



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ECOLOGIA AQUÁTICA E PESCA

IVANA KERLY DA SILVA VIANA

DA OOGÔNIA AO OÓCITO MATURO: DIFERENCIAÇÃO DAS CÉLULAS
GERMINATIVAS DE *Hypancistrus zebra*, (ISBRÜCKER E NIJSSEN, 1991) E A
INFLUÊNCIA DA MATRIZ EXTRACELULAR NO PROCESSO DE
MATURAÇÃO GONADAL

BELÉM – Pa

2017

IVANA KERLY DA SILVA VIANA

DA OOGÔNIA AO OÓCITO MATURO: DIFERENCIAÇÃO DAS CÉLULAS
GERMINATIVAS DE *Hypancistrus zebra*, (ISBRÜCKER E NIJSSEN, 1991) E A
INFLUÊNCIA DA MATRIZ EXTRACELULAR NO PROCESSO DE
MATURAÇÃO GONADAL

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ecologia Aquática e Pesca do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Pará, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ecologia Aquática e Pesca.

Orientador (a): Dr^a. **Rossineide Martins da Rocha**

Laboratório de Ultraestrutura celular ICB/UFPA

Co-Orientador (a): Dr^a **Maria Auxiliadora Pantoja Ferreira**

Laboratório de Imunohistoquímica e Biologia do Desenvolvimento ICB/UFPA

BELÉM – Pa

2017

IVANA KERLY DA SILVA VIANA

DA OOGÔNIA AO OÓCITO MATURO: DIFERENCIAÇÃO DAS CÉLULAS
GERMINATIVAS DE *Hypancistrus zebra*, (ISBRÜCKER E NIJSSEN, 1991) E A
INFLUÊNCIA DA MATRIZ EXTRACELULAR NO PROCESSO DE
MATURAÇÃO GONADAL

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa
de Pós-Graduação em Ecologia Aquática e Pesca do
Instituto de Ciências Biológicas da Universidade
Federal do Pará, como parte dos requisitos para
obtenção do título de Mestre em Ecologia Aquática
e Pesca.

Banca Examinadora:

Dr^a Rossineide Martins da Rocha (ICB/UFPA) – Orientadora/Presidente

Dr^a Maria Auxiliadora Pantoja Ferreira (ICB/UFPA) – Co-orientadora

Prof^a Dr^a Adriana Costa Guimarães (IG/UFPA) – Titular Membro Externo

CV: <http://lattes.cnpq.br/8549111150414569>

Prof^a Dr^a Diva Anelie de Araujo Guimarães (UFPA) – Titular Membro Externo

CV: <http://lattes.cnpq.br/2891287458034896>

Prof^a Dr^a Simone do Socorro Damasceno Santos (ICB/UFPA) – Titular Membro
Externo

CV: <http://lattes.cnpq.br/4573238690293498>

Prof^a Dr^a Renata Coelho Rodrigues Noronha (ICB/UFPA) - Suplente Membro
Interno

CV: <http://lattes.cnpq.br/0860824558237244>

Prof^a Dr^a Marcia Cristina Freitas da Silva (UFPA) – Suplente Membro Externo

CV: <http://lattes.cnpq.br/1146908343728002>

BELÉM – Pa

2017

Dados Internacionais de Catalogação- na-Publicação (CIP)
Biblioteca do Instituto de Ciências Biológicas - UFPA

Viana, Ivana Kerly da Silva

Da oogônia ao oócito maduro: diferenciação das células germinativas de *Hypancistus zebra*, (Isbrücker e Nijssen, 1991) e a influência da matriz extracelular no processo de maturação gonadal / Ivana Kerly da Silva Viana ; Orientadora, Rossineide Martins da Rocha ; Co-orientadora, Maria Auxiliadora Pantoja Ferreira. - 2017.

46 f. : il.

Inclui bibliografia

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Pará, Instituto de Ciências Biológicas, Programa de Pós-graduação em Ecologia Aquática e Pesca, Belém, 2017.

1. Loricarídeo – Xingu, Rio (PA). 2. Oogênese. 3. Peixe ornamental - reprodução. 4. Imunohistoquímica. 5. Microscopia eletrônica. I. Rocha, Rossineide Martins da, orientadora. II. Ferreira, Maria Auxiliadora Pantoja, co-orientadora. III. Título.

CDD – 22 ed. 597.098115

DEDICATÓRIA

Dedico a minha família que é e sempre será minha base, em especial a minha Mãe, Cerly Viana, que durante toda a minha formação acadêmica nunca poupar esforços para que eu conseguisse estudar e me formar, sempre me dando palavras sábias e reconfortantes nos momentos difíceis. Mãe esse título não é apenas meu, é seu. Obrigada!

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por me conceder varias benções durante esses dois anos. Pai lhe agradeço pelas palavras de alento que me deste quando mais precisava, por sempre me guiar na direção correta e por nunca desistir de mim. Que toda honra e glória sejam dadas ao Senhor.

Ao Joanthan minha paixão, por sempre me dá força e incentivar a desafios maiores. Não tenho palavras para descrever o quanto você foi fundamental nesses dois anos, obrigada por NUNCA duvidar da minha capacidade. Te amo vida!

Ao Bryan Wesley minha razão de viver, que apenas com um sorriso me dá força para seguir em frente. É por você que a mamãe nunca desiste!

Douglas e mamãe, vocês sabem o quanto sou eternamente grata por tudo que fazem por mim, obrigada pelo carinho, atenção, companhia e paciência que me deram ao longo dessa jornada sem vocês nada disso seria possível, meu amor por vocês é incondicional. Bella obrigada por escutar as minhas teorias biologicas e por sempre dizer sim quando eu perguntava: “fica com o Bryan rapidinho?”, muito obrigada Izabella. Família agradeço de coração por perdoarem minha ausência, irritabilidade constante (Jonathan que o diga) e meus vários pedidos de favores como: “pega o Bryan”, “marca tal consulta”, “compra tal coisa”. Dona Cerly. Douglas, Izabela, Jonathan e Bryan vocês são o motivo pelo qual me mantenho de pé todos os dias.

Agradeço eternamente as minhas orientadoras Prof^a Dr^a Rossineide Martins da Rocha e Prof^a Dr^a Maria Auxiliadora, por acreditar em meu potencial. Prof^a Rossineide obrigada por abrir as portas do seu laboratório desde o estagio voluntário passando pelo rotatório, todos os PIBICS, TCC até a conclusão do mestrado e por sempre exigir o meu melhor. Prof^a Auxiliadora muito obrigada pela paciência e dedicação que sempre empregou no meu aprendizado. Acredito que minha formação científica não seria a mesma sem os puxões de orelha, as conversas na hora do almoço e os conselhos que vocês duas sempre me deram. Muito obrigada por serem minhas mentoras, mães científicas e acima de tudo minhas amigas.

Yanne Alves Mendes, minha amiga muito obrigada por toda paciência (principalmente nas análises estatísticas), dedicação e inúmeras revisões nos meus textos (rs). Você foi uma peça fundamental na construção e finalização desse trabalho,

pode ter certeza que muitos trabalhos virão por aí com a autoria de Viana & Mendes (meu nome primeiro é claro).

A família histologia composta não apenas por colegas de trabalhos mais sim por verdadeiros amigos: Yanne, Lia, Leonardo, Fábio, Josiane, Suelen, Carol Montes, Julianas (Pantoja e Molica), Renata, Fernando, Breno, Ruy, Surama e Efrain. Muito obrigada todos vocês contribuíram direta e indiretamente para a concretização desse trabalho.

Aos meus amigos que sempre me apoiaram e me incetivaram a buscar cada vez mais conhecimento.

À banca examinadora pelo aceite em participar da avaliação do meu trabalho.

Ao CNPQ pela bolsa concedida durante o mestrado.

A todos que de alguma forma colaboraram para a construção desse trabalho meu sincero

OBRIGADA!

SUMÁRIO

DEDICATÓRIA.....	IV
AGRADECIMENTOS	V
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	7
RESUMO	9
1-INTRODUÇÃO GERAL	10
MORFOLOGIA OVARIANA E DESENVOLVIMENTO DOS OÓCITOS	11
2-JUSTIFICATIVA.....	14
3-OBJETIVOS	15
GERAL	15
ESPECIFICO	15
4-REFERÊNCIAS.....	15
CAPÍTULO I - PROCESS OF MATURATION AND DIFFERENTIATION OF OOCYTE <i>Hypancistrus zebra</i> , ISBRÜCKER AND NIJSSEN, 1991 (SILURIFORME, LORICARIDAE): AN ENDANGERED SPECIES	20
ABSTRACT	21
INTRODUCTION.....	21
MATERIAL AND METHODS	23
AREA OF STUDY AND PREPARATION OF SPECIMENS	23
LIGHT MICROSCOPY AND IMMUNOHISTOCHEMISTRY	23
MORPHOMETRY OF OOCYTES	24
TRANSMISSION ELECTRON MICROSCOPY (TEM) AND SCANNING ELECTRON MICROSCOPY (SEM).....	24
RESULTS.....	24
GONADAL ANATOMY	24
CHARACTERIZATION OF OOCYTE TYPES	25
STRUCTURE OF THE CELL ENVELOPE	29
IMUNOHISTOCHEMICAL ANALYSIS	31
DISCUSSION	33
ACKNOWLEDGMENTS	37
REFERENCES	37
ANEXOS.....	42
REGRAS DA REVISTA	42
AUTORIZAÇÃO SISBIO.....	45
CERTIFICADO COMISSÃO DE ÉTICA	46

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

MEV/SEM	Microscopia Eletrônica de Varredura
MET/TEM	Microscopia Eletrônica de Transmissão
IH	Imunohistoquímica
MEC/ECM	Matriz Extracelular
FPO/POF	Folículo Pós Ovulatório
Zr	Zona Radiata
Ac	Alvéolos Corticais
Y	Globulos de vitelo
L	Lúmen
IBAMA	Instituto Brasileiro do Meio Ambiente
SISBIO	Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais

RESUMO

Acari zebra, *Hypancistrus zebra* (Isbrucker e Nijssen, 1991) é uma espécie de peixe da família Loricariidae. Possui um grande potencial para a pesca de peixes ornamentais, devido a sua coloração caracterizada pelo padrão de listras brancas e pretas no corpo e nas nadadeiras. Atualmente, a espécie se encontra ameaçada de extinção, devido a alta exploração e o funcionamento de um complexo hidrelétrico que foi implantado na região onde a espécie habita. Desta forma, torna-se importante conhecer a biologia reprodutiva com ênfase na morfologia das células germinativas da espécie, para desenvolver técnicas de reprodução induzida, para fins comerciais e de preservação em ambiente natural. Neste contexto, o estudo objetivou descrever a maturação oocitária e a influencia da matriz extracelular no processo de diferenciação dos oócitos de *H. zebra*. Os exemplares foram coletados no trecho do médio inferior rio Xingu, entre a localidade de Gorgulho da Rita e a vila de Belo Monte (Altamira/ Pará). 37 fêmeas foram coletadas, as amostras de ovário foram processadas para a técnica de microscopia de luz, eletrônica de transmissão/varredura, imunohistoquímica e coloração com PAS. Foi identificado para *H. zebra* oogônias, quatro tipos oocitários (tipo I, II, III e IV), folículo pós ovulatório e oócitos em atresia inicial e avançada. O envelope celular foi caracterizado pela presença de três estruturas: camada da teca, camada de células foliculares e zona radiata subdividida em Zr1, Zr2 e Zr3. A imunomarcacão para fibronectina, laminina e colágeno IV ocorreu na lamina basal, camada de células foliculares e camada de teca, porém com diferentes intensidades e em distintos tipos oocitários. Desta forma, concluímos que o desenvolvimento e a diferenciação dos oócitos em *H. zebra* sofrem influência direta dos componentes da matriz extracelular.

Palavras-chave: imunohistoquímica; Acari zebra; peixe ornamental; desenvolvimento oocitário; microscopia eletrônica.

1- INTRODUÇÃO

A atividade de pesca ornamental na região amazônica teve seu início como uma alternativa para aumentar a renda das comunidades ribeirinhas que residem na região. Em meados de 1994 a 2003 essa atividade aliada a exportação movimentou um capital de US\$ 11,5 milhões por ano (PRANG, 2008). Essa modalidade tornou-se uma atividade muito expressiva na região e vem crescendo a cada ano. O estado do Pará ocupa a segunda posição na produção de peixes ornamentais, sendo responsável por 10% das exportações totais (BARTHEM et al., 1997). A capital Belém comercializa regularmente entre 1,5 a 3 milhões de peixes de aproximadamente 150 espécies dulcícolas, estuarinas e fluvio-estuarinas. Esta produção é oriunda de vários municípios, sendo a pesca realizada nas bacias de drenagem dos rios Amazonas, Tapajós, Xingu, Iriri, Tocantins, Araguaia e Guamá. Além de áreas situadas na região do estuário, nos municípios do nordeste paraense (TORRES, 2007).

