

Morfologia Comparativa  
de Oócitos de *Astyanax Cf. intermedius*  
(Characiformes: Characidae) de Rios do Norte  
do Espírito Santo e Sul da Bahia

Lorena Ziviani Bevitório  
Niumaique Gonçalves da Silva  
Leonardo Ferreira da Silva Ingenito  
Marcos de Lucca Moreira Gomes  
Juliana Castro Monteiro Pirovani



Morfologia Comparativa  
de Oócitos de *Astyanax* Cf. *intermedius*  
(Characiformes: Characidae) de Rios do Norte  
do Espírito Santo e Sul da Bahia

Lorena Ziviani Bevitório  
Niumaique Gonçalves da Silva  
Leonardo Ferreira da Silva Ingenito  
Marcos de Lucca Moreira Gomes  
Juliana Castro Monteiro Pirovani



2020 by Atena Editora

Copyright © Atena Editora

Copyright do Texto © 2020 Os autores

Copyright da Edição © 2020 Atena Editora

**Editora Chefe:** Profª Drª Antonella Carvalho de Oliveira

**Diagramação:** Lorena Prestes

**Edição de Arte:** Lorena Prestes

**Revisão:** Os Autores



Todo o conteúdo deste livro está licenciado sob uma Licença de Atribuição *Creative Commons*. Atribuição 4.0 Internacional (CC BY 4.0).

O conteúdo dos artigos e seus dados em sua forma, correção e confiabilidade são de responsabilidade exclusiva dos autores. Permitido o download da obra e o compartilhamento desde que sejam atribuídos créditos aos autores, mas sem a possibilidade de alterá-la de nenhuma forma ou utilizá-la para fins comerciais.

### **Conselho Editorial**

#### **Ciências Humanas e Sociais Aplicadas**

Profª Drª Adriana Demite Stephani – Universidade Federal do Tocantins  
Prof. Dr. Álvaro Augusto de Borba Barreto – Universidade Federal de Pelotas  
Prof. Dr. Alexandre Jose Schumacher – Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de Mato Grosso  
Profª Drª Angeli Rose do Nascimento – Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro  
Prof. Dr. Antonio Carlos Frasson – Universidade Tecnológica Federal do Paraná  
Prof. Dr. Antonio Gasparetto Júnior – Instituto Federal do Sudeste de Minas Gerais  
Prof. Dr. Antonio Isidro-Filho – Universidade de Brasília  
Prof. Dr. Carlos Antonio de Souza Moraes – Universidade Federal Fluminense  
Prof. Dr. Constantino Ribeiro de Oliveira Junior – Universidade Estadual de Ponta Grossa  
Profª Drª Cristina Gaio – Universidade de Lisboa  
Profª Drª Denise Rocha – Universidade Federal do Ceará  
Prof. Dr. Deyvison de Lima Oliveira – Universidade Federal de Rondônia  
Prof. Dr. Edvaldo Antunes de Farias – Universidade Estácio de Sá  
Prof. Dr. Eloi Martins Senhora – Universidade Federal de Roraima  
Prof. Dr. Fabiano Tadeu Grazioli – Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões  
Prof. Dr. Gilmei Fleck – Universidade Estadual do Oeste do Paraná  
Profª Drª Ivone Goulart Lopes – Istituto Internazionale delle Figlie di Maria Ausiliatrice  
Prof. Dr. Julio Candido de Meirelles Junior – Universidade Federal Fluminense  
Profª Drª Keyla Christina Almeida Portela – Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de Mato Grosso  
Profª Drª Lina Maria Gonçalves – Universidade Federal do Tocantins  
Profª Drª Natiéli Piovesan – Instituto Federal do Rio Grande do Norte  
Prof. Dr. Marcelo Pereira da Silva – Universidade Federal do Maranhão  
Profª Drª Miranilde Oliveira Neves – Instituto de Educação, Ciência e Tecnologia do Pará  
Profª Drª Paola Andressa Scortegagna – Universidade Estadual de Ponta Grossa  
Profª Drª Rita de Cássia da Silva Oliveira – Universidade Estadual de Ponta Grossa  
Profª Drª Sandra Regina Gardacho Pietrobon – Universidade Estadual do Centro-Oeste  
Profª Drª Sheila Marta Carregosa Rocha – Universidade do Estado da Bahia  
Prof. Dr. Rui Maia Diamantino – Universidade Salvador  
Prof. Dr. Urandi João Rodrigues Junior – Universidade Federal do Oeste do Pará  
Profª Drª Vanessa Bordin Viera – Universidade Federal de Campina Grande  
Prof. Dr. William Cleber Domingues Silva – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro  
Prof. Dr. Willian Douglas Guilherme – Universidade Federal do Tocantins

#### **Ciências Agrárias e Multidisciplinar**

Prof. Dr. Alexandre Igor Azevedo Pereira – Instituto Federal Goiano  
Prof. Dr. Antonio Pasqualetto – Pontifícia Universidade Católica de Goiás  
Profª Drª Daiane Garabeli Trojan – Universidade Norte do Paraná

Profª Drª Diocléa Almeida Seabra Silva – Universidade Federal Rural da Amazônia  
Prof. Dr. Écio Souza Diniz – Universidade Federal de Viçosa  
Prof. Dr. Fábio Steiner – Universidade Estadual de Mato Grosso do Sul  
Prof. Dr. Fágner Cavalcante Patrocínio dos Santos – Universidade Federal do Ceará  
Profª Drª Girlene Santos de Souza – Universidade Federal do Recôncavo da Bahia  
Prof. Dr. Júlio César Ribeiro – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro  
Profª Drª Lina Raquel Santos Araújo – Universidade Estadual do Ceará  
Prof. Dr. Pedro Manuel Villa – Universidade Federal de Viçosa  
Profª Drª Raissa Rachel Salustriano da Silva Matos – Universidade Federal do Maranhão  
Prof. Dr. Ronilson Freitas de Souza – Universidade do Estado do Pará  
Profª Drª Talita de Santos Matos – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro  
Prof. Dr. Tiago da Silva Teófilo – Universidade Federal Rural do Semi-Árido  
Prof. Dr. Valdemar Antonio Paffaro Junior – Universidade Federal de Alfenas

### **Ciências Biológicas e da Saúde**

Prof. Dr. André Ribeiro da Silva – Universidade de Brasília  
Profª Drª Anelise Levay Murari – Universidade Federal de Pelotas  
Prof. Dr. Benedito Rodrigues da Silva Neto – Universidade Federal de Goiás  
Prof. Dr. Edson da Silva – Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri  
Profª Drª Eleuza Rodrigues Machado – Faculdade Anhanguera de Brasília  
Profª Drª Elane Schwinden Prudêncio – Universidade Federal de Santa Catarina  
Prof. Dr. Ferlando Lima Santos – Universidade Federal do Recôncavo da Bahia  
Prof. Dr. Fernando José Guedes da Silva Júnior – Universidade Federal do Piauí  
Profª Drª Gabriela Vieira do Amaral – Universidade de Vassouras  
Prof. Dr. Gianfábio Pimentel Franco – Universidade Federal de Santa Maria  
Profª Drª Iara Lúcia Tescarollo – Universidade São Francisco  
Prof. Dr. Igor Luiz Vieira de Lima Santos – Universidade Federal de Campina Grande  
Prof. Dr. José Max Barbosa de Oliveira Junior – Universidade Federal do Oeste do Pará  
Profª Drª Magnólia de Araújo Campos – Universidade Federal de Campina Grande  
Profª Drª Mylena Andréa Oliveira Torres – Universidade Ceuma  
Profª Drª Natiéli Piovesan – Instituto Federaci do Rio Grande do Norte  
Prof. Dr. Paulo Inada – Universidade Estadual de Maringá  
Profª Drª Renata Mendes de Freitas – Universidade Federal de Juiz de Fora  
Profª Drª Vanessa Lima Gonçalves – Universidade Estadual de Ponta Grossa  
Profª Drª Vanessa Bordin Viera – Universidade Federal de Campina Grande

### **Ciências Exatas e da Terra e Engenharias**

Prof. Dr. Adélio Alcino Sampaio Castro Machado – Universidade do Porto  
Prof. Dr. Alexandre Leite dos Santos Silva – Universidade Federal do Piauí  
Prof. Dr. Carlos Eduardo Sanches de Andrade – Universidade Federal de Goiás  
Profª Drª Carmen Lúcia Voigt – Universidade Norte do Paraná  
Prof. Dr. Eloi Rufato Junior – Universidade Tecnológica Federal do Paraná  
Prof. Dr. Fabrício Menezes Ramos – Instituto Federal do Pará  
Prof. Dr. Juliano Carlo Rufino de Freitas – Universidade Federal de Campina Grande  
Profª Drª Luciana do Nascimento Mendes – Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio Grande do Norte  
Prof. Dr. Marcelo Marques – Universidade Estadual de Maringá  
Profª Drª Neiva Maria de Almeida – Universidade Federal da Paraíba  
Profª Drª Natiéli Piovesan – Instituto Federal do Rio Grande do Norte  
Prof. Dr. Takeshy Tachizawa – Faculdade de Campo Limpo Paulista

### **Conselho Técnico Científico**

Prof. Me. Abrãao Carvalho Nogueira – Universidade Federal do Espírito Santo  
Prof. Me. Adalberto Zorzo – Centro Estadual de Educação Tecnológica Paula Souza  
Prof. Dr. Adaylson Wagner Sousa de Vasconcelos – Ordem dos Advogados do Brasil/Seccional Paraíba  
Prof. Me. André Flávio Gonçalves Silva – Universidade Federal do Maranhão



Profª Drª Andreza Lopes – Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento Acadêmico  
 Profª Drª Andrezza Miguel da Silva – Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia  
 Prof. Dr. Antonio Hot Pereira de Faria – Polícia Militar de Minas Gerais  
 Profª Ma. Bianca Camargo Martins – UniCesumar  
 Profª Ma. Carolina Shimomura Nanya – Universidade Federal de São Carlos  
 Prof. Me. Carlos Antônio dos Santos – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro  
 Prof. Ma. Cláudia de Araújo Marques – Faculdade de Música do Espírito Santo  
 Prof. Me. Daniel da Silva Miranda – Universidade Federal do Pará  
 Profª Ma. Dayane de Melo Barros – Universidade Federal de Pernambuco  
 Prof. Me. Douglas Santos Mezacas -Universidade Estadual de Goiás  
 Prof. Dr. Edwaldo Costa – Marinha do Brasil  
 Prof. Me. Eliel Constantino da Silva – Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita  
 Profª Ma. Fabiana Coelho Couto Rocha Corrêa – Centro Universitário Estácio Juiz de Fora  
 Prof. Me. Felipe da Costa Negrão – Universidade Federal do Amazonas  
 Profª Drª Germana Ponce de Leon Ramírez – Centro Universitário Adventista de São Paulo  
 Prof. Me. Gevair Campos – Instituto Mineiro de Agropecuária  
 Prof. Me. Guilherme Renato Gomes – Universidade Norte do Paraná  
 Profª Ma. Jaqueline Oliveira Rezende – Universidade Federal de Uberlândia  
 Prof. Me. Javier Antonio Albornoz – University of Miami and Miami Dade College  
 Profª Ma. Jéssica Verger Nardeli – Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho  
 Prof. Me. José Luiz Leonardo de Araujo Pimenta – Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria Uruguay  
 Prof. Me. José Messias Ribeiro Júnior – Instituto Federal de Educação Tecnológica de Pernambuco  
 Profª Ma. Juliana Thaisa Rodrigues Pacheco – Universidade Estadual de Ponta Grossa  
 Prof. Me. Leonardo Tullio – Universidade Estadual de Ponta Grossa  
 Profª Ma. Lilian Coelho de Freitas – Instituto Federal do Pará  
 Profª Ma. Liliani Aparecida Sereno Fontes de Medeiros – Consórcio CEDERJ  
 Profª Drª Lívia do Carmo Silva – Universidade Federal de Goiás  
 Prof. Me. Luis Henrique Almeida Castro – Universidade Federal da Grande Dourados  
 Prof. Dr. Luan Vinicius Bernardelli – Universidade Estadual de Maringá  
 Profª Ma. Marileila Marques Toledo – Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri  
 Prof. Me. Rafael Henrique Silva – Hospital Universitário da Universidade Federal da Grande Dourados  
 Profª Ma. Renata Luciane Polsaque Young Blood – UniSecal  
 Profª Ma. Solange Aparecida de Souza Monteiro – Instituto Federal de São Paulo  
 Prof. Me. Tallys Newton Fernandes de Matos – Faculdade Regional Jaguaribana  
 Prof. Dr. Welleson Feitosa Gazel – Universidade Paulista

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)  
(eDOC BRASIL, Belo Horizonte/MG)**

M846 Morfologia comparativa de Oócitos de *Astyanax* Cf. *Intermedius* (Characiformes Characidae) de rios do norte do Espírito Santo e sul da Bahia [recurso eletrônico] / Lorena Ziviani Bevitório... [et al.]. – Ponta Grossa, PR: Atena, 2020.

Formato: PDF

Requisitos de sistemas: Adobe Acrobat Reader

Modo de acesso: World Wide Web

Inclui bibliografia

ISBN 978-65-86002-94-2

DOI 10.22533/at.ed.942200904

1. *Astyanax* (Peixe) – Classificação. 2. Peixes – Classificação – Espírito Santo. 3. Peixes – Classificação – Bahia. I. Bevitório, Lorena Ziviani. II. Silva, Niumaique Gonçalves da. III. Ingenito, Leonardo Ferreira da Silva. IV. Gomes, Marcos de Lucca Moreira. V. Pirovani, Juliana Castro Monteiro.

CDD 639.3

**Elaborado por Maurício Amormino Júnior – CRB6/2422**

## SUMÁRIO

RESUMO.....	1
ABSTRACT.....	2
INTRODUÇÃO .....	3
OBJETIVOS.....	11
MATERIAL E MÉTODOS.....	12
RESULTADOS .....	20
DISCUSSÃO .....	27
CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	32
REFERÊNCIAS.....	33
SOBRE OS AUTORES .....	41
ÍNDICE REMISSIVO .....	43

Data de submissão: 03/12/2019

**RESUMO:** As espécies pertencentes ao gênero *Astyanax* são, em geral, similares morfológicamente e sua separação tem sido historicamente difícil. Atualmente, a monofilia do gênero é amplamente rejeitada. Além disso, foram observadas variações morfológicas entre populações de *Astyanax intermedius*, provenientes de drenagens costeiras do norte do Espírito Santo e rio Mucuri/BA. Além dos caracteres morfológicos tradicionais, características dos gametas mostram grande variabilidade e têm sido estudadas em Characiformes. Sendo assim, nesse estudo comparou-se a morfologia e ultraestrutura dos ovócitos de seis populações de piabas, tradicionalmente identificadas como *A. cf. intermedius*, provenientes de quatro drenagens costeiras do norte do Espírito Santo e do sul da Bahia, utilizando técnicas de microscopia de luz e microscopia eletrônica de varredura. Fêmeas sexualmente maduras foram coletadas através de métodos tradicionais entre os meses de novembro de 2015 a janeiro de 2016. As análises morfométricas dos gametas foram realizadas utilizando o software Image-Pro Plus. O diâmetro dos ovócitos e a profundidade e diâmetros interno e externo da micropila não apresentaram alterações significativas, exceto a altura da zona radiata, que foi significativamente maior na população do rio Mucuri ( $p < 0,05$ ). Análises histoquímicas de carboidratos mostraram características ovocitárias similares entre as populações. A superfície da região micropilar e microvilosidades presentes na membrana plasmática apresentaram variações morfológicas entre as populações, entre indivíduos de uma mesma população, e ainda em um mesmo indivíduo. As variações observadas podem estar relacionadas à plasticidade fenotípica ou mesmo a alguma distinção taxonômica, já que aparentemente a espécie não está claramente determinada. Portanto, as observações indicam que a população do rio Mucuri difere das populações de estudos já realizados. No entanto, estudos moleculares, citogenéticos e morfológicos se fazem necessários, a fim de contribuir com a elucidação do status taxonômico entre as populações de *A. cf. intermedius*.

**PALAVRAS-CHAVE:** Ovócitos, piabas, ultraestrututura, microscopia de luz, região Neotropical.

## COMPARATIVE MORPHOLOGY OF THE *ASTYANAX CF. INTERMEDIUS* (CHARACIFORMES: CHARACIDAE) OOCYTES FROM RIVERS OF THE NORTH ESPÍRITO SANTO AND SOUTH BAHIA

**ABSTRACT:** The species belonging to the genus *Astyanax* are morphologically similar and their separation into different species has been historically difficult. Currently, the monophyly of the genus is widely rejected. Also, morphological variations were observed among populations of *Astyanax intermedius*, from the northern rivers of Espírito Santo and Mucuri river, in Bahia. In addition to the traditional morphological features, gamete characteristics show great variability and have been studied in Characiformes. Thus, in this study, the morphology and ultrastructure of oocytes from six populations of piabas, traditionally identified as *A. cf. intermedius*, from four coastal basins in northern Espírito Santo and southern Bahia, were compared using scanning electron microscopy and light microscopy techniques. Sexually mature females were collected through traditional methods from November 2015 to January 2016. Morphometrical analyzes of the gametes were performed using Image-Pro Plus software. The oocyte diameter, micropyle depth and internal and external micropyle diameters did not show significant changes, except for the height of the zona pellucida, which was significantly higher in the Mucuri river's population ( $p < 0.05$ ). Histochemical analyzes of carbohydrates showed similar oocyte characteristics among populations. The surface of the micropillary region and the microvilli present in the plasma membrane were morphologically variable among populations, individuals from the same population and, also, in the same individual. The observed variations may be related to phenotypic plasticity or even some taxonomic distinction, since apparently the species is not clearly determined. Therefore, the observations indicate that the population of the Mucuri River possibly comprises a distinct species not yet described. However, molecular, cytogenetic and morphological studies are necessary in order to contribute to the elucidation of the taxonomic status among the populations of *A. cf. intermedius*.

