



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
FACULDADE DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**

NAOMIN GONÇALVES DE CASTRO

DESCRIÇÃO HISTOLÓGICA DA GAMETOGENESE DE *Moenkhausia
collettii* EM ÁREA ANTROPIZADA

BELÉM – PA

2023

NAOMIN GONÇALVES DE CASTRO

DESCRIÇÃO HISTOLÓGICA DA GAMETOGENESE DE *Moenkhausia
collettii* EM ÁREA ANTROPIZADA

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado ao Colegiado do Curso de
Bacharelado em Ciências Biológicas,
Modalidade Biologia da Universidade
Federal do Pará, como requisito para a
obtenção do grau de Bacharel em
Biologia.

Orientadora: Prof^ª Dr^a Maria Auxiliadora
Pantoja Ferreira. Laboratório de
Imunohistoquímica e Biologia do
Desenvolvimento – ICB – UFPA.

BELÉM – PA

2023

NAOMIN GONÇALVES DE CASTRO

DESCRIÇÃO HISTOLÓGICA DA GAMETOGENESE DE *Moenkhausia
collettii* EM ÁREA ANTROPIZADA

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado ao Colegiado do Curso de
Bacharelado em Ciências Biológicas,
Modalidade Biologia da Universidade
Federal do Pará, como requisito parcial
para a obtenção do grau de Bacharel em
Biologia.

Orientadora: Prof^ª Dr^ª Maria Auxiliadora Pantoja Ferreira.
Laboratório de Imunohistoquímica e Biologia do Desenvolvimento, UFPA.

Avaliador¹: Prof^ª Dr^ª Veronica Regina Lobato de Oliveira-Bahia
Laboratório Multidisciplinar de Morfofisiologia Animal- ICB/UFPA

Avaliador²: Prof^ª Dr^ª Renata Silva de Oliveira
Laboratório de Ultraestrutura Celular- ICB/UFPA

BELÉM – PA

2023

“Quem é do Rancho, tem amor não se amofina, já dizia vovó desde o tempo
de menina”

Osvaldo e Albertino Garcia

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço à Deus e aos meus guias espirituais por me darem força e resiliência suficiente para chegar a esse momento. Dedico este trabalho aos meus pais, Silvia Gonçalves e Carlos Nazareno de Castro, por terem acreditado que a educação era o meu caminho a ser seguido, por sempre terem acreditado em meu potencial, apoiado as minhas decisões, e estarem ao meu lado nos bons e maus momentos.

Agradeço à toda minha família, por sempre ter torcido por mim e comemorado as minhas vitórias como se fossem suas, em especial minha madrinha Rachel, minhas tias Carla, Selma e Gal. Em memória àqueles que já não estão ao meu lado fisicamente, mas sempre me desejaram o melhor, meus avós Zeca, João, Alaide e Benedita que sempre se orgulhou de minha caminhada, além de minha tia Sônia que mesmo morando longe sempre apareceu em casa para me abraçar em todos os vestibulares que passei.

À minha orientadora Maria Auxiliadora, pela oportunidade e por todos os ensinamentos e lições repassadas.

Ao meu querido grupo de pesquisa GPHEA, por toda ajuda, torcida e companheirismo, mesmo os dias mais difíceis foram os mais leves porque a nossa amizade se faz presente nos laboratórios, além da honra e privilegio de poder trabalhar ao lado de minhas referências. Uma menção especial ao Alex e a Geovanna que me convidaram para fazer parte do grupo em 2022. E ao Juan, Elivelton e Ivana por não só me ajudarem, mas se tornarem colaboradores desse trabalho, desde a coleta dos peixes até a montagem das pranchas.

A todos os professores e professoras que estiveram presentes em minha caminhada, por todo apoio e ensinamento. Aos meus amigos da faculdade, e minha amiga Alice que há mais de dez anos torce e se anima pelas minhas conquistas. Meu muito obrigada por todos aqueles que, direta ou indiretamente, contribuíram de todas as formas para que eu pudesse chegar até o encerramento deste ciclo.

Agradeço a UFPa e ao ICB por toda infraestrutura e suporte para o desenvolvimento deste trabalho.

RESUMO

A mineração atualmente é sinônimo de grandes impactos negativos sobre os sistemas hidrobiogeoquímicos e ecossistemas naturais, e geração de áreas antropizadas. Os peixes são considerados bioindicadores da qualidade dos ecossistemas, em relação aos peixes amazônicos podemos destacar *Moenkhausia collettii*, Steindachner, 1882, pertencente à família Characidae. Estudos sobre sua gônada e células germinativas, revelam características morfológicas distintas que fornecem informações importantes sobre os processos degenerativos que ocorrem em ambientes perturbados. O objetivo desse trabalho foi descrever histologicamente a gametogênese de *M. collettii*. Para isso, os espécimes foram coletados em riachos que recebem resíduos de mineração no município de Paragominas – PA, eutanasiados com Eugenol, fixados em formaldeído e submetidos a incisão ventral para remoção das gônadas, elas foram processadas através de rotina histológica com inclusão em historesina. As gônadas de *M. collettii* estão localizadas na cavidade abdominal, são órgãos pares unidos em direção ao poro urogenital, apresentam diferença de coloração, que varia de acordo com os estágios de maturação gonadal. Os ovários encontraram-se envoltos por uma túnica albugínea, formando as lamelas ovíferas, que tem como função o suporte das diferentes células germinativas, como as oogônias e oócitos tipo I, II, III e IV, além disso foi possível identificar três tipos de níveis de atresia celular, oócitos em atresia inicial, intermediária e final. Os testículos de *M. collettii* apresentam variação na coloração, transparente em gônadas imaturas e esbranquiçado nas maduras. Os testículos de *M. collettii* apresentam variação na coloração, transparente em gônadas imaturas e esbranquiçado nas maduras. No interior do testículo foram encontrados os túbulos seminíferos, onde estão inseridas as células de linhagem germinativa masculina como: espermatogônia tipo A e tipo B, espermatócitos, espermátides e espermatozoides. Diante disso, esses resultados corroboram para a compreensão do processo de desenvolvimento da oogênese e espermatogênese de *M. collettii*, suas estratégias e táticas reprodutivas, subsidiando assim estudos que visem como a espécie pode responder as condições do ambiente antropizado em que se encontram, e consequentemente contribuir para sua preservação.

Palavra-chave: oogênese, espermatogênese, peixe, morfologia

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	8
2. OBJETIVOS.....	10
2.1 OBJETIVO GERAL	10
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	11
3. MATERIAL E MÉTODOS	11
3.1 ÁREA DE ESTUDO.....	11
3.2 COLETA DOS ESPÉCIMES.....	11
3.3 MICROSCOPIA DE LUZ	12
3.4 MORFOMETRIA E ANÁLISE ESTATÍSTICA	12
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	13
4.1 MORFOLOGIA OVARIANA E OOGÊNESE	13
4.2 MORFOLOGIA TESTICULAR E ESPERMATOGÊNESE.....	17
5. CONCLUSÃO	20
6. REFERÊNCIAS	21

1. INTRODUÇÃO

O Estado do Pará possui como uma de suas maiores atividades econômicas a mineração, uma vez que a constituição geomorfológica da região amazônica é muito abundante e privilegiada por apresentar grandes reservas minerais, entre estas se destacam as de alumínio (Al) e ferro (Fe) (Kotschoubey *et al.*, 2005; Souza-Filho *et al.*, 2016). Apesar de sua relevância econômica, a mineração atualmente é sinônimo de grandes impactos negativos sobre os sistemas hidrobiogeoquímicos e ecossistemas naturais, por promover a remoção da vegetação, consequente diminuição da fauna local e geração de áreas antropizadas (Macdonald *et al.*, 2015; Feng *et al.*, 2019; Martins *et al.*, 2020).

