



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

ALEX SOUSA PAIVA

**DESCRIÇÃO MORFOLÓGICA DA GAMETOGÊNESE DE *Heros severus*
Heckell, 1840 (*Cichassoma severum*)**

BELÉM – PA

2023

ALLEX SOUSA PAIVA

DESCRIÇÃO MORFOLÓGICA DA GAMETOGÊNESE DE *Heros severus*
Heckell, 1840 (*Cichassoma severum*)

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

Orientadora: Prof^a Dr^a Maria Auxiliadora Pantoja Ferreira. Laboratório de

Imunohistoquímica e Biologia do Desenvolvimento – ICB – UFPA.

BELÉM – PA

2023

ALLEX SOUSA PAIVA

DESCRIÇÃO MORFOLÓGICA DA GAMETOGÊNESE DE *Heros severus*
Heckell, 1840 (*Cichassoma severum*)

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

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

Avaliador¹: Prof^a. Dr^a Yanne Alves Mendes.
Laboratório de Histologia e Embriologia Comparada - ICB/UFPA.

Avaliador²: Prof. MSc. Breno Richard Monteiro Silva.
Laboratório de Imunohistoquímica e Biologia do Desenvolvimento - ICB/UFPA.

BELÉM – PA

2023

“Explicar toda a natureza é uma tarefa difícil demais para qualquer homem ou para qualquer época. É muito melhor fazer um pouco e com certeza e deixar o resto para outros que vêm depois de você”

Isaac Newton

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Maria Cleonice Sousa Paiva e Alexandre Nonato Brito Paiva, por todo o apoio e suporte que me deram ao longo da minha jornada acadêmica. Fizeram o possível para que eu percebesse que só através do estudo eu poderia ter acesso às chances que eles não tiveram e não mediram esforços para que eu pudesse alcançar o que eles não puderam.

À minha mãe, por todo o apoio emocional durante os períodos difíceis durante a graduação, me incentivando a continuar e me dando forças quando as minhas acabavam. Não foi fácil, mas essa é uma vitória que só foi possível pela participação dela.

Ao meu irmão e irmã, Ricardo e Carol, pela ajuda e apoio que deram às suas maneiras.

Às melhores amigas que a graduação poderia ter me proporcionado, Ana Lígia e Isabella, por ajudarem a compor o melhor trio que eu poderia ter na faculdade, me ajudando a não desistir nos momentos mais difíceis e contribuindo tanto na vida acadêmica quanto na vida pessoal, tendo me acolhido como parte das suas próprias famílias.

À Professora Doutora Maria Auxiliadora Pantoja Ferreira pelo acolhimento, orientação, paciência e direcionamento, sendo essenciais para a minha formação profissional. Hoje posso ver a evolução que ocorreu durante esse período juntos e sem dúvidas acrescentou muito na minha postura quanto membro de um grupo de pesquisa.

Ao Grupo de Pesquisa em Histologia de Espécies Aquáticas por me ensinarem como é fazer parte de um grupo de verdade. Agradeço por todo o apoio, ensinamento e contribuições feitas ao longo desses anos, especialmente a vocês: Ivana, Yanne, Juliana, Elivelton, Juan e Naomin. Espero ter acrescentado em algo para o grupo como um todo.

À Universidade Federal do Pará, ao Instituto de Ciências Biológicas – ICB e ao Laboratório de Imunohistoquímica e Biologia do Desenvolvimento por todo o aporte estrutural que me foi oferecido durante a graduação.

RESUMO

O acará severo *Heros severus* é um peixe ornamental da família dos ciclídeos, nativo da região amazônica, com grande importância comercial. No entanto, estudo sobre sua gametogênese que podem subsidiar o manejo no cultivo, ainda é escasso na literatura. Sabe-se que a oogênese e espermatogênese abrange processos complexos que incluem a multiplicação, diferenciação, crescimento e liberação dos gametas. O objetivo deste trabalho foi descrever a morfologia celular durante a oogênese e espermatogênese de *H. severus*. Para isso, vinte espécimes de *H. severus* provenientes de cultivo foram submetidos a biometria; em seguida foram eutanasiados para ser realizada uma incisão mediana ventral e retirada das gônadas, as quais foram fixadas em solução de Bouin por 24 horas e submetidas ao processo histológico para inclusão em parafina. As gônadas de *H. severus* estavam localizados na região dorsal, sendo órgãos pares alongados, simétricos e vascularizados, formando um ducto direcionado ao poro urogenital. Nas fêmeas foram observados oogônias e oócitos tipos I, II, III e IV cuja característica foi baseada na presença e distribuição do vitelo, organização do complexo pós ovulatório e oócitos em atresia. Para essa descrição foram considerados os estágios em maturação, maduro e desovado. Para os machos, as espermatogônias foram as maiores células germinativas, classificadas em tipo A e tipo B; os espermatócitos se apresentaram em diferentes fases de divisão meiótica e as espermatídes foram observadas em ninhos e no lúmen do túbulo. A análise morfológica dos espermatozoides mostrou uma cabeça esférica, três pares de mitocôndrias e uma cauda ou flagelo de aspecto alongado. Esses resultados asseguram o conhecimento da morfologia gonadal durante o processo de gametogênese e subsidiam dados para biologia reprodutiva e para aplicação de futuros estudos na reprodução induzida e criopreservação de sêmen de *H. severus*, que garantem a manutenção da espécie no ecossistema.

Palavras-chave: oócitos, linhagem espermatogênica, histologia, peixe.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	7.
2. OBJETIVOS	9.
2.1 Objetivo geral	9.
2.2 Objetivos específicos	9.
3. MATERIAL E MÉTODOS	10.
3.1 Cultivo de <i>Heros severus</i>	10.
3.2 Obtenção da gônada	10.
3.3 Microscopia de luz	10.
3.4 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)	11.
3.5 Morfometria e análise estatística	11.
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	12.
4.1 Morfologia do testículo e espermatogênese	12.
4.2 Morfologia do ovário e oogênese	15.
4.3 Análise estatística	17.
5. CONCLUSÃO	19.
6. REFERÊNCIAS	20.

1. INTRODUÇÃO

Peixes ornamentais da região amazônica despertam forte interesse em aquaristas, estando a maior parte da produção destinada ao mercado externo. Em um cenário mundial, no período entre 2000 e 2011, a exportação de ornamentais passou de 181 milhões de dólares para 372 milhões (Ladisa, Bruni, & Lovatelli, 2017), com o Pará sendo o estado de maior exportação de peixes ornamentais nativos, contribuindo com 58,20% das exportações no ano de 2017 (SECEX, 2018). Dentre essa diversidade de espécies, a família Cichlidae (Cichliformes) apresenta mais de 300 espécies descritas somente para a região amazônica, com cerca de 27 espécies comercializadas para finalidade ornamental e alimentar (Kullander *et al.*, 2003; Pereira, 2010; Santos, 2015; Ribeiro, 2021).