**KEYWORDS:** Oocytes, piabas, ultrastructure, light microscopy, Neotropical region.

Os peixes formam o grupo mais diversificado dentro dos vertebrados e possuem tamanhos, formas e habitats variados, ocupando ambientes dulcícolas, estuarinos e marinhos (NELSON, 2006; DESJARDINS & FERNALD, 2009). A existência de tamanha diversidade favorece o entendimento de sua história evolutiva, porém estabelece dificuldades em sua taxonomia. Embora os peixes formem um conjunto heterogêneo, exibem uma continuidade filogenética. No entanto, não formam um grupo monofilético, mas sim, um agrupamento parafilético (NELSON, 2006).

A região Neotropical possui a maior diversidade de espécies de peixes de água doce do planeta (VARI & MALABARBA, 1998). Das 13.800 espécies estimadas, aproximadamente 6.000 mil ocorrem na região Neotropical, das quais 4.475 são consideradas validadas (REIS *et al.*, 2003; NELSON *et al.*, 2016; ICMBio, 2017). Entretanto, o número de espécies de peixes de água doce para esta região pode ser ainda maior, chegando a 8.000 (SCHAEFER, 1998).

O Brasil destaca-se pela riqueza e diversidade de sua fauna de peixes em rios e riachos. Esta fauna é a de maior biodiversidade do mundo, sendo composta por cerca de 39 famílias e mais de 3.000 espécies (BUCKUP *et al.*, 2007; ICMBio, 2017). Tamanha diversidade deve-se a um conjunto de fatores históricos, ecológicos e evolutivos que sofrem alterações constantes há milhares de anos, desde a separação da Gondwana (RIZZO *et al.*, 2002; RIBEIRO *et al.*, 2006). Desse modo, conhecer a ictiofauna dessa região torna-se essencial para o desenvolvimento de ações que possam contribuir para modelos de preservação e manejo (VARI & MALABARBA, 1998).

Nos últimos anos, grandes progressos têm sido conquistados para a resolução da história evolutiva de vários componentes dos grupos dominantes de peixes de água doce neotropicais, bem como estudos com base em dados morfológicos, têm-se expandido consideravelmente (MALABARBA *et al.*, 1998). Porém, apesar dos notáveis progressos, muito ainda resta a ser conhecido sobre a filogenia dos diversos grupos, devido à imensa magnitude da biodiversidade desta região (SANTANA, 2010).



## 1.1 Superordem Ostariophysi

A superordem Ostariophysi representa aproximadamente 28% das espécies de peixes conhecidas e corresponde a cerca de 68% dos peixes de água doce do mundo, estando presente em todos os continentes, exceto na Antártida, Groenlândia e Nova Zelândia (NELSON *et al.*, 2016). A superordem Ostariophysi é composta por 5 ordens: Gonorynchiformes (*milkfishes*), Cypriniformes (carpas, barbos, dojôs, etc), Characiformes (tetras, lambaris, piabas, pacus, piranhas, traíras, etc), Siluriformes (bagres, cascudos, abotoados e mandis) e Gymnotiformes (poraquês, sarapós e ituíis), distribuídas em 80 famílias, 1.347 gêneros e cerca de 10.388 espécies (NELSON *et al.*, 2016). Dentro dessa diversidade, os Characiformes destacam-se como uma das principais ordens de Ostariophysi, com mais de 2.000 espécies (BALDISSEROTTO *et al.*, 2014; NELSON *et al.*, 2016).

## 1.2 Ordem Characiformes

A ordem Characiformes apresenta elevada diversidade de peixes de água doce, sendo reconhecidas cerca de 24 famílias, 520 gêneros e 2300 espécies, todas exclusivas de água doce e distribuídas ao longo da região Neotropical e África (NELSON *et al.*, 2016).

A ordem foi proposta por Günther em 1864 e seus representantes variam de 13 mm a 140 cm de comprimento (NELSON *et al.*, 2016). Possuem dentes geralmente bem desenvolvidos, nadadeira adiposa frequentemente presente; nadadeira pélvica presente, nadadeira anal variando de curta a moderadamente longa, corpo quase sempre coberto por escamas, linha lateral geralmente curvada, às vezes incompleta; maxila superior frequentemente não verdadeiramente protrátil (NELSON *et al.*, 2016).

Na região Neotropical, a ordem Characiformes é considerada um dos grupos dominantes entre os peixes de água doce, incluindo representantes muito distintos, em todos os planos corporais, tanto na anatomia interna, como externa. Essa variedade favorece a diversificação de suas famílias, levando à complexidade dos indivíduos que a compõem, sendo a família Characidae a maior, mais complexa e com maior diversidade dentro dos Characiformes (REIS *et al.*, 2003; VARI & MALABARBA, 1998).

O conhecimento atual sobre o padrão de relacionamento entre os Characiformes permanece controverso (NELSON *et al.*, 2016). No entanto, BURNS *et al.* (2009) postulam que os caracídeos apresentam grande variabilidade na forma e estrutura dos gametas, cuja análise tem fornecido uma série de novas características em estudos filogenéticos, auxiliando na elucidação do padrão de relacionamento entre Characiformes.

### 1.3 Família Characidae

A composição da família Characidae tem variado significativamente ao longo do estudo dos Characiformes (VARI, 1998) e o entendimento das inter-relações filogenéticas está longe de ser estabelecido (REIS *et al.*, 2003). Com 10 subfamílias e 1.122 espécies válidas reconhecidas, a família Characidae equivale a pelo menos 50% das espécies válidas da ordem Characiformes (ESCHMEYER & FONG, 2017).

A forma do corpo dos caraciformes e os biótopos que habitam são extremamente variados (NAKATANI *et al.*, 2001). De acordo com REIS *et al.* (2003), aproximadamente 86% das espécies válidas de Characidae são de porte pequeno, com menos de 15 cm de comprimento padrão quando adultas. Seus representantes apresentam, geralmente, nadadeira caudal adiposa e incluem a maioria dos peixes de escamas conhecidos popularmente como lambaris, piabas, piraicanjubaras, piranhas, pacus, entre outros (GURGEL, 2004).

Em consequência de sua natureza heterogênea, as espécies que não apresentam relações filogenéticas bem definidas são listadas como *incertae sedis* (LIMA *et al.*, 2003). Os gêneros *incertae sedis* em Characidae constituem um imenso conjunto de peixes, predominantemente pequenos, abundantes nos rios e em outros habitats aquáticos da região Neotropical (NELSON, 2006).

### 1.4 Gênero *Astyanax*

O gênero *Astyanax* Baird & Girard, 1854 é um dos mais diversos em Characidae, contendo indivíduos popularmente conhecidos como piabas e lambaris, com 140 espécies válidas reconhecidas (ZANATA *et al.*, 2017; ESCHMEYER *et al.*, 2017). Sua distribuição abrange desde o sul dos Estados Unidos até a região central da Argentina, ocupando diversos tipos de habitat em lagos, rios e riachos (EIGENMANN, 1921; WEITZMAN & MALABARBA, 1998; MELO & BUCKUP, 2006).

De acordo com filogenias mais recentes, o gênero *Astyanax* não representa um grupo monofilético (MIRANDE, 2010; OLIVEIRA *et al.*, 2011) e, até o momento, tem sido definido por uma combinação de caracteres proposta há quase um século por EIGENMANN (1921, 1927): possuem duas fileiras de dentes multicuspidados na pré-maxila, com a fileira pré-maxilar interna consistindo de cinco dentes, uma linha lateral completa, nadadeira adiposa presente e nadadeira caudal não coberta por escamas. Segundo MELO (2001), as espécies pertencentes ao gênero *Astyanax* são, em geral, morfologicamente similares e sua separação tem sido historicamente difícil. A transferência de várias espécies de *Astyanax* para outros gêneros de Characidae exemplifica bem a dificuldade de caracterização dos espécimes pertencentes ao gênero (VARI & CASTRO, 2007).

Diante dos problemas taxonômicos, o gênero *Astyanax*, atualmente, está classificado em *incertae sedis* (LIMA *et al.*, 2003). MIRANDE (2009, 2010) propôs uma nova hipótese de relacionamento entre os gêneros *incertae sedis*, que reconheceu

um clado de Characidae composto de forma não exclusiva por várias espécies de *Astyanax* denominado “*Astyanax* Clade”.

Assim como a sistemática do gênero não está resolvida, o status taxonômico de algumas espécies de *Astyanax* não é completamente claro e complexos de espécies são encontrados. Três destes complexos são amplamente reconhecidos: “complexo *Astyanax bimaculatus*”, “complexo *Astyanax fasciatus*” e “complexo *Astyanax scabripinnis*” (POZZOBON, 2012). A espécie *Astyanax* cf. *intermedius* utilizada neste trabalho (EIGENMANN, 1908) faz parte do complexo *A. scabripinnis* (MOREIRA-FILHO & BERTOLLO, 1991).

Embora as subespécies de *A. scabripinnis* sejam reconhecidas como espécies válidas, estudos taxonômicos e sistemáticos fazem-se necessários, a fim de estabelecer relações filogenéticas entre as espécies válidas e identificar novas espécies pertencentes ao complexo *A. scabripinnis* (POZZOBON, 2012).

### 1.5 *Astyanax intermedius*

As espécies pertencentes ao complexo *Astyanax scabripinnis*, tal como *Astyanax* cf. *intermedius*, comumente apresentam altura do corpo em torno de 30% do comprimento padrão e menos de 25 raios na nadadeira anal (MELO, 2001). Segundo EIGENMANN (1921), a espécie possui forma alongada, 37-39 escamas na linha lateral e olhos três vezes ou menos em relação ao tamanho da cabeça.

*A. cf. intermedius* possui descrição original de localidade-tipo para os rios Mucuri-BA e Paraíba do sul-RJ. Posteriormente, MELO (2001) redescreveu a espécie e restringiu sua distribuição à bacia do rio Paraíba do sul, sem, contudo, esclarecer a identidade dos exemplares-tipo provenientes do rio Mucuri, os quais são muito jovens e na época da descrição encontravam-se mal preservados (EIGENMANN, 1908, 1927; MELO, 2001).

Segundo MENEZES *et al.* (2007), a espécie pode não estar restrita apenas à bacia do rio Paraíba do sul e rios costeiros do estado do Rio de Janeiro e o próprio EIGENMANN (1927) acreditava que a espécie também estava presente nas bacias dos rios das Velhas (drenagem do rio São Francisco) e Doce. Nos últimos anos, diversos autores relataram a presença de *A. cf. intermedius* em drenagens costeiras no norte Espírito Santo (MAZZINI *et al.*, 2014; SARMENTO-SOARES & MARTINS-PINHEIRO, 2012; SARMENTO-SOARES & MARTINS-PINHEIRO, 2013; SARMENTO-SOARES & MARTINS-PINHEIRO, 2014; COSWOSCK & DUBOC, 2015), no rio Doce, Minas Gerais (LEZAMA *et al.*, 2011) e no Rio São Francisco, localizado na região de Três Marias (BRITSKI *et al.*, 1988). Porém, de acordo com os autores, a espécie *A. cf. intermedius* necessita de maiores investigações, pois alguns de seus caracteres e/ou distribuição não correspondem com a descrição original e podem estar associadas a novas espécies.

Além disso, coletas recentes realizadas por INGENITO L.F.S, (*comunicação pessoal*) nas drenagens costeiras no norte do Espírito Santo e no rio Mucuri, região

de Santa Clara, revelaram variações morfológicas entre as populações de *A. cf. intermedius* provenientes de diferentes bacias hidrográficas e de diferentes trechos dentro da bacia do rio São Mateus. Essas populações apresentam variações morfológicas quando comparadas à redescrição realizada por MELO (2001), sendo constatadas diferenças mais simples à mais complexas, indicando variações populacionais e, em alguns casos, indícios de espécies novas na região. Dessa forma, torna-se notável a necessidade de estudos que possam contribuir para a elucidação do status taxonômico das populações de *A. cf. intermedius* da região norte do Espírito Santo e sul da Bahia.

Além dos caracteres morfológicos tradicionais, várias características reprodutivas das espécies têm se mostrado potencialmente úteis no estudo do padrão de relacionamento entre os grupos (BAICERE-SILVA *et al.*, 2011). Características dos gametas mostram grande variabilidade e têm sido estudadas em diversos grupos entre os Characiformes (RIZZO, *et al.*, 2002; JAMIESON, 2009; BURNS *et al.*, 2009).

## 1.6 Sistema reprodutor feminino e ovogênese

Os peixes teleósteos apresentam, em sua maioria, fertilização e desenvolvimento externos, após a liberação dos gametas, masculino e feminino, para o meio aquático (NAKATANI *et al.*, 2001).

Na maioria dos Characiformes, os ovários e testículos são órgãos pares, alongados e fusiformes, localizados dorsolateralmente à cavidade celômica e à bexiga gasosa, onde se prendem pelo mesovário e mesórquio, respectivamente, e dorsalmente ao tubo digestivo. Tanto os ovários quanto os testículos são unidos em suas extremidades caudais, formando um ducto comum que se abre na papila urogenital (BAZZOLI, 2003).

Anatomicamente, ovários de teleósteos podem ser de dois tipos: cistovariano ou ginovariano. Os ovários cistovarianos têm continuidade com o oviduto, através do qual os oócitos alcançam o meio externo. Nos ginovarianos, em que o oviduto está ausente, os oócitos são liberados diretamente na cavidade celômica, para depois serem lançados ao meio externo (REDDING & PATIÑO, 1993). Os ovários são revestidos pela túnica albugínea, constituída por tecido conjuntivo denso que emite septos para o interior do órgão formando lamelas ovulíferas, delimitando a cavidade ovariana central. Tais lamelas contêm os oócitos em diferentes fases de desenvolvimento (BAZZOLI, 2003).

O desenvolvimento dos oócitos nas fêmeas dos teleósteos, durante toda a vida reprodutiva, tem início no epitélio germinativo a partir das oogônias (GRIER, 2000; GRIER, 2002). No epitélio ocorre a proliferação das células germinativas (oogônias), através de sucessivas mitoses. As oogônias resultantes das divisões mitóticas são progressivamente envoltas pelas células pré-foliculares, formando os cistos. (QUAGIO-GRASSIOTTO *et al.*, 2011). Dentro dos cistos, as oogônias diferenciadas

dividem-se por mitose, formando um conjunto de células interconectadas, denominado de cisto da linhagem germinativa (PEPLING *et al.*, 1999). Após um determinado número de ciclos mitóticos, as oogônias diferenciadas entram em meiose, dando origem aos oócitos (QUAGIO-GRASSIOTTO *et al.*, 2011). A meiose estaciona em diplóteno tardio, quando as pontes citoplasmáticas são quebradas pelas células pré-foliculares, com conseqüente individualização dos oócitos e, subsequente formação dos folículos ovarianos (QUAGIO-GRASSIOTTO *et al.*, 2011).

Durante a individualização dos cistos, as células pré-foliculares sintetizam a membrana basal que as suporta (FRANÇA *et al.*, 2010). O folículo ovariano recém-formado é constituído pelo oócito circundado pelas células foliculares que se apoiam na membrana basal. Células oriundas do estroma circundam o folículo ovariano, exceto na região de compartilhamento da membrana basal, formando a teca. O oócito envolto pelas células foliculares, a membrana basal e a teca formam o complexo folicular (GRIER *et al.*, 2009; MAZZONI *et al.*, 2010; QUAGIO-GRASSIOTTO *et al.*, 2011).

O desenvolvimento do oócito ocorre dentro do complexo folicular e compreende os estágios de crescimento primário e secundário, maturação e ovulação (GRIER *et al.*, 2009). Os crescimentos primário e secundário são também conhecidos como estágios pré-vitelogênico e vitelogênico (TYLER & SUMPTER, 1996; PATIÑO & SULLIVAN, 2002; GRIER *et al.*, 2009). Durante o estágio pré-vitelogênico, grande quantidade de RNA acumula-se no citoplasma, ocorre aumento da quantidade de organelas membranosas, a zona radiata é formada e os precursores dos alvéolos corticais iniciam sua formação (SELMAN & WALLACE, 1989).

A progressiva deposição de vitelo e o espessamento da zona pelúcida caracterizam a vitelogênese ou crescimento secundário (WALLACE & SELMAN, 1990; SELMAN & WALLACE, 1989). A vitelogênese progride até que o oócito esteja completamente desenvolvido e o citoplasma preenchido pelos glóbulos de vitelo. No fim da vitelogênese, o oócito poderá ser recrutado para a maturação. A maturação é caracterizada pela migração do núcleo, em direção ao polo animal onde a micrópila está localizada (PATIÑO & SULLIVAN, 2002; GRIER *et al.*, 2009). A meiose é retomada após o término da maturação e só se completa com a fertilização (QUAGIO-GRASSIOTTO *et al.*, 2013).