A ordem Siluriforme comporta o maior número de espécies ornamentais, destacando-se a família Loricariidae que apresenta o maior número de espécies, distribuídos na América do Sul e Central (REIS et al., 2003). Acredita-se que a família Loricariidae tenha aproximadamente 80 gêneros e mais de 700 espécies endêmicas da América do Sul (ARMBRUSTER & PAGE, 2006). A valorização mundial por essa família vem aumentando desde o ano de 1980, onde as primeiras espécies foram encontradas e posteriormente descritas no rio Xingu e Tocantins (PRANG, 2008). Segundo Rosa e Lima (2008), a família Loricariidae ocupa a quarta posição em relação as famílias que possuem o maior número de espécie de água doce ameaçadas de extinção no Brasil, ficando atrás apenas da Rivulidae com 52 espécies, Characidae com 32 espécies e Trichomycteridae com 10 espécies.

A maioria das espécies pertencentes a família Loricariidae são conhecidas como Acaris e possuem hábito bentônico e detritívoro, ou seja, consomem organismos associados ao fundo (SANTOS & SANTOS, 2005). Os loricarídeos possuem um diferencial morfológico quando comparados à outras espécies da ordem Siluriformes, o corpo é revestido por placas ósseas e a boca é modificada como se fosse um disco de sucção (ARMBRUSTER & PAGE, 2006). Entre os loricarídeos destaca-se a espécie *Hypancistrus zebra*, popularmente conhecido como Acari Zebra, Cascudo-Zebra, Zebrinha, Imperial Pleco, Zebra Pleco e código L046, mundialmente conhecido pelo mercado da aquarofilia.

A espécie é caracterizada por um pequeno tamanho, no máximo 10 cm de comprimento, um espinho dorsal, sete raios dorsais, um espinho anal e quatro raios anais, e uma coloração que lembra a zebra, por suas bandas brancas e pretas em desenhos particulares e definidos. Além de apresentar um padrão de listras que lembra um “E” próximo as suas narinas (fig. 1). É endêmica da região inferior do médio rio Xingu, sendo encontrado em baixas profundidades cerca de três a quatro metros, habita especificamente fendas e cavidades que são formadas por pedrais no leito do rio, se alimenta de algas e pequenos invertebrados aquáticos e detritos encontrados sobre blocos rochosos (ISBRÜCKER & NIJSSEN, 1991; ROSA & LIMA, 2008).



FIG. 1: exemplares de *Hypancistrus zebra* coletados no Rio Xingu.(Fonte: Pessoal)

O endemismo das espécies, incluindo *H. zebra*, pode ser explicado pelas barreiras naturais que se formaram no decorrer das décadas. Como, por exemplo no rio Xingu há formação de cachoeiras, corredeiras e barreiras menores, que individualizam outros corpos d'água como lagos e igarapés (CAMARGO et al., 2011). É provável a futura extinção de *Acari zebra*, tendo em vista que a espécie tem um histórico de forte comercialização na região norte, devido a sua coloração peculiar e seu pequeno porte, requisitos essenciais para a pesca de peixes ornamentais. A pesca desordenada e frequente da espécie, aliada a fatores biológicos como por exemplo a baixa fecundidade

(menos de 20 ovos por desova) ocasiona uma diminuição no tamanho das populações (ROSA & LIMA, 2008).

Estudo sobre esta espécie na região são de extrema importância, porém estão limitados somente aos dados de levantamento de ictiofauna (ZUANON, 1999; CAMARGO et al., 2004; CAMARGO et al., 2007) e a descrição da biologia reprodutiva (ROMAN, 2010; GONÇALVES, 2011).

- **MORFOLOGIA OVARIANA E DESENVOLVIMENTO DOS OÓCITOS**

O ovário de peixes teleósteos em sua maioria são órgãos pares que se localizam na cavidade abdominal. Apresentam coloração e tamanhos que depende do estágio de maturação gonadal. O órgão é envolvido por uma cápsula albugínea, que emite septos para o parênquima ovariano, a qual forma as lamelas ovigeras, onde está localizado o epitélio germinativo, além disso as lamelas servem de suporte para as células germinativas (NÚÑES & DUPONCHELLE, 2009; BROWN-PETERSON et al., 2011).

O tecido gonadal ou estroma ovariano é constituído por células pré-foliculares (células somáticas) e epitélio germinativo, onde ocorre a gametogênese (GRIER, 2000). As oogônias são as células iniciais desse processo, que se dividem através de sucessivas divisões mitóticas e posteriormente são envolvidas por células pré-foliculares. A partir desse momento as oogônias tendem a se ligar para formar os chamados cistos, os quais ocorrem divisões meióticas que geram os oócitos (QUAGIO-GRASSIOTTO et al., 2011).

O desenvolvimento oocitário é constituído por duas fases distintas (Fig. 2): crescimento primário ou fase pré vitelogênica, e crescimento secundário ou fase vitelogênica. No crescimento primário ocorre o aumento das organelas assim como a formação das estruturas que recobrem o oócito (Camada de teca, células foliculares e zona radiata). Nessa fase ocorre o aumento de tamanho dos oócitos, assim como sua basofilia (QUAGIO-GRASSIOTTO et al., 2011). A fase pré vitelogênica apresenta oócitos do tipo I e II. Oócito I apresenta citoplasma basófilo e homogêneo com núcleo proeminente e nucléolos centrais ou periféricos, já o oócito II apresenta o citoplasma com alvéolos corticais e núcleo contendo vários nucléolos na periferia da membrana.

A fase de crescimento secundário ou vitelogênico é caracterizado o aparecimento de substâncias proteicas, a grande produção e deposição de gotículas de vitelo no citoplasma do oócito e a migração do núcleo para o polo animal. Ainda é

observado o aparecimento de várias glicoproteínas, que servem para compor a zona radiata, e a formação dos alvéolos corticais, cuja a principal função após a fecundação é impedir a poliespermia. Essa fase apresenta o espessamento da zona radiata. Neste momento observa-se dois tipos de oócitos (III e IV), cuja principal diferença está na migração do núcleo para periferia, que é observado no oócito do tipo IV (WALLACE & SELMAN, 1981; ROMAGOSA & NARAHARA, 2002).

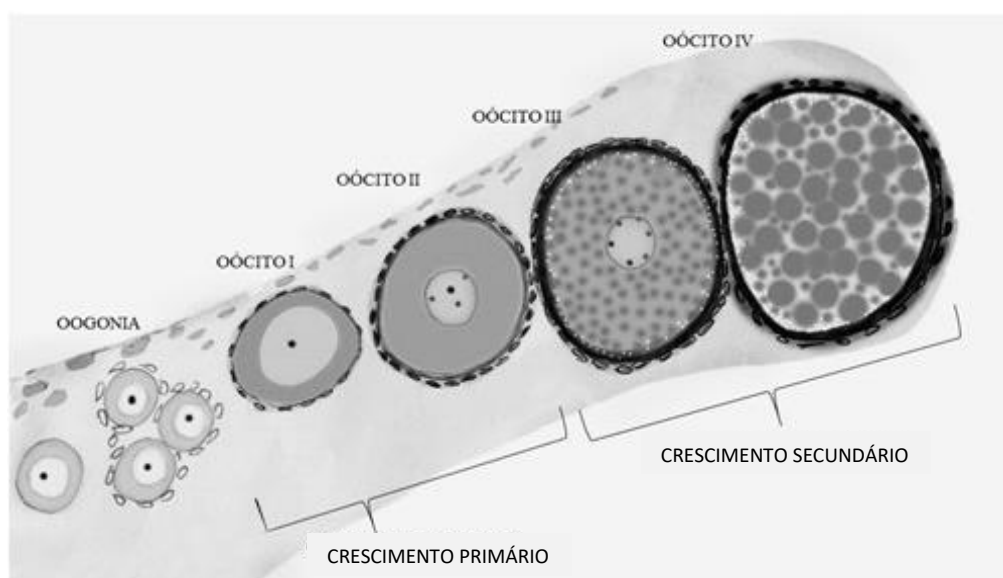


FIG. 2: Crescimento primário e secundário em uma lamela ovariana. (Fonte: Pessoal)

Ainda são observados os folículos pós ovulatórios (FPO) e oócitos em processo de atresia folicular. Os folículos são estruturas formadas após a desova e são caracterizados por apresentar uma única camada de células foliculares em formato prismático e um pequeno lúmen no interior do folículo. Após a desova os oócitos remanescente sofrem um processo de atresia folicular onde ocorrerá a fragmentação da zona radiata, a liquefação do vitelo, e a hipertrofia das células foliculares (THOMÉ et al., 2012).

Nesse estroma ovariano a matriz extracelular (MEC) se destaca pois proporciona um suporte estrutural às células e aos folículos, de modo que estas possam funcionar com eficácia (KIM et al., 2011). Essa matriz se subdivide em matriz pericelular, que se encontra adjacente à célula, em alguns casos ela se especializa e passa a ser denominada de membrana basal ou lâmina basal. A matriz pericelular é constituída de vários elementos dentre eles o fator de crescimento, e as proteases que ligadas a algumas proteínas solúveis tem o potencial de influenciar no ciclo celular e nas características da

célula como a migração, divisão, diferenciação, ancoragem celular e predisposição para a apoptose (PEREIRA et al, 2002; BORNSTEIN & SAGE, 2002).

A MEC presente nos folículos ovarianos denominada lâmina folicular basal, possui o papel de suporte, entretanto, ela funciona como membrana facilitadora de transporte de nutrientes, de hormônios e de outros sinais oriundos do meio extracelular (RODGERS et al., 2003). Entre os elementos que constituem a MEC destacam-se os componentes fibrilares, não fibrilares e microfibrilas.

A fibronectina é uma glicoproteína produzida por fibroblastos é um dímero composto por duas subunidades (250kDa). Uma característica extraordinária é a capacidade de ligar-se a várias outras moléculas que são importantes para o funcionamento celular (WIERZBICKA-PATYNOWSKI & SCHWARZBAUER, 2003.). Estar presente na MEC na forma solúvel e possui diversos sítios de ligação para colágeno, fibrinogênio, heparina e sítios de ligação celular (KIM et al., 2011). Estudos com bivalves demonstram que a fibronectina no ovário está associada intimamente com a MEC do órgão e sua porcentagem é maior quando comparamos a presença da fibronectina em gônadas masculinas (PAZ et al., 2002).

A laminina também é uma glicoproteína que possui um peso molecular de 850 kDa e está subdividida em três cadeias, possui várias funções onde destaca-se o revestimento de vários epitélios, a adesividade, migração e regeneração. Essa molécula possui receptores para heparan sulfato e colágeno tipo IV (todas moléculas da MEC) e também para as integrinas que são moléculas presentes na membrana da célula (SOUZA et al., 2007; BECK et al., 1990; STANDRING, 2010).

2- JUSTIFICATIVA

Para prevenir a extinção da espécie *H. zebra*, a sua captura foi proibida pelo Ministério do Meio Ambiente (MMA), através da Instrução Normativa nº05/2004. Entretanto, essa captura continua acontecendo ilegalmente, e um agravante para a situação da espécie é a construção da usina hidrelétrica de Belo Monte que fica situada no rio Xingu região de Altamira (Pará). Essa construção além de ter um impacto imediato na flora poderá mudar drasticamente a dinâmica do curso do rio e suprimindo os ecossistemas que é importante para diversas espécies, incluindo o *H. zebra*, tendo em vista que esta espécie apresenta um forte endemismo na região do médio rio Xingu (CONCEIÇÃO et al., 2010).

Em consideração a todos os fatores apresentados e mais o impacto da pesca sobre o *H. zebra*, essa espécie se encontra no Livro Vermelho da Fauna Brasileira ameaçada de Extinção. O estudo em questão pode gerar subsídios para implementação de técnicas de fertilização induzida da espécie que visa a criação em cativeiro. Visto que conhecer as características da gametogênese de uma espécie é o primeiro passo a seguir quando se pretende fazer o manejo e a reprodução induzida da espécie.

