



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

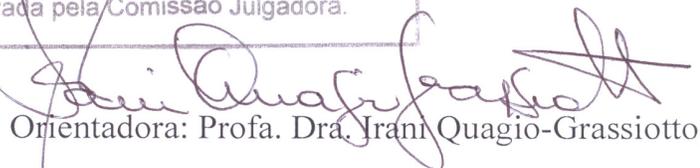
INSTITUTO DE BIOLOGIA

TALITA SARAH MAZZONI

**“Formação do epitélio germinativo durante a morfogênese e
diferenciação gonadal em *Cyprinus carpio* (Teleostei:
Cypriniformes): análise estrutural e ultraestrutural das células
germinativas e somáticas”**

Este exemplar corresponde à redação final
da tese defendida pelo(a) candidato (a)
TALITA SARAH MAZZONI
e aprovada pela Comissão Julgadora.

Dissertação apresentada ao Instituto de
Biologia para obtenção do Título de
Mestre em Biologia Celular e Estrutural,
na área de Biologia Celular.


Orientadora: Profa. Dra. Irani Quaglio-Grassiotto

Campinas, 2009

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA – UNICAMP

M459f

Mazzoni, Talita Sarah

Formação do epitélio germinativo durante a morfogênese e diferenciação gonadal em *Cyprinus carpio* (Teleostei: Cypriniformes): análise estrutural e ultraestrutural das células germinativas e somáticas / Talita Sarah Mazzoni. – Campinas, SP: [s.n.], 2009.

Orientadora: Irani Quagio-Grassiotto.
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.

1. Cypriniformes. 2. Diferenciação gonadal. 3. Epitélio germinativo feminino. 4. Epitélio germinativo masculino. I. Quagio-Grassiotto, Irani. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

(rcdt/ib)

Título em inglês: Formation of germinal epithelium during gonadal morphogenesis and differentiation in *Cyprinus carpio* (Teleostei: Cypriniformes): a structural and ultrastructural analysis of the germ and somatic cells.

Palavras-chave em inglês: Cypriniformes; Female germinal epithelium; Gonadal differentiation; Male germinal epithelium.

Área de concentração: Biologia Celular.

Titulação: Mestre em Biologia Celular e Estrutural.

Banca examinadora: Irani Quagio-Grassiotto, Fabiana Laura Lo Nostro, Laura Satiko Okada Nakaghi.

Data da defesa: 14/08/2009.

Programa de Pós-Graduação: Biologia Celular e Estrutural.

Campinas, 14 de agosto de 2009.

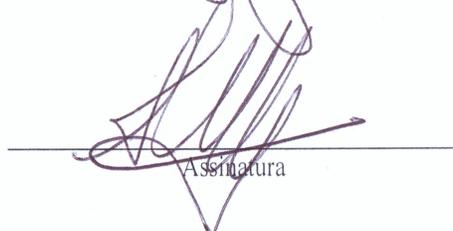
BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Irani Quagio Grassiotto (Orientadora)



Assinatura

Profa. Dra. Fabiana Laura Lo Nostro



Assinatura

Profa. Dra. Laura Satiko Okada Nakaghi



Assinatura

Profa. Dra. Renata Guimarães Moreira



Assinatura

Prof. Dr. Sebastião Roberto Taboga



Assinatura

*Dê sempre o melhor...
E o melhor virá.
Às vezes as pessoas são egocêntricas,
Ilógicas e insensatas...
Perdoe-as assim mesmo.
Se você é gentil, as pessoas podem
Acusá-lo de egoísta e interesseiro...
Seja gentil assim mesmo.
Se você é um vencedor, terá alguns
Falsos amigos e alguns inimigos verdadeiros...
Vença assim mesmo.
Se você é honesto e franco,
As pessoas podem enganá-lo...
Seja honesto e franco assim mesmo.
O que você levou anos para construir,
Alguém pode destruir de uma hora para outra...
Construa assim mesmo.
Se você tem paz e é feliz,
As pessoas podem sentir inveja...
Seja feliz assim mesmo.
O bem que você faz hoje
Pode ser esquecido amanhã...
Faça o bem assim mesmo.
Dê ao mundo o melhor de você,
Mas isso pode nunca ser o bastante...
Dê o melhor assim mesmo.
E veja você que, no final das contas,
É entre você e Deus...
Nunca será entre você e eles!*

(Madre Tereza de Calcutá)

*“Escolha um trabalho que você ame e não
terá de trabalhar um único dia em sua vida”.*

(Confúcio)

*“Aprender é a única coisa de que a mente nunca se
cansa, nunca tem medo e nunca se arrepende”.*

(Leonardo da Vinci)

*“Acreditar é monótono, duvidar é apaixonante,
manter-se alerta: eis a vida”.*

(Oscar Wilde)

*“Ame quem vos comanda. Mas sem lhes dizer.
O amor verdadeiro começa quando não se espera mais
nada em troca...”*

(Antoine de Saint-Exupéry)

Às carpas, que propiciaram a realização deste trabalho...

Segundo uma lenda chinesa, a Carpa, durante sua época de desova, tem de transpor diversos obstáculos, saltando por vales repletos de cascatas e cachoeiras percorrendo quase todo o continente asiático, até chegar à nascente do Huang Ho (Rio Amarelo) na montanha Jishinhan. Quando uma carpa consegue vencer a cascata Longman Falls (Portal do Dragão), ela se transforma em um dragão, atingindo seu objetivo final. Sua trajetória é sinônimo de perseverança, superação e luta por um objetivo ideal.

Na crença asiática, a carpa representa a vitória, a conquista, a coragem e a capacidade de atingir os mais altos desígnos. É símbolo de estímulo para ultrapassar as barreiras e dificuldades da vida; é símbolo de determinação e força para vencer obstáculos.

Essas palavras descrevem primorosamente as incansáveis lutas e barreiras que ultrapassei com muita força de vontade, persistência e determinação com o firme objetivo de alcançar as mais belas metas traçadas para este trabalho.

*Com honra e satisfação, só posso dizer que faria tudo de novo...
...quantas vezes fossem necessárias!*

Dedico este trabalho à pessoa que diariamente me faz crescer, como pessoa e como profissional. À minha orientadora – Professora Irani...

“Essa pessoa grande é capaz de compreender todas as coisas; essa pessoa grande é a melhor amiga que possuo no mundo” (Saint-Exupéry)

À Professora Irani Quagio-Grassiotto,

Professora, bem sabemos que um simples “obrigado” resumiria tudo o que eu tenho a lhe dizer, mas uma única palavra não me satisfaz, simplesmente por não haver palavra no mundo capaz de expressar meus sinceros e infindáveis agradecimentos à senhora.

Então, só quero dizer que é maravilhoso poder conviver com alguém tão admirável como a senhora, no seu modo de agir e pensar. Uma pessoa digna de respeito; de princípios, ética e bom senso inigualáveis. Penso que o que há de mais fantástico na senhora é exatamente isso... fazer sempre de um pequeno instante um grande momento. Por isso é uma honra tê-la como orientadora.

A senhora nos oferece ensinamentos que vão muito além do conhecimento científico... Ensinamentos fundamentais que nos fazem crescer, que são para toda a vida e que só uma verdadeira orientadora é capaz de transmitir! Dessa forma, só tenho a lhe agradecer por toda amizade e orientação, paciência e compreensão; por guiar meu caminho nesses poucos três anos de convivência e por ter me mostrado um novo horizonte – sempre tão seguro.

Por todo esse apreço, respeito, gratidão e admiração que lhe tenho, a senhora sempre será o meu maior exemplo; alguém em que eu quero me inspirar por toda a vida.

Obrigada por acreditar em mim, mesmo quando, tantas vezes, eu mesma não acreditei. Obrigada por nunca ter me deixado desistir. Obrigada por sempre me escutar e fazer com que eu sempre encontre as respostas para as minhas eternas dúvidas, dentro de mim mesma.

Enfim, obrigada por tudo o que sou quando estou com a senhora, por todo o bem que me faz e por ter se tornado tão importante na minha vida. Seus ensinamentos e atitudes me fortalecem, me encantam e me emocionam... SEMPRE!!!!

Agora sim: Muito Obrigada por tudo!!!!!!!

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar, gostaria de agradecer a Deus, por toda força que diariamente desperta dentro de mim. Força, esta, em forma de fé, amor e esperança, que me sustenta no meu caminhar, por maior que sejam as dificuldades. Que eu possa continuar trilhando meu caminho, fazendo o melhor que eu puder, onde eu estiver, com o que eu tiver. E que eu nunca perca a poesia do cotidiano, mesmo que muitas vezes ela exista somente dentro de mim.

Em segundo lugar, gostaria de agradecer a todas as pessoas que direta ou indiretamente contribuíram para a minha formação profissional e pessoal. Em momentos como estes que paramos e analisamos quem realmente importa, quem nunca importou, quem não importa mais e quem sempre importará em nossas vidas. Eis a razão pela qual algumas pessoas do nosso passado não chegam ao nosso futuro. Mas o que importa para mim, como diria Mário Quintana, é poder dizer às pessoas que nada é em vão. Que o amor existe, que vale a pena se doar às amizades, às pessoas e ao trabalho. Que a vida é bela sim e que eu sempre dei o melhor de mim... e que valeu a pena! E sempre valerá!!!

Sendo assim, gostaria de agradecer:

- À minha mãe Almerinda, por todas as lições de vida e de amor; por toda dedicação, renúncia, força e sabedoria. Sua força e seu amor me conduzem pela vida, e me deram as asas que eu precisava para voar. Minha vida é seu reflexo e o meu lugar mais seguro é o aconchego de seu coração.

- À minha querida avó Dodô. Não há um único dia, desde que você se foi, que eu deixe de me lembrar de você. “Porque tua ausência faz silêncio em todo lugar; mas enquanto houver você do outro lado, aqui do outro eu consigo me orientar”.

- Ao meu irmão Cesar Augustus, mais do que um irmão – um verdadeiro amigo.

- À tia Walkyria, minha “segunda-vó”, por todos os ensinamentos, amizade e admiração; obrigada por tudo o que sempre faz pela nossa família. A todos os meus primos, em especial à Almerinda, Guilherme, Maria Emília, Maria Cristina, Marise, Mequinho e Teinha por toda amizade e ajuda constante! À minha priminha Isabelle Pottiens, por toda alegria que me traz!

- À Rosângela Rossi, alguém para sempre especial - um pouco de irmã e muito de mãe. Rô, obrigada por tudo que sempre fez por mim, por sempre me entender e me apoiar. Que o brilho do seu olhar continue iluminando minha vida, como sempre foi. Obrigada pela presença constante em todos os meus dias. Sem você, minha vida perde todo o sentido!

- À querida amiga Denise Valio. Obrigada por participar da minha formação, por todos os belos ensinamentos e momentos divertidos durante nosso convívio sempre tão constante. Por toda amizade e dedicação que sempre teve. Obrigada por sempre estar presente nos momentos mais importantes da minha vida.

- À querida Sra. Guiomar Cardoso, minha verdadeira mestra!!! Àquela que conhece meus pensamentos, meus olhares e meu coração como ninguém. Grata por todos os anos que estive ao lado da senhora, aprendendo as mais belas lições de vida, de amor e de uma força maior! Sou sua eterna aprendiz!!!

- Ao Nelson Sônego, por todos esses anos de convivência e por tudo o que superamos. Pelos ensinamentos, biologia e toda magia que trouxe à minha vida. Que nossa amizade, respeito e admiração – comprovadamente indestrutíveis e incontestáveis, sob qualquer circunstância – continuem sempre presentes em nossas vidas.

- Aos amigos de longa data: Angélica Campos (*in memoriam*), Carla Migliatti, Cláudia Camargo Barros, Eliana Norte, Lilian Sales, Léo Burgos, Luiz Fernando Antunes, Maressa Carvalho, Maria Carolina Costa, Priscila Freire e Renata Roentgen. O tempo já nos provou que nossa amizade é verdadeira. “As pessoas realmente ligadas não precisam de ligação física. Quando se reencontram, mesmo depois de muitos anos afastados, a amizade é tão forte quanto sempre”.

- Ao meu sempre melhor amigo Rafael Henrique Nóbrega, por toda amizade, sinceridade e cumplicidade. Pelos muitos conselhos e críticas que tantas vezes me fazem acordar para a realidade. Por todos os momentos de alegrias e emoções. Você é meu exemplo de força e determinação.

- Aos amigos de graduação Alexandre Leite, Maria Gorete Teixeira e Érika Graner. Que nossa amizade sempre continue. Em especial ao Felipe Gustavo Ravagnani por momentos tão divertidos em Botucatu e em Campinas, e pelo companheirismo nas incontáveis noites em claro conversando ou estudando até o amanhecer!

- À amiga de graduação e pós-graduação Danielle Fernandes. Que tudo continue dando certo em nossa vida acadêmica, conforme remotamente planejado!!!

- Aos amigos de pós-graduação Aline Tagliaferro, Andréa de Aro, Bernhard Jordan, Débora Sobreira, Juliana Monteiro e Ricardo Fochi, por todo companheirismo e cooperação durante as disciplinas cursadas, e pela amizade que se perpetuou.

- Aos amigos do Departamento de Morfologia (IBB-UNESP) por toda amizade e momentos divertidos: Elaine Porto, Fernanda Losi, Flávia Dellela, Irani Ferreira, João Paulo Amorim, Juliana Perobelli e Wellerson Scarano. Além dos companheiros do Laboratório de Biologia da Reprodução de Peixes Neotropicais (IBB-UNESP): Ayesha Ribeiro, Clarianna Martins, Daniel Wildner, Fernanda Antoneli, Gisleine França, Julio Santana, Laura Migliorinni, Paula Nehring, Renata Ishiba e Rinaldo Ortiz.

- À Gisleine Fernanda França por tudo o que me ensinou sobre técnicas laboratoriais, desde as mais simples até as mais sofisticadas. Devo todo meu aprendizado técnico a você. Obrigada pelo apoio em todos os momentos acadêmicos e pessoais em que precisei e, principalmente, por ser uma grande amiga da qual eu sempre posso contar.

- Ao meu amigo mais do que especial Julio César Santana pelo companheirismo no trabalho e fora dele, e por ter se tornado alguém tão importante em tão pouco tempo. Obrigada por toda alegria e diversão que você proporciona. Obrigada por fazer parte da minha vida!

- Às meninas da Iniciação Científica que tanto me ajudaram ao longo deste trabalho: Ayesha Ribeiro e Paula Nehring. Obrigada por tudo meninas, e pela amizade que se fez. Especialmente à Tatá (Paula) por ser tão semelhante a mim, sendo, portanto, sempre capaz de me entender - ou vice-versa!!! Obrigada por ter se tornado uma verdadeira irmã! Que possamos ainda trabalhar muitos anos juntas, nesse nosso modo perfeitamente sincrônico de sempre!!!

- Ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural (IB-UNICAMP) pela oportunidade de crescimento profissional, durante a realização do meu mestrado.

- Aos professores da pós-graduação (IB-UNICAMP), especialmente à Profa. Cristina Vicente, Prof. Edson Pimentel, Profa. Heidi Dolder, Profa. Laurecir Gomes, Profa. Luciana Bolsoni e Profa. Shirlei Recco-Pimentel, por toda cobrança frente ao aprendizado, o que nos propiciou uma nova visão e ampliação dos conhecimentos. Em especial ao Prof. Dr. Luis Antonio Violin, pelo excelente profissionalismo; por suas fantásticas aulas sempre tão insuperáveis e fascinantes. Certamente um exemplo a ser seguido...

- À Liliam Alves Senne Panagio, secretária do Programa de Pós-Graduação (IB-UNICAMP), por todos os serviços burocráticos prestados, pela sempre disposição e presteza em nos ajudar, com nossos intermináveis problemas e dúvidas, e principalmente pela amizade sincera que nos oferece e por sempre torcer por nós! Obrigada por tudo, Liliam!!!

- Ao Departamento de Morfologia (IBB-UNESP) por todas as oportunidades de estágios, ao longo desses anos. Aos professores e funcionários do Departamento, por toda presteza e amizade, em especial à secretária Luciana Cristina Montes.

- À Profa. Dra. Wilma de Grava Kempinas (IBB-UNESP) por todas as oportunidades de estágio docência, aulas e participação em alguns de seus trabalhos. Obrigada por toda amizade e por ter se tornado tão especial em minha vida – apesar do “apesar de tudo” de sempre!!!

- À Profa. Maria Dalva Cesario (IBB-UNESP), por ter sido a responsável por todo o conhecimento de Embriologia que tenho hoje. E principalmente, por ter insistido tanto para que um dia eu viesse a trabalhar com a Professora Irani! Estes são os dois maiores presentes que ganhei da vida!!!

- Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq - processo 131286/2007-2) e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Programa de Excelência Acadêmica (CAPES/PROEX) pelo apoio financeiro, possibilitando a realização desse trabalho.

- Ao Centro de Microscopia Eletrônica (IBB-UNESP) e aos seus funcionários, por toda colaboração no processamento dos materiais, permitindo que pudéssemos realizar as análises ultraestruturais deste trabalho.
- À Piscicultura Santa Cândida (Santa Cruz da Conceição-SP), especialmente à família Ganeo (Rogério, Margareth, Léo e Neto) por permitirem a reprodução e criação das carpas em suas dependências.
- Aos técnicos de laboratório do Departamento de Morfologia (IBB-UNESP) José Eduardo Bozano, Renato Devidé e Ricardo Teixeira. Em especial ao Antônio Vicente Salvador, por dividir comigo os incontáveis dias rotineiros no laboratório! Obrigada por toda ajuda, apoio e amizade.
- Aos membros que compuseram a banca examinadora prévia (Profa. Dra. Laura Satiko Okada Nakaghi, Prof. Dr. Luis Antonio Violin Dias Pereira e Profa. Dra. Renata Guimarães Moreira) e a banca examinadora definitiva (Profa. Dra. Fabiana Laura Lo Nostro, Profa. Dra. Laura Satiko Okada Nakaghi e Profa. Dra. Renata Guimarães Moreira) deste trabalho, pela disponibilidade de participação, pelas correções e sugestões na análise do mesmo.
- À Profa. Dra. Fabiana Laura Lo Nostro (Universidad de Buenos Aires) por de certa forma, ter sido a responsável – mesmo sem saber – pela minha escolha em trabalhar com diferenciação gonadal e continuar trabalhando com peixes (e conseqüentemente com Professora Irani), durante uma conversa sincera e convincente em uma de suas vindas para o Brasil, quando eu ainda nem entendia direito que “Lo Nostro *et al.*” e Fabiana se compunham de uma mesma pessoa!!!
- Ao Dr. Harry Grier (Florida Fish and Wildlife Research Institute – Florida/USA) por todos os valiosos ensinamentos e sugestões ao longo deste e de outros trabalhos.
- E a você Albert Kelvin, por toda força e apoio diários, e pela presença constante nas batalhas da minha vida!!! Obrigada por sempre estar presente, principalmente em momentos como este, de mais uma conquista!!!

A todos, muito obrigada!!!!

Talita Sarah Mazzoni

SUMÁRIO

1. Resumo	01
2. Abstract	03
3. Introdução	05
4. Revisão Bibliográfica	
4.1 Os Peixes Teleostei e a família Cyprinidae	07
4.2 Aspectos da Biologia Reprodutiva dos Teleostei	07
4.3 Determinação Sexual	08
4.4 Morfogênese e Diferenciação Gonadal	09
4.5 O Epitélio Germinativo	13
4.6 Estrutura ovariana	13
4.7 Estrutura testicular	16
4.8 <i>Cyprinus carpio</i> como modelo experimental	19
5. Objetivos	23
6. Material e Métodos	25
7. Resultados	
7.1 Primórdio Gonadal	31
7.2 Gônadas Indiferenciadas	31
7.3 Diferenciação Gonadal	
7.3.1 Diferenciação Ovariana	33
7.3.2 Diferenciação Testicular	38
Esquema: Cronologia da Diferenciação Gonadal	85
8. Discussão	87
9. Conclusões	99
10. Referências Bibliográficas	101

RESUMO

Numa nova visão da morfogênese gonadal, sua descrição em *Cyprinus carpio*, mostra como a proliferação e diferenciação de células germinativas e somáticas a partir do primórdio gonadal levam à formação das diferentes estruturas ovarianas e testiculares e à constituição do epitélio germinativo que margeia as lamelas ovíferas e os túbulos testiculares. Em *C. carpio*, o primórdio gonadal é formado por células germinativas primordiais (CGPs) rodeadas por células somáticas. Após sucessivas divisões mitóticas das células somáticas, o tecido gonadal aumenta em comprimento e espessura. As CGPs isoladas entre células somáticas se dividem mitoticamente formando grupos de células germinativas, que se organizam em cordões contínuos, os quais são invadidos por células somáticas, levando à uma reorganização estrutural e diferenciação gonadal. Nas gônadas femininas, as oogônias são envolvidas por expansões citoplasmáticas das agora células pré-foliculares, formando cistos, delimitados por uma membrana basal em formação. Cada oogônia divide-se por mitose, formando novas oogônias ou entra em meiose originando os oócitos. Com a entrada e permanência em diplóteno, os oócitos, ainda no interior dos cistos, iniciam seu desenvolvimento que completar-se-á no interior dos folículos ovarianos. As células pré-foliculares progressivamente interpenetram nos cistos e envolvem cada oócito individualizando-os. Estas gradativamente sintetizam a membrana basal envolvendo progressivamente o folículo em formação. As células foliculares assentadas em parte na membrana basal do próprio epitélio germinativo mantêm uma região de contato entre o folículo ovariano e o epitélio germinativo, que compartilham uma mesma membrana basal. Ao término da foliculogênese, o oócito inicia seu crescimento primário. No tecido gonadal, células mesenquimais se interconectam e se diferenciam, dando origem ao estroma ovariano, isolado do compartimento germinativo pela membrana basal. Células indiferenciadas do estroma emitem prolongamentos que contatam os folículos em formação, constituindo a teca. Células somáticas periféricas por migração e invaginação no tecido gonadal, formam as lamelas ovíferas. Lâminas teciduais de células somáticas formam-se em ambos os lados do ovário, projetando-se até se contatarem, formando o lúmen ovariano. Nas gônadas masculinas, as células somáticas, pré-Sertoli, invadem os cordões contínuos de CGPs. Estas, agora espermatogônias, são envolvidas por expansões citoplasmáticas das células de Sertoli, formando cistos. Estes formam conjuntos

celulares que se distribuem ao longo da gônada, cada qual circundado por células somáticas. Ao redor de cada conjunto celular, inicia-se a formação da membrana basal, porém de forma incompleta. Gradativamente, os cistos de espermatogônias que constituem um mesmo conjunto, afastam-se uns dos outros, criando um espaço central. Células somáticas de conjuntos celulares adjacentes afastam-se, permitindo fusão entre os dois conjuntos celulares e aumento do espaço central formando um único compartimento luminal, delimitado por cistos de espermatogônias, estes, apoiados na membrana basal. Formam-se os túbulos testiculares e o epitélio germinativo masculino é estabelecido. O compartimento germinativo encontra-se agora separado pela membrana basal dos demais componentes celulares, que irão se diferenciar no compartimento intersticial. Inicia-se a espermatogênese no interior de cada cisto, de forma sincrônica. Após espermiogênese, os espermatozóides são liberados no lúmen, e os túbulos testiculares se anastomosam, culminando com a formação do ducto espermático na porção dorsal do testículo.

ABSTRACT

The description of gonadal morphogenesis in *Cyprinus carpio* provides a new vision of proliferation and differentiation of germ and somatic cells from the gonadal primordium leading to the formation of different ovarian and testicular structures, and the constitution of germinal epithelium which borders the ovigerous lamellae and the seminiferous tubules. In *C. carpio* the gonadal primordium is an elongated structure with individual PGCs scattered among somatic cells. The PGCs divide and organize into continuous cords that are delimited by the somatic cells. Then, in female gonad, somatic cells move into the cords, wrap around and individualize the PGCs that subsequently differentiate in oogonia. Each oogonium is wrapped by the now prefollicle cells giving rise to a cyst. Prefollicle cells rest upon a forming basement membrane. Inside the cysts oogonium proliferates by mitosis, originating new oogonia. Or, they enter into meiosis, becoming oocytes. Oocytes advance to diplotene where meiosis is arrested. Still inside the cysts oocytes enter primary growth, they are subsequently surrounded by prefollicle cells, and they become ovarian follicles. The differentiating gonad maintains a compact structure, continues elongating and becomes larger. Invaginations appear in the ventral region of the ovary; these form the ovigerous lamellae. Mesenchymal cells scattered inside the lamellae move away from one another giving rise to the extra-vascular space in the developing stroma where the cellular processes of these cells connect to one another and form a cellular net. Meanwhile, epithelial cells coming from the gonad periphery, and present in the ventral invaginations, associate with oogonia forming germinal epithelium. These also interact with the follicles that become connected to the epithelium sharing some extension of the basement membrane. Mesenchymal cells surround the ovarian follicles, becoming theca and, include the follicle, forms the follicle complex. On either side of the developing ovary, a coelomic epithelial cell proliferation forms a laminar tissue that grows ventrally, then extending beneath the developing ovary and fusing to form the central lumen of the carp cystovarian ovary. In male gonad, somatic cells move into the cords, wrap around and individualize the PGCs that subsequently differentiate in spermatogonia. Each spermatogonium wrapped by the now pre-Sertoli cells giving rise to a cyst. The cysts join one another forming clusters. A basement membrane is synthesized around each cluster. Pre-Sertoli cells rest upon the forming basement membrane. In the center of the clusters a space is

created when pre-Sertoli cells move away from one another. Then, nearby clusters fuse to one another that become connected by the same luminal space. The progressive fusion of the clusters gives rise to the seminiferous tubules that are bordered by the new formed germinal epithelium constituted by the cysts that rest upon the basement membrane. Mesenchymal cells surround the seminiferous tubules give rise to the cellular components of the interstitial compartment. Inside the cysts spermatogenesis starts. As the final spermatid cells are released into the luminal compartment, the anastomosis of the testicular tubules occurs forming the spermatic duct on the dorsal region of the testis.

INTRODUÇÃO

O desenvolvimento gonadal e a diferenciação sexual vêm sendo bastante estudados nos Teleostei (Davies e Takashima, 1980; Timmermans e Taverne, 1983; Parmentier e Timmermans, 1985, Meijide *et al.*, 2005, Otani *et al.*, 2005; Çek, 2006). Porém estes estudos concentram-se no início da diferenciação gonadal, não se preocupando com a formação de estruturas gonadais cruciais para um entendimento mais completo do processo de diferenciação gonadal, como a formação de lamelas ovígeras, formação do estroma ovariano, a primeira foliculogênese, formação de túbulos testiculares, estabelecimento do epitélio germinativo, etc. Além disso, a maioria dos trabalhos limita-se somente à diferenciação das células germinativas iniciais, seja nos machos ou nas fêmeas (Bruslé e Bruslé, 1978; Mezhnin, 1978; Colombo *et al.*, 1984; Parmentier e Timmermans, 1985; Hamaguchi, 1992; Patiño e Takashima, 1995; Patiño *et al.*, 1996; Strüssmann *et al.*, 1996; Lin *et al.*, 1997; Nakamura *et al.*, 1998; Devlin e Nagahama, 2002). Descrições histológicas mais detalhadas do desenvolvimento e diferenciação gonadal são bastante limitadas. Os dados existentes são controversos e os critérios morfológicos disponíveis para detectar os primeiros sinais da diferenciação gonadal não são suficientemente claros.

No que tange as gônadas já diferenciadas, tanto a espermatogênese como a oogênese, em especial a foliculogênese nos Teleostei, têm recebido nos últimos anos uma atenção crescente, seja em relação à estrutura gonadal ou à dinâmica do compartimento intersticial e do epitélio germinativo (Grier e Taylor, 1998; Grier e Lo Nostro, 2000; Grier, 2000; 2002; Nóbrega, 2006; Grier *et al.*, 2007; Grier e Uribe, 2009; Grier *et al.*, 2009). Os dados até então disponíveis concentram-se nos grupos mais derivados entre os Teleostei e somente agora começam a ser encontrados para os grupos mais basais (Ostariophysi) como nos Siluriformes e Characiformes (Nóbrega, 2006) e Gymnotiformes (França, doutorado em andamento), ambos em animais sexualmente maduros.

Na última década o conceito de epitélio germinativo conforme proposto por Grier (2000), sua descoberta e aplicação, tem impulsionado e modificado significativamente o entendimento das bases celulares que regem as alterações gonadais durante o ciclo reprodutivo anual das fêmeas e machos de Teleostei. A melhor compreensão desta dinâmica anual passa, entretanto,

pelo conhecimento de como se dá a formação do epitélio em si, ao longo da morfogênese e diferenciação das gônadas, sejam elas femininas ou masculinas.

O conceito de epitélio germinativo foi desenvolvido a partir de estudos realizados com Perciformes (Grier e Lo Nostro, 2000; Grier, 2000; 2002) e pouco a pouco vem sendo aplicado aos Teleostei mais basais, como os Ostariophysii.

Entre os Ostariophysii, os estudos mais detalhados sobre a morfogênese e diferenciação gonadal referem-se aos Cypriniformes, e em sua maioria são anteriores à apreensão do significado do epitélio germinativo no processo de renovação celular que ocorre nas gônadas dos Teleostei ao longo dos ciclos reprodutivos anuais. Os Ostariophysii, um grupo de Teleostei basal compreende os Gonorynchiformes (Série: Anotoophysii), e os Cypriniformes, Siluriformes, Characiformes e Gymnotiformes (Série: Otoophysii) (Nelson, 2006). Entre os Ostariophysii, é em Cypriniformes que são encontrados os estudos mais detalhados sobre a morfogênese e diferenciação gonadal, inclusive em *Cyprinus carpio* (Parmentier e Timmermans, 1985; Winkoop e Timmermans, 1992; Winkoop *et al.*, 1992). Neste sentido, e tendo por base os relatos já existentes, tomou-se aqui o Cypriniformes, *Cyprinus carpio*, para o estudo da formação do epitélio germinativo durante a morfogênese e diferenciação gonadal, visando a construção de um possível modelo que possa ser aplicado aos Ostariophysii e quiçá aos Teleostei em geral.

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1. Os Peixes Teleostei e a Família Cyprinidae

Os peixes representam aproximadamente 50% dos vertebrados, ocupando os mais diversos ambientes aquáticos, sendo que, destes, 96% correspondem aos peixes Teleostei (Vazzoler, 1996). Os Teleostei ocorrem em uma grande diversidade de habitat, estando submetidos às diferentes condições ambientais, constituindo, assim, um grupo extremamente heterogêneo em termos de anatomia, comportamento e ecologia (Nakatani *et al.* 2001).

Dentre os Teleostei, os Euteleostei compreendem os Ostariophysii, Protacanthopterygii e Neoteleostei. A superordem Ostariophysii, considerada mais basal entre os Euteleostei, representa cerca de três quartos dos peixes de água doce do mundo, sendo a segunda maior superordem de peixes (Nelson, 2006). É constituída pelas séries Anatophysii (Gonorynchiformes) e Otophysii, a qual reúne as ordens Siluriformes, Characiformes, Gymnotiformes e Cypriniformes (Fink e Fink, 1981).

A família Cyprinidae é a maior família de peixes de água doce compreendendo mais de 2000 espécies distribuídas em aproximadamente 220 gêneros (Nelson, 2006). Distribuem-se pela América do Norte, África e Eurásia. É uma das seis famílias da ordem dos Cypriniformes, a qual apresenta grande diversidade de espécies principalmente no Sudeste Asiático. Os Cyprinidae apresentam dentes faríngeos, lábios finos sem dobras ou papilas, boca com ou sem barbilhões, maxilar superior protrátil, contornado apenas pela pré-maxila, e algumas espécies apresentam raios espinhosos na nadadeira dorsal. São espécies ovíparas podendo ou não apresentar cuidado parental (Nelson, 2006).

2. Aspectos da Biologia Reprodutiva dos Teleostei

Os peixes Teleostei, em sua maioria, são predominantemente dióicos (Nagahama, 1983), porém em algumas famílias como Serranidae, Sparidae, Labridae e Synbranchidae o hermafroditismo e a reversão sexual podem ser frequentes (Hoar, 1969; Redding e Patiño, 1993; Le Gac e Loir, 1999; Lo Nostro, 2000; Sadovy de Mitcheson e Liu, 2008).

Na maioria das espécies, a reprodução é cíclica e sazonal, determinando uma série de modificações morfo-fisiológicas em suas gônadas (Nagahama, 1983). Seu ciclo reprodutivo

ocorre em função da variação das condições ambientais, sendo a temperatura e o fotoperíodo considerados os mais potentes moduladores da atividade reprodutiva (Billard, 1986).

Os Teleostei apresentam inúmeras estratégias reprodutivas (Nagahama, 1983; Vazzoler, 1996; Nakatani *et al.*, 2001). Dentre estas, incluem-se mecanismos como a liberação dos gametas no ambiente aquático para a fertilização externa até estratégias mais complexas, como o desenvolvimento de órgãos especializados para a fertilização interna, seguida da liberação dos ovos fertilizados ou ainda gestação interna dos embriões (Le Gac e Loir, 1999, Moreira *et al.*, 2001).

Após a desova, os ovos de peixes de água doce podem ser pelágicos (Moreira *et al.*, 2001) ou adesivos (Mansour *et al.*, 2009), apresentando diferentes graus de densidade e adesividade, respectivamente (Kunz, 2004). Durante a fertilização, o espermatozóide associa-se à superfície do oócito através da micrópila; ocorre reconhecimento dos gametas, seguido da adesão e fusão de suas membranas citoplasmáticas (Hart, 1990). Através da reação cortical, na qual o conteúdo dos grânulos corticais é liberado no espaço perivitelínico, forma-se a membrana de fertilização e o ovo torna-se impermeável a um próximo espermatozóide (Gilbert, 2003).

Certas espécies apresentam cuidado parental com a prole (ver Blumer, 1982) levando à redução da predação e aumento da sobrevivência de seus descendentes (Baylis, 1981). Algumas espécies da família Anabantidae (Perciformes) constroem ninhos de bolhas, nos quais os ovos são depositados após a fertilização (Riehl e Baensch, 1991). Outras espécies não possuem cuidado parental e apenas liberam seus milhares de ovos no ambiente. Estes só terão sucesso em seu desenvolvimento caso haja condições favoráveis à sua sobrevivência (Moreira *et al.*, 2001).

3. Determinação Sexual

Nos peixes Teleostei a determinação sexual e a diferenciação gonadal são controladas por fatores genéticos, fisiológicos e comportamentais (Baroiller e D’Cotta, 2001; Devlin e Nagahama, 2002; Munoz e Warner, 2003; Perry e Grober, 2003; Frisch, 2004).

O sexo genético do embrião é determinado no momento da fertilização pela combinação dos cromossomos provenientes dos gametas feminino e masculino, sendo a determinação sexual definida como a soma dos genes responsáveis pela formação das gônadas e de suas características (Piferrer, 2001). Esses genes estão espalhados pelo genoma ou concentrados em cromossomos

responsáveis pela determinação sexual (Devlin e Nagahama, 2002). A determinação e diferenciação sexual resultam, portanto, de uma complexa rede de interconexões entre esses genes, ainda não bem esclarecida, podendo haver interações antagônicas, regulações positivas ou negativas e ainda acentuações ou atenuações da expressão gênica. Neste aspecto, o controle genético é um dos principais determinantes sexuais, mas adicionalmente fatores ambientais, como temperatura, fotoperíodo, salinidade, também possuem grande influência no processo, determinando o sexo fisiológico dos peixes (Strüssmann *et al.*, 1996; Cesar *et al.*, 2005).

A maioria dos Teleostei é dióica ou gonocorística, ou seja, apresenta indivíduos com sexos separados. Estes peixes podem apresentar dois tipos de desenvolvimento gonadal, sendo classificados como gonocorísticos indiferenciados ou diferenciados. Nos gonocorísticos indiferenciados, a gônada indiferenciada inicia seu desenvolvimento assemelhando-se a um ovário e, posteriormente, parte dos indivíduos torna-se macho enquanto a outra se mantém como fêmea. Já nos gonocorísticos diferenciados, a gônada diferencia-se diretamente em um testículo ou em um ovário (Yamamoto, 1969). As espécies gonocorísticas que apresentam intersexo são, na maior parte, gonocorísticos indiferenciados, enquanto que, dentre os gonocorísticos diferenciados, a taxa de intersexo é quase nula (Yamamoto, 1969; Sadovy de Mitcheson e Liu, 2008). Portanto, no início da embriogênese, o sexo dos peixes não está definido morfológicamente, já que não possui gônadas diferenciadas em testículos ou ovários, nem nenhuma outra característica associada ao sistema reprodutor desenvolvida. Possui apenas precursores gonadais que darão origem aos ovários ou testículos: as células germinativas primordiais e as células somáticas. Nesta etapa do desenvolvimento, as células germinativas primordiais são totipotentes, podendo dar origem a uma espermatogônia ou a uma oogônia. Em determinado momento durante o desenvolvimento gonadal, através de sinalização química, a gônada diferencia-se em ovário ou testículo. Uma vez que isso ocorra e o tecido gonadal complete sua diferenciação, o peixe torna-se fisiologicamente macho ou fêmea (Cesar *et al.*, 2005).