## **1.7 Ultraestrutura dos oócitos em Characiformes e suas implicações filogenéticas**

Nos peixes teleósteos, durante o crescimento do folículo ocorre a formação da zona radiata, que consiste na deposição de material amorfo ao redor das microvilosidades existentes entre a superfície dos oócitos e das células foliculares (ANDERSON, 1967). A zona radiata é constituída de substâncias de natureza glicoproteica, sendo que sua espessura e número de camadas podem variar nos



diferentes grupos de peixes (AMANZE & IYVENGAR, 1990). A camada interna é composta, principalmente, por proteínas, sendo homóloga a zona pelúcida de mamíferos (SCAPIGLIATI *et al.*, 1999) e a camada externa mostra uma combinação de proteínas e glicoproteínas (GURAYA, 1996). Sua função está associada à interação dos ovos aos diferentes substratos de desova, além de proteger o embrião contra microrganismos patogênicos e injúrias físicas (KUDO & YAZAWA, 1997; HART, 1990). Na maioria dos peixes, a zona radiata é constituída por duas camadas, nas quais existem poros ou canais dispostos radialmente a essa dupla camada, sendo, por isso, denominada zona radiata (GURAYA, 1996). A disposição dos poros/canais é uma característica espécie-específica (RIEHL, 1993).

A zona radiata nos peixes teleósteos apresenta uma interrupção na região do polo animal, que leva à formação de uma estrutura com formato de poro ou funil denominada micrópila (IWAMATSU *et al.*, 1993). O vestibulo micropilar pode apresentar diferenças morfológicas, dependendo da espécie, exibindo estrutura lisa ou vários sulcos com disposição retilínea (GANECO & NAKAGHI, 2003; RIZZO *et al.*, 2003). Uma vez que os espermatozoides dos peixes teleósteos não possuem acrossomo (JAMIESON, 1991), a micrópila permite seu acesso direto ao citoplasma do oócito, sem a ocorrência de reação acrosômica, como ocorre na maioria dos vertebrados (REDDING & PATIÑO, 1993).

A camada mais externa da zona radiata pode sofrer alterações físico-químicas que permitem aos ovos aderirem a diferentes substratos (LAALE, 1980; RIEHL & PATZNER, 1998). Nos teleósteos, os substratos são selecionados de acordo com a qualidade do local, a fim de maximizar a taxa de desenvolvimento e sobrevivência da prole (WOOTTON & SMITH, 2014).

Os ovos não-adesivos apresentam a camada mais externa da zona radiata menos desenvolvida em relação aos ovos que apresentam algum grau de adesividade (RIZZO & BAZZOLI, 1993; RIZZO *et al.*, 1998). Os ovos adesivos aderem entre si formando massas e/ou se ligam a diferentes substratos, quando liberados em água. Já os ovos livres mantêm-se individualizados na água (BAZZOLI, 2003).

Em geral, ovos adesivos são de peixes sedentários, de desova parcelada. Por outro lado, os ovos não adesivos apresentam superfície da zona radiata lisa com poros/canais ou rede fibrilar recobrimdo a zona radiata, sendo observados, principalmente, em peixes que apresentam comportamento reprodutivo migratório (RIZZO *et al.*, 2002). Nos Characiformes, os padrões de superfície têm relação com o grau de adesividade dos oócitos e, em geral, ovos de espécies pertencentes ao mesmo gênero apresentam padrão de superfície similares (Tabela 1). Além dos arranjos de superfície, outros critérios também são necessários para caracterização e identificação de diversas espécies em teleósteos, tais como distância entre os poros/canais da zona radiata, diâmetro dos poros e morfologia da micrópila (RIEHL, 1993; BELOTE & COSTA, 2002).

Dado o potencial de aplicabilidade das características gaméticas na elucidação

das relações interespecíficas, o presente estudo compara a morfologia dos gametas femininos, buscando identificar caracteres particulares e/ou compartilhados entre as diferentes populações de *A. cf. intermedius* do complexo *A. scabripinnis*.

Adesividade	Características	Exemplo de gêneros
<b>Não adesivo ou pouco adesivo</b>	Comuns em espécies migradoras, são pequenos e numerosos, grande espaço perivitelino e não estão sujeitos a cuidados parentais. Possuem zona radiata lisa com poros canais simples ou rede fibrilar recobrindo a superfície.	<i>Astyanax, Bryon, Curimatella, Leporinus, Prochilodus, Triportheus e Salminus.</i>
<b>Adesivo</b>	Comuns em espécies não migradoras, são de tamanho variável, pouco numerosos, espaço perivitelino geralmente menor, podem estar sujeitos a cuidados parentais. Possuem zona radiata com poros/canais hexagonais, filamentos, vilos ou glóbulos.	<i>Acestrorhynchus, Bryconops, Hoplias, Schizodon e Serrasalmus</i>

Tabela 1. Padrão de adesividade dos oócitos e comportamento reprodutivo em gêneros de peixes Characiformes (modificado de Rizzo *et al.*, 2002).

## 2.1 Geral

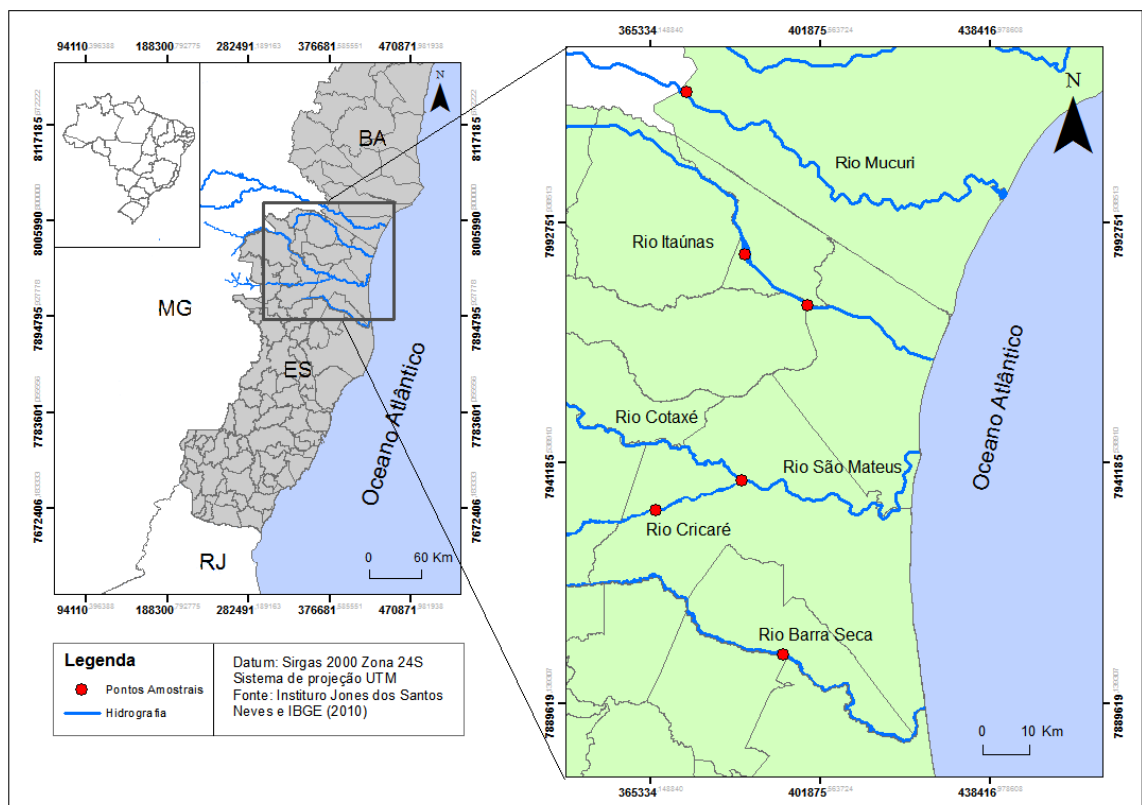
Comparar a morfologia do gameta feminino de populações identificadas como *Astyanax cf. intermedius* provenientes de quatro drenagens costeiras do norte do Espírito Santo (rios Barra Seca, São Mateus e Itaúnas) e do sul da Bahia (rio Mucuri), com vistas à identificação de uma ou mais espécies.

## 2.2 Específicos

- Quantificar e comparar, através da microscopia de luz e utilizando ferramentas morfométricas, o diâmetro dos oócitos, altura da zona pelúcida, profundidade da micrópila, diâmetro interno e externo dos poros micropilares;
- Identificar carboidratos terminais em oócitos das populações em estudo, através de técnicas histoquímicas;
- Descrever a ultraestrutura dos oócitos em populações de *A. cf. intermedius*, através de técnicas convencionais de microscopia eletrônica de varredura (MEV);
- Comparar a morfologia, densidade e distância entre os poros/canais presentes na zona radiata, através da MEV;
- Analisar comparativamente os dados obtidos, a partir das características morfológicas e morfométricas, a fim de identificar caracteres particulares e/ou compartilhados entre as diferentes populações em estudo.

## 3.1 Local de coleta

Os exemplares analisados neste estudo são provenientes de quatro drenagens costeiras localizadas no norte do Espírito Santo e sul da Bahia, sendo as bacias dos rios Mucuri, Itaúnas, São Mateus e Barra Seca (Figura 1). Os pontos de coleta foram determinados de acordo com a facilidade de acesso ao local, além de informações prévias sobre a ocorrência da espécie em estudo, disponibilizadas pelo Núcleo de Pesquisas de Peixes Continentais (NUPPEC) do Centro Universitário norte do Espírito Santo (CEUNES/UFES) e bibliografia disponível.



**Figura 1.** Pontos de coleta em evidência (●), localizados no norte do Espírito Santo e sul da Bahia.

Fonte: M.Sc. Thais do Rego Sciarretta.

O rio Mucuri é formado pela junção dos rios Mucuri do sul e Mucuri do norte,

com nascentes nos municípios de Malacacheta e Ladainha em Minas Gerais, respectivamente. Percorre 242 km desde as nascentes até sua foz no município de Mucuri, Bahia. Sua área total de drenagem é de 15.100 km<sup>2</sup>, tendo como principais afluentes os rios Todos os Santos e Pampã (CETEC, 1983; EUCLYDES, 2005). A coleta dos indivíduos na Bacia do rio Mucuri foi realizada no município de Mucuri/BA, localizado a jusante da barragem de Santa Clara (17°53'50"S 40°11'50"W), na localidade tipo baiana de *Astyanax* cf. *intermedius*.

O rio Itaúnas localiza-se no extremo norte capixaba, tendo suas principais nascentes nos municípios de Ponto Belo e Mucurici, desaguando no município de Conceição da Barra. A bacia do rio Itaúnas possui uma superfície de aproximadamente 4.434 km<sup>2</sup> (SARMENTO-SOARES & MARTINS-PINHEIRO, 2012). Neste estudo, foram determinados dois pontos distintos de coleta na calha do rio Itaúnas, ambos situados no município de Pedro Canário/ES (ponto 1: 18°18'42,6"S 39°57'19,0"W; ponto 2 18°12'45,8"S 40°04'49,1"W).

A bacia hidrográfica do rio São Mateus possui uma superfície de cerca de 13.482 km<sup>2</sup> entre os estados de Minas Gerais e Espírito Santo. O rio São Mateus é formado pela união dos rios Cotaxé (ou rio do norte), com cerca de 244 km e o rio Cricaré (ou Braço sul), com cerca de 200 km (ANA, 2009). As coletas na bacia do rio São Mateus foram realizadas em dois pontos distintos, ambos no município de São Mateus/ES. Ponto 1, Cachoeira do Inferno, no rio Cricaré (18°39'03,3"S 40°05'24,5"W) e ponto 2, na junção entre os rios Cricaré e Cotaxé (18°42'27"S 40°16'01"W).

Percorrendo cerca 157 km de extensão, o rio Barra Seca constitui uma bacia de 3.230 m<sup>2</sup>, incluindo a Reserva Biológica de Sooretama por completo e grande parte da Reserva Natural de Linhares (Reserva Natural da Vale). Faz limites ao norte e nordeste com a bacia do São Mateus e ao sul e sudeste com a parte baixa da bacia do rio Doce e a leste com o oceano Atlântico (SARMENTO-SOARES & MARTINS-PINHEIRO, 2014). A coleta foi realizada no município de Sooretama, próximo à Reserva Biológica de Sooretama (18°59'18,5"S 40°00'27,8"W).

### 3.2 Coleta e processamento de material biológico

As coletas foram realizadas sob licença SISBIO nº 48489-2 para Leonardo Ferreira da Silva Ingenito. A identificação dos *Astyanax* cf. *intermedius* (Figura 2), provenientes das seis populações em estudo, foi realizada pelo Prof. Dr. Leonardo Ferreira da Silva Ingenito com base em EIGENMANN (1908, 1927), GÉRY (1977) e MELO (2001).





Figura 2. Exemplar de *Astyanax cf. intermedius* (comprimento padrão: 65,82 mm) coletado na bacia do rio Mucuri, Mucuri, Bahia, Brasil. (Foto: Leonardo F. S. Ingenito).

Foram coletadas fêmeas sexualmente maduras em duas coletas realizadas nas quatro drenagens em estudo. Nove a dezenove indivíduos foram capturados por ponto de coleta, exceto o ponto 1, localizado no rio Itaúnas, onde foram obtidos apenas quatro indivíduos. As coletas foram realizadas entre os meses de novembro de 2015 a janeiro de 2016, sendo estabelecidos com base em estudos relacionados ao período reprodutivo de *A. cf. intermedius* (PLESLEY, P.A.S, *comunicação pessoal*).

Os peixes foram coletados com auxílio de rede de arrasto multifilamento 2x1,4 m malha 0,25 cm, peneiras de arroz, puçás com malha multifilamento 0,25 cm e tarrafas 2,1x15 m malha 1,5 cm. Ainda em campo, os exemplares coletados foram fixados em solução de formol tamponado 10% em tampão fosfato sódio pH 7,2, após abertura da cavidade peritoneal e mantidos em sacos plásticos devidamente etiquetados.

Em laboratório, os exemplares foram identificados, pesados em balança analítica de precisão de 0,0001 g (Gehaka - AG220A) e medidos com paquímetro digital (Vonder PD-150) com precisão de 0,01 mm. Após a coleta dos dados biométricos, os exemplares foram dissecados e as gônadas fixadas em solução de Bouin, por até 24h a 4°C, para processamento e análise em microscopia de luz. As gônadas destinadas para microscopia eletrônica de varredura (MEV) foram fixadas em glutaraldeído 2,5% em tampão fosfato de sódio pH 7.2, por até 24 h a 4°C.

Após 48 horas em solução de formaldeído 10%, os exemplares dissecados foram transferidos para uma solução de álcool etílico 70%, identificados e se encontram em fase de tombamento como testemunho na *Coleção Zoológica norte Capixaba* (CZNC, CEUNES/UFES).

### 3.3 Microscopia de luz

As gônadas destinadas às análises em microscopia de luz foram desidratadas em concentrações crescentes de álcool etílico (70%, 80%, 90%, 95% e 100%), diafanizadas em xilol e incluídas em Paraplast (Merck). Após a inclusão, o material foi seccionado em micrótomo rotativo e as secções obtidas (5µm) foram montadas

sobre lâminas histológicas e coradas rotineiramente com Hematoxilina e Eosina (HE). Para a coloração com HE, as lâminas foram hidratadas, coradas em Hematoxilina de Harris por 2 min, lavadas em água corrente por 10 min, coradas em Eosina 2.5% por 3 min, novamente lavadas em água corrente por 10 min, desidratadas, montadas e fotografadas com câmera digital acoplada ao microscópio de luz (Leica LCC50 HD). O processamento para microscopia de luz foi realizado no Laboratório de Biologia Estrutural – PPGBT/CEUNES/UFES.

### 3.4 Colorações histoquímicas

Para realização das colorações histoquímicas, as gônadas foram desidratadas em concentrações crescentes de Álcool etílico (70%, 80%, 90%, 95% e 100%), incluídas em resina glicol metacrilato e seccionadas em micrótomo rotativo. As secções obtidas (3 $\mu$ m) foram montadas sobre lâminas histológicas, as quais foram posteriormente coradas com as técnicas de Ácido Periódico Schiff (PAS) (MCMANUS, 1946), Alcian Blue (AB) pH 2,5 (LEV & SPICER, 1964) e técnica combinada de AB 2,5 + PAS modificada de BANCROFT & STEVENS (1996).

Na técnica de PAS, para detecção de glicoproteínas neutras, as lâminas foram banhadas em Ácido Periódico 1% por 45 min, lavadas em água destilada e mergulhadas em Reativo de Schiff por 60 min. Seguiu-se uma nova lavagem em água de corrente por 10 minutos, coloração em Hematoxilina de Harris por 3 min, lavagens em água destilada, montagem e fotodocumentação.

No método de AB pH 2,5, para detecção de glicoproteínas ácidas, as lâminas foram hidratadas, em seguida banhadas em solução tampão fosfato de sódio pH 7,2 por 30 min e mergulhadas em Alcian Blue pH 2,5 por 45 min, novamente lavadas em tampão fosfato de sódio pH 7.2, seguido de banho em água corrente por 2 min. Posteriormente, as lâminas foram montadas e fotodocumentadas.

