

CLAUDIA ROCHA

ANÁLISES HISTOQUÍMICAS DA OVOGÊNESE DE
Sphoeroides testudineus (Linnaeus, 1758), TETRAODONTIDAE

Monografia apresentada para obtenção
do título de Bacharel em Ciências
Biológicas, Universidade Federal do
Paraná.

Orientador: Prof. Marco A. F. Randi

CURITIBA

2000

Dedico aos meus pais,
Alvacir e Rosi

AGRADECIMENTOS

Agradeço em primeiro lugar a minha família e ao meu noivo Agnaldo pelo apoio, compreensão e paciência;

Aos colegas da faculdade, em especial à Juçara, Elaine, Luciana, Carolina, Ana Paula, Fernanda e Mariana, pela companhia, pelos momentos de descontração e até mesmos pelas discussões, pois nos fizeram amadurecer;

Ao Yart, pela “co-orientação” na iniciação científica; Ao Prof. Dr. Ciro e a todos os colegas do laboratório de Toxicologia pela convivência harmônica;

Ao amigo Zão, pela orientação, conselhos e confiança;

Ao Prof. Dr. Henry por ter acreditado em meu potencial, pelas idéias, conselhos e por todo apoio;

Ao Centro de Estudos do Mar – CEM, pela estrutura oferecida para o desenvolvimento deste e de outros trabalhos;

Ao Laboratório de Fotomicroscopia do Setor de Ciências Biológicas, por disponibilizar os equipamentos;

Ao Prof. Marco A. F. Randi pela orientação, dedicação e por me fazer pensar.

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS	iii
SUMÁRIO	iv
RESUMO	v
INTRODUÇÃO	1
JUSTIFICATIVA	3
OBJETIVOS	4
Objetivo geral	4
Objetivos específicos	4
MATERIAL E MÉTODOS	5
RESULTADOS	7
Detecção de nucléolo	7
Detecção de compostos ácidos	7
Detecção de carboidratos ácidos	8
Detecção de carboidratos neutros	8
Detecção de proteínas totais	8
Detecção de dna (cromatina)	9
DISCUSSÃO	16
CONCLUSÕES	20
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	21
ANEXOS	23
Técnica da banda NOR	23
Técnica azul de toluidina	23
Técnica de azul de alcian	24
Técnica de ácido periódico-shiff (PAS)	24
Técnica de <i>fast green</i> ácido	25
Técnica da reação de Feülgen	25
Técnica de hematoxilina-férrica	26
Técnica <i>acridine-orange</i>	26

RESUMO

ANÁLISES HISTOQUÍMICAS DA OVOGÊNESE DE *Sphoeroides testudineus* (Linnaeus, 1758), TETRAODONTIDAE

Sphoeroides testudineus é uma espécie componente da ictiofauna de fundo de regiões etuarinas pouco profundas, onde se alimenta de macro e microinvertebrados. Apesar de serem venenosas, espécies de Tetraodontiformes são consumidas frequentemente em países asiáticos, sendo pouco explorados comercialmente no Brasil, onde a literatura sobre a biologia destes animais é escassa. Estudos sobre o desenvolvimento ovariano, com vistas a um estabelecimento do ciclo reprodutivo destes animais, foram realizados, caracterizando esta espécie como tendo ciclo reprodutivo anual. O presente trabalho visa elucidar aspectos histoquímicos da ovogênese de *S. testudineus*, uma vez que pouco se conhece a respeito desse assunto, inclusive para outras espécies de peixes. Assim, foram coletados exemplares na gambôa do Baguaçu, Baía de Paranaguá, que tiveram suas gônadas fixadas em Bouin e submetidas a técnicas citoquímicas diversas, após uma caracterização morfológica padrão. Foram utilizadas as seguintes técnicas : (1) Banda NOR para detecção de nucléolos; (2) azul de toluidina em pH4,0 para detecção de compostos ácidos; (3) azul de alcian (pH 2,5 e 1,0) para evidenciação de carboidratos ácidos carboxilados e sulfatados; (4) ácido periódico-Schiff (PAS) para detecção de carboidratos neutros; (5) *fast green* ácido (pH2,5), para evidenciação de proteínas totais; (6) hematoxilina férrica para detecção de compostos ácidos, especialmente ácidos nucleicos, além de proteínas redutoras; (7) reação de Feülgen para detecção de DNA; (8) *acridine orange* para evidenciação de RNA e DNA. Os nucléolos foram demonstrados, evidenciando-se únicos nas fases iniciais e numerosos nas fases mais avançadas. Nas fases iniciais estão presentes carboidratos ácidos; os carboidratos neutros foram detectados

especialmente nos grânulos de vitelo, no final do desenvolvimento ovocitário. Proteínas totais se apresentam nas fases iniciais, na membrana vitelina e nas margens dos grânulos de vitelo e em quantidade reduzida no interior destes grânulos, permitindo inferir que a composição do vitelo para esta espécie consista, principalmente, de glicoproteínas. As técnicas de detecção de ácidos nucleicos deixam evidente um intenso processo de síntese nas fases iniciais, que diminui nas fases mais avançadas. O decréscimo gradativo da basofilia citoplasmática e o aparecimento de numerosos nucléolos permite subdividir as fases inicialmente propostas II e IV em subfases (inicial e final). A cromatina se encontra muito frouxa desde as fases iniciais, dificultando sua visualização mesmo pela reação de Feülgen. As células foliculares responderam positivamente a todas as técnicas, ao contrário das vesículas citoplasmáticas de ovócitos na fase III, que não apresentaram coloração em qualquer das técnicas utilizadas, devendo se tratar de lipídios removidos durante o processamento histológico.

Palavras-chave: citoquímica, ovogênese, peixes

INTRODUÇÃO

Os estuários constituem ecossistemas de grande importância para reprodução e desenvolvimento de várias espécies de peixes, os quais geralmente possuem alta capacidade de adaptação a grandes variações de salinidade e temperatura.

Segundo CHAVES & OTTO (1998), tetraodontiformes são comuns na ictiofauna de fundo em regiões de ambiente estuário-manguezal, cuja maior perturbação se restringe à pesca artesanal e ao turismo. FIGUEIREDO & MENEZES (2000) relatam a presença de *Sphoeroides testudineus*, conhecido popularmente como Baiacu, de Nova Jersey (EUA) até o estado de Santa Catarina (Brasil).

Na Ásia ocorrem outras espécies de baiacus, sendo que no Japão sua carne é muito apreciada e de alto valor comercial. Apesar do seu baixo valor econômico no Brasil, principalmente devido à presença de uma toxina (tetrodotoxina) concentrada na pele, no fígado e nas gônadas, estas espécies são de grande importância para a manutenção dos ambientes estuarinos, uma vez que são predadores de invertebrados. Um estudo feito por TARGETT (1978) constatou, em *S. testudineus*, um hábito alimentar rico em anfípodas, isópodas, bivalves, gastrópodas, sipunculídeos, cracas, algas e detritos.