4. Morfogênese e Diferenciação Gonadal

Nos peixes Teleostei, assim como nos outros vertebrados, as células germinativas primordiais diferenciam-se a partir de células endodérmicas do saco vitelino, partindo de regiões

extragonadais, e migram para a crista gonadal durante um período específico do desenvolvimento embrionário (Nakamura *et al.*, 1974; Foyle, 1993; Braat *et al.*, 1999; Molyneaux e Wylie, 2004; Otani *et al.*, 2005). A crista gonadal é formada por um espessamento da mesoderme intermediária, que se projeta ventralmente para a cavidade celomática do embrião sendo delimitada pelo mesotélio ou epitélio celomático (mesoderme lateral somática da parede posterior) (Nakamura *et al.*, 1998; Devlin e Nagahama, 2002; Otani *et al.*, 2005). Ao migrarem para a crista gonadal, as células germinativas primordiais dispõem-se entre as células somáticas e proliferam por mitose constituindo o primórdio gonadal (Nakamura *et al.*, 1998; Patiño e Takashima, 1995; Braat *et al.*, 1999; Kobayashi *et al.*, 2000). Durante o período de morfogênese, portanto, o primórdio gonadal é formado; aumenta em comprimento e origina uma gônada indiferenciada (Strüssmann *et al.*, 1996; Lin *et al.*, 1997; Meijide *et al.*, 2005). Esta por sua vez, passa por uma série de modificações estruturais (Futuyma, 2002), determinando a formação de uma gônada feminina ou masculina.

Em um comparativo aos outros vertebrados, nos anfíbios a gônada apresenta dois constituintes somáticos distintos embriologicamente (Witschi, 1957): o córtex e a medula, sendo o primeiro originário do epitélio celomático (mesoderme lateral) e o segundo, do blastema mesonéfrico (mesoderme intermediária). Na diferenciação ovariana, o córtex se desenvolve, enquanto ocorre degeneração da medula. Processo inverso se dá na diferenciação testicular. Formam-se assim, a gônada feminina e a masculina (Nakamura *et al.*, 1998).

Da mesma forma, em mamíferos, as células germinativas primordiais, ao migrarem para a crista gonadal, penetram no mesênquima subjacente e são incorporadas nos cordões sexuais primários. Nos machos, esses cordões penetram na região medular da gônada, diferenciam-se em cordões seminíferos, originando os túbulos seminíferos, os quais são formados por células de Sertoli, de origem epitelial (do epitélio celomático), e espermatogônias. Esses cordões perdem sua conexão com o epitélio na região cortical, pelo desenvolvimento de uma túnica albugínea. Os túbulos seminíferos encontram-se separados do mesênquima (mesoderme intermediária do blastema mesonéfrico), que dá origem às células intersticiais, incluindo a célula de Leydig (Larsen, 2001; Carlson, 2004). No ovário em formação, os cordões sexuais primários também penetram na medula, porém sofrem degeneração. A seguir são formados novos cordões na região cortical, cordões sexuais secundários, que se estendem a partir do epitélio ovariano para o

mesênquima subjacente. À medida que crescem, os cordões corticais incorporam as células germinativas primordiais. Posteriormente, esses cordões se rompem formando agrupamentos isolados de células – os folículos primordiais – cada qual formado por uma oogônia, rodeada por células foliculares derivadas do epitélio. Do estroma ovariano (originário a partir da mesoderme intermediária), diferenciam-se as células da teca (Larsen, 2001; Carlson, 2004).

Já na maioria dos Teleostei, a diferenciação gonadal inicia-se com proliferação e diferenciação de células somáticas e germinativas (Devlin e Nagahama, 2002), sem que ocorra degeneração tecidual. Casos isolados como em *Siganus guttatus* (Komatsu *et al.*, 2006) podem ocorrer, no qual há degeneração de parte do tecido gonadal para formação da cavidade ovariana e do ducto testicular. Em peixes gonocorísticos indiferenciados, como *Danio rerio*, apoptoses podem também ser frequentes, em decorrência do processo de remodelação gonadal para que animais geneticamente machos desenvolvam um testículo definitivo a partir de um tecido ovariano (Uchida *et al.*, 2002). No entanto, ao contrário dos outros vertebrados, não há nenhuma indicação clara da existência de tecido medular nas gônadas de Teleostei (Guraya, 1994), o qual poderia sofrer processos de desenvolvimento ou degeneração para formação de determinada gônada masculina ou feminina. Dessa forma, a gônada dos Teleostei diferencia-se em ovário ou testículo, a partir somente de uma reorganização celular no tecido gonadal, como é o caso de *Cyprinus carpio* que, sendo uma espécie gonocorística diferenciada, apresenta desenvolvimento e diferenciação gonadal direta em um testículo ou ovário (Parmentier e Timmermans 1985).

Assim, a diferenciação gonadal nos Teleostei inclui mudanças tanto nas células somáticas, quanto nas células germinativas (Strüssmann e Nakamura, 2002). Ocorrem desde divisões mitóticas de oogônias ou espermatogônias a partir das células germinativas primordiais (García-Alonso *et al.*, 2009), até mudanças estruturais, como proliferação mitótica das células somáticas resultando na formação da cavidade ovariana, ductos eferentes, ductos espermáticos, lóbulos testiculares originando testículos ou ovários (Patiño e Takashima, 1995; Nakamura *et al.*, 1998; Strüssmann e Nakamura, 2002) (Figuras I e II).

Algumas características histológicas como intensa proliferação mitótica das células germinativas, entrada das células germinativas em meiose e reorganização das células somáticas formando uma cavidade ovariana indicam o início da diferenciação gonadal feminina (Nakamura *et al.*, 1998; Strüssmann e Nakamura, 2002; García-Alonso *et al.*, 2009).

Já na diferenciação gonadal masculina, um dos primeiros sinais histológicos é o início da formação do ducto eferente e/ou do ducto espermático (Nakamura *et al.*, 1998; Strüssmann e Nakamura, 2002), seguido pela formação de vasos sanguíneos próximos aos ductos eferentes e espermáticos, e formação dos lóbulos testiculares (Patiño e Takashima, 1995; Nakamura *et al.*, 1998; Strüssmann e Nakamura, 2002).

Em etapas mais avançadas da diferenciação ovariana, as oogônias transformam-se em oócitos, iniciando a divisão meiótica e células somáticas presentes nas gônadas diferenciam-se em células pré-foliculares. No estroma ovariano, células mesenquimais diferenciam-se em células pré-tecais. No testículo, as células somáticas diferenciam-se nas células de Sertoli, que envolvem a espermatogônia. No interstício notam-se fibroblastos, células mióides, fibrilas de colágeno, granulócitos e capilares sanguíneos (Meijide *et al.*, 2005).

Os pressupostos testículos geralmente permanecem indiferenciados por um período mais prolongado do que os ovários. Cronologicamente, a oogênese inicia-se antes da espermatogênese, em indivíduos de uma mesma espécie (Nakamura *et al.*, 1998; Strüssmann e Nakamura, 2002). Esse atraso da diferenciação testicular em relação à ovariana parece ser um fenômeno comum na maioria dos Teleostei (Nakamura *et al.*, 1998; Meijide *et al.*, 2005). Porém, algumas espécies mostram uma diferenciação simultânea entre machos e fêmeas, como a tilápia *Oreochromis mossambicus* (Nakamura e Takahashi, 1973) e *O. niloticus* (Nakamura e Nagahama, 1989), não existindo nenhum caso na literatura que relate a precedência masculina (Strüssmann e Nakamura, 2002).

Durante a diferenciação gonadal, a transição de oogônia em oócito ou de espermatogônia em espermatócito se caracteriza por uma mudança distinta principalmente no núcleo da célula, que é percebida pela compactação da cromatina, indicando o início da meiose e posterior detecção de complexos sinaptonêmicos em oócitos ou espermatócitos em zigóteno e paquíteno (Meijide *et al.*, 2005). Além desses atributos, mitocôndrias características de células germinativas primordiais deixam de ser esféricas, tornando-se alongadas e eletron-densas. As núages, material eletron-denso no citoplasma, próximo ao envoltório nuclear, constituem também um componente característico das células germinativas primordiais (Edy, 1975), sendo detectadas tanto nas oogônias quanto nas espermatogônias, podendo estar em menor quantidade nas outras células germinativas em processo de diferenciação como nos oócitos e espermatócitos (Satoh, 1974:

Bruslé e Bruslé, 1978; Hamaguchi, 1982, 1992; Billard, 1984; Flores e Burns, 1993; Grandi e Colombo, 1997; Quagio-Grassiotto e Carvalho, 1999; Grier, 2000; Guimarães e Quagio-Grassiotto, 2001; Lo Nostro *et al.*, 2003; Meijide *et al.* 2005).

5. O Epitélio Germinativo

O epitélio germinativo é definido a partir das mesmas características histológicas que determinam qualquer outro tipo de epitélio somático (Grier, 2000, 2002; Grier e Lo Nostro, 2000), ou seja, deve delimitar uma cavidade ou superfície do corpo estando, obrigatoriamente, voltado para uma luz; apresentar complexos juncionais, que conectem lateralmente uma célula epitelial à outra; estar apoiado sobre uma membrana basal (lâmina basal + fibras reticulares) e ser avascular (Grier, 2000, 2002; Grier e Lo Nostro, 2000). Porém o epitélio germinativo apresenta uma característica única que o diferencia dos demais epitélios: a presença de células germinativas, garantindo a produção contínua dos gametas (Grier, 2000, 2002; Grier e Lo Nostro, 2000). Deste modo, o epitélio germinativo nos Teleostei é constituído por células somáticas e células germinativas, que revestem os túbulos testiculares e as lamelas ovígeras nas gônadas masculina e feminina, respectivamente, delimitando o lúmen testicular e ovariano (Grier e Taylor, 1998; Grier e Lo Nostro, 2000; Grier, 2000, 2002; Parenti e Grier, 2004; Grier *et al.*, 2007; Grier e Uribe, 2009).

6. Estrutura Ovariana

Na maioria dos Teleósteos, os ovários são órgãos pares, saculiformes, localizados no sentido longitudinal e dorsalmente à cavidade celomática, na qual estão presos através do mesovário. Porém, em alguns grupos, durante o desenvolvimento gonadal, os ovários podem fundir-se em um órgão único (Strüssmann e Nakamura, 2002), como na maioria dos Teleostei vivíparos, por exemplo, os Poecilídeos (Grier *et al.*, 2009), ou ainda, um dos ovários pode degenerar. Em ambos os casos somente um ovário torna-se funcional (Nagahama, 1983). Em *Arapaima gigas* (Osteoglossiformes), por exemplo, somente o ovário esquerdo mostra-se desenvolvido, enquanto que o direito, quando presente, é atrofiado e não funcional, produzindo apenas oócitos pré-vitelogênicos (Godinho *et al.*, 2005).

Há dois tipos de organização ovariana: Cisto-ovariana e Gymno-ovariana. Na organização do tipo Cisto-ovariana (Hoar, 1969), os ovários são órgãos cavitários e apresentam o compartimento germinativo em forma de lamelas, que se projetam a partir da cápsula em direção à luz do órgão. Neste caso, a cavidade ovariana é contínua com os gonoductos (Grier *et al.*, 2007) que se unem caudalmente e desembocam na papila urogenital (Nagahama, 1983; Selman e Wallace, 1986; Connaughton e Aida, 1998; Helfman *et al.*, 2000; Grier *et al.*, 2007). Já na organização do tipo Gymno-ovariana, como nos Anguiliformes (Colombo *et al.*, 1984) e Salmoniformes (Grier *et al.*, 2007) os ovários apresentam lamelas ovígeras expostas diretamente para cavidade celomática. Dessa forma, durante a oocitação, os oócitos maduros são liberados diretamente na cavidade celomática, podendo ainda manter-se estocados por muito tempo antes da desova (Helfman *et al.*, 2000).

Os ovários possuem uma estrutura geral básica, com o compartimento germinativo em forma de lamelas que se projetam a partir da cápsula em direção à luz do órgão (Nagahama, 1983; Selman e Wallace, 1986; Connaughton e Aida, 1998; Helfman *et al.*, 2000). Margeando as lamelas ovígeras e conseqüentemente delimitando o lúmen ovariano, encontra-se o epitélio germinativo (Figura III). Este é composto por dois tipos celulares: as células somáticas epiteliais e as células germinativas - as oogônias, que se encontram espalhadas entre as células somáticas epiteliais. As células epiteliais, unidas através de desmossomos e junções de oclusão, estão apoiadas sobre uma membrana basal (Grier, 2000).

Após a diferenciação sexual e no início de cada ciclo reprodutivo, as células-tronco presentes no epitélio germinativo feminino dividem-se várias vezes por mitose (Tokarz, 1978). Assim se auto-renovam e/ou diferenciam-se em oogônias que se reúnem em ninhos. Nos ninhos, as oogônias que se comprometem com a foliculogênese entram em meiose dando origem aos oócitos que avançam para a prófase da primeira divisão e estacionam em diplóteno (Grier, 2000; Le Menn *et al.*, 2007; Grier *et al.*, 2009). Ainda no interior dos ninhos, o oócito dá início ao seu desenvolvimento. Células epiteliais oriundas do epitélio germinativo associam-se aos oócitos em diplóteno. Agora como células pré-foliculares interpenetram progressivamente os ninhos, envolvendo e individualizando cada oócito; sintetizam a membrana basal que progressivamente envolve o folículo ovariano em formação, o qual permanece unido ao epitélio germinativo (Grier, 2000; Grier, 2002; Le Menn *et al.*, 2007; Grier *et al.*, 2009).

A partir do conjuntivo circundante, células pré-tecais dispõem-se ao redor do folículo em formação, sobre a membrana basal recém sintetizada, e dão origem às células da teca interna e externa. Completa-se, assim a formação do complexo folicular, constituído pelo oócito diplotênico, envolto seqüencialmente pelo epitélio folicular apoiado na membrana basal e por duas camadas de células da teca (Tokarz, 1978; Wallace e Selman, 1990; Grier, 2000; Grier, 2002; Grier e Lo Nostro, 2000; Le Menn *et al.*, 2007; Grier *et al.*, 2009).

Uma vez que o folículo ovariano é formado, ou seja, que o processo de foliculogênese se completa, o oócito inicia efetivamente seu crescimento primário (Grier *et al.*, 2009), conhecido também por crescimento pré-vitelogênico (Wallace e Selman, 1981; Nagahama, 1983; Selman e Wallace, 1989).

No núcleo, os organizadores nucleolares são amplificados, destacam-se dos cromossomos, tornam-se circulares e dão origem a múltiplos nucléolos (Grier *et al.*, 2009). Posteriormente, esses oócitos tornam-se cada vez mais volumosos (Wallace e Selman, 1981; Nagahama, 1983; Guimarães e Quagio-Grassiotto, 2001; Patiño e Sullivan, 2002) e seus nucléolos migram para a periferia nuclear, sendo identificados como oócitos perinucleolares (Le Menn *et al.*, 2007; Grier *et al.*, 2009). Uma grande quantidade de RNA heterogêneo e RNA ribossomal são sintetizados (Mazabrand *et al.*, 1975; Guraya, 1986; Wallace e Selman, 1990; Tyler e Sumpter, 1996; Francolini *et al.*, 2003). Os RNAs associam-se a proteínas e são transferidos para o citoplasma onde dão origem a corpos densos conhecidos como “nüages” (Edy, 1975; Clérot, 1976; Toury *et al.*, 1977).

Simultaneamente os oócitos em crescimento primário, apresentam uma mudança gradual na basofilia citoplasmática, que se torna cada vez mais intensa devido ao acúmulo de RNAs em seu citoplasma (Selman e Wallace, 1989; Tyler e Sumpter, 1996).

Nesta fase, os cromossomos plumosos tornam-se visíveis (Nagahama, 1983; Selman e Wallace, 1989); organiza-se o núcleo de vitelo, ou corpúsculo de Balbiani, um aglomerado de organelas membranosas que se localizam na posição juxtenuclear (Hubbard, 1894 apud Selman e Wallace, 1989, Munõz *et al.*, 2001; Meijide *et al.*, 2005); tem início a formação do envoltório oocitário, consideradas a zona pelúcida, a camada de células foliculares e a membrana basal (Anderson, 1967, Quagio-Grassiotto e Guimarães, 2003) e a diferenciação do envoltório

folicular, consideradas a membrana basal e os componentes da teca (Quagio-Grassiotto e Guimarães, 2003).

Neste período, a proliferação das organelas membranosas é intensa. Inicialmente dispostas ao redor do núcleo, aumentam em número e extensão, espalham-se pelo citoplasma e atingem a periferia do oócito. Glicoproteínas são produzidas e incorporadas aos alvéolos corticais recém-formados na periferia do oócito (Patiño e Sullivan, 2002; Le Menn *et al.*, 2007; Grier *et al.*, 2009). Os alvéolos corticais formam-se a partir de depressões do oolema, tornam-se progressivamente maiores e constituem as grandes vesículas que margeiam a superfície oocitária. Na fertilização, durante a reação cortical o conteúdo dos alvéolos é liberado no espaço perivitelínico, entre a superfície do oócito e o envelope vitelínico (Anderson, 1968; Wallace e Selman, 1981; Nagahama, 1983; Verma e Thakur, 1988; Selman e Wallace, 1989; Ohta *et al.*, 1990; West, 1990; Patiño e Sullivan, 2002; Le Menn *et al.*, 2007; Grier *et al.*, 2009).

O aparecimento dos alvéolos corticais marca a etapa final do crescimento primário dos oócitos (Patiño e Sullivan, 2002; Le Menn *et al.*, 2007; Grier *et al.*, 2009). A partir daí os oócitos estarão prontos para responder aos estímulos que conduzem à incorporação de vitelo, maturação e posterior ovulação (Le Menn *et al.*, 2007; Grier *et al.*, 2009).

7. Estrutura Testicular

Na maioria dos Teleostei, os testículos são órgãos pares, alongados, localizados longitudinal e dorsalmente à cavidade celomática. Podem variar de simples bolsas alongadas que convergem para a papila urogenital a órgãos foliáceos com função predominantemente espermatogênica, contendo regiões diferenciadas com função secretora ou armazenadora de esperma (Loir *et al.*, 1989; Le Gac e Loir, 1999).

A estrutura testicular nos Teleostei é classificada de acordo com a forma e organização do compartimento germinativo (Grier, 1993; Grier e Taylor, 1998; Parenti e Grier, 2004). Há, portanto, dois tipos de organização testicular: Tubular Anastomosado e Lobular (Grier, 1993). Em ambos os tipos, o ducto espermático geralmente tem posição dorsal (Schulz, 2003).

No testículo tubular anastomosado, o compartimento germinativo é formado por alças e túbulos que se interconectam, formando anastomoses, desde a periferia até a região do ducto testicular (Grier, 1993; Grier e Uribe, 2009). Neste, as espermatogônias encontram-se distribuídas

por todo testículo. Esse padrão testicular ocorre principalmente nos Teleostei mais basais, como por exemplo, nos Ostariophysi (Grier, 1993; Parenti e Grier, 2004; Grier e Uribe, 2009).

Já no testículo lobular, o compartimento germinativo, em formato digitiforme, termina em fundo cego na periferia testicular, ocorrendo nos Neoteleostei (Atherinomorpha e Percomorpha) (Grier, 1993; Parenti e Grier, 2004; Grier e Uribe, 2009). Neste padrão é possível distinguir dois tipos de organização, de acordo com a distribuição das espermatogônias ao longo dos lóbulos – lobular restrito e lobular irrestrito (Grier, 1993; Parenti e Grier, 2004; Grier e Uribe, 2009).

No testículo lobular restrito, característico dos Atherinomorpha, as espermatogônias estão confinadas na porção distal dos lóbulos, formando cistos. Durante a espermatogênese, os cistos de células germinativas em diferenciação são deslocados ao longo dos lóbulos. Ao final da espermiogênese, os cistos se abrem e os espermatozóides são liberados no ducto eferente (Grier *et al.*, 1980; Grier, 1993; Loir *et al.*, 1995; Pudney, 1995; Grier e Uribe, 2009). No testículo lobular irrestrito, presente nos Percomorpha, as espermatogônias estão distribuídas ao longo de todo lóbulo (Grier, 1993; Parenti e Grier, 2004; Grier e Uribe, 2009).

A organização básica dos testículos é comum a todos os Teleostei e aos demais vertebrados. Este órgão tem função espermatogênica e esteroidogênica, sendo dividido em dois compartimentos: o compartimento intersticial e o compartimento germinativo, os quais se encontram separados por uma membrana basal (Grier, 1992, 1993; Grier e Lo Nostro, 2000; Loir *et al.*, 1995; Pudney, 1996; Grier e Uribe, 2009).

O compartimento intersticial é constituído por vasos sanguíneos, células mióides, fibras nervosas e tecido conjuntivo (Grier *et al.*, 1989; Loir, 1990; Pudney, 1996; Loir *et al.*, 1995), além das células de Leydig que possuem função esteroidogênica (Loir *et al.*, 1989; Loir, 1990; Pudney, 1996; Callard, 1996). A produção de hormônios esteróides é importante para a diferenciação sexual, desenvolvimento das características sexuais secundárias, comportamento sexual e regulação da espermatogênese (Weltzien *et al.*, 2004).

Já o compartimento germinativo, na forma de lóbulos ou túbulos anastomosados, determina a presença de cavidades no interior do testículo, que são revestidas pelo epitélio germinativo (Grier, 1993).

O epitélio germinativo masculino (Figura IV) é composto, assim como o epitélio germinativo feminino, por dois tipos celulares: as células germinativas e as células somáticas

(células de Sertoli), as quais estão unidas por complexos juncionais e apoiadas sobre a membrana basal (Grier, 1993).

Células-tronco da linhagem espermatogonial, presentes nos testículos, dividem-se e auto renovam-se, dando origem às espermatogônias destinadas à espermatogênese (Schulz e Miura, 2002; Schulz, 2003). Cada espermatogônia é envolvida individualmente por processos citoplasmáticos das células de Sertoli formando um cisto, enquanto as células-tronco espermatogoniais permanecem em contato com a membrana basal. Em um mesmo cisto, o desenvolvimento celular é sincrônico. Dessa forma, a produção dos gametas masculinos ocorre no interior dos cistos, no epitélio germinativo que reveste o compartimento seminífero testicular (Grier, 1981; 2002; Billard, 1986; Pudney, 1995; Guraya, 2001; Grier e Uribe, 2009).

No interior de cada cisto, ocorre proliferação da espermatogônia primária, originando espermatogônias secundárias. Estas entram em meiose e dão origem aos espermatócitos primários. A meiose progride originando os espermatócitos secundários. Com o término da meiose ocorre formação das espermátides e através da espermiogênese, ainda no interior dos cistos, as espermátides haplóides completam sua diferenciação (Grier, 1981, 1992; Billard, 1986; Selman e Wallace, 1986; Grier e Uribe, 2009).

Durante as subsequentes divisões celulares as citocineses são incompletas e as células germinativas permanecem interligadas por pontes citoplasmáticas. Ao final da espermiogênese as pontes citoplasmáticas e o citoplasma residual são eliminados. Os cistos abrem-se e os espermatozóides são liberados para o lúmen testicular (Grier, 1981; Billard, 1986; Selman e Wallace, 1986). Este tipo de espermiogênese é dita como cística, na qual a finalização do processo de diferenciação das espermátides leva à abertura dos cistos e liberação dos espermatozóides na luz do compartimento germinativo (Grier, 1981, 1992; Billard, 1986; Selman e Wallace, 1986; Grier e Uribe, 2009). Porém, em alguns animais, a espermiogênese é do tipo semi-cística, com células germinativas sendo liberadas dos cistos ainda em meiose ou no final da sua segunda divisão. Nesse caso a espermiogênese completa-se no lúmen do compartimento seminífero (Lahnsteiner e Patzner, 1990; Munõz *et al.*, 2002; Burns *et al.*, 2009).

Conforme a espécie, os espermatozóides podem ser estocados na luz do compartimento seminífero ou no ducto espermático. Nas espécies inseminadoras, grupos de espermatozóides podem ser envoltos por produtos de secreção das células de Sertoli - os espermatóforos - e

transferidos para o aparelho reprodutor das fêmeas onde permanecem até o momento da fertilização (Constantz, 1989). Os espermatozóides produzidos nos testículos estão morfológicamente formados, porém alterações fisiológicas durante sua passagem pelo gonoducto são necessárias para aquisição da capacidade fecundante e maior motilidade. Esse processo conhecido como capacitação, possibilita a maturação dos espermatozóides e é desencadeado pelo aumento do pH do líquido seminal e por altas concentrações de HCO_3^- no gonoducto (Miura e Miura, 2003).

Já as células de Sertoli respondem pela sustentação e nutrição das células germinativas em desenvolvimento no interior dos cistos e pela fagocitose dos resíduos citoplasmáticos da espermiogênese. Controlam a composição do fluido seminal e ao final de cada ciclo reprodutivo fagocitam os espermatozóides residuais (Billard, 1970; Grier, 1993; Pudney, 1993). No epitélio germinativo, as células de Sertoli unem-se através de complexos juncionais, inúmeros desmossomos e formam a barreira hemato-testicular. Propiciam também um ambiente estrutural e molecular favorável para o desenvolvimento da espermatogênese (Grier, 1993; Pudney, 1993; Loir *et al.*, 1995), sendo responsáveis pela secreção de vários fatores de crescimento que atuam na proliferação e/ou diferenciação das células germinativas (Miura, 1998; Le Gac e Loir, 1999).

8. O Modelo Experimental: *Cyprinus carpio*

Cyprinus carpio, pertencente à família Cyprinidae, da ordem Cypriniformes, é conhecida popularmente como carpa comum. É uma espécie onívora que se alimenta de insetos aquáticos, crustáceos, anelídeos, moluscos, sementes, plantas aquáticas, algas e principalmente de larvas que vivem nos sedimentos de lagos e rios (Scott e Crossman, 1973). Originária da Ásia (Robins *et al.*, 1991), onde é cultivada há mais de 3000 anos, a carpa comum foi introduzida no Brasil, através de sistemas de criação, em 1882 (Nomura, 1984) e encontra-se hoje, assim como outras variedades de carpas existentes, amplamente distribuída no mundo inteiro, pela presença de algumas características da espécie como a rusticidade, rápido crescimento, fácil regime alimentar, fácil adaptação e propagação natural em tanques e viveiros (Graeff e Pruner, 2000). São animais bastante resistentes, suportando temperaturas entre 1°C a 40°C. As carpas geralmente atingem maturidade sexual após um ano de vida, quando apresentam, em média, um quilo. No Brasil, a reprodução ocorre entre os meses de agosto e outubro, podendo se estender até dezembro

dependendo das condições climáticas (Galli e Torloni, 1992). Todas as variedades de carpas apresentam valor econômico, sendo utilizadas em larga escala tanto nas chamadas pescas esportivas como no aquarismo (espécies ornamentais). Tais características tornam as carpas um interessante modelo biológico, bastante utilizado como modelo experimental nas mais diversas áreas da biologia.

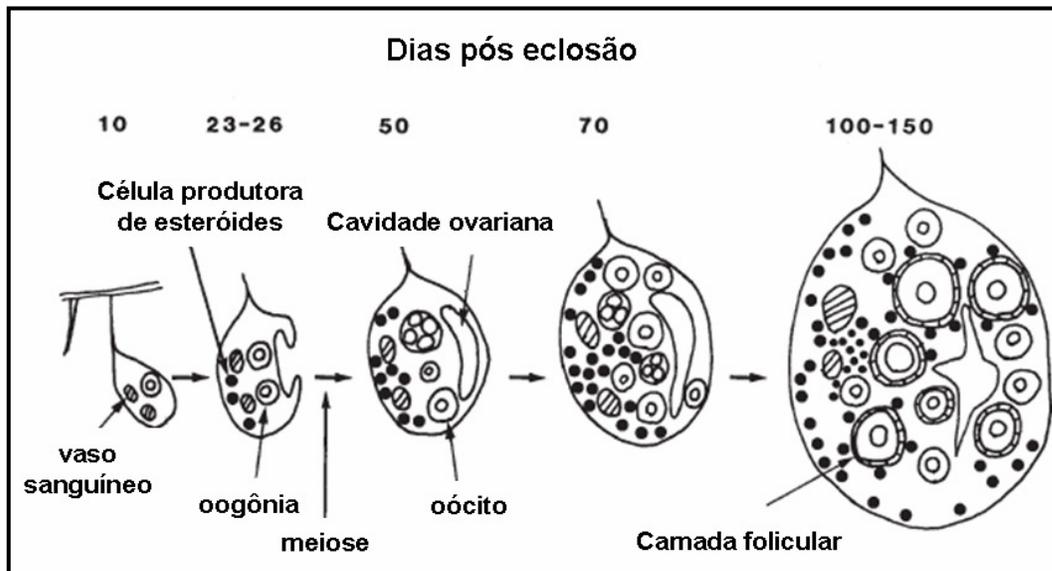


Figura I: Esquema da diferenciação ovariana em *Oreochromis niloticus* (traduzido de Nakamura et al., 1998).

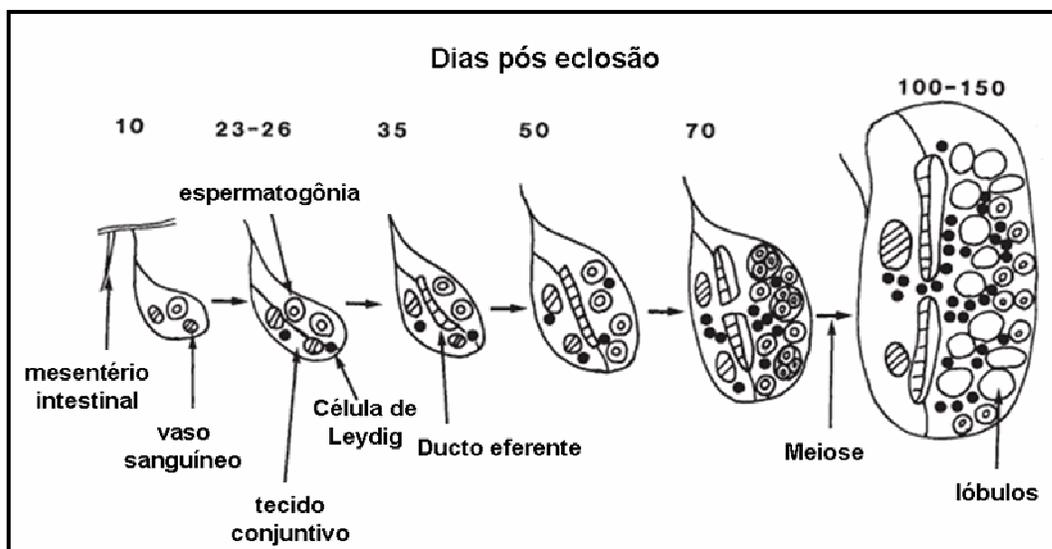


Figura II: Esquema da diferenciação testicular em *Oreochromis niloticus* (traduzido de Nakamura et al., 1998).

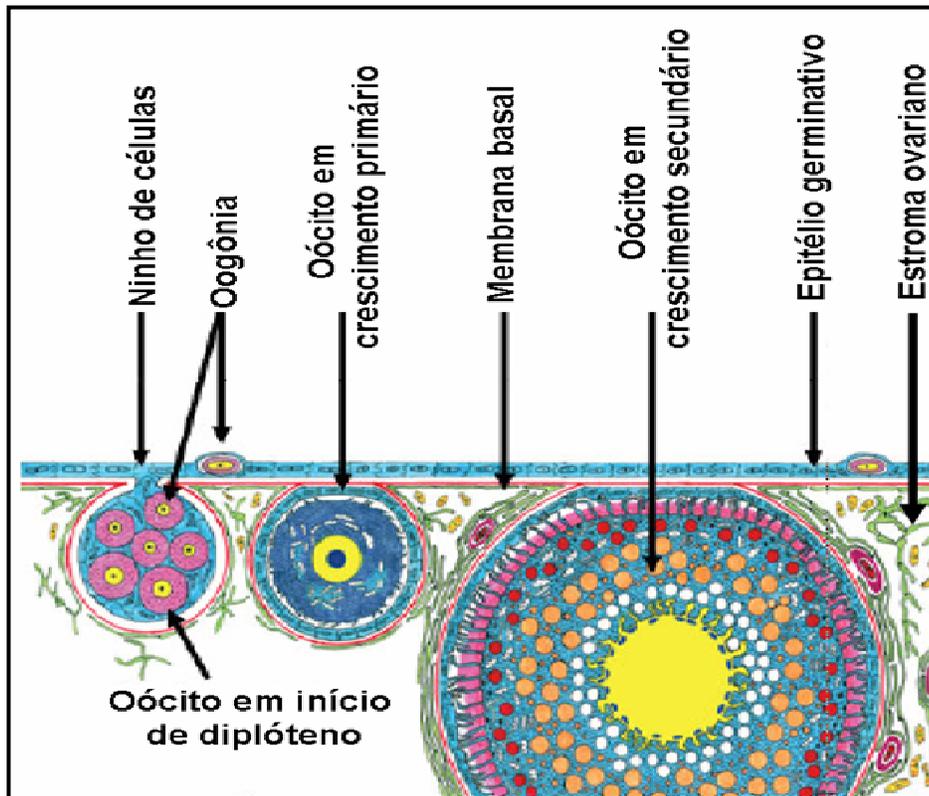


Figura III: Esquema do epitélio germinativo feminino (modificado de Grier, 2008).

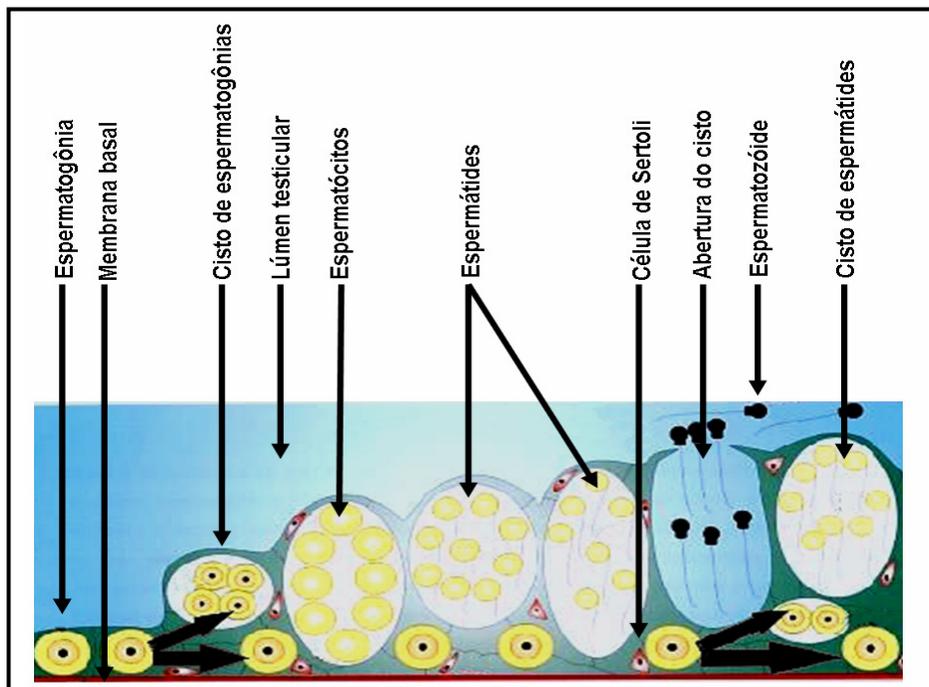


Figura IV: Esquema do epitélio germinativo masculino (modificado de Nóbrega, 2006).

OBJETIVOS

Até o presente momento parece não haver nenhum estudo sistematizado considerando o conceito de epitélio germinativo em Cypriniformes (Ostariophysi), seja ao longo do ciclo reprodutivo ou durante a diferenciação gonadal. Dessa forma, tomou-se aqui, como modelo experimental, a espécie *Cyprinus carpio*, como representante da ordem Cypriniformes, para descrição do processo de formação do epitélio germinativo durante a morfogênese e diferenciação gonadal, considerando a definição do epitélio germinativo proposto por Grier (2000). Assim, trabalhando com larvas e alevinos de *Cyprinus carpio*, estudou-se:

(1) à Microscopia de Luz, o desenvolvimento e formação da estrutura gonadal durante o período de morfogênese e de diferenciação gonadal;

(2) à Microscopia de Luz, a formação de estruturas gonadais, tais como formação do compartimento intersticial, túbulos seminíferos e ductos espermáticos nas gônadas masculinas, e formação das lamelas ovígeras, estroma e lúmen ovariano e nas gônadas femininas;

(3) à Microscopia de Luz e à Microscopia Eletrônica de Transmissão, o desenvolvimento e diferenciação das células germinativas e somáticas epiteliais, bem como das células mesenquimais, durante o período de diferenciação gonadal;

(4) à Microscopia de Luz e à Microscopia Eletrônica de Transmissão a formação e estabelecimento do epitélio germinativo masculino e feminino, com especial atenção à formação da membrana basal.

MATERIAL E MÉTODOS

1. Os Animais

Adultos de *Cyprinus carpio* foram adquiridos na Piscicultura Santa Cândida (22° 07'05''S, 47°28'37''W), município de Santa Cruz da Conceição-SP e transferidos para o laboratório da própria piscicultura para que a reprodução, através de indução hormonal, fosse realizada. Os ovos e larvas obtidos foram mantidos em incubadoras com água corrente proveniente da nascente do Córrego do Arouca (com temperatura ambiente em torno de 28°C e fotoperíodo natural) até completarem o desenvolvimento larval, sendo coletados periodicamente desde o momento da fecundação. Os espécimens (Figura V) foram anestesiados por imersão em solução aquosa de benzocaína, dissolvida em álcool absoluto na dose de 1mg⁻¹ e transferidos para diferentes soluções fixadoras, específicas para cada metodologia. Após esse período, os alevinos (Figura V) - jovens sexualmente imaturos de *Cyprinus carpio* - foram mantidos em tanques de cimento, com 1600 litros (200x80x100cm), pertencentes à Piscicultura Santa Cândida, e coletados mensalmente durante o período de um ano até completarem sua diferenciação gonadal e formação total das gônadas.