Neste grupo destaca-se a espécie *Heros severus*, Heckel 1840 (*Cichlasoma severum*), denominado “severo”, distribuída geograficamente desde o rio Solimões-Amazonas até o rio Xingu. Em geral, esses animais habitam rios lentos, águas calmas e profundas contendo raízes ou galhos de árvores submersas. São onívoros, mas também possuem afinidade frugívora, apresentam dimorfismo sexual, onde os machos são maiores, apresentam espinhos nas nadadeiras dorsal, anal e pélvica e um padrão em mosaico no rosto, enquanto o rosto das fêmeas tem coloração uniforme (Figura 1). A reprodução é contínua ao longo do ano e na maioria das vezes há o cuidado parental onde os pais preparam e cuidam dos ninhos para a postura dos ovos até a eclosão das larvas (Kullander *et al.*, 2003).

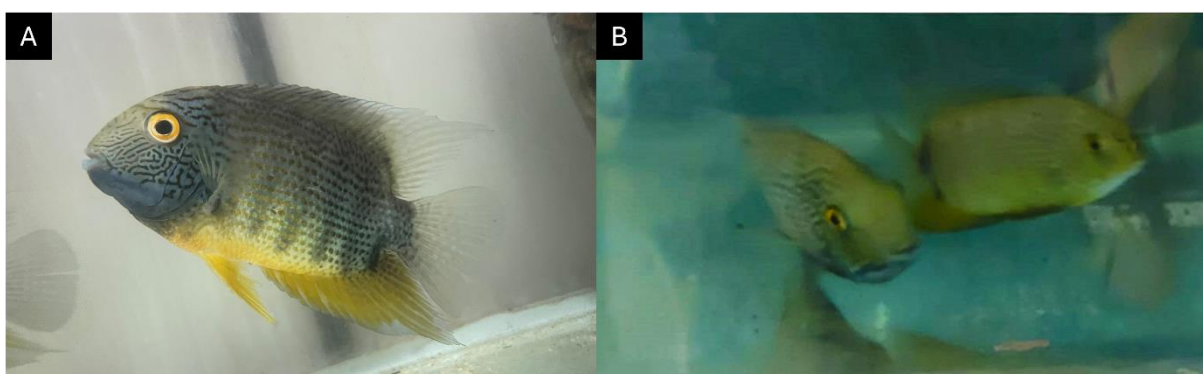


Figura 1: Demonstração de dimorfismo sexual. A) Macho de *Heros severus*; B) Fêmea de *Heros severus*.

Em peixes, a maturação gonadal é um processo morfofisiológico, onde ocorre o amadurecimento de células germinativas, culminando com a formação dos gametas masculinos e femininos (Vazzoler, 1996). O conhecimento da estrutura gonadal de peixes teleósteos tem

sido fundamental para entender a biologia reprodutiva das espécies e os mecanismos envolvidos na maturação dos gametas (Blaxter 1988; Santos *et al.*, 2001; Nóbrega *et al.*, 2009, Viana, 2022).

Anatomicamente, os testículos dos peixes podem ser classificados em filiforme, franjado ou lobular (Melo *et al.*, 2011). De acordo com a organização do compartimento seminífero e distribuição das espermatogônias no epitélio germinativo, os testículos de peixes teleósteos são classificados em tubulares anastomosados, quando os túbulos seminíferos são conectados entre si e formam um sistema tubular contínuo, característico de peixes primitivos, incluindo siluriformes (Grier, 1993); e em lobulares quando os lóbulos testiculares são delimitados e o epitélio germinativo se encontra organizado na parede do lóbulo. Estes arranjos são característicos de teleósteos derivados (Parenti & Grier, 2004; Grier & Uribe-Aranzábal, 2009). Por outro lado, o testículo lobular pode ser classificado em espermatogonial irrestrito, quando as espermatogônias estão localizadas ao longo de todo comprimento dos lóbulos (Grier *et al.*, 1993); e espermatogonial restrito, no qual espermatogônias estão restritas à extremidade terminal dos lóbulos (Grier & Uribe-Aranzábal, 2009; Mazzoni *et al.*, 2014). Essas informações são importantes porque subsidiam características ao processo complexo e regulado que é a espermatogênese de peixes, onde as células germinativas indiferenciadas dão origem a espermatozoides determinando o ciclo reprodutivo.

Em se tratando do desenvolvimento do ovário e do crescimento do oócito são processos bastantes investigados que informam sobre as adaptações morfológicas, ecológicas e comportamentais dos animais (Selman & Wallace, 1989; Murua & Saborido-Rey 2003; Murua & Motos 2006; Carvalho, *et al.* 2009; Viana *et al.* 2018; Viana *et al.*, 2023). A oogênese tem início no epitélio germinativo a partir das oogônias (Grier, 2002), distribuídas ao longo do tecido. Posteriormente sucessivas divisões mitóticas darão origem a novas oogônias, seguidas por divisões meióticas, originando assim os oócitos (Vazzoler, 1996). O processo meiótico progride até que as pontes citoplasmáticas sejam quebradas pelas células pré-foliculares, desencadeando a individualização dos oócitos (Grier, 2022; Quagio-Grassiotto *et al.*, 2011). Durante esse evento tanto oócito quanto o epitélio germinativo sofrem alterações, no qual no oócito ocorre a produção de vitelo, aumento do volume celular e a formação de micrópila; enquanto no estroma ovariano ocorre a reorganização das células foliculares e matriz, formando ao final o folículo ovariano (Quagio-Grassiotto *et al.* 2014; Abreu *et al.* 2015; Viana *et al.* 2018).

Um método importante para a avaliação da espermatogênese e da oogênese em peixes pode ocorrer pelas investigações histológicas convencionais e morfométrica, considerando os aspectos estereológicos. Essas análises permitem resultados quantitativos a partir de amostras sistemáticas, uniformes e aleatórias que podem então ser aplicadas a qualquer estrutura em que o estudo morfométrico seja possível (Leal *et al.*, 2009). Portanto, a técnica permite uma melhor compreensão da dinâmica entre o número e tamanho das células germinativas e mecanismos celulares envolvidos nos estágios de maturação celular (Rodrigues *et al.*, 2017).

Essas informações têm subsidiado as particularidades e diferenças nas estratégias reprodutivas, nas adaptações evolutivas e nos aspectos filogenéticos que esses animais apresentam (Nobrega *et al.*, 2009; Arantes *et al.*, 2017). Vale ressaltar que o ciclo de vida dos peixes, incluindo a reprodução, pode ser comprometido em locais onde a hidrodinâmica do rio é alterada, como por exemplo em locais onde há a construção de barragens hidrelétricas (Mendes *et al.*, 2021). Diante do exposto há necessidade em conhecer o desenvolvimento gonadal do animal, em cultivo, para posteriormente relacionar com as condições de estresse que podem interferir na reprodução. Especificamente, estudos sobre a estrutura testicular e as características ultraestruturais das células germinativas em três espécies de Loricarídeos da mesma subfamília, *Baryancistrus xanthellus*, *Peckoltia oligospila* e *Hipancistrus zebra* revelaram características biológicas distintas que subsidiaram as estratégias que o animal possui para sobreviver no ambiente (Viana *et al.*, 2018, 2022).