MATSUMURA (1995) propôs que a tetrodotoxina seja um ferormônio feminino, que tem por função atrair os machos. De fato, os folículos ovarianos liberados possuem alta concentração de tetrodotoxina na membrana vitelina, a qual induz o macho a liberar os espermatozoides na água.

Segundo DIAS *et. al* (1998), estudos reprodutivos de teleósteos têm importância tanto teórica quanto prática por possibilitarem não só a compreensão dos mecanismos envolvidos na perpetuação e modificação da espécie, mas também do uso que os indivíduos de uma espécie fazem de um sistema ou área; estes dados permitem aprimorar a administração pesqueira e a aquicultura.

Os aspectos geralmente abordados nos trabalhos de reprodução são: (1) o fator de condição, como indicador do período de desova; (2) o tipo de desova e fecundidade; (3) a escala de maturidade; (4) o tamanho da primeira maturação; (5) estudos morfológicos e (6) demonstrações citoquímicas.

O ovócito e seus componentes citoplasmáticos (núcleo vitelínico, vesículas e glóbulos de vitelo), bem como as membranas que fazem parte do folículo ovariano (membrana vitelínica e células foliculares) podem ser analisados através de diferentes técnicas citoquímicas. GUTIERREZ *et al.* (1985) em um estudo citoquímico propôs a presença de mucosubstâncias ácidas e glicoproteínas no citoplasma de ovócitos vitelogênicos de *Solea senegalensis* Kaup. De acordo com RAMADAN *et al.* (1979) a formação de vitelo em peixes tem mostrado numerosas variações na origem, no número e nas transformações de inclusões de vitelo durante a ovogênese. As inclusões podem conter gordura, proteína ou glicogênio, podendo os dois últimos ocorrerem associados. Os autores diferenciaram dois tipos de glóbulos de vitelo de *Merluccius* sp.: glóbulos perinucleares (contendo glicogênio) e glóbulos periféricos (contendo glicoproteínas).

Segundo ROCHA *et al.* (1999) a ovogênese de *S. testudineus* apresenta 4 fases ovocitárias, determinadas por análises microscópicas de material corado com hematoxilina e eosina. A fase I (FI) corresponde ao estágio de ovogônia, com citoplasma reduzido; o núcleo é grande e ocupa quase toda a célula, e o nucléolo é único e central; esta fase é de difícil visualização. Na fase II (FII) a célula apresenta um volume maior, com citoplasma bem visível, porém ainda reduzido se comparado com o tamanho do núcleo; os nucléolos se apresentam numerosos e periféricos. A célula na fase III (FIII) é caracterizada por apresentar um tamanho maior, pela presença de membrana vitelina e vesículas citoplasmáticas não coradas. A fase IV (FIV) caracteriza-se pelo grande volume celular, com citoplasma repleto de grânulos de vitelo.

JUSTIFICATIVA

Apesar de serem numerosos os trabalhos de caracterização morfológica da ovogênese em peixes (VIZZIANO & BEROIS, 1990; FÁVARO & CHAVES, 1999; BARBIERI & BARBIERI, 1985; AGOSTINHO *et. al*, 1987; ZANIBONI & RESENDE, 1988; SILVA & ESPER, 1991), pouco se publica sobre avaliações citoquímicas e histoquímicas dos folículos ovarianos. Qualquer material nessa área será sempre de grande valia no melhor entendimento dos processos envolvidos na reprodução animal.

A determinação dos principais componentes químicos, bem como a sua distribuição nas diferentes fases ovocitárias para *S. testudineus*, complementam a descrição ovocitária e ovariana feita por ROCHA *et al.* (1999).

OBJETIVOS

Objetivo geral

O presente estudo visa um maior conhecimento da composição química das diferentes fases ovocitárias de *S. testudineus*, através de diferentes técnicas citoquímicas.

Objetivos específicos

- Caracterizar a presença e a evolução do nucléolo ao longo do processo de desenvolvimento ovocitário;
- Detectar a presença de macromoléculas ácidas (RNA e carboidratos ácidos) e neutras (carboidratos) no citoplasma dos ovócitos, em todas as fases de desenvolvimento, bem como das membranas envoltórias;
- Demonstrar a existência de DNA e proteínas nas referidas células, bem como sua distribuição.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram coletados 582 exemplares de *S. testudineus*, totalizando 13 coletas mensais de novembro de 1998 a novembro de 1999, na gamboa do Bagaçu, Baía de Paranaguá (PR), utilizando-se uma rede tipo "Fyke" (30 x 1,5m) com malhas de 10mm e 8mm.

Os exemplares coletados foram transportados ao Laboratório de Ictioplâncton do Centro de Estudos do Mar, em Pontal do Sul (PR), seccionados ventralmente, expondo as gônadas para determinação do sexo e estágio de maturidade gonadal macroscópico baseado na chave de identificação de estádios para teleósteos (VAZZOLER, 1996).

Algumas gônadas foram fixadas em Bouin por 18 horas e conservadas em álcool 70%, sendo posteriormente desidratadas em série crescente de álcoois (70%, 80%, 90%, 100%), diafanizadas em xilol e incluídas em parafina.

Os cortes foram feitos com espessura de 5µm, distendidos em lâminas histológicas e submetidas às seguintes técnicas histoquímicas: (1) Banda NOR; (2) azul de toluidina a pH4,0 para detecção de compostos ácidos; (3) azul de alcian (pH2,5 e pH1,0) para evidenciação de carboidratos ácidos carboxilados e sulfatados; (4) Ácido Periódico-Schiff (PAS) para detecção de carboidratos neutros; (5) *fast green* ácido (pH2,5) para evidenciação de proteínas totais; (6) hematoxilina férrica para detecção de proteínas redutoras e ácidos nucleicos; (7) reação de Feülgen para detecção de DNA e (8) *acridine orange* para evidenciação de RNA. Os protocolos utilizados para cada uma das referidas técnicas estão em anexo.

Para a reação de Feülgen foi realizada uma curva de hidrólise, para se obter o melhor tempo de reação com o ácido clorídrico. As condições de hidrólise foram HCl 4 mol/L, na temperatura de 25°C, por tempos de 5min a 75min com intervalos de 5min.

Posteriormente, as lâminas confeccionadas foram analisadas em microscopia de luz e fotografadas no laboratório de fotomicroscopia do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná.

RESULTADOS

DETECÇÃO DE NUCLÉOLO

A técnica de Banda NOR (Nucleolar Organizing Region) utiliza-se de uma solução de nitrato de prata para detecção de nucléolos, uma vez que este apresenta, em sua composição, proteínas redutoras de prata. A reação tem como produto a precipitação do metal, apresentando coloração castanho escuro.

No material estudado ficaram evidentes os nucléolos, unitários nas fases iniciais FI e FII, numerosos e periféricos ao final da fase II, possibilitando uma nova classificação. Estas estruturas permanecem numerosas nas fases mais avançadas; a reação também foi observada nas células foliculares e nos grânulos de vitelo da FIV (fig. 1).

DETECÇÃO DE COMPOSTOS ÁCIDOS

A técnica de azul de toluidina foi utilizada para evidenciar compostos ácidos, por se tratar de um corante básico; em pH4,0 o corante reage com radicais fosfato, carboxila e sulfato (ácidos nucleicos e carboidratos, principalmente).