Os alevinos também foram anestesiados por imersão em solução aquosa de benzocaína, e seu peso e comprimento mensurados para acompanhamento do crescimento dos animais. Os órgãos presentes na cavidade celomática foram expostos através de uma secção ventral do corpo do animal e suas gônadas foram removidas, pesadas e imersas em solução fixadora apropriada para cada metodologia.

As coletas foram realizadas periodicamente, de acordo com o desenvolvimento dos animais, iniciando-se no momento da fecundação, considerado como zero hora. A partir deste período foram realizadas coletas sucessivas nos intervalos de 15 minutos, 30 minutos, 1 hora, 2 horas, 4 horas, 6 horas, 12 horas, 18 horas, 20 horas, 24 horas, 26 horas, 28 horas, 30 horas, 33 horas, 42 horas, 48 horas, 53 horas, 67 horas, 72 horas, 77 horas e 96 horas. Durante os 18 primeiros dias, foram realizadas coletas de três em três dias. Após esse período coletou-se durante o mês seguinte de cinco em cinco dias, passando para coletas semanais (durante dois meses) e posteriores coletas de 10 em 10 dias (durante mais os dois meses seguintes). Do sexto

ao oitavo mês, as coletas foram realizadas em intervalos periódicos de 15 dias, tornando-se mensais até o completo período de um ano.

Iniciou-se a alimentação das larvas no sétimo dia pós-fertilização (terceiro dia pós-eclosão), período correspondente à total absorção do saco vitelínico. As larvas foram alimentadas com ração em pó, a qual foi substituída gradativamente por pélets (alimento extrusado) com diferentes diâmetros, de acordo com o tamanho dos alevinos (Tabela I). A ração da marca Laguna Peixes – Ocialis – Evalidis[®] utilizada em todas as etapas de crescimento dos animais não apresenta qualquer tipo de hormônio em sua composição.

2. Reprodução por Indução Hormonal

Fêmeas e machos adultos de *Cyprinus carpio* foram selecionados para a reprodução induzida. Os espécimens receberam extrato bruto de hipófise de carpa diluído em solução salina de cloreto de sódio 0,9% na proporção 1mg de glândula/0,1ml de solução, centrifugado por 5 minutos (4000rpm). As fêmeas receberam duas doses de hormônio com intervalo de 8 horas: na primeira dose aplicou-se 0,5mg de extrato de hipófise/Kg e na segunda aplicação, 3mg de extrato de hipófise/kg. Os machos receberam uma única dose de 2mg de extrato de hipófise/kg, no momento da segunda aplicação das fêmeas (método padronizado pela Piscicultura Santa Cândida para diferentes espécies de peixes). As doses hormonais foram aplicadas através de injeção intraperitoneal, na base da nadadeira peitoral. A partir da segunda dose hormonal a temperatura foi medida a cada hora para o cálculo da hora-grau (somatória da temperatura a cada hora). A hora-grau foi utilizada somente para a determinação do momento aproximado da desova, a qual ocorreu aproximadamente entre 220 e 280 horas-grau. Os animais foram anestesiados em benzocaína e fez-se massagem abdominal em fêmeas e machos para a extrusão de oócitos e espermatozóides, respectivamente. Os oócitos desovados foram coletados diretamente em uma bacia plástica e em seguida o sêmen coletado adicionado aos oócitos para a fecundação. Após a adição do sêmen, os ovos foram revolvidos com o auxílio de uma pena durante 5 minutos, assegurando uma boa fecundação. Os ovos adesivos foram colocados sobre uma peneira circular e giratória em incubadoras com água corrente. Posteriormente à fase larval, os juvenis foram transferidos para tanques de criação (ver Figura VI).

3. Preparação do Material para a Microscopia de Luz

Para microscopia de luz, as gônadas dos animais, bem como larvas e juvenis, foram fixadas em Karnovsky - solução de glutaraldeído 2% e paraformaldeído 4% em tampão Sorensen (0,1M a pH 7,2) por pelo menos 24 horas. Após fixação, as amostras foram fotografadas e o material desidratado em uma série crescente de álcool (70% por 4 horas; 95% por 4 horas), infiltrados e incluídos em historesina Leica (metacrilato glicol).

Cortes histológicos seriados longitudinais, transversais e parassagitais dos espécimens em período de desenvolvimento larval e juvenil, e das gônadas de alevinos, com 3µm de espessura, foram obtidos em micrótomo equipado com navalhas de vidro e receberam as seguintes colorações: Hematoxilina Férrica/Eosina; Azul de Toluidina-Bórax; e Ácido Periódico de Schiff + Hematoxilina Férrica + Metanil Yellow (Quintero-Hunter *et al.*, 1991) utilizadas para análises histológicas e detecção de substâncias de diferentes composições químicas.

A documentação do material foi realizada através de um microscópio acoplado a uma câmera JVC e um computador com o programa Leica QWIN, pertencente ao Laboratório de Análise de Imagens do Departamento de Morfologia do Instituto de Biociências, UNESP, Campus de Botucatu-SP.

Todos os procedimentos para o processamento do material para microscopia de luz foram realizados no Laboratório de Biologia da Reprodução de Peixes Neotropicais – Departamento de Morfologia do Instituto de Biociências, UNESP, Campus de Botucatu-SP.

4. Método de Reticulina

A reticulina ou fibra reticular é um tipo de fibra colágena composta de colágeno tipo III (Strum *et al.*, 2007). Essas fibras, juntas com a lâmina basal, formam a membrana basal, na qual o epitélio encontra-se apoiado (Junqueira e Carneiro, 1999). As fibras reticulares são argirófilas, apresentando alta afinidade por sais de prata (Junqueira e Carneiro, 1999). Dessa forma, o Método de Reticulina, que envolve impregnação por prata, foi empregado para que a formação da membrana basal ao longo do desenvolvimento gonadal pudesse ser acompanhada.

A técnica se dá pela sensibilização do tecido através de um agente oxidante, o permanganato de potássio, que causa redução dos grupos aldeídos associados à reticulina. Posteriormente ocorre deposição de íons de prata carregados positivamente sobre os grupos

aldeídos e finalmente redução de íons de prata pela ação do formol (Puchtler e Waldrop, 1978; Vidal, 1988), resultando numa coloração escura (preto-acastanhado). Como resultado, regiões que apresentam reticulina coram-se em preto acastanhado. Para obter esses resultados, cortes histológicos preparados para microscopia de luz foram submetidos ao Método de Reticulina.

Os cortes histológicos foram tratados com permanganato de potássio 1% por 3 minutos e lavados rapidamente em água destilada, colocando-se na sequência ácido oxálico por 2 minutos. Após nova lavagem em água destilada, tratou-se o material com alúmen de ferro 1% por 3 minutos e realizou-se uma nova lavagem. O material foi então submetido ao tratamento com prata amoniacal por 3 minutos e lavado com água destilada em abundância para retirar todo o excesso de prata. Finalmente o material foi tratado com formol 10% por 3 minutos e lavado em água destilada. Após desidratação em estufa, as lâminas foram montadas.

5. Preparação do Material para a Microscopia Eletrônica de Transmissão

Fragments de gônadas dos alevinos foram fixados em solução de glutaraldeído 2% e paraformaldeído 4% em tampão Sorensen (0,1M a pH 7,2) por pelo menos 24 horas. O material foi pós-fixado por 2h no escuro em 1% de tetróxido de ósmio no mesmo tampão, contrastado em bloco com solução aquosa de 5% de uranila por 2 horas, desidratado em acetona e embebido em araldite. Após seleção dos cortes semi-finos, o material foi seccionado em ultramicrótomo equipado com navalha de diamante, contrastado com solução saturada de acetato de uranila em 50% de álcool e citrato de chumbo e documentado em microscópio eletrônico de transmissão Phillips – CM 100. Esta metodologia foi realizada no Centro de Microscopia Eletrônica do Instituto de Biociências, UNESP, Campus de Botucatu-SP.

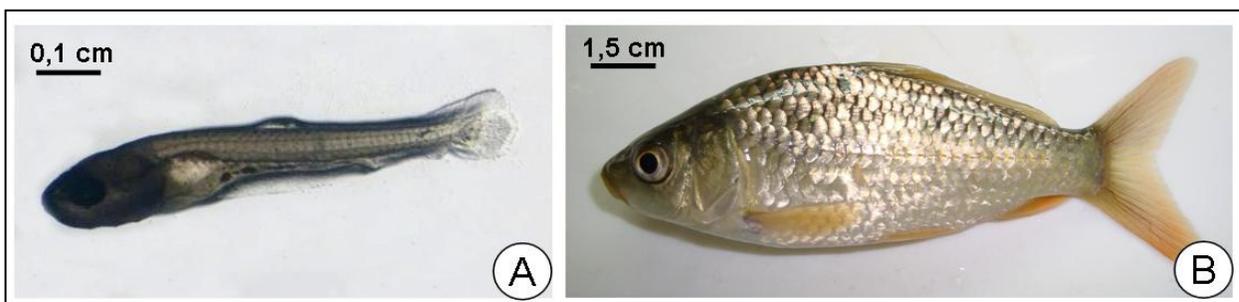


Figura V: A) larva de *Cyprinus carpio* com 10 dias pós-fertilização; B) alevino de *Cyprinus carpio* com 06 meses de idade.

Tabela I: informação nutricional da ração utilizada, diâmetro do extrusado e número de refeições realizadas durante a criação dos animais

	Larvas Pós-Larvas	Micro Alevinos	Alevinos	Peixes Adultos
Tipo	pó	extrusado	extrusado	extrusado
Diâmetro (mm)	-	1,5	2,6	4,0
Peso por saco (kg)	10	10	25	25
Proteína %	55	45	36	28
Extrato etéreo %	10	08	07	05
Fibra bruta %	04	04	04	09
Matéria mineral %	20	20	09	09
Umidade %	10	10	08	08
Vitamina C	600	540	500	240
Peso peixe (g)	Até 03	03 a 17	17 a 60	60 a 210
Taxa de alimentação (% de biomassa)	18 a 20	12 a 16	06 a 10	04 a 05
Refeições por dia	08	07	06	04

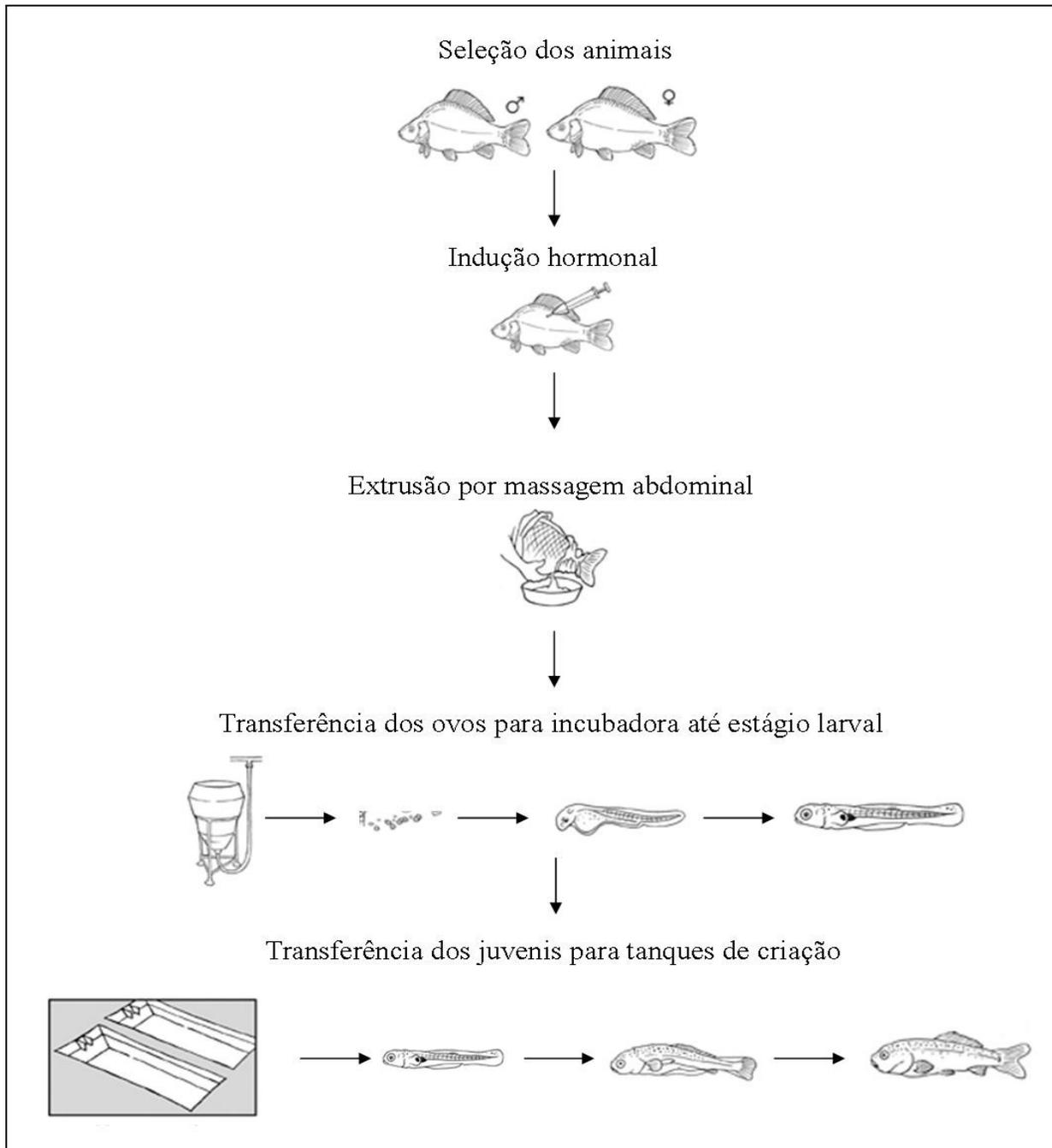


Figura VI: esquema representando a reprodução por indução hormonal e transferência de ovos, larvas e juvenis para incubadora e tanque de criação (modificado de FAO Fisheries and Aquaculture, 2004-2009).

RESULTADOS

1. PRIMÓRDIO GONADAL

Os primórdios gonadais em *Cyprinus carpio* foram observados pela primeira vez em animais com 07 dias pós-fertilização dorsalmente ao trato digestório e ventralmente ao rim em desenvolvimento, até 30 dias pós-fertilização. Apresentam-se aos pares sobre o peritônio ao longo de toda cavidade celomática, presos por uma fina camada de mesentério gonadal. Cada primórdio gonadal localiza-se ventro-lateralmente à bexiga natatória e dorsalmente ao aparelho digestório (Figura 1). Em secções parassagitais (Figura 1), mostra-se filiforme, longo, extremamente delgado, apresentando inicialmente uma ou duas camadas de células somáticas, interpostas por raras células germinativas primordiais (CGPs). As células somáticas são pavimentosas, com núcleo basófilo e citoplasma escasso. Já as CGPs são células bastante ovaladas com núcleo basófilo e volumoso, e citoplasma acidófilo rico em núcleo, a qual é eosinofílica quando corada com Hematoxilina/Eosina e apresenta resposta positiva ao Metanil Yellow, sendo portanto rica em proteínas. Já em cortes transversais (Figura 1), o primórdio gonadal é uma estrutura elíptica, na qual se observa apenas uma CGP central observada esporadicamente, circunscrita por células somáticas dispostas perifericamente.

O primórdio gonadal aumenta gradativamente em espessura, principalmente pela proliferação de células somáticas e não apresenta vasos sanguíneos (Figura 1). Divisões mitóticas não foram observadas nas CGPs, nesta etapa de desenvolvimento.

Nas intermediações do primórdio gonadal, há grande quantidade de granulócitos, células arredondadas com núcleo basófilo e grânulos citoplasmáticos PAS positivos (Figura 1).

Neste período, não há diferenças morfológicas que sugiram tratar-se de uma gônada masculina ou feminina.

2. GÔNADAS INDIFERENCIADAS

As gônadas indiferenciadas foram observadas em animais com 37 a 50 dias pós-fertilização, quando anatomicamente puderam ser identificadas na cavidade celomática.

Macroscopicamente, as gônadas indiferenciadas são extremamente longas e delgadas, percorrendo toda cavidade celomática desde a papila urogenital (Figura 2A), sendo que neste

período puderam-se distinguir as gônadas masculinas das femininas. Os pressupostos ovários são sempre mais achatados e difusos, principalmente em sua porção cranial enquanto que os pressupostos testículos são totalmente cilíndricos em toda sua extensão (dados não mostrados), porém histologicamente, não há diferença entre o tecido gonadal masculino e feminino.

Nas secções parassagitais, as gônadas indiferenciadas são bastante espessas quando comparadas ao primórdio gonadal, principalmente pela grande quantidade de células somáticas (Figuras 3A-E). Em cortes transversais, notam-se agora um número maior de células germinativas primordiais (CGPs) por secção, sendo que estas não mais se localizam somente na região central da gônada. As CGPs, ainda com formato elíptico e nucléolo evidente (Figura 3D), mantêm-se em número reduzido e encontram-se inicialmente isoladas entre as células somáticas ao longo de toda a gônada (Figuras 3A-D). Gradualmente, tornam-se mais arredondadas (Figura 3E), apresentando ainda citoplasma rico em nüage. Nota-se o aparecimento dos primeiros vasos sanguíneos, principalmente próximos às CGPs (Figuras 3B-C).

Posteriormente, as CGPs passam a ser encontradas em grupos, organizando-se em cordões contínuos, formado unicamente por CGPs (Figuras 3F, 4A-C, 13A). Cada grupo de CGPs é envolto por células somáticas, que o delimita, juntamente com uma membrana basal em formação, não havendo portanto células somáticas em seu interior (Figuras 3F-H).

Entre um grupo e outro de CGPs há grande quantidade de células somáticas, isoladas dos cordões contínuos pela membrana basal em formação. Assim, já na gônada indiferenciada, os cordões contínuos de CGPs delimitados por células somáticas (Figuras 4A-C, 13A) são separados dos demais tipos celulares por uma membrana basal (Figuras 7A, 16A-B). Neste período divisões mitóticas são observadas com frequência (Figura 4B) e ocorre um aumento do número de vasos sanguíneos (Figuras 4B-C).

Essas CGPs também arredondadas (Figuras 4C, 13A), apresentam predominância de eucromatina em seu núcleo (Figuras 8A, 17A) e grande quantidade de material eletrôn-denso no citoplasma, próximo ao envoltório nuclear – as nüages (Figura 8A). Estas aparecem frequentemente associadas às mitocôndrias (Figuras 8C, 17B), as quais têm formato arredondado e cristas tubulares.

As células somáticas são geralmente pavimentosas, têm núcleo basófilo e citoplasma escasso (Figuras 3A-E, 4A-C, 13A). Porém células com diferentes formatos nucleares são

observadas, desde núcleos fusiformes até sinuosos (Figuras 4C, 8A-B, 10D, 13A, 17D, 17F). Apresentam regiões de heterocromatina junto ao envoltório nuclear e regiões dispersas de eucromatina (Figuras 3F-H, 8A). Frequentemente apresentam expansões citoplasmáticas e citoplasma escasso (Figuras 3G-H), porém rico em organelas como mitocôndrias alongadas e eletrôn-densas, retículo endoplasmático e complexo de Golgi (dados não mostrados). As células somáticas adjacentes estão unidas fortemente por uma grande quantidade de junções celulares, principalmente desmossomos (dados não mostrados).

3. DIFERENCIAÇÃO GONADAL

As gônadas de *Cyprinus carpio* diferenciaram-se diretamente em um ovário ou testículo, apresentando, portanto, desenvolvimento gonocorístico direto (diferenciado), com precedência da diferenciação ovariana sobre a testicular. Porém, embora ocorra essa precedência da gônada feminina, as fêmeas analisadas não atingiram maturidade sexual. Comparativamente aos machos que completaram o processo de espermatogênese resultando em uma grande quantidade de espermatozoides, as fêmeas não produziram oócitos maduros durante o período analisado.

3.1 DIFERENCIAÇÃO OVARIANA

Os primeiros indícios da diferenciação ovariana foram observados em animais com 60 dias pós-fertilização.

Durante todo o período de diferenciação ovariana, os ovários de *Cyprinus carpio* mantêm-se como órgãos pares, alongados, levemente achatados e difusos (Figura 2B), localizados longitudinalmente na região dorsal da cavidade celomática. Estão presos à parede dorsal desta cavidade por uma fina membrana de tecido conjuntivo – o mesovário. Macroscopicamente, esse padrão estrutural é mantido até a completa diferenciação da gônada, variando apenas na coloração do tecido gonadal conforme os diferentes graus de desenvolvimento, sendo mais translúcido inicialmente, tornando-se mais opaco e posteriormente levemente amarelado.

Foliculogênese e Crescimento Primário

No pressuposto ovário em diferenciação inicial, os cordões contínuos de células germinativas primordiais (CGPs) (Figura 4C), são invadidos pelas células somáticas que os

circundam (Figura 8A). Ao invadi-los (Figura 4D), as células somáticas pavimentosas circunjacentes parecem perder o contato com a membrana basal; dispõem-se perpendicularmente ao cordão contínuo e se interpõem entre as CGPs (Figura 7A), envolvendo-as gradativamente, e as individualizando (Figuras 4D, 8A, 8C). Dessa forma, passam a apresentar núcleo triangular (Figura 4D) e prolongamentos citoplasmáticos que envolvem as CGPs (Figuras 8A, 8C). As CGPs, agora diferenciadas em oogônias, são então isoladas umas das outras por células somáticas formando cistos (Figuras 4D, 8C). Cada oogônia isolada, dentro do cisto, prolifera por mitose dando origem a novas oogônias ou entra em meiose originando os oócitos (Figuras 4E-H, 8B, 8D-F). Durante as sucessivas divisões celulares, no interior do cisto, a citocinese é incompleta, podendo observar-se pontes citoplasmáticas entre as células germinativas (Figuras 8F, 9A-B).

Uma vez que cada oogônia dá origem a um cisto e tendo início as divisões celulares, formam-se diferentes cistos próximos um do outro (Figuras 4F-H), originando grupamentos (conjuntos celulares), delimitados gradativamente por uma mesma membrana basal em formação (Figuras 7B-C, 8B, 8D-F, 9A). Assim, ao longo de toda gônada, observam-se oogônias isoladas individualmente entre células somáticas, e cistos delimitados por células somáticas derivadas do epitélio, contendo oogônias e/ou oócitos profásicos iniciais (Figuras 4E-H).

As oogônias são células arredondadas que apresentam citoplasma escasso com granulações eosinofílicas correspondentes às núages, e núcleo grande, esférico com um único nucléolo bem evidente (Figuras 4D, 8C). Seu citoplasma apresenta mitocôndrias esféricas com cristas tubulares, frequentemente associadas às núages. Estas também se encontram em grande quantidade próxima ao envoltório nuclear (Figuras 8A, C). Há uma grande quantidade de retículo endoplasmático disperso no citoplasma (dados não mostrados).

Os oócitos, presentes nos cistos são também arredondados, com núcleo contendo cromatina em distintas formas de organização de acordo com a etapa da prófase em que se encontram (Figuras 4F-H, 8B, 8D-F), porém seus citoplasmas não os diferem, mantendo-se sempre ligeiramente acidófilo e escasso (Figuras 4F-G).

Os oócitos profásicos apresentam inicialmente núcleo mais basófilo (Figuras 4F-H) e eletron-denso (Figuras 8E-F) do que as oogônias; há um aumento do número de mitocôndrias, as quais tornam-se mais alongadas e mais eletron-densas (Figuras 8E-F, 9A-B). Há uma diminuição

na quantidade de nãuge no citoplasma e retículo endoplasmático e complexo de Golgi são observados com frequência (dados não mostrados).

O oócito leptotênico apresenta núcleo fortemente basófilo, com ao menos um nucléolo bastante evidente (Figuras 4F-H; 5B-E). Com a progressão da prófase, ocorre perda gradual da basofilia nuclear do oócito (Figura 5). O oócito em zigóteno apresenta maior condensação cromossômica, dando um aspecto granular ao núcleo (Figuras 4F-H, 5). Os complexos sinaptonêmicos começam a ser formados permitindo o pareamento dos cromossomos homólogos. Em paquíteno, os complexos sinaptonêmicos estão totalmente formados (Figuras 8B, 9D) e no núcleo do oócito percebe-se uma forte basofilia próxima ao envoltório nuclear (Figuras 4H, 5D).

Os cistos agora contendo oócitos diplotênicos são invadidos pelas células somáticas epiteliais – as agora células pré-foliculares (Figuras 5A-E; 8C-F). As células pré-foliculares, unidas fortemente por inúmeros desmossomos (Figura 9D) envolvem total e gradativamente cada oócito (Figuras 8F, 9C-E) que se separa do cisto, dando origem a um folículo ovariano (Figuras 5E, 9F). Durante esse processo conhecido como foliculogênese, as células pré-foliculares, após se diferenciarem em células foliculares, iniciam a formação da membrana basal (Figuras 7D-F, 9G). Gradativamente, a membrana basal é sintetizada individualizando cada folículo ovariano (Figuras 7E-H, 10A-C, 12A-B). Pode-se observar com frequência uma membrana basal única sendo compartilhada por dois folículos ovarianos (Figuras 7E, 11C).

Com a entrada e permanência do oócito em diplóteno, os cromossomos plumosos tornam-se visíveis. O citoplasma dos oócitos aumenta em volume tornando-se gradualmente mais basófilo, dando início ao crescimento primário, ainda no interior dos cistos (Figuras 5A, 5C-E).

O oócito diplotênico agora isolado no folículo ovariano, e em crescimento primário apresenta núcleo com um número variável de nucléolos, os quais inicialmente localizados na região central do núcleo (oócitos com múltiplos nucléolos) tornam-se posteriormente periféricos (oócitos perinucleolares) (Figuras 5E-I). Conforme avança em crescimento primário aumentando em volume, o citoplasma do oócito torna-se gradualmente menos basófilo, com aspecto gretado (Figuras 6D, 6J), devido ao aumento e padrão de distribuição das organelas. Inicialmente surge um anel concêntrico, localizado próximo ao núcleo, de coloração mais clara, que se espalha gradualmente por todo o citoplasma (Figuras 6D, 6J).

Observam-se pequenas irregularidades na membrana plasmática do oócito correspondentes à formação de microvilosidades (Figuras 12C-E). Estas se estendem da superfície do oócito em direção às suas células foliculares, iniciando a formação da zona pelúcida. Essas células foliculares, agora pavimentosas com núcleo basófilo (Figuras 5G-I, 6D, 6I), apresentam citoplasma escasso com reduzido número de organelas (Figuras 10A, 10C-F, 11C-D, 12A, 12F).

Nessa etapa da diferenciação ovariana, a gônada mostra-se ainda compacta, longa e delgada (Figura 5A).

No final do crescimento primário, no ooplasma surgem pequenas vesículas periféricas (alvéolos corticais) que são gradativamente preenchidas por polissacarídeos neutros, os quais respondem positivamente ao PAS (dados não mostrados).

Não foram observados oócitos em crescimento secundário, ou seja, oócitos com deposição de grânulos de vitelo no citoplasma.

Formação das Lamelas Ovíferas

Neste período em que os animais apresentam 90 dias pós-fertilização, a gônada permanece ainda compacta, porém ao longo da região ventral do ovário surgem pequenas invaginações, a partir das quais se desenvolvem as lamelas ovíferas (Figura 5F).

Células somáticas da periferia da gônada alteram sua disposição espacial, colocando-se perpendicularmente ao tecido gonadal, interpondo-se em fileiras paralelas para o interior do tecido (Figuras 5G, 10D-F). Ao se afastarem, as fileiras de células somáticas criam espaços interlamelares, formando invaginações no tecido gonadal, que se tornam cada vez mais profundas dando origem as lamelas ovíferas (Figuras 5H-I). Estas se projetam, então, para a cavidade celomática a partir da região dorsal do ovário. Nesta mesma região, o tecido conjuntivo adjacente se espessa, compondo a túnica albugínea em formação (dados não mostrados).

Formação do Estroma Ovariano e Epitélio Germinativo

A gônada, agora já diferenciada em um ovário em animais com 110 dias pós-fertilização, é formada por oogônias isoladas, cistos de oogônias e oócitos, folículos ovarianos e uma grande quantidade de células somáticas (Figuras 6A-C). As células somáticas com aspecto fusiforme,

núcleo basófilo e citoplasma escasso, localizam-se em duas regiões específicas: na periferia do tecido gonadal, delimitando-o, e no interior das lamelas, dispersas entre as células germinativas (Figura 6C). As células somáticas dispersas no interior das lamelas afastam-se gradativamente uma das outras resultando na formação de espaços extravasculares (Figuras 6A-C), preenchidos por uma substância que responde levemente ao PAS (Figura 6G) e ao Azul de Toluidina (dados não mostrados), portanto, de natureza polissacarídica. Forma-se assim o estroma ovariano (Figuras 6, 11A) constituído por um tecido conjuntivo frouxo, no qual além das células somáticas inicialmente presentes, são encontradas células mesenquimais indiferenciadas (Figuras 6C-D, 6G, 11A-B), fibrilas de colágeno e vasos sanguíneos. As células mesenquimais de formato estrelado conectam-se uma às outras por prolongamentos citoplasmáticos formando uma rede no interior da lamela (Figuras 6C-D, 6G, 11A).

Na região de projeção e formação das lamelas ovíferas (Figura 6C), células somáticas periféricas ao tecido gonadal reorganizam-se formando um epitélio que margeia as lamelas recém formadas (Figuras 6G-J). Este epitélio recém formado (Figura 12G), agora apoiado sobre uma membrana basal (Figuras 7J, 12H), isola as células germinativas do lúmen interlamelar e as separa do estroma ovariano (Figuras 7G-H, 12G-H). Assim, oogônias aprisionadas entre as células epiteliais constituem agora o epitélio germinativo feminino (Figuras 6G-J, 12G). Oogônias em proliferação formam aglomerados celulares que são invadidos por células derivadas do epitélio. Nestes aglomerados celulares as oogônias são circundadas pelas células epiteliais formando cistos. Nos cistos, as oogônias dividem-se por mitose e entram em meiose dando origem aos oócitos. Estes sítios de proliferação e diferenciação celular e posterior formação dos folículos ovarianos constituem ninhos de células germinativas.

Neste período de diferenciação ovariana, a membrana basal torna-se contínua ao longo do epitélio, sendo compartilhada em uma pequena extensão entre os folículos ovarianos recém formados e o epitélio germinativo propriamente dito recém formado (Figura 7J). Os folículos ovarianos projetam-se gradativamente para o estroma ovariano, abandonando os cistos (Figuras 6I-J, 12F). Abaixo do epitélio, dispõem-se os componentes do estroma ovariano como células mesenquimais, fibroblastos e vasos sanguíneos. Dessa forma, a membrana basal separa os dois compartimentos ovarianos: o germinativo, composto pelas células somáticas epiteliais e células germinativas; e o intersticial, formado pelos componentes do estroma ovariano (Figura 7).

A partir do estroma (Figuras 6C, 11A), células mesenquimais com aspecto estrelado (Figuras 6C-D, 11A-B) e pobre em organelas, com mitocôndrias alongadas e eletrondensas (Figura 11A), projetam-se em direção aos folículos recém formados até os contatarem, circundando-os e dando origem às células pré-tecais (Figuras 6D, 11C-D), formando a teca ao redor de cada folículo (Figuras 7I, 11C-D), exceto na região em que a membrana basal das células foliculares e do epitélio germinativo estão unidas. Entre as células foliculares e a teca encontra-se a membrana basal (Figuras 7I, 12C).

Formação do Cisto-Ovário

A constituição do ovário como um órgão cavitário e, portanto, a formação do lúmen ovariano é posterior à formação das lamelas ovígeras e à constituição do epitélio germinativo. O fechamento do órgão é gradual e pode ser acompanhado através de secções transversais (Figura 6E). Células somáticas epiteliais acumulam-se e projetam-se lateralmente em ambos os lados do ovário, formando lâminas que gradativamente aumentam em comprimento em direção à região ventral do ovário (Figura 6F). Ao se contatarem, fundem e encerram parte da cavidade celomática, formando a cavidade ou lúmen ovariano (dados não mostrados).

3.2 DIFERENCIAÇÃO TESTICULAR

Os primeiros indícios da diferenciação testicular foram observados em animais com 75 dias pós-fertilização.

Os testículos de *Cyprinus carpio* são órgãos pares, alongados (Figuras 2C-D), localizados longitudinalmente na região dorsal da cavidade celomática. Estão presos à parede dorsal desta cavidade por uma fina membrana de tecido conjuntivo – o mesórquio.

Durante o período de diferenciação gonadal, os testículos apresentaram mudanças significativas. No início da diferenciação, surgem pequenas reentrâncias ao longo dos testículos, as quais se acentuam gradativamente com o desenvolvimento gonadal, tornando-se cada vez mais proeminentes (Figura 2C). Formam-se assim verdadeiros lobos na gônada diferenciada (Figura 2D). Em média há cinco lobos bem definidos ao longo do testículo, que podem ser percebidos logo no início da diferenciação testicular. Esses lobos conectam-se uns aos outros pela região dorsal da gônada. As gônadas indiferenciadas são mais transparentes, enquanto que o testículo

apresenta uma coloração homogênea esbranquiçada ao longo de toda a gônada, sendo os lobos da porção cranial maiores que os da porção caudal. Na extremidade caudal os testículos unem-se em um gonoducto único o qual desemboca na papila urogenital.

Formação do Túbulo Testicular e o Epitélio Germinativo

Em animais com 75 dias pós-fertilização, o pressuposto testículo, ainda filiforme, aumenta gradualmente em espessura e comprimento. Na gônada indiferenciada, notam-se os cordões contínuos (Figura 13A) delimitados por uma membrana basal (Figuras 16A-B). Estes cordões contínuos de células germinativas primordiais (CGPs) (Figura 13A) deixam de ser observados, uma vez que as células somáticas, denominadas agora de pré-Sertoli, invadem-nos (Figuras 13B, 17A). Em cortes longitudinais e parassagitais, as gônadas apresentam grande número de CGPs dispersas pelo tecido gonadal (dados não mostrados).

As CGPs (Figura 13A), agora diferenciadas em espermatogônias, são arredondadas (Figuras 13B, 17A, 17D-G), apresentando em seu citoplasma mitocôndrias esféricas com cristas tubulares, frequentemente associadas às granulações eletrôn-densas correspondentes às núages (Figuras 17B-C, 17G). Têm núcleo grande, esférico (Figura 13B) com um único nucléolo bem evidente (Figuras 13C-E, 17E). Apresentam também uma grande quantidade de retículo endoplasmático e vesículas dispersas em seu citoplasma (dados não mostrados).

Já as células pré-Sertoli (Figura 17) apresentam núcleo basófilo, triangular e citoplasma escasso (Figura 17C) e estão fortemente unidas umas às outras por inúmeros desmossomos (dados não mostrados). Apresentam projeções citoplasmáticas que se interpõem gradativamente entre as espermatogônias (Figura 17). Dessa forma, as espermatogônias são gradual e individualmente envolvidas por expansões citoplasmáticas das agora células de Sertoli, formando cistos (Figura 13B), delimitados, portanto, pelos prolongamentos citoplasmáticos das células de Sertoli (Figuras 18A-B).

As células de Sertoli (Figuras 18, 20C), com as mesmas características nucleares da célula pré-Sertoli, podem participar da formação de mais de um cisto (Figuras 20B-C), ou ainda, um único cisto pode ser envolvido por mais de uma célula de Sertoli, que prolifera conforme este aumenta em volume (Figura 18A). Seus prolongamentos citoplasmáticos se conectam através de complexos juncionais, principalmente por desmossomos (dados não mostrados). Possuem sistema

de endomembranas desenvolvido e mitocôndrias eletron-densas alongadas (dados não mostrados).

Os cistos recém formados agrupam-se em inúmeros conjuntos de células que se distribuem ao longo da gônada, cada qual circundado por células somáticas (Figuras 13C-D, 17D, 17F). Ao redor de cada conjunto celular, mantém-se a membrana basal (Figuras 16C-E), porém esta não circunda todo o agrupamento celular (Figura 16F). Gradativamente, os cistos de espermatogônias que constituem um mesmo conjunto, afastam-se uns dos outros, criando um pequeno espaço central entre eles (Figuras 13E-G, 16D-F, 18). Concomitante, células somáticas dos conjuntos celulares adjacentes afastam-se (Figuras 19A-D), permitindo uma fusão progressiva entre os dois conjuntos de células. Conseqüentemente, o espaço central desses conjuntos torna-se agora, único e maior, formando assim, um compartimento luminal (Figuras 13H-I, 16G-H, 19E-F). Este compartimento passa agora a ser delimitado por cistos de espermatogônias (Figuras 13H-I, 14A), apoiados em uma membrana basal (Figuras 16G-H, 20B). Como consequência do processo, formam-se os túbulos testiculares e o epitélio germinativo masculino é estabelecido (Figuras 14A, 16H, 18F). As células somáticas, uma vez unidas fortemente pelos complexos juncionais formam gradativamente uma barreira hemato-testicular (dados não mostrados).