Entre as atividades desempenhadas por mineradoras, estão a extração e refino da bauxita para obtenção do alumínio, sob a forma de íons aluminatos (Al_2O_3). A partir deste processamento, há formação de um resíduo denominado de lama vermelha. Este resíduo retém ainda ferro, titânio e sílica presentes na bauxita, além do alumínio que não foi extraído durante o refino (Silva Filho *et al.*, 2007; Bouchoucha *et al.*, 2019). Ao entrar em contato com os ecossistemas aquáticos, esses metais podem ser distribuídos nos diversos compartimentos do ambiente, como solo, sedimento, plantas e animais, como os peixes (Santana *et al.*, 2007), nos quais já são relatados impactos negativos no crescimento, na reprodução e estes danos podem estar associados a atividade de mineração de bauxita (Chapman *et al.*, 2014; Kusin *et al.*, 2017).

Compreende-se que a região amazônica possui grandes áreas de habitats naturais bem preservados e uma variedade de bacias hidrográficas, com grande diversidade de peixes devido a sua heterogeneidade ambiental (Nelson *et al.*, 2006; Benone *et al.*, 2017; Santos *et al.*, 2019). Os peixes que são considerados bioindicadores de qualidade dos ecossistemas apresentam como principais características, o sedentarismo (não migratórios), estar em abundância no local e frequente ao longo do ano. Estes têm a capacidade de bioconcentrar e integrar uma carga contaminante ao seu organismo (Taghavi *et al.*, 2016), além de serem ectotérmicos e sensíveis a mudanças no ambiente onde vivem (Li *et al.*, 2013).

Nesse sentido, alterações nas propriedades físicas e químicas dos ecossistemas aquáticos impactam inevitavelmente a fisiologia e a fenologia dos organismos e, em última análise, a composição das comunidades e das cadeias tróficas. A reprodução dos peixes, depende em grande parte de sinais ambientais específicos que desencadeiam ou modulam a maturação gonadal. Assim, essas rápidas mudanças ambientais em curso interferem

diretamente nos processos reprodutivos e podem comprometer o sucesso reprodutivo e a sobrevivência (Servili et al., 2020).

Os peixes teleósteos obtêm sucesso reprodutivo em ambientes variados, pois apresentam diferentes estratégias e/ou táticas reprodutivas (Vazzoler, 1996). Durante a sua reprodução é fundamental entender os mecanismos envolvidos na maturação das gônadas (Nóbrega et al., 2009). Desse modo, podemos observar que a diversidade de peixes é refletida em sua estrutura de gônadas e estratégias reprodutivas (Vazzoler, 1996; Nóbrega et al., 2009). Essas informações subsidiam as particularidades e diferenças nas estratégias reprodutivas, o equivalente às características que determinam sua função no ambiente, suas táticas e adaptações em função de alterações ambientais, que podem resultar em mudanças comportamentais e morfológicas (Stearns, 1989; Gross, 1996).

Estudos sobre a estrutura gonadal e os aspectos ultraestruturais das células germinativas, revelam características morfológicas do órgão, a fim de compreender os estádios de maturação gonadal (Viana *et al.*, 2018, 2022). Do mesmo modo que as análises histológicas são fontes de diagnóstico que subsidiam os estudos ecológicos, descrevendo com segurança as características gonadais dos peixes, o dimorfismo sexual e informações importantes sobre os processos degenerativos nos órgãos do animal mediante a um ambiente poluído por metais (Braunbeck *et al.*, 1998; Mendes *et al.*, 2021).

Em fêmeas e machos dos teleósteos, a gametogênese tem início no epitélio germinativo, sendo epitélio das lamelas ovarianas, e epitélio dos túbulos seminíferos (Grier, 2002). O desenvolvimento oocitário tem sido amplamente estudado, buscando explicar as diversas morfologias que caracterizam a reprodução (Viana *et al.*, 2018). Este processo, também denominado de oogênese, consiste desde a multiplicação da oogônia, passando pela diferenciação e liberação de oócitos maduros (Uribe *et al.*, 2016). Neste processo há organização das células e matriz que circundam o oócito formando o complexo folicular que auxilia na maturação da célula até o momento da liberação para ser fertilizado (Selman & Wallace, 1989; Grier *et al.*, 2009; Quagio-Grassiotto *et al.*, 2014).

De modo semelhante, é por meio do estudo da espermatogênese que se pode compreender os mecanismos envolvidos na maturação dos espermatozoides (Billard, 1986; Viana *et al.*, 2022). Este processo se encontra subdividida em três fases, a proliferativa na qual ocorre divisões mitóticas das espermatogônias, a meiótica, a qual envolve as divisões meióticas I e II formando espermatócitos I, II e as espermátides e a fase espermiogênica que consiste nas

modificações da espermatíde originando os espermatozoides (Grier, 1981). Em geral, os testículos de peixes são classificados de acordo o aspecto macroscópico do órgão como filiforme, franjada ou lobular (Melo *et al.*, 2011). E de acordo com a organização do compartimento germinativo e distribuição de espermatogônias os testículos são classificados em tubular anastomosado, lobular espermatogonial restrito e lobular espermatogonial irrestrito (Grier, 1981; Parenti & Grier, 2004; Mazzoni *et al.*, 2014).

Entre as espécies presentes em área de mineração, destaca-se *Moenkhausia collettii*, Steindachner, 1882, pertencente à família Characidae, conhecido como lambari, piaba ou tetra com distribuição na América do Sul, ocorrendo além do Brasil, Colômbia, Guiana Francesa, Guiana, Venezuela, Suriname e Peru (Reis *et al.*, 2016). Essa espécie é caracterizada por apresentar pequeno porte, corpo alongado, e possui como principal característica uma larga faixa horizontal no olho (Queiroz *et al.*, 2013; Soares, 2020). Possui uma importância econômica por estar na lista de peixes de água doce permitidos à captura, passíveis de exploração para fins ornamentais (IBAMA, 2012). Porém as características reprodutivas da espécie ainda são limitadas, principalmente em áreas antropizadas.

Nesse contexto, *M. collettii* é uma espécie que apesar de sua abundância grande distribuição nos rios e riachos da região amazônica e potencial para ser bioindicador em ecossistemas aquáticos, estudos sobre a sua reprodução e as características morfológicas gonadais, são escassos ou desconhecidos em áreas antropizadas pela mineração.

Diante disso, é fundamental compreender o processo da oogênese e espermatogênese de *M. collettii*, a fim de subsidiar estudos que visem como a espécie pode responder as condições do ambiente antropizado em que se encontra, e consequentemente contribuir para sua preservação. O objetivo desse trabalho foi descrever histologicamente a gametogênese de *M. collettii*, provenientes de riachos em área de mineração

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

- Descrever morfolologicamente a oogênese e espermatogênese de *M. collettii* proveniente de riachos em área de mineração

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Caracterizar as células da linhagem germinativa feminina e masculina;
- Descrever os estágios de maturação da oogênese e da espermatogênese;
- Identificar os tipos de atresia presentes na oogênese de *M. collettii*.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 ÁREA DE ESTUDO

O presente estudo foi realizado no município de Paragominas - PA, Bacia do rio Capim, mesorregião do Sudeste Paraense, Brasil, em duas microbacias pertencentes às drenagens dos igarapés Parariquara e Potiritá respectivamente (Figura 1).