3- OBJETIVOS

GERAL

- ✓ Descrever o processo de maturação oocitária e a participação da matriz extracelular em *H. zebra*

ESPECÍFICOS

- ✓ Determinar as características oocitária que tornam um oócito apto a desova;
- ✓ Mensurar o diâmetro de cada tipo oocitário;
- ✓ Caracterizar a ultraestrutura dos diferentes tipos oocitários;
- ✓ Determinar a presença da fibronectina e da laminina e colágeno tipo IV nos diferentes tipos oocitários;

Observação: As coletas foram autorizadas pelo SISBIO, e o estudo foi aprovado pela comissão de ética em pesquisa com animais de experimentação (CEPAE/UFPA) sob o numero de registro 3603020816 (ANEXO)

4- REFERÊNCIAS

ARMBRUSTER, J. W. & PAGE, L. M. Redescription of *Pterygoplichthys punctatus* and description of a new species of *Pterygoplichthys* (Siluriformes: Loricariidae). **Neotropical Ichthyology**, v.4, p.401-402, 2006.

BARTHEM, R. B.; PETRERE JR., M; ISAAC, V. J.; RIBEIRO, M. C. L. B.; McGRATH, D. G.; VIEIRA, I. J. A.; VALDERAMA-BARCO, M. **A pesca na Amazônia: problemas e perspectivas para o seu manejo**. In: 11 Valadares-Pádua, C. & Bodmer, R. E. Manejo e Conservação da Vida Silvestre no Brasil. MCT-CNPq, Sociedade Civil Mamirauá. 1997.

BECK, K.; HUNTER, I.; ENGEL, J. Structure and function of laminin: anatomy of a multidomain protein. **FASEB Journal**. v.4, p.148-160, 1990.

BROWN-PETERSON NJ, GRIER HJ, OVERSTREET RM. Annual changes in germinal epithelium determine male reproductive classes of the cobia. **Journal of Fish Biology**, v.60, p.178-202, 2011.

BORNSTEIN, P.; SAGE, E. H.. Matricellular proteins: extracellular modulators of cell function. **Current opinion in cell biology**, v.14, n.5, p.608-616, 2002.

CAMARGO, M.; GIARRIZZO, T.; ISAAC, V.; Review of The Geographic Distribution of Fish Fauna of The Xingu River Basin, Brazil. **Ecotropica**, v. 10, p.123–147, 2004.

CAMARGO, M. & GIARRIZZO, T. Fish, Marmelos Conservation Area (BX044), Madeira River basin, states of Amazonas and Rondônia, Brazil. **Check list**, v.3, n. 4, p.281-296, 2007

CAMARGO, M., CARVALHO JÚNIOR, J. & ESTUPIÑAN, R.A. Peixes Comerciais da Ecorregião Aquática Xingu-Tapajós. In: Castilhos, Z.C. & Backup, P.A. (Eds.), Ecorregião Aquática Xingu-Tapajós. CETEM, Rio de Janeiro, pp. 175–192, 2011.

CONCEIÇÃO, L. C.; CARVALHO JÚNIOR, J. R.; SANTANA, A. R.; NAKAYAMA, L. Pescadores, peixes ornamentais e conservação dos recursos naturais: uma abordagem etnoictiológica de comunidades do rio Xingu PA-Brasil. **In: I Seminário Internacional de Ciências do ambiente e Sustentabilidade na Amazônia. 2010.** Anais do I Seminário Internacional de Ciências do Ambiente e Sustentabilidade na Amazônia, Manaus-AM, p.1-7, 2010.

GRIER HJ. Ovarian germinal epithelium and folliculogenesis in the common snook, *Centropomus undecimalis* (Teleostei, Centropomidae). **Journal of Morphology**. v.243, p.265-281. 2000.

GONÇALVES, A. P. Ecologia e etnoecologia de *Hypancistrus zebra* (Siluriformes: Loricariidae) no rio Xingu, Amazônia brasileira, (2011).

ISBRUKER, I. J. H. & NIJSSEN, H. *Hypancistrus zebra*, a new genus and species of uniquely pigmented ancistrine loricariidae fish from the Rio Xingu, Brazil. **Ichthyological Exploration of Freshwaters**, v.1, n.4, p.349-350, 1991.

KIM, S. H., TURNBULL, J., & GUIMOND, S. Extracellular matrix and cell signalling: the dynamic cooperation of integrin, proteoglycan and growth factor receptor. **Journal of Endocrinology**, v.209, n.2, p.139-151. 2011.

NÚÑEZ, J., & DUPONCHELLE, F.. Towards a universal scale to assess sexual maturation and related life history traits in oviparous teleost fishes. **Fish Physiology and Biochemistry**, v.35, n.1, p.167-180, 2009

PRANG, G. An industry analysis of the freshwater ornamental fishery with particular reference to the supply of Brazilian freshwater ornamentals to the UK market. **Uakari**, v.3, n.1, p.7-52. 2008.

PAZ, M., RUIZ, M. F., SÁNCHEZ, L., & MIKHAILOV, A. Identification of a fibronectin-like molecule from a marine bivalve *Pecten maximus* (L., 1758) and its

hyperaccumulation in the female compartment of the gonad. **Boletín do Instituto Español de Oceanografía**, v.18, n.1-4, p.393-400. 2002.

PEREIRA, M., RYBARCZYK, B. J., ODRLJIN, T. M., HOCKING, D. C., SOTTILE, J., & SIMPSON-HAIDARIS, P. J. The incorporation of fibrinogen into extracellular matrix is dependent on active assembly of a fibronectin matrix. **Journal of cell science**, v.115, n.3, p.609-617. (2002).

QUAGIO-GRASSIOTTO I, GRIER HJ, MAZZONI TS, NÓBREGA RH, AMORIM JP. Activity of the ovarian germinal epithelium on the follicle formation and the oocyte development in the freshwater catfish *Pimelodus maculatus* (Teleostei: Ostariophysi: Siluriformes). **Journal of Morphol**, v.8, p.1290-1306, 2011

REIS, R. E.; KULLANDER, S. O.; FERRARIS, C. J. Check List of the freshwater fishes of south and Central America. Porto Alegre. **EDIPUCRS**. 742p, 2003.

ROMAGOSA, E.; NARAHARA, M. Y. Desenvolvimento e diferenciação dos ovócitos de pacu, *Piaractus mesopotamicus* (Holmberg, 1887)(Osteichthyes, Characidae). **Acta Scientiarum. Biological Sciences**, v. 24, p. 433-438, 2002.

RODGERS, R. J.; IRVING-RODGERS, H. F.; RUSSELL, D. L. Extracellular matrix of the developing ovarian follicle. **Reproduction**, v. 126, n. 4, p. 415-424, 2003.

ROMAN, A. P. O. Biologia reprodutiva e dinâmica populacional de *Hypancistrus zebra* Isbrücker & Nijssen, 1991 (Siluriformes, Loricariidae), no rio Xingu, Amazônia brasileira. (2010).

ROSA, R. S.; LIMA, F. C. T. Os Peixes Brasileiros Ameaçados de Extinção. In: MACHADO, A. B. M.; DRUMOND, G. M.; PAGLIA, A.P. Livro Vermelho da Fauna Brasileira Ameaçada de Extinção. **Biodiversidade**, v.19, n.2, p.8-285. Brasília/ Belo Horizonte, MMA/Fundação Biodiversitas, 2008.

SANTOS, G. M. & SANTOS, A. C. M. Sustentabilidade da pesca na Amazônia. **Estudos Avançados**, v. 19, n. 54, 2005.

STANDRING, S. **Gray's Anatomia**. Elsevier Brasil, pa 38, 2010.

SOUZA, L. F. P., SOUZA, V. F., DE GÓES SILVA, L. D., DOS SANTOS, J. N., & DE ALMEIDA, S. R. Expressão da laminina na membrana basal em carcinoma escamo celular oral. **Revista Brasileira de Otorrinolaringologia**, v.73, n.6, p.768-74. 2007.

THOMÉ, R. G., DOMINGOS, F. F. T., SANTOS, H. B., MARTINELLI, P. M., SATO, Y., RIZZO, E., & BAZZOLI, N. Apoptosis, cell proliferation and vitellogenesis during the folliculogenesis and follicular growth in teleost fish. **Tissue and Cell**, v.44, n.1, p.54-62, 2012.

TORRES, M. F. 2007. A Pesca Ornamental na Bacia do Rio Guamá: Sustentabilidade e Perspectivas de Manejo. Tese (doutorado em Desenvolvimento Sustentável do Trópico Úmido). Universidade Federal do Pará, Belém. 284 p.

WALLACE, R. A.; SELMAN, K. Cellular and dynamic aspects of oocyte growth in teleosts. **American Zoologist**, v. 21, p. 325-343. 1981.

WIERZBICKA-PATYNOWSKI, I., & SCHWARZBAUER, J. E. The ins and outs of fibronectin matrix assembly. **Journal of cell science**, v.116, n.16, p.3269-3276. 2003.

ZUANON, J. A. S. **História natural da ictiofauna de corredeiras do rio Xingu, na região de Altamira Pará**. Tese de Doutorado (Doutor em Ciências Biológicas), Universidade Estadual de Campinas. Campinas, São Paulo. 220p, 1999.

CAPÍTULO I

PROCESS OF MATURATION AND DIFFERENTIATION OF OOCYTE
Hypancistrus zebra, ISBRÜCKER AND NIJSSEN, 1991 (SILURIFORME,
LORICARIDAE): AN ENDANGERED SPECIES

Título abreviado: Morfologia oócitária de *Hypancistrus zebra*

O capítulo foi submetido a Hydrobiologia (ISSN: 1573-5117 / versão eletrônica)

Process of maturation and differentiation of oocyte *Hypancistrus zebra*, Isbrücker and Nijssen, 1991 (SILURIFORME, LORICARIDAE): An endangered species

Ivana Kerly Viana^{1*}, Maria Auxiliadora Ferreira¹, Yanne Mendes¹ and Rossineide Rocha¹

^{1*} Instituto Ciências Biológicas, Universidade Federal do Pará, Guamá, 66075-110 Belém, Brazil.

Corresponding author: e-mail: ivanakerly@hotmail.com / Fone: +55 91 3201-7876

¹ Instituto Ciências Biológicas, Universidade Federal do Pará, Rua Augusto Corrêa, 01 - Guamá, 66075-110 Belém, Brazil

Abstract

Hypancistrus zebra is an endemic fish species in the Xingu River currently threatened with extinction due to overexploitation and the recent construction of the hydroelectric dam in the region, which could affect their life cycle. This study describes the oogenesis, addressing the formation of the cellular envelope that covers the oocyte and the influence of extracellular matrix proteins (laminin, fibronectin and collagen type IV) on the maturation process. 37 female specimens of *H. zebra* were captured, and the ovaries were collected and submitted to routine histological processing for light microscopy and electron microscopy, and immunohistochemistry techniques. *H. zebra* oocytes were classified into four types (I – IV), with specific nuclear and cellular envelope characteristics, and also postovulatory and atretic follicles. Cellular envelope consists of three layers: radiata zone subdivided in zr1, zr2 and zr3, follicular cells and the theca cell (external and internal). Extracellular matrix proteins during oogenesis showed different intensities of immunolocalization. This study may contribute to reproductive biotechnology, assisting induced fertilization in order to support captive breeding and the conservation of this species.

Keywords: Immunolocalization, Histology, Extracellular matrix, Fish, Reproduction.

Introduction

Oogenesis in teleost fishes has been widely investigated to elucidate various morphological and ecological adaptations that occur during reproduction. It is a dynamic process that occurs in the ovary, which starts with the multiplication of the

oogonia, continues with the differentiation and growth of oocytes, and ends with the release of mature oocytes (Murua & Saborido-Rey, 2003; Murua & Motos, 2006; García-Seoane et al., 2014; Costa et al., 2015; Gomes et al., 2015; Uribe et al., 2016).

During the gonadal development both oocyte and ovarian stromal undergo changes: in the oocytes there is the gradual production of yolk globules, increased cellular volume, nuclear displacement toward the periphery of the cell and the formation of the micropyle; while in the ovarian stroma there are morphological changes in the follicular cells, the reorganization of the extracellular matrix (ECM) and the emergence of the theca (Quagio-Grassiotto et al., 2014; Murata et al., 2014; Abreu et al., 2015).

Specifically, the ECM is made up of molecules secreted by the tissue cells, and composed of fibrillar proteins, glycoproteins and proteoglycans that provide the structural support of cells and control the transport of nutrients, hormones and other signaling substances originating from the extracellular environment (Rodgers, et al., 2003; Kim, et al., 2011). Among the ECM components, laminin and collagen type IV are important which are specific to the basal lamina or external layer of the cells providing the cell-matrix adhesion. However, fibronectin is a glycoprotein that also promotes adhesion and support to the matrix. All components are involved in the growth, differentiation and cell migration (Beck et al., 1990; Wierzbicka-patynowski & Schwarzbauer, 2003; Rodgers et al., 2003).