Observou-se uma grande afinidade a este corante no citoplasma das fases iniciais nas células foliculares em todas as fases. Nas fases mais avançadas da ovogênese o citoplasma diminui a basofilia. Além disto os nucléolos responderam positivamente em todas as fases. Os grânulos de vitelo, no início da fase IV (FIV), apresentaram-se basófilos apenas em suas margens; num estágio um pouco mais avançado desta mesma fase, estes grânulos deixam de apresentar basofilia (fig. 2).

DETECÇÃO DE CARBOIDRATOS ÁCIDOS

O corante azul de alcian em pH 2,5 reage positivamente com carboidratos ácidos carboxilados e sulfatados, enquanto que em pH 1,0 evidencia apenas carboidratos ácidos sulfatados. Tanto carboidratos carboxilados como sulfatados foram encontrados apenas no citoplasma das fases iniciais de desenvolvimento ovocitário (FI e FII), sempre com coloração pouco intensa, e nas células foliculares de todas as fases (fig. 3).

DETECÇÃO DE CARBOIDRATOS NEUTROS

O ácido periódico quebra ligações entre carbonos que apresentam grupos hidroxila, glicóis e amino, produzindo grupamentos aldeídicos que são evidenciados pelo reativo de Schiff; nisso consiste a técnica de PAS. Esta técnica indicou carboidratos neutros em alta concentração nos grânulos de vitelo da FIV e na membrana vitelina da FIII. Quantidades moderadas deste componente foram identificadas no citoplasma de células FIII e na membrana vitelina na FIV, como também nas células foliculares em todas as fases, (fig. 4A).

DETECÇÃO DE PROTEÍNAS TOTAIS

Fast green ácido (pH 2,5) é um indicador da presença de proteínas totais, as quais foram observadas em grande quantidade nas células foliculares e nucléolos de todas as fases ovocitárias, na membrana vitelina da FIII e FIV; e nos grânulos de vitelo de FIV apresentam-se bem corados, sendo nas margens a maior intensidade de coloração. O citoplasma mostra uma intensidade moderada em todas as fases (fig. 4B e C).

DETECÇÃO DE DNA (CROMATINA)

A reação de Feülgen consiste na quebra da ligação purina-desoxirribose deixando livres grupamentos aldeídos na desoxirribose; estes grupamentos reagem com reativo de Schiff formando composto magenta. A intensidade de coloração é proporcional à quantidade de DNA.

O material de estudo foi submetido a esta técnica, porém não foram obtidos resultados positivos para os ovócitos em nenhum dos quinze tempos de hidrólise testados. A reação para células foliculares foi positiva, indicando a viabilidade da reação.

A hematoxilina-férrica evidencia proteínas redutoras de ferro, além de possibilitar uma coloração de fundo dos compostos ácidos. O resultado foi positivo nas células foliculares e nos nucléolos em todas as fases, corando também a periferia dos grânulos de vitelo em algumas células da FIV, além de provocar uma intensa basofilia no citoplasma das células em início de fase II. Esta técnica permitiu ainda a visualização de cromosomas, provavelmente cromosomas plumosos (fig. 5).

A técnica de fluorescência pelo *acridine-orange* foi utilizada para detectar DNA (fluorescência vermelha) e RNA (fluorescência verde). Só foi observada fluorescência verde, com maior intensidade no citoplasma das fases iniciais do desenvolvimento ovocitário, na periferia dos grânulos de vitelo da FIV e nos nucléolos de todas as fases (fig. 6). Houve também fluorescência de fundo (*background*) devida à presença do formol utilizado na fixação.