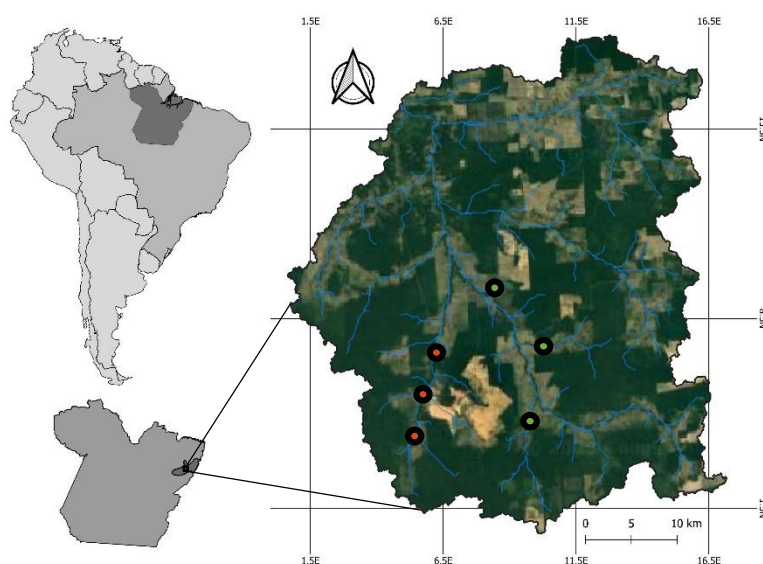


Figura 1- Localização do estado do Pará, com destaque para as microbacias dos igarapés Parariquara e Potiritá na bacia do Rio Capim, município de Paragominas, Pará, Brasil. Os círculos em laranja e verde indicam os pontos onde os espécimes de *M. collettii* foram coletados.

3.2 COLETA DOS ESPÉCIMES

Os espécimes de *M. collettii* foram coletados bimestralmente entre março de 2022 e março de 2023. A captura dos espécimes ocorreu com auxílio de peneiras de mão retangulares de 80 x 60 cm e rede de arrasto de 6 m, ambas com malha de 2 mm entre nós opostos. Os espécimes foram eutanasiados com doses letais de Eugenol a 6 ml/L, foram mensurados quanto a sua massa total (Mt) em g com auxílio de uma balança analítica com precisão de 0,0001 g, e

quanto ao seu comprimento padrão (Cp) em milímetros, com o auxílio de um paquímetro de 0,01 mm de precisão.

Em seguida os espécimes foram fixados em formol a 10%, onde permanecem por 48h, e posteriormente são acondicionados em álcool 70%. Em laboratório, os espécimes de *M. collettii* foram eviscerados, por meio de uma incisão longitudinal na região ventral para a retirada das gônadas, e foram verificados quanto a sua massa (Mg), com precisão de 0,0001 g, e acondicionadas em álcool 70%, para análises microscópicas.

As coletas desse trabalho foram legalmente respaldadas pela licença de número 81469-1, expedida pelo Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (ICMBio), através do Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade (SISBIO), e regulamentada pelo Comitê de Ética para uso animal da Universidade Federal do Pará (UFPA), através do processo de número 8730240222.

3.3 MICROSCOPIA DE LUZ

As gônadas de *M. colletti* foram processadas conforme a histologia de rotina com inclusão em historesina - Metacrilato Glicol (Cordeiro *et al.*, 2019, adaptado). As amostras foram desidratadas gradualmente em etanol 70% a 100%, em seguida foram embebidas em soluções decrescentes de historesina mais álcool 95%, e infiltradas com endurecedor. As amostras foram levadas para estufa para completar o processo de endurecimento ao longo de um dia. Os blocos com as amostras foram cortados com auxílio de um micrótomo, foram feitos cortes entre 5 e 3 micrometros. As lâminas foram coradas com azul de metileno e azul de toluidina, analisadas e fotografadas em um fotomicroscópio Nikon Eclipse Ci-S H550S acoplado a uma câmera Nikon Digital Sight DS-U3, usando software NIS-Elements BR (4.00.07-bit).

3.5 MORFOMETRIA E ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para análise morfométrica foram selecionados apenas testículos em maturação. Um total de 5 exemplares foram utilizados, para cada espécime, foi analisado o diâmetro equivalente (n=20) de cada tipo celular (espermatogônia A, espermatogônia B, espermatócito, espermátide e espermatozoide) totalizando 100 células de cada tipo.

Os cortes foram analisados em fotomicroscópio utilizando o software NIS-elements BR (4.00.07-bit), e os tipos celulares foram analisados na objetiva de 100X. Cada célula foi sobreposta com duas linhas tracejadas se cruzando em ângulos retos no meio da célula, e o comprimento do segmento da linha ao longo desse diâmetro da célula foi medido, por fim, o comprimento aproximado das duas medições foi considerado como diâmetro aproximado da célula. Para verificar se havia diferença entre os tipos celulares (espermatogônia A, espermatogônia B, espermatócito, espermátide e espermatozoide) os valores dos diâmetros foram testados quanto as premissas estatísticas de normalidade e homoscedasticidade e testados com o teste de Kruskal-Wallis, seguido de um teste de comparação múltipla de Wilcoxon.

Todas as análises feitas no presente estudo foram realizadas levando em consideração um nível de significância de 5%, utilizando o software de livre acesso R Core Team, 2023, 4.3.1, utilizando os pacotes Car (Fox e Weisberg, 2019) e Vegan (Oksanen et al., 2022) e ggplot2 (Wickham, 2016).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 MORFOLOGIA OVARIANA E OOGÊNESE

As gônadas de *M. collettii* estão localizados na cavidade abdominal, são órgãos pares unidos em direção ao poro urogenital, apresentam diferença de coloração, que varia de acordo com os estágios de maturação gonadal. Os ovários (Fig.2B) encontram-se envoltos por uma túnica albugínea, que emite projeções para o interior do ovário, formando as lamelas ovígeras, que tem como função o suporte das diferentes células germinativas, como as oogônias e oócitos tipo I, II, III e IV.

Em *M. collettii* foram observados quatro estágios de maturação ovariana, imaturo, em maturação, maduro e desova (Fig. 1C-N). O estágio imaturo (Fig. 2C), apresentou como características a presença de oogônias (Fig.2D), que são as primeiras células de linhagem germinativa com formato ovóide, núcleo central volumoso e citoplasma escasso, e foram encontradas formando ninhos. As oogônias estão localizadas no epitélio germinativo do ovário, o seu arranjo em ninhos ocorre por meio de projeções de células foliculares, logo após elas se tornam oócitos uma vez iniciada a meiose (Uribe *et al.*, 2015). Do mesmo modo foi possível identificar a presença oócitos tipo I (Fig. 2E), com núcleo volumoso e presença de vários

nucléolos localizados na periferia. Essa organização dos nucléolos também é encontrada no caracídeo *Hoplias malabaricus*, Bloch, 1794 (Quagio-Grassiotto *et al.*, 2013).