The ECM function is to promote the maturation of the ovarian germ cells during oogenesis. The oogenesis is classified into phases: primary growth characterized by the oocyte volume that increases a few hundredfold, the nucleo-cytoplasmic ratio decreases, and also many membranous organelles elaborated within the oocytes cytoplasm; and secondary growth phase is characterized by the formation of the cortical alveoli and the increase of yolk globules (Wallace & Selman, 1981; Tyler & Sumpter, 1996; Kagawa, 2013).

Although it is believed that oocyte development is generally a process conserved among teleost species, in the case of oogenesis of Amazonian ornamental fish of the family Loricariidae, the literature contains limited information. Particularly since these are small-sized animals and use different survival based reproductive strategies, supporting the hypothesis that the components and cellular organization and the ECM protein expression have a specific pattern during oogenesis.

Hypancistrus zebra, (Isbrücker & Nijssen, 1991), commonly known as Acari zebra, is a small loricariidae, widely used in ornamental fishery due to a pattern of black

and white stripes along its body and fin. *H. zebra* is an endemic species of the Xingu River basin, and due to its intense overexploitation it has been placed in the list of endangered species and its capture and marketing is illegal (Rosa & Lima, 2008). However, what draws attention to the study of this species is the fact that its habitat is located in the area where a hydroelectric dam was built. This situation may represent a risk factor for the survival of the species, considering that the operation of a hydroelectric dam may influence the hydrological cycle of the river, the food supply and consequently the life cycle of the species (Winemiller et al., 2016). Therefore, the objective of our study is to describe oogenesis in *H. zebra*, evidencing structural, ultrastructural and morphometric differences between cell types and to analyze the presence of laminin, collagen type IV and fibronectin during oocyte maturation.

Materials and methods

Area of study and preparation of specimens

A total of 37 female *H. zebra* specimens were collected between 2012 and 2013, from the Xingu River (3° 12' 52" S, 52° 11' 23" W) north region of Brazil. The specimens were transported to the laboratory, anesthetized with benzocaine hydrochloride (0.1 g.L⁻¹) and euthanized with sodium pentobarbital solution (60-100mg/Kg) under the guidance of the National Council for the Control of Animal Experimentation (CONCEA), protocol number 3603020816. Subsequently, the gonads were removed through a ventral incision. The gonads were classified into three stages: maturing, mature and spawned. The oocyte development classification was adapted from Núñez & Duponchelle (2009).

Light microscopy and immunohistochemistry

Ovarian fragments of *H. zebra* were fixed in Bouin solution for 24 hours. The samples were then dehydrated in increasing concentrations of ethanol, cleared in xylene, infiltrated and embedded in paraffin (Prophet et al. 1995). Sections of 5µm thick were cut and stained with hematoxylin and eosin solution (HE) and periodic acid-Schiff (PAS). For immunohistochemistry, replicas of previously identified slides were deparaffinized in xylene, washed in phosphate buffered saline (PBS) and immersed in sodium citrate buffer heated to 70°C for 25 minutes. Subsequently, the slides were incubated in 3% hydrogen peroxide in methanol for 30 minutes, blocked with 10% normal goat serum for 1 hour incubated in anti-rabbit fibronectin polyclonal primary

antibody (1:200), anti-rabbit laminin (1:60) and anti-rabbit collagen type IV (1:100) for 12 hours and post-incubated in anti-rabbit IgG secondary antibody conjugated with peroxidase for 2 hours. Afterwards the samples were developed in DAB (3, 3'diaminobenzidine) for 5 minutes, washed in distilled water, counterstained with hematoxylin and examined under a Carl Zeiss optical microscope (Axiostar plus 1169151).

Morphometry of oocytes

The diameters of 100 oocytes (I, II, III and IV) were measured, totaling 400 cells. Only cells that displayed a nucleus were measured. The data were tested through one-way analysis of variance (ANOVA), followed by *a posteriori* Tukey test with 5% significance level (α).

Transmission Electron Microscopy (TEM) and Scanning Electron Microscopy (SEM).

Ovarian fragments were fixed in Karnovsky solution (4% paraformaldehyde, 2% glutaraldehyde in 0.1M sodium cacodylate buffer, pH 7.4) for 24 hours. After fixation, the fragments were washed in sodium cacodylate buffer (0.1M pH 7.4) and post-fixed in 1% osmium tetroxide in sodium cacodylate buffer (0.1M pH 7.4) for 2 hours. For TEM analysis, the fragments were dehydrated in ascending acetone series, embedded in Epon 812. Semi-thin 1 μ m thick sections were made in a microtome and stained with 1% methylene blue and then analyzed under a Carl Zeiss optical microscope (Axiostar plus 1169151). Ultra-thin sections were contrasted with uranyl acetate and lead citrate and examined in JEOL (JEM -100CX II) electron microscope. For SEM analysis, the specimens were dehydrated in a graded ethanol series (30% to 100%) and critical point drying using CO₂. Specimens were mounted on stubs, coated with gold and examined using a LEO 1430 SEM.

Results

Gonadal Anatomy

The ovary of *H. zebra* (Fig. 1a) is a pair of lobular-shaped organs, located in the abdominal cavity. In the final development stage the ovary, which is large and occupies almost the entire abdominal cavity, has a yellowish color and intense vascularization (Fig. 1b).

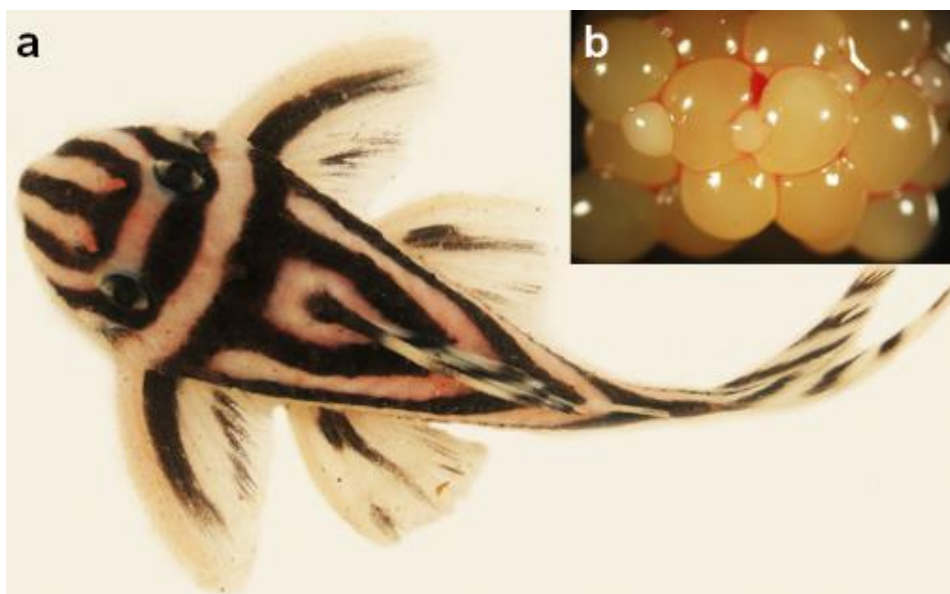


Fig.1 a - Photograph of specimen of *Hypancistrus zebra*. **b** - Mature ovary containing oocytes of different sizes.

Characterization of oocyte types

In the ovarian parenchyma, the germ cells are surrounded by ovigerous lamellae that give support to the oogonia and oocytes. These were classified into four types: I, II, III and IV.

Oogonia may be individual or grouped, surrounded by squamous cells clustered into nests (Fig. 2a). Compared to cytoplasm, oogonia have a large nucleus with only one nucleolus, which may be distributed in the center or at the periphery of the nucleus. Type I or previtellogenic oocytes exhibit a small mean diameter of $44.07 \pm 11.72 \mu\text{m}$, the cytoplasm is homogenous and basophil, peripheral or central nucleus with a single nucleoli and are surrounded by squamous follicular cells and a small fibrillar network (Fig. 2b, d). PAS positive was observed in the cytoplasm and nucleus of these oocytes (Fig. 2c, d).

Type II oocytes or vitellogenesis have a mean diameter of $103.71 \pm 23.32 \mu\text{m}$ and exhibit basophilic cytoplasm that contains cortical alveoli immediately below the plasma membrane, the nucleus is evident, with several nucleoli scattered at the periphery of the nuclear membrane (Fig. 2f). There is a fibrillar network around the cells and an amorphous layer, known as a radiata zone, located between the plasma membrane of the oocyte and the follicular cell (Fig. 2f, g).

Type III oocytes have a mean diameter of $212.20 \pm 83.33 \mu\text{m}$, and have a thick fibrillar network (Fig. 2h). The nucleus is central and the cytoplasm is filled with yolk

globules and cortical alveoli (Fig. 2i). The following layers are observed in these oocytes: thick radiata zone, cubic shape follicular cells, and the theca, these layers form the cell envelope (Fig. 2j). The type IV oocytes have a mean diameter of 487.81 ± 275.85 μm , the cytoplasm filled with yolk globules and cortical alveoli is located below of plasmatic membrane, the nucleus migrates to the periphery of the cell. In this type of oocyte the cell envelope is fully formed (Fig. 3a, 4c). The diameter of the oocytes exhibited significant size differences, except in types I and II ($F=253.5$; $D.F=3$; $p<0.01$) (Fig. 6).

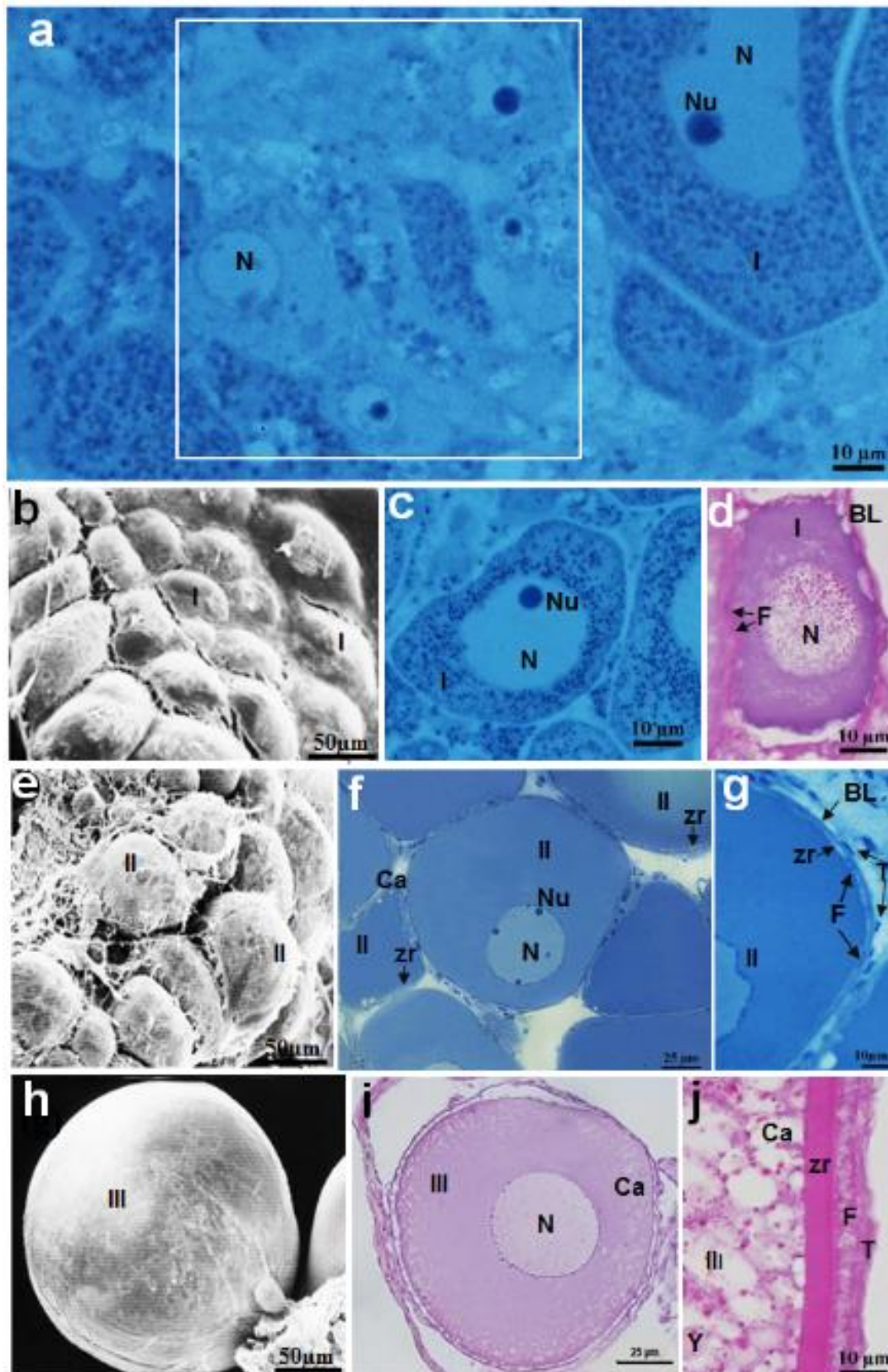


Fig.2 Morphology of oocytes types in *H. zebra*. **a** - Oogonia nest. **b,e,h** - SEM of the surface of type I, II and III oocytes, respectively. **c,d** - Type I oocytes with granules in the cytoplasm and nucleus. **f** - Type II oocyte. **g** - Formation of the cell envelope in type II oocyte. **i** - Type III oocyte. **j** - Cell envelope in type III oocyte. Color: a,c,f,g - Methylene blue, d,j - PAS/

hematoxylin, i, HE. N: nucleus, Nu: nucleolus, Ca: cortical alveolus, BL: basal lamina, F: follicular cell, Zr: radiata zone, Y: yolk globules, T: theca layer.