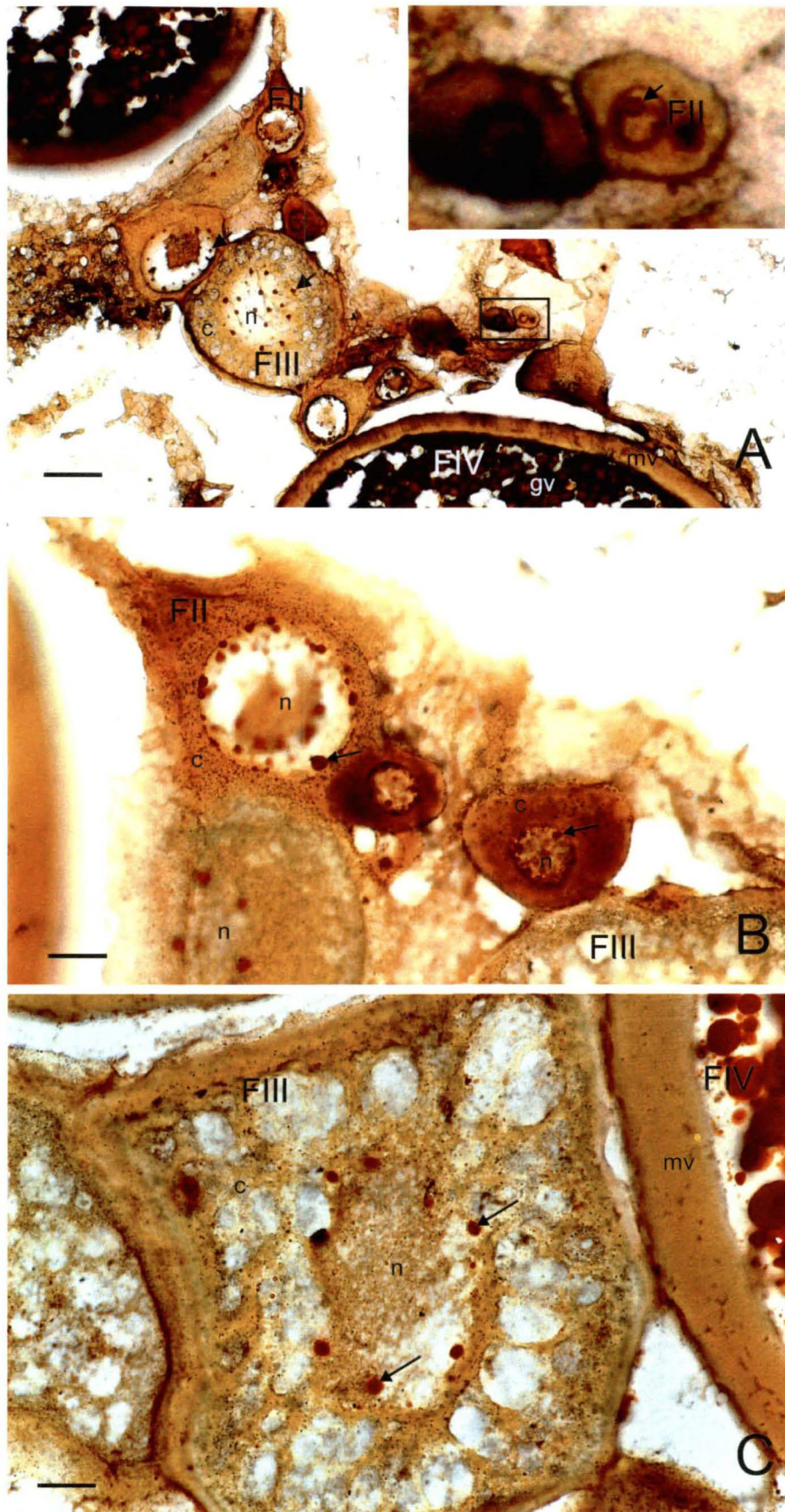


Figura 1 - Ovário de *S. testudineus* corado pela técnica de banda NOR, para evidenciação de nucléolo. As setas apontam os nucléolos. Observe que na fase II o nucléolo é inicialmente único, fragmentando-se depois. Também, os grânulos de vitelo (gv) intensamente marcados na fase IV. No inserto da figura 1A, uma ampliação da região enquadrada. n = núcleo; c = citoplasma; mv = membrana vitelina. FII = fase II, FIII = fase III; FIV = fase IV do desenvolvimento ovocitário (vide texto). Barras: A = 50 μ m; B e C = 15,9 μ m.

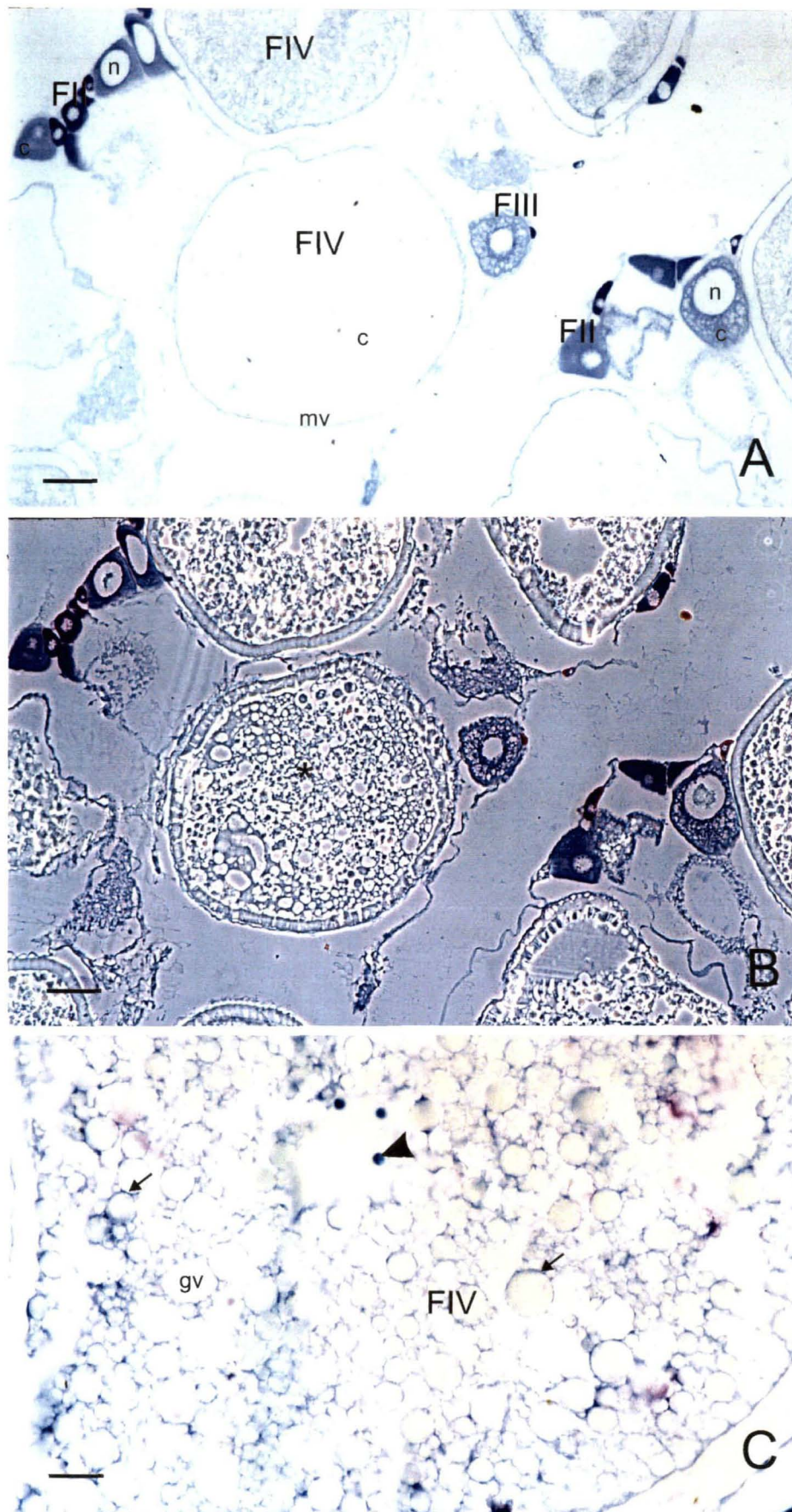


Figura 2 - Ovário de *S. testudineus* corado por azul de toluidina a pH4,0, para evidenciação de macromoléculas ácidas. Observe a diminuição da basofilia citoplasmática ao longo do desenvolvimento ovocitário. A figura 2B é em contraste de fase, para evidenciar a presença de material no citoplasma da célula apontada (*). Na figura 2C, as setas apontam regiões de síntese na periferia dos grânulos de vitelo (gv); a cabeça de seta aponta um nucléolo. n = núcleo; c = citoplasma; mv = membrana vitelina. FII = fase II, FIII = fase III; FIV = fase IV do desenvolvimento ovocitário (vide texto). Barras: A e B = 100µm; C = 15,9µm.