A maturação de oócitos ocorre antes da ovulação e é um pré-requisito para uma fertilização bem sucedida (Nagahama & Yamashita, 2008). Nas gônadas em maturação de *M. collettii* (Fig. 2F) foram observados em maior quantidade oócitos do tipo II (Fig. 2G), que possuem como característica, núcleo volumoso e presença de uma fina camada com células de formato achatado denominada de células foliculares (Fig. 2H). Essas células são importantes porque estão responsáveis pela conversão de hormônios como estradiol, o que ajuda na manutenção dos oócitos durante a maturação para o desenvolvimento ovariano (Patiño & Sullivan, 2002; Viana *et al.*, 2023).

O ovário maduro (Fig. 2I) apresentou como característica a presença dos oócitos do tipo III (Fig. 2J) e IV (Fig. 2K). Oócitos do tipo III, apresentaram volume maior devido aos glóbulos de vitelo que preenchem o citoplasma da célula. Este material acumulado é essencial para nutrição o desenvolvimento embrionário e larval da prole (Hara *et al.*, 2016, Mendes *et al.*, 2022). Neste oócitos o núcleo apresenta vários nucléolos onde é possível observar o complexo folicular (Fig. 2L) formado pelas seguintes camadas: zona radiata (Zr), células foliculares (Cf) e camada de teca (T). Os oócitos do tipo IV são as maiores células da linha germinativa, em que o núcleo migra para o polo animal da célula e passa a ser descrito como vesícula germinativa, o citoplasma é ocupado por vitelo e por alvéolos corticais abaixo da membrana plasmática. Estas células apresentam o complexo folicular totalmente formado e com maior espessura (Fig. 2M) (Viana *et al.*, 2018, 2023).

Durante o estágio de desova, pode-se observar a presença de complexos pós-ovulatórios (POCs) (Fig. 2N), esses são estruturas excedentes de folículos maduros que foram ovulados durante a estação reprodutiva e o crescimento das células germinativas (Fig. 2O) (Moraes *et al.*, 2016; Cassel *et al.*, 2017).

Atresia folicular em peixes teleósteos vem sendo descrita como processo degenerativo das células germinativas e somáticas, que envolve apoptose, uma forma programada de morte celular, autofagia e heterofagia (Cassel *et al.*, 2017, Corriero *et al.*, 2021). Por outro lado, a atresia é um processo normal que ocorre na gônada dos peixes principalmente na oogênese ao longo do ciclo ovariano (Ganias *et al.*, 2008, Corriero *et al.*, 2021).

Em *M. collettii*, em maior frequência nos ovários maduros, foram identificados três tipos atresia: a inicial (Fig. 3A) onde o oócito ainda permanece com seu formato ovóide

com irregularidades e distorções na membrana plasmática da célula (Viana *et al*, 2018), mas ainda é possível distinguir o núcleo da célula. Atresia intermediária (Fig. 3B) onde a célula, já distorcida, perdeu seu formato original e é possível observar a presença de vacúolos em seu interior (Miranda *et al.*, 1999). E em atresia final (Fig.3C), em que oócito é totalmente deformado, o núcleo não é observado, as células foliculares e tecas são hipertrofiadas, fusão dos glóbulos de vitelo (Viana *et al*, 2018).

Inúmeros fatores podem influenciar o aumento da atresia folicular acima das taxas fisiológicas, como agentes biológicos, luz, temperatura, confinamento, níveis hormonais inadequados, disponibilidade de alimentos, reservas de energia e estresses associados ao ambiente em que os peixes estão inseridos (Cassel *et al.*, 2017; Corriero *et al.*, 2021). Em nosso estudo, a espécie por ser coletada em riachos onde há resíduos da área de mineração acreditamos a forte influência do ambiente sobre o ecossistema o que pode gerar o estresse e comprometer a fisiologia dos órgãos, como o ovário, provocando a alteração no mecanismo de sobrevivência da célula.

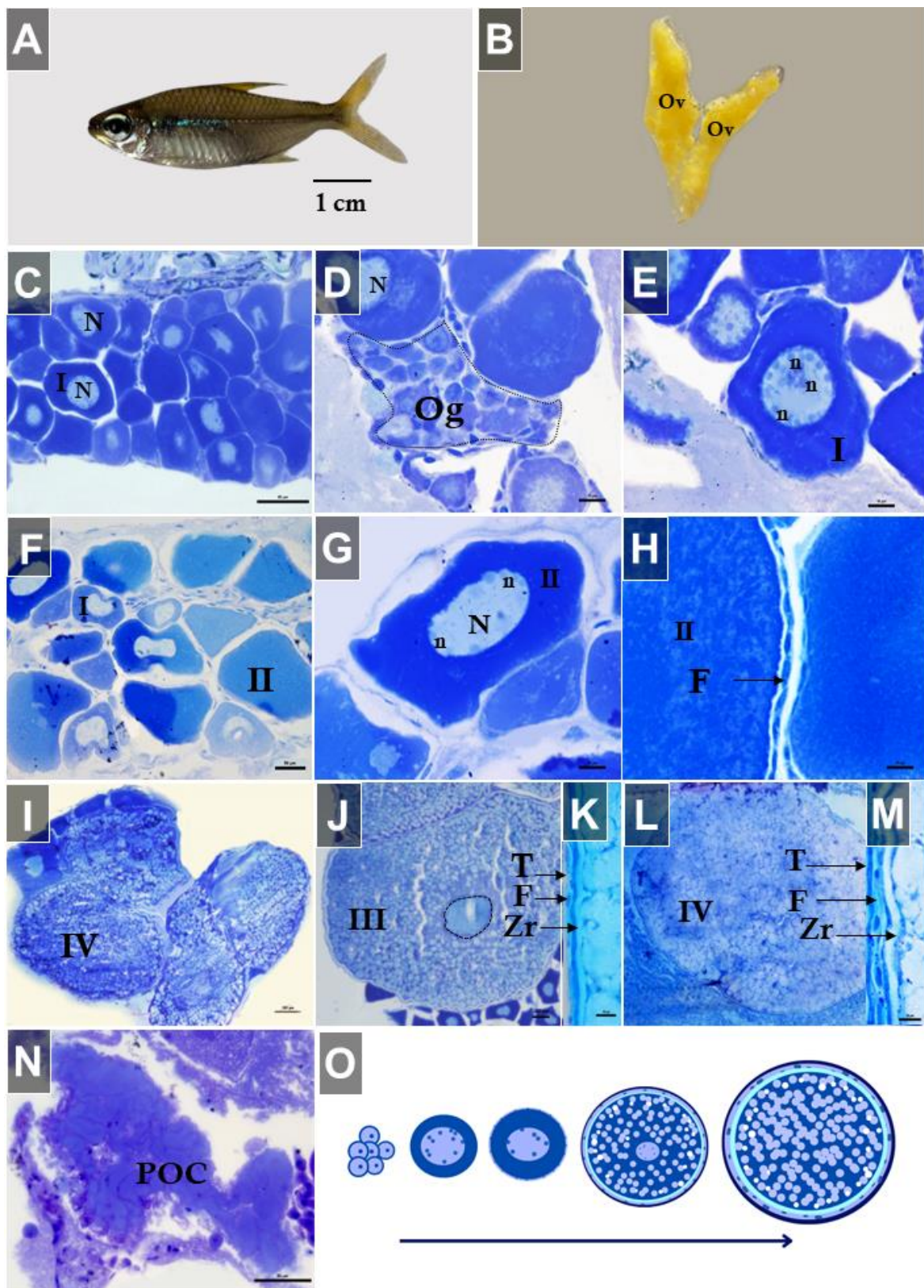


Figura 2- **A:** Espécime de *M. collettii*. **B:** Foto macroscópica do ovário de *M. collettii*. **C:** Oócito imaturo. **D:** Oogônia. **E:** Oócito tipo I. **F:** Oócito em maturação. **G:** Oócito tipo II. **H:** Células foliculares. **I:** Oócito maduro. **J:** Oócito tipo III. **K:** Teca, células foliculares e zona radiata em oócito tipo III. **L:** Oócito tipo IV. **M:** Espessamento da teca, células foliculares e zona radiata em oócito tipo IV. **N:** Complexo pós ovulatório. **O:** Resumo esquemático evidenciando o crescimento das oogônias até o oócito tipo IV.