O compartimento germinativo, formado pelas espermatogônias e células de Sertoli, encontra-se agora totalmente separado das demais células somáticas por uma membrana basal (Figuras 16I-K, 20A-D). Essas células somáticas, isoladas do compartimento germinativo, irão se diferenciar dando origem ao compartimento intersticial (Figura 20A). Observam-se neste compartimento células que lembram fibroblastos, com núcleo alongado e formato irregular, além de vasos sanguíneos (Figura 20B), fibrilas de colágeno e escassas células mesenquimais, em processo de diferenciação (dados não mostrados). Notam-se também algumas poucas células mióides, reconhecidas por apresentarem microfilamentos dispostos em arranjo paralelo em seu citoplasma (dados não mostrados). Células de Leydig (Figura 20B) também foram observadas esporadicamente, apresentando heterocromatina difusa, nucléolo evidente e retículo endoplasmático desenvolvido no citoplasma (dados não mostrados). Foram identificadas por suas mitocôndrias características com grande quantidade de cristas tubulares, lembrando o formato de favo de mel (dados não mostrados).

As espermatogônias agora no epitélio germinativo já estabelecido mantêm características similares às CGPs. São células extremamente grandes sendo as maiores células da linhagem germinativa masculina. Têm forma esférica ou oval, núcleo volumoso, central, com cromatina finamente granulada (Figuras 14, 20A-B). Geralmente, apresentam um único nucléolo (Figuras 14I, 15A). Seu citoplasma é acidófilo e apresenta grande quantidade de núcleo (Figura 15B), mitocôndrias com cristas tubulares, retículo endoplasmático e complexo de Golgi, além de uma grande quantidade de vesículas e membranas (dados não mostrados).

Em animais com 85 dias pós-fertilização, a gônada apresenta inúmeros túbulos testiculares já formados, porém é ainda constituída apenas por células somáticas e espermatogônias, não havendo nenhum outro tipo de célula germinativa (Figura 14A).

Após essa organização das células espermatogênicas em cistos no epitélio germinativo, inicia-se a espermatogênese (Figura 14B). O processo no interior de cada cisto ocorre de forma sincrônica, ou seja, em cada cisto, as células germinativas encontram-se em uma mesma fase de desenvolvimento (Figuras 14E, 14G-I, 15A-D, 20A, 20D). A citocinese no interior dos cistos é incompleta entre as células germinativas, permanecendo unidas através de pontes citoplasmáticas que frequentemente apresentam reforços de membranas, possuindo bordas eletrondensas (Figura 20E). Por entre as pontes citoplasmáticas, nota-se o trânsito de vesículas, organelas e outros componentes celulares pelo seu interior (dados não apresentados). Centríolos são também facilmente observados nas células espermatogênicas, tendo um de seus elementos ancorado à membrana plasmática, podendo dar origem a um cílio curto (dados não mostrados).

Espermatogênese

No início da espermatogênese, em gônadas de animais com 95 dias pós-fertilização nota-se a presença de cistos contendo diversas células germinativas em uma mesma etapa de desenvolvimento (espermatogônia primária, espermatogônias secundárias, espermatócitos e espermatídes). Não há formação de espermatozóides e os túbulos testiculares encontram-se vazios (Figuras 14B-E).

As espermatogônias primárias mantêm as mesmas características das espermatogônias da etapa anterior. Já as espermatogônias secundárias são células menores do que as primárias (dados não mostrados). Nos cistos ocorrem em grupos de número variável; possuem núcleo esférico com

cromatina difusa também finamente granulada, com dois ou mais nucléolos. Neste período a atividade meiótica é intensa, de modo que os espermatócitos tornam-se bastante numerosos.

Os espermatócitos são ainda menores que as espermatogônias, têm núcleo basofílico (Figuras 14D-H) com cromatina caracteristicamente compactada e não possuem nucléolo (Figuras 20A, 20D). Podem ser identificados pelas figuras de divisão celular (Figura 20E). Encontram-se geralmente em zigóteno e paquíteno da prófase I, ou em metáfase I da meiose (Figuras 20D-E). Seu citoplasma escasso apresenta mitocôndrias alongadas e bastante eletrondensas, retículo endoplasmático e complexo de Golgi (dados não mostrados). Os espermatócitos em zigóteno possuem núcleo central, cromatina heterogênea e observam-se a formação de elementos laterais do complexo sinaptonêmico junto ao envoltório nuclear (dados não mostrados). Nos espermatócitos em paquíteno, notam-se os complexos sinaptonêmicos já formados e os cromossomos tornam-se mais compactados (dados não mostrados).

Ao final da diacinese, o envoltório nuclear já se encontra fragmentado e os espermatócitos seguem para a metáfase (Figura 20E).

No interior dos cistos, cada espermatócito encontra-se em etapas da meiose bastante próximas, podendo num mesmo cisto serem encontrados espermatócitos profásicos e metafásicos (Figura 20E).

Com o avanço da espermatogênese, os espermatócitos I dividem-se formando os espermatócitos II. Estes apresentam um menor tamanho, núcleo mais compacto e citoplasma ainda mais escasso. Poucas organelas podem ser observadas em seu citoplasma (dados não mostrados).

As espermátides são pequenas células esféricas com citoplasma bastante reduzido e flagelo em formação (Figuras 14I, 15A). Seu núcleo, com cromatina em compactação, decresce gradualmente em diâmetro ao longo da espermatogênese (Figuras 14I, 15A, 15D), sendo encontradas em diferentes etapas da espermiogênese (Figura 15E).

Em animais com 110 dias pós-fertilização, os cistos de espermatócitos e espermátides tornam-se mais numerosos ao longo da gônada, mas há ainda predomínio de espermatogônias. Inicia-se a produção de espermatozóides, porém em pequena quantidade. Os espermatozóides são as menores células da linhagem germinativa (Figuras 14H-I, 15B-G); caracterizam-se por apresentar um longo flagelo e núcleo arredondado, com cromatina altamente compactada

(Figuras 20F-G), a qual se cora intensamente (Figuras 14H-I, 15B-G). Apresentam mitocôndrias eletrôn-densas em sua peça intermediária (Figuras 20F-G) e estão presentes no lúmen dos túbulos testiculares (Figuras 14H-I).

Em animais com 130 dias pós-fertilização, os testículos apresentam um maior tamanho, em volume e espessura. Notam-se cistos em diferentes fases da espermatogênese (Figura 14F). As espermatogônias, espermatócitos e espermátides ocorrem em grande quantidade. O lúmen dos túbulos testiculares passa a ser totalmente preenchido por espermatozóides (Figuras 14F-I)

Observam-se dois tipos diferentes de cistos de espermátides: cistos com espermátides iniciais ocupando todo o espaço delimitado pelo cisto (Figuras 15A, 15D, 15E); e cistos com espermátides finais, com seus flagelos voltados para o centro, e núcleos junto à parede do cisto (Figuras 15A, 15E).

Animais com 150 dias pós-fertilização já apresentam testículos completamente desenvolvidos (Figura 15C). Nestes, os cistos de espermatogônias, espermatócitos e espermátides tornam-se pouco numerosos. Após espermiogênese, gradativamente os cistos se rompem; o epitélio germinativo torna-se descontínuo e o compartimento luminal é totalmente preenchido por espermatozóides (Figuras 15C-G). Os túbulos testiculares tornam-se anastomosados (Figuras 15C-D, 16L-O) principalmente na região dorsal do testículo, formando o ducto espermático (Figuras 15C, 16L). Nesses testículos, o compartimento intersticial é ainda bastante reduzido e pouco desenvolvido (Figuras 15F, 16, 20A-B), constituído por fibras colágenas, fibroblastos, granulócitos e vasos sanguíneos, além de raras células de Leydig (Figura 20B) e células mióides (dados não mostrados).

Próximo à região de formação do ducto, o testículo apresenta grande quantidade de espermatogônias e células somáticas. Dessa forma, a porção caudal da qual partem os ductos testiculares de ambos os testículos para formar o gonoducto, mostra-se ainda indiferenciada. O gonoducto, portanto, encontra-se aparentemente ainda não formado (dado não mostrado).

Figura 1: Desenvolvimento do primórdio gonadal entre 07 e 30 dias pós-fertilização em cortes transversais e sagitais: o aumento do número de células germinativas primordiais (CGPs) (seta azul) e células somáticas (seta preta) leva ao espessamento do tecido gonadal. Notar a ausência de vasos sanguíneos. **Bx:** bexiga natatória; **Fi:** fígado; **gr:** granulócitos; **Hp:** hepatopâncreas; **In:** intestino; **Mu:** músculo; **Nt:** notocorda; **PG:** primórdio gonadal. *Colorações:* **AT:** Azul de Toluidina; **MY:** PAS + Hematoxilina Férrica + Metanil Yellow.

FIGURA 1

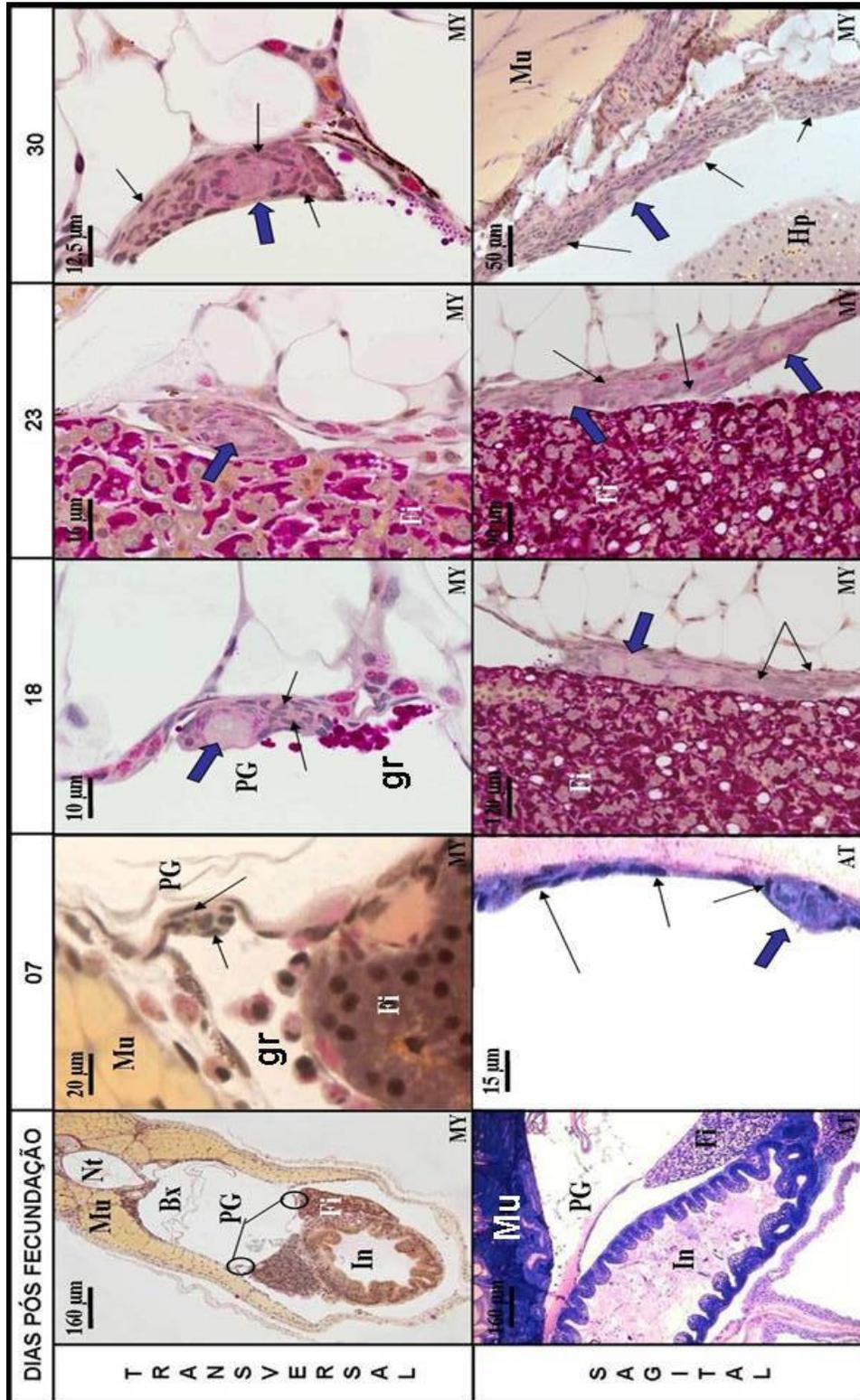


Figura 2: **A)** Juvenil de *Cyprinus carpio* com 45 dias pós-fertilização, com a cavidade exposta, durante dissecação das gônadas indiferenciadas. **B)** Ovários de alevino de *C. carpio*, com seis meses de idade, ao final da diferenciação gonadal. **C)** Testículos de alevino de *C. carpio* com quatro meses de idade, durante o período de diferenciação gonadal. Os lobos testiculares encontram-se ainda em período de formação. **D)** Testículos com os lobos testiculares totalmente formados de alevino de *C. carpio* com seis meses de idade. **Bx:** bexiga natatória; **Du:** ducto espermático; **Gd:** gônada diferenciada; **Gi:** gônada indiferenciada; **In:** intestino; **Lo:** lobos testiculares; **Pu:** região de conexão da gônada com a papila urogenital; **vs:** vaso sanguíneo.

FIGURA 2

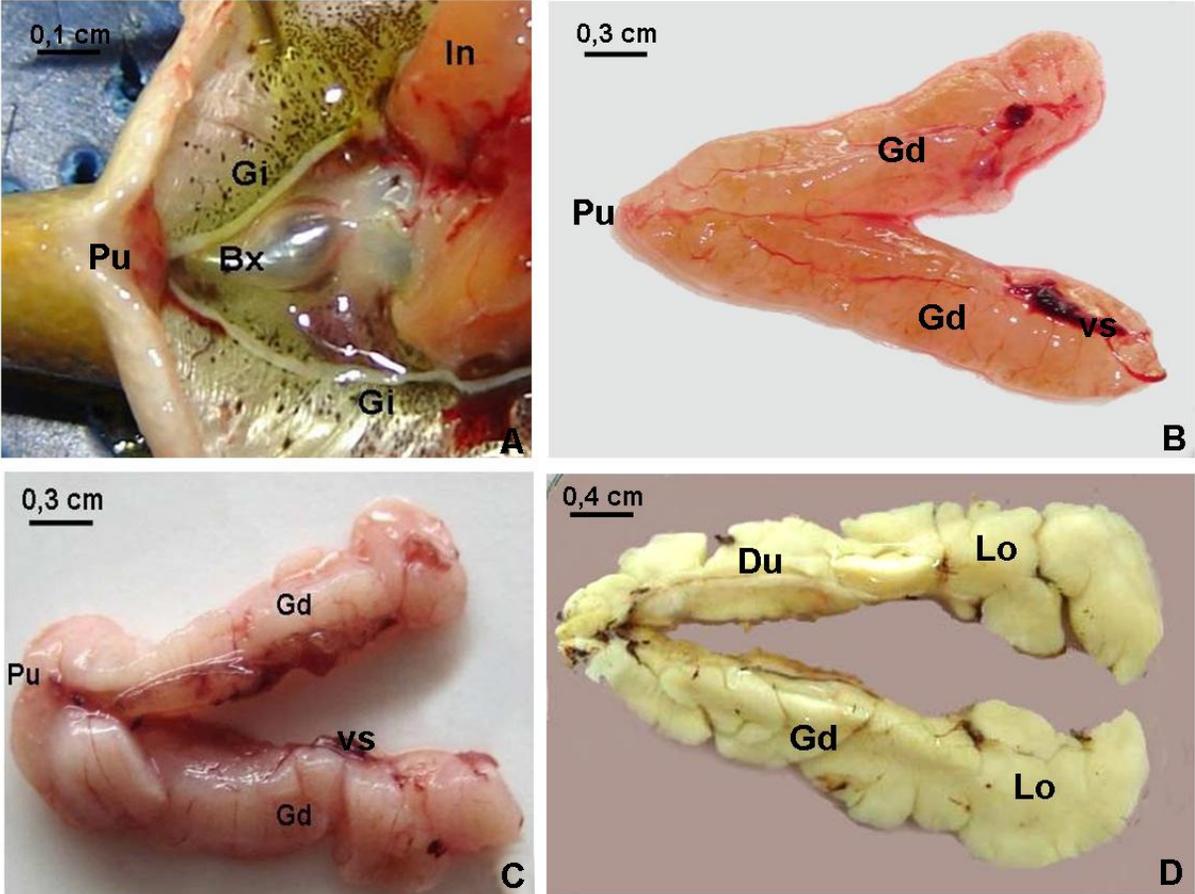


Figura 3: **A)** Corte histológico longitudinal de gônada indiferenciada. Notar as células germinativas primordiais distribuídas isoladamente entre as células somáticas. Aparecimento dos primeiros vasos sanguíneos (coloração: MY). **B-C)** Células germinativas primordiais rodeadas e isoladas por células somáticas ao longo da gônada indiferenciada. Notar a presença de vasos sanguíneos próximos das células germinativas primordiais (coloração: MY). **D)** Célula germinativa primordial ainda com formato elíptico, envolta por células somáticas (coloração: MY). **E)** Células germinativas primordiais envoltas por células somáticas, porém agora com formato esférico (coloração: MY). **F - H)** Micrografia eletrônica de transmissão da gônada indiferenciada. **F)** Cordões contínuos de células germinativas primordiais sendo formados na gônada indiferenciada. Notar células somáticas delimitando o cordão contínuo e ausência de células somáticas por entre as células germinativas primordiais (barra = 1,5µm). **G)** Célula somática emitindo prolongamentos citoplasmáticos (cabeça de seta) por entre as células germinativas primordiais, circundando-as para posterior interposição (barra = 2,0µm). **H)** Célula germinativa primordial sendo delimitada por células somáticas. Notar início da formação da membrana basal (seta aberta), separando os componentes celulares que darão origem ao compartimento intersticial ou estroma das células somáticas associadas às células germinativas primordiais (barra = 4,0µm). **cc:** cordões contínuos de CGPs; **cs:** célula somática; **CGP:** célula germinativa primordial; **m:** mitocôndria; **n:** núcleo; **vs:** vaso sanguíneo; **asterisco:** nãuge; **cabeça de seta:** prolongamentos citoplasmáticos; **seta aberta :** membrana basal; **seta fechada:** limite celular.

seta aberta: →

seta fechada: →

FIGURA 3

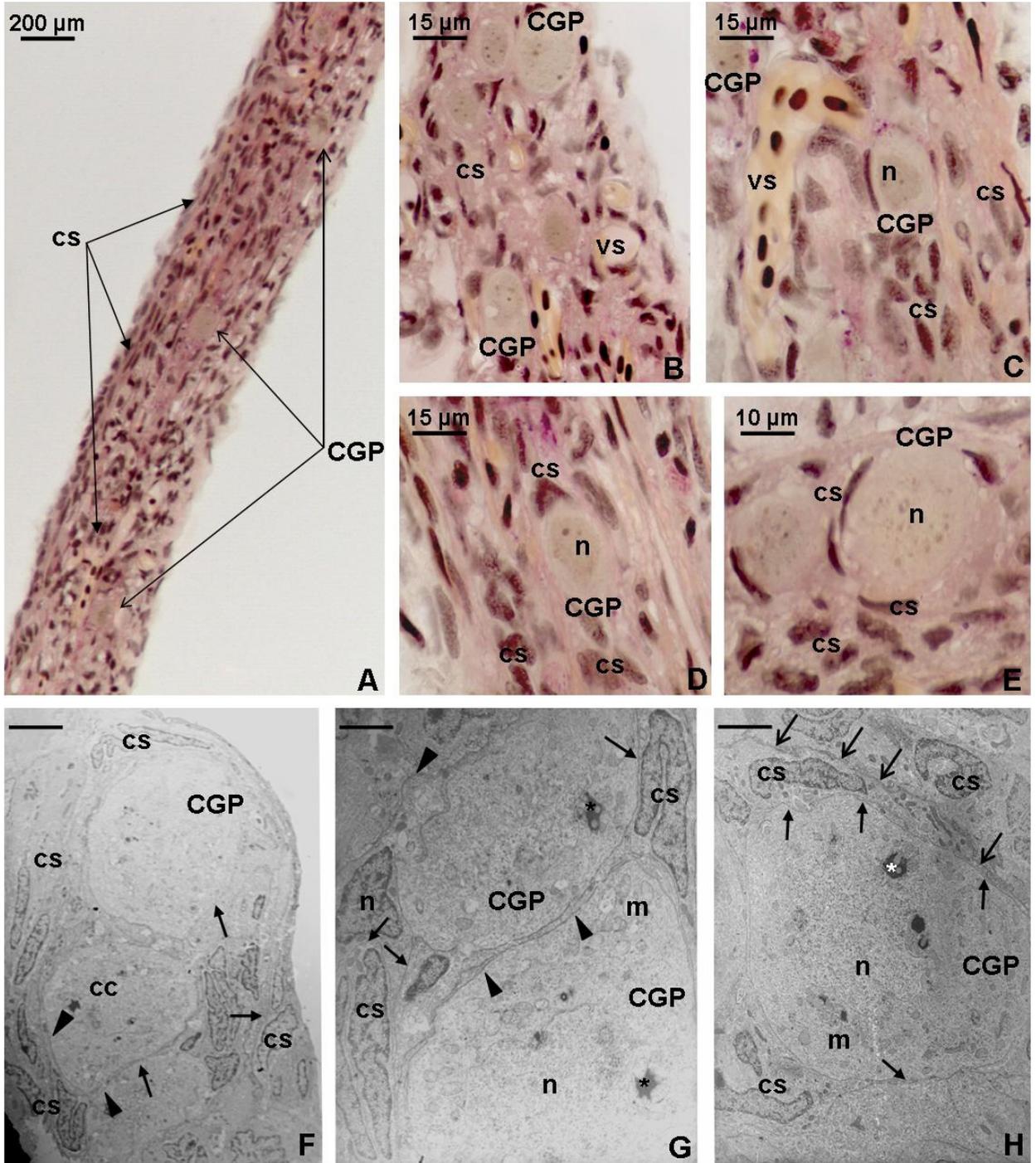


Figura 4: **A)** Corte histológico parassagital de gônada feminina indiferenciada. Notar aumento do número de vasos sanguíneos corados em amarelo pelo Metanil Yellow (detalhes em **B** e **C**) e presença de cordões contínuos de células germinativas primordiais ao longo da gônada, delimitados por células somáticas (coloração: MY). **B)** Células germinativas primordiais distribuídas na gônada indiferenciada e divisão mitótica da célula germinativa primordial (coloração: MY). **C)** Detalhe de um cordão contínuo de células germinativas primordiais. Notar a ausência de células somáticas no interior do cordão (coloração: MY). **D)** Grupos de células germinativas primordiais, agora diferenciadas em oogônias, sendo invadidos por células somáticas, formando um cisto (coloração: MY). **E)** Corte histológico parassagital de gônada feminina em início de diferenciação gonadal, com início de atividade meiótica. Presença de ninhos de oogônias e oócitos profásicos (coloração: MY). **F-H)** Detalhes de **E** mostrando a formação de cistos de oogônias e oócitos profásicos. Notar o limite dos cistos, formados pelos prolongamentos das células somáticas, agora pré-foliculares, que tem resposta positiva ao PAS (cabeça de seta) (coloração: MY). **cc:** cordões contínuos de CGPs; **ci:** cistos; **cs:** célula somática; **CGP:** célula germinativa primordial; **m:** metáfase; **n:** núcleo; **o:** oócito; **og:** oogônia; **ol:** oócito leptotênico; **oz:** oócito zigotênico; **pq:** oócito paquitênico; **vs:** vaso sanguíneo; **asterisco:** núage; **cabeça de seta:** limite dos cistos; **seta aberta:** células pré-foliculares; **seta fechada:** células somáticas

FIGURA 4

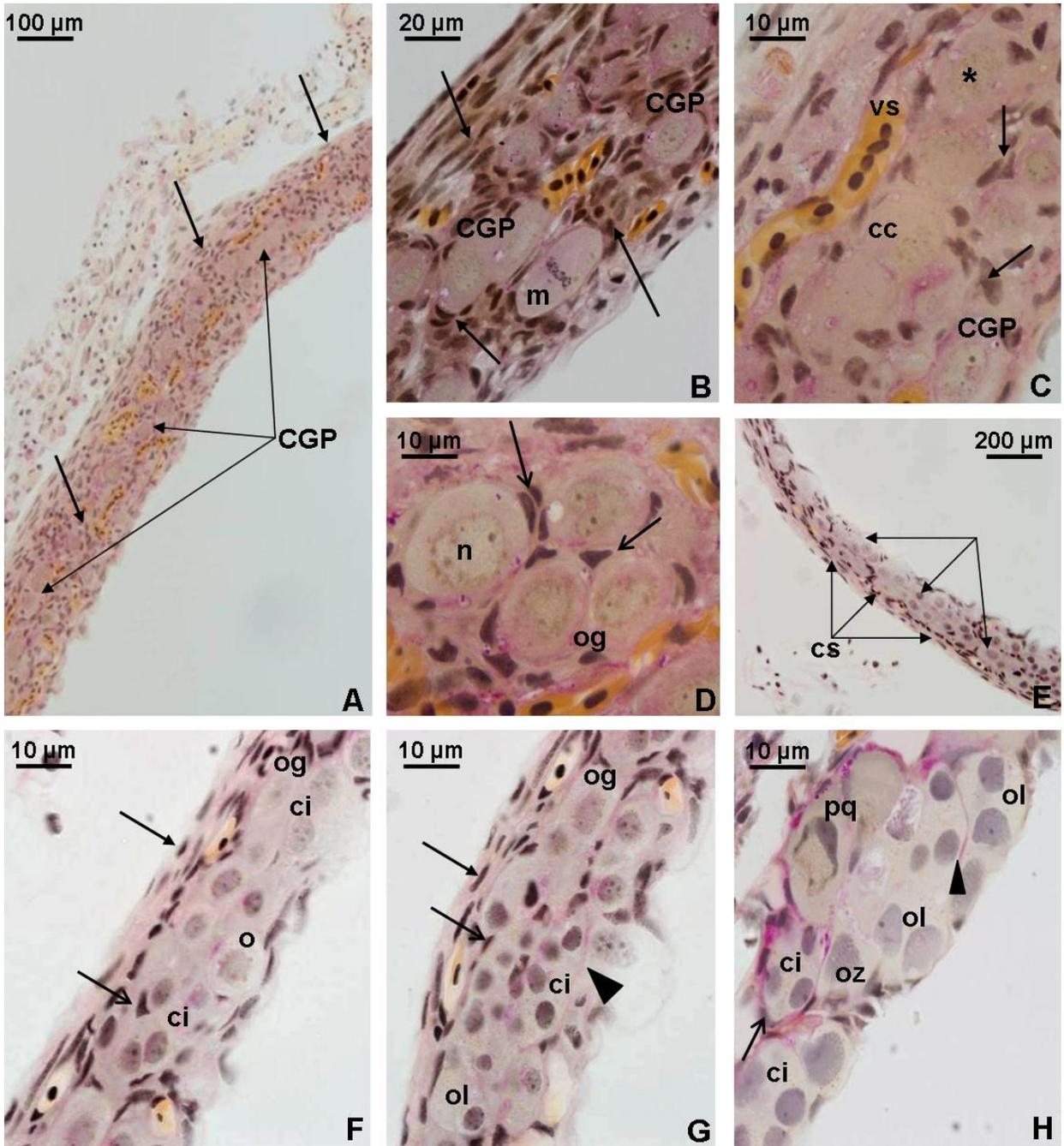


Figura 5: **A)** Corte parassagital de gônada feminina durante a diferenciação gonadal. Notar que a gônada é uma estrutura compacta, apresentando cistos e oogônias distribuídas em grande quantidade ao longo do tecido gonadal. Início do crescimento primário dos oócitos (coloração: MY). **B-E)** Detalhes de **A** mostrando a grande quantidade de cistos de oogônias e oócitos em diferentes etapas da prófase (notar diferentes graus de compactação da cromatina e basofilia nuclear), além de oogônias isoladas. **E)** Detalhe de um oócito em crescimento primário imerso no tecido gonadal já com citoplasma basofílico (coloração: MY). **F)** Corte histológico sagital de ovário mostrando início da formação das lamelas ovígeras na região ventral da gônada. A gônada, ainda compacta, apresenta as primeiras invaginações. Notar aumento do número de oócitos em crescimento primário (coloração: MY). **G-H)** Processo de formação das lamelas ovígeras. **G)** Células somáticas epiteliais dispõem-se perpendicularmente ao tecido gonadal e migram para o interior da gônada (seta em vermelho). Posteriormente (**H)**) as células somáticas se afastam separando o tecido gonadal e provocando a formação de invaginações ao longo da gônada (coloração: MY). **I)** Detalhe do processo de invaginação resultando na formação das lamelas ovígeras (coloração: MY). **ci:** cistos; **f:** células foliculares; **L:** lamelas ovígeras; **m:** metáfase; **n:** núcleo; **od:** oócito em início de diplóteno; **og:** oogônia; **ol:** oócito leptotênico; **op:** oócito em crescimento primário; **pq:** oócito paquitênico; **vs:** vaso sanguíneo; **seta aberta:** células pré-foliculares; **seta fechada:** células somáticas; **seta vermelha:** invaginações no tecido gonadal formando lamelas ovígeras.

FIGURA 5

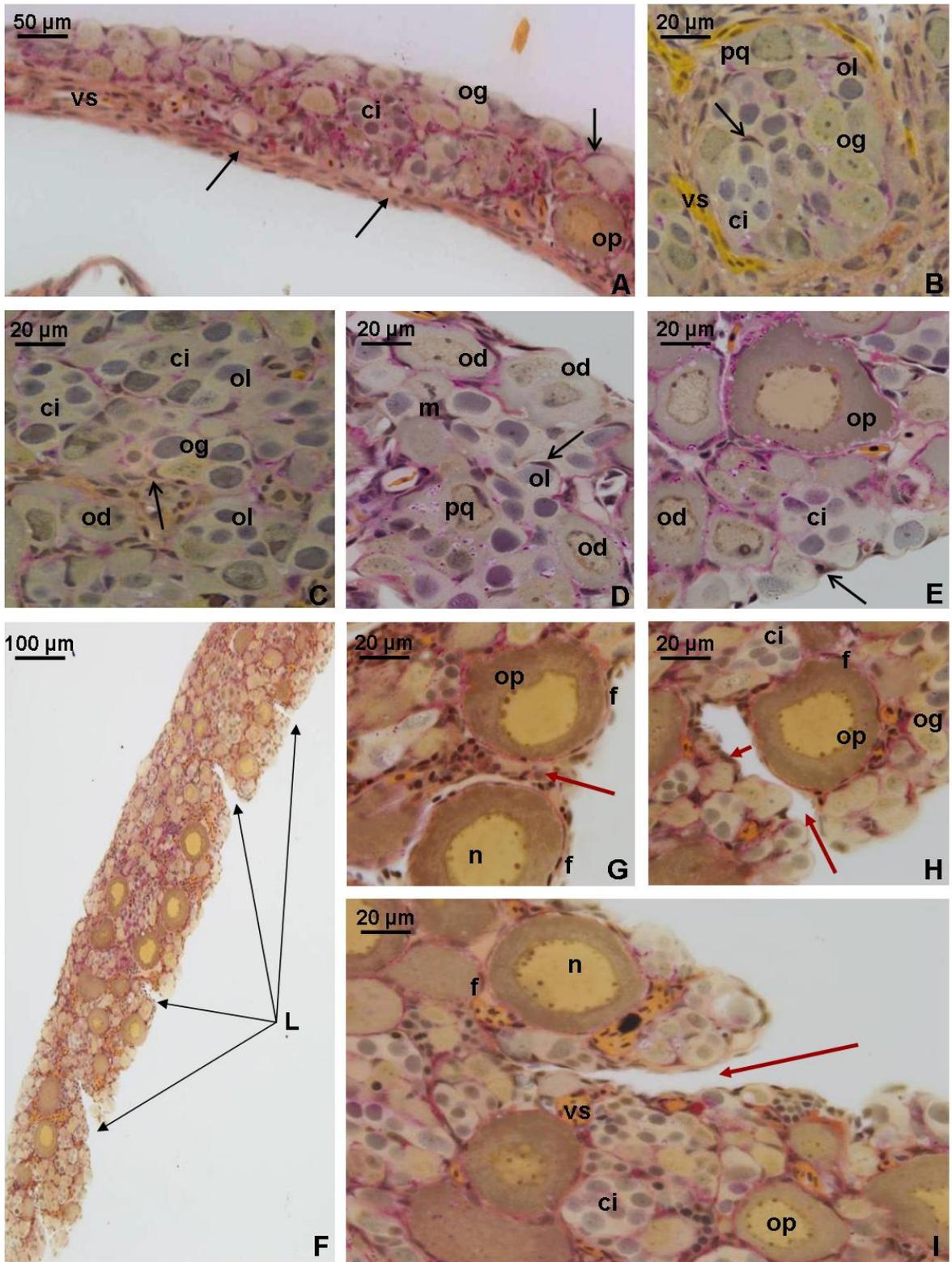


Figura 6: **A)** Corte histológico parassagital de ovário no início da formação do estroma ovariano. Notar a presença de invaginações que formam as lamelas ovígeras (seta em vermelho) (coloração: MY). **B)** Detalhe de **A** destacando formação da lamela ovígera e estroma ovariano (coloração: MY). **C)** Porção do ovário em corte histológico parassagital, mostrando a rede subjacente às células somáticas (seta em preto) formada por células somáticas indiferenciadas (mesenquimais) no estroma ovariano. Notar a espaço interlamelar já bem delimitado (seta em vermelho) (coloração: HE). **D)** Detalhe de **C**: Células mesenquimais do estroma ovariano diferenciam-se em células pré-tecais e contatam o folículo ovariano para formação do complexo folicular. Notar a presença de capilar sanguíneo junto à camada celular que irá se diferenciar na teca. O oócito em crescimento primário apresenta uma região próxima ao núcleo que se mostra menos corada (+), correspondendo à distribuição de diferentes organelas pelo citoplasma (coloração: HE). **E)** Corte histológico transversal do ovário em início de formação da cavidade ovariana, a partir da formação de lâminas teciduais de células somáticas na periferia da gônada (coloração: MY). **F)** Detalhe de **E** destacando a lâmina tecidual formada pelo acúmulo de células somáticas em um dos lados do ovário, que se projeta ventralmente para a cavidade celomática. Notar a invaginação existente, correspondente à formação da lamela ovígera (seta em vermelho) que se projeta para a região ventral da cavidade celomática, que tornar-se-á a cavidade ovariana, quando de seu encerramento pela fusão das lâminas teciduais (coloração: MY). **G-I)** Formação do epitélio germinativo pós-formação das lamelas ovígeras e estroma ovariano. Notar em **G** a presença de oogônias aprisionadas junto ao epitélio e envoltas por células somáticas epiteliais. No estroma em formação, nota-se a presença de uma substância PAS positiva. A partir do epitélio em formação, as oogônias dividem-se e dão origem aos cistos (**H**). Após foliculogênese e entrada em crescimento primário, o oócito deixa o cisto e segue seu desenvolvimento (**I**) (coloração: MY). **J)** Ovário totalmente diferenciado. O epitélio germinativo encontra-se definitivamente estabelecido e as lamelas ovígeras totalmente formadas pelas invaginações no tecido gonadal que se tornam mais acentuadas (seta em vermelho). O estroma ovariano permanece ainda pouco desenvolvido. Notar nos oócitos em crescimento primário, o aspecto gretado do citoplasma, correspondente à distribuição das organelas (+) (coloração: MY). **ci:** cistos; **cs:** células somáticas; **cm:** células mesenquimais; **EG:** epitélio germinativo; **es:** estroma ovariano; **f:** células foliculares; **L:** lamelas ovígeras; **n:** núcleo; **od:** oócito em início de diplóteno; **og:** oogônia; **op:** oócito em crescimento primário; **pc:** prolongamentos citoplasmáticos; **pt:** célula pré-tecal; **asterisco:** nãage; **seta aberta:** células pré-foliculares; **seta vermelha:** invaginações no tecido gonadal formando lamelas ovígeras; **símbolo de mais (+):** citoplasma gretado pela distribuição de organelas.