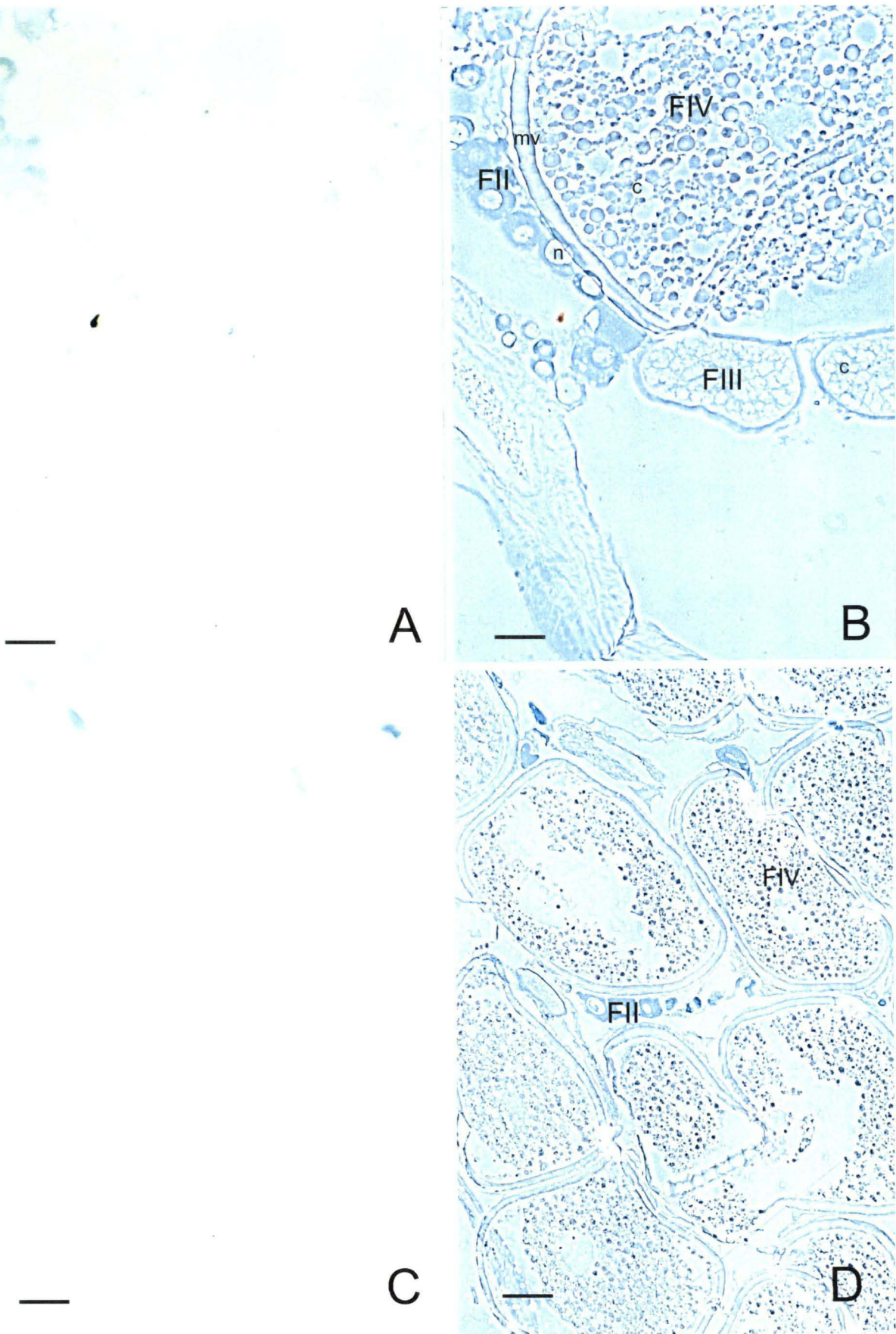


Figura 3 - Ovário de *S. testudineus* corado por azul de alcian a pH2,5 (3A e 3B) e pH1,0 (3C e 3D), para evidenciação de carboidratos ácidos carboxilados e sulfatados. 3B e 3D - contraste de fase.. Observe que a coloração só se verifica nos estágios iniciais (fase II) do desenvolvimento ovocitário. n = núcleo; c = citoplasma; mv = membrana vitelina. FII = fase II, FIII = fase III; FIV = fase IV do desenvolvimento ovocitário (vide texto). Barras: A = 50 μ m; B e C = 15,9 μ m.



Figura 4 - Ovário de *S. testudineus* corado pela técnica de P.A.S. (4A), para evidênciação de carboidratos neutros, e por *fast green* ácido - pH2,5 (4B e 4C), para evidênciação de proteínas totais. Os carboidratos neutros são mais evidentes nas fases finais do desenvolvimento ovocitário (FIII e FIV), especialmente localizados nos grânulos de vitelo (* branco). As proteínas são evidenciadas em todas as fases. Na figura 4B, as setas apontam cromosomas plumosos, e a cabeça de seta aponta um nucléolo num ovócito em fase I. Em 4C visualiza-se o acúmulo de proteínas na periferia dos grânulos de vitelo. n = núcleo; c = citoplasma; mv = membrana vitelina. FI = fase I; FII = fase II; FIII = fase III; FIV = fase IV do desenvolvimento ovocitário (vide texto). Barras: A e B = 50µm; C = 15,9µm.