Desse modo, estudos morfológicos e morfométricos da espermatogênese e oogênese são importantes para subsidiar estratégias de cultivo, estudos filogenéticos, criopreservação de gametas e para avaliação da saúde dos animais em ambientes antropizados. Mediante ao exposto, o presente trabalho tem como objetivo descrever a estrutura gonadal do *H. severus* classificando e relacionando com o seu processo de espermatogênese e oogênese.

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Descrever o aspecto morfológico e morfométrico das gônadas e células germinativas de *Heros severus* em diferentes estágios de maturação.

2.2 OBJETIVO ESPECÍFICO

- Caracterizar o aspecto histológico dos ovários e testículos de *Heros severus*;
- Descrever o desenvolvimento oocitário de *Heros severus*;
- Descrever a espermatogênese de *Heros severus*;
- Analisar a morfometria das células espermatogênicas de *Heros severus*.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 CULTIVO DE *Heros severus*

Espécimes de *H. severus* foram mantidos em cultivo no laboratório de piscicultura no Campus de Bragança. Um total de 20 casais foram distribuídos em cinco aquários com volume de 60 L de água em um sistema de recirculação com um filtro mecânico e biológico e uma lâmpada de esterilização ultravioleta. As condições do ambiente foram temperatura da água (27 ° C), oxigênio dissolvido (6,5-7,5 mg L⁻¹), pH 6,5-6,8 e amônia total (0,00-0,03 mg-1). Os parâmetros da água foram medidos com uma sonda multiparâmetro (modelo HI 9828, Hanna Instruments, Barueri, SP, Brasil). O fotoperíodo foi ajustado para 12 h de claridade e 12 h de escuridão por lâmpadas fluorescentes (60 W). Para garantir o bem-estar dos peixes, abrigos flutuantes feitos com linhas de nylon (semelhantes às raízes das macrófitas aquáticas) e refúgios de tubos de PVC foram colocados no fundo do aquário. Os peixes foram alimentados manualmente quatro vezes ao dia até saciedade. A ingestão média de ração foi de 8,10± 0,42 g ind⁻¹. Os aquários foram sifonados semanalmente para renovação da água e remoção de fezes, trocando 1/3 do volume de água.

3.2 OBTENÇÃO DA GÔNADA

Um total de 10 machos e 10 fêmeas de *H. severus* foram analisados. Todos os animais foram anestesiados em hidrocloreto de benzocaína (0,1 g.L⁻¹) por 10 minutos, que foi adicionado na água. Em seguida foram mensurados quanto à massa total (g) e comprimento total (cm) com auxílio de um paquímetro digital. Em seguida, com objetivo de eutanásia, os peixes foram transferidos para um recipiente contendo dose letal de hidrocloreto de benzocaína (250 mg.L). Foi realizado uma incisão mediana ventral no corpo do animal para retirada das gônadas, as quais foram seccionadas e fixadas em solução de Bouin, com parte dos testículos fixados também em Karnovsky

A orientação de procedimento para eutanásia nesses animais está de acordo com a recomendação do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e aprovado pelo CEUA/UFPA no de registro 7327280421.

3.3 MICROSCOPIA DE LUZ

Após fixação em solução Bouin por 24 horas, as gônadas foram desidratadas em concentrações crescentes de etanol (70% até absoluto), diafanizadas em xilol e incluídas em parafina (Prophet *et al.*1995). Após, foram realizados cortes de 5 µm de espessura em micrótomo Leica, os quais foram desparafinizados em xilol, hidratados em concentrações decrescentes de etanol, corados em Hematoxilina-Eosina e analisados e fotografados em fotomicroscópio (NIKON Eclipse Ci-E, NIKON Coporation, Tóquio, Japão), com uma câmera digital acoplada (NIKON DS-Ril, NIKON Coporation, Tóquio, Japão).

3.4 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV)

Os testículos fixados em solução de Karnovsky por 24 horas foram lavadas em tampão cacodilato de sódio 0,1M pH 7,4 e pós-fixados em tetróxido de ósmio 1% por 2 horas em temperatura ambiente. Em seguida as amostras foram desidratadas em concentrações crescentes de etanol e submetidas à secagem em ponto crítico em CO₂. Posteriormente, foram colocadas em stubs e submetidas à metalização com cobertura de ouro com 10 nm de espessura e analisados em microscópio eletrônico de varredura LEO 1430.

3.5 MORFOMETRIA E ANÁLISE ESTATÍSTICA

Foram mensuradas aleatoriamente 100 células de cada tipo da linhagem espermatogênica (espermatogônias A, espermatogônias B, espermatócitos, espermatídes e espermatozoides), sendo padronizada a contagem por áreas das gônadas a fim de evitar que a mesma célula fosse contada mais de uma vez. Os cortes histológicos foram avaliados em fotomicroscópio com o software NIS-elements BR (4.00.07-bit), com as medidas sendo realizadas com a lente objetiva de 100X (Viana *et al.*, 2022).

Os valores de diâmetro das células da linhagem germinativa de *H. severus* foram testados quanto as premissas estatísticas de normalidade e homoscedasticidade utilizando os testes de Shapiro-Wilk e Levene, respectivamente. Para verificar possíveis diferenças nos diâmetros das células entre os tipos celulares foi utilizado um teste não paramétrico de Kruskal-

Wallis, seguido de um teste de comparação múltipla de Wilcoxon, adotando-se um nível de significância de 5%.

Todas as análises do presente estudo foram realizadas com auxílio do software de livre acesso R Core Team (2022), versão 4.2.2, utilizando os pacotes Car (Fox e Weisberg, 2019), Vegan (Oksanen *et al.*, 2022) e ggplot2 (Wickham, 2016).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 MORFOLOGIA DO TESTÍCULO E ESPERMATOGÊNESE

Macroscopicamente, os testículos de *Heros severus* (Figura 2A) apresentaram-se como órgãos pares de aspecto alongado, onde foi observado testículo direito e esquerdo (Figura 2B), os quais se unem na extremidade caudal formando um único ducto espermático ligado ao poro urogenital, e variam de coloração dependendo do estágio de maturação em que se encontram. Microscopicamente apresentam o compartimento intersticial e o germinativo. O compartimento germinativo apresentou uma organização que se classifica como lobular espermatoγονial irrestrita, onde se observa a distribuição das espermatoγονias ao longo de todo o túbulo seminífero, e as demais células germinativas masculinas, como espermatoγονias, espermátocitos, espermátides e espermatozoides agrupadas em ninhos, semelhante ao caracterizado por Grier *et al.*, (1980) (Figura 2C). Esta organização também foi observada em outros grupos de teleósteos, como em Characiformes como *Leporinus macrocephalus* (Muñoz *et al.*, 2011) e em Siluriformes como *Hypophthalmus marginatus* (Gonçalves *et al.*, 2019), indicando que estas características morfológicas são preservada nas espécies, o que pode sugerir uma maior eficiência espermatoγονica, uma vez que as espermatoγονias espalhadas ao longo de todo o túbulo seminífero consequentemente irão gerar mais cistos germinativos e maior produção de espermatozoides.