FIGURA 6

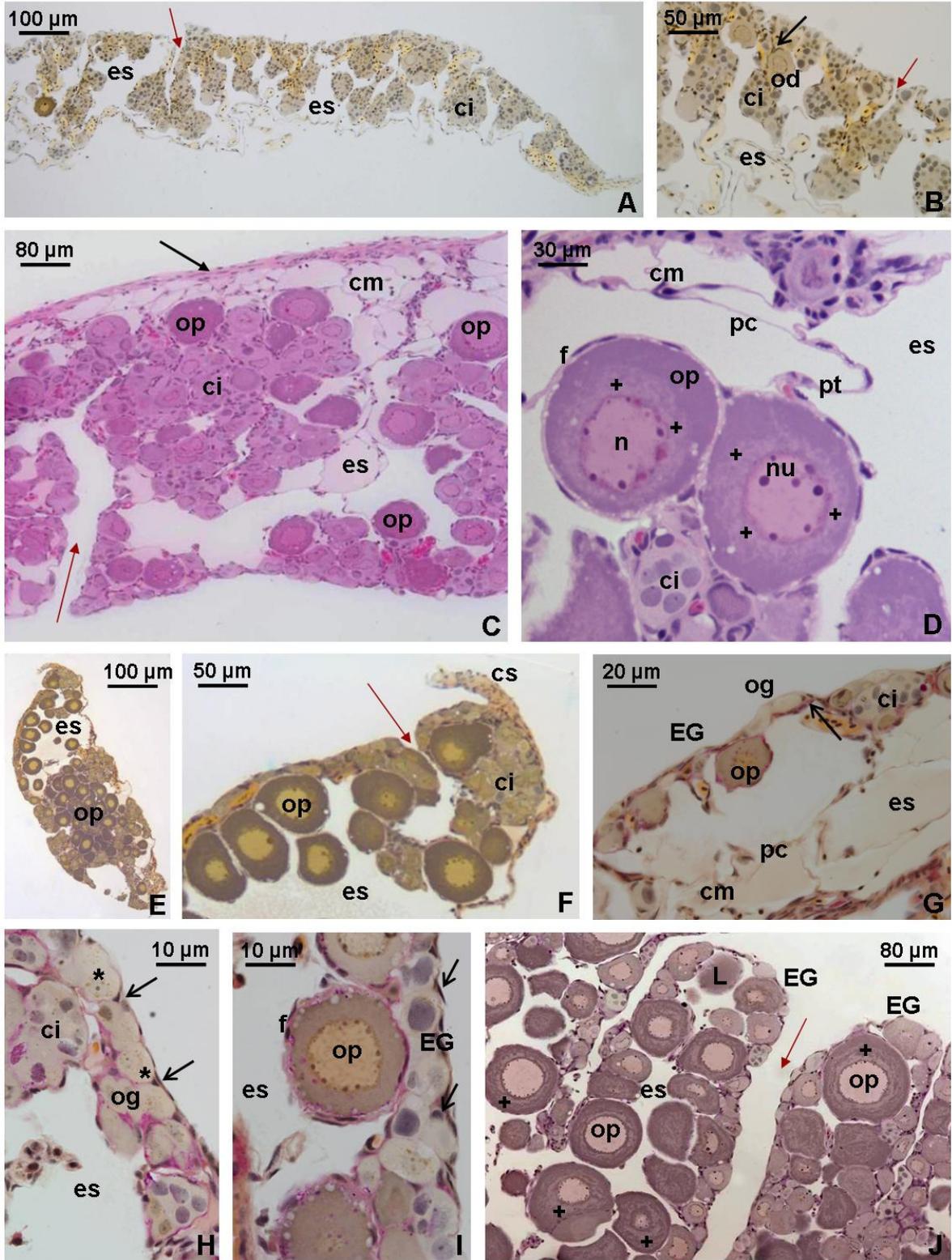


Figura 7: Cortes histológicos de ovários em diferentes períodos da diferenciação gonadal corados pelo Método de Reticulina, permitindo o acompanhamento da formação da membrana basal, pela impregnação por prata das fibras reticulares, que se coram em preto-acastanhado. **A)** Gônada indiferenciada com presença de cordões contínuos de células germinativas primordiais sendo invadidos por células somáticas. Notar que desde então, a membrana basal já separa parcialmente os componentes associados ao epitélio germinativo, dos componentes celulares que darão origem ao estroma ovariano. **B)** Cistos sendo delimitados pela membrana basal. **B-C)** Conjunto de cistos totalmente delimitado pela membrana basal. **D)** Oócitos em crescimento primário envoltos pela membrana basal em um mesmo compartimento. Notar ausência de membrana basal entre os oócitos, embora presença de células foliculares. **E)** Membrana basal sendo formada entre os folículos ovarianos. **F)** Folículo ovariano delimitado pela membrana basal. Notar região de ausência de membrana basal no folículo, região esta que se torna contínua à membrana do epitélio germinativo, mantendo o folículo conectado ao mesmo. **G)** Corte histológico longitudinal do ovário já diferenciado, mostrando separação dos folículos ovarianos do estroma ovariano, pela membrana basal. **H)** Detalhe de **G**. Folículos ovarianos totalmente circundados pela membrana basal **I)** Complexo folicular já formado. Notar a célula folicular e a teca, ambas apoiadas sobre a membrana basal. **J)** Região da membrana basal do oócito que torna-se contínua com o epitélio germinativo. Notar que as células foliculares e as células somáticas epiteliais do epitélio compartilham a mesma membrana basal. **cc:** cordões contínuos; **ci:** cistos; **EG:** epitélio germinativo; **es:** estroma ovariano; **f:** células foliculares; **n:** núcleo; **o:** oócito; **og:** oogônia; **op:** oócito em crescimento primário; **pf:** células pré-foliculares; **t:** teca; **vs:** vaso sanguíneo; **seta aberta:** região de membrana basal; **seta fechada:** células pré-foliculares.

FIGURA 7

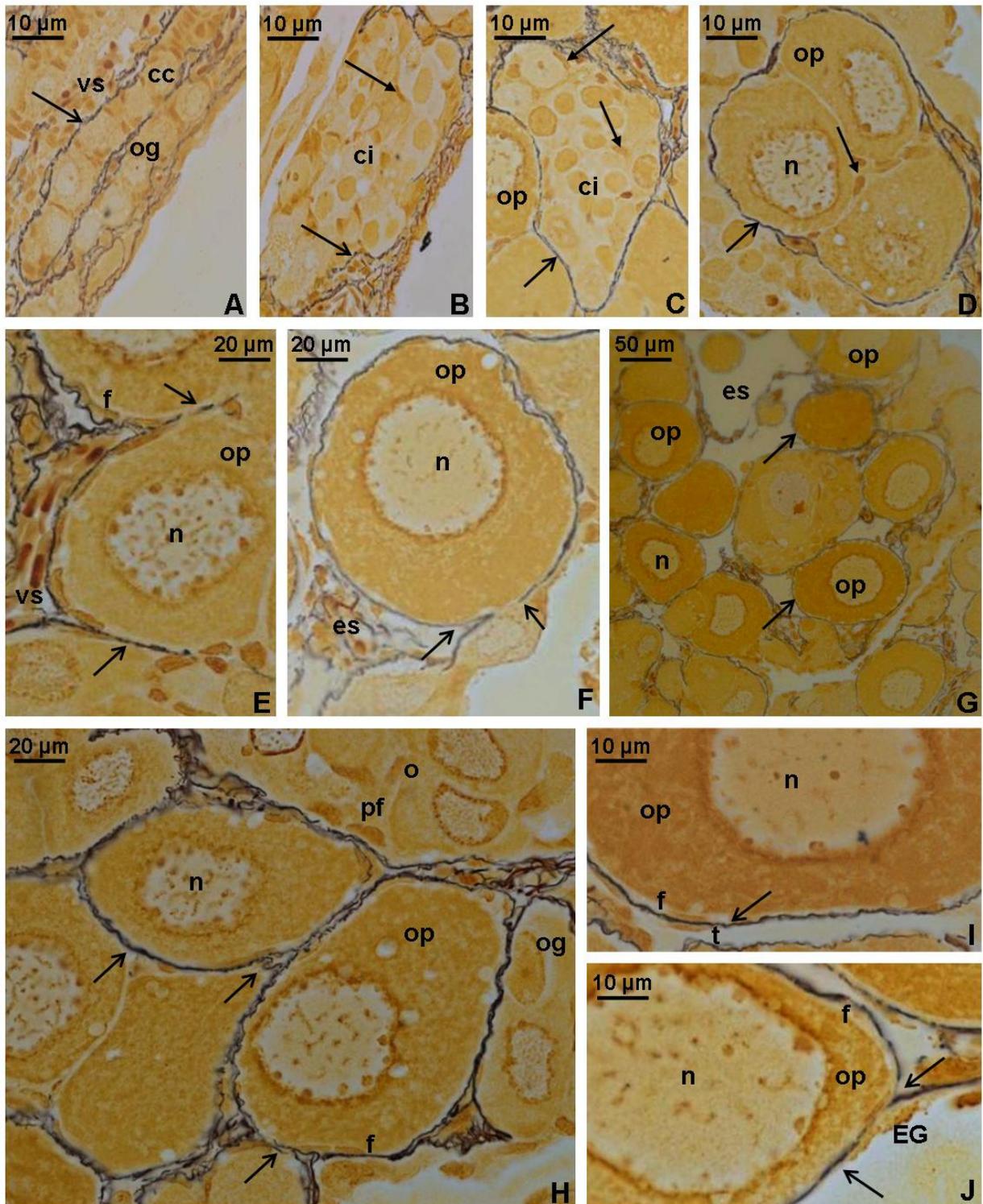


Figura 8: Micrografia eletrônica de transmissão de gônada feminina. **A)** Cordões contínuos de oogônias sendo invadidos por células somáticas. Notar limite celular das células somáticas que envolvem as oogônias, local de formação da membrana basal, isolando-as dos outros componentes celulares (barra = 4,0 μ m). **B)** Oócito paquitênico sendo envolvido pelas células somáticas epiteliais. A disposição destas células indica um processo de movimentação e migração para o interior do tecido gonadal. Notar a formação da membrana basal (barra = 5,0 μ m). **C)** Oogônia totalmente individualizada pelas células pré-foliculares (barra = 2,2 μ m). **D)** Cistos de oogônias e oócitos profásicos delimitados pela membrana basal (barra = 1,5 μ m). **E)** Cisto de oócitos profásicos envoltos por prolongamentos citoplasmáticos das células pré-foliculares. Notar a formação da membrana basal ao redor do cisto (barra = 3,0 μ m). **F)** Detalhe de **E** mostrando uma célula pré-folicular que envolve o cisto. Notar o limite citoplasmático entre ambas as células e a membrana basal circunjacente (barra = 1,8 μ m). **ci:** cistos; **cs:** células somáticas; **m:** mitocôndrias; **n:** núcleo; **o:** oócito; **og:** oogônia; **po:** pontes citoplasmáticas; **pf:** células pré-foliculares; **si:** complexo sinaptonêmico; **vs:** vaso sanguíneo; **asterisco:** núage; **seta aberta:** membrana basal; **seta fechada:** limite celular.

FIGURA 8

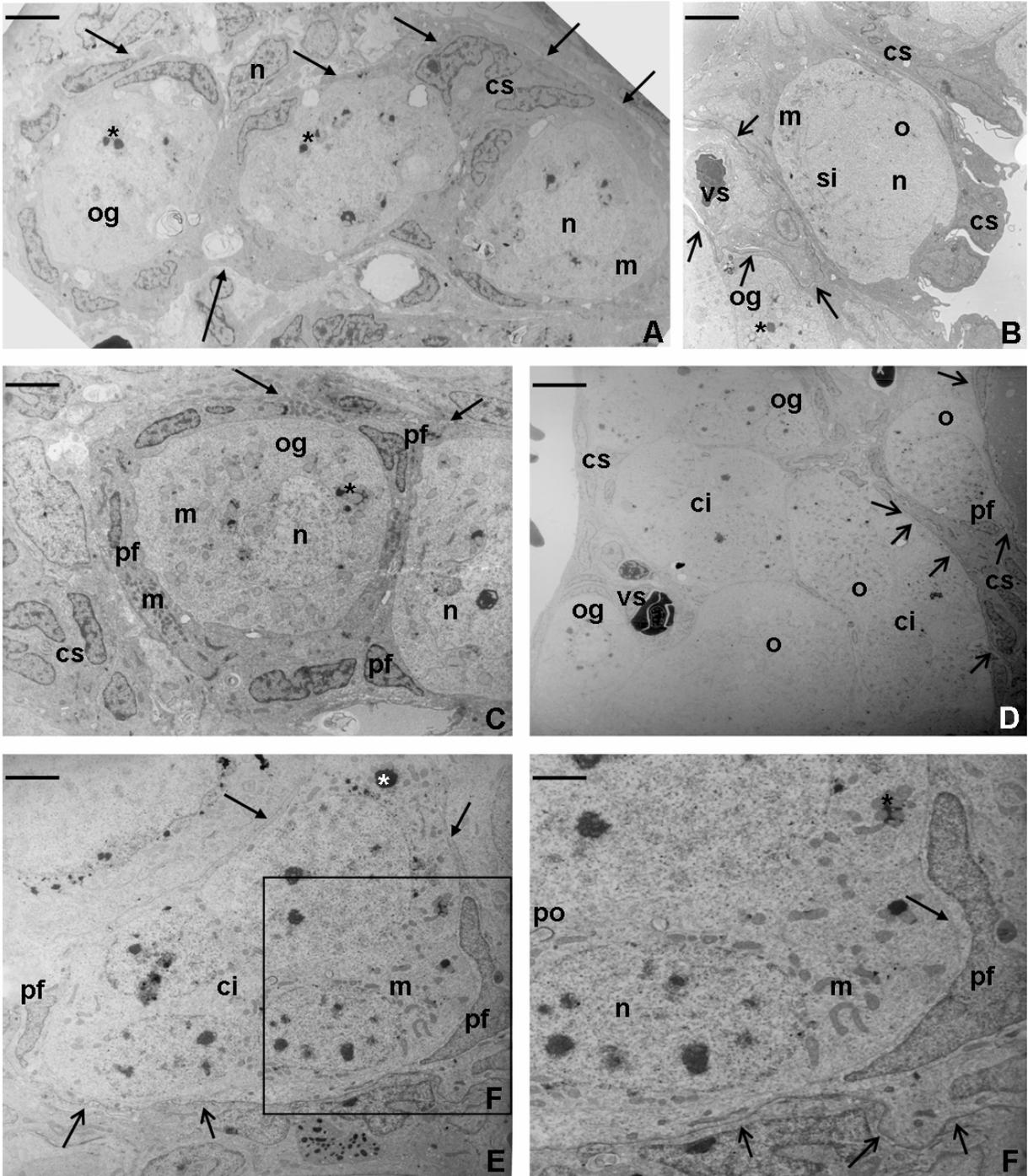


Figura 9: Micrografia eletrônica de transmissão de gônada feminina. **A)** Cistos de oócitos envoltos por células pré-foliculares. Notar prolongamentos citoplasmáticos das células somáticas (cabeça de seta). Oócito diplotênico separado do cisto compartilha ainda a mesma membrana basal que circunda os cistos (barra = 2,3 μ m). **B)** Detalhe de uma ponte citoplasmática de **A**. Entre os oócitos existem pontes citoplasmáticas resultantes do processo de divisão celular, no qual a citocinese é incompleta (barra = 0,6 μ m). **C)** Prolongamentos citoplasmáticos (cabeça de seta) de uma célula pré-folicular, que envolve e isola uma oogônia (barra = 0,7 μ m). **D)** Célula pré-folicular associada a um oócito diplotênico. Notar a continuidade da membrana basal que ainda não se interpõe entre o oócito e o cisto adjacente (barra = 2,3 μ m). **E)** Célula pré-folicular com inúmeros desmosmos que a une fortemente a outras células somáticas epiteliais (barra = 1,4 μ m). **F)** Oócito diplotênico partindo de um cisto, permanecendo conectado às células somáticas adjacentes pela membrana basal. Notar os polimorfismos das células somáticas que passam a se associar ao oócito (barra = 6,0 μ m). **G)** Detalhe de **F** mostrando região de continuidade da membrana basal, que envolve o oócito, com as células somáticas circunjacentes (barra = 4,0 μ m). **ci:** cistos; **cs:** células somáticas; **d:** desmosmos; **m:** mitocôndrias; **n:** núcleo; **o:** oócito; **po:** pontes citoplasmáticas; **pf:** células pré-foliculares; **si:** complexo sinaptonêmico; **vs:** vaso sanguíneo; **asterisco:** nuage; **cabeça de seta:** prolongamentos citoplasmáticos; **seta aberta:** membrana basal; **seta fechada:** limite celular.

FIGURA 9

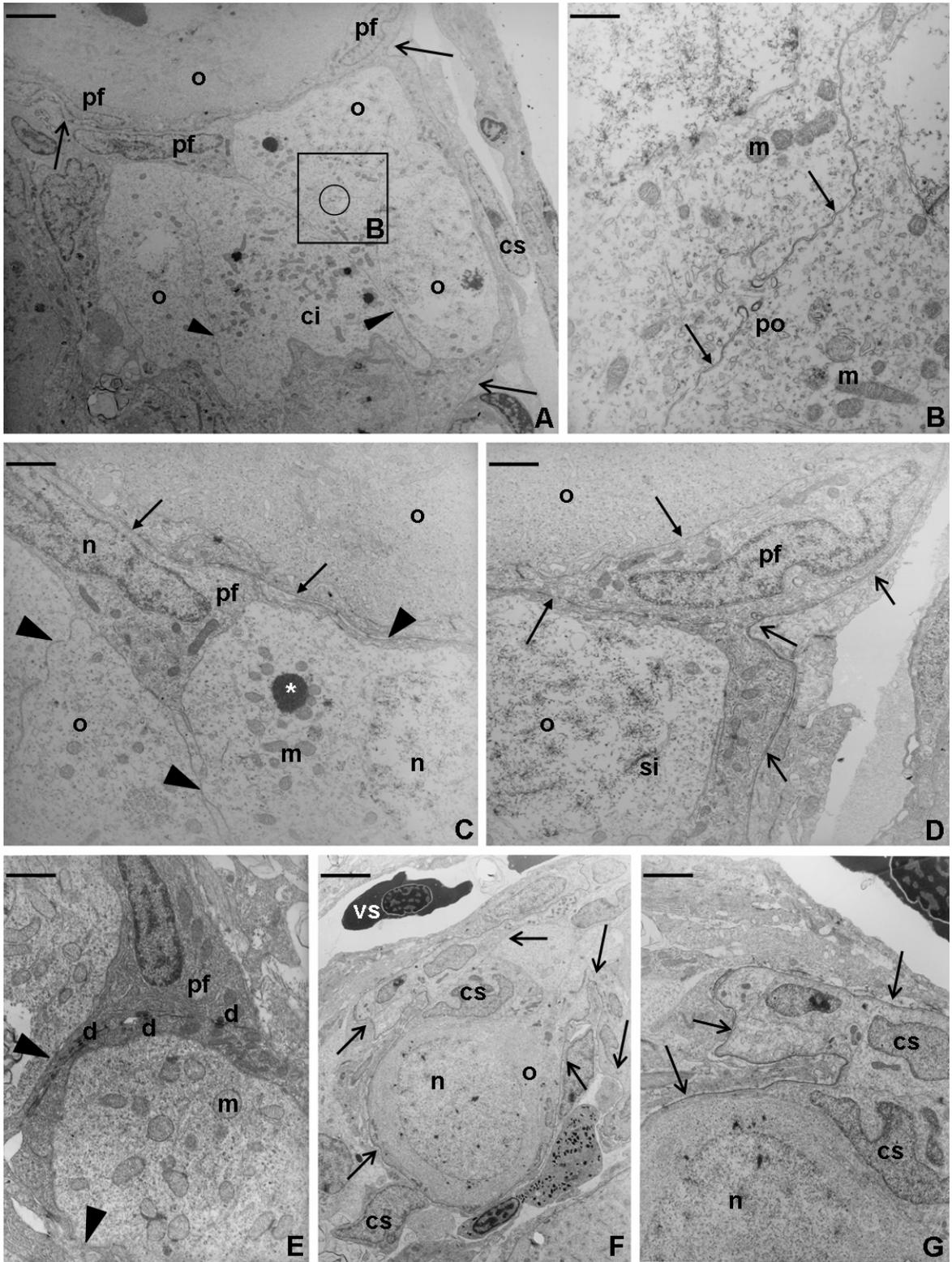


Figura 10: Micrografia eletrônica de transmissão de gônada feminina. **A)** Oócito em crescimento primário circundado por células foliculares apoiadas em uma membrana basal, que as separa dos demais componentes celulares (barra = 6,0 μ m). **B)** Membrana basal contínua com célula somática epitelial (barra = 1,7 μ m). **C)** Detalhe da superfície de dois oócitos em crescimento primário. Notar que na região adjacente aos oócitos, as células foliculares que formam o folículo ovariano compartilham uma única membrana basal. Portanto a teca ainda não se encontra formada nesta região (barra = 1,5 μ m). **D-F)** Formação da lamelas ovígeras por migração de células somáticas. **D)** Células somáticas epiteliais apoiadas sob uma membrana basal dispõem-se perpendicularmente ao tecido gonadal, indicando migração e interposição entre o tecido gonadal. Notar membrana basal já formada nos oócitos subjacentes (barra = 1,5 μ m). **E)** Invasão do tecido gonadal pelas células somáticas, que se interpõem entre dois oócitos (barra = 5,8 μ m). **F)** Detalhe de **E** mostrando as células somáticas isoladas dos folículos ovarianos pela membrana basal dos mesmos (barra = 3,2 μ m). **cs:** células somáticas; **f:** células foliculares; **n:** núcleo; **nu:** nucléolo; **o:** oócito; **op:** oócito em crescimento primário; **seta aberta:** membrana basal; **seta fechada:** limite celular.

FIGURA 10

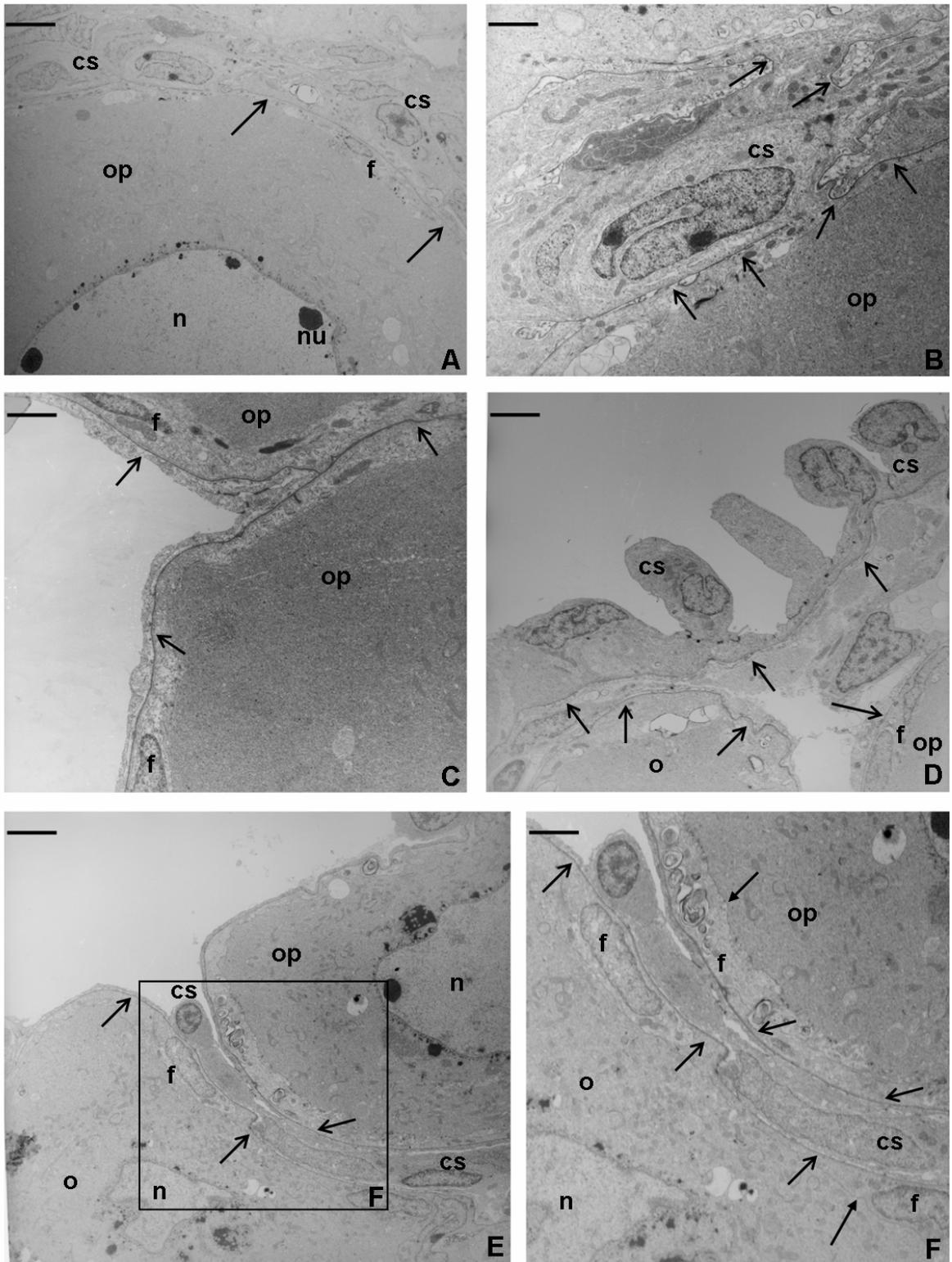


Figura 11: Micrografia eletrônica de transmissão de gônada feminina. **A)** Células mesenquimais com aspecto estrelado no estroma ovariano formando uma rede de conexões pela união entre seus prolongamentos citoplasmáticos (barra = 1,7 μ m). **B)** Célula mesenquimal se aproxima do folículo ovariano e o contata a partir de seus prolongamentos citoplasmáticos (barra = 2,0 μ m). **C)** Célula mesenquimal agora diferenciada em células pré-tecal contata o folículo ovariano, apoiando-se sob a membrana basal do folículo. Notar a presença de uma célula da teca já associada ao folículo ovariano. (barra = 1,5 μ m). **D)** Célula pré-tecal totalmente associada ao folículo ovariano. Notar a membrana basal entre a célula pré-tecal e a célula folicular (barra = 6,0 μ m). **cm:** células mesenquimais; **es:** estroma ovariano; **f:** células foliculares; **gr:** granulócito; **m:** mitocôndrias; **op:** oócito em crescimento primário; **pt:** célula pré-tecal; **t:** teca; **cabeça de seta:** prolongamentos citoplasmáticos; **seta aberta:** membrana basal; **seta fechada:** limite celular.

FIGURA 11

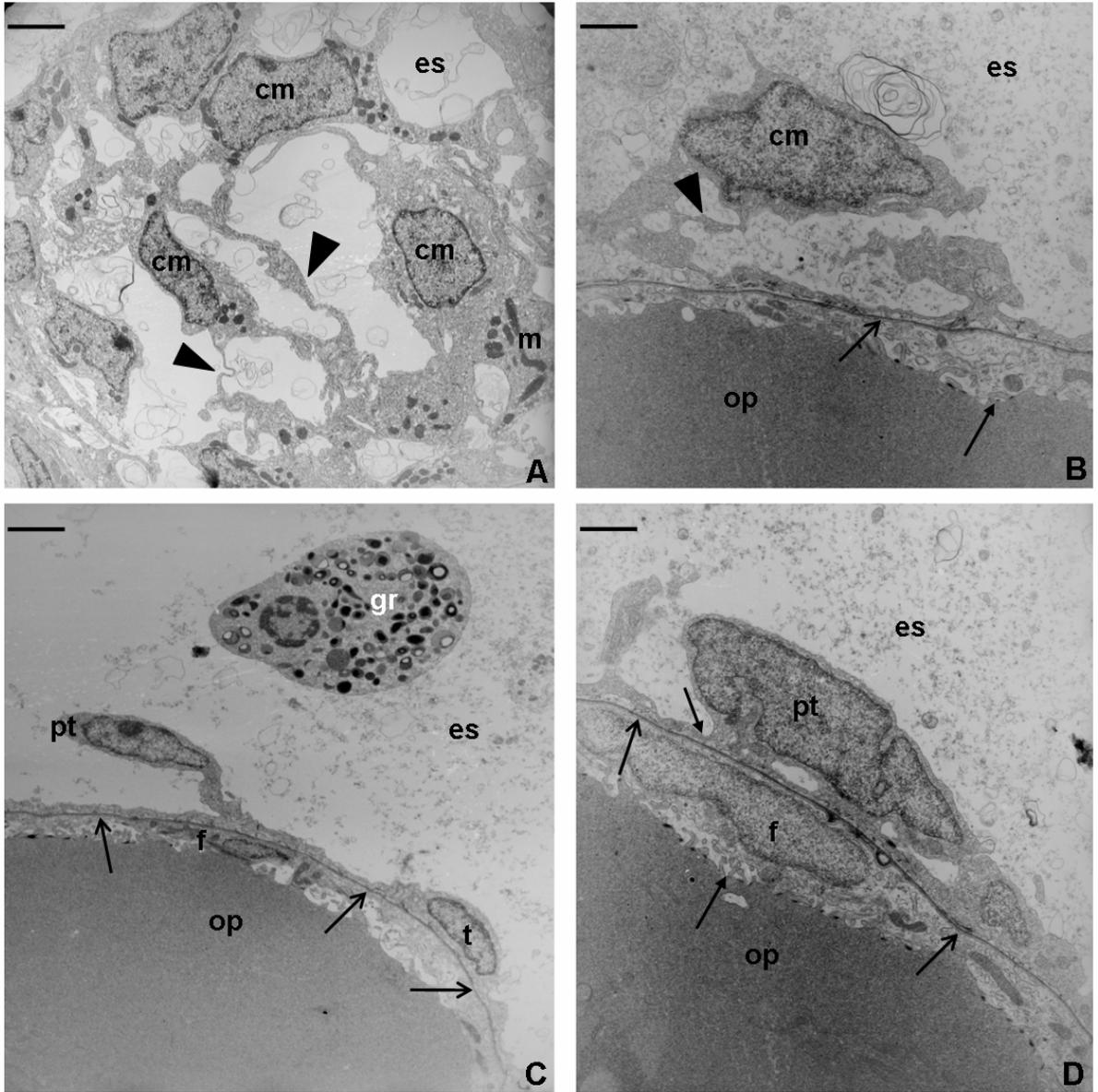


Figura 12: Micrografia eletrônica de transmissão de gônada feminina. **A)** Oócitos em crescimento primário, envolvidos pela membrana basal e separados do estroma ovariano (barra = 7,0 μ m). **B)** Detalhe de **A**. Membrana basal bastante desenvolvida dos folículos ovarianos separa as células foliculares dos demais componentes celulares presentes no estroma ovariano (barra = 1,5 μ m). **C)** Continuidade da membrana basal e seu compartilhamento entre os folículos ovarianos adjacentes (barra = 0,8 μ m). **D)** Detalhe de **C** mostrando a membrana basal do folículo ovariano (barra = 1,2 μ m). **D-E)** Detalhes de **C** mostrando a formação de microvilosidades entre o oócito e as células foliculares, e material eletrôn-denso (duplo asterisco) a ser depositado na região, correspondendo ao início da formação da zona pelúcida (barra = 1,2 e 1,6 μ m respectivamente). **F)** Oócito em crescimento primário deixando o cisto, porém ainda conectado ao mesmo pela membrana basal (barra = 8,0 μ m). **G)** Epitélio germinativo com células somáticas epiteliais (pré-foliculares) envolvendo e isolando uma célula germinativa, através de prolongamentos citoplasmáticos (barra = 4,0 μ m). **H)** Detalhe de **G** mostrando célula pré-folicular apoiada na membrana basal do epitélio germinativo. Notar a membrana basal do folículo ovariano (barra = 2,0 μ m). **cs:** células somáticas; **ci:** cistos; **d:** desmossomos; **es:** estroma ovariano; **f:** células foliculares; **m:** mitocôndrias; **mi:** microvilosidades; **n:** núcleo; **nu:** nucléolo; **og:** oogônia; **op:** oócito em crescimento primário; **pf:** célula pré-folicular; **t:** teca; **vs:** vaso sanguíneo; **asterisco duplo:** material eletrôn-denso; **cabeça de seta:** prolongamentos citoplasmáticos; **seta aberta:** membrana basal; **seta fechada:** limite celular.

FIGURA 12

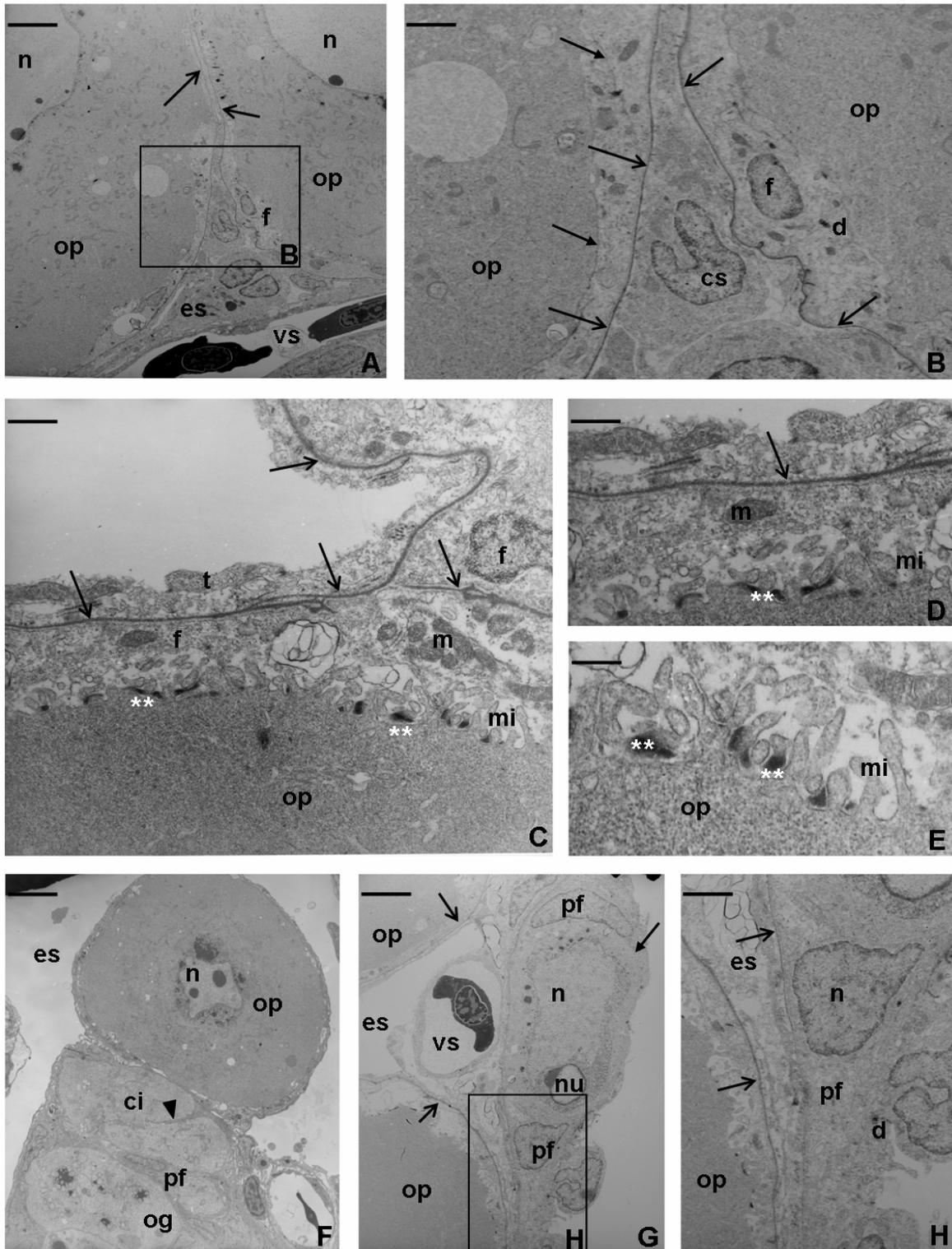


Figura 13: **A)** Corte histológico longitudinal da gônada masculina indiferenciada formada apenas por células somáticas e espermatogônias. Células somáticas (pré-Sertoli) invadem os cordões contínuos, individualizando cada célula germinativa primordial (coloração: AT). **B)** Espermatogônias individualizadas pelas agora células de Sertoli (coloração: AT). **C-D)** Corte longitudinal do testículo em início de diferenciação gonadal. As espermatogônias encistadas formam diferentes conjuntos celulares. Notar ausência de espaços entre os conjuntos celulares e ausência de luz ou lúmen no tecido gonadal (coloração: MY). **E)** Corte histológico de gônada masculina, durante início da formação dos túbulos testiculares. Notar o aparecimento de espaços entre os cistos de espermatogônias (coloração: MY). **F)** Detalhe de **E** mostrando os espaços originados entre os cistos de um mesmo conjunto celular, pelo afastamento dos cistos que o compõem (coloração: MY). **G)** Conjuntos celulares com cistos que ainda não se afastaram e conjuntos celulares já com um espaço central (coloração: MY). **H)** Fusão de conjuntos celulares adjacentes formando um espaço único (lúmen) delimitado por cistos de espermatogônias. Nesta etapa, define-se o epitélio germinativo e o túbulo testicular é formado (coloração: MY). **I)** Corte longitudinal de um testículo formado apenas por cistos de espermatogônias que delimitam diversos túbulos testiculares. **cc:** cordões contínuos de CGPs; **cl:** conjuntos celulares; **cs:** célula somática; **CGP:** célula germinativa primordial; **eg:** espermatogônia; **gr:** granulócitos; **lu:** lúmen do túbulo testicular; **n:** núcleo; **vs:** vaso sanguíneo; **asterisco:** nudge; **seta aberta:** células de Sertoli; **seta fechada:** células somáticas; **símbolo de mais (+):** espaço (luz) entre os cistos.