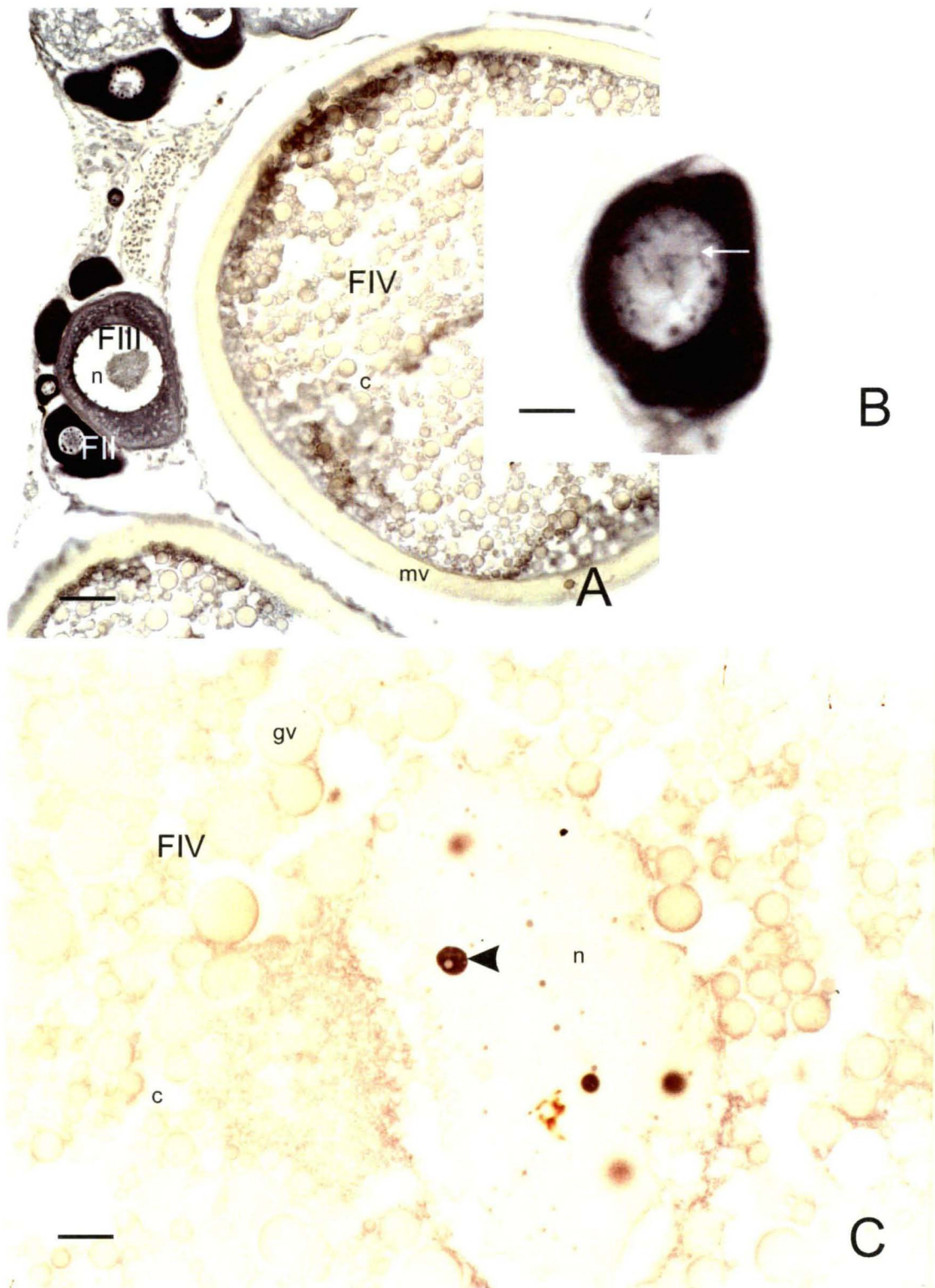


Figura 5 - Ovário de *S. testudineus* corado por hematoxilina férrica, para evidenciação de componentes ácidos, especialmente ácidos nucléicos. Observa-se uma diminuição da intensidade de coloração com o desenvolvimento ovocitário. Em 5B a seta aponta um cromosoma. Em 5C a cabeça de seta aponta um nucléolo no qual são evidenciadas diferentes regiões. n = núcleo; c = citoplasma; mv = membrana vitelina; gv = grânulo de vitelo. FII = fase II, FIII = fase III; FIV = fase IV do desenvolvimento ovocitário (vide texto). Barras: A = 50µm; B = 5µm; C = 15,9µm.

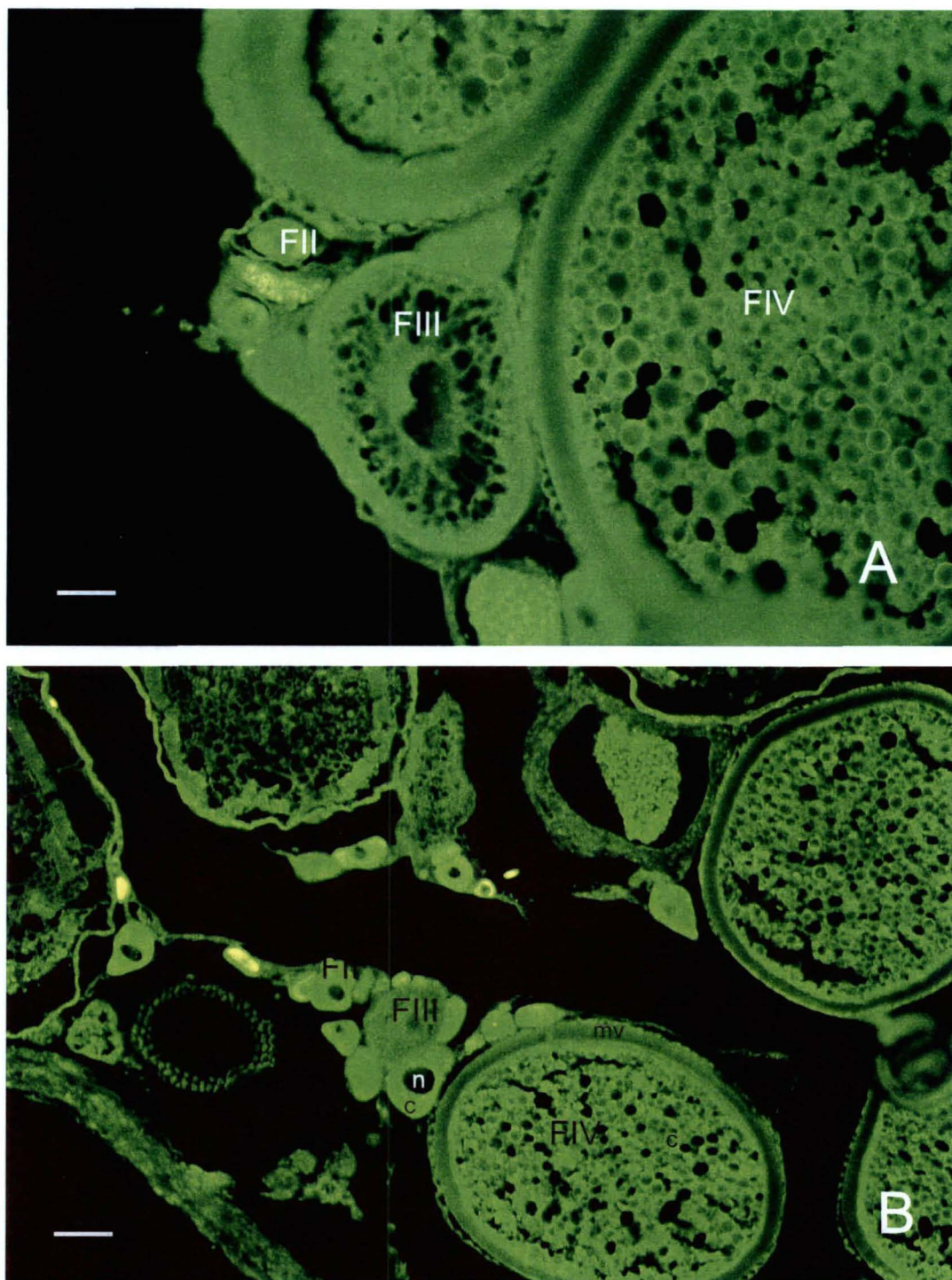


Figura 3 - Ovário de *S. testudineus* corado por *acridine orange* a pH7,2 (PBS) e observado sob microscopia de fluorescência, para evidenciação de ácidos nucleicos. Apesar da fluorescência devida ao fixador (formol), pode-se observar uma maior intensidade nas fases iniciais, decrescendo com o desenvolvimento ovocitário. n = núcleo; c = citoplasma; mv = membrana vitelina. FII = fase II, FIII = fase III; FIV = fase IV do desenvolvimento ovocitário (vide texto). Barras: A = 50 μ m; B e C = 15,9 μ m.

DISCUSSÃO

Apesar do nucléolo ser um parâmetro bastante utilizado na descrição morfológica da ovogênese de peixes (VIZZIANO & BEROIS, 1990; FÁVARO & CHAVES, 1999; BARBIERI & BARBIERI, 1985; AGOSTINHO *et. al.*, 1987; ZANIBONI & RESENDE, 1988; SILVA & ESPER, 1991), não foram encontrados na literatura trabalhos com ovogênese de peixes que utilizassem técnicas específicas para demonstração desta estrutura. A técnica utilizada no presente trabalho permite demonstrar com maior segurança a presença do nucléolo, bem como suas diferentes distribuições ao longo do desenvolvimento ovocitário.

A observação do nucléolo único nas células de fase II com menor volume e a grande quantidade de nucléolos nas células maiores desta mesma fase, permite subdividi-la em duas, FII inicial e FII final. Este processo ser devido ao fenômeno de amplificação gênica, na qual o gene para o RNAr é copiado muitas vezes, como já descrito para anfíbios (VIDAL & MELLO, 1987).

