 4.7 REABSORÇÃO DOS FOLÍCULOS PÓS OVULATÓRIOS

O ovócito vitelogênico, após a ovulação, deixa na lamela ovulígera suas camadas (envoltório) mais externas, constituídos da zona granulosa e da teca, que se apresentam flácidas e dobradas para dentro da cavidade deste envoltório que agora se denomina folículo pós ovulatório ou folículo vazio (Figura 12A). A célula micropilar, comumente visualizada dentro destes folículos, não foi observada nestes folículos do peixe estudado. Inicialmente os folículos pós ovulatórios apresentam um lúmen amplo, anteriormente ocupado pelo ovócito recentemente expelido. A camada de células foliculares é evidente e organizada. O poro de ovulação também comumente observado na descrição de folículos pós ovulatórios de outros peixes não foi observado neste trabalho. A teca, camada mais externa do envoltório, não se apresentava muito evidente devido sua pequena espessura. Entre as camadas foliculares não havia mais a presença dos filamentos protéicos de adesividade observados entre as células, quando os ovócitos ainda se encontravam nas lamelas ovulíferas. Esta observação sugere que tais estruturas saíram junto com o ovócito durante a ovulação para cumprir seu papel de adesividade ovocitária.

Os vacúolos anteriormente encontrados na camada granulosa durante o desenvolvimento ovocitário, antes alongados devido à compressão que o ovócito causava a essa camada, se tornaram amplos, arredondados em sua maioria e ao seu redor pode-se observar núcleos basófilos das células foliculares. Com dois dias após a desova, devido a constrição sofrida pelo folículo os vacúolos diminuíram de tamanho, no quarto dia estas estruturas eram quase imperceptíveis, entretanto iniciou-se o surgimento de novos vacúolos, ainda pequenos e arredondados, que são causados pelo início da absorção das células foliculares. Estas estruturas se desenvolveram progressivamente até o dia 25, onde ocorreu uma ocupação total dos folículos por grandes vacúolos.

No dia 32 os folículos pós ovulatórios apresentavam aspecto de uma massa amorfa residual (Figura 12D), circundada e infiltrada por tecido conjuntivo. Nesse período os folículos já apresentavam tamanho reduzido confirmando assim o final de sua reabsorção. Foi observada também a presença de células sanguíneas de defesa em todos os momentos do processo de reabsorção.



**FIGURA 12.** Visão temporal da reabsorção dos folículos pós ovulatórios (estrela).  
A: folículo recém formado. B: Folículo com 6 dias após a desova. C: Folículos com 15 dias após a desova. D: Folículo com 32 dias após a desova.

**Quadro 1.** Descrições morfológicas dos folículos pós ovulatórios de *M. praecox* em diferentes estágios de reabsorção.

CARACTERÍSTICAS	DIAS								
	0	2	4	6	10	15	20	25	32
<b>Aspecto</b>	Camada de células foliculares evidentes e organizadas	Início de restrição do lúmen pelo processo de reabsorção;	Aumento de granulações; obstrução progressiva do lúmen;	Manteve as características anteriores	Maior desorganização da zona granulosa	Mais desorganizado; aumento da invasão de tecido conjuntivo; áreas totalmente obstruídas	Aspecto mais vacuolado e granuloso.	Grande redução da área do folículo; aparenta aspecto residual, característica de massa disforme de tecido conjuntivo	Massa amorfa, residual, reduzida, circundada e infiltrada por tecido conjuntivo
<b>Células da zona granulosa</b>	Mais frouxas e colunares; núcleo basófilo	Células epitélio cilíndrico simples; núcleo basófilo	Núcleos maiores e mais visíveis	Início de desorganização e aumento de estruturas conjuntivas	Diminuição da basófila folicular;	Aumento da desorganização da camada de células folicular	Hipertrofia das células foliculares; aumento da desorganização da zona granulosa	Células foliculares muito hipertrofiadas; sem aspecto de camada granulosa	Pouca definição celular; aspecto granular
<b>Vacúolos</b>	Presença	Início de redução	Surgimento de vacúolos de digestão.	Se manteve	Aumento da vacuolização;	Se manteve	Aumento da vacuolização;	Vacúolos grandes por todo o folículo	Vacúolos grandes por todo o folículo
<b>Lúmen</b>	Amplio	Início de redução	Redução do lúmen	Continua aumento de obstrução	Lúmen quase totalmente obstruído	Lúmen quase totalmente obstruído	Ainda se pode ver o lúmen residual	Inexistente	Inexistente
<b>Células sanguíneas de defesa</b>	Presença em pequeno número	Presença de células de defesa mononucleares	Se manteve	Se manteve	Se manteve	Se manteve	Se manteve	Se manteve	Presença de vasos sanguíneos na periferia