Na técnica combinada AB pH 2,5 + PAS é possível evidenciar em azul as glicoproteínas ácidas e, na cor magenta, as glicoproteínas neutras. Quando há mistura de ambas, a cor é dependente da glicoproteína dominante, podendo variar do azul púrpura ao violeta. As lâminas destinadas a essa técnica foram tratadas em AB pH 2,5 por 2h, em seguida foram realizados banhos sucessivos em água corrente e água destilada. Posteriormente, as lâminas foram deixadas em solução de ácido periódico 1% por 60 min, lavadas em água corrente por 5 min e em água destilada. Seguiu-se com a imersão no Reativo de Schiff por 60 min, lavagem em água corrente por 5 min, contracoloração com hematoxilina de Mayer por 2 min, seguida de uma nova lavagem em água destilada. Por fim, as lâminas foram montadas e fotodocumentadas.

### 3.5 Análises morfométricas

Para análises morfométricas foram capturadas micrografias com câmera digital

acoplada ao microscópio de luz (Leica LCC50 HD). As imagens foram obtidas de diferentes campos em lâminas coradas com HE com aumento de 40x, 200x e 400x. Foram mensurados: diâmetro dos oócitos em vitelogênese completa, espessura da zona radiata, profundidade da micrópila e os diâmetros dos poros interno e externo do vestíbulo micropilar, utilizando o software Image-Pro Plus versão 6.0 (MEDIA CYBERNETICS, 2001).

O diâmetro dos oócitos com vitelogênese completa (Figura 3) foi obtido a partir da mensuração, ao acaso, de 15 secções transversais, por indivíduo, de células com o contorno mais circular possível, em que o núcleo estivesse em evidência. As medidas foram realizadas com um aumento de 40x. Foram tomadas duas medidas diametralmente opostas e o diâmetro do oócito foi considerado a média das duas medidas obtidas.

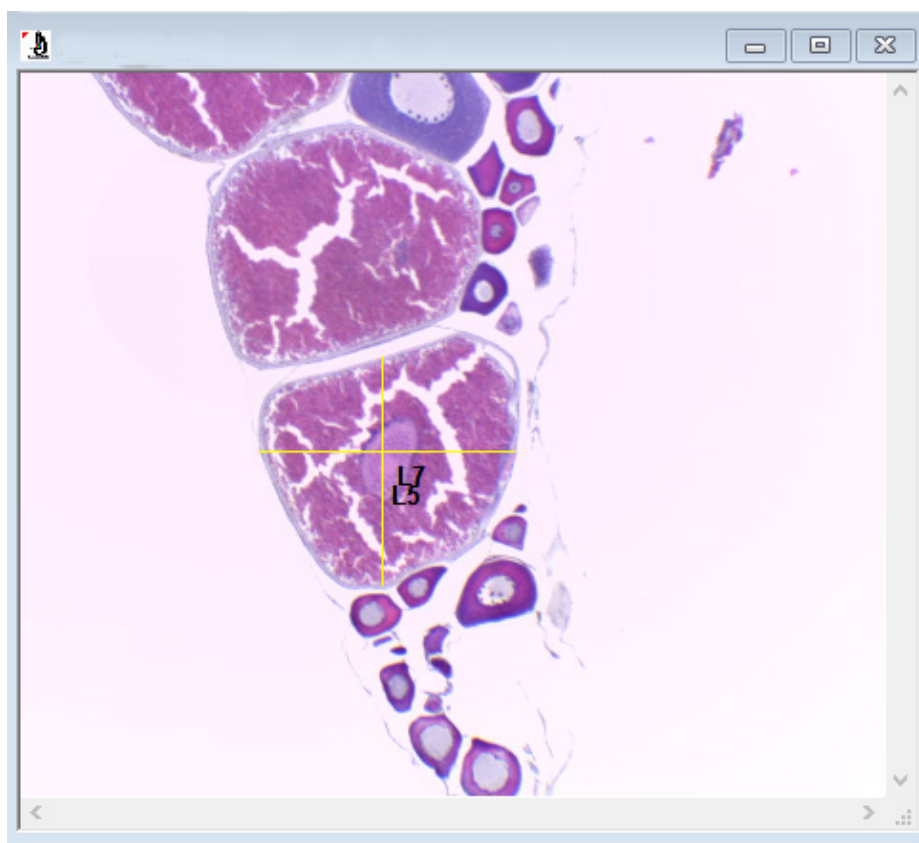


Figura 3. Medida do diâmetro do oócito em vitelogênese completa. A partir da média dos valores obtidos, calculou-se o diâmetro dos oócitos.

A altura da zona radiata foi calculada a partir da média de 10 medidas feitas na zona radiata de cada oócito (Figura 4). Foram analisados 15 oócitos, ao acaso, por indivíduo. As medidas foram realizadas em aumento de 200x.

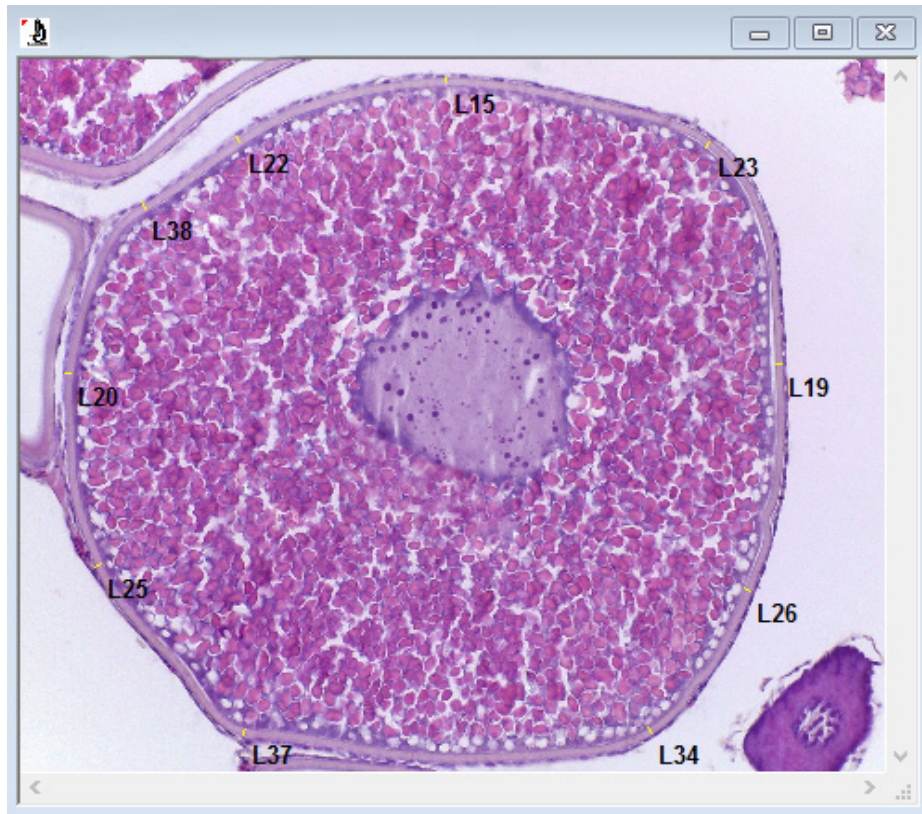


Figura 4. Medida da altura da zona radiata (L15-L38). A partir da média dos valores obtidos, calculou-se a altura.

A profundidade da micrópila e o diâmetro interno e externo dos poros do vestíbulo micropilar foram mensurados a partir de 10 secções transversais por ponto de coleta (Figura 5). A profundidade da micrópila foi tomada a partir da invaginação da zona radiata até o término do poro micropilar interno. O diâmetro do poro micropilar externo e interno foram mensurados a partir do início da invaginação da zona radiata e o término da invaginação, respectivamente. As medidas foram realizadas em aumento de 400x.



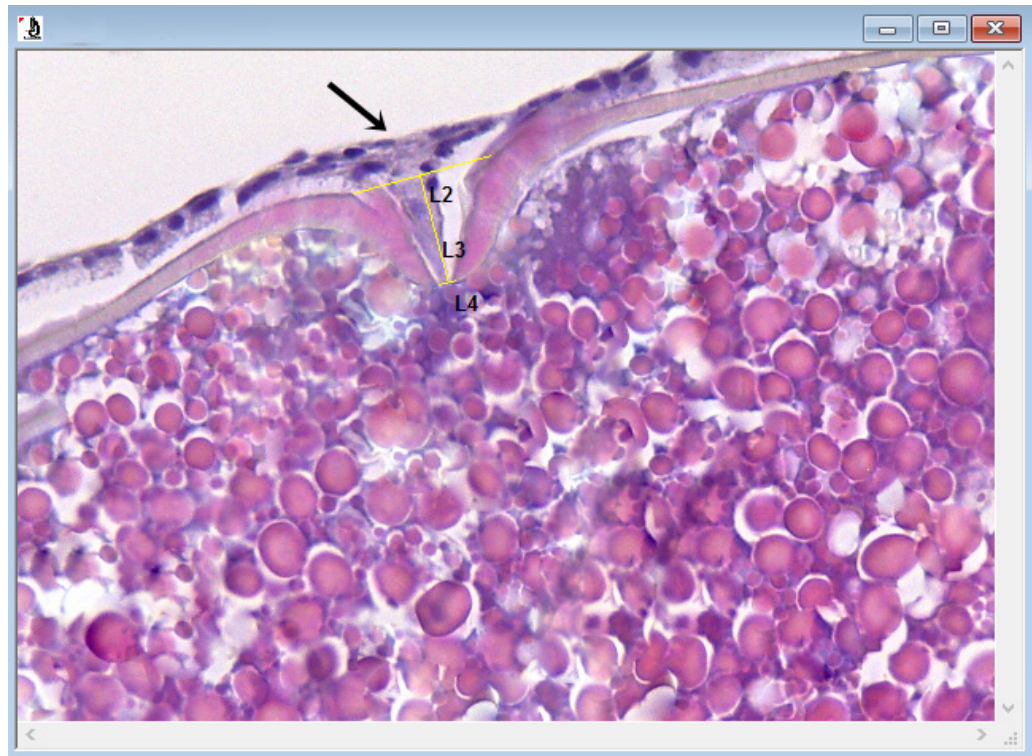


Figura 5. Medida de profundidade da micrópila, diâmetro dos poros interno e externo do vestibulo micropilar. Seta: micrópila.

### 3.6 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

Os oócitos utilizados neste estudo foram obtidos através de técnicas convencionais de dissecação e não a partir de ovulação induzida, comumente utilizada para estudos de reprodução. Dessa forma, só foi possível obter a superfície micropilar dos oócitos em evidência, livre de células foliculares, através de técnicas de criofatura, onde houve a exposição dos oócitos ao congelamento, por meio do nitrogênio líquido, retirando assim, os resquícios de células foliculares presentes nos oócitos quando coletados antes da ovulação. Desse modo, a região micropilar tornou-se evidente, bem como a superfície dos oócitos que se apresentou livre de células foliculares. As análises em MEV foram realizadas a partir de oócitos com o mesmo tamanho padrão, a fim de garantir que as análises comparativas fossem realizadas em oócitos que se encontrassem em um mesmo estágio de desenvolvimento.

As amostras destinadas a criofatura foram lavadas em tampão cacodilato de sódio (0,1M, pH 7,2), pós-fixadas em solução aquosa de tetróxido de ósmio 1% por 1h, no escuro, e lavados em tampão cacodilato de sódio (0,1M, pH 7,2). Ao volume inicial das amostras, em um intervalo de 5 minutos foram adicionadas gotas de glicerol 30% em tampão cacodilato de sódio 0,1M, de forma que ao final de 30 min a solução tenha dobrado de volume, atingindo uma solução final de glicerol 15%. A solução foi substituída por glicerol 30% por 3h. Em seguida, os fragmentos foram congelados em nitrogênio líquido e fraturados com o auxílio de estilete. Posteriormente, o material foi desidratado em série crescente de etanol, seco ao ponto crítico, montado em suportes de alumínio e coberto com ouro no *sputter coater*,



sendo observado e fotodocumentado no microscópio de varredura (Jeol - JMS 6610 VL). Os procedimentos para MEV foram realizados no Laboratório de Ultraestrutura Celular Carlos Alberto Redins - CCS, UFES.

### **3.7 Análises estatísticas**

Os dados morfométricos foram analisados utilizando o teste Shapiro-Wilk (BioEstat 5.0) para avaliar a normalidade. Os dados que apresentaram distribuição normal foram testados a partir da ANOVA seguido do teste de Tukey (Past 3.08). O teste Kruskal-Wallis foi aplicado aos dados que não seguiram uma distribuição normal. Foram considerados significativos valores com  $p < 0,05$ . Os resultados foram apresentados como média e desvio padrão da média.

## RESULTADOS

Foram capturados 65 exemplares da espécie em estudo provenientes das quatro bacias amostradas, sendo vinte indivíduos da bacia do rio São Mateus (ponto 1: onze e ponto 2: nove), dezenove indivíduos da bacia do rio Barra Seca, treze indivíduos da bacia do rio Mucuri e treze da bacia do rio Itaúnas (ponto 1: quatro e ponto 2: nove). Os exemplares coletados das seis populações apresentaram comprimento padrão médio entre 28,93 e 64,77 mm e peso corporal entre 0,62 e 6,44 g (Tabela 2).

	Mucuri	Itaúnas 1	Itaúnas 2	S.M. 1	S.M. 2	Barra Seca
<b>CP (mm)</b>	64,77±4,04	33,26±5,77	36,51±6,07	56,69±2,06	50,50±5,62	28,93±3,62
<b>PC (g)</b>	6,44±1,45	0,91±0,45	1,27±0,52	4,89±0,49	3,20±1,32	0,62±0,17

Tabela 2. Dados biométricos de populações de *A. cf. intermedius*, provenientes de quatro drenagens, distribuídas em 6 pontos de coleta.

Valores são média ± desvio-padrão. CP - comprimento padrão; PC - peso corporal, S.M - São Mateus.

O aparelho reprodutor dos representantes das populações em estudo apresentou órgãos pares, alongados e fusiformes, com as extremidades anterior e posterior formando o oviduto, que se comunicam com o poro urogenital. Os ovários das fêmeas de *A. cf. intermedius* são classificados como cistovariano, pelo fato de apresentarem oviduto contínuo, através do qual os oócitos são lançados ao meio externo.

O folículo vitelogênico dos indivíduos das seis populações em estudo apresentaram glóbulos de vitelo acidófilos, ocupando a maior parte do citoplasma, alvéolos corticais visíveis e de tamanhos variados, na região periférica dos oócitos (citoplasma cortical), núcleo central ou ligeiramente excêntrico com nucléolos evidentes, zona radiata acidófila com camadas interna e externa distintas e células foliculares pavimentosas (Figura 6). A micrópila apresentou vestíbulo micropilar, formado por uma invaginação da zona radiata no qual se aloja o corpo da célula micropilar durante a maturação ovocitária, além disso, foi possível visualizar o canal micropilar que contém o prolongamento dessa célula que perpassa a zona radiata (Figura 6E).

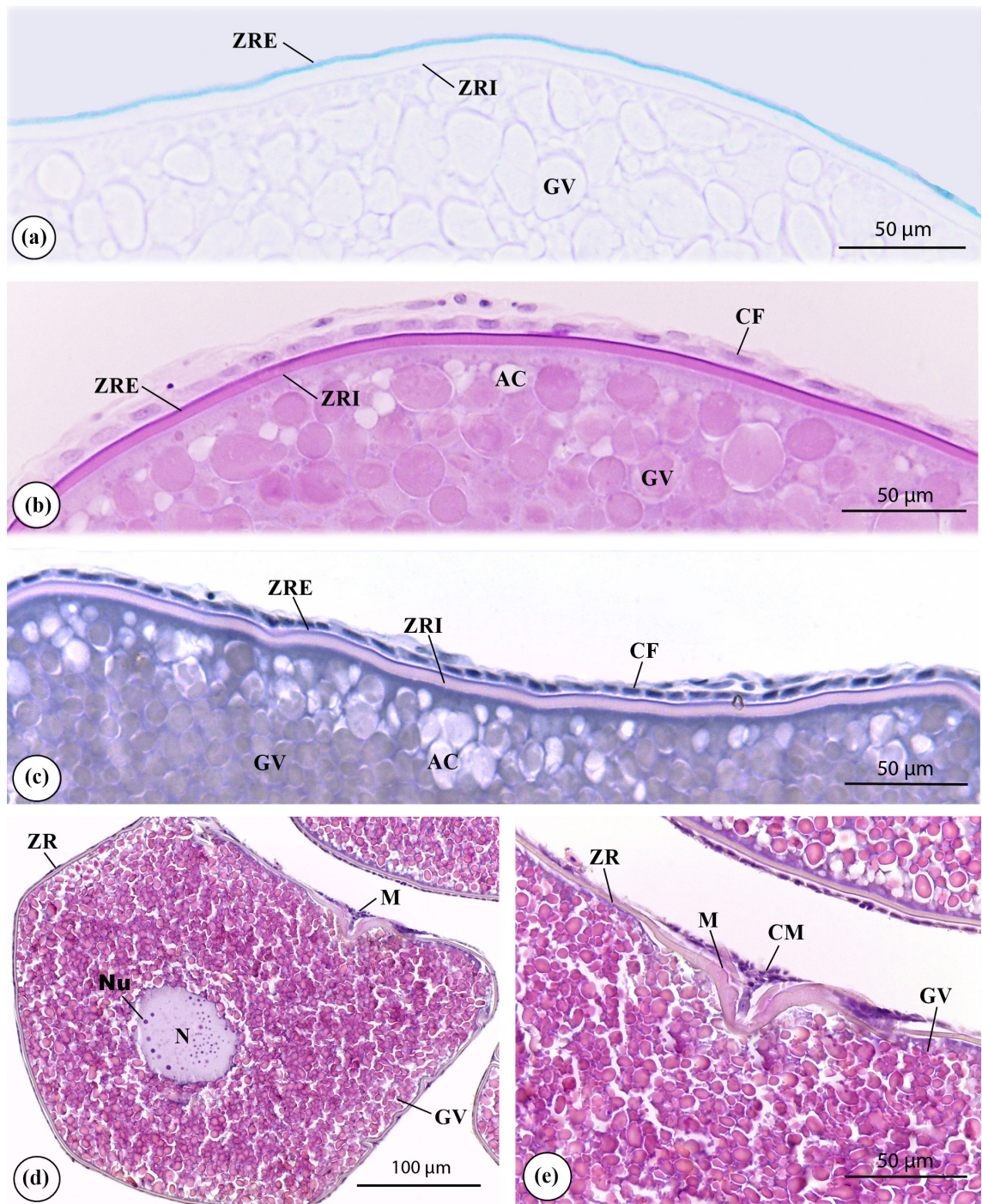


Figura 6. Secções histológicas dos oócitos de populações *A. cf. intermedius* coradas com Alcian Blue (a), PAS (b), Alcian Blue+PAS (c) e HE (d, e). ZR – zona radiata; ZRE- zona radiata externa; ZRI - zona radiata interna; GV - glóbulos de vitelo; AC - alvéolos corticais; CF - células foliculares; M - micrópila; CM; célula micropilar; N - núcleo, Nu- nucléolo.