FIGURA 13

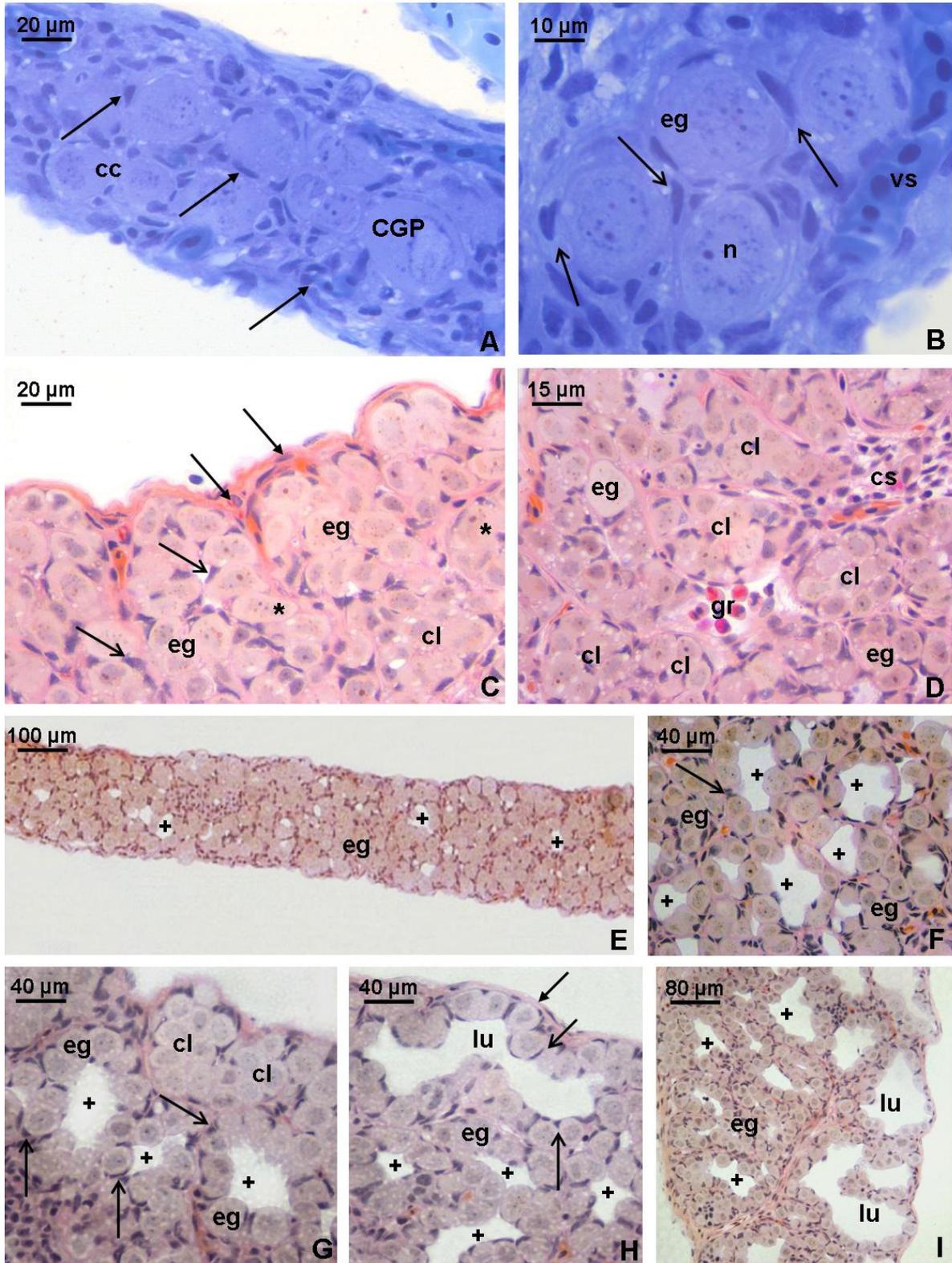


Figura 14: **A-C)** Corte histológico longitudinal de testículo: **A)** Antecedendo o início da espermatogênese (coloração: MY). **B)** Em início de espermatogênese, com túbulos testiculares ainda vazios (coloração: MY). **C)** Durante a espermatogênese; notar o aumento de cistos de espermatócitos e espermatídes (coloração: MY). **D)** Detalhe de **B** mostrando túbulos testiculares com lúmen livre de espermatozóides e poucos espermatócitos (coloração: MY). **E)** Detalhe de **C** mostrando aumento do número de células germinativas e de cistos de espermatócitos e espermatídes (coloração: MY). **F)** Corte histológico parassagital do testículo repleto de cistos em diferentes etapas da espermatogênese e início da produção de espermatozóides. Notar os lobos testiculares (coloração: MY). **G-H)** Túbulos testiculares formados por cistos de células germinativas em diferentes etapas da espermatogênese (coloração: MY). **I)** Túbulos testiculares preenchidos por espermatozóides e cistos de espermatogônias e espermatócitos. Interstício bastante reduzido (coloração: MY). **ci:** cistos; **e:** espermatócitos; **eg:** espermatogônia; **et:** espermatídes; **i:** interstício; **Lo:** lobos testiculares; **lu:** lúmen do túbulo testicular; **vs:** vaso sanguíneo; **z:** espermatozóides; **seta aberta:** células de Sertoli; **seta fechada:** células somáticas; **símbolo de mais (+):** espaço (luz) entre os cistos

FIGURA 14

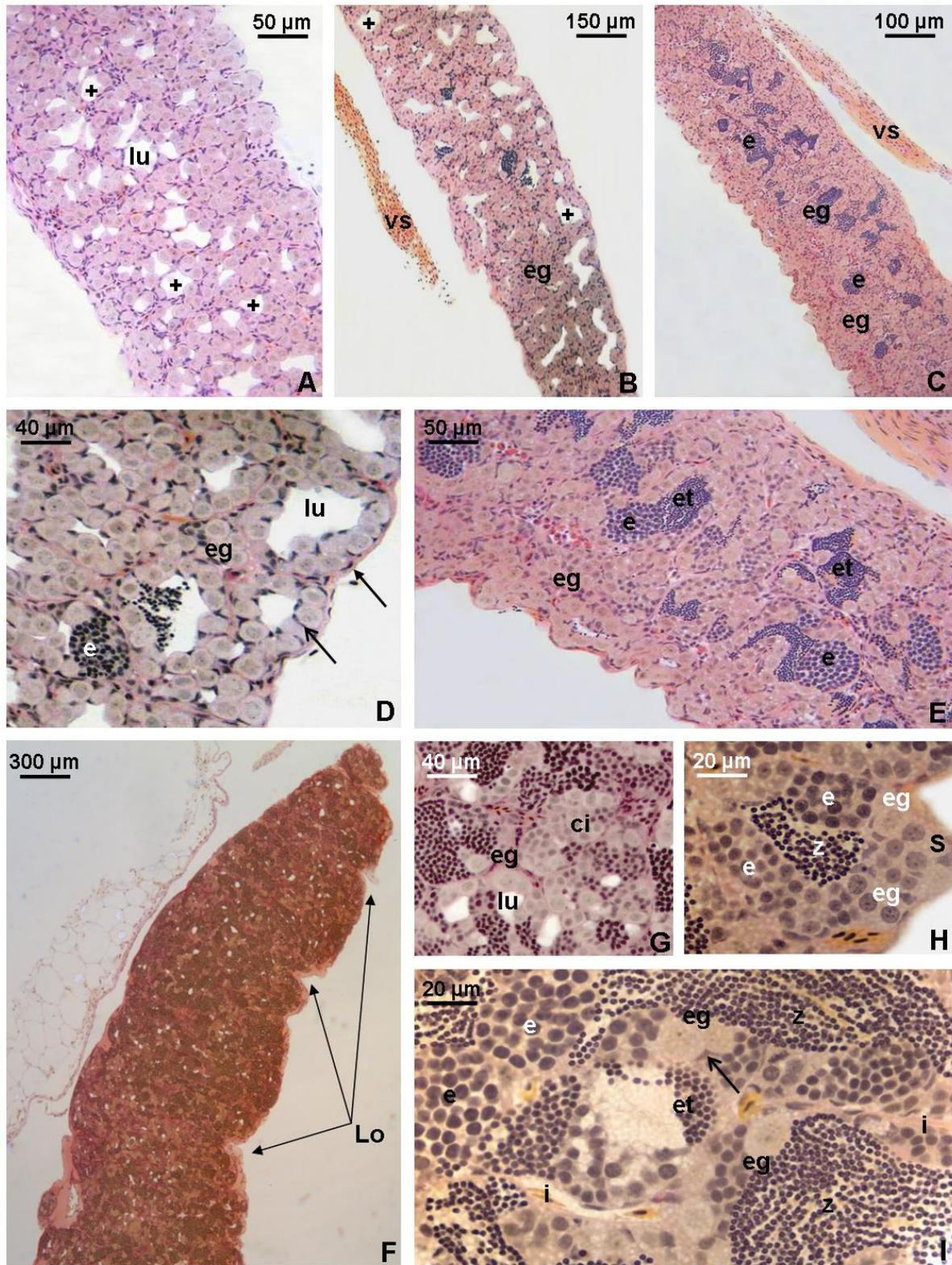


Figura 15: **A)** Compartimento intersticial e compartimento germinativo de um testículo. Aumento do número de cistos de espermatócitos e espermatídes. O número de espermatogônias é reduzido gradativamente (coloração: MY). **B)** Cistos de espermatócitos no túbulo testicular e espermatozóides em seu lúmen (coloração: MY). **C)** Corte histológico longitudinal de testículo com grande quantidade de espermatozóides e epitélio germinativo descontínuo. Ducto espermático totalmente formado pela anastomose dos túbulos testiculares na região dorsal do testículo (coloração: MY). **D)** Túbulos testiculares anastomosados. Grande quantidade de espermatozóides e presença moderada de cistos (coloração: MY). **E)** Cistos de espermatogônias, espermatócitos e espermatídes. Pouca quantidade de espermatozóides no lúmen testicular. Notar a diferença da disposição das espermatídes iniciais e espermatídes finais no interior dos cistos (coloração: AT). **F-G)** Túbulos testiculares totalmente preenchidos por espermatozóides. Epitélio germinativo descontínuo e compartimento intersticial bastante reduzido (coloração: AT). **du:** ducto espermático; **e:** espermatócitos; **ef:** espermatídes finais; **eg:** espermatogônia; **et:** espermatídes; **i:** interstício; **m:** metáfase **ta:** túbulos anastomosados; **tu:** túbulo testicular; **z:** espermatozóides.

FIGURA 15

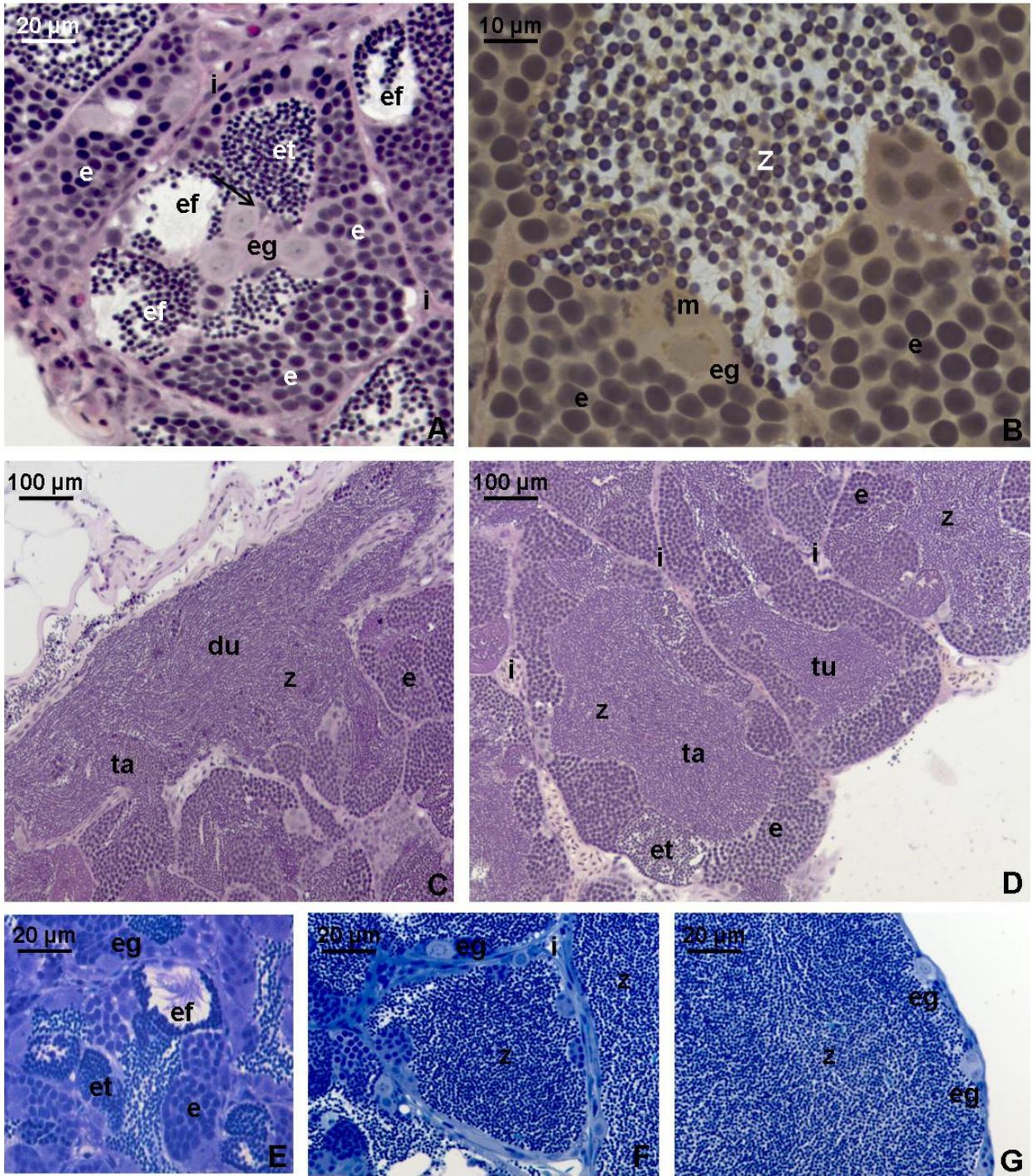


Figura 16: Cortes histológicos de testículos em diferentes períodos da diferenciação gonadal corados pelo Método de Reticulina, permitindo o acompanhamento da formação da membrana basal, pela impregnação por prata das fibras reticulares, que se coram em preto-acastanhado. **A)** Corte longitudinal de gônada indiferenciada com presença de cordões contínuos de células germinativas primordiais sendo invadidos por células somáticas. Notar que desde então, a membrana basal já separa parcialmente os componentes associados ao epitélio germinativo dos componentes celulares que darão origem ao interstício. **B)** Detalhe de **A** mostrando cordões contínuos sendo invadidos pelas células pré-Sertoli. Notar a membrana basal, delimitando-os. **C)** Conjuntos celulares de cistos de espermatogônias delimitados por uma membrana basal. Notar ausência de luz entre os conjuntos celulares ou entre os cistos de um mesmo conjunto. **D)** Corte longitudinal de gônada em diferenciação, formada por diversos conjuntos celulares que se distribuem ao longo do tecido gonadal. Reparar que estes estão sempre delimitados por uma membrana basal que os separa dos componentes intersticiais. **E)** Detalhe de **D**. Cistos de um mesmo conjunto celular se afastam, originando um espaço entre eles (+). Membrana basal permanece somente ao redor dos conjuntos celulares e nunca em seu interior. **F)** Fusão entre dois conjuntos celulares delimitados por uma membrana basal. Notar ausência de membrana basal na região de fusão (seta branca). **G)** Corte longitudinal de uma gônada masculina, agora com grande quantidade de cistos de espermatogônias e túbulos testiculares já formados. **H)** Detalhe de **G** mostrando túbulos adjacentes separados por prolongamentos citoplasmáticos (cabeça de seta) das células somáticas. Estas ao se afastarem, permitem a fusão entre os dois conjuntos celulares, formando o lúmen dos túbulos testiculares. Notar que todo o conjunto está delimitado por uma membrana basal e ausência desta em seu interior. **I)** Corte longitudinal de um testículo que apresenta cistos de espermatogônias e espermátócitos. **J)** Detalhe de **I** mostrando um túbulo testicular formado por cistos de espermatogônias e espermátócitos, totalmente delimitado pela membrana basal. **K)** Túbulos testiculares com espermatozóides em seu lúmen. Notar que entre dois túbulos, circundados por uma membrana basal contínua, esta não se faz presente entre os túbulos, indicando uma região na qual se dará uma anastomose. **L)** Corte longitudinal de testículo com ducto testicular já formado. Notar a disposição dos túbulos testiculares ao longo do tecido gonadal e presença de inúmeras anastomoses entre os mesmos. **M)** Detalhe de **L**. Túbulos anastomosados são circundados por uma membrana basal contínua. **N)** Detalhe de **L**. Túbulos testiculares que não sofreram anastomoses, sendo circundados integralmente pela membrana basal. **O)** Detalhe de **L**. Túbulos testiculares sofrem anastomoses e o epitélio germinativo torna-se descontínuo, com reduzido número de cistos. **cc:** cordões contínuos; **ci:** cistos; **cl:** conjuntos celulares; **du:** ducto espermático; **e:** espermátócitos; **eg:** espermatogônia; **i:** interstício; **ta:** túbulos anastomosados; **tu:** túbulo testicular; **vs:** vaso sanguíneo; **z:** espermatozóides; **cabeça de seta:** prolongamentos citoplasmáticos; **seta aberta:** região de membrana basal; **seta fechada:** células de Sertoli; **símbolo de mais (+):** espaço (luz) entre os cistos.

FIGURA 16

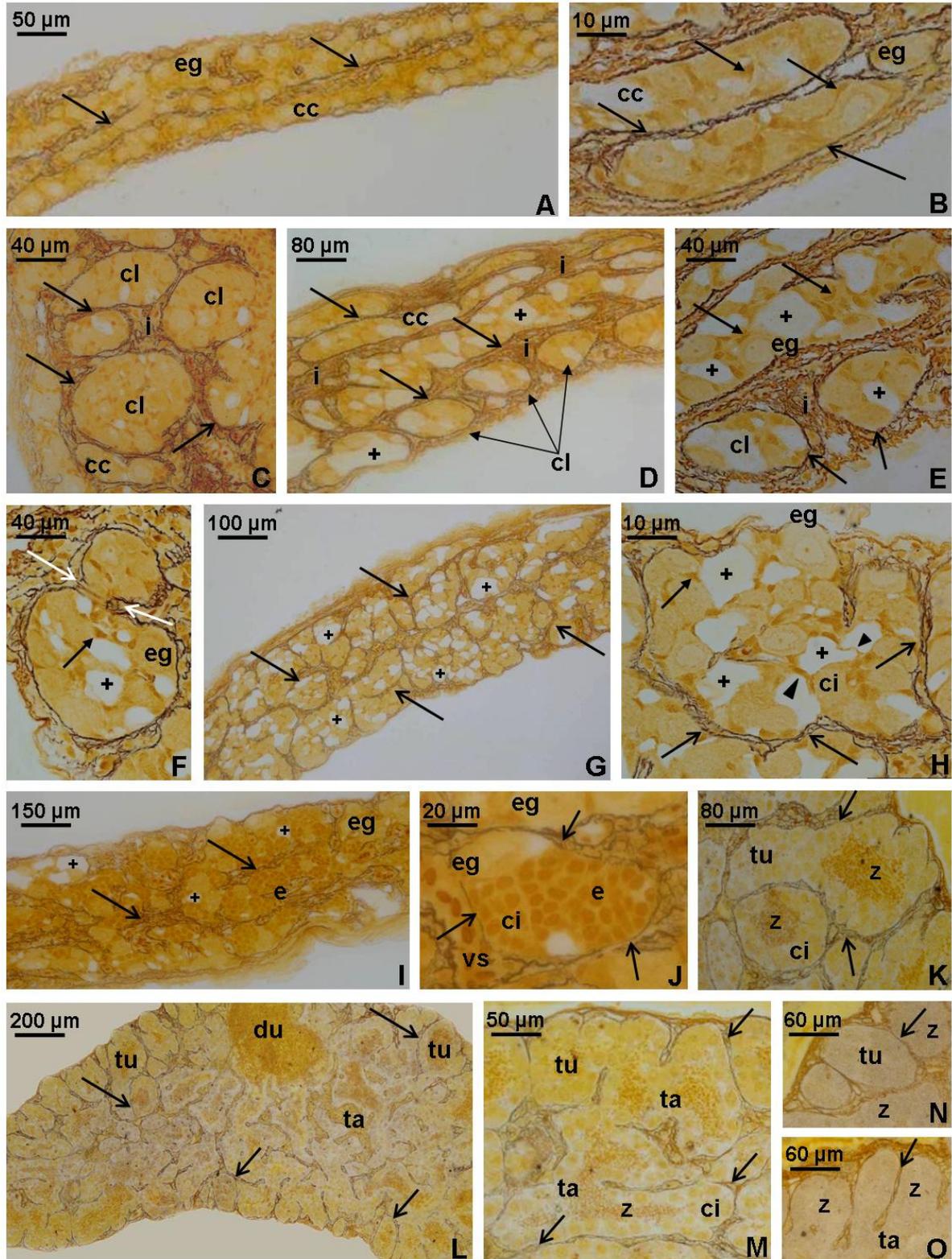


Figura 17: Micrografia eletrônica de transmissão de gônada masculina. **A)** Cordões contínuos de espermatogônias sendo invadidos por células pré-Sertoli. Não é possível notar região de membrana basal (barra = 8,0 μ m). **B)** Prolongamentos de uma célula pré-Sertoli, que envolve uma espermatogônia. Notar o limite celular da célula pré-Sertoli, possível região de formação de membrana basal (barra = 2,0 μ m). **C)** Célula pré-Sertoli, com as mesmas características de células de Sertoli, disposta entre as espermatogônias. Notar núcleo triangular, nucléolo evidente e prolongamentos citoplasmáticos (cabeça de seta) (barra = 2,0 μ m). **D)** Formação de um conjunto celular composto por cistos de espermatogônias. Notar que o conjunto celular é delimitado por células somáticas, apoiadas em uma membrana basal (barra = 3,5 μ m). **E)** Detalhe de **D** mostrando região de formação da membrana basal, que separa o conjunto celular dos componentes intersticiais (barra = 1,8 μ m). **F)** Cistos de um mesmo conjunto celular iniciam processo de afastamento (setas cruzadas), formando um pequeno espaço entre eles (barra = 7,0 μ m). **G)** Detalhe de **F** mostrando uma espermatogônia totalmente envolta por prolongamentos das células de Sertoli, antes mesmo do início do afastamento entre os cistos (barra = 1,7 μ m). **cl:** conjuntos celulares; **cs:** células somáticas; **d:** desmosomos; **eg:** espermatogônia; **m:** mitocôndrias; **n:** núcleo; **nu:** nucléolo; **ps:** células pré-Sertoli; **vs:** vaso sanguíneo; **asterisco:** nüage; **cabeça de seta:** prolongamentos citoplasmáticos; **seta aberta:** membrana basal; **setas cruzadas:** afastamento dos cistos no interior de um conjunto celular, dando origem a um espaço central; **seta fechada:** limite celular.

FIGURA 17

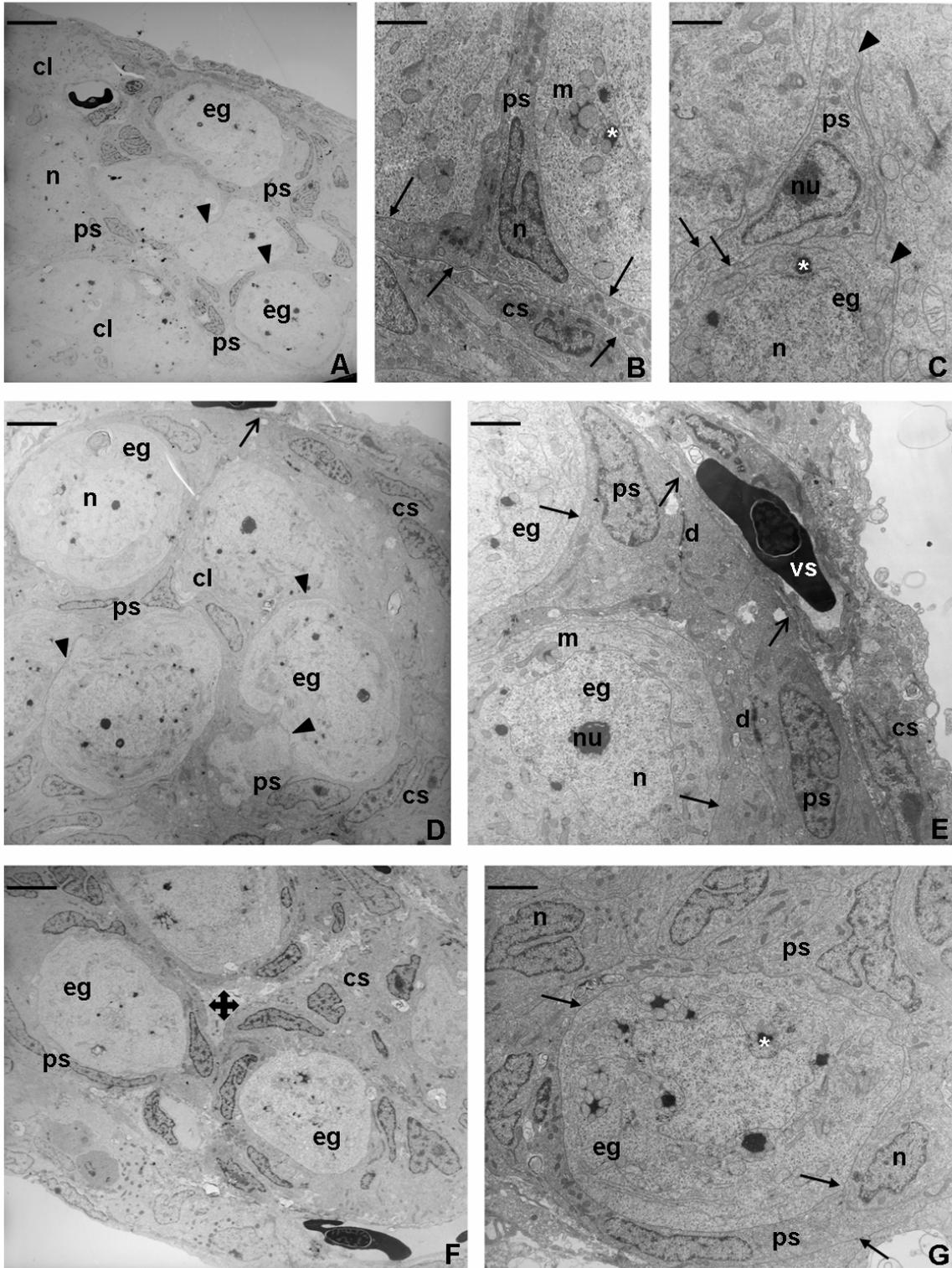


Figura 18: Micrografia eletrônica de transmissão de gônada masculina. **A)** Maior afastamento entre os cistos de um mesmo conjunto celular, levando à formação de uma pequena luz ou lúmen central (setas cruzadas) (barra = 5,0 μ m). **B)** Detalhe de **A**. Notar a grande quantidade de restos citoplasmáticos no interior da luz formada. Esta luz entre os cistos é delimitada por prolongamentos citoplasmáticos das células de Sertoli que envolvem as espermatogônias. Notar que os cistos estão delimitados por uma membrana basal (barra = 2,0 μ m). **C)** Maior afastamento entre os cistos, conseqüentemente o lúmen torna-se maior entre os cistos (barra = 6,0 μ m). **D)** Lúmen sendo formado. Notar os prolongamentos citoplasmáticos em seu interior (cabeça de seta) e células de Sertoli sempre envolvendo as espermatogônias (barra = 4,0 μ m). **E)** Conjuntos celulares com lúmen formado, agora confluem para a formação de um lúmen único. Interstício pode ser observado entre os conjuntos celulares adjacentes (barra = 5,0 μ m). **F)** Detalhe do lúmen formado em **E**. Notar os prolongamentos citoplasmáticos das células de Sertoli que compõem os cistos de espermatogônias (barra = 2,0 μ m). **cl:** conjuntos celulares; **cs:** células somáticas; **eg:** espermatogônia; **i:** interstício; **m:** mitocôndrias; **n:** núcleo; **nu:** nucléolo; **S:** célula e Sertoli; **asterisco:** núage; **cabeça de seta:** prolongamentos citoplasmáticos; **seta aberta:** membrana basal; **setas cruzadas:** afastamento dos cistos, dando origem a um espaço central (luz ou lúmen); **seta fechada:** limite celular.

FIGURA 18

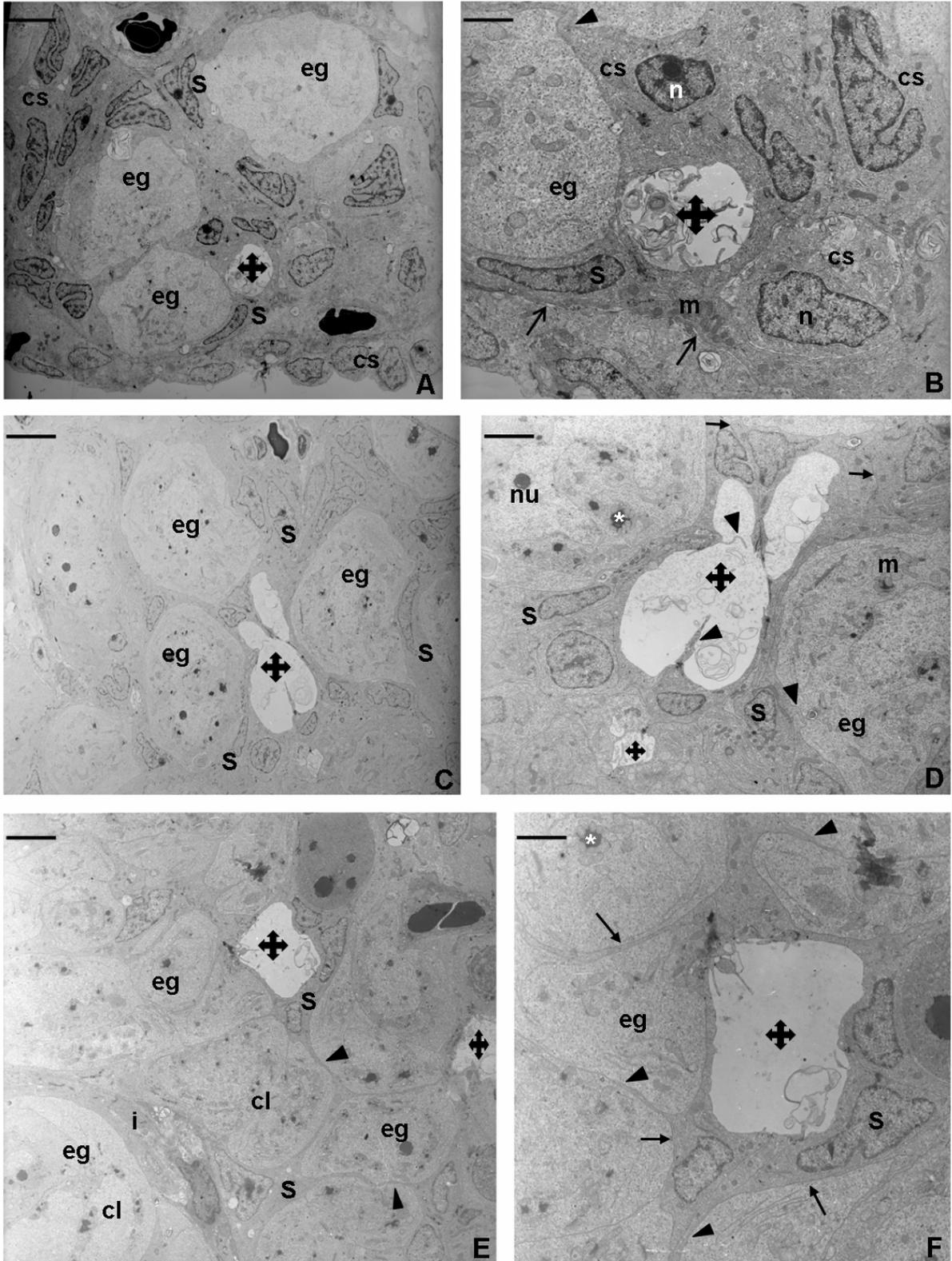


Figura 19: Micrografia eletrônica de transmissão de gônada masculina. **A)** Inúmeros espaços formados no interior de conjuntos celulares distintos (setas cruzadas) (barra = 7,0 μ m). **B)** Espaço de dois conjuntos celulares adjacentes, delimitados por prolongamentos citoplasmáticos de uma mesma célula de Sertoli (barra = 8,0 μ m). **C)** Rede formada por prolongamentos citoplasmáticos (cabeça de seta) de células somáticas no interior dos espaços criados pelo afastamento dessas células (barra = 2,5 μ m). **D)** Detalhe de **C**. Reparar nos prolongamentos citoplasmáticos de duas células somáticas que se contatam (cabeça de seta). Ao deixarem de se contatar, os espaços adjacentes (setas cruzadas) tornam-se único (barra = 0,5 μ m). **E)** Após afastamento das células somáticas entre conjuntos celulares adjacentes, o lúmen é formado, sendo delimitado por cistos de espermatogônias. Está formado o túbulo testicular (barra = 3,0 μ m). **F)** detalhe de **E** mostrando que o lúmen é delimitado por prolongamentos das células de Sertoli que formam o cisto, sendo que a espermatogônia nunca está exposta diretamente para a luz (barra = 1,0 μ m). **ci:** cistos; **cl:** conjuntos celulares; **cs:** células somáticas; **eg:** espermatogônia; **i:** interstício; **n:** núcleo; **S:** célula e Sertoli; **cabeça de seta:** prolongamentos citoplasmáticos; **seta aberta:** membrana basal; **setas cruzadas:** lúmen formado entre os cistos no interior de diferentes conjuntos celulares.