Postovulatory follicles (POF) were observed in the ovarian stroma, a characteristic structure which shows that spawning occurred. They are formed by theca layers and follicular cells and remain in the ovary until subsequent reabsorption (Fig. 3c). The presence of follicular atresia in initial and advanced stages was also observed. The initial atresia stage shows a loss of its rounded configuration, exhibits irregular appearance and fragmentation of the nucleus (Fig. 3d). However, in the advanced atresia stages the nucleus is not observed and the follicle is totally disorganized (Fig. 3e).

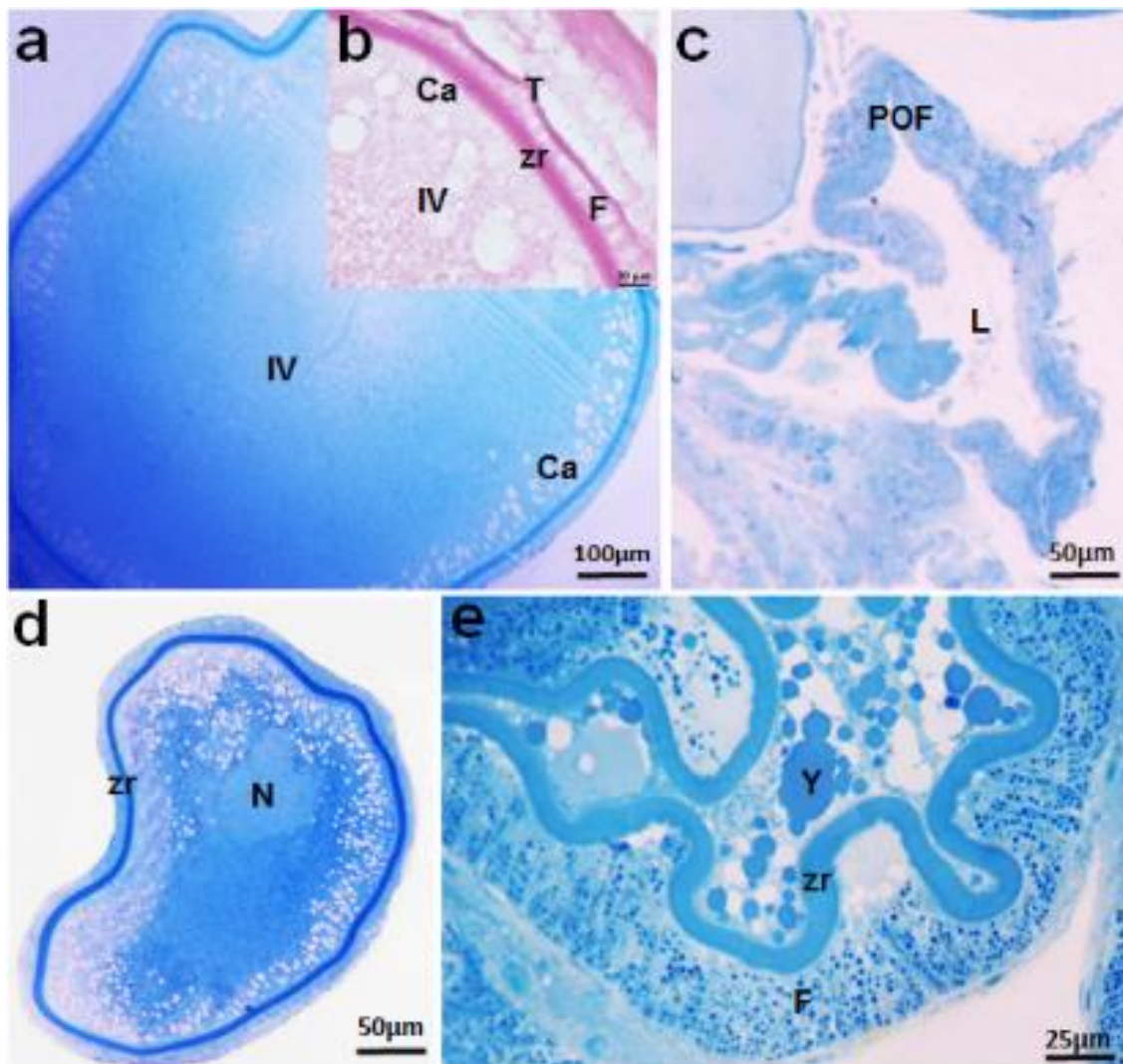


Fig. 3 Different structures in the ovary of *H. zebra*. **a** - Type IV oocyte. **b** - Cell envelope of type IV oocyte. **c** - Postovulatory follicle exhibiting the lumen. **d** - Oocytes in initial atresia. **e** -

Oocyte in final atresia. Stained: a,c,d,e - Methylene blue, b - PAS/hematoxylin. N: nucleus, Ca: cortical alveolus, F: follicular cell, Zr: radiata zone, Y: yolk globules, T: theca layer, L: lumen.

Structure of the cell envelope

The formation of the cell envelope begins from the type I oocyte, characterized by a thin layer of squamous follicle cells; type II oocytes have the presence of the radiata zone, follicular cells, a basal lamina and fusiform cells organizing outside the lamina, characterizing the beginning of the theca (Fig. 2g). In type III and IV oocytes three layers are found (radiata zone, follicular cells and theca) that compose cell envelope, these layers are thicker in type IV oocyte (Fig. 3b).

Ultrastructurally, type IV oocyte exhibits a greater amount of yolk globules in the cytoplasm (Fig. 4b). The radiata zone is subdivided in radiata zone 1 (Zr1), radiata zone 2 (Zr2) and radiata zone 3 (Zr3). Zr1 is contact with the follicular cell layer through membrane projections, and is less electron-dense than the other layers; Zr2 is the intermediate layer, with smaller rounded pores; Zr3 is the layer in contact with the oocyte membrane, with larger and irregular-shaped pores. Zr2 and Zr3 have microvilli inside the pores (Fig. 4a, c, e). Furthermore, there is a layer of cuboid shaped follicular cells characterized by a cytoplasm filled with mitochondria and an irregular-shaped nucleus with condensed chromatin (Fig. 4d). Outside cell envelope an inner theca compound of squamous cells is observed, and an outer theca composed of collagen fibers (Fig. 4f).

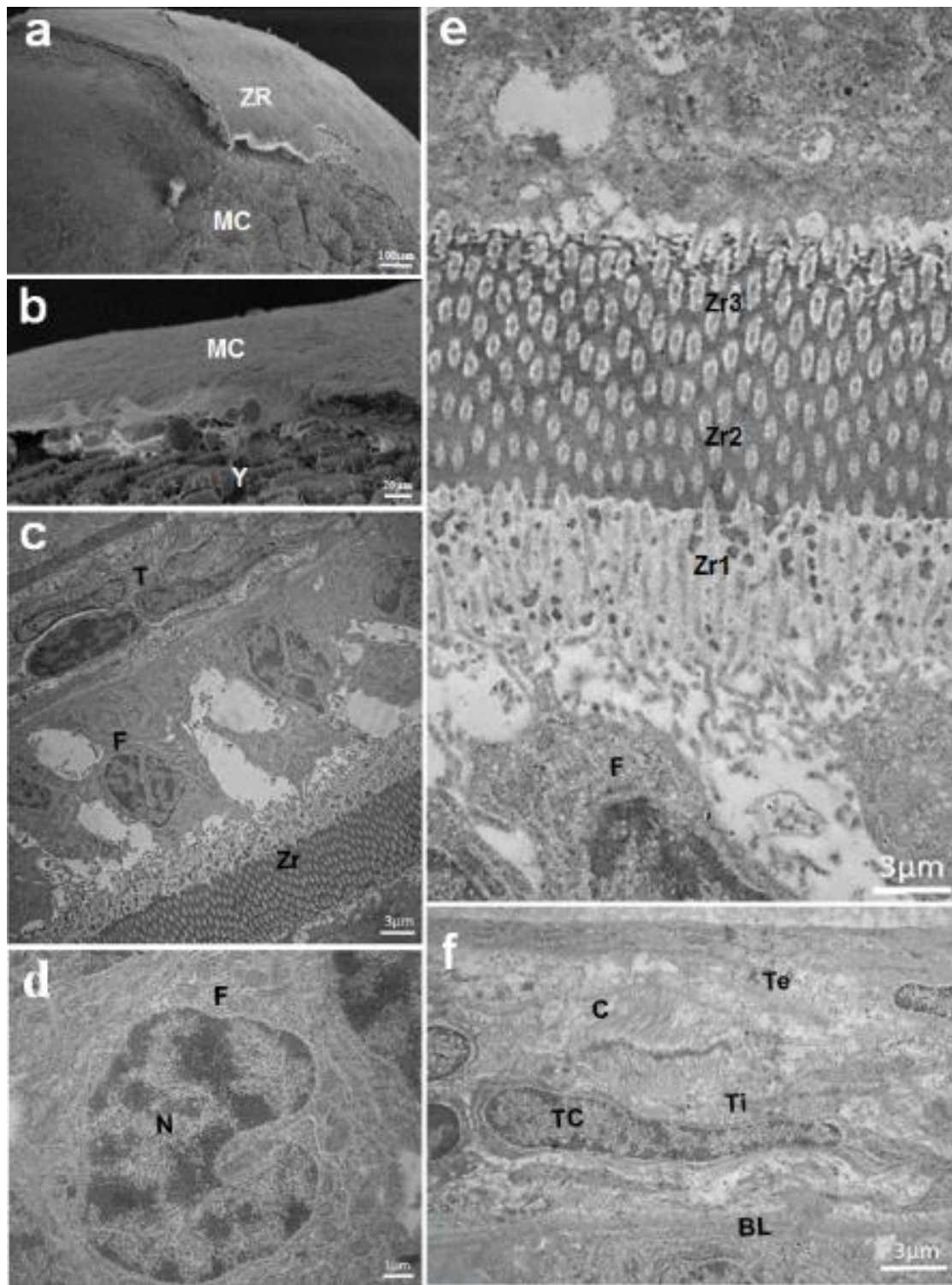


Fig.4 Cell envelope formation in *H. zebra*. **a,b** - SEM of surface of type IV oocyte showing membrane of the oocyte and radiata zone. **c** - Detail of cell envelope. **d** - Follicular cell with irregular cuboid-shaped nucleus and condensed chromatin. **e** - Subdivision of radiata zone. **f** - Theca layer showing the internal theca with the presence of theca cell, and external theca with the presence of collagen. BL: basal lamina, F: follicular cell, Zr: radiata zone, Zr1: radiata

zone 1, Zr2: radiata zone 2, Zr3: radiata zone 3, Y: yolk globules, T: theca, Ti: internal theca, Te: external theca

Immunohistochemical analysis

Immunolabeling for the ECM protein occurred in different components of the cell envelope. Fibronectin was observed mainly in the basal lamina of the type I and II oocytes (Fig. 5a), theca layer of type III oocytes (Fig. 5b) and follicular cells and theca of type IV oocyte (Fig. 5c). However, the laminin was observed in the follicular cells, basal lamina and inner theca from type II oocytes (Fig. 5d, e). collagen type IV was observed in the outer theca from the type III oocyte, and more evident type IV oocyte (Fig. 5f).