## 5. DISCUSSÃO

Os ovários de *M. praecox* foram identificados como um órgão único e de formato arredondado, distinto do ovário da maioria dos peixes teleósteos. Entretanto, internamente sua constituição é semelhante a de outros peixes teleósteos, com ovogônias, ovócitos com células foliculares circundantes, tecido de suporte ou estroma, tecido nervoso e vascular (NAGAHAMA, 1983). O padrão de desenvolvimento dos ovócitos de *M. praecox* foi caracterizado como sendo assincrônico, em que os ovos são recrutados de uma população heterogênea de desenvolvimento ovocitário e são subsequentemente ovulados em diversos períodos durante cada estação de desova (SCOTT, 1987). Geralmente os autores dividem os estágios de desenvolvimento dos ovócitos baseados em fatores morfológicos, o que, de acordo com a espécie, apresenta vasta variação, como: Nejedli et al. (2004) descreveram 4 estágios para *Sardina pilchardus*; Shabanipour e Hossayni (2010) descreveram 5 estágios para *Cyprinus carpio*; Yamamoto et al, (1965) dividiram o desenvolvimento dos ovócitos de *Salmo gairdneri irideus* em 8 estágios; Stequert et al. (2003) descreveram 6 estágios para *Vinciguerria nimbaria*. No presente trabalho foram identificados 4 estágios, sendo: ovócitos em crescimento primário (O1); crescimento secundário (O2); alvéolo cortical (O3); e por último, vitelogênico (O4).

Concordando com Amorim (2007) para *Pimelodus maculatus*, na fase de crescimento primário o núcleo é grande, com presença de inúmeros nucléolos situados na periferia do nucleoplasma. O citoplasma dos ovócitos primários de *M. praecox* foi semelhante aos de *Sardina pilchardus*, que, inicialmente foram basófilos e gradualmente com o crescimento dos ovócitos essa basofilia foi diminuindo (NEJEDLI et al., 2004). A não observação, neste trabalho, das camadas foliculares nesta fase de desenvolvimento ovocitário, coincidiu com os relatos de Çakici e Üçüncü, (2007) e Shabanipour e Hossayni (2010) em estudos com *Danio rerio* e *Cyprinus carpio*, respectivamente.

Os ovócitos em estágio de desenvolvimento secundário (O2) seguiram o padrão descrito por Stequert et al. (2003) para *Vinciguerria nimbaria*, onde os ovócitos foram maiores do que aqueles na fase anterior, apresentavam núcleo com diversos pequenos nucléolos basófilos periféricos, núcleo este que se manteve

grande, entretanto, houve aumento do citoplasma diminuindo assim a relação núcleo plasmática em relação ao O1. Segundo Menn et al. (2007), o aumento no tamanho do citoplasma é causado pela inclusão de RNA e mRNAs. O mesmo autor relata que o mRNA receptor de vitelogenina é acumulado em larga escala no citoplasma neste estágio.

Segundo Guimarães e Quagio-Grassiotto (2001), no estudo com *Serrasalmus spilopleura*, foi observado durante a fase avitelogênica a formação do envelope folicular, este é composto de duas camadas, uma adjacente ao ovócito, formada de células foliculares que é coberta pela segunda camada, mais externa, denominada teca. Em *M. praecox* o surgimento do envelope folicular ou ovocitário foi visível, inicialmente, em ovócitos em crescimento secundário, como uma estrutura fina e de difícil identificação. Entretanto, Menn et al. (2007) relataram que, quando o ovócito jovem (O1) é separado do ninho de ovogônias, está circundado por uma camada única de células da granulosa e, mais externamente, uma pequena quantidade de células somáticas formam uma camada única constituída da teca associada com vasos sanguíneos. Este mesmo autor relata que, junto com o ovócito, estas camadas de células granulosas e a teca formam o folículo ovocitário.

O desenvolvimento da fase de alvéolo cortical para *M. praecox* seguiu o padrão encontrado por Bazzoli e Godinho (1994) em 102 espécies de peixes teleosteos, com inicial aparecimento de pequenos alvéolos corticais circundando a periferia do citoplasma e gradualmente aumentando em número e volume. O desenvolvimento da fase de alvéolo cortical se dá de diferentes formas, assim, como apresentado por Motta et al. (2005), que definiu distinções e similaridades na formação dos alvéolos corticais de 8 espécies de peixes. Já em *M. praecox* o desenvolvimento desta fase foi semelhante ao de *Danio rerio*, definido por Çakici e Üçüncü (2007), em que o início do surgimento destas estruturas foi na zona periférica do citoplasma e foi aumentando em número e tamanho até o preenchimento quase que por completo do citoplasma.