A basofilia citoplasmática decrescente observada com as técnicas de azul de toluidina, azul de alcian e hematoxilina férrica, está de acordo com o que foi descrito por GUTIERREZ *et al.* (1985) para *Solea senegalensis*. Segundo RAMADAN *et al.* (1979) tal basofilia se deve principalmente à alta concentração de RNA no citoplasma das fases iniciais. O presente estudo demonstra que a basofilia se deve ao RNA pois, quando comparadas as intensidades de coloração entre azul de toluidina (pH4,0) e azul de alcian (pH2,5 e pH1,0), fica evidente que a referida basofilia se deve quase que exclusivamente aos radicais fosfato, que estão protonados em pH4,0, mas não em 2,5; como estes radicais estão presentes principalmente nos ácidos nucleicos, pode-se concluir que a basofilia citoplasmática se deva à presença de RNA. O acúmulo de reservas para o desenvolvimento embrionário passa necessariamente por uma intensa produção de proteínas; daí as altas concentrações de RNA.

A coloração por azul de toluidina apresentou um padrão diferenciado para ovócitos da fase IV, sendo que o citoplasma, inicialmente corado, vai perdendo completamente a afinidade ao corante no seu estágio final, especialmente ao redor dos grânulos de vitelo; também é nesta periferia que se observa uma maior intensidade de coloração pelo *fast green* ácido, demonstrando ali um acúmulo de proteínas. Provavelmente está se observando, nesta etapa, um período final de síntese proteica, sendo o RNA destruído paulatinamente. Os processos de transcrição, por sua vez, devem ter se encerrado no início desta fase. Porém é curioso notar que os nucléolos continuam presentes mesmo nas etapas em que já não se observa basofilia citoplasmática. Como consequência destas observações, propõe-se aqui uma subdivisão desta fase (FIV) em inicial e final.

As proteínas sintetizadas na periferia dos grânulos de vitelo podem estar desempenhando duas funções: ou são constituintes do próprio vitelo, ou são enzimas envolvidas no processo de síntese de carboidratos, que também se acumulam nestes grânulos.

De acordo com FÁVARO & CHAVES (1999), a síntese de carboidratos ácidos nas fases intermediárias da vitelogênese de *Hypostomus cf. tietensis* se deve, provavelmente, ao envolvimento dessas substâncias na manutenção da ovogênese. NEVES *et al.*(1992) verificaram que os glóbulos de vitelo de *Oligosarcus argenteus* não apresentam polissacarídeos, permanecendo negativos ao PAS e ao azul de alcian (pH2,5 e 0,5); constataram ainda a presença de compostos fortemente reativos ao PAS no citoplasma, entre os grânulos de vitelo. No presente estudo verificou-se a quase inexistência de carboidratos ácidos mesmo nas fases iniciais do ovócito; de modo semelhante, SCHULTZ & FAVARO (2000) encontraram uma pequena reatividade em ovócitos de *Sphoeroides greeleyi*; já FAVARO & CHAVES (1999) demonstraram a presença de maior quantidade desses compostos em *Hypostomus cf. tietensis*; talvez isso reflita diferentes adaptações em diferentes ambientes (água doce x estuário).

A coloração pouco intensa para proteínas totais e fortemente PAS positiva no interior dos grânulos de vitelo também foi observada por RAMADAN *et al.* (1987) em *Sparus aurata*. Esses dados fazem supor que a principal composição dos grânulos de vitelo seja glicoproteica também em *S. testudineus*.

RAMADAN *et al.* (1979) observou claramente cromosomas normais e “plumosos” em ovócitos imaturos de *Merluccius*; no presente trabalho, a hematoxilina-férrica permitiu detectar cromosomas, sendo estes mais evidentes nas fases iniciais do desenvolvimento ovocitário (FI e FII).

RAMADAN *et al.* (1979) também relatou que a intensidade de reação para o DNA diminui gradativamente ao longo do desenvolvimento ovocitário, até se tornar invisível. O DNA não foi observado com a reação de Feülgen nos ovócitos de *S. testudineus*, em qualquer uma das fases, apesar desta reação ser positiva para os núcleos das células foliculares. Como o núcleo apresenta um volume muito grande e a cromatina bastante descondensada, a quantidade de DNA presente num corte de 5µm deve ser insuficiente para uma reação positiva.

As vesículas citoplasmáticas, características da FIII, não apresentaram coloração em qualquer uma das técnicas utilizadas, permitindo sugerir que são compostas por lipídios, removidos durante o processamento histológico do material. Entretanto, não pode ser descartada a hipótese de serem vesículas vazias; este material merece ainda um estudo mais aprofundado. VIZZIANO & BEROIS (1990), através das técnicas de Sudam Black e Shultz, observaram grandes quantidades de vitelo lipídico tanto na vitelogênese lipídica como na vitelogênese protéica de *Macrodon ancylodon*, o que está de acordo com estudos realizados em várias espécies de peixes. Através da mesma técnica, RAMADAN *et al.* (1987) detectaram lipídios no citoplasma em todas as fases do desenvolvimento ovocitário de *Sparus aurata*, sendo que nas fases mais avançadas, se apresentou na forma de glóbulos. No presente

estudo, aparentemente se observam glóbulos na fase IV que não se apresentam corados por qualquer das técnicas utilizadas, o que pode sugerir a presença de lipídios também em *Spherooides testudineus*, mesmo nas fase finais do desenvolvimento ovocitário.