No estágio em maturação, através da análise ultraestrutural foi possível observar a parede do testículo com aspecto mais homogêneo, devido ao volume celular interior (Figura 3A). Os túbulos seminíferos nesse estágio se apresentaram repletos de células da linhagem germinativa, as quais se agrupavam em ninhos delimitados pelas células de Sertoli (Figura 3B-G).

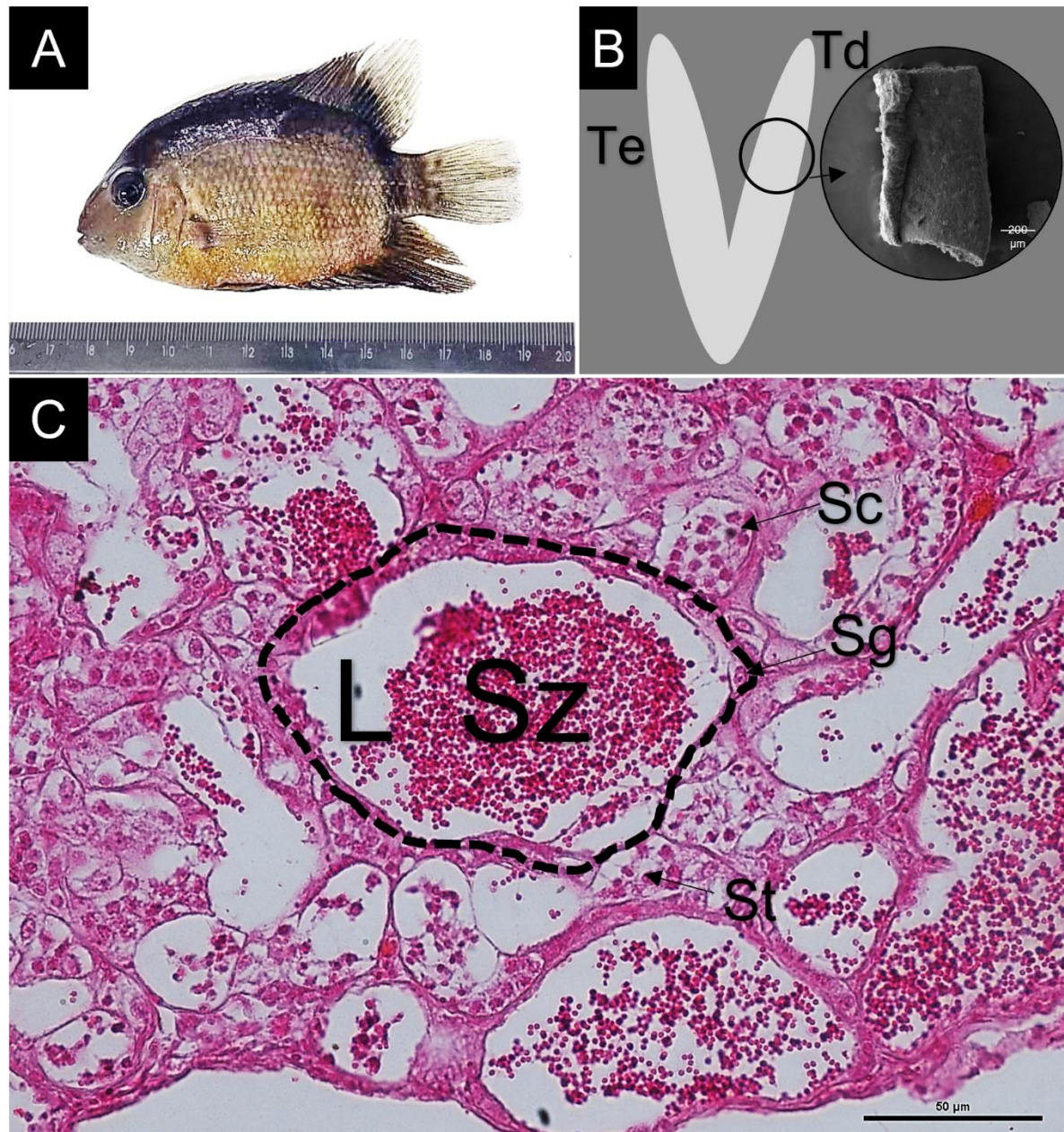


Figura 2: A) Indivíduo adulto de *Heros severus*; B) Modelo esquemático do testículo com visão externa da superfície testicular em MEV; C) Túbulos seminíferos com presença de diferentes células germinativas. Legenda: Te=Testículo esquerdo; Td=Testículo direito; L=Lúmen; Sg=espermatogônia; Sc=espermátocito; St=espermátides; Sz=espermatozoide; linha tracejada=delimitação dos túbulos seminíferos.

As espermatogônias, primeiras células da linhagem espermatogênica, foram as maiores células, apresentando diferença de diâmetro entre as do tipo A ($12,9 \pm 1,17 \mu\text{m}$) e as do tipo B ($8,74 \pm 1,11 \mu\text{m}$), apresentaram-se aderidas à parede dos túbulos seminíferos e possuem

como característica um citoplasma volumoso e um núcleo com presença de nucléolo central ou periférico, sendo as maiores células espermatogênica, bem como observado em outros teleósteos (Leal *et al.*, 2009; De Melo Dias *et al.*, 2017). Espermatogônias tipo A encontram-se normalmente isoladas na periferia do túbulo seminífero (Figura 3D e 3E), enquanto as do tipo B apresentaram um núcleo mais condensado e formando ninhos de espermatogônia (Figura 3D).

Foram observados espermatócitos com $3,95 \pm 0,53 \mu\text{m}$ de diâmetro formando ninhos em vários pontos do túbulo seminífero e em diferentes estágios da meiose, fazendo com que este tipo celular apresentasse uma grande variação em relação à forma do citoplasma e núcleo (Figura 3B e 3E).

As espermátides apresentaram diâmetro médio de $1,68 \pm 0,12 \mu\text{m}$. Em fase inicial foram observadas com citoplasma delgado e um núcleo esférico. Estas células estavam conectadas entre si através de pontes citoplasmáticas, (Figura 3F), e puderam ser encontradas no lúmen dos túbulos, com desenvolvimento assíncrono, demonstrando que o *H. severus* possui espermatogênese semi-cística, onde o processo de espermiogênese ocorrerá no lúmen do túbulo (Mattei *et al.*, 1993; Schulz *et al.*, 2010). Em estágio mais avançado, através da MEV foi possível perceber a diminuição do citoplasma e o início da formação dos pares de mitocôndrias na peça média (Figura 3B).

Os espermatozoides apresentaram diâmetro de $1,38 \pm 0,18 \mu\text{m}$, foram observados no lúmen do túbulo seminífero e apresentaram a cabeça com formato esférico, com perda do corpo residual, três pares de mitocôndrias na peça intermediária e uma cauda alongada com formato cilíndrico (Figura 3G-J).