Com o avanço da fase de alvéolo cortical o núcleo do ovócito se tornou disforme e com aspecto opaco, assim como encontrado em ovócitos de *Danio rerio* por Yön et al. (2008). Ainda nesta fase, em *M. praecox*, em conjunto com o crescimento do ovócito a zona radiata (ZR) se torna mais espessa e visível, essa mesma característica foi relatada em outros trabalhos (SHABANIPOUR e HOSSAYNI, 2010; JIANG et al., 2010). Os relatos de Matsuyama et al. (1991)

podem justificar o desenvolvimento da ZR devido ao papel desta estrutura na passagem da vitelogenina para os ovócitos, como processo de inclusão de vitelo. Corroborando com este autor, Menn et al. (2007) relataram que, na fase de alvéolo cortical se inicia a inclusão de vitelogenina no citoplasma do ovócito, e que este evento só pode ser visualizado nesta fase em microscopia eletrônica. Este mesmo autor afirma ainda que, quando no citoplasma, a vitelogenina se funde com lisossomos, conhecidos como corpo multivesicular (CMV), proveniente do aparelho de Golgi. O CMV contém enzimas lisossomais, incluindo catepsina D, que possibilita clivar a vitelogenina em pequenas proteínas do vitelo. Os CMVs aumentam em tamanho e são gradualmente transformados em pequenos grânulos de vitelo, em seguida grandes glóbulos de vitelo. Essa afirmação está de acordo com os achados de Motta et al. (2005), onde, no final da fase de alvéolo cortical inicia-se o surgimento de densos vacúolos no citoplasma. Do mesmo modo ocorreu em *M. praecox*, quando, o surgimento de densos vacúolos de vitelo foi determinante para a caracterização do início da fase de ovócito vitelogênico (O4).

Vitelogênese é o principal evento responsável pelo enorme crescimento do ovócito em alguns teleósteos e pode ser responsável por 95% do tamanho final do ovo (TYLER, 1991). Esta característica foi observada em *M. praecox*, onde os ovócitos em vitelogênese apresentaram o maior tamanho. Para a espécie estudada, no presente trabalho, este crescimento se deu ao aumento de glóbulos de vitelo em número e tamanho no citoplasma, do mesmo modo como foi relatado por Benjamin, (2004) para *Xiphophorus maculatus*. Em *M. praecox*, este desenvolvimento dos glóbulos de vitelo se deu de forma desordenada, surgindo inicialmente, no citoplasma de forma geral, como pequenos glóbulos entre o alvéolo cortical, glóbulos estes que foram aumentando em número e tamanho até ocupar quase que por completo o citoplasma. Nejedli et al. (2004) descreveram, para *Sardina pilchardus*, desenvolvimento de glóbulos de vitelo distinto ao de *M. praecox*, onde o surgimento inicial destas estruturas se deu na região periférica do citoplasma e gradualmente foi avançando em direção ao núcleo. Entretanto, Çakici e Üçuncü (2007) descrevendo o desenvolvimento dos ovócitos em *Danio rerio*, para a fase vitelogênica observaram que os glóbulos de vitelo surgiram ao redor do núcleo e se estenderam em direção à periferia do ovócito.

Assim como em *Danio rerio* (YÖN, 2008), na fase final de vitelogênese na melanotaenia neon o núcleo não estava com limites claros e definidos, o que pode

ser atribuído ao fato do ovócito estar completamente ocupado pelos glóbulos de vitelo e ao grande crescimento do citoplasma, o que tornou menor a relação núcleo plasmática.

O desenvolvimento e diferenciação das camadas que compõem o envelope folicular também foram marcantes nesta fase de ovócito vitelogênico. A zona radiata se tornou visivelmente mais grossa e sua estriação podia ser vista com mais facilidade. Estas estrias foram, neste trabalho, mais evidentes em ovócitos mais avançados. A mesma característica pôde ser notada por Jiang et al. (2010) para *Siniperca chuatsi*. A zona radiata apresenta esse desenvolvimento nesta fase devido ao papel dela na passagem da vitelogenina para o ovócito, assim como descreve Shabanipour e Hossayni (2010) em *Cyprinus carpio*.