FIGURA 19

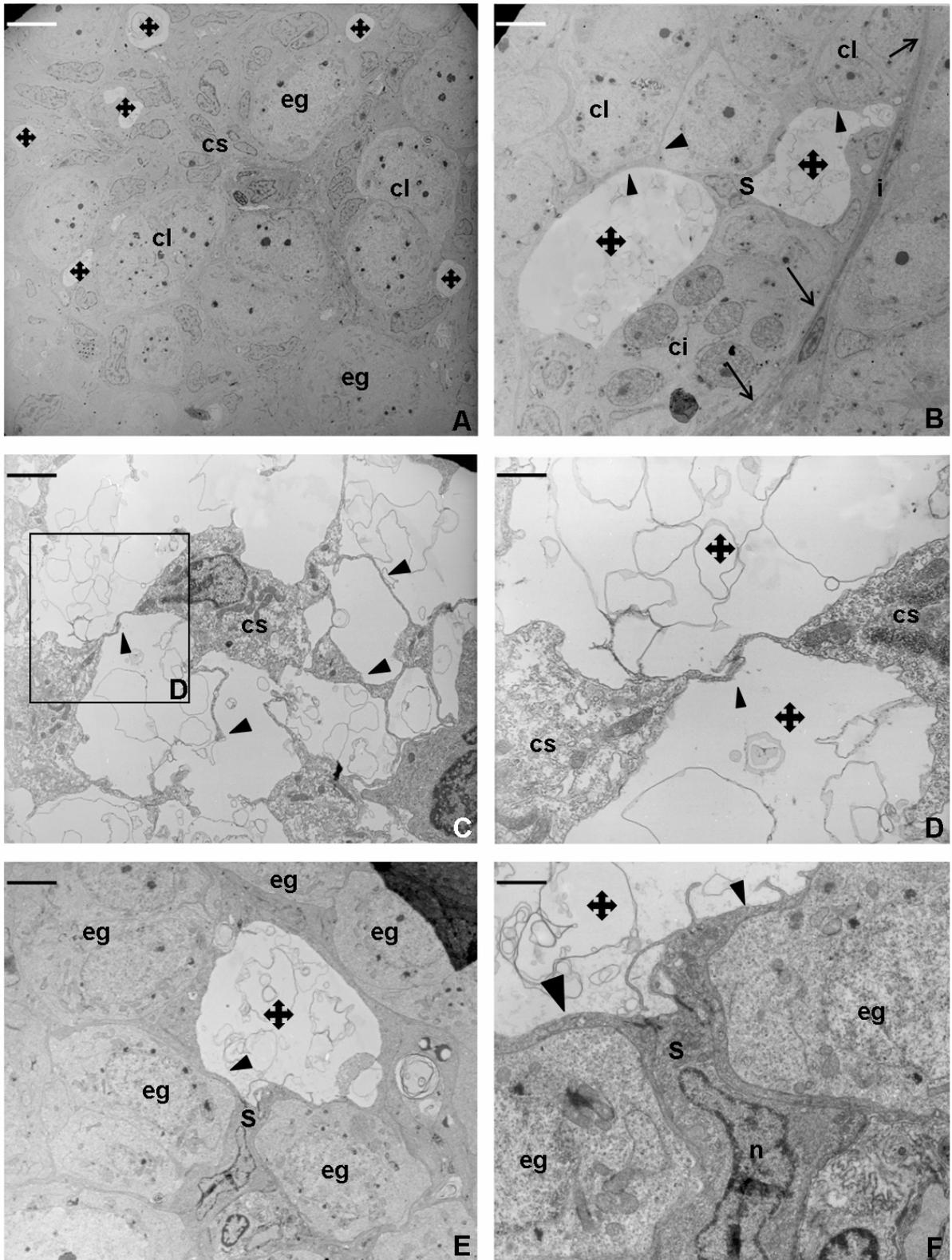
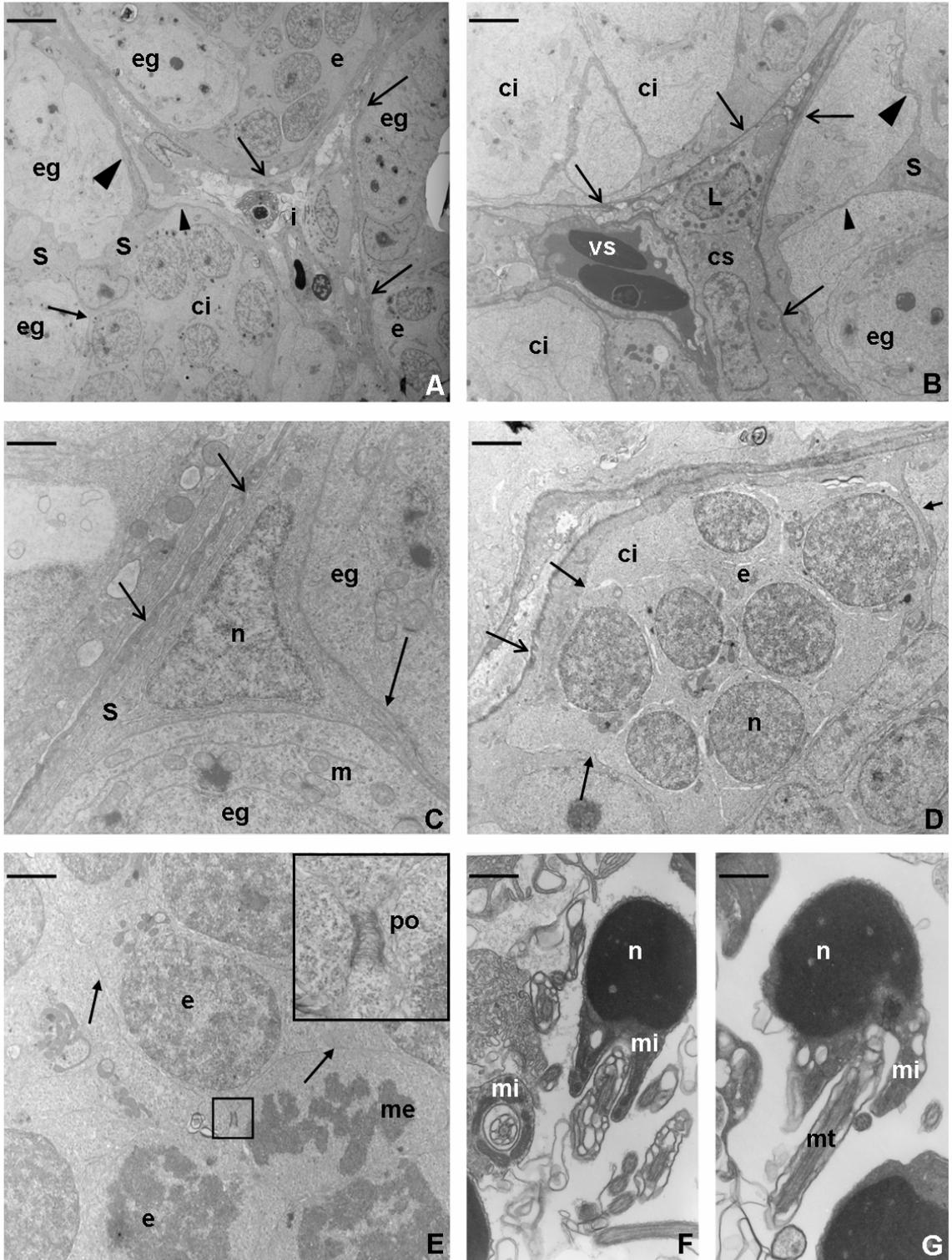
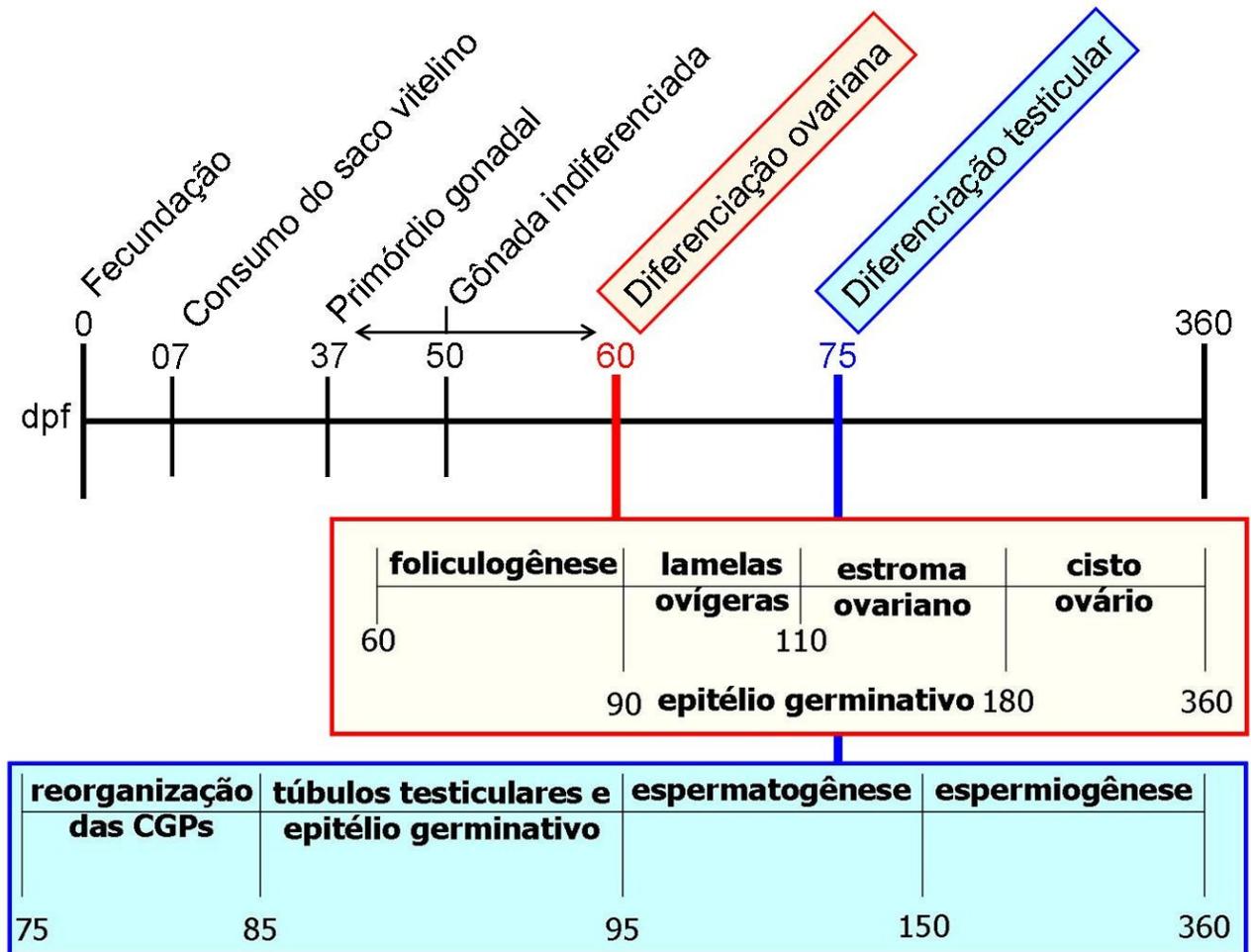


Figura 20: Micrografia eletrônica de transmissão de gônada masculina. **A)** Diferentes túbulos testiculares formados por cistos de espermatogônias e espermatócitos, apoiados sobre uma membrana basal. Notar o início do desenvolvimento e diferenciação do interstício (barra = 8,0 μ m). **B)** Detalhe de uma região de interstício, na qual se encontram células somáticas, vasos sanguíneos e uma célula de Leydig. Notar os túbulos testiculares ao redor, separados do interstício por uma membrana basal (barra = 3,0 μ m). **C)** Célula de Sertoli, com núcleo triangular, apoiada sobre a membrana basal e emitindo prolongamentos citoplasmáticos que envolvem as espermatogônias adjacentes (barra = 1,0 μ m). **D)** Cisto de espermatócitos, delimitados por prolongamentos citoplasmáticos das células de Sertoli que se apóiam sobre uma membrana basal (barra = 4,0 μ m). **E)** Cisto de espermatócito em diferentes etapas da divisão celular (espermatócitos profásicos e metafásicos). Entre os espermatócitos, nota-se a formação de pontes citoplasmáticas. No detalhe, uma ponte citoplasmática, resultante do processo de divisão celular, com citocinese incompleta, apresentando reforços de membrana (barra = 1,5 μ m). **F-G)** Espermatozóides de *Cyprinus carpio* no lúmen testicular. Núcleo altamente eletrôn-denso e citoplasma bastante reduzido. Mitocôndrias se dispõem ao redor do flagelo em formação. Notar em **F** corte transversal da porção inicial do flagelo, na qual o axonema é envolto por grande quantidade de mitocôndrias que o circundam (barra = 1,0 μ m). **G)** Notar microtúbulos do axonema que compõem o flagelo do espermatozóide (barra = 0,7 μ m). **ci:** cistos; **e:** espermatócitos; **eg:** espermatogônia; **i:** interstício; **L:** célula de Leydig; **m:** mitocôndrias; **me:** metáfase; **mi:** mitocôndrias da peça intermediária do espermatozóide; **mt:** microtúbulos do axonema que formam o flagelo do espermatozóide; **n:** núcleo; **po:** ponte citoplasmática com reforço de membrana **S:** célula de Sertoli; **vs:** vaso sanguíneo; **cabeça de seta:** prolongamentos citoplasmáticos; **seta aberta:** membrana basal; **seta fechada:** limite celular.

FIGURA 20



CRONOLOGIA DA DIFERENCIAÇÃO GONADAL



Principais eventos da diferenciação gonadal feminina e masculina, ao longo do tempo (dias pós-fertilização - dpf), durante o período de um ano, desde o momento da fecundação (zero hora).

DISCUSSÃO

O epitélio germinativo, permanentemente ativo, é a fonte de renovação celular que assegura e mantém a continuidade da gametogênese nos peixes. Na última década os estudos de Grier e colaboradores sobre dinâmica do epitélio germinativo propiciaram um novo entendimento dos eventos cíclicos de desenvolvimento gonadal pelos quais os machos (Grier e Taylor, 1998; Grier e Lo Nostro, 2000; Grier, 2002) e as fêmeas (Grier, 2000, 2002; Grier *et al.*, 2005; 2007) dos Teleostei passam ao longo da vida reprodutiva. Todos estes estudos conduzidos com indivíduos sexualmente adultos e conseqüentemente com um epitélio germinativo ativo, deixam, no entanto, uma lacuna no que se refere ao conhecimento da formação do próprio epitélio germinativo.

Os vários relatos existentes sobre a diferenciação gonadal nos Teleostei (Davies e Takashima, 1980; Timmermans e Taverne, 1983; Colombo *et al.*, 1984; Parmentier e Timmermans, 1985; Colombo e Grandi, 1996; Grandi e Colombo, 1997; Meijide *et al.*, 2005, Otani *et al.*, 2005; Çek, 2006), inclusive em *Cyprinus carpio* (Winkoop *et al.*, 1992; Timmermans *et al.*, 1996), em geral abordam a origem das células germinativas primordiais, e sua associação com as células somáticas na organização das estruturas gonadais, mas não têm, até então, se ocupado com a formação do epitélio em si. Além disso, estes estudos partem geralmente de secções transversais das gônadas em desenvolvimento o que impossibilita a visão do processo como um todo. Para que a formação do epitélio germinativo pudesse ser realmente acompanhada e que esperançosamente pudesse ser um modelo para os estudos dessa natureza, a diferenciação gonadal em *C. carpio*, desde a constituição do primórdio gonadal até sua organização final em um ovário ou testículo foi acompanhada histologicamente, através de secções transversais, longitudinais ou parassagittais, e complementadas com análises ultra-estruturais.

O primórdio gonadal

Em *Cyprinus carpio*, aqui analisado, o primórdio gonadal foi detectado em animais com sete dias pós-fertilização, no primeiro dia após total absorção do saco vitelínico pelo animal em desenvolvimento. O intervalo de zero a sete dias pós-fertilização, inclui a embriogênese, e é tido como o período no qual ocorre a migração das células germinativas primordiais a partir de

regiões extragonadais para a crista gonadal resultando na formação do primórdio gonadal (Sato, 1974; Hamaguchi, 1982; Timmermans e Taverne, 1989; Winkoop *et al.*, 1992; Flores e Burns, 1993). O primórdio gonadal está presente em ambos os lados da bexiga natatória e dorsalmente ao intestino, sendo identificado pela presença de grandes células germinativas primordiais rodeadas por células somáticas oriundas da crista gonadal (Parmentier e Timmermans, 1985; Timmermans *et al.*, 1996; presente estudo). Decorrente do seu recente processo de migração, as células germinativas primordiais apresentam inicialmente formas elípticas (Çek, 2006; presente estudo), tornando-se mais esféricas na gônada indiferenciada.

Antecedendo a diferenciação gonadal, a maioria das células somáticas presentes no tecido gonadal de *Cyprinus carpio* são morfologicamente semelhantes tanto nas gônadas supostamente masculinas como nas femininas e parecem ser provenientes de um epitélio celomático (mesotélio da crista gonadal), tendo, portanto, origem epitelial, como relatado por Nakamura e colaboradores (1974) e Devlin e Nagahama (2002). Com o início da diferenciação gonadal, um outro tipo celular é detectado – as células somáticas que irão compor o tecido intersticial das gônadas. Estas, ainda indiferenciadas e com aspecto estrelado, teriam uma origem mesenquimal, sendo provenientes do mesênquima subjacente ao epitélio celomático (Devlin e Nagahama, 2002).

Sucessivos ciclos mitóticos das células germinativas primordiais, e das células somáticas levam ao povoamento da gônada em desenvolvimento (Winkoop *et al.*, 1992), que se alonga e torna-se mais espessa (Hliwa *et al.*, 2003). Apesar do alongamento e espessamento progressivo do primórdio gonadal em *Cyprinus carpio*, divisões mitóticas das células germinativas primordiais, não foram documentadas.

Portanto, durante todo o período compreendido entre 07 e 30 dias pós-fertilização, o primórdio gonadal em *Cyprinus carpio* não apresenta outras mudanças morfológicas que não o aumento na quantidade de células somáticas presentes. Mantém-se como uma estrutura formada apenas por células somáticas e pelas células germinativas primordiais, as quais permanecem raras e isoladas. Nem mesmo a formação de vasos sanguíneos é detectada no período. Portanto define-se aqui como “primórdio gonadal” o tecido gonadal em desenvolvimento, ou seja, a gônada em formação, constituída apenas de células germinativas primordiais e células somáticas, com ausência total de vasos sanguíneos.

A gônada indiferenciada

Em *Cyprinus carpio* a partir de 37 dias pós-fertilização, as células germinativas primordiais ainda isoladas entre as células somáticas, aumentam consideravelmente em número e os primeiros vasos sanguíneos são detectados, principalmente próximos às células germinativas primordiais. A proximidade das células germinativas primordiais com vasos sanguíneos parece estar associada ao aporte e percepção de diferentes estímulos (Devlin e Nagahama, 2002), como os estímulos hormonais que atuam na diferenciação celular e que se difundem através da circulação sanguínea (Çek, 2006). O até então primórdio gonadal passa a constituir uma gônada indiferenciada, na qual células germinativas primordiais encontram-se espalhadas isoladamente entre as células somáticas principalmente na região central da gônada. Esse arranjo do tecido gonadal e disposição das células germinativas primordiais parecem resultar do descompasso existente entre proliferação de células somáticas - anterior e/ou mais rápida - do que a proliferação das células germinativas primordiais. Como consequência, a gônada se alonga; as células germinativas ficam isoladas, sendo interceptadas por segmentos gonadais formados unicamente por células somáticas (Winkoop *et al.*, 1992; Strüssmann *et al.*, 1996; Lin *et al.*, 1997; Meijide *et al.*, 2005; presente estudo).

Para alguns autores (Colombo e Grandi, 1996; Hendry *et al.*, 2002) o aumento do número de células germinativas primordiais neste momento deve-se à migração tardia das células germinativas primordiais a partir de regiões extragonadais e justificam assim a ausência de divisões mitóticas neste período. É certo que o período de migração das células germinativas primordiais de regiões extragonadais para as gônadas é bastante variável, dependendo da espécie em questão. No Anguilliformes, *Anguilla anguilla*, por exemplo, a presença de células bastante semelhantes às células germinativas primordiais na parede da cavidade celomática, próximo à gônada, é considerada uma evidência morfológica de que o aumento do número de células germinativas nas gônadas é causado pela migração das células germinativas primordiais e não por divisões mitóticas, mesmo após o período de metamorfose das larvas (Grandi e Colombo, 1997).

Em *Cyprinus carpio*, porém, essa possibilidade de migração tardia das células germinativas primordiais não é aqui considerada uma vez que não se observou nenhuma célula semelhante às células germinativas primordiais em outras regiões da cavidade celomática. Ainda nesse aspecto, após o sétimo dia pós-fertilização, a migração de células germinativas primordiais

oriundas do saco vitelino torna-se aqui inviável, uma vez que neste período, as larvas encontram-se com o saco vitelino totalmente consumido.

Outros autores entendem que a migração tardia das células germinativas primordiais responderia pela disposição destas células em grupos formando cordões contínuos (Winkoop *et al.*, 1992). Em *Cyprinus carpio*, a formação desses cordões contínuos de células germinativas primordiais coincide com o aumento pronunciado das divisões mitóticas deste tipo celular. Supõe-se, portanto que, os cordões contínuos formam-se a partir de divisões mitóticas das células germinativas primordiais que encontravam-se até então isoladas.

As gônadas indiferenciadas com células germinativas primordiais organizadas em cordões contínuos não oferecem nenhum indício quanto ao rumo do processo de diferenciação, ou seja, se tornarão ovários ou testículos. No entanto, a reorganização estrutural que se segue com cordões contínuos sendo invadidos pelas células somáticas (Hamaguchi, 1992; Flores e Burns, 1993; Meijide *et al.*, 2005; presente estudo) determina uma nova relação entre as células germinativas e somáticas comprometendo o rumo da diferenciação, na qual as gônadas femininas e masculinas assumem definitivamente o seu destino.

A distinção sexual das gônadas

É consenso entre os diferentes autores que a proliferação de células germinativas primordiais e sua entrada em meiose marcam o início da diferenciação gonadal nos peixes gonocoristas, seja ela ovariana ou testicular (Nakamura e Takahashi, 1973; Strüssmann *et al.*, 1996; Nakamura *et al.*, 1998; Maack e Segner, 2003; Meijide *et al.*, 2005). E que os principais parâmetros morfológicos utilizados para a distinção sexual das gônadas em desenvolvimento são constituídos pela formação da cavidade ovariana a partir do acúmulo de células somáticas na periferia do ovário, e pela formação do ducto eferente na gônada masculina (Nakamura e Takahashi, 1973; Nakamura e Nagahama, 1989; Strüssmann *et al.*, 1996; Nakamura *et al.*, 1998; Meijide *et al.*, 2005; Komatsu *et al.*, 2006).

Em alguns grupos de Teleostei, como por exemplo, no Siluriformes, *Ictalurus punctatus* (Patiño *et al.*, 1996) e no Perciformes, *Sarotherodon niloticus* (Nakamura e Nagahama, 1985), a diferenciação da gônada feminina tem início com a formação da cavidade ovariana precedendo o

início da atividade meiótica das oogônias ou ainda com ambas ocorrendo de forma concomitante, como em outro Perciformes, *Oreochromis mossambicus* (Nakamura e Takahashi, 1973).

A distinção entre as gônadas femininas e masculinas pode ser detectada mais cedo a partir da maneira como se organizam as células germinativas e as células somáticas a elas associadas quando da perda da organização cordonal pelas células germinativas primordiais. Assim em *Cyprinus carpio* quando as células somáticas que circundam os cordões contínuos de células germinativas primordiais interpenetram as células germinativas primordiais envolvendo-as, são formados cistos que se mantêm isolados nas futuras gônadas femininas e organizam-se em conjuntos nas futuras gônadas masculinas. As células germinativas primordiais individualmente envolvidas pelas expansões citoplasmáticas das células somáticas, formando um cisto, diferenciam-se em oogônias ou espermatogônias. As células somáticas que se associam às primeiras oogônias constituem as células pré-foliculares, enquanto as associadas às primeiras espermatogônias constituem as pré-Sertoli.

Os cordões celulares e as células somáticas a eles associados, bem como os cistos aos quais dão origem são delimitados por uma membrana basal, claramente exposta pelo método de coloração para a reticulina, mostrando que a segregação entre os componentes germinativos e intersticiais ocorre já nas gônadas não totalmente diferenciadas.

Em *Cyprinus carpio*, no interior dos cistos das agora gônadas femininas, as oogônias proliferam por mitose ou entram em meiose dando origem aos oócitos, enquanto nas gônadas masculinas a entrada em meiose é precedida pela organização dos túbulos seminíferos.

Os cistos formados sejam aqueles contendo espermatogônias ou oogônias, não diferem daqueles presentes nas gônadas masculinas dos animais sexualmente adultos (Grier, 1981; 2002; Billard, 1986; Pudney, 1995; Guraya, 2001; Grier e Uribe, 2009).

A formação dos primeiros folículos ovarianos

Análogo ao que ocorre no epitélio germinativo das lamelas ovígeras nas fêmeas sexualmente adultas (Grier, 2000; Le Menn *et al.*, 2007; Grier *et al.*, 2009), também na gônadas indiferenciadas de *Cyprinus carpio*, cada oogônia no interior do cisto pode continuar se dividindo por mitose, formando novas oogônias ou pode entrar em meiose originando os oócitos. Com as divisões celulares ocorrendo dentro dos cistos estes aumentam de tamanho devido ao aumento do

número de células e têm uma nova expansão com a entrada em meiose. O aumento do tamanho dos cistos é acompanhado pela proliferação das células somáticas que o envolvem, as células pré-foliculares. No interior de cada cisto, o desenvolvimento das células germinativas é sincrônico. Acredita-se que desenvolvimento sincrônico das células germinativas no interior de cistos deva-se à presença de pontes citoplasmáticas entre as células (Fawcett *et al.*, 1959). Existentes entre as células germinativas nos cistos dos machos sexualmente adultos (Grier, 1976; Billard, 1984; Silveira *et al.*, 1990; Gusmão *et al.*, 2002; Quagio-Grassiotto e Carvalho, 1999; Negrão *et al.*, 2002), pontes citoplasmáticas entre oócitos profásicos como as vistas nos cistos presentes nas gônadas compactas de *Cyprinus carpio* foram recentemente mostradas entre oócitos profásicos do Mugiliformes, *Liza aurata* (Le Menn *et al.*, 2007).

Seguindo a entrada e posterior permanência em diplóteno, os oócitos se desenvolvem. O desenvolvimento primário dos oócitos que tem início ainda nos cistos se continua no interior dos folículos ovarianos. Na formação dos folículos ovarianos, dos animais sexualmente adultos, as células pré-foliculares progressivamente interpenetram nos cistos e envolvem cada oócito individualizando-os (ver Le Menn *et al.*, 2007; Grier *et al.*, 2009 para revisão; presente estudo). Nas gônadas femininas, ainda compactas de *Cyprinus carpio*, à medida que os oócitos crescem, são separados dos oócitos adjacentes por células pré-foliculares provenientes da própria parede do cisto. O oócito em crescimento projeta-se para fora do cisto e é progressivamente envolto pelas células, agora, foliculares e pela membrana basal em formação. As células foliculares polimórficas em decorrência do seu ativo processo de movimentação, ao envolverem completamente os oócitos tornam-se pavimentosas. Formam-se assim os primeiros folículos ovarianos, constituídos pelo oócito em crescimento envolto por uma camada de células foliculares pavimentosas, circundadas e apoiadas numa membrana basal. A membrana basal segrega os folículos recém formados dos demais constituintes celulares presentes nas gônadas em desenvolvimento.

A formação do epitélio germinativo feminino, a constituição das lamelas ovígeras e a organização dos complexos foliculares

Nas gônadas femininas, ainda compactas, de *Cyprinus carpio*, os folículos ovarianos em formação são gradualmente circundados por uma lâmina basal e permanecem imersos no tecido

gonadal. A partir da periferia da região ventral da gônada, células epiteliais em movimentação adentram o tecido compacto formando invaginações que progridem e ao mesmo tempo em que formam as lamelas ovígeras, dão origem ao epitélio germinativo que as margeia. As células somáticas epiteliais oriundas da periferia da gônada ao migrarem para o interior do tecido compacto interpõem-se por entre as células germinativas - cistos com oogônias, ninhos em desenvolvimento e mesmo por entre os folículos ovarianos recém formados - interconectando-as. As células germinativas desde o início de formação da gônada estão segregadas dos demais componentes teciduais pelas células pré-foliculares que por sua vez apóiam-se sobre uma membrana basal. Portanto, o epitélio germinativo, quando da sua formação, estará separado do estroma ovariano pela membrana basal e as células germinativas agora constituintes e aprisionadas do epitélio nunca fazem face com o lúmen que se forma entre as lamelas ovígeras.

Ao longo do tecido gonadal feminino de *Cyprinus carpio*, interpostos aos folículos ovarianos já formados e aos cistos de oogônias e/ou oócitos, encontram-se outros componentes celulares. Dentre estes, surgem pequenos espaços, que se expandem gradativamente dando origem a espaços extravasculares. Células estreladas com características mesenquimais progressivamente se interconectam formando uma rede frouxa que dá origem a um compartimento intersticial. Este compartimento corresponde ao estroma ovariano, do qual novos componentes celulares irão se diferenciar, permanecendo isolados do compartimento germinativo pela membrana basal. O estroma ovariano nos peixes é em geral formado por um tecido conjuntivo frouxo do tipo mucoso, no qual os espaços extravasculares são amplos e a quantidade de fibras colágenas é pequena (Grier, 2000; presente estudo).

No estroma, as células mesenquimais emitem prolongamentos citoplasmáticos que interagem com os folículos ovarianos e respondem de ora em diante pela formação dos constituintes da teca. Como os folículos já apresentam uma membrana basal totalmente formada, as células mesenquimais ao contatarem o folículo, apóiam-se sobre sua membrana basal, e diferenciando-se em uma célula pré-tecal.

Com a diferenciação das células da teca, o folículo ovariano em *Cyprinus carpio* passa a constituir o complexo folicular. O complexo folicular é formado, portanto, pelo oócito diplotênico, envolto pelas células foliculares, apoiadas em uma membrana basal e por duas camadas de células da teca (a teca interna e a teca externa) (Tokarz, 1978; Wallace e Selman,

1990; Grier, 2000; Grier e Lo Nostro, 2000; Grier, 2002; Grier *et al.*, 2007; Le Menn *et al.*, 2007; Grier *et al.*, 2009).

A gônada apresenta agora dois compartimentos distintos - o epitélio germinativo que reveste as lamelas ovígeras e o estroma ovariano (Grier *et al.*, 2007; Le Menn *et al.*, 2007; Grier *et al.*, 2009; presente estudo) – separados pela membrana basal que se torna contínua.

No interior dos complexos foliculares, o desenvolvimento dos oócitos prossegue, microvilosidades surgem no ooplasma e na região apical das células foliculares colocando em contato oócito e células foliculares, e a formação da zona pelúcida tem início (Quagio-Grassiotto e Guimarães, 2003; presente estudo).

No epitélio germinativo que margeia as lamelas ovígeras recém formadas, nas gônadas de *Cyprinus carpio*, a proliferação das oogônias forma aglomerados celulares delimitados pela membrana basal, os ninhos. Nos ninhos as oogônias são encistadas por células somáticas de origem epitelial - as células pré-foliculares – no interior do cisto proliferam por mitose e ou entram em meiose dando origem a cistos de oócitos. Oogônias não encistadas, oogônias no interior de cistos e cistos contendo oócitos, além das células pré-foliculares convivem no interior de um mesmo ninho. Como ocorre nos animais sexualmente adultos (Grier *et al.*, 2007; 2009), os oócitos em *Cyprinus carpio* iniciam o crescimento primário ainda no interior dos cistos e ao serem envoltos pelas células pré-foliculares durante a formação dos folículos ovarianos, permanecem conectados ao epitélio germinativo através de certa extensão da membrana basal compartilhada entre as células foliculares e as células epiteliais propriamente ditas. As regiões da membrana basal comuns entre o epitélio germinativo e os folículos ovarianos, até então de difícil detecção pelos métodos de coloração convencionais, e não sem dificuldades indiretamente expostos pelo método de PAS (que permite a detecção de polissacarídeos neutros), puderam aqui finalmente ser claramente observadas quando do uso da metodologia que utiliza a afinidade pela prata para contrastar as fibras reticulares.

A formação da cavidade ovariana

O último dos eventos da diferenciação ovariana que ocorre em *Cyprinus carpio* é a formação da cavidade ovariana, que acontece somente após completa diferenciação das lamelas

ovígeras, estabelecimento do epitélio germinativo e formação do estroma ovariano, bem como início do crescimento primário dos oócitos, portanto após completa diferenciação germinativa.

O processo de formação da cavidade ovariana em *Cyprinus carpio*, exceto pela ordem cronológica dos eventos da diferenciação gonadal, não difere do descrito em outras espécies de peixes (ver Nakamura *et al.*, 1998 para revisão).

A partir da periferia das lamelas ovígeras, a proliferação de células somáticas leva a formação de lâminas teciduais que se expandem e ao se contatarem, fusionam e encerram as lamelas ovígeras numa cavidade, formando o lúmen ovariano. A formação das lâminas teciduais que levam ao fechamento do ovário e a constituição da cavidade ovariana têm sido descrita sempre em secções transversais nas quais se apresentam como protuberâncias laterais do órgão formadas por células somáticas e que aumentam gradativamente até encontrarem-se e se fundirem, delimitando, assim, a cavidade ovariana. (Patiño e Takashima, 1995; Nakamura *et al.*, 1998; Strüssmann e Nakamura, 2002; Meijide *et al.*, 2005).

Este tipo de ovário, comum na maioria dos Teleostei, é dito cisto-ovário, e constitui um órgão cavitário, no qual se projetam as lamelas ovígeras (Hoar, 1969; Nagahama, 1983; Selman e Wallace, 1986; Connaughton e Aida, 1998; Helfman *et al.*, 2000), sendo contínuo com o gonoducto (Grier *et al.*, 2007; 2009) que desemboca na papila urogenital.

Os cisto-ovários, como os de *Cyprinus carpio* na etapa em que antecede a formação da cavidade ovariana, passam por uma organização do tipo gymno-ovariana. Gymno-ovários presentes em alguns grupos de peixes como os Salmoniformes, por exemplo, têm as lamelas ovígeras expostas diretamente para a cavidade celomática, na qual os oócitos maduros são liberados (Helfman *et al.*, 2000; Grier *et al.*, 2007; 2009).

A formação do epitélio germinativo masculino, a constituição dos túbulos seminíferos e a organização dos testículos

Nas gônadas supostamente masculinas de *Cyprinus carpio*, os cordões contínuos de células germinativas primordiais são invadidos por células somáticas, as agora células pré-Sertoli, que ao se interporem gradualmente entre as células germinativas, emitem prolongamentos citoplasmáticos, individualizando cada célula germinativa primordial. Formam-se os cistos, nos quais, as agora espermatogônias, encontram-se circundadas e isoladas uma das outras pelos

prolongamentos citoplasmáticos das agora células de Sertoli (Timmermans e Taverne, 1983; Parmentier e Timmermans, 1985; Nakamura *et al.*, 1998; Meijide *et al.*, 2005; Otani *et al.*, 2005; Çek, 2006). As células de Sertoli são tidas como oriundas de células epiteliais (Hamaguchi, 1992; Grier, 1993) e ao envolverem as espermatogônias, estabelecem inúmeros complexos juncionais, que respondem pela integridade do cisto e composição da barreira hemato-testicular (Nagahama, 1983; Pudney, 1993; Meijide *et al.*, 2005).

Em *Cyprinus carpio* os cistos conectados entre si por complexos juncionais organizam-se em conjuntos, que são circundados parcialmente por uma membrana basal. Na região central de cada conjunto, os cistos afastam-se gradualmente um dos outros, criando um pequeno espaço luminal.

Rearranjos celulares na região livre de membrana basal entre conjuntos de cistos adjacentes permitem a sua fusão ou confluência, dando origem aos túbulos testiculares, suportados por uma membrana basal contínua que os separa do compartimento intersticial. Decorrente da fusão progressiva entre os conjuntos de cistos forma-se também o compartimento luminal.

Nesse momento todos os critérios pelos quais o epitélio germinativo é definido encontram-se reunidos e nas gônadas masculinas de *Cyprinus carpio* organiza-se também o compartimento intersticial. O testículo em *C. carpio*, como nos demais Teleostei passa, portanto, a ser formado por dois compartimentos: o compartimento germinativo, constituído pelo epitélio germinativo que margeia os túbulos seminíferos, e o compartimento intersticial, ambos separados por uma membrana basal (Grier, 1992, 1993; Loir *et al.*, 1995; Pudney, 1996; Grier e Lo Nostro, 2000; Grier e Uribe, 2009).

O compartimento intersticial é constituído por vasos sanguíneos, células mióides, fibras nervosas e tecido conjuntivo (Grier *et al.*, 1989; Loir, 1990; Pudney, 1996; Loir *et al.*, 1995; Grier e Uribe, 2009), além das células de Leydig (Loir *et al.*, 1989; Loir, 1990; Pudney, 1996; Callard, 1996). Detectável e identificável somente à microscopia eletrônica, os componentes do compartimento intersticial parecem ser os últimos a se organizarem durante o desenvolvimento testicular em *Cyprinus carpio*.

Uma vez organizados os compartimentos testiculares em *Cyprinus carpio*, a espermatogênese tem início. Como na maioria dos Teleostei a espermatogênese em *C. carpio* é

cística, o processo no interior de cada cisto ocorre de forma sincrônica, ou seja, em cada cisto células germinativas encontram-se em uma mesma fase de desenvolvimento. As espermatogônias dividem-se mitoticamente dando origem às espermatogônias secundárias, as quais através de divisões meióticas darão origem aos espermatócitos, que se diferenciam em espermatídes e espermatozóides (Grier, 1981; 2002; Billard, 1986; Pudney, 1995; Guraya, 2001; Grier e Uribe, 2009).

Com o avanço do desenvolvimento gonadal os cistos de espermatócitos e espermatídes tornam-se gradativamente predominantes sobre os cistos de espermatogônias secundárias, e os espermatozóides começam a ser liberados no compartimento luminal. Inicialmente, a produção de espermatozóides é pequena, porém, ao final do desenvolvimento gonadal, a quantidade de cistos é reduzida drasticamente; nos túbulos testiculares o epitélio germinativo torna-se descontínuo e o compartimento luminal é totalmente preenchido por espermatozóides.

Descrita e considerada como característica dos Teleostei mais basais, como os Ostariophysi (Grier, 1993; Grier e Uribe, 2009), portanto no também Ostariophysi, *Cyprinus carpio* a organização testicular é do tipo tubular anastomosado. Neste tipo de organização testicular, os túbulos sofrem anastomoses em diferentes regiões do testículo, especialmente na região do ducto espermático (Grier, 1993; Grier e Uribe, 2009). Estas anastomoses ocorrem gradualmente ao longo de todo processo de diferenciação das gônadas, sucedem a formação dos túbulos testiculares, decorrentes da fusão de conjuntos de cistos adjacentes e respondem pela organização do tipo tubular-anastomosada dos testículos dos Ostariophysi (presente estudo).

A organização testicular, assim como nas gônadas femininas, até então de difícil detecção pelos métodos de coloração convencionais, como por exemplo, o método de PAS ou pela imagem negativa das gônadas maduras dos animais sexualmente adultos (Grier, 1992), pode aqui finalmente ser delineada com clareza quando do uso da metodologia que utiliza a afinidade pela prata para contrastar as fibras reticulares.

Como a espermatogênese em *Cyprinus carpio* ocorre de forma simultânea ao longo de todo o testículo, novas anastomoses formam-se especialmente entre túbulos testiculares cujo compartimento luminal encontrava-se preenchido por espermatozóides, principalmente na região dorsal do testículo, dando início à formação do ducto espermático.

Em *Cyprinus carpio*, na região de formação do ducto espermático único, correspondente a região caudal do testículo, o tecido gonadal caracteriza-se por conter uma grande quantidade de espermatogônias dispersas por entre células somáticas, cuja organização lembra a morfologia do testículo ainda em diferenciação. Tais características teciduais sugerem que o crescimento do testículo deve ocorrer na porção caudal, com a diferenciação se dando da região cranial para a caudal e, portanto, que gonoducto seria na realidade uma das últimas estruturas a se formar no testículo.