Através da ultraestrutura do testículo no estágio espermiado foi observado a superfície externa do túbulo seminífero com aspecto rugoso devido à diminuição do volume celular decorrente da liberação dos espermatozoides para o meio externo (Figura 3K). A presença de espermatozoides residuais no interior dos túbulos seminíferos sugere a retenção destas células maduras em virtude da maturação incompleta (Figura 3L e 3M). este fato foi observado em outros peixes com organização lobular espermatogonial irrestrita, como *Baryancistrus xanthellus*, *Peckoltia oligospila* e *Hypancistrus zebra* (Viana *et al.*, 2022).

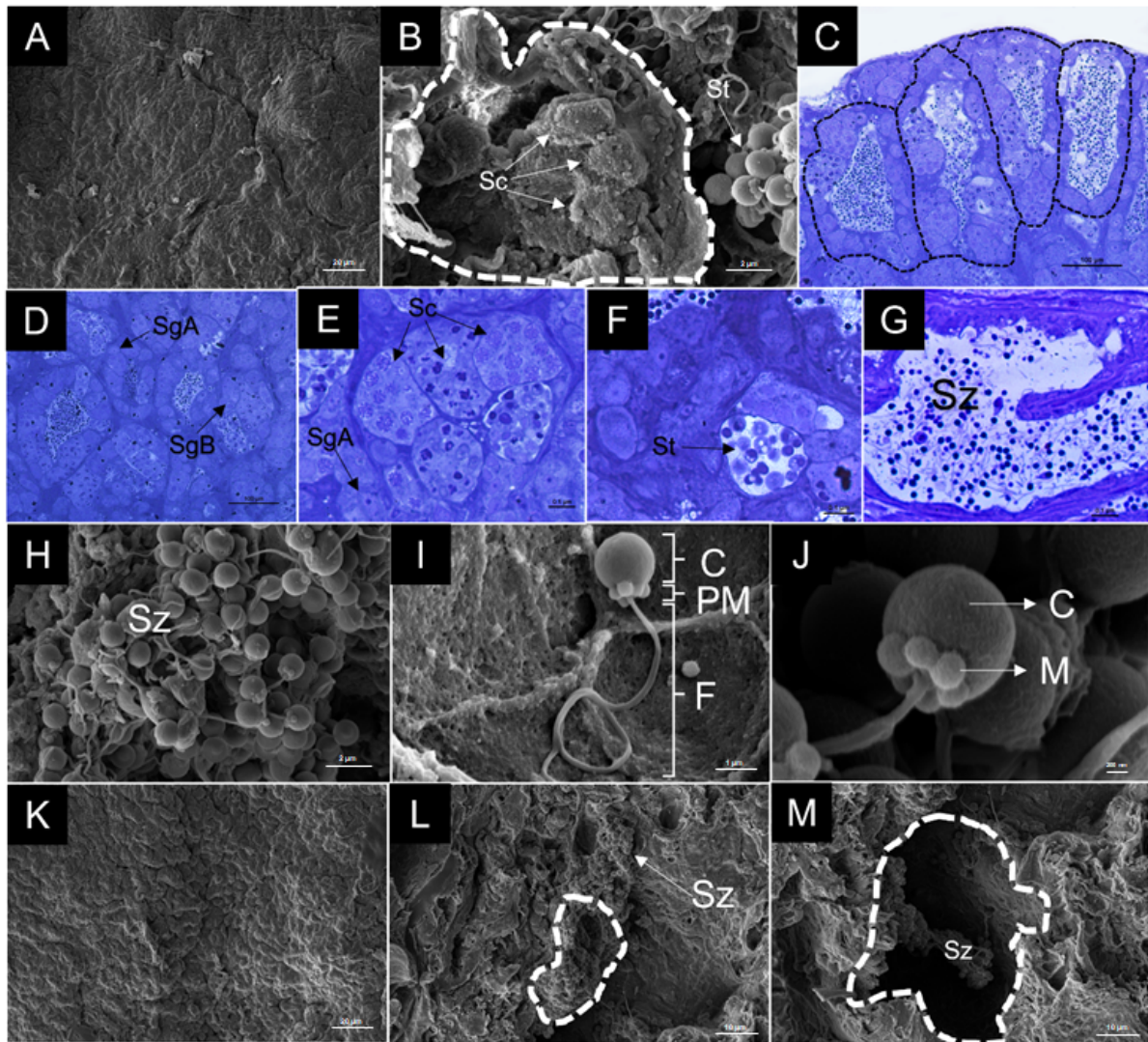


Figura 3: Diferentes estágios de maturação e morfologia das células germinativas de machos de *Heros severus*. A-G) Estágio em maturação. A) Parede testicular; B) MEV do túbulo seminífero mostrando espermatócitos e espermatídes em seu interior; C) Túbulos seminíferos com ninhos das diferentes células germinativas; D) Espermatogônias A e B; E) Ninhos de espermatócitos durante a meiose; F) Ninho de espermatídes em fase inicial; G) Espermatozoides no lúmen do túbulo seminífero. H-M) Estágio espermiado. H-J) MEV dos espermatozoides com destaque nas suas estruturas; K) Parede testicular; L-M) Túbulos seminíferos com a presença de espermatozoides residuais. Legenda: SgA=espermatogônia-A; SgB=espermatogônia-B; Sc=espermatócito; St=espermatídes; Sz=espermatozoide; C=cabeça; PM=peça média; F=flagelo; linha tracejada=delimitação dos túbulos seminíferos.

4.2 MORFOLOGIA DO OVÁRIO E OOGÊNESE

Os ovários de *Heros severus* se encontravam localizados na região dorsal, sendo órgãos pares alongados, simétricos e vascularizados e formando um ducto direcionado ao poro urogenital. Foram visualizados ovários no estágio em maturação, maduro e desova (Figura 4).

No estágio em maturação (Figura 4 B e C) o ovário apresentou aspecto volumoso e ricamente vascularizado. Microscopicamente foi observado predominância de oócitos tipo I (Figura 4H), com um citoplasma basófilo e núcleo central e oócitos tipo II (Figura 4I) com um citoplasma acidófilo e núcleo com numerosos nucléolos e alvéolos corticais.

No estágio maduro (Figura 4 D e E) o ovário apresentou coloração amarelada, com uma rica presença de vasos na parede. Neste estágio houve predomínio de oócitos tipo III (Figura 4J) e IV (Figura 4K) com o citoplasma preenchido por grânulos de vitelo. Estas células exibiam um envoltório oocitário delgado formado por zona radiata, camada de células foliculares e camada de teca.

No estágio desovado (Figura 4 F e G) as gônadas exibiam um aspecto flácido e uma coloração pálida. A partir da análise microscópica foi evidenciado oócitos tipos I, II, o complexo pós-ovulatório e oócitos em atresia, o que também foi observado em outros ciclídeos, como *Geophagus argyrostictus* e *Geophagus altifrons* (Mendes *et al.*, 2020).