Através da histoquímica para carboidratos (Tabela 4) (Figura 6A-C) foi possível visualizar nos oócitos dos indivíduos das seis populações a presença de duas camadas que constituem a zona radiata: zona radiata interna (ZRI), mais espessa e zona radiata externa (ZRE), mais delgada. A ZRE apresentou reação fortemente positiva nas técnicas de PAS, AB pH 2,5 e AB pH 2,5+PAS, indicando a presença de glicoproteínas neutras e ácidas carboxiladas (Figura 6A-C). A técnica combinada AB+PAS, identifica glicoproteína ácida carboxilada e glicoproteína neutra, sendo que a cor em evidência é dependente da glicoproteína dominante. Os

oócitos de *A. cf. intermedius* apresentaram predominância de glicoproteínas ácidas carboxiladas, devido à cor azul em evidência (Figura 6C). Reações positivas nas técnicas de histoquímica PAS e AB pH 2,5 +PAS e AB negativa se fizeram presentes na ZRI e nos glóbulos de vitelo, indicando a presença de glicoproteínas neutras. Os alvéolos corticais apresentaram reação positiva fraca nas técnicas de PAS e AB pH 2,5+PAS, apresentando alvéolos corticais corados e outros não foram corados, indicando a presença de glicoproteínas neutras. As células foliculares, por outro lado, apresentaram reação positiva às técnicas de PAS e AB pH 2,5 +PAS e reação negativa à técnica de AB pH 2,5, indicando a presença de glicoproteínas neutras (Figura 6A-C). Não foram observadas diferenças histoquímicas entre as diferentes populações em estudo.

	PAS	AB 2,5	PAS + AB 2,5
<b>Células foliculares</b>	+	-	+
<b>Zona radiata interna</b>	+	-	+
<b>Zona radiata externa</b>	+	+	+
<b>Alvéolos corticais</b>	+	-	+
<b>Glóbulos de vitelo</b>	+	-	+

Tabela 4. Reatividade das estruturas ovocitárias à histoquímica de carboidratos em populações de *A. cf. intermedius*. +: reação positiva; -: reação negativa. PAS: Ácido Periódico de Shiff; AB pH 2,5: Alcian Blue em pH 2,5; PAS+AB 2,5: Alcian Blue pH 2,5 combinado com Ácido Periódico de Shiff.

Os diâmetros dos oócitos das populações de *A. cf. intermedius* não apresentaram diferenças significativas nas diferentes populações em estudo. A altura da zona radiata variou de 2,88 a 6,44  $\mu\text{m}$ , sendo significativamente mais espessa na população do rio Mucuri quando comparada às outras populações em estudo. A profundidade da micrópila e os diâmetros externo e interno dos poros da região micropilar não apresentaram diferenças significativas quando comparados estatisticamente (Tabela 3). No entanto, os valores absolutos variam muito entre oócitos de uma mesma população e até de um mesmo indivíduo. Além disso, as micrografias de microscopia eletrônica apresentam variações no número de raios, e ainda, sugerem diferenças na estrutura micropilar, relacionadas à profundidade da micrópila, os diâmetros interno e externo dos poros da região micropilar de indivíduos de uma mesma população ou até em diferentes oócitos de um mesmo indivíduo (Figura 8B-H). Porém, não foi possível comparar estatisticamente os dados da região micropilar entre indivíduos de uma mesma população devido ao número amostral ser reduzido para tal análise.



	Mucuri	Itaúnas 1	Itaúnas 2	S.M. 1	S.M. 2	Barra Seca
<b>DOV</b>	406,60±12,5	426,45±28,62	407,17±7,79	362,42±23,96	361,21±34,52	419,85±38,96
<b>AZR</b>	<b>6,44±0,51<sup>a</sup></b>	<b>3,47±0,47<sup>b</sup></b>	<b>3,27±0,23<sup>b</sup></b>	<b>3,61±0,30<sup>b</sup></b>	<b>3,58±0,40<sup>b</sup></b>	<b>2,88±0,43<sup>b</sup></b>
<b>PMI</b>	26,85±15,62	35,56±15,88	36,89±8,43	30,69±12,55	28,44±6,69	34,46±13,68
<b>DE</b>	23,78±10,13	29,95±12,46	30,15±11,18	23,07±4,58	24,42±6,79	25,43±5,49
<b>DI</b>	5,39±2,31	6,53±2,44	6,49±1,87	5,20±1,95	6,69±1,98	4,36±1,54

Tabela 3. Morfometria de oócitos e da região micropilar de *A. cf. intermedius*.

Valores expressos em micrometros ( $\mu\text{m}$ ) são média  $\pm$  desvio-padrão. Letras diferentes na mesma linha  $p < 0,05$  segundo Teste Kruskal-Wallis. DOV - diâmetro do oócito; AZR - Altura da zona radiata; PMI - profundidade da micrópila; DE - diâmetro do poro externo micropilar; DI - diâmetro do poro interno micropilar.

Os oócitos analisados em MEV (Figura 7) apresentaram padrões de superfície da região micropilar altamente variável entre as populações, entre indivíduos de uma mesma população e, ainda, em um mesmo indivíduo. Uma única micrópila foi observada em cada oócito, situada no polo animal. A micrópila caracteriza-se por apresentar uma depressão na zona radiata, formando um canal micropilar e um vestíbulo (invaginação), com raios radialmente dispostos, sendo intercalados por sulcos (depressões), dispostos em torno da região micropilar. O número de raios encontrados no vestíbulo micropilar foi altamente variável, sendo observados oócitos com 9, 10, 11, 12, 14, 15 e 17 raios (Figura 7B-H). Tal variação se faz presente em todas as populações em estudo. Além disso, a espessura dos raios e, conseqüentemente, a espessura dos sulcos foi variável, sendo possível observar raios mais delgados e sulcos mais espessos e vice-versa. Entretanto, a variação no número de raios não apresenta relação com a espessura dos mesmos. Essas variações perpassam todos os pontos em estudo, não sendo características específicas de cada população.

Os dados morfométricos não apresentaram diferenças estatísticas significativas em relação à profundidade da micrópila, diâmetros dos poros internos e externos da região micropilar, sendo que as micrografias obtidas a partir de MEV sugerem que existe variação entre os oócitos de uma mesma população (Figura 8C-E).

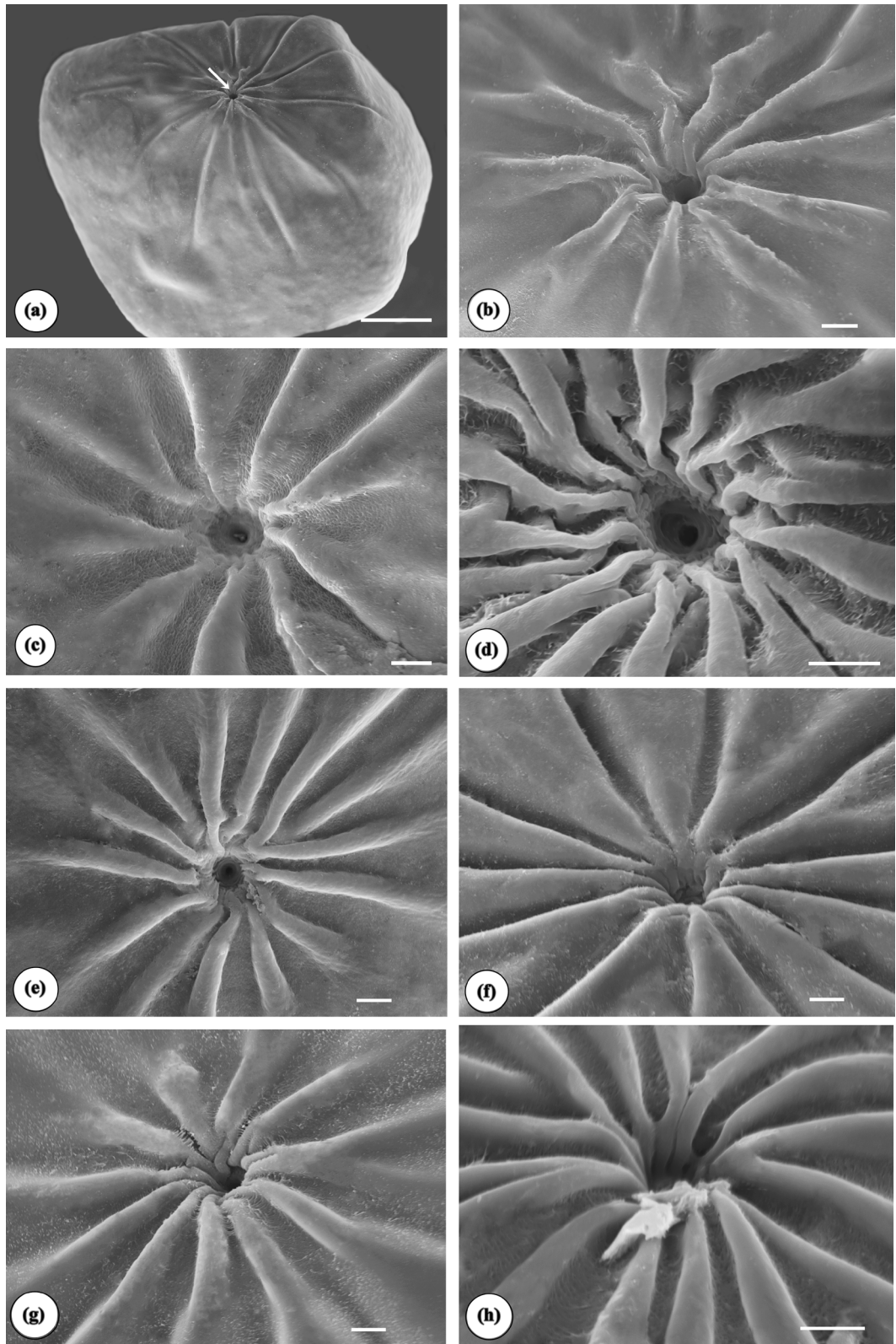


Figura 7. Microscopia eletrônica de varredura com padrão de variação da região micropilar em oócitos de populações de *A. cf. intermedius*. Vista do polo animal, onde se localiza a micrópila (A). Micrópila com 10 raios radiais (b); 9 raios (c); 17 raios (d); 14 raios (e); 12 raios (f); 11 raios (g); 15 raios (h). Região micropilar com raios mais espessos (C e F) e raios mais delgados (b, d, e, g, h). Seta - micrópila. Barra = 100 $\mu$ m (a), 10 $\mu$ m (b, c, d, e, f, g, h).

Abaixo da zona radiata está situada a membrana plasmática, constituída por microvilosidades que formam uma densa cobertura em sua superfície (Figura 8A e 8C). Foram observados dois padrões de microvilosidades em populações de *A. cf. intermedius*. Filamentos finos, longos e individualizados (Figura 8B) e, ainda,



filamentos espessos, sobrepostos, dispostos em forma de “malha” (Figura 8D). Não houve diferença entre as populações amostradas, sendo observado os dois padrões em todas as populações, e ainda, em diferentes oócitos de um mesmo indivíduo.

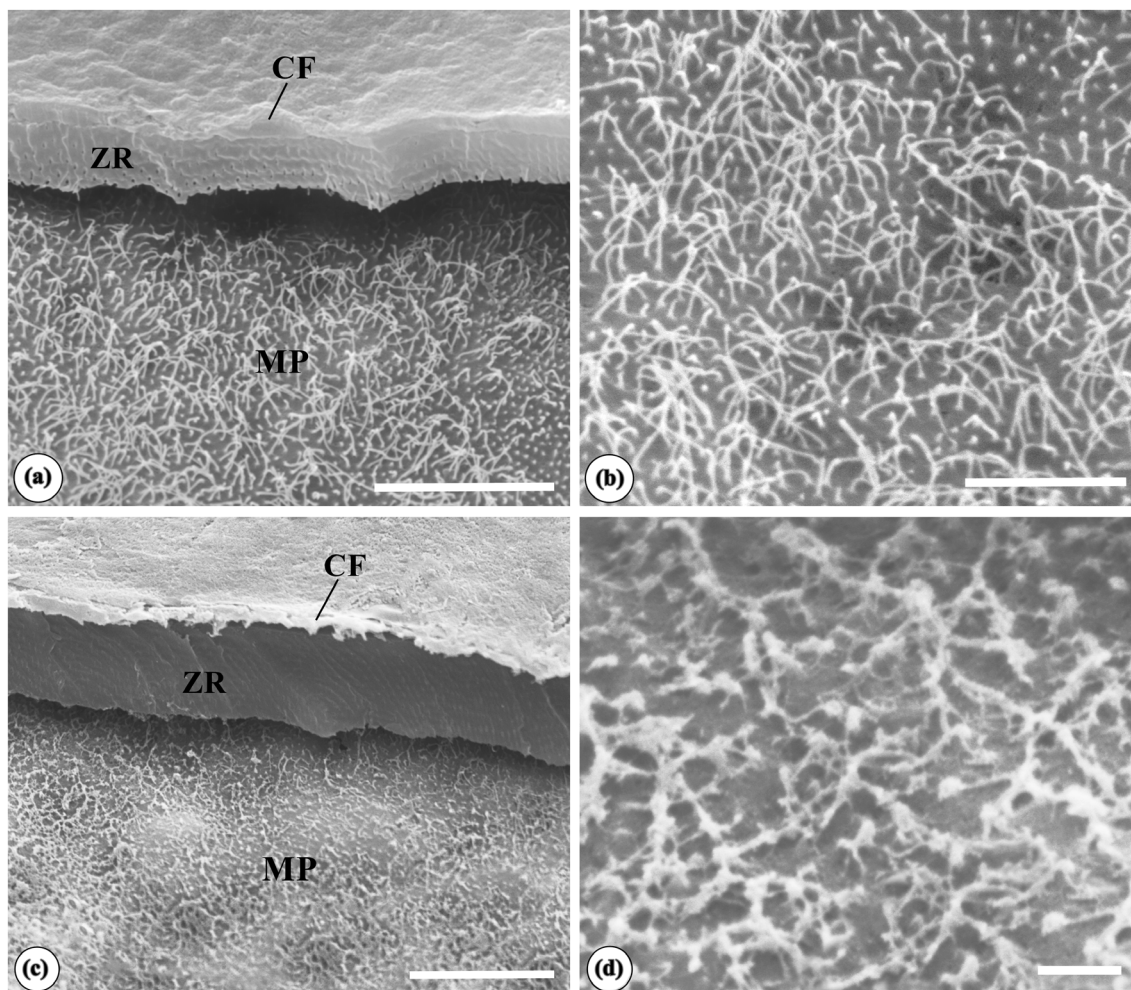


Figura 8. Microscopia eletrônica de varredura de oócitos de populações *A. cf. intermedius*. Zona radiata fraturada, no polo vegetal, evidenciando dois padrões de superfície da membrana plasmática. Filamentos finos, longos e individualizados (a, b), filamentos espessos, sobrepostos, dispostos em forma de “malha” (c, d). ZR - zona radiata; CF - células foliculares; MP- membrana plasmática. Barra = 10 $\mu$ m (a, c), 5 $\mu$ m (b) e 1 $\mu$ m (d).

A superfície dos oócitos das populações *A. cf. intermedius* em estudo, apresentaram uma rede fibrilar recobrendo os poros-canais da zona radiata no polo vegetativo e, dessa forma, não foi possível quantificar a distância entre os poros/canais, bem como, o número de poros por  $\mu\text{m}^2$ . A rede fibrilar dos oócitos de *A. cf. intermedius* foi caracterizada por uma rede delicada de fibrilas concentradas no polo vegetativo (Figura 9A e 9C), tornando-se progressivamente imperceptível próximo à micrópila (Figura 9B). A camada interna da zona radiata apresenta poros/canais na superfície voltada para os glóbulos de vitelo, sendo uma extensão dos poros encontrados na superfície externa da zona radiata. O padrão de superfície encontrado em oócitos das populações estudadas de *A. cf. intermedius* é típico de ovos não adesivos, o que sugere que os oócitos sejam livres ou pouco adesivos.