Suzuki et al. (2000) relataram que em *Loricariichthys* sp. durante a maturação dos ovócitos um espaço foi formado entre a zona granulosa e o ovócito; a altura das células dentro da zona granulosa declinou, e um material da zona granulosa foi derramado no espaço. Segundo este autor, este material é responsável pela propriedade adesiva do ovo. No presente trabalho foram visualizados filamentos protéicos com características tintoriais acidófilas entre as células da granulosa, filamentos estes considerados como prováveis responsáveis pelas características de adesividade dos ovos. As diferenças entre os materiais responsáveis pela adesividade dos ovos de *M. praecox* e dos ovos de *Loricariichthys* sp. se devem ao comportamento reprodutivo distinto das espécies. Segundo Busson-Mabillot (1977) em *Cichlasoma nigrofasciata* aparatos de adesividade que recobrem a zona radiata, como filamentos e uma camada gelatinosa, são sintetizados pelas células foliculares durante a vitelogênese.

Os folículos pós ovulatórios originam-se após a ovulação (expulsão dos ovócitos da lamela ovulígera, na fase de maturação final) e são formados pelas camadas mais externas do ovócito (teca e zona granulosa), e sua presença pode ser observada facilmente entre 0 e 24 horas após a desova (ROMAGOSA et al., 2000). Segundo Drummond et al. (2000), estas estruturas remanescentes são rapidamente reabsorvidas após a desova, o que ocorre através de morte celular programada (apoptose).

Assim como nos relatos de Hunter e Macewicz (1983), inicialmente, no presente trabalho, o folículo pós ovulatório apresentou-se como uma estrutura conspícua que logo entra em processo de reabsorção. Imediatamente após a

desova essa estrutura apresenta um lúmen amplo e contorcido, resultado da saída do ovócito dos seus dois envoltórios mais externos, ou seja, das camadas da granulosa e teca. Santos et al. (2005) relataram a presença, dentro do lúmen de folículos pós ovulatórios, de um tipo especializado de célula folicular que tamponava a micrópila ou seja a célula micropilar, entretanto, esta ocorrência não foi observada em *M. praecox*. O poro de ovulação é outra característica que também não foi observado no presente trabalho, sugerindo que esta abertura de saída do ovócito, em melanotenia neon, pode se fechar muito rapidamente após a ovulação.

Drummond et al. (2000) relataram que poucas horas após a desova as células foliculares sofreram hipertrofia e se tornaram colunares, as mesmas características foram observadas nas células foliculares de *M. praecox*, cujo ovário foi coletado no dia 0 (zero). Semelhantemente ao processo de reabsorção dos folículos pós ovulatórios no presente estudo, em *Engralis encrasicolus* foram definidos estágios de reabsorção dos folículos pós ovulatórios, em que, no primeiro estágio as células foliculares apresentaram leve hipertrofia e formato colunar ou cuboidal. Os folículos apresentam formato e lúmen irregular (ALDAY et al., 2010).

Em *M. praecox* foram observadas, no folículo em questão, células sanguíneas de defesa mononucleadas desde o dia 0 (zero), indicando início de reabsorção. A partir do quarto dia após a desova foi observado início de vacuolização nos folículos pós ovulatórios. Kaptaner e Ünal (2006), através de técnicas específicas para identificar células apoptóticas em folículos pós ovulatórios de *Chalcalburnus tarichi*, observaram que estas células estavam presentes em larga escala na zona granulosa e em menor número na teca dos folículos desde o primeiro dia após a ovulação. Corroborando com esse relato, Drummond et al. (2000) relatou que apoptose foi um mecanismo preliminar responsável pela eliminação dos folículos pós ovulatórios em *Astyanax bimaculatus lacustris*. Wood e Van Der Kraak (2001) demonstraram através do método de TUNEL que apoptose foi associada com regressão pós ovulatória em truta arco-iris *Onchorhynchus mykiss*. Sugere-se que o mecanismo de apoptose seja o principal responsável pela formação de vacúolos e conseqüentemente a reabsorção dos folículos pós ovulatórios em *M. praecox*. A presença de células sanguíneas mononucleadas nos folículos pós ovulatórios se manteve constante até o dia 15 após a desova, quando a hipertrofia e a desorganização das células foliculares atingiram um alto nível. A presença destas células pode estar associada com o

processo de apoptose celular, já que as mesmas tem a função de digestão das células mortas.