Neste trabalho foi possível distinguir oócitos tipos III e IV, caracterizados principalmente pelo acúmulo de grânulos de vitelo, fonte de nutrientes para o embrião, e pela distinção das camadas que compõem o complexo folicular, o qual se torna bem distinto, sendo constituído pela zona radiata, responsável por conferir adesividade a diferentes substratos, pelas células foliculares, as quais são encarregadas de transportar substâncias e fornecer resistência, e pela camada da teca, a qual auxilia na produção de hormônios necessários à reprodução (Viana *et al.*, 2018). No oócito tipo IV também ocorre a migração do núcleo para a periferia da célula, fazendo com que se observe apenas os grânulos de vitelo (Quagio-Grassiotto *et al.* 2014, Viana *et al.*, 2018).

Essas mudanças morfofisiológicas das células de linhagem oocitária desde oogônias até oócitos IV estão relacionadas com a produção de vitelo e embasam a classificação dos estágios de maturação gonadal (Oliveira *et al.*, 2017; Mendes *et al.*, 2021). Vale destacar que nessas mudanças há um grande investimento somático e energético que está intimamente associado com o meio ambiente onde elas habitam. Por exemplo as espécies ornamentais, que não possuem capacidade migratória apresentam oócitos maiores e o envoltório celular permite uma característica adesiva ao ovo, diminuindo a vulnerabilidade a predação e garantindo a manutenção da prole (Melo *et al.*, 2011; Arantes *et al.*, 2017).

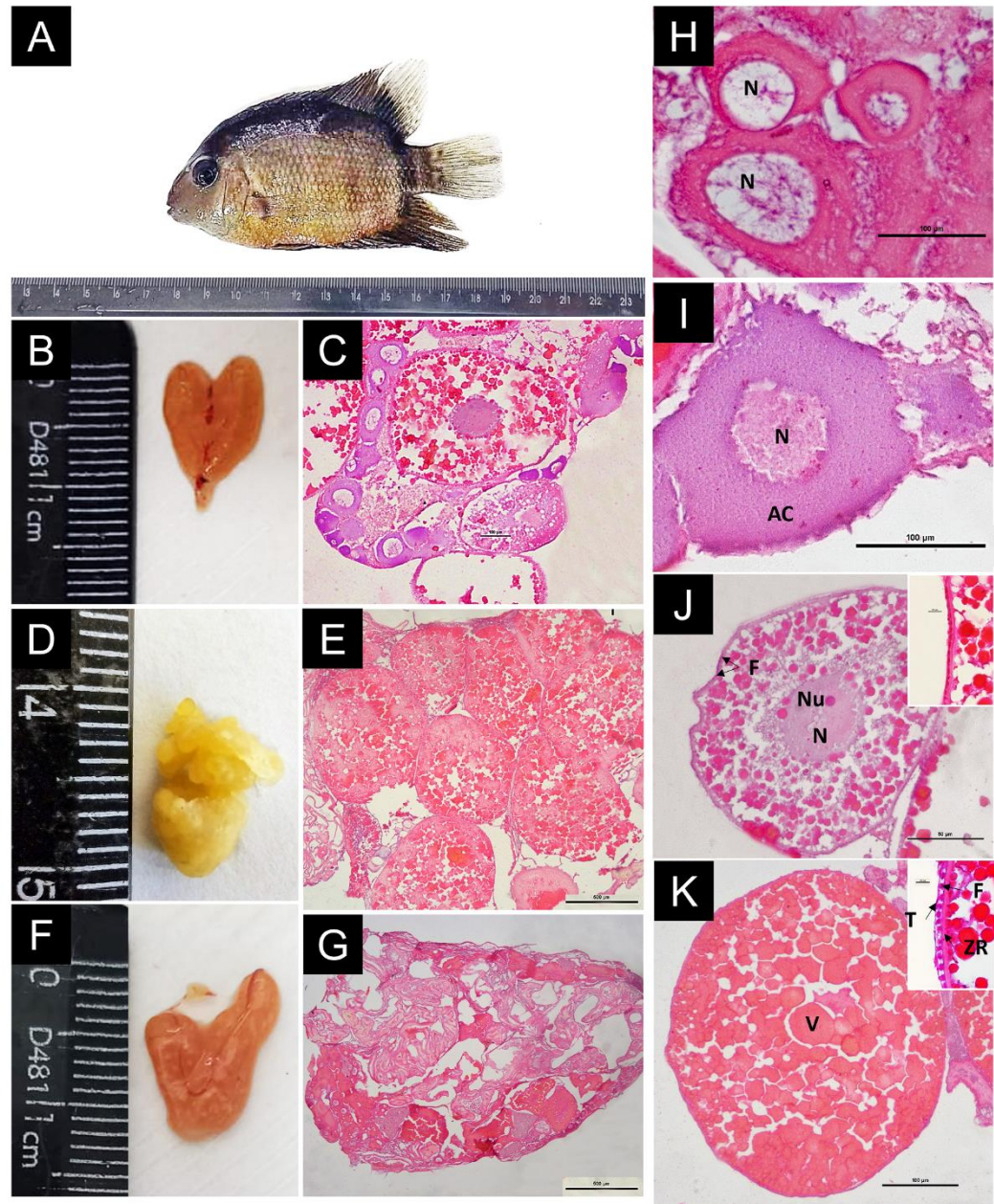


Figura 4: Aspectos macro e microscópicos de fêmeas de *Heros severus*. A) indivíduo adulto de *Heros severus*. B, D, F: Fotos macroscópicas dos ovários em maturação, maduro e desovado, respectivamente. C, E, G: Fotomicrografia dos ovários em maturação, maduro e desovado, respectivamente. H, I, J, K: Oócitos tipo I, II, III e IV, respectivamente. Legenda: N=Núcleo; Nu=Nucléolo; AC=Alvéolos corticais; T=Camada da teca; F=células foliculares; ZR=Zona radiata.

4.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Foi possível evidenciar diferenças entre os valores de diâmetro dos diferentes tipos de células ($H_{(4,495)} = 471.32$, $p < 0.05$). De acordo com o teste de comparação múltipla, foi observado que os valores de diâmetro diferiram para todos os tipos de células. Sendo assim, os diâmetros das SgA diferiram de SgB, Sc, St e Sz ($p < 0.05$); SgB diferiram de Sc, St e Sz ($p < 0.05$); Sc diferiram de St e Sz ($p < 0.05$), e por fim, St diferiu de Sz ($p < 0.05$) (Figura 5).