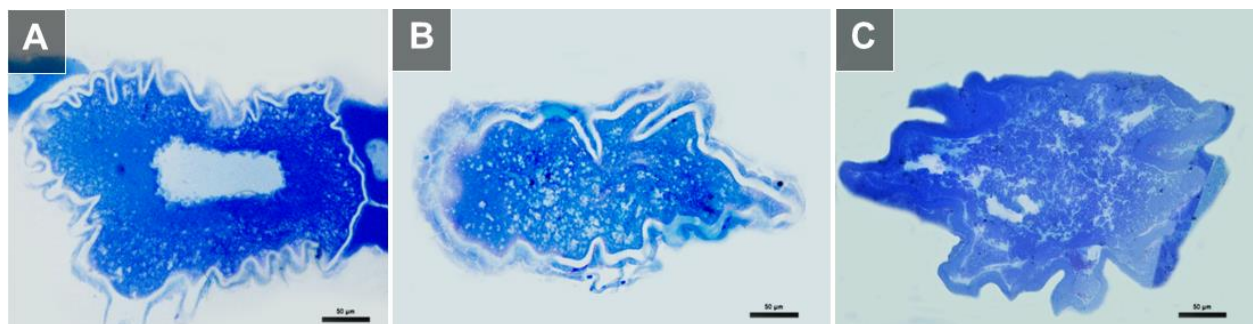


Figura 3- **A:** Atresia inicial. **B:** Atresia intermediária. **C:** Atresia final.

4.2 MORFOLOGIA TESTICULAR E ESPERMATOGÊNESE

Os testículos de *M. collettii* (Fig. 4B) apresentam variação na coloração, de transparente em gônadas imaturas a esbranquiçado quando maduras. Nos indivíduos maduros, os testículos são pares, volumosos, de formato lobular que se unem na porção caudal formando um único ducto. No interior do testículo se encontram os túbulos seminíferos onde estão inseridas as células de linhagem germinativa: espermatogônia, espermatócitos, espermatídes e espermatozoides. A organização dos túbulos é do tipo tubular anastomosados. Esse padrão estrutural e de distribuição celular se manteve similar a outros peixes teleósteos como Characiformes e Siluriformes (Grier, 1981; Parenti & Grier, 2004).

Nos machos de *M. collettii* foram encontrados três estágios de maturação testicular, imaturo, em maturação e maduro. No estágio imaturo (Fig. 4C) houve a prevalência das maiores células da linha germinativa masculina, que são as espermatogônias, classificadas nos tipos de espermatogônia A (SgA) e espermatogônia B (SgB).

A espermatogônia A (Fig. 4D), apresentou diâmetro médio de $15.56 \pm 1.84 \mu\text{m}$, ela possui como característica um núcleo volumoso com presença de um nucléolo central, geralmente encontradas individualizadas na periferia do túbulo, ela passa por divisões mitóticas

que dão origem às espermatogônias B (Grier, 1981; Grier & Uribe, 2009). A SgB (Fig.4E) apresentou diâmetro médio de $9.19 \pm 1.58 \mu\text{m}$, cromatina condensada, um menor volume quando comparada a SgA. Aspecto similar foi observado em outros teleósteos (De Melo Dias *et al.*, 2017), e normalmente foram encontradas formando agrupamentos denominados de “ninhos”, as SgB passam por sucessivas divisões mitóticas antes de iniciar a meiose (Grier & Uribe, 2009).

Nesse estágio também foi possível identificar as células de Sertoli (Fig. 4C) que são capazes de fornecer suporte mecânico, proteção celular e suporte nutritivo (França *et al.*, 2016), sendo assim fundamentais para o desenvolvimento das células germinativas (Siqueira-Silva *et al.*, 2019). Além disso, foram encontradas as células mioides (Fig. 4C), em torno dos túbulos seminíferos (Zhou *et al.*, 2019).

Durante o estágio em maturação (Fig. 4F) observou-se no epitélio germinativo de *M. collettii* ninhos de espermatócitos (Fig.4G-H), diâmetro médio de $4.95 \pm 0.63 \mu\text{m}$, em diferentes aspectos de condensação da cromatina (Gonçalves *et al.*, 2019), agrupados na periferia do túbulo. Com maior frequência outro tipo celular presente foram as espermatídes (Fig. 4F), com diâmetro médio $2.42 \pm 0.23 \mu\text{m}$, que possuem núcleo condensado e citoplasma escasso. As espermatídes em estágio inicial são esféricas, e por meio da espermiogênese se transformam em espermatozoides, que também foram visualizados no lúmen do túbulo seminífero em menores quantidades. Assim, ao final da espermiogênese, os testículos maduros de *M. collettii* (Fig. 4I) apresentaram espermatozoides no lúmen dos túbulos seminíferos em grandes quantidades, com diâmetro médio da cabeça de $1.77 \pm 0.10 \mu\text{m}$ e ninhos de espermatócitos e espermatídes (Fig. 4J).

Em relação a análise morfométrica (Fig.5), foi possível evidenciar que houve diferenças nos diâmetros das células ($H_{(4,495)}=477,89$; $p<0,05$). De acordo com o teste de comparação múltipla de Wilcoxon, os diâmetros dos diferentes tipos de célula diferiram entre si ($p<0,05$).