Com 32 dias após a desova os folículos pós ovulatórios de *M. praecox* se apresentavam com tamanho reduzido, alta proliferação de tecido conjuntivo e característica de massa amorfa. Essas características confirmam período final de reabsorção destas estruturas. Do mesmo modo, em *Astyanax bimaculatus lacustris*, com quatro dias após a desova os folículos se apresentavam como uma massa amorfa residual reduzida, mas não completamente absorvida (DRUMMOND et al., 2000). A mesma característica de massa celular amorfa foi constatada para os folículos de *Pseudoplatystoma fasciatum* após 24 horas da desova (ROMAGOSA et a., 2005). Este autor sugeriu que o comportamento reprodutivo desta espécie (desova total) poderia influenciar na rapidez com que ocorre a involução e degeneração dos folículos. Hunter e Macewicz (1983), através da observação dos estágios de degeneração do folículo de *Engraulis mordax*, acreditam que de 3 a 4 dias após a desova todos os folículos pós ovulatórios foram reabsorvidos. Com relação ao presente trabalho podemos supor que, devido à tática reprodutiva da espécie trabalhada, que apresenta desovas com pequeno número de ovos (menos de uma centena por desova), não haja necessidade de reabsorção dos folículos em um curto espaço de tempo, pois já existem outros ovócitos prontos para serem desovados como foi evidenciado nas lâminas histológicas.

Segundo Hunter e Macewicz (1985) a duração da degeneração folicular pode ser dependente de temperatura, devido às taxas metabólicas dos pecilotérmicos, como peixes, que pode ser diretamente afetado pela temperatura ambiente.

## 6. CONCLUSÕES

Matrizes de *M. praecox* mantidas em temperatura média de  $28,64 \pm 1,11$  °C apresentaram características finais de reabsorção dos folículos pós ovulatórios com 32 dias após a desova.

Os ovários dos peixes desta espécie apresentaram organização ovocitária do tipo assincrônica (observação de todos os tipos ovocitários no mesmo período sem dominância de um tipo específico).

Foram definidos quatro tipos ovocitários, sendo eles, crescimento primário (O1), crescimento secundário (O2), alvéolo cortical (O3) e vitelogênico (O4).

Durante o período experimental não foi possível observar nas lâminas histológicas de ovário a presença de célula micropilar ou poro de ovulação nos folículos pós ovulatórios desta espécie. Filamentos responsáveis pela adesividade dos ovos foram histologicamente bem evidentes a partir dos O3.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGOSTINHO, A.A.; BARBIERI, M.C.; BARBIERI, G.; AGOSTINHO, C.S. Biologia reprodutiva de *Rhinelepis áspera* (AGASSIZ, 1829) (Teleostei, Loricariidae) no rio Paranapanema. II. Estrutura dos ovários e estádios de maturação. **Revista Brasileira de Biologia**, Rio de Janeiro, v. 47, n. 3, p. 319-328, 1987.

ALDAY, A.; SANTOS, M.; URIARTE, A.; MARTÍN, I.; MARTÍNEZ, U.; MOTOS, L. Revisión de los criterios para la clasificación de folículos degenerados, para el Bay of Biscay anchovy (*Engraulis encrasicolus* L.). **Revista de Investigación Marina**, v. 17, n. 8, p. 165-171, 2010.

ALLEN, G.R.; MIDGLEY, S.H.; ALLEN, M. **Field guide to the freshwater fishes of Australia**, Western Australia Museum: Perth, Australia, 410 p., 2002.

ALLEN, G.R.; NORBERT, J.C. **Rainbowfishes of Australia and Papua New Guinea**, Ed. T.F.H. Publications, NJ, 141 p., 1982.

AMORIM, J.P.A. **Foliculogênese e caracterização celular das classes reprodutivas em *Pimelocus maculatus* (Siluriformis: Pimelodidae)**, Dissertação, Botucatu-SP: Ed. UNESP, 2007.

BAZZOLI, N.; GODINHO, H.P. Cortical alveoli in oocytes of freshwater neotropical teleost fish, **Bollettino di Zoologia**, v. 61, n. 4, p. 301-308, 1994.

BAZZOLI, N.; RIZZO, E.; SANTOS, G.B.; SATO, J.E.Y. Dinâmica da ovogênese em peixes forrageiros da represa de Três Marias, Minas Gerais: estudo histológico e histoquímico. **BIOS**, Belo Horizonte, v. 4, n. 4, p. 5-10, 1996.

BABIN, P.J.; CARNEVALI, O.; LUBZENS, E.; SCHNEIDER, W.J. **Molecular aspects of oocyte vitellogenesis in fish**. In: BABIN, P.J.; CERDÀ, J.; LUBZENS, E. The fish oocyte: From basic studies to biotechnological applications, New York, Springer, p. 39-76, 2007.