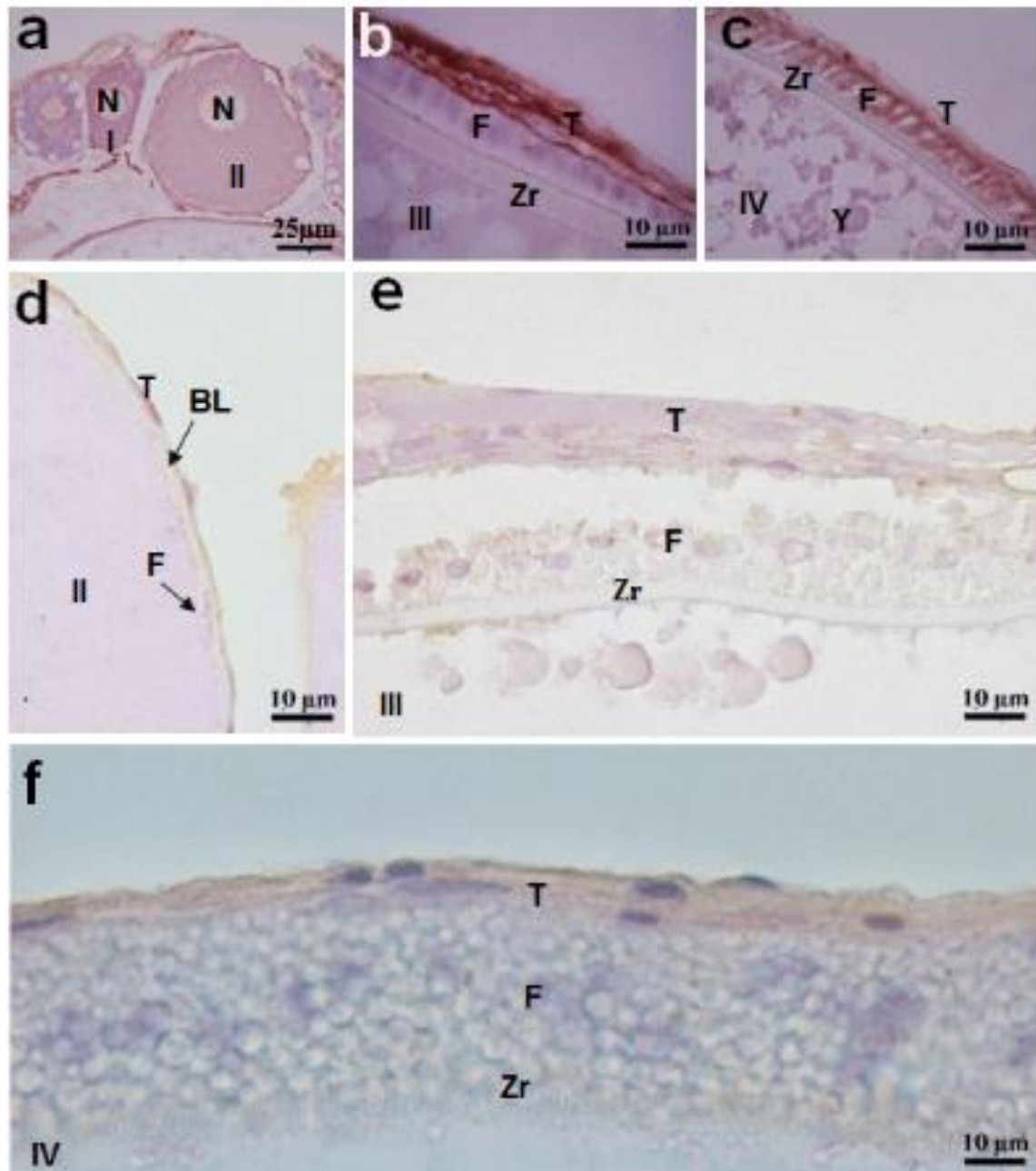


Fig.5 Immunohistochemistry reaction in oocytes of *H. zebra*. **a-c** - Immunolocalization of fibronectin, demonstrating reaction in the basal lamina, follicular cells and theca. **d,e** - Immunostaining of laminin in the basal lamina and theca. **f** - Immunolocalization of collagen type IV in the theca. I: type I oocyte, II: Type II oocyte, III: Type III oocyte, IV: Type IV oocyte, N: nucleus, BL: basal lamina, F: follicular cell, Zr: radiata zone, T: theca layer.

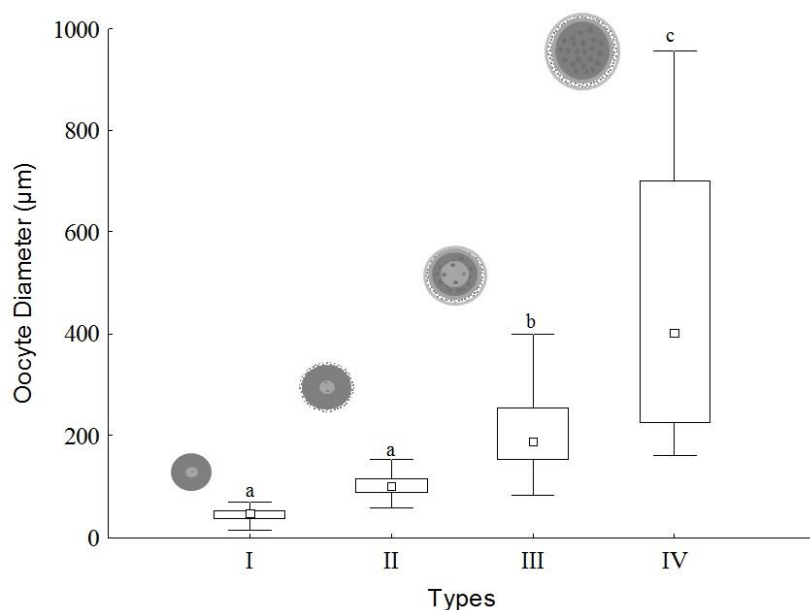


Fig.6 Distribution of mean diameters (μm) of oocyte types in *H. zebra*

Discussion

Herein we sought to characterize the ultrastructure and morphometry, as well as the expression and organization of extracellular matrix for oogenesis in the *H. zebra*. The ovary of Loricariids is generally characterized by its large size and yellowish color, the same organization pattern was found in *H. zebra* but with larger and fewer oocytes, similar to that observed in *Rhinelepis aspera* (Melo et al., 2011) and *Neoplecostomus microps* (Brito et al., 2016). Generally, the larger and fewer oocytes are related to the life history of the reproduction and parental care of the species (Winemiller & Rose, 1992).

We adapted the classification proposed by Núñez & Duponchelle (2009) since it has been used for Amazonian fish such as *Aequidens tetramerus* (Silva et al., 2013) and *Serrasalmus gouldingi* (Prudente et al., 2015). *H. zebra* oogonia were found individually or nests, also referred as cysts. This organization pattern was also found in *Laetacara araguaiae* (Santos-Silva et al. 2015). According to Quagio-Grassiotto et al. (2011), this cell arrangement occurs through pre-follicular cell projections that separate the nests from the other oogonia scattered throughout germinal epithelium. Then, these oogonia enter meiosis, initiating oocyte development. We believe that the same cellular organization occurs in *H. zebra* at the beginning of oogenesis.

During primary growth types I and II oocytes were PAS-positive and granulations in cytoplasm and nucleus were evidenced by methylene blue, this aspect reveals the

start of the ribonucleic acid and protein synthesis in the cell (Selman & Wallace, 1989; Grier, 2000). At this moment both the follicular cells and the oocytes by hormonal influence, are stimulated to produce intracytoplasmic substances such as vitellogenin, and extra cytoplasmic as cell envelope components that can be observed (Patiño & Sullivan, 2002; Jalabert, 2005). In *H. zebra* the appearance and increase of yolk globules and cortical alveoli are examples of protein production in the cell under endocrine influence, observed in types III and IV oocytes. The role of the cortical alveoli is to block polyspermy after oocyte fertilization. This emphasizes that during the oocyte growth stages a fibrillar network was found around the cells, especially in type II oocytes, therefore, we suggest that this arrangement is a remodeling of the matrix to help the cells of the ovarian parenchyma in the subsequent phases.

Two structures are commonly observed during gonadal maturation in fish, the POF and follicle atretic. In *H. zebra* the formation of POF was characterized by the irregular shape with lumen, follicular cell hypertrophy and intense vascularization of the theca, similar to that found by Nagahama (1983). Follicular atresia was frequently observed in the mature ovary of the species in this study, classified as initial and advanced, unlike the classification used by Paschoalini et al., (2013) in *Pimelodus maculatus*, which was characterized as initial, intermediate and final atresia. In the case of *H. zebra* we proposed that follicular atresia is the animal's normal physiological response to its habitat, rapids-dwelling.

A relevant fact in *H. zebra* was the diameter of oocytes ranging from 44.07 µm in type I oocytes to 487.81 µm in type IV oocytes. The increase in oocyte diameter in accordance with the development stage of oocytes is similar to that found in *Loricariichthys platymetopon*, *Loricariichthys sp*, *Loricaria sp*, *Hypostomus ternetzi* and *Megalancistrus aculeatus* (Suzuki et al., 2000) and *Hypostomus francisci* (Sales et al., 2016). Thus, differences in diameters are related to reproductive tactics, small and numerous eggs are common in migratory species, while the large and few eggs are related to non-migratory species (Kolm & Ahnesjo, 2005), for example *H. zebra*, which is an endemic species. This type of oocyte pattern suggests that the animal invests in oocyte quality with increased yolk production, ensuring nutritional reserves for the larval stage.

In this study we highlight the presence of the cell envelope in the oocytes, which is composed of three layers: radiata zone, follicular cells and theca. We believe that the formation of the radiata zone occurs gradually from type II oocytes with the appearance

of amorphous material between the plasma membrane of the oocyte and the follicular cells. This aspect corroborates the findings of Jiang et al. (2010) and Grier (2012), but differs from Perini et al. (2013) which report only two layers for the radiata zone. We emphasize that the appearance of Zr in *H. zebra* follows a formation order: intermediate (Zr2), external (Zr1) and the internal (Zr3), similar to the studies proposed by Santos-Silva et al. (2015). This organization allows contact between the oocyte and follicular cells, the transport of substances, and which also ensure resistance against abrasion (Suzuki et al., 2000, Santos-Silva et al., 2015). We observed pores with microvilli in the Zr2 and ZR3 layers and only microvilli in Zr1, in contact with the follicular cells, and it can act as communication channels for the oocyte-follicle cell and support the fertilized egg to adhere to the substrate in *H. zebra*.

Another component of the cell envelope is the follicular cells, which exhibit a squamous to cuboidal shape and irregular nucleus. Similar aspects were found in other teleost, cuboid follicular cells in *Iheringichthys labrosus* (Santos et al., 2006), cuboid and prismatic in *Loricariichthys spixii* (Duarte et al., 2007) and cylindrical in *Trachelyopterus galeatus*, *Lophiosilurus alexandri* and *Rhinelepis áspera* (Melo et al., 2011). Morphological variation of the follicular cells depends on the maturation phase of the oocyte, since this cell is one of the first elements to organize in the germinal epithelium, which is directly related to the growth and maintenance of oocytes during the reproductive cycle (Grier, 2000; Quagio-Grassiotto & Guimarães, 2006). In mammals there is a paracrine relationship between the follicular cell and the oocyte, with protein expression and modulation, which promote folliculogenesis (Gilchrist & Armstrong, 2004). In the case of *H. zebra*, we believe that oogenesis is also mediated by the follicular cell.

The appearance of theca occurs in type II oocytes and reaches its maximum development in type IV oocytes. This structure is responsible for the production of testosterone which is converted into 17 β -estradiol through the follicular cells. This hormone will act on the liver to produce vitellogenin, which is responsible for the increase of yolk globules (Senthilkumaran et al. 2004). In addition, *H. zebra* presents laminin, collagen type IV and fibronectin in the theca layer, suggesting these elements have a strong influence on the organization of this layer since the beginning of the cell envelope organization from type I oocytes.

We observed extracellular matrix both in the basal lamina as well as in the ovarian parenchyma. Some authors reported that matrix elements are commonly associated with

the basal lamina of different ovarian cells (Rodgers, 2003; Berkholtz et al., 2006; Thomé et al., 2010). In the ovary of *H. zebra* the glycoproteins fibronectin and laminin type IV collagen displayed greater intensity from the oocytes type I and II, respectively. We believe that this organization of the matrix elements reinforce their role in the growth, maturation and differentiation of cells, which provide favorable microenvironments in the ovary *H. zebra* for oocyte growth.