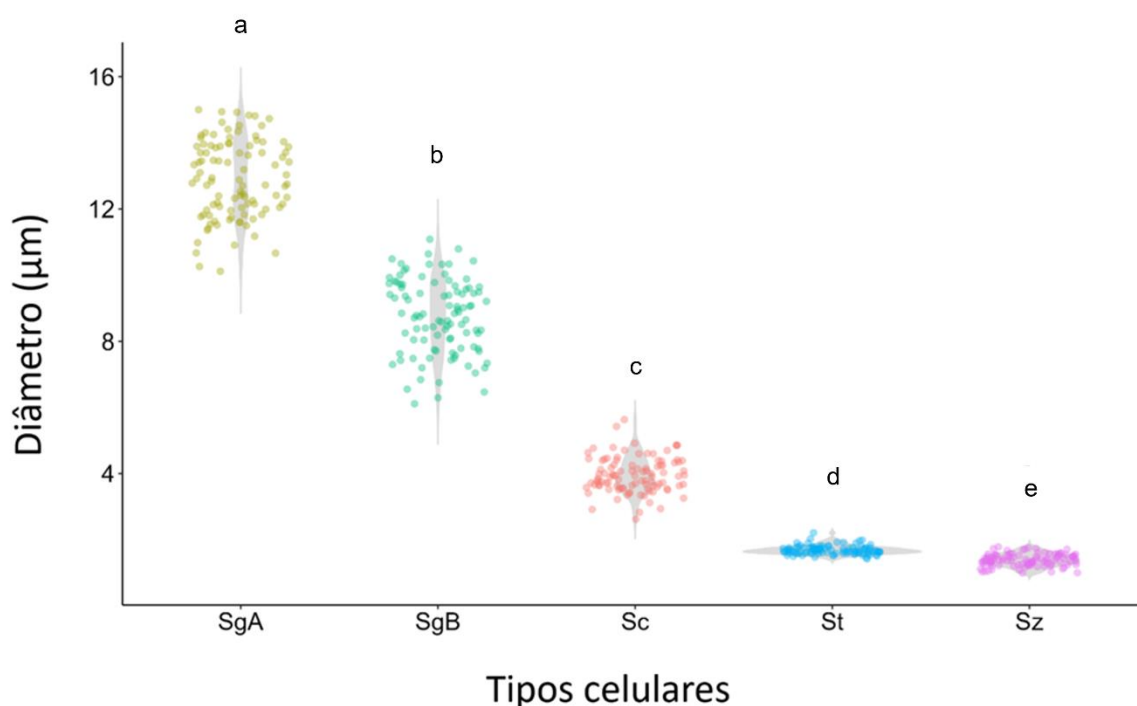


Figura 5 – Distribuição do diâmetro das diferentes células da linhagem espermatogênica de machos de *Heros severus*. Diferentes letras indicam diferença estatística. Legenda: SgA=espermatogônia-A; SgB=espermatogônia-B; Sc=espermatócito; St=espermátides; Sz=espermatozoide.

As espermatogônias do tipo A apresentaram diâmetro semelhante ao observado em espermatogônias de outras espécies de ciclídeos que compartilham a mesma estratégia reprodutiva, como o *Cichlasoma nigrofasciatum* e *Neolamprologus bruchardi* (Fishelson, 2003), que realizam a desova em um substrato, onde os ovos ficam aderidos e ocorre a fecundação, enquanto as espermatogônias tipo B são menores que as espermatogônias observadas em *Labeotropheus trewavasae*, *Pseudotropheus zebra* (Fishelson, 2003). A redução no diâmetro foi maior em *H. severus* do que o observado em outras espécies, possuindo

espermátocitos e espermátides consideravelmente menores do que as de *C. nigrofasciatum*, *N. bruchardi*, *L. trewavasae* e *P. zebra* (Fishelson, 2003).

CONCLUSÃO

Esses resultados asseguram o conhecimento da morfologia gonadal e subsidiam dados para biologia reprodutiva e para aplicação de futuros estudos na reprodução induzida e criopreservação de sêmen de *Heros severus*, que garantem a manutenção da espécie no ecossistema.

REFERÊNCIA

- Abreu, M. R., Garcia, P. & Zaniboni-Filho, E. (2015). Histological characterization of oocyte developmental stages of *Steindachneridion scriptum* kept in captivity. *Acta Sci Anim Sci Maringá*: 351–356
- Arantes, F.P., Silva, F.A., Santos, J.E., Rizzo, E., Sato, Y., Bazzoli, N. (2017). Comparative morphology of gonads from six species of fish belonging to the family Anostomidae (Characiformes: Anostomidae). *Rev. Biol. Trop.* 65, 713–723.
- Bayona Perez IL, Mazzoni TS, Quagio-Grassiotto I. (2020) Cellular development of the germinal epithelium during the female and male gametogenesis of *Chaetodon striatus* (Perciformes: Chaetodontidae). *Zygote*. 28(4):291–9.
- 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.
- Carvalho, Pa; Paschoalini, Al.; Santos, Gb.; Rozzi, E.; Bazzoli, N. (2009). Reproductive biology of *Astyanax fasciatus* (Pisces: Characiformes) in a reservoir in southeastern Brazil. *Journal of Applied Ichthyology*, 25: 306–313.
- Eiras, B.J.C.F; Campelo, D.A.V.; Moura, L.B.; Sousa, L.M.; Nunes, I.S.; Oliveira, L.C.C.; Magalhães, A.; Costa, R.M (2022). Feeding rate and frequency during the first feeding of angelfish (*Pterophyllum scalare* - Schultze, 1823) and severum (*Heros severus* - Heckel, 1840) with *Moina* sp. *Aquaculture* 55.738106
- Fox, J, Weisberg. S. An {R} Companion to Applied Regression, Third Edition. Thousand Oaks CA: Sage. 2019. URL: <https://socialsciences.mcmaster.ca/jfox/Books/Companion>
- Gensemer, R. W; Playle, R C. The bioavailability and toxicity of aluminum in aquatic environments. *Critical reviews in environmental science and technology*. v. 29, n. 4, p. 315-450, 1999.
- Goncalves, L. A. B., Silva, G. M., 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.

Grier, H.J. (1993) Comparative organization of Sertoli cells including the Sertoli cell barrier. In: Russel, L.D., Griswold, M.D. (Eds.), *The Sertoli Cell*. Cache River Press, Clearwater, FL, pp. 704–739.

Grier, H.J., Linton, J.R., Leatherland, J.F., de Vlaming, V.L. (1980) Structural evidence for two diferente testicular types in teleost fishes. *Am. J. Anat.* 159, 331–345.

Grier, H.J., Uribe-Aranzábal, M.C. (2009) The testis and spermatogenesis in teleosts. In: Jamieson, .G.M. (Ed.), *Reproductive Biology and Phylogeny of Fishes (Agnathans and Bony Fishes)*. Science Publishers, New Hampshire, pp. 119–142.

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.

H. Wickham. *ggplot2: Elegant Graphics for Data Analysis*. Springer-Verlag, New York, 2016.
<https://ggplot2.tidyverse.org/>

Kullander, S. O., Ferraris, C. J. Jr; Engraulida, E. (2003) Check list of the freshwater of south-central America, Porto Alegre: EDIPUCRS; 752p.

Kullander, S.O. 2003. Family Cichlidae. Pp. 605-654. In: Reis, R. E.; Kullander, S. O.; Ferraris Jr. C. J. (eds.). Check list of the freshwater fishes of South and Central America. EDIPUCRS, Porto Alegre, RS. 742p

Leal, M. C., Cardoso, E. R., Nobrega, R. H., Batlouni, S. R., Bogerd, J., & França, L. R. (2009). Histological and stereological evaluation of zebrafish (*Danio rerio*) spermatogenesis with an emphasis on spermatogonial generations. *Biology of Reproduction*, 81, 77–187.
<https://doi.org/10.1095/biolr eprod.109.076299>

Lowe-Mcconnel RH (1987) *Ecological studies in tropical fish communities*. Cambridge Tropical Biology

Mattei, X., Siau, Y., Thiaw, O.T., Thiam, D., 1993. Peculiarities in the organization of testis of *Ophidion* sp. (Pisces: Teleostei). Evidence for two types of spermatogenesis in teleosts fish. *J. Fish Biol.* 43, 931–937.