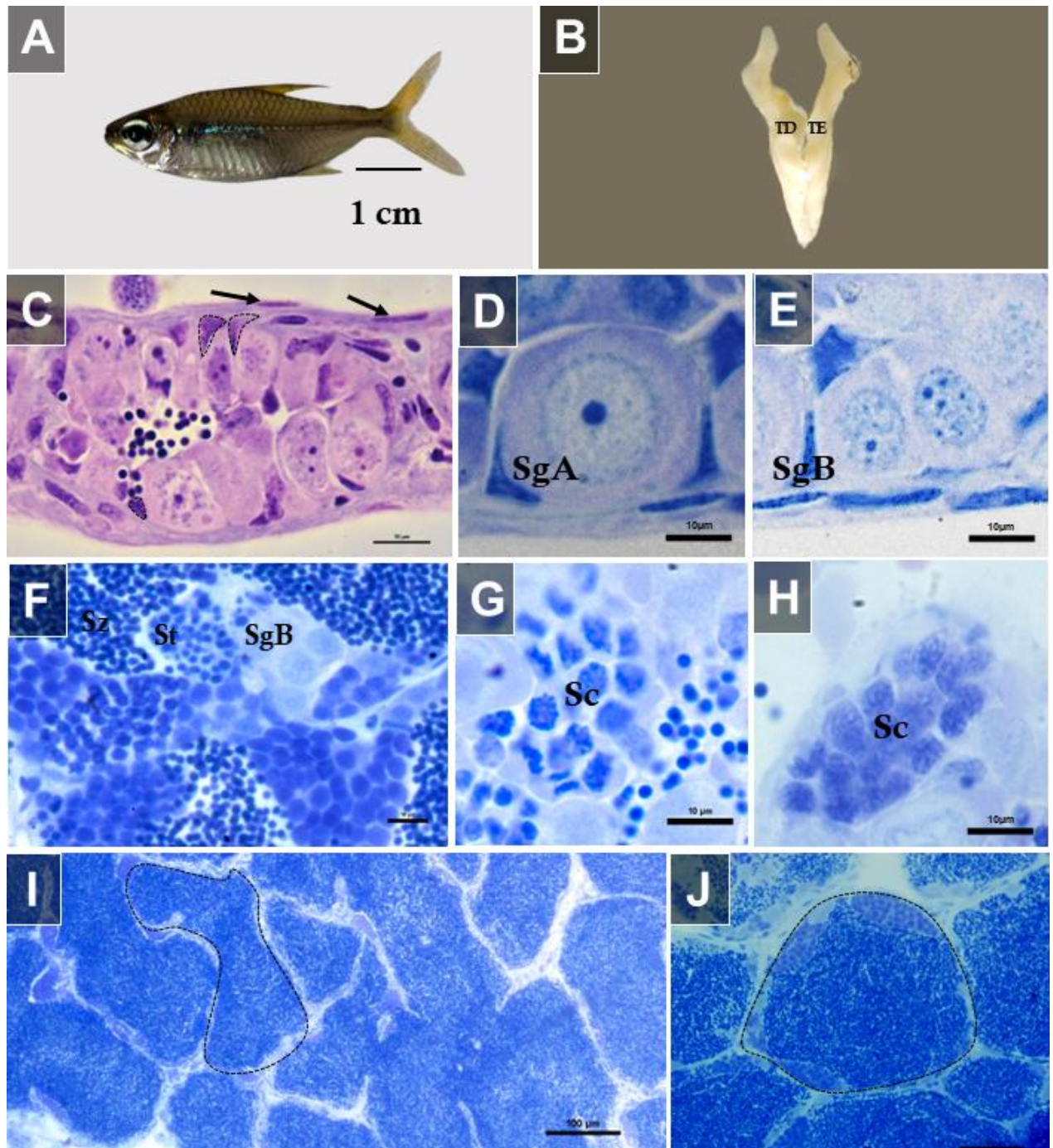


Figura 4- **A:** Exemplar adulto de *M. collettii*. **B:** Fotografia dos testículos. **C:** Estágio imaturo, com destaque para as células de Sertoli (traço) e células mioides (seta). **D:** Espermatogônia A. **E:** Espermatogônia B. **F:** Estágio em maturação. **G-H:** Espermatócitos em diferentes aspectos de condensação da cromatina **I:** Estágio maduro **J:** Espermatozoides ao longo do túbulo seminífero.

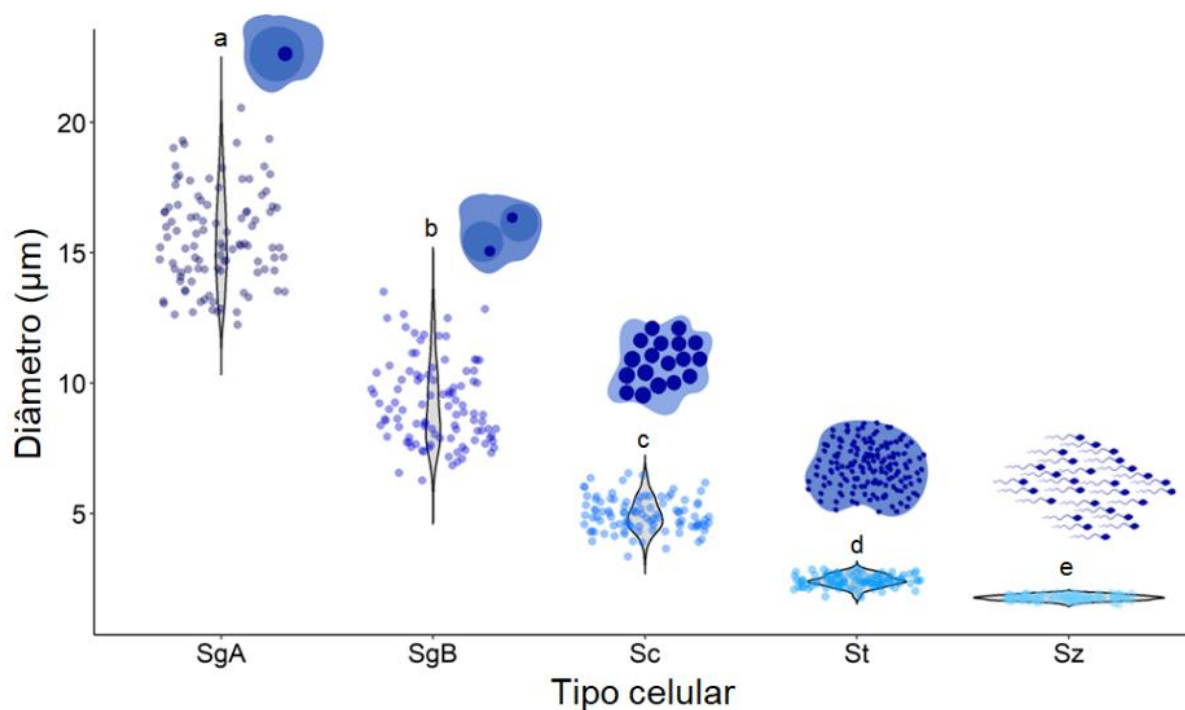


Figura 5- Variação do diâmetro dos diferentes tipos celulares de *M. collettii* coletados em riachos da bacia do Rio Capim, município de Paragominas, Pará, Brasil. **SgA** – Espermatogônia A; **SgB** – Espermatogônia B; **Sc** Espermatócito; **St** – Espermátide; **Sz** – Espermatozoide.

5. CONCLUSÃO

Com esse trabalho, foi possível caracterizar a gametogênese de *Moenkhausia collettii* e os resultados corroboram para a compreensão do processo de desenvolvimento gonadal de um peixe de riacho. Embora haja a frequência de alterações celulares, principalmente no ovário, os dados subsidiam que a espécie está respondendo positivamente ao ambiente em que está inserido realizando todos os processos para reprodução.