In summary, based upon morphological and immunohistochemical analysis, we present a model for the oogenesis of the *H. zebra* (Figure 7). Throughout the gonadal development, the different types of oocytes in the ovaries of *H. zebra* have different characteristics in relation to the nucleus, diameter and cell envelope. The ECM components laminin, fibronectin and collagen type IV promote the development of the oocyte and the organization of the cell envelope. The information generated may contribute to reproductive biotechnology, assisting induced fertilization in order to support captive breeding and the conservation of this species

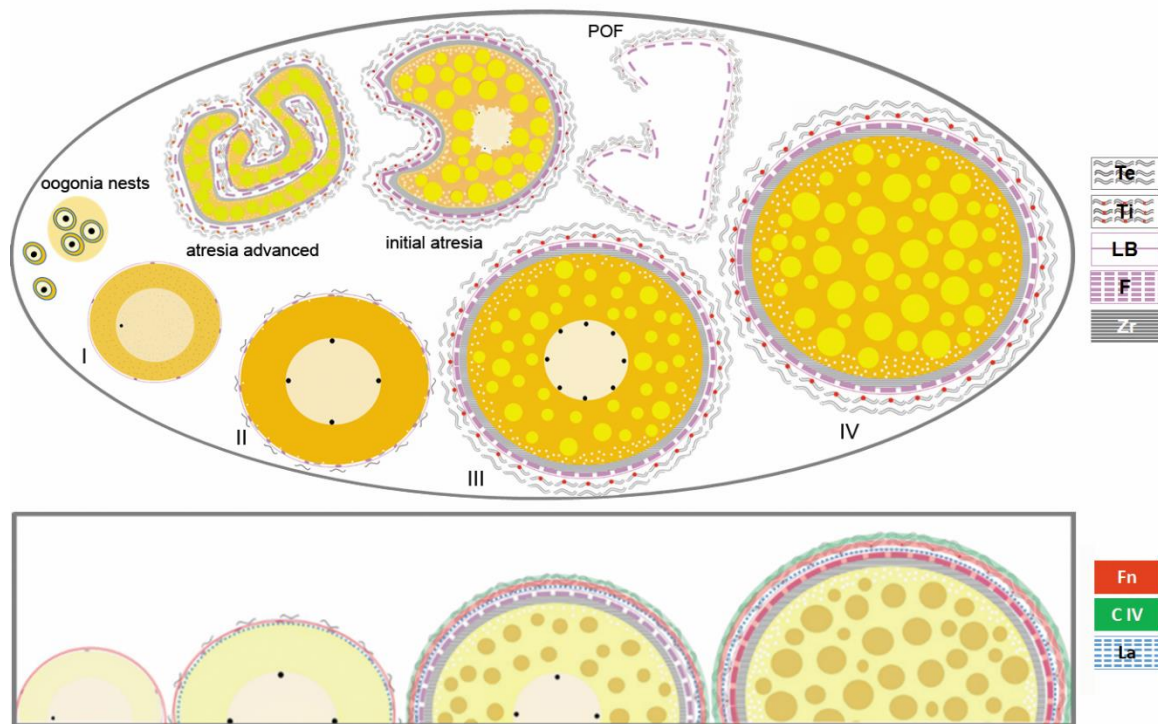


Fig.7 Proposal of oogenesis model and formation of cell envelope in *H. zebra* **a** - Oogonia that were individual in the ovary now form nests through projections of prefollicular cells, and subsequently differentiate into type I oocyte with peripheral or central nucleus with only one nucleolus, a basal lamina and squamous follicular cells. In the type II oocytes there is the appearance of the radiata zone, as well as a greater presence of squamous follicular cells, a basal lamina and the beginning of the theca organization. In the type III oocyte the nucleus has

several peripheral nucleoli and the cellular envelope is composed of the radiata zone, cuboid-shaped follicular cells and the theca. The type IV oocytes have the cytoplasm filled with yolk globules. The cellular envelope is thick, the internal theca formed by pavement cells is observed externally, and the external theca is composed of collagen fibers. After spawning, irregular POF is formed by follicular cells and theca. Oocytes at initial atresia are found in the ovary which exhibits a slight loss of its rounded configuration, irregular appearance and fragmentation of the nucleus; and advanced atresia with the absence of nucleus and totally disorganized oocyte. **b** - Fibronectin is found in the basal lamina of oocytes type I and II, in the theca of type III oocytes, in the follicular cells and theca of type IV oocyte. Laminin was found in the follicular cells, basal lamina and theca from type II oocyte, and the collagen type IV was found in the theca layer from type III oocyte accentuated in type IV

Acknowledgements

We are grateful to the National Council of Technological and Scientific Development (CNPQ) for the scholarship granted, to FAPESPA Agreement 070/2008 for financial support, the Technician José Augusto of Universidade Paulista (USP) of Ribeirão Preto for obtaining the electron micrographs.

References

- Abreu, M. R., P. Garcia & E. Zaniboni-Filho, 2015. Histological characterization of oocyte developmental stages of *suruvi Steindachneridion scriptum* kept in captivity. *Acta Scientiarum. Animal Sciences* Maringá: 351–356.
- Beck, K., I. Hunter & J. Engel, 1990. Structure and function of laminin: anatomy of a multidomain protein. *The FASEB Journal* 4: 148–160.
- Berkholtz, C. B., B. E. Lai, T. K. Woodruff & L. D. Shea, 2006. Distribution of extracellular matrix proteins type I collagen, type IV collagen, fibronectin, and laminin in mouse Folliculogenesis. *Histochemistry and Cell Biology* 126: 583–592.
- Brito, M. F. G., H. Lazzarotto & E.P. Caramaschi, 2016. Life-history features of a rapids-dwelling loricariid catfish from Atlantic forest streams, Brazil. *Biota Neotropica* 16: e20150068.
- Costa, E. F. S., J. F. Dias & H. Murua, 2015. Reproductive strategy and fecundity of the keystone species *Paralichthys brasiliensis* (Teleostei, Sciaenidae): an image processing techniques application. *Environmental Biology of Fishes* 98: 2093–2108.

- Duarte, S., F. G. Araújo, A. Sales & N. Bazzoli, 2007. Morphology of Gonads, Maturity and Spawning Season of *Loricariichthys spixii* (Siluriformes, Loricariidae) in a Subtropical Reservoir. *Brazilian Archives of Biology and Technology* 6: 1019–1032.
- García-Seoane, E., A. Bernal & F. Saborido-Rey, 2014. Reproductive ecology of the glacier lanternfish *Benthoosema glaciale*. *Hydrobiologia* 727: 137–149.
- Gilchrist, R.B., L. J. Ritter & D. T. Armstrong, 2004. Oocyte–somatic cell interactions during Follicle development in mammals. *Animal Reproduction Science* 82: 431–446.
- Gomes, I. D., F. G. Araújo, A. A. Nascimento & A. Sales, 2015. Equilibrium reproductive strategy of the armored catfish *Hypostomus auroguttatus* (Siluriformes, Loricariidae) in a tropical river in Southeastern Brazil. *Environmental Biology of Fishes* 98: 249–260.
- Grier, H., 2000. Ovarian Germinal Epithelium and Folliculogenesis in the Common Snook, *Centropomus undecimalis* (Teleostei: Centropomidae). *Journal of Morphology* 243: 265–281.
- Grier, H. J., 2012. Development of the Follicle Complex and Oocyte Staging in Red Drum, *Sciaenops ocellatus* Linnaeus, 1776 (Perciformes, Sciaenidae). *Journal of Morphology* 273: 801–829.
- Isbrucker, I. J. H. & H. Nijssen, 1991. *Hypancistrus zebra*, a new genus and species of uniquely pigmented ancistrine loricariid fish from the Rio Xingu, Brazil (Pisces: Siluriformes: Loricariidae). *Ichthyology Explorer Freshwater* 4: 345–350.
- Jalabert, B., 2005. Particularities of reproduction and oogenesis in teleost fish compared to mammals. *Reproduction Nutrition Development* 45: 261–279.
- Jiang, Y. Q., T. T. Zhang & W. X. Yang, 2010. Formation of zona radiata and ultrastructural analysis of egg envelope during oogenesis of Chinese perch *Siniperca chuatsi*. *Micron* 41: 7–14.
- Kagawa, H., 2013. Oogenesis in Teleost Fish. *Aqua-BioScience Monographs* 6: 99–127.
- Kim, S. H., J. Turnbull & S. Guimond, 2011. Extracellular matrix and cell signalling: the dynamic cooperation of integrin, proteoglycan and growth factor receptor. *Journal of Endocrinology* 209: 139–151.
- Kolm, N. & I. Ahnesjö, 2005. Do egg size and parental care coevolve in fishes?. *Journal of Fish Biology* 66: 1499–1515.
- Melo, R. M. C., F. P. Arantes, Y. Sato, J. E. Santos, E. Rizzo & N. Bazzoli, 2011. Comparative Morphology of the Gonadal Structure Related to Reproductive Strategies

- in Six Species of Neotropical Catfishes (Teleostei: Siluriformes). *Journal of Morphology* 272: 525–535.
- Murata, K., F. S. Conte, E. McInnis, T. H. Fong & G. N. Cherr, 2014. Identification of the Origin and Localization of Chorion (Egg Envelope) Proteins in an Ancient Fish, the White Sturgeon, *Acipenser transmontanus*. *Biology of Reproduction* 90: 1–12.
- Murua, H. & F. Saborido-Rey, 2003. Female reproductive strategies of marine fish of the North Atlantic. *Journal of Northwest Atlantic Fishery Science* 33: 23–31.
- Murua, H., L. Motos, 2006. Reproductive strategy and spawning activity of the European hake *Merluccius merluccius* (L.) in the Bay of Biscay. *Journal of Fish Biology* 69: 1288–1303.
- Nagahama, Y., 1983. The functional morphology of teleost gonads. In Hoar, H. S., Randall, D. J. and Donaldson, E. M., eds. *Reproduction — Endocrine Tissues and Hormones*. New York: Academic Press, 223–75.
- Núñez, J. & F. Duponchelle, 2009. Towards a universal scale to assess sexual maturation and related life history traits in oviparous teleost fishes. *Fish Physiology and Biochemistry* 35: 167–180.
- Paschoalini, A. L., V. R. Perini, D. M. Ribeiro, P. S. Formagio, E. Rizzo & N. Bazzoli, 2013. Reproduction of *Pimelodus maculatus* (Siluriformes: Pimelodidae) in three section of Grande River basin, downstream Porto Colombia dam, south-eastern Brazil. *Neotropical Ichthyology*, 11: 615–623.
- Patiño, R. & C. V. Sullivan, 2002. Ovarian follicle growth, maturation, and ovulation in teleost fish. *Fish Physiology and Biochemistry* 26: 57–70.
- Perini, V. R., Y. Sato, E. Rizzo & N. Bazzoli, 2013. Comparative Analysis of the Oocytes and Early Development of Two Species of Curimatidae Teleost Fish. *Anatomia Histologia Embryologia* 42: 40–47.
- Prophet, E. B., B. Mills, J. B. Arrington & L. H. Sabin, 1995. *Métodos Histotecnológicos*. Washington, D. C. Instituto de patología de las Fuerzas Armadas: 1–280.
- Prudente, B. S., M. A. P. Ferreira, R. M. Rocha & L. F. A. Montag, 2015. Reproductive biology of the piranha *Serrasalmus gouldingi* (Fink and Machado-Allison 1992) (Characiformes: Serrasalminidae) in “drowned” rivers of the Eastern Amazon. *Environmental Biology of Fishes* 98: 11–22.