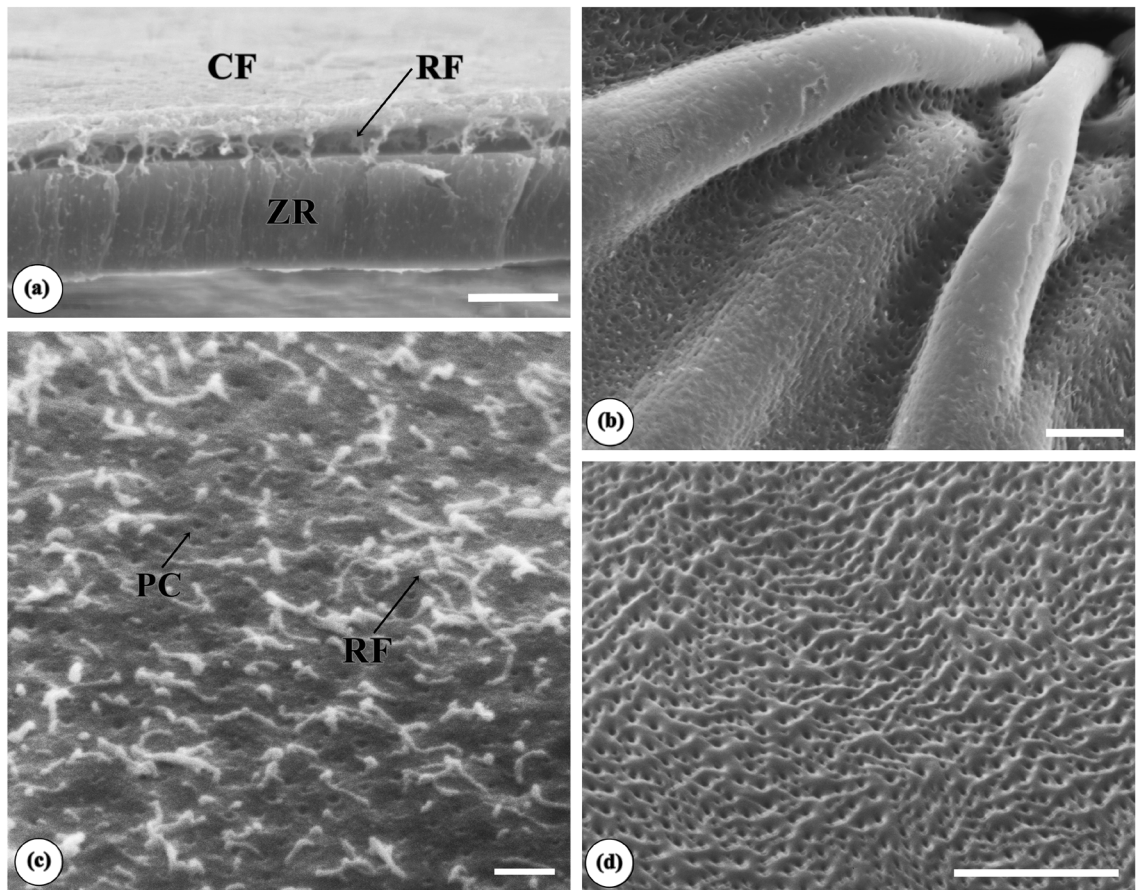


Figura 9. Padrão de superfície de oócitos de populações de *A. cf. intermedius*. Fratura da zona radiata com rede fibrilar e células foliculares (CF) recobrando a zona radiata (ZR) no polo vegetativo (a). Polo animal com poros/canais livres de rede fibrilar (b) Rede fibrilar no polo vegetativo (c). Superfície interna da zona radiata com poros/canais distribuídos de forma uniforme (d). ZR - zona radiata; CF - células foliculares; RF - rede fibrilar; PC - poros-canais. Barra = 5 $\mu$ m (a, b, d) e 1 $\mu$ m (c).

O presente estudo fornece pela primeira vez a descrição e uma análise comparativa dos oócitos de populações de *A. cf. intermedius*, utilizando análises em microscopia de luz (morfometria e histoquímica) e em microscopia eletrônica de varredura (MEV), incluindo a técnica de criofratura. Além disso, os oócitos das populações em estudo foram obtidos por dissecação de gônadas, metodologia essa não convencional para esse tipo de abordagem. Contudo, foi possível obter resultados satisfatórios para análises de MEV, através de uma técnica inédita desenvolvida neste estudo, onde, usando o processamento tradicional para a técnica de criofratura, foi possível expor a superfície ovocitária livre de células foliculares.

Apesar de estudos disponíveis na literatura descreverem a estrutura e ultraestrutura de oócitos em Characiformes (RIZZO et al., 2002; RIZZO & GODINHO, 2003; GANECO & NAKAGHI, 2003; MELO et al., 2016), trabalhos relacionados ao gênero *Astyanax* são escassos e estudos com a espécie *A. intermedius* não são relatados na literatura. Portanto, este estudo fornece dados inéditos sobre morfologia e ultraestrutura de gametas femininos de *A. cf. intermedius*, através de uma abordagem comparativa entre diferentes populações, ampliando as informações sobre os oócitos em Characiformes, além de fornecer subsídios para estudos filogenéticos e conservacionistas.

A morfologia macroscópica dos ovários das populações de *A. cf. intermedius* segue o padrão descrito para a maioria dos Characiformes (BAZZOLI, 2003). O ovário é do tipo cistovariano com a extremidade anterior e posterior formando o oviduto, que se comunica com o poro urogenital, como na maioria dos peixes teleósteos (SELMAN & WALLACE, 1986; REDDING & PATIÑO, 1993).

Os oócitos vitelogênicos das seis populações de *A. cf. intermedius* não apresentaram diferenças em relação à morfologia e composição das células foliculares, zona radiata interna e externa, alvéolos corticais e glóbulos de vitelo.

Embora o presente estudo esteja comparando a composição histoquímica em diferentes populações, que apresentam variações morfológicas corporais e, possivelmente, compreendem novas espécies (INGENITO, L.F.S, *comunicação pessoal*), não foram encontradas diferenças entre as populações em relação à composição histoquímica do gameta feminino. Estudos disponíveis na literatura, os quais avaliaram a composição de estruturas ovocitárias em diversas espécies,



detectaram padrões espécie-específicos, principalmente quando comparados à zona radiata externa e aos alvéolos corticais (BAZZOLI & GODINHO, 1994; MOTTA et al., 2005; GOMES et al., 2007; HONORATO-SAMPAIO et al., 2015).

As células foliculares presentes nos oócitos vitelogênicos das populações em estudo apresentaram glicoproteínas neutras, o que também foi verificado para outros caraciformes (BAZZOLI, 1992; BRITO & BAZZOLI, 2009; HONORATO-SAMPAIO et al., 2015). As células foliculares produzem proteínas que podem ser utilizadas no crescimento da camada folicular, maturação ovocitária e, ainda, na formação da zona radiata (GURAYA, 1986).

A zona radiata, presente nos oócitos de peixes, assim como outros vertebrados, possui papel fundamental no fornecimento de oxigênio aos oócitos, na proteção de ovos recém desovados e, em alguns casos, na adesão dos ovos ao substrato (RIEHL, 1996; SANTOS et al., 2006). Assim como a maioria dos teleósteos (GURAYA, 1996), a zona radiata das populações de *A. cf. intermedius* aqui estudadas é formada por duas camadas distintas.

Glicoproteínas ácidas são comumente encontradas na superfície de ovos adesivos, como em *Serrasalmus brandtii* (RIZZO & BAZZOLI, 1991), em *Romanichthys valsanicola* (RIEHL & PATZNER, 1998) e *Paracheirodon axelrodi* (BRITO & BAZZOLI, 2009). Embora tenha sido observada a presença de glicoproteínas neutras e ácidas na zona radiata externa, os ovos das populações em estudo não possuem indicativo para ovos adesivos, conforme observações realizadas em MEV. HONORATO-SAMPAIO et al. (2015), ao analisar a constituição química de oócitos não adesivos, também detectou glicoproteínas ácidas compondo a camada externa da zona radiata, no entanto, a presença de glicoproteínas ácidas em ovos não adesivos não é esclarecida.

A zona radiata foi significativamente mais espessa na população do rio Mucuri, quando comparada às outras populações em estudo. Segundo RIEHL (1996) e SANTOS et al. (2006) a espessura da zona radiata pode estar relacionada à adaptação a diferentes habitats e ao local de desova. Porém, os ambientes observados na bacia no rio São Mateus, em especial na Cachoeira do Inferno (SM1), são similares àquele presente no rio Mucuri e, ainda assim, a espessura da zona radiata foi estatisticamente diferente entre essas populações. LEONARDO F. S. INGENITO (*comunicação pessoal*) observou variações morfológicas corporais nas populações provenientes de drenagens costeiras no norte do Espírito Santo e no rio Mucuri, que, possivelmente, compreendem espécies distintas ainda não descritas. Dessa forma, a diferença observada na espessura da zona radiata na população do rio Mucuri pode ser um indicativo de que as populações *Astyanax cf. intermedius* provenientes das drenagens da área de estudo representem uma espécie distinta. Esta hipótese é corroborada pela constatação de AMANZE & IYVENGAR (1990), que inferiu que a espessura na zona radiata varia nos diferentes grupos de peixes.

Os alvéolos corticais são sintetizados no retículo endoplasmático e no

complexo de Golgi (TYLER & SUMPTER, 1996). Segundo PATIÑO & SULLIVAN (2002), o seu conteúdo apresenta grande quantidade de glicoproteínas sintetizadas dentro do próprio oócito. Além disso, a sua composição química pode variar dependendo da espécie (BAZZOLI & GODINHO, 1994). Os alvéolos corticais dos oócitos de teleósteos são análogos aos grânulos corticais de mamíferos, sendo que o seu conteúdo é liberado no espaço perivitelínico durante a reação cortical, prevenindo a polispermia e protegendo o embrião de agressões físicas, pelo endurecimento da zona radiata (YAMAMOTO, 1961; GRIER et al., 2009). As populações de *A. cf. intermedius* aqui estudadas apresentaram alvéolos corticais na periferia do oócito, como também observado por BAZZOLI & GODINHO (1994) em extenso trabalho com teleósteos neotropicais de água doce, incluindo outras espécies do gênero *Astyanax*. Foram detectadas glicoproteínas neutras nos alvéolos corticais das diferentes populações em estudo, sugerindo que elas possam ter a mesma estratégia para prevenir a polispermia (VERMA & THAKUR, 1988; BAZZOLI & GODINHO, 1994).

O vitelo é definido como o material nutritivo de armazenamento do oócito, que após a fecundação, permite ao embrião o desenvolvimento na ausência de uma fonte externa de alimentação (GRIER et al., 2009). Os glóbulos de vitelo nas populações em estudo são constituídos por glicoproteínas neutras, coincidindo com as observações de BAZZOLI (1992). O diâmetro dos oócitos vitelogênicos pode variar entre famílias e populações da mesma espécie, devido às variações na expressão gênica (PATIÑO & SULLIVAN, 2002). Não foram observadas diferenças significativas no diâmetro dos oócitos entre as populações aqui estudadas. Os oócitos de *A. cf. intermedius* são considerados pequenos, de acordo com a classificação de RIZZO & GODINHO (2003), com diâmetro variando de 361,21 a 426,45  $\mu\text{m}$ . Os valores encontrados aqui para o diâmetro dos oócitos em vitelogênese completa são semelhantes àqueles encontrados por MARCON (2008) para *Astyanax bimaculatus* (possivelmente *Astyanax lacustris*), que possui ovos pouco adesivos (RIZZO & GODINHO, 2003).

Em oócitos das populações de *A. cf. intermedius*, analisados em MEV, a zona radiata apresentou raios que circundam a micrópila, sendo intercalados por sulcos (depressões), dispostos radialmente em torno da região micropilar. RIZZO & GODINHO (2003) observaram resultados semelhantes para ovos de *Astyanax lacustris*. Além disso, esse padrão micropilar também foi descrito para outros caracídeos (RIZZO, 2001). Segundo AMANZE & IYENGAR (1990) e YANAGIMACHI et al. (2017), a presença de sulcos em torno da região micropilar pode orientar os espermatozoides em direção ao canal micropilar, a fim de facilitar a fertilização.

A profundidade da micrópila e os diâmetros externo e interno dos poros da região micropilar não apresentaram diferenças significativas entre as populações estudadas, quando comparados estatisticamente. Porém, os valores absolutos são altamente variáveis entre oócitos de uma mesma população e até de um mesmo indivíduo, sugerindo variabilidade dentro de uma mesma população. Além disso,

os oócitos analisados neste estudo apresentaram variação no número de raios encontrados em torno do vestíbulo micropilar entre as populações, entre indivíduos de uma mesma população e ainda em um mesmo indivíduo. A espessura dos raios e, conseqüentemente, a espessura dos sulcos foi variável, sendo possível observar raios mais delgados, sulcos mais espessos e vice-versa.

A variabilidade observada na região micropilar pode ser justificada pela plasticidade fenotípica ou mesmo a alguma distinção taxonômica, expresso por essas populações. De acordo com FUTUYMA (1998) a plasticidade fenotípica é a capacidade de um organismo apresentar variações fenotípicas dependendo do ambiente. Partindo do pressuposto que as populações amostradas possam estar isoladas geograficamente, pelo menos entre as diferentes bacias, elas podem estar sofrendo um processo de adaptação, justificando, assim, a variabilidade encontrada em indivíduos de uma mesma população. Além disso, INGENITO & DUBOC (2014), observaram um acentuado polimorfismo em caracteres morfológicos relacionados ao número de dentes presente na pré-maxila em *Astyanax erermus* Ingenito & Duboc, 2014, que se manteve isolada, corroborando a plasticidade fenotípica mesmo em caracteres considerados tradicionalmente conservativos para o gênero.

A ultraestrutura superficial dos oócitos tem sido utilizada como um caráter filogenético para a identificação de espécies em grupos de peixes (RIEHL & SCHULTE, 1978). O poro micropilar interno permite a passagem do espermatozoide até o citoplasma, sendo o mecanismo inicial para prevenir a hibridação interespecífica (GARY et al., 1982; CHEN et al., 1999), visto que o diâmetro da abertura do poro coincide com o tamanho da cabeça do espermatozoide (GRIER et al., 2009), sendo considerado espécie-específico (RIEHL, 1980).

Segundo RIZZO & GODINHO (2003), os padrões de superfície encontrados nos oócitos de Characiformes têm relação com o grau de adesividade e com os grupos sistemáticos. Foram descritos dois padrões de superfície em oócitos livres: zona radiata lisa com poros-canais simples e rede fibrilar recobrendo a zona radiata (RIZZO & GODINHO, 2003). As populações de *A. cf. intermedius* apresentaram uma camada de fibrilas que constituem a rede fibrilar a qual recobre os poros-canais da zona radiata no polo vegetativo, tornando-se progressivamente imperceptível próximo à micrópila. RIZZO & BAZZOLI (1993) encontram resultados semelhantes para a superfície ovocitária em peixes do gênero *Prochilodus*. Segundo KUCHNOW & SCOTT (1977), as fibrilas visualizadas em *Fundulus heteroclitus* funcionam como um dispositivo de ancoragem para restringir o número de espermatozoides que terão acesso à região micropilar e, dessa forma, podem auxiliar na prevenção à polispermia. Além disso, a ausência de fibrilas na região próxima à micrópila indica uma possível adaptação, a qual facilita o momento da fertilização.

Os poros-canais presentes na zona radiata permitem trocas de gases e nutrientes do ovo com o meio, sendo ocupados por microvilosidades da membrana ovocitária e/ou prolongamentos das células foliculares (RIZZO et al., 2002; RIZZO

& GODINHO, 2003). As microvilosidades observadas na membrana plasmática dos oócitos de populações de *A. cf. intermedius* apresentaram dois padrões distintos de distribuição em oócitos de um mesmo indivíduo. Foi possível visualizar filamentos finos, longos e individualizados e, ainda, filamentos espessos, sobrepostos e dispostos em forma de “malha”. Microvilosidades presentes na membrana ovocitária foram observadas em oócitos vitelogênicos de outras espécies, como *Pimelodus maculatus* (OLIVEIRA-JUNIOR, 2002) *Prochilodus argenteus* e *Salminus brasiliensis* (RIZZO & GODINHO, 2003), atravessando os poros canais da zona radiata. Porém, os trabalhos disponíveis na literatura detectaram a presença de microvilosidades através de microscopia eletrônica de transmissão e, dessa forma, não é possível observar o padrão de distribuição das microvilosidades presentes na membrana plasmática como realizados no presente estudo.



# CONSIDERAÇÕES FINAIS

O presente estudo fornece pela primeira vez a descrição dos oócitos de *A. cf. intermedius*, utilizando análises em microscopia de luz e MEV. Os oócitos foram obtidos por meio de metodologia não convencional para esse tipo de abordagem, no entanto, a técnica utilizada neste estudo pode ser considerada inédita para obter oócitos livres de células foliculares.