Curiosamente relatos anteriores em diferentes espécies de Perciformes (Nakamura e Takahashi, 1973; Nakamura e Nagahama, 1985, 1989; Meijide *et al.*, 2005) consideram que a formação do ducto eferente é um indício confiável para reconhecimento do início da diferenciação testicular (ver Nakamura *et al.*, 1998 para revisão). Porém, assim como em *Cyprinus carpio*, no também Cypriniformes *Puntius conchoni* (Çek, 2006) a formação do ducto espermático ocorre posteriormente às divisões celulares das espermatogônias que resultam na formação de novas células germinativas - espermatogônias e espermatócitos.

CONCLUSÕES

Em *Cyprinus carpio*:

- Apesar do desenvolvimento dos primórdios gonadais ser semelhante nas fêmeas e nos machos, a distinção sexual ocorre cedo nas gônadas ainda indiferenciadas e pode ser morfológicamente detectada a partir do momento em que as células germinativas primordiais associam-se as células somáticas epiteliais (células pré-Sertoli e pré-foliculares) e perdem a organização cordonal.

- Tanto nas gônadas supostamente femininas como nas masculinas, as células somáticas epiteliais ao se associarem às células germinativas primordiais formam cistos no interior dos quais ocorrerá a formação e diferenciação inicial dos gametas femininos, e a formação e diferenciação dos gametas masculinos.

- As células germinativas e as células epiteliais a elas associadas estão segregadas dos demais componentes celulares presentes nas gônadas em diferenciação por uma membrana basal, desde a formação dos cordões pelas células germinativas primordiais até a constituição do epitélio germinativo, e assim permanecem nas gônadas diferenciadas.

- As células epiteliais têm um papel decisivo na formação do epitélio germinativo, tanto nos machos como nas fêmeas.

- É a partir da associação - mediante complexos juncionais - entre células epiteliais de cistos contíguos que se formam os conjuntos de cistos que caracterizam as gônadas masculinas. São estas que ao se afastarem no centro dos conjuntos de cistos dão início a formação do compartimento luminal dos testículos e mais, é a associação entre as células epiteliais (pré-Sertoli) de conjuntos de cistos vizinhos que dá origem aos túbulos seminíferos e conseqüentemente ao epitélio germinativo que os reveste.

- É a partir da invaginação das células epiteliais oriundas da periferia das gônadas femininas compactas que se formam as lamelas ovígeras e a sua consequente associação com os componentes germinativos que leva à constituição do epitélio germinativo que margeia as lamelas.

- A organização tubular anastomosada dos testículos deve-se a fusão progressiva entre os conjuntos de cistos vizinhos nas gônadas em diferenciação e se continua com a anastomose dos túbulos nas gônadas já diferenciadas.

- No interior das lamelas ovígeras a formação dos espaços extravasculares é decorrente do afastamento entre as células somáticas mesenquimais as quais respondem também pela organização do estroma ovariano e a organização da teca nos complexos foliculares.

- A diferenciação ovariana embora seja mais longa, inicia-se mais cedo que a testicular, porém a constituição do epitélio germinativo masculino antecede no tempo a constituição do epitélio germinativo feminino.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Anderson, E. (1967). The formation of the primary envelop during oocyte differentiation in teleosts. *J. Cell Biol.*, v.35, p.193-212.
- Anderson, E. (1968). Cortical alveoli formation and vitellogenesis during oocyte differentiation in pipefish, *Syngnathus fuscus*, and killifish, *Fundulus heteroclitus*. *J. Morphol.*, v.125, p.23-60.
- Baylis, J.R. (1981). The evolution of parental care in fishes, with reference to Darwin's rule male sexual selection. *Env. Biol. Fishes*, 6: 223-251.
- Baroiller, J.F.; D'Cotta, H. (2001). Environment and sex determination in farmed fish. *Comp. Biochem. Physiol. C*, 130: 399-409.
- Billard, R. (1970). La spermatogenèse de *Poecilia reticulata*. III. Ultrastructure des cellules de Sertoli. *Ann. Biol. Anim. Bioch. Biophys.*, 10: 37-50.
- Billard, R. (1984). Ultrastructural changes in the spermatogonia and spermatocytes of *Poecilia reticulata* during spermatogenesis. *Cell Tiss Res*. 273: 219-226.
- Billard, R. (1986). Spermatogenesis and spermatology of some teleost fish species. *Reprod. Nutr. Dev.*, 26: 877-1024.
- Blumer, L.S. (1982). A bibliography and categorization of bonyfishes exhibiting parental care. *Zool. J. Lin. Soc.*, 76: 1-22.
- Braat, A.K.; Speksnijder, J.E.; Zivkovic, D. (1999). Germ line development in fishes. *Int. J. Dev. Biol.*, 43: 45-760.
- Bruslé, S. & Bruslé, J. (1978). An ultrastructural study of the germ cells in *Mugil (Liza) auratus* Risso, 1810 (Teleostei: Mugilidae). *Ann. Biol. Anim. Biochem. Biophys.*, 18:1141-1153.
- Burns, J.R.; Quagio-Grassiotto, I.; Jamieson, B.G.M. (2009). Ultrastructure of spermatozoa: Ostariophysi. In *Reproductive Biology and Phylogeny of Fishes (Agnathans and Neoteleostomi)*. Jamieson, B.G.M. (Ed.), New Hampshire: Science Publishers, Enfield. Vol.8A: 287-387.
- Callard, G.V. (1996). Endocrinology of Leydig Cells in Nonmammalian Vertebrates. In: Payne, A.H.; Hardy, M.P.; Russel, L.D. editors. *The Leydig Cell*. Vienna, IL: Cache River Press. p.308-331.

- Carlson, B.M. (2004). *Human Embryology and Developmental Biology*. Third Edition. Elsevier, New York, 522 p.
- Çek, S. (2006). Early gonadal development and sex differentiation in rosy barb (*Puntius conchoni*). *Anim. Biol.*, 56: 335-350.
- Cesar, M.P.; Murgas, L.D.S.; Araújo, R.V.; Drummond, C.D. (2005). Métodos para obtenção de população monosexo na piscicultura. *Bol. Agropec. Universidade Federal de Lavras- MG*, 69: 1-27.
- Clérot, J.C. (1976). Les groupements mitochondriaux des cellules germinales des poissons téléostéens cyprinidés. I. Étude ultrastructurale. *J. Ultrastruct. Res.*, 54: 461-475.
- Colombo, G.; Grandi, G. (1996). Histological study of the development and sex differentiation of the gonad in the European eel. *J. Fish Biol.*, 48: 493-512.
- Colombo, G.; Grandi, G.; Rossi, R. (1984). Gonad differentiation and body growth in *Anguilla anguilla* L. *J. Fish. Biol.*, 24: 215-228.
- Connaughton, M.A.; Aida, K. (1998). Female reproductive system, fish. In: Krobil, E.; Neill, J. D. (ed.). *Encyclopedia of Reproduction*. San Diego, Academic Press. p. 193-205.
- Constantz, G. D. (1989). Reproductive biology of poeciliid fishes. In: *Ecology and Evolution of Livebearing Fishes (Poeciliidae)*. G. K. Meffe and F. F. Snelson, Jr. (eds.). Prentice Hall, Englewood Cliffs, New Jersey. pp.33-50.
- Davies, P.R. e Takashima, F. (1980). Sex determination in common carp, *Cyprinus carpio*. *J. Tokyo Univ. Fish.*, 66: 191-199.
- Devlin, R.H.; Nagahama, Y. (2002). Sex determination and sex differentiation in fish: an overview of genetic, physiological, and environmental influences. *Aquaculture*, 208:191-364.
- Edy, E.M. (1975). Germ plasm and the differentiation of the germ cell line. *Int. Rev. Cytol.*, 43: 229-280.
- FAO. © (2004-2009). Cultured Aquatic Species Information Programme. Text by Peteri, A. In: FAO Fisheries and Aquaculture Department [online]. Rome. Updated 12 July 2005. http://www.fao.org/fishery/culturedspecies/Cyprinus_carpio/en.
- Fawcett, D.W.; Ito, S.; Slauterback, D.L. (1959). The occurrence of intercellular bridges in groups, of cells exhibiting synchronous differentiation. *J Biophys Biochem Cytol.* 5: 453-460.

- Fink, S.V.; Fink, W.L. (1981). Interrelationships of the ostariophysan fishes (Teleostei). *Zool. J. Linn. Soc.*, London, 72: 297-353.
- Flores, J. A.; Burns, J. R. (1993). Ultrastructural study of embryonic and early adult germ cells, and their support cells, in both sexes of *Xiphophorus* (Teleostei: Poecillidae). *Cell Tissue Res.* 271: 263-270.
- Foyle T.P. (1993). A histological description of gonadal development and sex differentiation in the coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*) for both untreated and oestradiol immersed fry. *J. Fish. Biol.*, 42: 699-712.
- França, G.F. (projeto de doutorado em andamento). Caracterização do epitélio germinativo masculino, da formação e regressão folicular das fêmeas, da atividade das células esteroidogênicas e fagocíticas gonadais em Gymnotiformes (Teleostei: Ostariophysi). Universidade Estadual de Campinas.
- Francolini, M.; Lora Lamia, C.; Bonsignorio, C.; Cotelli, F. (2003). Oocyte development and egg envelope formation in *Oreochromis niloticus*, a mouth-brooding cichlid fish. *J. Submicrosc. Cytol. Pathol.*, 35, p.49-60.
- Frisch, A. (2004). Sex-change and gonadal steroids in sequentially-hermaphroditic fish. *Rev. Fish Biol. Fisheries*, 14: 481-99.
- Futuyma, D.J (2002). *Biologia Evolutiva*. 2ª Edição, FUNPEC Editora. Ribeirão Preto-SP.631p.
- Galli, L.F.; Torloni, C.E.C. (1992). Criação de peixes. 3. ed. São Paulo: Nobel. 119p.
- Godinho, H.P; Santos, J.E.; Formagio, P.S.; Guimarães-Cruz, R.J. (2005). Gonadal morphology and reproductive traits of the Amazonian fish *Arapaima gigas* (Schinz, 1822). *Acta Zool. (Stockholm)*, 86: 289-294.
- García-Alonso, J.; Ruiz-Navarro, A.; Chaves-Pozo, E; Torralva, M.; García-Ayala, A. (2009). Gonad plasticity and gametogenesis in the endangered Spanish toothcarp *Aphanius iberus* (Teleostei: Cyprinodontidae). *Tissue and cel*, 41: 206-213.
- Graeff, A.; Pruner, E.N. (2000). Efeito da densidade de povoamento na produtividade final em carpas (*Cyprinus carpio* var *specularis*) em fase de engorda, durante o verão. *Rev. bras. zootec.*, 29(3): 639-645.

- Grandi, G. e Colombo, G. (1997). Development and early differentiation of gonad in the European eel (*Anguilla anguilla* [L], Anguilliformes, Teleostei): a cytological and ultrastructural study. *J. Morphol.*, 231: 195-216.
- Grier H.J. (1976). Sperm Development in the Teleost *Oryzias latipes*. *Cell Tiss Res.* 168: 419-431.
- Grier, H.J.; Van den Hurk R.; Billard, R. (1989). Cytological identification of cells types in the testis of *Esox lucius* and *E. niger*. *Cell Tissue Res.*, 257: 491-496.
- Grier, H.J.; Linton, J.R.; Leatherland, J.F.; De Vlaming, V. L. (1980). Structural evidence for two different testicular types in teleost fishes. *Amer. J. Anat.*, 159: 331-345.
- Grier, H.J. (1981). Celular organization of the testis and spermatogenesis in fishes. *Amer. Zool.*, 21: 345-357.
- Grier, H.J. (1992). Chordate testis: the extracellular matrix hypothesis. *J. Experiment. Zool.*, 261: 151-160.
- Grier, H.J. (1993). Comparative organization of Sertoli cells including the Sertoli cell barrier. In: *The Sertoli cell*, (Russel L.D. & Griswold, M.D., eds.) Clearwater, Cache River Press. pp. 704-730.
- Grier, H.J.; Taylor, R.G. (1998). Testicular maturation and regression in the common snook. *J. Fish Biol.*, 53: 521-542.
- Grier, H.J. (2000). Ovarian germinal epithelium and folliculogenesis in the Common Snook, *Centropomus undecimalis* (Teleostei: Centropomidae). *J. Morphol.*, 243: 265-281.
- Grier, H.J.; Lo Nostro, F. (2000). The germinal epithelium in fish gonads: the unifying concept. In: Norberg, B.; Kjesbu, O.S.; Taranger, G.L.; Andersson, E.; Stefansson, S.O. editors. *Proceedings of the 6th International Symposium on the Reproductive Physiology of Fish*. Norway: University of Bergen. pp.233-236.
- Grier, H.J. (2002). The germinal epithelium: its dual role in establishing male reproductive classes and understanding the basis for indeterminate egg production in female fishes. In: *Proceedings of the fifty-third annual Gulf and Caribbean Fisheries Institute* (Creswell, R.L. ed.). November 2000. Fort Pierce: Mississippi/Alabama Sea Grant Consortium. pp. 537-552.

- Grier, H.J.; Uribe, M.C.; Parenti, L.R., Rosa-Cruz, G. (2005). Fecundity, the Germinal, and Folliculogenesis in Viviparous fishes. *Viviparous Fishes*, First edition published by New Life Publication. pp. 191-216.
- Grier, H.J.; Uribe, M.C.; Parenti, L.R. (2007). Germinal epithelium, folliculogenesis, and postovulatory follicles in ovaries of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum,1792) (Teleostei, Protacanthopterygii, Salmoniformes). *J. Morphol.* 268: 293-310.
- Grier, H.J.; (2008). II International Symposium on Animal Biology of Reproduction (ISABR 2008) in São Paulo, SP, Brazil.
- Grier, J.H.; Uribe, M.C. (2009). The Testis and Spermatogenesis in Teleosts. In: Jamieson, B.J.M. (Ed): *Reproductive Biology and Phylogeny of Fishes (Agnathans and Bony Fishes) Phylogeny Reproductive System Viviparity Spermatozoa*. 802p
- Grier, J.H., Uribe, M.C.; Patiño, R. (2009). The ovary, folliculogenesis and oogenesis in teleosts. In: Jamieson, B.J.M. (Ed): *Reproductive Biology and Phylogeny of Fishes (Agnathans and Bony Fishes) Phylogeny Reproductive System Viviparity Spermatozoa*. 802p.
- Gilbert, S.F. (2003). *Developmental Biology*. Seventh edition. Sinauer. Sunderland, MA. 750p.
- Guimarães, A.C.D.; Quagio-Grassiotto, I. (2001). Ultrastructural aspects of oogenesis and oocyte primary growth in *Serrasalmus spilopleura* (Teleostei, Characiformes, Serrasalminae). *Tissue e Cell.*, v.33, p.241-248.
- Guraya, S.S. (1986). *The Cell and Molecular Biology of Fish Oogenesis*. Basel: Ed. Sauer, H. W. Karger. pp. 223.
- Guraya, S. S. (1994). Gonadal development and production of gametes in fish. *Proceedings of the Indian National Science Academy (Part B)* 60: 15-32.
- Guraya, S.S. (2001). Comparative cellular and molecular biology of testis in vertebrates. Trends in endocrine, paracrine and autocrine regulation of structure and functions. Enfield, Science Publishers, Inc. 91p.
- Gusmão P.; Foresti F.; Quagio-Grassiotto I. (2002). The ultrastructure of the premeiotic and meiotic stages of spermatogenesis in *Plagioscion squamosissimus* (Teleostei, Perciformes, Sciaenidae). *J. Submicrosc. Cytol. Pathol.* 34: 159-165.
- Hamaguchi, S. (1982). A light- and electron-microscopic study on the migration of primordial germ cells in the teleost, *Oryzias latipes*. *Cell Tissue Res.* 227:139-151.

- Hamaguchi, S. (1992). Sex differentiation of germ cells and their supporting cells in *Oryzias latipes*. *Fish Biol J Medaka*, 4: 11-18.
- Hart, N.H. (1990). Fertilization in teleost fishes: mechanisms of sperm-egg interactions. *Int. Ver. Cytol.* 121:1-66.
- Helfman, G.S.; Collete, B.B.; Facey, D. (2000). Teleosts at last I: Bony-tongues through Anglerfishes. In: *The diversity of fishes*. Blackwell, Massachusetts, p. 221-243.
- Hendry, C.I.; Martin-Robichaud, D.J.; Benfey, T.J. (2002). Gonadal sex differentiation in Atlantic halibut. *J. Fish Biol.* 60, 1431-1442.
- Hliwa, P.; Demska-Zakęś, K.; Martyniak, A.; Król, J. (2003). Gonadal differentiation in *Vimba vimba* (L. 1758). *Czech J. Anim. Sci.*, 48 (11): 441-448.
- Hoar, W.S. (1969). Reproduction. In: Hoar, W.S. & Randall, D.J. editors. *Fish Physiology*. New York: Academic Press, 111: chap.1.
- Junqueira, L.C.; Carneiro, J. (1999). *Histologia Básica*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 433p.
- Kobayashi, T.; Kajiura-Kobayashi, H.; Nagahama, Y. (2000). Differential expression of vasa homologue gene in the germ cells during oogenesis and spermatogenesis of a teleost fish, tilapia, *Oreochromis niloticus*. *Mech. Develop.*, 99: 139-142.
- Komatsu, T.; Nakamura, S.; Nakamura, M. (2006). A sex cord-like structure and some remarkable features in early gonadal sex differentiation in the marine teleost *Siganus guttatus* (Bloch). *J. Fish Biol.* 68: 236-250.
- Kunz, Y.W. (2004). *Developmental Biology of Teleost Fishes*. Dordrecht, Springer. 636p.
- Lahnsteiner, F.; Patzner, R.A. (1990). Spermiogenesis and structure of mature spermatozoa in blennioid fishes (Pisces, Blenniidae). *J. Submicrosc. Cytol. Pathol.*, 22: 565-576.
- Larsen, W.J. (2001). *Human Embryology*. Third Edition. Churchill Livingstone. Philadelphia, 548p.
- Le Gac, F.; Loir, M. (1999). Male Reproductive System, Fish. In: Knobil, E. & Neill, J.D. editors. *Encyclopedia of Reproduction*. San Diego: Academic Press, 3: 20-30.
- Le Menn, F., Cerdà J. and Babin P.J. (2007). Ultrastructural aspects of the ontogeny and differentiation of ray-finned fish ovarian follicles. In: Babin, J.P., Cerdà and Lubzens E. (Eds): *The Fish Oocyte: From Basic Studies to Biotechnological Applications*, Springer, Dordrecht. pp.1-37.

- Lin, F.; Dabrowski, K.; Timmermans, L.P.M. (1997). Early gonadal development and sexual differentiation in muskellunge (*Esox masquinongy*). *Can. J. Zool.*, 75: 1262-1269.
- Loir, M. ; Cauty, C. ; Planquette, P. ; Le Bail, P.Y. (1989a). Comparative study of the male reproductive tract in seven families of South-American catfishes. *Aquat. Living Resour.*, 2: 45-56.
- Loir, M. (1990). Interstitial cells from the testis of the trout (*Oncorhynchus mykiss*) in vivo and in primary culture. *Cell Tissue Res.*, 261: 133-144.
- Loir, M.; Sourdain, P. ; Mendis-Handagama, S.M.L.C. ; Jégou, B. (1995). Cell-cell interactions in the testis of teleosts and elasmobranchs. *Microsc. Res. Tech.*, 32: 533-552.
- Lo Nostro, F. L. (2000). Espermatogénesis, ciclo anual e inducción hormonal de la espermiación en el pez protogínico diándrico, *Synbranchus marmoratus*, Bloch, 1975 (Teleostei, Synbranchidae). Tesis Doctoral. Depto. de Ciencias Biológicas, Facultad de Ciencias Exactas, Hemeroteca, Universidad de Buenos Aires, Argentina.
- Lo Nostro, F. L.; Grier, H.; Meijide, F. J.; Guerrero G. A. (2003). Ultrastructure of the testis in *Synbranchus marmoratus* (Teleostei, Synbranchidae): the germinal compartment. *Tissue Cell* 35: 121-132.
- Maack, G.; Segner, H. (2003). *Morphological development of the gonads in zebrafish*. *Journal of Fish Biology*. 62: 895–906.
- Mansour, N.; Lahnsteiner, F.; Patzner, R.A. (2009). Ovarian fluid plays an essential role in attachment of Eurasian perch, *Perca fluviatilis* eggs. *Theriogenology*, 71: 586-593.
- Mazabrand, T.; Wegnez, M.; Denis, H. (1975). Biochemical research on the oogenesis. RNA accumulation in the oocytes of teleost. *Develop. Biol.*, 44: 326-332.
- Meijide, F.J.; Lo Nostro, F.; Guerrero, G.A. (2005). Gonadal Development and Sex Differentiation in the Cichlid Fish *Cichlasoma dimerus* (Teleostei, Perciformes): A Light- and Electron-Microscopic Study. *Journal of Morphology*, 264: 191-210.
- Mezhnin, F.I. (1978). Development of the sex cells in the early ontogeny of the common perch, *Perca fluviatilis*. *J. Ichthyol.*, 18:71-86.
- Miura, T. (1998). Spermatogenetic cycle in fish. In: *Encyclopedia of reproduction*. (Knobil, E. & Neill, J. D. eds.). San Diego. Academic Press, 4: 571-578.

- Miura, T.; Miura, C.I. (2003). Molecular control mechanisms of fish spermatogenesis. *Fish Physiol. Biochem.*, 28: 181-186.
- Molyneaux, K.; Wylie, C. (2004). Primordial germ cell migration. *Int. J. Dev. Biol.* 48: 537-44.
- Moreira, H.L.M; Vargas, L.; Ribeiro, R.P.; Zimmermann, S. (2001). Fundamentos da Moderna Aqüicultura. Editora da ULBRA/ Canoas. 200p.
- Munoz, R.C.; Warner, R.R.A. (2003). New version of the size-advantage hypothesis for sex change: Incorporating sperm competition and size-fecundity skew. *Am. Naturalist*, 161: 749-61.
- Muñoz, M.; Casadevall, M.; Bonet, S. (2001). Gonadal structure and gametogenesis of *Aspitrigla obscura* (Pisces, Triglidae). *Ital. J.Zool.*, 68: 39-46.
- Muñoz, M.; Casadevall, M.; Bonet, S. (2002). Testicular structure and semicystic spermatogenesis in a specialized ovuliparous species: *Scorpaena notata* (Pisces, Scorpaenidae). *Acta Zool.*, 83: 213-219.
- Nagahama, Y. (1983). The functional morphology of teleost gonads. In: *Fish physiology*. (Hoar, W.S.; Randall, D.J.; Donaldson, E.M., eds.). New York, Academic Press. V. IX, chap. 6.
- Nakamura, M.; Takahashi, H. (1973). Gonadal sex differentiation in *Tilapia mossambica*, with special regard to the time of estrogen treatment effective in inducing complete feminization of genetic males. *Bull Fac. Fish Hokkaido Univ.*, 24: 1-13.
- Nakamura, M.; Takahashi, H.; Hiroi, O. (1974). Sex differentiation in the masu salmon (*Oncorhynchus masou*). *Sci. Rep. Hokkaido Salmon Hatchery*. 28: 1-8.
- Nakamura, M.; Nagahama, Y. (1985). Steroid producing cells during ovarian differentiation of the tilapia *Sarotherodon niloticus*. *Development, Growth and Differentiation* 27: 701-708.
- Nakamura, M.; Nagahama, Y. (1989). Differentiation and development of Leydig cells, and change of testosterone levels during testicular differentiation in tilapia *Oreochromis niloticus*. *Fish Physiol. Biochem.*, 7: 211-219.
- Nakamura, M.; Kobayashi, T.; Chang, X.T.; Nagahama, Y. (1998). Gonadal sex differentiation in teleost fish. *J. Exp. Zool.*, 281: 362-372.
- Nakatani, K; Agostinho, A.A.; Baumgartner, G.; Bialecki, A.; Sanches, P.V.; Makrakis, M.C.; Pavanelli, C.S. (2001). Ovos e larvas de peixes de água doce: Desenvolvimento e manual de identificação. Maringá: EDUEM. 378p.

- Negrão, J.N.C.; Carvalho, E.D.; Foresti, F.; Quagio-Grassiotto, I. (2002). Spermatogonia and spermatocyte ultrastructure in *Hoplias malabaricus* (Teleostei, Characiformes: Erythrinidae). *J. Zool. Lond.* 257: 287-293.
- Nelson, J.S. (2006). Fishes of the world. 4nd. Ed. New York: John Wiley & Sons. 601p.
- Nóbrega, R.H. (2006). Alterações do epitélio germinativo masculino, células endócrinas testiculares e células gonadotrópicas durante o ciclo reprodutivo de *Serrasalmus spilopleura* (Kner, 1859) e *Pimelodus maculatus* (Lacépède, 1803). Dissertação de Mestrado, Universidade Estadual de Campinas.
- Nomura, H. (1984). Dicionário dos peixes do Brasil. Brasília: Editerra. 482p.
- Ohta, T.; Iwamatsu, T.; Takama, M.; Yoshimoto, Y. (1990). Cortical alveolus breakdown in the eggs of the freshwater teleost *Rhodeus ocellatus ocellatus*. *Anat. Rec.*, 227: 486-496.
- Otani, S.; Kitauchi, T.; Saito, T.; Sakao, S.; Maegawa, S.; Inoue, K.; Yamaha, E. (2005) The formation of primordial germ cells from germline cells in spherical embryos derived from the blastodisc of 2-cell embryos in goldfish, *Carassius auratus*. *Int. J. Dev. Biol.*, 49: 843-850.
- Parenti, L.R. ; Grier, H.J. (2004). Evolution and phylogeny of gonad morphology in bony fishes. *Integr. Comp. Biol.*, 44: 333-348.
- Parmentier, H.K.; Timmermans, L.P.M. (1985). The differentiation of germ cells and gonads during development of carp (*Cyprinus carpio* L.). A study with anti-carp sperm monoclonal antibodies. *J Embryol. Exp. Morphol.*, 90:13-32.
- Patiño, R.; Sullivan, C.V. (2002). Ovarian follicle growth, maturation, and ovulation in teleost fish. *Fish Physiol. Biochem.*, 26: 57-70.
- Patiño, R.; Takashima, F. (1995). In: Takashima, F.; Hibiya, T., editors. *An atlas of fish histology*, 2nd ed. Stuttgart Kodansha-Gustav Fisher, 128-153.
- Patiño, R.; Davis, K.B.; Schoore, J.E.; Uguz, C.; Strussmann, C.A.; Parker, N.C.; Simco, B.A.; Goudie, C.A. (1996). Sex differentiation of channel catfish gonads: normal development and effects of temperature. *J. Exp. Zool.*, 276: 209-218.
- Perry, A.N.; Grober, M.S. (2003). A model for social control of sex change: interactions of behaviour, neuropeptides, glucocorticoids, and sex steroids. *Horm. Behav.*, 43: 31-8.
- Piferrer, F. (2001). Endocrine sex control strategies for the feminization of teleost fish. *Aquaculture*, 197: 229-281.

- Puchtler, H.; Waldrop, F.W. (1978). Silver impregnation methods for reticulum fibers and reticulin: A re-investigation of their origins and specificity, *Histochemistry*, 57(3): 177.
- Pudney, J. (1993). Comparative cytology of the non-mammalian vertebrate Sertoli cell. In: *The Sertoli cell*. (Russell, L.D. & Griswold, M.D., eds.) Clearwater, Cache River Press. pp. 612-657.
- Pudney, J. (1995). Spermatogenesis in nonmammalian vertebrates. *Microsc. Res. Techn.*, 32: 459-497.
- Pudney, J. (1996). Comparative cytology of the Leydig cell. In: *The Leydig cell*. (Payne, A.H.; Hardy, M.P.; Russel, L.D., eds.) Vienna, Cache River Press. pp. 98-142.
- Quagio-Grassiotto, I.; Carvalho, E.D. (1999). The ultrastructure of *Sorubim lima* (Teleostei, Siluriformes, Pimelodidae) spermatogenesis: premeiotic and meiotic periods. *Tissue Cell*. 31: 561-567.
- Quagio-Grassiotto, I.; Guimarães, A. C. D. (2003). Follicular epithelium, theca and egg envelop formation in *Serrasalmus spilopleura* (Teleostei, Characiformes, Characidae). *Acta Zool.*, 84: 121-129.
- Quintero-Hunter, I.; Grier, H.; Muscato, M. (1991). Enhancement of histological detail using metanil yellow as counterstain in periodic acid/Schiff's hematoxylin staining of glycol methacrylate tissue sections. *Biotech. Histochem.*, 66: 169-172.
- Redding, J.M.; Patiño, R. (1993). Reproductive physiology. In: Evans, D.H. editor. *The physiology of fishes*. Boca Raton, FL: CRC Press. p.503-534.
- Robins, C.R., Bailey, R.M; Bond, C.E; Brooker, J.R.; Lachner, E.A; Lea, R.N; Scott, W.B (1991). World fishes important to north Americans: exclusive of species from the continental waters of the United States and Canada. Bethesda, Maryland: *Am. Fish. Soc. Spec. Publ.*, 21: 243p.
- Riehl, R.; Baensch, H.A. (1991). *Aquarien Atlas*. Band. 1. Melle: Mergus, Verlag für Natur- und Heimtierkunde, Germany. 992p.
- Sadovy de Mitcheson, Y.; Liu, M. (2008). Functional hermaphroditism in teleosts. *Fish and Fisheries*. 9: 1-43.
- Satoh, N. (1974). An ultrastructural study of sex differentiation in the teleost *Oryzias latipes*. *J. Embryol. Exp. Morphol.*, 32:195-215.

- Schulz, R.W.; Miura, T. (2002). Spermatogenesis and its endocrine regulation. *Fish. Physiol. Biochem.*, 26: 43-56.
- Schulz, R.W. (2003). Endocrine regulation of spermatogenesis in teleost fish. *ARBS Ann. Rev. Biom. Sc.*, 5: 57-58.
- Scott, W.B. & Crossman, E.J. (1973). Freshwater fishes of Canada. *Bull. Fish. Res. Board Can.*, 184:1-966.
- Selman, K.; Wallace, R.A. (1986). Gametogenesis in *Fundulus heteroclitus*. *Am. Zool.*, 26: 173-192.
- Selman, K.; Wallace, R.A. (1989). Cellular aspects of oocyte growth in teleosts. *Zool. Sci.*, 6: 211-231.
- Silveira H.; Rodrigues P.; Azevedo C. (1990). Fine structure of the spermatogenesis of *Blenninus pholis* (Pisces, blenniidae). *J. Submicrosc. Cytol.* 22: 103-109.
- Strum, J.M.; Gartner, L.P.; Hiatt, J.L. (2007). Cell biology and histology. Hagerstown, MD: Lippincott Williams & Wilkins. p. 83.
- Strüssmann, C.A.; Takashima, F.; Toda, K. (1996). Sex differentiation and hormonal feminization in pejerrey *Odontesthes bonariensis*. *Aquaculture*, 139: 31-45.
- Strüssmann, C.A.; Nakamura, M. (2002). Morphology, endocrinology, and environmental modulation of gonadal sex differentiation in teleost fishes. *Fish Physiol. Biochem.*, 26: 13-29.
- Timmermans, L.P.M.; Taverne, N. (1983). Origin and differentiation of primordial germ cells (PGCs) in the rosy barb, *Barbus conchonus* (Cyprinidae, Teleostei). *Acta Morph. Neerl. Scan.*, 21: 182.
- Timmermans, L.P.M.; Taverne, N. (1989). Segregation of primordial germ cells: their numbers and fate during early development of *Barbus conchonus* (Cyprinidae, Teleostei) as indicated by 3H-thymidine incorporation. *J. Morphol.* 202: 225-237.
- Timmermans, L.P.; Wang, J.; Taverne, N.; Schipper, H.; Parmentier, H.K. (1996). Characterization of antigens specific for spermatozoa and germ cells during early gonadal development of carp (*Cyprinus carpio*, Cyprinidae, Teleostei) with monoclonal antibodies. *Int J Dev Biol.; Suppl.* 1:221S-222S.

- Tokarz, R.R. (1978). Oogonial proliferation, oogenesis, and folliculogenesis in nonmammalian vertebrates. In: Jones, R. E. (ed.). *The vertebrate ovary*. New York, Plenum Press. pp.145-179.
- Toury, R.; Clérot, J.C.; André, J. (1977). Les groupements mitochondriaux des cellules germinales des poissons téléostéens Cyprinides. IV. Analyse biochimique des constituants du "ciment" intermitochondrial isolé. *Biol. Cell.*, 30: 225-232.
- Tyler, C.R.; Sumpter, J.P. (1996). Oocyte growth and development in teleosts. *Rev. Fish Biol. Fisher.*, 6: 287-318.
- Uchida, D.; Yamashita, M.; Kitano, T.; Iguchi, T. (2002). Oocyte apoptosis during the transition from ovary-like tissue to testes during sex differentiation of juvenile zebrafish. *J. Experimental Biol.* 205: 711-718.
- Vazzoler, A.E.A.M. (1996). *Biologia da reprodução de peixes Teleósteos. Teoria e Prática*. Maringá: EDUEM, 169p.
- Verma, G.P.; Thakur, C. (1988). Origin and composition of cortical granules in oocytes of a teleost, *Mastacembelus armatus armatus* (Lacépède). *Arch. Biol.*, 99: 325-334.
- Vidal, B.C. (1988). Histochemical and anisotropical properties characteristics of silver impregnation: The differentiation of reticulin fibers from the other interstitial collagens. *Zool. Jb. Anat.* 117: 485-494.
- Wallace, R.A.; Selman, K. (1981). Cellular and dynamic aspects of oocyte growth in teleosts. *Scien. Zool.*, 21: 325-343.
- Wallace, R.A.; Selman, K. (1990). Ultrastructural aspects of oogenesis and oocyte growth in fish and amphibians. *J. Electron Microsc. Tech.*, 16: 175-201.
- West, G. (1990). Methods of assessing ovarian development in fish: a review. *Aust. J. Mar. Freshw. Res.*, 41: 199-222.
- Winkoop, A.; Timmermans, L.P.M. (1992). Phenotypic changes in germ cells during gonadal development of the common carp (*Cyprinus carpio*). An immunohistochemical study with anti-carp spermatogonia monoclonal antibodies. *Histochemistry*. 95: 77-85.
- Winkoop, A.; Booms G.H.R.; Dulos G.J., Timmermans, L.P.M. (1992). Ultrastructural changes in primordial germ cells during early gonadal development of the common carp (*Cyprinus carpio* L. Teleostei). *Cell Tissue Res.* 267:337-346.

- Witschi, E. (1957). The inducer theory of sex differentiation. *J. of the Faculty of Sciences, Hokkaido University, Series VI, Zoology* 13: 428-439.
- Yamamoto, T. (1969). Sex differentiation. In: Hoar WS, Randall DJ, editors. New York: Academic Press. *Fish physiol.*, 3: 117-175.

DECLARAÇÃO

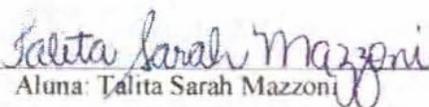
Declaro para os devidos fins que o conteúdo de minha **Tese de Mestrado** intitulada "Formação do epitélio germinativo durante a morfogênese e diferenciação gonadal em *Cyprinus carpio* (Teleostei: Cypriniformes). análise estrutural e ultraestrutural das células germinativas e somáticas":

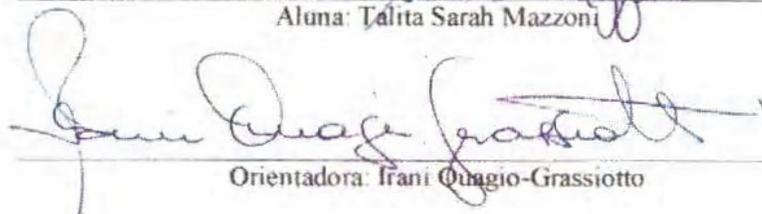
() não se enquadra no Artigo 1º, § 3º da Informação CCPG 01/2008, referente a bioética e biossegurança.

() está inserido no Projeto CIBio (Protocolo nº _____), intitulado _____

(X) tem autorização da Comissão de Ética em Experimentação Animal (Protocolo nº 27/2007-CEEA).

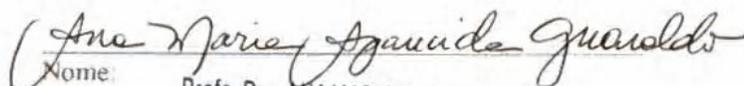
() tem autorização do Comitê de Ética para Pesquisa com Seres Humanos (?) (Protocolo nº _____).


Aluna: Talita Sarah Mazzoni


Orientadora: Irani Quaggio-Grassiotto

Para uso da Comissão ou Comitê pertinente:

(X) Deferido () Indeferido


Nome: Profa. Dra. ANAMARIA A. GUARALDO
Função: Presidente
Comissão de Ética na Experimentação Animal
CEEA/IB - UNICAMP



CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo nº **27/2007-CEEA**, sobre “Formação do epitélio germinativo durante a morfogênese e diferenciação gonadal em *Cyprinus carpio* (Teleostei: Cypriniformes): análise estrutural e ultraestrutural das células germinativas e somáticas”, sob a responsabilidade de **IRANI QUAGIO GRASSIOTTO**, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e foi aprovado “Ad referendum” da **COMISSÃO DE ÉTICA NA EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL** (CEEA), nesta data.

Botucatu, 27 de abril de 2009.



Prof. Dra. **PATRÍCIA FERNANDA F. PINHEIRO**
Presidente - CEEA