BENJAMIM, L.A. **Caracterização dos ovários e do desenvolvimento ovocitário, e da recuperação ovariana pós-parto do platy (*Xiphophorus maculatus*) (Teleostei, Poeciliidae) em condições laboratoriais controladas e sob ação do hormônio de crescimento**, Tese de Doutorado, UNICAMP, Campinas-SP, 2004.

BUN NG, T.; IDLER, D.R. **Yolk formation and differentiation in teleost fishes**. In: HOAR, W.S.; RANDALL, D.J.; BRETT, J.R. Fish physiology, Reproduction, New York: Academic Press, p. 373-404, 1983.

BROMAGE, N.R.; CUMARANATUNGA, P.R.T. **Egg production in rainbow trout**. In Muir, J.F. and Roberts, R.J., eds. Recent Advances in Aquaculture. London and Sydney: Croom Helm, p. 65-138, 1988.

BUSSON-MABILLOT, S. Un type particulier de sécrétion exocrine: Celui de l'appareil adhésif de l'oeuf d'un poisson Téléostéen. **Biology of the Cell**, v. 30, p. 233-244, 1977.

CHAPOVETSKY, V.; GATTEGNO, T.; ADMON, A. **Proteomics analysis of the developing fish oocyte**. In: BABIN, P.J.; CERDÀ, J.; LUBZENS, E. The fish oocyte: From basic studies to biotechnological applications, Springer, p. 99-112, 2007.

CHINI, H.A.S.; GARCIA, J.A.D.; MAISTRO, E.L.; QUAGIO-GRASSIOTTO, I. Dynamics and cytochemistry of oogenesis in *Leporinus striatus* Kner (Teleostei, Characiformes, Anostomidae) from the Rio Sapucaí, Minas Gerais, Brasil. **Revista Brasileira de Zoologia**, v. 18, n. 4, p. 1065-1072, 2001.

ÇAKICI, Ö; ÜÇÜNCÜ, S.I. Oocyte development in the Zebrafish, *Danio rerio* (Teleostei: Cyprinidae). **Journal of Fisheries & Aquatic Sciences**, v. 24, n. 1-2, p. 137-141, 2007.

DRUMMOND, C.D.; BAZZOLI, N.; RIZZO, E.; SATO, Y. Post-ovulatory follicle: a model for experimental studies of programmed cell death or apoptosis in teleosts. **Journal of Experimental Zoology**, v. 287, n. 2, p. 176-182, 2000.

FÁVARO, L.F.; CHAVES, P.T.C. Aspectos morfológicos e citoquímicos da ovogênese de *Hypostomus cf. tietensis* (Loricariidae) do Lago Igapó I (Londrina, PR, Brasil), Curitiba. **Acta Biológica Paranaense**, v. 28, n. 1-4, p. 125-139, 1999.

FISHBASE. *Melanotaenia lacustris* (MUNRO, 1964) Dwarf rainbowfish. Disponível em: < <http://www.fishbase.org/summary/Melanotaenia-lacustris.html>>. Acesso em: 10 de setembro de 2013.

FITZHUGH, R.G.; HETTLER, F.W. Temperature influence on postovulatory follicle degeneration in Atlantic menhaden, *Brevoortia tyrannus*. **Fishery Bulletin**, v. 93, n. 3, p. 568-572, 1995.

GARCIA, J.A.D.; CHINI, H.A.S.; MAISTRO, E.L.; QUAGIO-GRASSIOTTO, I. Dynamics and cytochemistry of oogenesis in *Astyanax fasciatus* (Cuvier) (Teleostei, Characiformes, Anostomidae) from Rio Sapucaí, Minas Gerais, Brasil. **Revista Brasileira de Zoologia**, v. 1, n. 4, p. 1057-1064, 2001.

GRIER, H.J.; URIBE, M.C.; PARENTI, L.R. Germinal Epithelium, Folliculogenesis, and Postovulatory Follicles in Ovaries of Rainbow Trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum, 1792) (Teleostei, Protacanthopterygii, Salmoniformes). **Journal of Morphology**, v. 268, n. 4, p. 293-310, 2007.

GUIMARÃES-CRUZ, R.J.; SANTOS, J.E.; SANTOS, G.B. Gonadal structure and gametogenesis of *Loricaria lentiginosa* Isbrucker (Pisces, Teleostei, Siluriformes). **Revista Brasileira de Zoologia**, v. 22, n. 3, p. 556-564, 2005.