Os oócitos vitelogênicos das seis populações de *A. cf. intermedius* não apresentam diferenças em relação à morfologia e composição histoquímica presente nas células foliculares, zona radiata interna e externa, alvéolos corticais e glóbulos de vitelo.

As análises morfométricas não apresentaram diferenças significativas entre as diferentes populações, exceto a altura da zona radiata que foi significativamente mais espessa na população do rio Mucuri, indicando uma possível espécie distinta ainda não descrita.

Os oócitos analisados em MEV apresentaram a superfície da região micropilar altamente variável, além de padrões distintos de microvilosidades presentes na membrana plasmática das populações em estudo, dos indivíduos de uma mesma população e, ainda, em um mesmo indivíduo.

Embora o significado funcional para essas variações não ter sido completamente esclarecido, ambos podem estar relacionados à plasticidade fenotípica ou mesmo a alguma distinção taxonômica, já que aparentemente a espécie não está claramente determinada. No entanto, estudos moleculares, citogenéticos e morfológicos se fazem necessários, a fim de contribuir com a elucidação de parentesco entre as populações de *A. cf. intermedius*.

## REFERÊNCIAS

- AMANZE, D.; IYVENGAR, A. 1990. **The micropyle: a sperm guidance system in teleost fertilization**. *Development*, v.109, p. 495-500.
- ANA – Agência Nacional de Águas. 2009. **Bacias hidrográficas do Atlântico Sul – trecho leste. Sinopse de informações do Rio de Janeiro, Espírito Santo, Bahia e Sergipe**. In: Sistema Nacional de Informações sobre Recursos Hídricos – CD nº 4. Disponível em: <<http://hidroweb.ana.gov.br/doc/BHASLeste/index.htm>>. Acesso em: 14 de fevereiro de 2017.
- ANDERSON, E. 1967. **The formation of the primary envelop during oocyte differentiation in teleosts**. *Journal of Cell Biology*, v. 35, n. 1, p. 193-212.
- BAICERE-SILVA, C. M.; FERREIRA, K. M.; MALABARBA, L. R.; BENINE, R. C.; QUAGIO-GRASSIOTTO, I. 2011. **Spermatic characteristics and sperm evolution on the subfamily Stevardiinae (Ostariophysi: Characiformes: Characidae)**. *Neotropical Ichthyology*, v. 9, p. 377-392.
- BALDISSEROTTO, B.; CYRINO, J.E.P.; URBINATI, E. C. 2014. **Biologia e Fisiologia de peixes Neotropicais de água doce. Jabotical: FUNEP. 336p.**
- BANCROFT, J.D.; STEVENS, A. 1996. **Theory and Practice of Histological Techniques**. 4<sup>a</sup> ed. Edinburgh: Churchill Livingstone. 766p.
- BAZZOLI, N. **Ovogênese em peixes teleósteos neotropicais de água doce**. 1992. 191 p. Tese (Doutorado em Morfologia) - Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.
- BAZZOLI, N.; GODINHO, H. P. 1994. **Cortical alveoli in oocytes of freshwater Neotropical teleost fish**. *Bolletino di Zoology*, v. 61, p. 301-308.
- BAZOLLI, N. 2003. **Parâmetros reprodutivos de peixes de interesse comercial na região de Pirapora**. In: GODINHO, A. L.; GODINHO, H. P. *Águas, peixes e pescadores do São Francisco das Minas Gerais*. Belo Horizonte: Editora PUC Minas. p. 291-306.
- BELOTE, D. F.; COSTA, W. J. E. M. 2002. **Reproductive behavior patterns in the Neotropical annual fish genus *Simpsonichthys* Carvalho, 1959 (Cyprinodontiformes, Rivulidae): description and phylogenetic implications**. *Boletim do Museu Nacional, Nova Serie, Zoologia*, v. 489 p. 1-10.
- BRITO, M.F.G.; BAZZOLI, N. 2009. **Oogenesis of the cardinal tetra *Paracheirodon axelrodi* Schultz (1956): a histological and histochemical study**. *Brazilian Journal of Morphological Sciences.*, v. 26 p.14-18.
- BRITSKI, H. A.; SATO, Y.; ROSA, A. B. S. 1988. **Manual de identificação de peixes da região de Três Marias (com chaves de identificação para os peixes da Bacia do São Francisco)**. 3<sup>a</sup> ed., CODEVASF, Brasília, 115p.

- BUCKUP, P. A.; MENEZES, N. A.; GHAZZI, M. S. 2007. **Catálogo das espécies de peixes de água doce do Brasil**. Série livros 23, Rio de Janeiro: Museu Nacional. 195p.
- BURNS, J. R.; QUAGIO-GRASSIOTTO, I.; JAMIESON, B. G. M. 2009. **Ultrastructure of spermatozoa: Ostariophysi**. In: Reproductive Biology and Phylogeny of Fish (Agnatha and Osteichthyes). Science Publishers, Enfield, NH, USA, cap. 11.
- CETEC. 1983. **Diagnóstico Ambiental do Estado de Minas Gerais**. Belo Horizonte: Fundação Centro Tecnológico de Minas Gerais (CETEC). 158p.
- CHEN, K. C.; SHAO, K. T.; YANG, J. S. 1999. **Using micropilar ultrastructure for species identification and phylogenetic inference among four species of Sparidae**. Journal of Fish Biology, v.55, p. 288-300.
- COSWOSCK, M. D. A.; DUBOC, L. F. 2015. **Ecologia trófica de *Astyanax intermedius* (Characiformes: Characidae) na sub-bacia do rio Preto do Sul, bacia do rio São Mateus-ES**. Boletim do Museu de Biologia Mello Leitão, v. 37, n. 2, p. 165-192.
- DESJARDINS, J. K.; FERNALD, R. D. 2009. **Fish sex: why so diverse?** Current Opinion in Neurobiology, v. 19, p. 1-6.
- EIGENMANN, C. H. 1908. **Preliminary descriptions of new genera and species of tetragonopterid characins**. (Zoölogical Results of the Thayer Brazilian expedition). Bulletin of the Museum of Comparative Zoology, v. 52, n. 6, p. 91-106.
- EIGENMANN, C. H. 1921. **The American Characidae**. Memoirs of the Museum of Comparative Zoology, v. 43, n. 3, p. 209-310.
- EIGENMANN, C. H. 1927. **The American Characidae**. Memoirs of the Museum of Comparative Zoology, v. 43, n. 4, p. 311-428.
- ESCHMEYER, W. N.; FONG, J. D. **Catalog of fishes: Species by family/subfamily**. Versão eletrônica. California Academy of Sciences. Available. Disponível em: <<http://research.calacademy.org/research/ichthyology/catalog/SpeciesByFamily.asp>> Acesso em: 14 de fevereiro de 2017. [This version was edited by Bill Eschmeyer].
- ESCHMEYER, W. N.; FRINKE, R.; van der Laan (eds). **Catalog of fishes: genera, species, references. Versão eletrônica. California Academy of Sciences**. Available. Disponível em <<http://researcharchive.calacademy.org/research/ichthyology/catalog/fishcatmain.asp>>. Acesso: 14 de fevereiro de 2017. [This version was edited by Bill Eschmeyer].
- EUCLYDES, H. P. 2005. **Atlas digital das águas de Minas: uma ferramenta para o planejamento e gestão dos recursos hídricos**. Belo Horizonte: Ruralminas/UFV.
- FRANÇA, G.F.; GRIER, H.J.; QUAGIO-GRASSIOTTO, I. 2010. **A new vision of the origin and the oocyte development in the ostariophysi applied to *Gymnotus sylvius* (Teleostei, Gymnotiformes)**. Neotropical Ichthyology, v. 8, n.4 p.787-804.
- FUTUYMA, D.J. 1998. **Evolutionary biology**. Sinauer Associates, Sunderland. 763p.
- GANECO, L. N.; NAKAGHI, L. S. O. 2003. **Morfologia da micrópila e da superfície dos ovócitos de piracanjuba, *Brycon orbignyanus* (Osteichthyes, Characidae), sob microscopia eletrônica de varredura**. Acta Scientiarum, v. 25, n. 1, p. 227-231.
- GARY, N. C.; WALLIS, H.; CLARK, J. R. 1982. **Fine structure of the envelope and micropyles in the eggs of the white sturgeon, *Acipenser trasmontanus* Richardson**. Development Growth &

Differentiation, v. 24, p. 341–352.

GÉRY, J. 1977. **Characoids of the World**. Neptune City: T. F. H. Publications. 672 p.

GOMES, B.V.C.; SCARPELLI, R.S.; ARANTE, F.P.; SATO, Y.; BAZZOLI, N.; RIZZO, E. 2007. **Comparative oocyte morphology and early development in three species of trahiras from the São Francisco River basin, Brazil**. *Journal of Fish Biology*, v. 70, p. 1412–1429.

GRIER, H. J. 2000. **Ovarian germinal epithelium and folliculogenesis in the common snook, *Centropomus undecimalis* (Teleostei: Centropomidae)**. *Journal of Morphol*, v. 243, p. 265–281.

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: 53 Annual Gulf and Caribbean Fisheries Institute. Proceeding Mississippi. p. 539-52.

GRIER, H.J.; URIBE-ARANZÁBAL, M.C.; PATIÑO, R. 2009. **The ovary, folliculogenesis, and oogenesis in teleost**. In: JAMIESON, B.G.M. *Reproductive biology and phylogeny of fishes (Agnathans and Neotelestomi)*. Phylogeny-Reproductive System-Viviparity-Spermatozoa. Enfield: Science Publishers Inc. p.1-61.

GURAYA, S. S. 1986. **The cell and molecular biology of fish oogenesis**. Basel: Sauer, H. W. 223p.

GURAYA, S. S. 1996. **Recent advances in the functional morphology of follicular wall, egg-surface components, and micropyle in the fish ovary**. In: MUNSHI, J. S. D.; DUTTA, H. M (Ed.) *Fish morphology – horizon of new research*, p. 114-144.

GURGEL, H. C. B. 2004. **Estrutura populacional e época de desova de reprodução de *Astyanax fasciatus* (Curvier) (Characidae, Tetragonopterinae) do Rio Ceará Mirim, Poço Branco, Rio Grande do Norte, Brasil**. *Revista Brasileira de Zoologia*, v. 21, p. 131-135.

HART, N.H. 1990. **Fertilization in teleost fishes: mechanisms of sperm-egg interactions**. *International Review of Cytology*, v. 112, p. 1-66.

HONORATO-SAMPAIO, K.; PRADO, P.S.; SATO, Y.; BAZZOLI, N.; RIZZO, E. 2015. **Comparative morphology of the oocyte surface and early development in four Characiformes from the São Francisco River, Brazil**. *Journal of Morphology*, v. 276, p.1258-1272.

ICMBio – Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade. 2017. **Lista de espécies ameaçadas**. Disponível em: <<http://www.icmbio.gov.br/portal/especies-ameacadas-destaque>>. Acesso em: 18 de março de 2017.

INGENITO, L. F. S.; DUBOC, L. F. 2014. **A new species of *Astyanax* (Ostariophysi: Characiformes: Characidae) from the upper Rio Iguaçu basin, southern Brazil**. *Neotropical Ichthyology*, v. 12, p. 281-290.

IWAMATSU, T.; ISHIJIMA, S.; NAKASHIMA, S. 1993. **Movement of spermatozoa and changes in micropyles during fertilization in medaka eggs**. *The Journal of Experimental Zoology*, v. 266, p. 57-64.

JAMIESON, B. G. M. 1991. **Fish Evolution and Systematics: Evidence from Spermatozoa**. Cambridge: Cambridge University Press. 319 p.

JAMIESON, B. G. M. 2009. **Reproductive biology and phylogeny of fish (Agnatha and Osteichthyes)**. Science Publishers, Enfield, NH, USA. 768 p.

KUCHNOW, K. P.; SCOTT J. R. 1977. **Ultrastructure of the chorion and its micropyle apparatus in**

- the mature *Fundulus heterochtus* (Walbaum) ovum. Journal of Fish Biology, v. 10 p. 197-210.
- KUDO, S.; YAZAWA, S. 1997. **Biding of antibiotics to glycoproteins of vitelline and fertilization envelopes of cherry salmon eggs.** Histochemical Journal, v. 29, p. 607-616.
- LAALE, H. W. 1980. **The perivitelline space and egg envelopes of bony fishes: a review.** Copeia, v. 1980, n. 2, p.210–226.
- LEV, R.; SPICER, S.S. 1964. **Specific staining of sulfate groups with alcian blue at low ph.** Journal of Histochemistry and Cytochemistry, v. 12 p. 309.
- LEZAMA, A.Q.; TRIQUES, M.L.; QUEIROZ, F.M. 2011. ***Astyanax intermedius* Eigenmann, 1908 (Actinopterygii: Characiformes: Characidae): Distribution extension in eastern Brazil.** Check List, v.7, n.5, p. 583-584.
- LIMA, F.C.T.; MALABARBA, L.R.; BUCKUP, P.A.; VARI, R.P.; HAROLD, A.; BENINE, R.; OYAKAWA, O.; PAVANELLI, C.S.; MENEZES, N.A.; LUCENA, C.A.S.; MALABARBA, M.C.S.L.; LUCENA, Z.M.S.; REIS, R.E.; LANGEANI, F.; CASATTI, L.; BERTACO, V.A.; MOREIRA, C.; LUCINDA, P.H.F. 2003. **Family Characidae.** In: REIS, R.E.; KULLANDERS, S.O.; FERRARIS, C.J. (Eds). Check List of the Freshwater fishes of South and Central America, p. 104-169.
- MALABARBA, L.R.; REIS, R.E., VARI, R. P., LUCENA, Z. M.; LUCENA, C. A. S. 1998. **Phylogeny and classification of Neotropical fishes.** Porto Alegre: EDIPUCRS. 603p.
- MARCON, L. **Morfologia ovariana do lambari *Astyanax bimaculatus* sob efeito do hormônio de crescimento.** 2008. 77 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa.
- MAZZINI, I.M.; DUBOC, L.F.; INGENITO, L.F.S. 2014. **Checklist preliminar da fauna de peixes Characiformes da bacia do rio São Mateus, Brasil.** In: L.M. SARMENTO-SOARES.; E.J. LIRIO.; R.F. MARTINS-PINHEIRO (orgs.). Anais do III SIMBIOMA, Simpósio Sobre a Biodiversidade da Mata Atlântica: Áreas Protegidas e Biodiversidade. Santa Teresa: Associação de Amigos do Museu de Biologia Mello Leitão. p. 329–337.
- MAZZONI, T.S.; GRIER, H.J.; QUAGIO-GRASSIOTTO, I. 2010. **Germline cysts and the formation of the germinal epithelium during female morphogenesis in *Cyprinus carpio* (Teleostei: Ostariophysi: Cypriniformes).** The Anatomical Record, v. 293 p. 1581-1606.
- MCMANUS, J. F. A. 1946. **Histological demonstration of mucin after periodic acid.** Nature, v. 158, p. 202.
- MEDIA CYBERNETICS, Inc. 2001. **Image-Pro Plus (Image Analysis Software), version 4.5.** Programa e Documentação.
- MELO, F. A. G. 2001. **Revisão taxonômica das espécies do gênero *Astyanax* Baird & Girard, 1854 (Teleostei: Characiformes: Characidae) da região da Serra dos Órgãos.** Arquivos do Museu Nacional, v. 59, n. 1, p. 1-46.
- MELO, F. A. G.; BUCKUP, P. A. 2006. ***Astyanax henseli*, a new name for *Tetragonopterus aeneus* Hensel, 1870 from southern Brazil (Teleostei: Characiformes).** Neotropical Ichthyology, v. 4, p. 45-52.
- MELO, R. M. C.; GOMES, D. D.; MOREIRA, D. P., GOMES, M. R.; BAZZOLI, N.; RIZZO, E. 2016. **Comparative morphology of the reproductive system of seven species of ostariophysan fishes from the upper Das Velhas River, Brazil.** Journal of Morphology, v. 278, p.170-181.
- MENEZES, N. A.; WEITZMAN, S. H.; OYAKAWA, O. T.; LIMA, F. C. T., CASTRO, R. M. C.;