- Quagio-Grassiotto, I. & A. C. D. Guimarães, 2006. Follicular epithelium, theca and egg envelope formation in *Serrasalmus spilopleura* (Teleost, Characiformes, Characidae). *Acta Zoologica* 84: 121–129.
- Quagio-Grassiotto, I., H. Grier, T. S. Mazzoni, R. H. Nobrega & J. P. A. Amorim, 2011. Activity of the Ovarian Germinal Epithelium in the Freshwater Catfish, *Pimelodus maculatus* (Teleostei: Ostariophysi: Siluriformes): Germline Cysts, Follicle Formation and Oocyte Development. *Journal of Morphology* 272: 1290–1306.
- Quagio-Grassiotto, I., D. D. Wildnera & A. C. D. Guimarães-Bassolic, 2014. A cytochemical approach to describe oocyte development in the freshwater ostariophysan, *Serrasalmus maculatus* (Characiformes). *Micron* 60: 18–28.
- Rodgers, R. J., H. F. Irving-Rodgers & D. L. Russell, 2003. Extracellular matrix of the developing ovarian follicle. *Reproduction* 126: 415–424.
- Rosa, R. S. & F. C. T. Lima, 2008. Os Peixes Brasileiros Ameaçados de Extinção. In: Machado, A. B. M, G. M. Drumond, A. P. Paglia. *Livro Vermelho da Fauna Brasileira Ameaçada de Extinção*. Fundação Biodiversitas Biodiversidade 19: 8–285.
- Sales, C. F., F. F. T. Domingos, L. S. Brighenti, R. I. M. A. Ribeiro, H. B. Santos & R. G. Thomé, 2016. Biological variables of *Hypostomus francisci* (Siluriformes: Loricariidae) from Itapecerica River, Minas Gerais State, Brazil. *Annals of the Brazilian Academy of Sciences* 88: 1603–1614.
- Santos, J. E., G. E. V. Padilha, O. Bomcompagni-Junior, G. B. Santos, E. Rizzo & N. Bazzoli, 2006. Ovarian follicle growth in the catfish *Iheringichthys labrosus* (Siluriformes: Pimelodidae). *Tissue and Cell* 38: 303–310.
- Santos-Silva, A. P., D. H. Siqueira-Silva, A. Ninhaus-Silveira & R. Veríssimo-Silveira, 2015. Oogenesis in *Laetacara araguaiae* (Ottoni and Costa, 2009) (Labriformes: Cichlidae). *Zygote*: 1–9.
- Selman, K. & R. A. Wallace, 1989. Cellular aspects of oocyte growth in teleosts. *Zoological Science* 6: 211–231.
- Senthilkumaran, B., M. Yoshikuni & Y. Nagahama. 2004. A shift in steroidogenesis occurring in ovarian follicles prior to oocyte maturation. *Molecular and Cellular Endocrinology* 215: 11–18.
- Silva, T. C. G., D. P. Cavalcante & H. L. Queiroz, 2013. Aspects of the reproductive biology of *aequidens tetramerus* (cichlidae) in várzea areas of the middle solimões river, brazilian amazon. *UAKARI* 9: 63–74.

- Susuki, H. I., A. A. Agostinho & K. O. Winemiller, 2000. Relationship between oocyte morphology and reproductive strategy in loriciariid catfishes of the Paraná River, Brazil. *Journal of Fish Biology* 57: 791–807.
- Thomé, R., H. B. Santos, Y. Sato, E. Rizzo & N. Bazzoli, 2010. Distribution of laminin b2, collagen type IV, fibronectina and MMP-9 in ovaries of the teleost fish. *Journal of Molecular Histology* 41: 215–224.
- Tyler, C. R. & J. P. Sumpter, 1996. Oocyte growth and development in teleosts. *Reviews in Fish Biology and Fisheries* 6: 287–318.
- Uribe, M. C., H. J. Grier, A. García-Alarcón, & L. R. Parenti, 2016. Oogenesis: From Oogonia to Ovulation in the Flagfish, *Jordanella floridae* Goode and Bean, 1879 (Teleostei: Cyprinodontidae). *Journal of Morphology* 277: 1339–1354.
- Wallace, R. A. & K. Selman, 1981. Cellular and dynamic aspects of oocyte growth in teleosts. *American Zoologist* 21: 325–343.
- Wierzbicka-Patynowski, I. & J. E. Schwarzbauer, 2003. The ins and outs of fibronectin matrix assembly. *Journal of cell science* 116: 3269–3276.
- Winemiller, K. O. & K. A. Rose, 1992. Patterns of Life-History Diversification in North American Fishes: Implications for Population Regulation. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 49: 2196–2218.
- Winemiller, K. O., P. B. McIntyre, L. Castello, E. Fluett-Chouinard, T. Giarrizzo, S. Nam, I. G. Baird, W. Darwall, N. K. Lujan, I. Harrison, M. L. J. Stiassny, R. A. M. Silvano, D. B. Fitzgerald, F. M. Pelicice, A. A. Agostinho, L. C. Gomes, J. S. Albert, E. Baran, M. Petrere Jr, C. Zarfl, M. Mulligan, J. P. Sullivan, C. C. Arantes, L. M. Sousa, A. A. Koning, D. J. Hoeinghaus, M. Sabaj, J. G. Lundberg, J. Armbruster, M. L. Thieme, P. Petry, J. Zuanon, G. T. Vilara, J. Snoeks, C. Ou, W. Rainboth, C. S. Pavanelli, A. Akama, A. van Soesbergen & L. Sáenz, 2016. Balancing hydropower and biodiversity in the Amazon, Congo, and Mekong. *Science* 351: 128–129.

ANEXOS

NORMAS DA REVISTA HYDROBIOLOGIA

Instructions for Authors (Online Submission)

Title Page

The title page should include:

The name(s) of the author(s)

A concise and informative title

The affiliation(s) and address(es) of the author(s)

The email address, telephone and fax numbers of the corresponding author

Abstract

Please provide an abstract of 150 to 200 words. Abstracts longer than 200 words cannot be uploaded. The abstract should not contain any undefined abbreviations or unspecified references.

Keywords

Please provide 4 to 6 keywords which can be used for indexing purposes.

Text Formatting

Manuscripts should be submitted in Word.

Use a normal, plain font (e.g., 10point Times Roman) for text.

Use italics for emphasis.

Use the automatic page numbering function to number the pages.

Do not use field functions.

Use tab stops or other commands for indents, not the space bar.

Use the table function, not spreadsheets, to make tables.

Use the equation editor or MathType for equations.

Save your file in docx format (Word 2007 or higher) or doc format (older Word versions).

Manuscripts with mathematical content can also be submitted in LaTeX.

LaTeX macro package (zip, 182 kB)

Abbreviations

Abbreviations should be defined at first mention and used consistently thereafter.

Acknowledgments

Acknowledgments of people, grants, funds, etc. should be placed in a separate section on the title page. The names of funding organizations should be written in full.

References

References in the text will use the name and year system: Adam & Eve (1983) or (Adam & Eve, 1983). For more than two authors, use Adam et al. (1982). References to a particular page, table or figure in any published work is made as follows: Brown (1966: 182) or Brown (1966: 182, fig. 2). Cite only published items; grey literature (abstracts, theses, reports, etc) should be avoided as much as possible. Papers which are unpublished or in press should be cited only if formally accepted for publication.

References will follow the styles as given in the examples below, i.e. journals are NOT abbreviated (as from January 2003), only volume numbers (not issues) are given, only normal fonts are used, no bold or italic.

Engel, S. & S. A. Nichols, 1994. Aquatic macrophytes growth in a turbid windswept lake. *Journal of Freshwater Ecology* 9: 97–109.

Horne, D. J., A. Cohen & K. Martens, 2002. Biology, taxonomy and identification techniques. In Holmes, J. A. & A. Chivas (eds), *The Ostracoda: Applications in Quaternary Research*. American Geophysical Union, Washington DC: 6–36.

Maitland, P. S. & R. Campbell, 1992. *Fresh Water Fishes*. Harper Collins Publishers, London.

Tatrai, I., E. H. R. R. Lammens, A. W. Breukelaar & J. G. P. Klein Breteler, 1994. The impact of mature cyprinid fish on the composition and biomass of benthic macroinvertebrates. *Archiv für Hydrobiologie* 131: 309–320.

Electronic Figure Submission

Supply all figures electronically.

Indicate what graphics program was used to create the artwork.

For vector graphics, the preferred format is EPS; for halftones, please use TIFF format. MSOffice files are also acceptable.

Vector graphics containing fonts must have the fonts embedded in the files.

Name your figure files with "Fig" and the figure number, e.g., Fig1.eps

Line Art

Definition: Black and white graphic with no shading.

Do not use faint lines and/or lettering and check that all lines and lettering within the figures are legible at final size.

All lines should be at least 0.1 mm (0.3 pt) wide.

Scanned line drawings and line drawings in bitmap format should have a minimum resolution of 1200 dpi.

Vector graphics containing fonts must have the fonts embedded in the files.

Combination Art

Definition: a combination of halftone and line art, e.g., halftones containing line drawing, extensive lettering, color diagrams, etc.

Combination artwork should have a minimum resolution of 600 dpi.

Figure Lettering

To add lettering, it is best to use Helvetica or Arial (sans serif fonts).

Keep lettering consistently sized throughout your finalized artwork, usually about 2–3 mm (8–12 pt).

Variance of type size within an illustration should be minimal, e.g., do not use 8pt type on an axis and 20pt type for the axis label.

Avoid effects such as shading, outline letters, etc.

Do not include titles or captions within your illustrations.

Figure Numbering

All figures are to be numbered using Arabic numerals.

Figures should always be cited in text in consecutive numerical order.

Figure parts should be denoted by lowercase letters (a, b, c, etc.).

If an appendix appears in your article and it contains one or more figures, continue the consecutive numbering of the main text. Do not number the appendix figures, "A1, A2, A3, etc."

Figures in online appendices (Electronic Supplementary Material) should, however, be numbered separately.

AUTORIZAÇÃO SISBIO



Ministério do Meio Ambiente - MMA
 Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade - ICMBio
 Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - SISBIO

Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 54088-1	Data da Emissão: 23/05/2016 14:38	Data para Revalidação*: 22/06/2017
* De acordo com o art. 28 da IN 03/2014, esta autorização tem prazo de validade equivalente ao previsto no cronograma de atividades do projeto, mas deverá ser revalidada anualmente mediante a apresentação do relatório de atividades a ser enviado por meio do Sisbio no prazo de até 30 dias a contar da data do aniversário de sua emissão.		

Dados do titular

Nome: IVANA KERLY DA SILVA VIANA	CPF: 964.2XXXXX
Título do Projeto: Estudo da Gametogênese de <i>Hypancistrus zebra</i> (Isbrucker & Nijssen, 1991)	
Nome da Instituição : UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ	CNPJ: 34.621.748/0001-23

Material e métodos

1	Método de captura/coleta (Peixes)	Captura manual, Coleta manual
---	-----------------------------------	-------------------------------

Destino do material biológico coletado

#	Nome local destino	Tipo Destino
1	UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ	

Este documento (Autorização para atividades com finalidade científica) foi expedido com base na Instrução Normativa nº 03/2014. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Sisbio/ICMBio na Internet (www.icmbio.gov.br/sisbio).

Código de autenticação: 87972954



Página 2/3

CERTIFICADO COMISSÃO DE ÉTICA UFPA



UFPA
Universidade Federal do Pará

**Comissão de Ética no
Uso de Animais**

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Estudo da Gametogênese de *Hypancistrus zebra* (Isbrucker & Nijssen, 1991)", protocolado sob o CEUA nº 3603020816, sob a responsabilidade de *Rossineide Martins Da Rocha e equipe; Ivana Kerly Da Silva Viana; Maria Auxiliadora Pantoja Ferreira; Renata Silva De Oliveira; Yanne Alves Mendes* - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei 11.794, de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899, de 15 de julho de 2009, com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais do Universidade Federal do Pará (CEUA/UFPA) em reunião de 29/09/2016.

We certify that the proposal "Study Gametogenesis of *Hypancistrus zebra* (Isbrucker & Nijssen, 1991)", utilizing 30 Fishes (males and females), protocol number CEUA 3603020816, under the responsibility of *Rossineide Martins Da Rocha and team; Ivana Kerly Da Silva Viana; Maria Auxiliadora Pantoja Ferreira; Renata Silva De Oliveira; Yanne Alves Mendes* - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes (or teaching) - it's in accordance with Law 11.794, of October 8 2008, Decree 6899, of July 15, 2009, with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was approved by the Ethic Committee on Animal Use of the Federal University of Para (CEUA/UFPA) in the meeting of 09/29/2016.

Vigência da Proposta: de 09/2016 a 09/2019

Área: Instituto De Ciências Biológicas

Procedência: Campus de Altamira

Espécie: Peixes

Gênero: Machos e Fêmeas

Idade: 1 a 12 meses N: 30

Linhagem: *Hypancistrus zebra*

Peso: 2 a 6 g

Resumo: Acari zebra, *Hypancistrus zebra* (Isbrucker e Nussen, 1991) é uma espécie de peixe da família Loricariidae que possui um grande potencial para a pesca de peixes ornamental. Endêmico do rio Xingu-Pará, essa espécie atualmente se encontra ameaçada de extinção. Desta forma torna-se importante conhecer a biologia reprodutiva para desenvolver reprodução induzida para fins comerciais e de preservação. Os exemplares serão coletados no trecho do médio inferior rio Xingu entre a localidade de Gorgulho da Rita e a vila de Belo Monte, Altamira/ PA, após serão levados ao laboratório de ultraestrutura celular para a realização das técnicas de imunistoquímica e microscopia de luz.

Belém do Pará, 30 de setembro de 2016

Prof. Dr. Moisés Hamoy
Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal do Pará