6. REFERÊNCIAS

- Benone, N., Esposito, M., Juen, L., Pompeu, P., & Montag, L. (2017). Regional controls on physical habitat structure of Amazon streams. **River Research and Applications**, 33, 766–776. <https://doi.org/10.1002/rra.3137>
- Billard R. Spermatogenesis and spermatology of some teleost fish species. *Reprod Nutr Développement*. 1986;26:877–920. biodiversity and conservation in South America. **Journal of Fish Biology**, 89(1), 12–47.
- Blaxter, J.H.S. 1988 The physiology of developing fish: Eggs and Larvae. In: HOAR, W.S. e Randall, D.J. (Ed.). *Fish physiology*. San Diego: Academic Press. v.11, p.1-58.
- Bouchoucha, M; Chekri R; Leufroy A.; Jitaru P.; Millour S.; Marchond N.; Chafey C.; Testu C.; Zinck J.; Cresson P.; Mirallès F.; Mahe A.; Arnich N.; Sanaa M.; Bemrah N.; Guérin T 2019. Trace element contamination in fish impacted by bauxite red mud disposal in the Cassidaigne canyon (NW French Mediterranean). **Science of the Total Environment** 690:16–26
- Braunbeck, T. (1998). Cytological alterations in fish hepatocytes following in vivo and in vitro sublethal exposure to xenobiotics — structural biomarkers of environmental contamination. In: Braunbeck, T., Hinton, D.E., Streit, B. (eds) **Fish Ecotoxicology**. EXS, vol 86. Birkhäuser, Basel. https://doi.org/10.1007/978-3-0348-8853-0_3
- Cassel M, Chehade C, Branco GS, Caneppele D, Romagosa E, Borella Maria Inê, Ovarian development and the reproductive profile of *Astyanax altiparanae* (Teleostei, Characidae) over one year: Applications in fish farming, *Theriogenology* (2017), doi: 10.1016/j.theriogenology.2017.04.044.
- Chapman, J. M., Proulx, C. L., Veilleux, M. A., Levert, C., Bliss, S., Andre, M. E., ... & Cooke, S. J. (2014). Clear as mud: a meta-analysis on the effects of sedimentation on freshwater fish and the effectiveness of sediment-control measures. **Water research**, 56, 190-202
- Cordeiro, J. G., Maximino C., Siqueira-Silva, D. H., Histological staining of fish gonadal tissue. *Protocols*, 2019
- Corriero, A, Zupa, R, Mylonas, CC, Passantino, L. Atresia of ovarian follicles in fishes, and implications and uses in aquaculture and fisheries. *J Fish Dis*. 2021; 44: 1271–1291. <https://doi.org/10.1111/jfd.13469>

- Cussac, V., Ortubay, S. Gametogenesis and Development of *Gymnocharacinus Bergi* (Pisces, Characidae): Reproductive Mode Relative to Environmental Stability. *Environmental Biology of Fishes* 63, 289–297 (2002). <https://doi.org/10.1023/A:1014396327117>
- De Melo Dias, G.C., Cassel, M., Oliveira De Jesus, L.W., Batlouni, S.R., Borella, M.I., 2017. Spermatogonia, germline cells, and testicular organization in the Characiform *Prochilodus lineatus* studied using histological, stereological, and morphometric approaches. *Anat. Rec.* 300, 589–599. <https://doi.org/10.1002/ar>.
- Feng, Y., Wang, J., Bai, Z., Reading, L., 2019. Effects of surface coal mining and land reclamation on soil properties: a review. **Earth-Science Rev.** 191, 12–25. <https://doi.org/10.1016/j.earscirev.2019.02.015>.
- França, L.R., Hess, R.A., Dufour, J.M., Hofmann, M.C. and Griswold, M.D. (2016), The Sertoli cell: one hundred fifty years of beauty and plasticity. *Andrology*, 4: 189-212. <https://doi.org/10.1111/andr.12165>
- Ganias, K., Nunes, C., & Stratoudakis, Y. (2008). Use of late ovarian atresia in describing spawning history of sardine, *Sardina pilchardus*. **Journal of Sea Research**, 60, 297–302. <https://doi.org/10.1016/j.seares.2008.06.004>
- Gonçalves, L. A. B., Silva, G. M. F., Viana, I. K. S., Hainfellner, P., Ferreira, M. A. P., Batlouni, S. R., & Rocha, R. M. (2019). Testicular structure and development of germ cells of *Hypophthalmus marginatus* Valenciennes 1840 (Siluriformes: Pimelodidae). *Animal reproduction science*, 211, 106223. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2019.106223>
- Grier HJ, Uribe MC, Patino R. 2009. The ovary, folliculogenesis and oogenesis in teleost. In: Jamieson BGM, editor. *Reproductive Biology and Phylogeny of Fishes (Agnathans and Bony Fishes)*, Vol 8A. Enfield, NH: Science Publishers Inc. pp 25–84
- Grier HJ. Cellular organization of the testis and spermatogenesis in fishes. *Am Zool.* 1981;21:345–57.
- Grier HJ. The germinal epithelium: Its dual role in establishing male reproductive classes and understanding the basis for indeterminate egg production in female fishes. In: Creswell RL (Ed.). *Proceedings of the Fifty-third Annual Gulf and Caribbean Fisheries Institute*, 2000, Biloxi, Mississippi. Fort Pierce, FL: Gulf and Caribbean Fisheries Institute, 2002. p.537-552

Gross, M. R. (1996). Alternative reproductive strategies and tactics: diversity within sexes. **Trends in Ecology & Evolution**, 11(2), 92–98. [https://doi.org/10.1016/0169-5347\(96\)81050-0](https://doi.org/10.1016/0169-5347(96)81050-0)

IBAMA. In: Instrução Normativa Interministerial nº1, de 3 de janeiro de 2012. 2012. Peixes de captura para fins ornamentais. Diário Oficial da União: Seção1, 3:26-42.

Kotschoubey, B; Calaf, J. M. C; Lobato, A. C. C; Leite, A. S; Azevedo, C. H. D. Caracterização e gênese dos depósitos de bauxita da Província Bauxitífera de Paragominas, noroeste da bacia do Grajaú, nordeste do Pará/oeste do Maranhão. Caracterização de depósitos minerais em distritos mineiros da Amazônia. p. 687-782, 2005.

Kusin, F. M., Rahman, M. S. A., Madzin, Z., Jusop, S., Mohamat-Yusuff, F., & Ariffin, M. (2017). The occurrence and potential ecological risk assessment of bauxite mine-impacted water and sediments in Kuantan, Pahang, Malaysia. **Environmental Science and Pollution Research**, 24, 1306-1321

Li, J., Dong, S., Peng, M., Yang, Z., Liu, S., Li, X., Zhao, C., 2013. Effects of damming on the biological integrity of fish assemblages in the middle Lancang-Mekong River basin. **Ecol. Indic.** 34, 94–102. <https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2013.04.016>. 140

Macdonald, S.E., Landhäuser, S.M., Skousen, J. *et al.* Forest restoration following surface mining disturbance: challenges and solutions. *New Forests* **46**, 703–732 (2015). <https://doi.org/10.1007/s11056-015-9506-4> male reproductive system of the catfish *Iheringichthys labrosus* (Lütken, 1874) (Siluriformes:

MARTINS, W. B. R. et al., Ecological methods and indicators for recovering and monitoring ecosystems after mining: A global literature review. **Ecological Engineering**. v. 145, p. 105707, 2020.

Mazzoni, T.S., Grier, H.J. and Quagio-Grassiotto, I. (2014), Male Gonadal Differentiation and the Paedomorphic Evolution of the Testis in Teleostei. **Anat. Rec.**, 297: 1137-1162. <https://doi.org/10.1002/ar.22915>

Melo, R. M., Arantes, F. P., Sato, Y., dos Santos, J. E., Rizzo, E., & Bazzoli, N. (2011). Comparative morphology of the gonadal structure related to reproductive strategies in six species of neotropical catfishes (Teleostei: Siluriformes). *Journal of morphology*, 272(5), 525–535. <https://doi.org/10.1002/jmor.10931>

MENDES, Y. A. et al. Oogenesis and expression of PCNA and vitellogenin in *Geophagus* native to the Amazon basin in pre- and post-hydroelectric dam periods. **Animal Reproduction Science**, v. 247, n. 107150, p. 107150–107150, 1 dez. 2022.