- Mazzoni, T.S., Grier, H.J., Quagio-Grassiotto, I., (2014) Male gonadal differentiation and the aedomorphic evolution of the testis in teleostei. *Anat. Rec.* 297, 1137–1162. <https://doi.org/10.1002/ar.22915>.
- Melo, R.M.C., 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). *J. Morphol.* 272, 525–535.
- Melo, R.M.C., Gomes, D.D., Moreira, D.P., Gomes, M.R., Bazzoli, N., Rizzo, E., 2017. Comparative morphology of the reproductive system of seven species of ostariophysan fishes from the Upper Das Velhas River, Brazil. *J. Morphol.* 278, 170–181. <https://doi.org/10.1002/jmor.20627>
- Mendes, Y.A.; Oliveira, R.S.; Montag, L.F.A.; Andrade, M.C.; Giarrizzo, T.; Rocha, R.M.; Ferreira, M.A.P. (2021) Sedentary fish as indicators of changes in the river flow rate after impoundment. *Ecological Indicators* 125:107466
- Muñoz, M.E., Batlouni, S.R., Vicentini, I.B.F., Vicentini, C.A., 2011. Testicular structure and description of the seminal pathway in *Leporinus macrocephalus* (Anostomidae, Teleostei). *Micron* 42, 892–897. <https://doi.org/10.1016/j.micron.2011.06.008>
- Murua, H. & Motos, L. (2006) Reproductive strategy and spawning activity of the European hake *Merluccius merluccius* (L.) in the Bay of Biscay. *J Fish Biol* 69, 1288–1303.
- Murua, H.; Saborido-Rey. (2003). Female reproductive strategies of marine fish of the North Atlantic. *Journal of Northwest Atlantic Fishery Science*, 33: 23-31.
- Nobrega RH, Quagio-Grassiotto I. (2007) Morphofunctional changes in Leydig cells throughout the continuous spermatogenesis of the freshwater teleost fish, *Serrasalmus spilopleura* (Characiformes, Characidae): Na ultrastructural and enzyme study. *Cell Tissue Res.* 329:339–49.
- Oksanen, J; Blanchet, F. G; Friendly, M; Kindt, R; Legendre, P; Mc Glinn, D. *et al.*, *Vegan: Community Ecology Package*. R package version 2.6-4. 2022. <https://CRAN.Rproject.org/package=vegan>

Oliveira, V. A.; Ferreira, M. A. P.; Rocha, R. M.; Montag, L. F. A. Reproduction of the duck catfish *Ageneiosus ucayalensis* in a ria river system. *Journal of Fish Biology*, v. 90, n. 3, p. 1062-1069, 2017.

Parenti, L.R., Grier, H.J. (2004) Evolution and phylogeny of gonad morphology in bony fishes. *Integr. Comp. Biol.* 44, 333–348.

Quagio-Grassiotto, I.; Grier, H.; Mazzoni, T. S.; Nóbrega, R. F.; 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. *Journal of Morphology*, v. 272, n. 11, p. 1290-1306, 2011.

Quagio-Grassiotto, I; Wildner, Daniel Dantas; Guimarães-Bassoli, Ariene Cristina Dias. A cytochemical approach to describe oocyte development in the freshwater ostariophysan, *Serrasalmus maculatus* (Characiformes). *Micron*, v. 60, p. 18-28, 2014.

R Core Team (2022). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. <https://www.r-project.org/>

Ribeiro, M. W. S., Oliveira, J. N. D., Souza, A. M. D., Gonçalves, J. D. S., Carvalho, T. B., & Lopes, A. C. C. (2021). Conhecendo os ciclídeos ornamentais amazônicos. *Conhecendo os ciclídeos ornamentais amazônicos*.

Rodrigues, M. S., Siqueira-Silva, D. H. D., Postingel-Quirino, P., Ninhaus-Silveira, A., & Veríssimo-Silveira, R. (2017). The efficiency of spermatogenesis and the support capacity of Sertoli cells in Characiformes. *Theriogenology*, 103, 149–152. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2017.07.025>

Santos, J.E., Bazzoli, N., Rizzo, E., Santos, G.B. (2001) Morphofunctional organization of the male reproductive system of the catfish *Iheringichthys labrosus* (Lütken, 1874) (Siluriformes: Pimelodidae). *Tissue Cell* 33, 533–540.

Santos, T. A. 2015. Ciclídeos no rio Catolé Grande no trecho urbano de Itapetinga/BA: Ecomorfologia e alimentação. 50 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Ambientais). Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia. Itapetinga.

Schulz, R.W., França, R.L., Lareyre, J., LeGac, F., Chiarini-Garcia, H., Nobrega, R.H., Miura, T., 2010. Spermatogenesis in fish. *Gen. Comp. Endocrinol.* 165, 390–411. <https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2009.02.013>

Selman, K. & Wallace, R. A. (1989) Cellular aspects of oocyte growth in teleosts. *Zool Sci* 6, 211–231.

Uribe, Mc.; Grier, Hj.; García-Alarcón, A.; Parenti, Lr. (2016). Oogenesis: From Oogonia to Ovulation in the Flagfish, *Jordanella floridae* Goode and Bean, 1879 (Teleostei: Cyprinodontidae). *Journal of Morphology*, 277: 1339–1354.

Vazzoler AEAM (1996) *Biologia da reprodução de peixes teleósteos: Teoria e prática*. Maringá: EDUEM, 169 pp.

Viana, I. K. S., Gonçalves, L. A., Ferreira, M. A. P., Mendes, Y. A., & Rocha, R. M. (2018). Oocyte growth, follicular complex formation and extracellular-matrix remodeling in ovarian maturation of the imperial zebra pleco fish *Hypancistrus zebra*. *Scientific reports*, 8(1), 13760.

Viana, I. K. S., Pantoja, J. C., 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), 1-10.

Winemiller Ko, McIntyre Pb, Castello L, Fluet-Chouinard E, Giarrizzo T, Nam S, Baird Ig, Darwall W, Lujan Nk, Harrison I, Stiassny Mlj, Silvano Ramd, Fitzgerald B, Pelicice Fm, Agostinho Aa, Gomes Lc, Albert Js, Baran E, Petrere Jr M, Zarfl C, Mulligan M, Sullivan Jp, Arantes Cc, Sousa Lm, Koning Aa, Hoeinghaus Dj, Sabaj M, Lundberg Jg, Armbruster J, Thieme Ml, Petry P, Zuanon J, Torrente Vilara G, Snoeks J, Ou C, Rainboth W, Pavanelli Cs, Akama A, Van Soesbergen A, Sáenz L (2016) Balancing hydropower and biodiversity in the Amazon, Congo, and Mekong. *Science* 351: 6269. 10.1126/science.aac7082