- WEITZMAN, M. J. 2007. **Peixes de água doce da Mata Atlântica. Lista preliminar das espécies e comentários sobre conservação de peixes de água doce neotropicais.** Universidade de São Paulo, São Paulo: Museu de Zoologia/USP, 408p.
- MIRANDE, J. M. 2009. **Weighted parsimony phylogeny of the family Characidae (Teleostei: Characiformes).** Cladistics, v. 25 p. 574-613.
- MIRANDE, J. M. 2010. **Phylogeny of the family Characidae (Teleostei: Characiformes): from characters to taxonomy.** Neotropical Ichthyology, v. 8, p. 385-568.
- MOREIRA-FILHO, O.; BERTOLLO, L. A. C. 1991. ***Astyanax scabripinnis* (Pisces, Characidae): a species complex.** Revista Brasileira de genética, v. 14 p. 331-357.
- MOTTA, C.M.; TAMMARO, S.; SIMONIELLO, P.; PRISCO, M.; RICCHIARI, P.; ANDREUCETTI, P.; FILOSA, S. 2005. **Characterization of cortical alveoli content in several species of Antarctic notothenioids.** Journal of Fish Biology, v. 66 p.442–453.
- NAKATANI, K.; AGOSTINHO, A. A.; BAUMGARTNER, G.; BIALETSKI, A.; SANCHES, P. V.; MAKRAKIS, M. C.; PAVANELLI, C. S. 2001. **Ovos e larvas de peixes de água doce: desenvolvimento e manual de identificação.** Keshiyu Nakatani (org.). Maringá: EDUEM. 378 p.
- NELSON, J.S. 2006. **Fishes of the World.** 4 ed. New York: John Wiley and Sons. 622 p.
- NELSON, J.S.; GRANDE, T.C.; WILSON, M.V.H. 2016. **Fishes of the World.** 5 ed. New York: John Wiley and Sons, 2016. 690 p.
- OLIVEIRA, C.; AVELINO, G.S.; ABE, K.T.; MARIGUELA, T.C.; BENINE, R.C.; ORTI, G.; VARI, R.P.; CORRÊA. CASTRO, R.M. 2011. **Phylogenetic relationships within the speciose family Characidae (Teleostei: Ostariophysi: Characiformes) based on multilocus analysis and extensive ingroup sampling.** BMC Evolutionary Biology, v. 1-25.
- OLIVEIRA-JUNIOR, L. R. **Análise comparativa da reprodução do mandi- Amarelo, *Pimelodus maculatus* Lacèpède, 1803 (Pisces, Pimelodidae), em dois trechos do rio São Francisco, MG.** 2002. 43 p. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular) - Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.
- PATIÑO, R.; SULLIVAN, C.V. 2002. **Ovarian follicle growth, maturation, and ovulation in teleost fish.** Fish Physiology Biochemistry, v. 26, p. 57-70.
- PEPLING, M. E.; DE CUEVAS M.; SPRADLING, A. C. 1999. **Germline cysts: A conserved phase of germ cell development?** Trends Cell Biology, v.9, p.257-262.
- POZZOBON, A.P.B. **Relações filogenéticas e história evolutiva do gênero *astyanax* (Teleostei: Characidae), com base em caracteres moleculares.** 2012. 51 f. Dissertação (mestrado em biologia celular e molecular) - UNESP, Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro.
- QUAGIO-GRASSIOTTO, I.; GRIER, H.J.; MAZZONI, T.S.; NÓBREGA, R.H.; AMORIM, J.P. 2011. **Activity of the ovarian germinal epithelium on the follicle formation and the oocyte development in the freshwater catfish *Pimelodus maculatus* (Teleostei: Ostariophysi: Siluriformes).** Journal Morphology, v.8, p.1290-1306.
- QUAGIO-GRASSIOTTO, I.; WILDNER, D. D.; ISHIBA, R. 2013. **Gametogênese de peixes: aspectos relevantes para o manejo reprodutivo.** Revista Brasileira de Reprodução Animal, v. 37, n. 2, p. 181-191.
- REDDING, J. M.; PATIÑO, R. 1993. **Reproductive Physiology.** In: Evans, D. H. The Physiology of Fishes, CRC Press, Boca Raton. p. 503-534.



- REIS, R.E.; KULLANDER, S.O.; FERRARIS, C. 2003. **Check list of the freshwater fishes of South and Central America (CLOFFSCA)**. Porto Alegre: EDIPUCRS. 742 p.
- RIBEIRO, A.C.; LIMA, F.C.T.; RICCOMINI, C.; MENEZES, N.A. 2006. **Fishes of the Atlantic rainforest of Boraceia: testimonies of the Quaternary fault reactivation within a Neoproterozoic tectonic province in southeastern Brazil**. Ichthyological Exploration of Freshwaters, v.17 p.57-164.
- RIEHL, R. 1980. **Micropyle of some salmonins and coregonins**. Environmental Biology of Fishes, v.5, p. 59–66.
- RIEHL, R. 1993. **Surface morphology and micropyle as a tool for identifying fish egg by scanning electron microscopy**. Microscopy and Analysis, Surrey, p.29-31.
- RIEHL, R. 1996. **The ecological significance of the egg envelope in teleosts with special reference to limnic species**. Limnologia, v. 26, 183–9.
- RIEHL, R.; SCHULTE, E. 1978. **Bestimmungsschlüssel der wichtigsten deutschen Süßwasser-Teleosteer anhand ihrer Eier**. Archiv für Hydrobiologie, v. 83, p. 200–212.
- RIEHL, R.; PATZNER, R. A. 1998. **Minireview: The modes of egg attachment in teleost fishes**. Italian Journal of Zoology, v. 65, p. 415–420.
- RIZZO, E. **Biologia de ovos de peixes neotropicais de água doce: estudos comparativo e experimental, com ênfase na análise da superfície e do aparelho micropilar**. 2001. 102 p. (Doutorado em Morfologia) - Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.
- RIZZO, E.; BAZZOLI, N. 1991. **The zona pellucida of the white piranha *Serrasalmus brandtii* Reinhardt, 1874 (Pisces, Characidae): A cytological and cytochemical study**. Functional and Developmental Morphology, v. 1, n. 4, p. 21-24.
- RIZZO, E.; BAZZOLI, N. 1993. **Oogenesis, oocyte surface and micropylar apparatus of *Prochilodus affinis*, Reinhardt, 1874 (Pisces, Characiformes)**. European Archives of Biology, v. 104, n. 1, p. 1-6.
- RIZZO, E.; GODINHO, H.P. 2003. **Superfície de ovos de peixes Characiformes e Siluriformes**. In: GODINHO, H. P.; GODINHO, A.L. (Eds.). Águas, peixes e pescadores do São Francisco das Minas Gerais. Belo Horizonte: PUC Minas. p. 115-132.
- RIZZO, E.; GODINHO, H. P.; SATO, Y. 2003. **Short-term storage of oocytes from the Neotropical teleost fish *Prochilodus marggravii***. Theriogenology, v. 60, p. 1059-1070.
- RIZZO, E.; MOURA, T. F. C.; SATO, Y.; BAZZOLI, N. 1998. **Oocyte surface in four teleosts fish species post spawning and fertilization**. Brazilian Archives of Biology and Technology, v. 41, n. 1, p. 37-48.
- RIZZO, E.; SATO, Y.; BARRETO, B. P.; GODINHO, H. P. 2002. **Adhesiveness and surface patterns of eggs in Neotropical freshwater teleosts**. Journal of Fish Biology, v. 61, n. 3, p. 615-632.
- SANTANA, J. C. O. **A espermiogênese e a ultraestrutura dos espermatozoides de representantes de alguns gêneros *incertae sedis* em Characidae, anteriormente alocados em Tetragonopteridae (Teleostei: Characiformes) com ênfase em Moenkhausia, e suas implicações filogenéticas**. 2010. 123 f. Dissertação (Mestrado em Biologia Geral e Aplicada) – Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Botucatu.
- SANTOS, J. E.; PADILHA, G. E.; BONCOMPAGNI-JUNIOR, O.; RIZZO.; BAZZOLI, N. 2006. **Ovarian**

- follicle growth in the catfish *Iheringichthys labrosus* (Siluriformes: Pimelodidae). *Tissue and Cell*, v. 38 p. 303–310.
- SARMENTO-SOARES, L.M; MARTINS-PINHEIRO, R.F. 2012. **A fauna de peixes nas bacias do Norte do Espírito Santo, Brasil**. *Sitientibus série Ciências Biológicas*, v. 12, p. 1–25.
- SARMENTO-SOARES, L.M; MARTINS-PINHEIRO, R.F. 2013. **A fauna de peixes na REBIO Córrego Grande e seu entorno direto, Espírito Santo, Brasil**. *Boletim do Museu de Biologia Mello Leitão (N. Ser.)*, v. 31, 25–57.
- SARMENTO-SOARES, L.M.; R.F. MARTINS-PINHEIRO, R.F. 2014. **A fauna de peixes na bacia do rio Barra Seca e na REBIO de Sooretama, Espírito Santo, Brasil**. *Boletim do Museu de Biologia Mello Leitão (N. Ser.)*, v. 35, p. 49–104.
- SCAPIGLIATI, G.; MELONI, S.; MAZZINI, M. 1999. **A monoclonal antibody against chorion proteins of the sea bass *Dicentrarchus labrax* (Linnaeus, 1758): studies of chorion precursors and applicability in immunoassays**. *Biology of Reproduction*, v. 60, p. 783-789.
- SCHAEFER, S.A. 1998. **Conflict and resolution: impact of new taxa on phylogenetic studies of the Neotropical cascudinhos (Siluroidei: Loricariidae)**. In: MALABARBA, L.R.; REIS, R.E.; VARI, R. P.; LUCENA, Z. M.; LUCENA, C. A. S. LUCENA (Eds.). *Phylogeny and classification of Neotropical fishes*. Porto Alegre: EDIPUCRS. p. 375-400.
- SELMAN, K.; WALLACE, R.A. 1889. **Cellular aspects of oocyte growth in teleosts**. *Zoological Science*, v. 6 p. 211-231.
- SELMAN, K.; WALLACE, R.A. 1986. **Gametogenesis in *Fundulus heteroclitus***. *American Zoologist*, v. 26, p. 173-192.
- TYLER, C. R.; SUMPTER, J. P. 1996. **Oocyte growth and development in teleosts**. – *Reviews in Fish Biology and Fisheries*, v. 6, p. 287- 318.
- VARI, R. P. 1998. **Higher level phylogenetic concepts within Characiforms (Ostariophysi), a Historical Review**. In MALABARBA, L. R.; REIS, R. E.; VARI, R. P.; LUCENA, Z. M. S.; LUCENA, C. A. S. (Org.). *Phylogeny and classification of Neotropical fishes*, Porto Alegre: EDIPUCRS. p. 111-122.
- VARI, R. P.; CASTRO, R. M. C. 2007. **New Species of *Astyanax* (Ostariophysi: Characiformes: Characidae) from the Upper Rio Paraná System, Brazil**. *Copeia*, v. 1, p. 150-162.
- VARI, R. P.; MALABARBA, L. R. 1998. **Neotropical ichthyology: an overview**. In: Malabarba, L. R.; Reis, R. E.; Vari, R. P.; Lucena, Z. M. & Lucena, C. A. S. (Eds.). *Phylogeny and classification of Neotropical fishes*. EDIPUCRS. 603p.
- VERMA, G. P.; THAKUR, C. 1988. **Origin and composition of cortical granules in oocytes of a teleost, *Mastacembelus armatus armatus* (Lacépède)**. *Archives Biology Sciences*, v. 99, p. 325-334.
- WALLACE, R.A.; SELMAN, K. 1990. **Ultrastructural aspects of oogenesis and oocyte growth in fish and amphibians**. *Journal of Electron Microscopy Technique*, v. 16, p. 175-201.
- WEITZMAN, H. S.; MALABARBA, L. R. 1998. **Perspectives about the phylogeny and classification of the Characidae (Teleostei: Characiformes)**. In: L.R. MALABARBA; R. E. REIS; R. P. VARI; Z. M. S. LUCENA; C. A. S. LUCENA. (Eds.) *Phylogeny and classification of Neotropical fishes*. Porto Alegre: EDIPUCRS. p. 161-170.
- WOOTTON, R. J.; SMITH. C. 2014. **Reproductive biology of teleost fishes**. John Wiley & Sons. 472p.

YAMAMOTO, T. 1961. **Physiology of fertilization in fish eggs**. International Review of Cytology, v. 12, p. 361-405.

YANAGIMACHI, R.; HARUMI, T.; MATSUBARA, H.; YAN, W.; YUAN, S.; HIROHASHI, N.; IIDA, T.; YAMAHA, E.; ARAI, K.; MATSUBARA, T.; ANDOH, T.; VINES, C.; CHERR, G. 2017. Chemical and physical guidance of fish spermatozoa into the egg through the micropyle. Biology of Reproduction, v. 96, n. 4, 780–799.

ZANATA, A. M.; LIMA, F. C.; DI DARIO, F. A. B. I. O.; GERHARD, P. 2017. **A new remarkable and Critically Endangered species of *Astyanax* Baird & Girard (Characiformes: Characidae) from Chapada Diamantina, Bahia, Brazil, with a discussion on durophagy in the Characiformes**. Zootaxa, v.4232, n. 4, 491-510.

# SOBRE OS AUTORES

**Lorena Ziviani Bevitório:** Possui graduação em Licenciatura em Ciências Biológicas e mestrado em Biodiversidade Tropical pela Universidade Federal do Espírito Santo. Possui experiência em biologia reprodutiva, morfologia, histopatologia e ecotoxicologia. Atualmente, pesquisadora em análises ambientais no Programa de Monitoramento da Biodiversidade Aquática na Área Ambiental I, da Rede Rio Doce Mar/Fundação Espírito-santense de Tecnologia (FEST).

**Niumaique Gonçalves da Silva:** Possui graduação em Licenciatura em Ciências Biológicas pela Universidade Federal do Espírito Santo. Possui experiência em biologia reprodutiva, morfologia, histopatologia, ecotoxicologia. Atualmente, analista ambiental no Programa de Monitoramento da Biodiversidade Aquática na Área Ambiental I da Rede Rio Doce Mar/Fundação Espírito-santense de Tecnologia (FEST).

**Marcos de Lucca Moreira Gomes:** Possui graduação em Bacharelado e Licenciatura em Ciências Biológicas pela Universidade Federal de Viçosa, mestrado em Biologia Celular e Estrutural pela Universidade Federal de Viçosa e doutorado em Biologia Celular e Estrutural pelo Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas. Pós-Doutorado na Universidade de Wageningen, Holanda, na área de Morfologia. Possui experiência, principalmente, nas seguintes áreas: morfologia, histotécnica, histopatologia e biologia da reprodução. Atualmente, Professor Adjunto do Departamento de Biologia Estrutural da Universidade Federal do Triângulo Mineiro.

**Leonardo Ferreira da Silva Ingenito:** Possui graduação em Bacharelado e Licenciatura em Ciências Biológicas pela Pontifícia Universidade Católica do Paraná, mestrado e doutorado em Ciências Biológicas (Zoologia) pela Universidade Federal do Rio de Janeiro (Museu Nacional). Pós-doutorados na área de biodiversidade na Universidade Federal do Espírito Santo. Tem experiência em pesquisa, docência e consultoria na área de Zoologia, com ênfase em Ictiologia, atuando na área de sistemática e biogeografia de peixes água doce neotropicais. Atualmente, pós-doutorando no Instituto Nacional da Mata Atlântica (INMA, Santa Teresa, bolsista FAPES) e Professor Colaborador no Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade Tropical da Universidade Federal do Espírito Santo (UFES, São Mateus).

**Juliana Castro Monteiro Pirovani:** Possui graduação em Bacharelado e Licenciatura em Ciências Biológicas pela Universidade Federal de Viçosa, mestrado e doutorado em Biologia Celular e Estrutural, pelo Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas. Possui experiência, principalmente, nas seguintes áreas: citologia, biologia do desenvolvimento e embriologia, histopatologia, biologia da reprodução e Ecotoxicologia. Atualmente, professora Associada do Departamento de Ciências Agrárias e Biológicas da Universidade Federal do Espírito Santo, Campus São Mateus.



## ÍNDICE

### A

Acrossomo 9

Água doce 3, 4, 29, 33, 34, 37, 38, 41

Alvéolos corticais 22

### B

Biodiversidade 35, 36, 41

### C

Caracídeos 4, 29

Caráter filogenético 30

Células foliculares 8, 18, 20, 21, 22, 25, 26, 27, 28, 30, 32

Células foliculares 22

Characiformes 2, 1, 2, 4, 5, 7, 9, 10, 27, 30, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40

Coletas 6, 13, 14

Criofratura 18, 27

### D

Drenagens costeiras 1, 6, 11, 12, 28

### E

Espermatozoide 30

### F

Fecundação 29

Fertilização 7, 8, 29, 30

### G

Gametas 1, 4, 7, 10, 27

Glicoproteínas 9, 15, 21, 22, 28, 29

Glicoproteínas 28

Gônadas 14, 15, 27

### I

Incertae sedis 5, 38

### L

Localidade-tipo 6

### M

Membrana plasmática 1, 24, 25, 31, 32

Micrópila 1, 8, 9, 11, 16, 17, 18, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 29, 30, 34

Micrópila 24

Microvilosidades 1, 8, 24, 30, 31, 32

Microvilosidades 31

## O

Ostariophysa 34

Ostariophysa 4, 33, 34, 35, 36, 37, 39

Ovários 7, 20, 27

## P

Peixes 3, 4, 5, 7, 8, 9, 10, 12, 14, 27, 28, 30, 33, 34, 36, 37, 38, 39, 41

Plasticidade fenotípica 1, 30, 32

Polimorfismo 30

Polo animal 8, 9, 23, 24, 26

Polo vegetal 25

## R

Relações interespecíficas 10

Rios 2, 3, 5, 6, 11, 12, 13

## T

Técnicas histoquímicas 11

Teleósteos 7, 8, 9, 27, 28, 29, 33

## U

Ultraestrutura 1, 8, 11, 19, 27, 30, 38

## V

Variabilidade 1, 4, 7, 29, 30

Variações fenotípicas 30

Variações morfológicas 1, 7, 27, 28

Vestíbulo micropilar 9, 16, 17, 18, 20, 23, 30

Vitelo 8, 20, 21, 22, 25, 27, 29, 32

Vitelogênese 8, 16, 29

## Z

Zona radiata 1, 8, 9, 10, 11, 16, 17, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32

 **Atena**  
Editora

**2 0 2 0**