GUIMARÃES, A.C.D.; QUAGIO-GRASSIOTTO, I. Ultrastructural aspects of oogenesis and oocyte primary growth in *Serrasalmus spilopleura* (Teleostei, Characiformes, Characidae). **Tissue & Cell**, v.33, n. 3, p. 241-248, 2001.

HUMPHREY, C.; KLUMPP, D.W.; PEARSON, R. Early development and growth of the east rainbowfish, *Melanotaenia splendida splendida* (Peters). I. Morphogenesis and ontogeny, **Marine and Freshwater Research**, v. 54, n. 1, p.17- 25, 2003.

HUNTER, R. **Rainbowfish (sic), from nature to your aquarium**, Ed. AFM. 6/97, 1997.

HUNTER, J.R.; MACEWICZ, B.J. Measurement of spawning frequency in multiple spawning fishes, **Southwest Fisheries Center**, National Marine Fisheries Service, NOM, PO. Box 271, La Jolla, CA 92038, 1983.

JIANG, Y.Q.; ZHANG, T.T.; YANG, W.X. Formation of zona radiata and ultrastructural analysis of egg envelope during oogenesis of Chinese perch *Siniperca chuatsi*, **Micron**, v. 41, n. 1, p. 7-14, 2010.

KAPTANER, B.; ÜNAL, G. Apoptosis in Postovulatory Follicles of *Chalcalburnus tarichi* Pallas, 1811. **Journal of Fisheries & Sciences**, v. 23, n. 3-4, p. 263-267, 2006.

LEONARDO, A.F.G.; ROMAGOSA, E.; BATLOUNI, S.R.; BORELLA, M.I. Occurrence and significance of ovariano f ovarian and follicular refression in cachara *Pseudoplatystoma fasciatum* (Linnaeus, 1766): a histology approach, **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 58, n. 5, p. 831-840, 2006.

MATSUYAMA, M.; NAGAHAMA, Y.; MATSUURA, S. Observations on ovarian follicle ultrastructure in the marine teleost, *Pagrus major*, during vitellogenesis and oocyte maturation. **Aquaculture**, v. 92, p. 67-82, 1991.

MCGUIGAN, K.; ZHU, D.; ALLEN, G.R.; MORITZ, C. Phylogenetics relationships and historical biogeography of melanoteiid fishes in Australia and New Guinea, **Marine and Fresh Water Research**, v. 51, p. 713-723, 2000.

MENN, L.E., F.; CERDÁ, J.; BABIN, J.P. **Ultrastructural aspects of the ontogeny and differentiation of ray-finned fish ovarian follicles**. In: BABIN, P.J.; CERDÁ, J.; LUBZENS, E. The fish oocyte: From basic studies to biotechnological applications, New York, Springer, p. 1-38, 2007.

MIRANDA, A.C.L.; BAZZOLI, N.; RIZZO, E.; SATO, Y. Ovarian follicular atresia in two teleost species: a histological and ultrastructural study, **Tissue and Cell**, v. 31, n. 5, p. 480-488, 1999.

MOTTA, C.M.; TAMMARO, S.; SIMONIELLO, P.; PRISCO, M.; RICCHIARI, L.; ANDREUCETTI, P.; FILOSA, S. Characterization of cortical alveoli content in several species of Antarctic notothenioids. **Journal of Fish Biology**, v. 66, p. 442-453, 2005.

NAGAHAMA, Y. **The functional morphology of teleost gonads**. In: HOAR, W.S.; RANDALL, D.J.; BRETT, J.R. Fish physiology, Reproduction, New York: Academic Press, p. 223-275, 1983.

NEJEDLI, S.; PETRINEC, Z.; KUŽIR, S.; SREBOČAN, E. Annual oscillation of ovarian morphology in European pilchard (*Sardina pilchardus* Walbaum) in the northern Adriatic Sea, **Veterinarski Arhiv**, v. 74, n. 2, p. 97-106, 2004.

REID, H.P.; HOLDWAY, D.A. Early development of the Australian crimsonspotted rainbowfish, *Melanotaenia fluviatilis* (Pisces: Melanotaeniidae), **Marine and Freshwater Research**, v. 46, n. 2, p. 475-480, 1995.

RIZZO, E.; BAZZOLI, N. Follicular atresia in curimatá-pioa *Prochilodus affinis* Reinhardt, 1874 (Pisces, Characiformes), **Revista Brasileira de Biologia**, v. 55, n. 4, p. 697-703, 1995.