Mendes, Y. A., R. S. Oliveira, L.F.A. Montag, M. C. Andrade, T. Giarrizzo, R. M. Rocha, M. A. P. Ferreira, Sedentary fish as indicators of changes in the river flow rate after impoundment, **Ecological Indicators**, Volume 125, 2021, 107466, <https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2021.107466>.

Morais RDVS, Thomé RG, Santos HB, Bazzoli N, Rizzo E (2016) Relationship between bcl-2, bax, beclin-1, and cathepsin D proteins during postovulatory follicular regression in fish ovary. **Theriogenology** 85:1118–1131. doi:10.1016/j.theriogenology.2015.11.024

Nagahama, Y. and Yamashita, M. (2008), Regulation of oocyte maturation in fish. **Development, Growth & Differentiation**, 50: S195-S219. <https://doi.org/10.1111/j.1440-169X.2008.01019.x>

Nelson JS (2006) *Fishes of the world*. Wiley, Hoboken

Nóbrega RH, Batlouni SR, França LR. An overview of functional and stereological evaluation of spermatogenesis and germ cell transplantation in fish. *Fish Physiol Biochem*. 2009 Mar;35(1):197-206. doi: 10.1007/s10695-008-9252-z. Epub 2008 Aug 22. PMID: 18716890.

Parenti, L.R., Grier, H.J., 2004. Evolution and phylogeny of gonad morphology in bony fishes. *Integr Comp Biol*. 44, 333–48.

Patiño, R., Sullivan, C.V. Ovarian follicle growth, maturation, and ovulation in teleost fish. *Fish Physiology and Biochemistry* 26, 57–70 (2002). <https://doi.org/10.1023/A:1023311613987>

Quagio-Grassiotto I, Wildner DD, Guimaraes ACD. 2014. A cytochemical approach to describe oocyte development in the freshwater ostariophysan, *Serrasalmus maculatus* (Characiformes). *Micron* 60:18–28.

Quagio-Grassiotto, I., Grier, H., Mazzoni, T. S., Nobrega, R. H. & Amorim, J. P. A. Activity of the ovarian germinal epithelium in the freshwater catfish, *Pimelodus maculatus* (Teleostei: Ostariophysi: Siluriformes): germline cysts, follicle formation and oocyte development. *J Morphol* 272, 1290–1306 (2011).

Quagio-Grassiotto, I., Wildner, D.D., Ishiba, R. Gametogênese de peixes: aspectos relevantes para o manejo reprodutivo. **Rev. Bras. Reprod. Anim.**, Belo Horizonte, v.37, n.2, p.181-191, abr./jun. 2013.

Queiroz, L., Torrente-Vilara, G., Ohara, W., Pires, T., Zuanon, J., & Doria, C. (2013). Peixes do Rio Madeira (Dialeto Latin Ameri..., Vol. 1). <https://www.researchgate.net/publication/290841749>

Reis, R. E., Albert, J. S., Di Dario, F., Mincarone, M. M., Petry, P., & Rocha, L. A. (2016). Fish Santana, G. P.; Barroncas, P. DE S. R.. Estudo de metais pesados (Co, Cu, Fe, Cr, Ni, Mn, Pb e Zn) na Bacia do Tarumã-Açu Manaus (AM). **Acta Amazonica**, v. 37, n. 1, p. 111–118, 2007.

Santos, LL, Benone, NL, Soares, BE, Barthem, RB, Montag, LFA. Trait–environment relationships in Amazon stream fish assemblages. *Ecol Freshw Fish*. 2019; 28: 424–433. <https://doi.org/10.1111/eff.12465>

Selman K, Wallace AR. 1989. Cellular aspects of oocyte growth in teleosts. **Zool Sci** 6:211–231

Servili, A., Canario, A. V., Mouchel, O., & Muñoz-Cueto, J. A. (2020). Climate change impacts on fish reproduction are mediated at multiple levels of the brain-pituitary-gonad axis. **General and Comparative Endocrinology**, 291, 113439.

Silva-Filho, E. B.; Alves, M. C. M.; DA Motta, M.. Lama vermelha da indústria de beneficiamento de alumina: produção, características, disposição e aplicações alternativas. *Matéria* (Rio de Janeiro), v. 12, n. 2, p. 322–338, 2007.

Siqueira-Silva, D. H.; Da Silva Rodrigues, M.; Nóbrega, R. H. Testis structure, spermatogonial niche and Sertoli cell efficiency in Neotropical fish. **General and Comparative Endocrinology**, v. 273, p. 218–226, mar. 2019.

Soares, I. M. (2020). Revisão taxonômica e Análise Filogenética morfológica do complexo de espécies *Moenkhausia colletti* (Characiformes: Characidae). Doutorado em Ciências Biológicas, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 255p.

Souza-Filho, P. W. M; De Souza, E. B; Júnior, R. O. S; Nascimento JR, W. R. *et al.*, Four decades of land-cover, land-use and hydroclimatology changes in the Itacaiúnas River

watershed, southeastern Amazon. **Journal of Environmental Management**. v. 167, p. 175-184, 2016.

Stearns, S. C. (1989). The evolutionary significance of phenotypic plasticity. *BioScience*, 39(7), 436–445. <https://doi.org/10.2307/1311135>

Taghavi Jelodar H, Fazli H, Salman Mahiny A. Study on heavy metals (chromium, cadmium, cobalt and lead) concentration in three pelagic species of Kilka (Genus *Clupeonella*) in the southern Caspian Sea. **Iranian Journal of Fisheries Sciences** 2016; 15(1): 567-74

Uribe, M.C., Grier, H.J., García-Alarcón, A. and Parenti, L.R. (2016), Oogenesis: From Oogonia to Ovulation in the Flagfish, *Jordanella floridae* Goode and Bean, 1879 (Teleostei: Cyprinodontidae). **Journal of Morphology**, 277: 1339-1354. <https://doi.org/10.1002/jmor.20580>

Vazzoler, A. E. A. M. (1996). Biologia da reprodução de peixes teleósteos: teoria e prática. In EDUEM

Viana, I. K. S., Ferreira, M. A. P., Mendes, Y. A., Silva, B. R. M., Gonçalves, L.A.B., Rocha, R.M. Follicular complex may predict reproductive tactics in siluriform fishes. **Heliyon**, v. 9, n. 5, p. e16204, 1 maio 2023. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2023.e16204>

Viana, I. K. S., S, G. M. F., Pantoja, J. C. D., Oliveira, R. S., Mendes, Y. A., Nunes, J. L. G., Ferreira, M. A. P., & Rocha, R. M. (2022). Subfamily hypostominae: similarities and differences in testicular structure of amazonian fish. *BMC zoology*, 7(1), 3. <https://doi.org/10.1186/s40850-021-00106-5>

Viana, I.K.S., Gonçalves, L.A.B., Ferreira, M.A.P. *et al.* Oocyte growth, follicular complex formation and extracellular-matrix remodeling in ovarian maturation of the imperial zebra pleco fish *Hypancistrus zebra*. *Sci Rep* **8**, 13760 (2018). <https://doi.org/10.1038/s41598-018-32117-7>

Zhou, R., Wu, J., Liu, B. *et al.* The roles and mechanisms of Leydig cells and myoid cells in regulating spermatogenesis. *Cell. Mol. Life Sci.* **76**, 2681–2695 (2019). <https://doi.org/10.1007/s00018-019-03101-9>