ROMAGOSA, E.; ANDRADE-TALMELLI, E.F.; PAIVA, P. de; GODINHO, H.M.; BATLOUNI, S.R. Observações preliminares sobre o comportamento reprodutivo das fêmeas de cachara, *Pseudoplatystoma fasciatum* (Teleostei, Siluriformes, Pimelodidae) na região do Vale do Ribeira, SP, em condições de confinamento, **Brazilian Journal of Morphological Sciences**, v. 17, p. 1-224 (Suplemento), 2000.

ROMAGOSA, E.; BATLOUNI, S.R.; BORELLA, M.I.; LEONARDO, A.F.G. Involução dos volículos pós-ovulatórios em *Pseudoplatystoma fasciatum* (PISCES, TELEOSTEI), São Paulo, **Boletim do Instituto de Pesca**, v. 31, n. 2, p. 135, 2005.

SANTOS, J.E.; RIZZO, E.; BAZZOLI, N.; SATO, Y.; MORO, L. Ovarian regression and apoptosis in the South American Teleost *Leporinus Taeniatus* Lutken (Characiformes, Anostomidae) from the São Francisco Basin, **Journal of Fish Biology**, v. 67, n. 5, p. 1446-1459, 2005.

SAWAGUCHI, S.; OHKUBO, N.; KOYA, Y.; MATSUBARA, T. Incorporation and Utilization of Multiple Forms of Vitellogenin and their Derivative Yolk Proteins during Vitellogenesis and Embryonic Development in the Mosquitofish, *Gambusia affinis*, **Zoological Science**, v. 22, n. 6, p. 701-710, 2005.

SCOTT, A.P. Reproductive endocrinology of fish. In Chester Jones, C., Ingleton, P. M. and Phillips, J. C., eds. **Fundamentals of Comparative Vertebrate Endocrinology**. New York: Plenum Press, p. 223 – 56, 1987.

SELMAN, K.; WALLACE, R.A.; SARKA, A.; QI, X. Stages of oocyte development in the zebrafish, *Brachydanio rerio*, **Journal of Morphology**, v. 218, n. 2, p. 203-224, 1993.

SHABANIPOUR, N.; HOSSAYNI, S.N. Histological and ultrastructural study of Zona Radiata in oocyte of common carp *Cyprinus carpio* (Linnaeus 1758), **Micron**, v. 41, n. 7, p. 877-881, 2010.

SOUZA, M.S. Piscicultura ornamental: Uma boa opção para o pequeno produtor, **Revista Panorama da Aqüicultura**, v. 6, n. 36, p. 20-21, 1996.

STEQUERT, B.; MENARD, F.; MARCHAL, E. Reproductive biology of *Vinciguerria nimbaria* in the equatorial waters of the eastern Atlantic Ocean, **Journal of Biology**, v. 62, n. 5, p. 1116-1136, 2003.

SUZUKI, H.I.; AGOSTINHO, A.A.; WINEMILLER, K.O. Relationship between oocyte morphology and reproductive strategy in loriciid catfishes of the Paraná River, Brazil. **Journal of Fish Biology**, v. 57, n. 3, p. 791-807, 2000.

TAYLOR, E.C. **Over the rainbows**, Pet Business, p. 1-99, 1999.

TYLER, C.R. Vitellogenesis in salmonids. In: SCOTT, A.E.; SUMPTER, J.E.; KIME, D.E.; ROLFE, J., **Proceedings of the Fourth International Symposium Reproductive Physiology of Fish**. Sheffield, UK. Sheffield University Press, p. 295-299, 1991.

TYLER, C.R.; SUMPTER, J.P. Oocyte growth and development in teleosts, **Reviews in Fish Biology and Fisheries**, v. 6, n. 3, p. 287-318, 1996.

VAZZOLER, A.E.A.M. Biologia da reprodução de peixes teleósteos: teoria e prática, Maringá: Eduem/SBI/CNPq/Nupélia, 169 p., 1996.

VIDAL Jr., M.V. Melanotaenia maçã, **Panorama da Piscicultura**, v. 15, n. 88, p. 39-42, 2005.

WOOD, A.W.; VAN DER KRAAK, G. Apoptosis and ovarian function: novel perspectives from the teleosts. **Biol. Reprod.**, 64: 264-271, 2001

YAMAMOTO, K.; OOTA, I.; TAKANO, K.; ISHIKAWA, T. Studies on the maturing process of the rainbow trout, *Salmo gairdneri irideus*. 1. Maturation of the ovary of a one-year old fish. **Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries**, v. 31, p. 123-132, 1965.

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