CONCLUSÕES

- Com base nos resultados obtidos pode-se inferir que o nucléolo está presente nos ovócitos, sendo unitário nas FI e FII inicial e numerosos em FII final e nas demais fases; sua multiplicação deve acontecer pelo fenômeno da amplificação gênica;
- Baseado na classificação feita por ROCHA *et al.* (1999) e nos resultados obtidos a partir das técnicas de Banda NOR e azul de toluidina, propõe-se uma subdivisão na fase II (inicial e final) e na fase IV (inicial e final) sendo mantida a descrição para FI e FIII segundo ROCHA *et al.* (1999). A FII inicial é caracterizada pelo aumento no volume citoplasmático e nucléolo único; e FII final pelos nucléolos numerosos e periféricos, além do volume celular maior que o das fases precedentes. A FIV inicial é determinada pela presença de grânulos de vitelo que respondem positivamente à coloração de azul de toluidina; e FIV final caracterizada também pela presença de grânulos, porém negativos para a referida técnica;
- Esta diferença de basofilia na FIV, permite ainda sugerir que o processo de síntese proteica se estende até a FIV inicial, estando praticamente ausente na FIV final;
- A pequena quantidade de carboidratos ácidos, somente nas fases iniciais do desenvolvimento ovariano, permite dizer que a basofilia verificada se deve a grandes quantidades de RNA, envolvido num intenso processo de síntese;
- Nas margens dos grânulos de vitelo também há um sítio de síntese, cujo produto final provavelmente consista em glicoproteínas, sendo este composto a principal reserva para *S. testudineus*;
- A cromatina altamente descondensada, não corada pela reação de Feülgen, é mais um indício do intenso processo de síntese que ocorre nestas células.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGOSTINHO, A.A.; BARBIERI, M.C.; BARBIERI, G.; AGOSTINHO, C.S. Biologia Reprodutiva de *Rynelepsis aspera* (AGASSIZ, 1829) (Teleostei, Loricariidae) no Rio Paranapanema. II. Estrutura dos Ovários e Estádios de Maturação. **Rev. Brasil. Biol.**, 47 (3):319-328. 1987.
- BARBIERI, M.C. & BARBIERI, G. Reprodução de *Gymnotus carapo* (Linnaeus, 1758) na Represa do Lobo (SP). Morfologia e Histologia de Ovário. Variação Sazonal. (Teleostei, Gymnotidae). **Rev. Brasil. Biol.**, 45 (1/2): 3-12. 1985.
- CHAVES, P. DE T. DA C. & OTTO, G. Aspectos Biológicos de *Diapterus rhombeus* (Cuvier) (Teleostei, Gerreidae) na Baía de Guaratuba, Paraná, Brasil. **Revta Bras. Zool.**, 15(2):289-295. 1998.
- DIAS, J. F.; PERES-RIOS, E.; CHAVES, P. DE T. DA C.; ROSSI-WONGTSCHOWSKI, C.L.B. . Análise Macroscópica dos Ovários de Teleosteos: Problemas de Classificação e Recomendações de Procedimentos. **Revta Bras. Biol.**, 58(1): 55-69. 1998.
- FÁVARO, L.F. & CHAVES, P. DE T. DA C.. Aspectos Morfológicos e Citoquímicos da Ovogênese de *Hypostomus cf. tietensis* (Loricariidae) do Lago Igapó I (Londrina, PR, BRASIL). **Acta Biol. Par.**, 28 (1,2,3,4): 125:139. 1999.
- FIGUEIREDO, J.L. & MENEZES, N.A. **Manual de Peixes Marinhos do Sudeste do Brasil. VI. Teleostei (5)**. Museu de Zoologia da Universidade de São Paulo. 2000.
- GUTIERREZ, M.; SARASQUETE, M.C.; RODRIGUEZ, R.B.. Caracteres Citoquímicos de Carbohidratos y Proteínas Durante la Ovogéneses del Lenguado, *Solea senegalensis* Kaup, 1858. **Instituto de Investigaciones Pesqueras de Cádiz**, 49(3): 353-363. 1985.
- MATSUMURA, K. Tetrodotoxin as a Pheromone. **Nature**, vol 378, pp 563-564. 1995.
- NEVES, C.A.; ANDRADE, D.R.; MATTA, S.L.P.; VIDAL JR, M.V.; SANTOS, A.A.. Citoquímica dos Carboidratos dos Glóbulos de Vitelo nos Ovócitos do Lambari-bocarra (*Oligosarcus argenteus* GUNTHER 1864). ENCONTRO ANUAL DE AQUICULTURA DE MINAS GERAIS, 10, 1992, Belo Horizonte. **Anais, Belo Horizonte**, 1992, p. 12-16.
- RAMADAN, A.A.; EZZAT, A.; HAFEZ, S.. Studies on Fish Oogenesis. III. Cytochemical Studies on Developing Oocytes of *Merluccius*. **Folia Morph. Prague**, 27(3): 172-181. 1979.

- RAMADAN, A.A.; EZZAT, T.A.A.; KHADRE, S.E.M.; MEGUID, N.A.; AZIZ, E.L.S.H.A..
Citological and Cytochemical Changes in the Ovary of *Sparus aurata* During the Annual
Reproductive Cycle. **Folia Morph. Prague**. 35 (3): 237-250. 1987.
- ROCHA, C., FÁVARO, L.F. & SPACH, H.L. Dados Preliminares da Biologia Reprodutiva
de fêmeas de *Sphoeroides testudineus*, da gamboa do Bagaçu, baía de Paranaguá – PR.
SEMANA NACIONAL DE OCEANOGRAFIA, 12, 1999, Rio de Janeiro. **Resumos Expandidos**,
Rio de Janeiro: UERJ, 1999, p. 372-374.
- SCHULTZ, Y.D.; FÁVARO, L.F.. **Aspectos reprodutivos de *Sphoeroides greeleyi*, da
gamboa do Bagaçu, Baía de Paranaguá – Pr: ovogênese e tamanho de primeira
maturação**. Curitiba, 2000. 19 f. Monografia (Bacharelado em Ciências Biológicas) –
Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.
- SILVA, R.M.P.C.; ESPER, M.L.P.. Obsevações sobre o desenvolvimento citomorfológico
dos ovários de tainha *Mugil platanus* (GUNTHER) da Baía de Paranaguá (Brasil). **Acta.
Biol. Par.** , 20 (1,2,3,4.): 15-39. 1991.
- TARGETT, T. E. Food Resource Partitioning by the Pufferfishes *Sphoeroides spengleri* and
S. testudineus from Biscayne Bay, Florida. **Marine Biology**, 49, 83-91. 1978.
- VAZZOLER. A. E. A. M. **Biologia reprodutiva de peixes teleósteos: teoria e prática**..
Maringá : UEM, 1996.
- VIDAL, B.C.; MELLO, M.L.S.. **Biologia Celular**. Rio de Janeiro: Livraria Atheneu, 1987.
- VIZZIANO, D. & BEROIS, N.. Histología Del Ovário de *Macrodon ancylodon* (BLOCH Y
SHNEIDER, 1801) Teleostei: Scianidae) Ovogénisis. Folículos Post-ovulatorios. Atresia.
Rev. Brasil. Biol., 50 (2): 523-536. 1990.
- ZANIBONI FILHO, E. & RESENDE, E.K.. Anatomia de Gônadas, Escala de Maturidade e
Tipo de Desova do Marinnã, *Brycon aphyalus* (GUNTHER, 1869) Teleostei: Characidae).
Rev. Brasil. Biol., 488 (2): 833-844. 1988.

ANEXOS

TÉCNICA DA BANDA NOR

- Desparafinização: 2 banhos de 5min em xilol
- Hidratação: 1 banho de 5min em álcool absoluto
1 banho de 5min em álcool 90%
1 banho de 5min em álcool 70%
1 banho de 5min em água destilada
- Coloração: 1 gota de solução composta de: 1g de gelatina
50 ml de água
0,5 ml de ac. Fórmico
- 1 gota de solução de nitrato de prata 50%

Cobrir com laminula e levar à estufa (60°C) até ficar castanho-dourado, lavar em água destilada e deixar secar.

TÉCNICA AZUL DE TOLUIDINA

- Desparafinização: 2 banhos de 5minem xilol
- Hidratação: 1 banho de 5min em álcool absoluto
1 banho de 5min em álcool 90%
1 banho de 5min em álcool 70%
1 banho de 5min em água destilada
- Coloração: 1 banho de 20min em solução de Azul de Toluidina (pH 4,0 em solução tampão de McIlvaine)
3 banhos de 2min em água corrente
- Deixar secar ao ar
- Diafanização: 2 banhos de 5min em xilol

TÉCNICA DE AZUL DE ALCIAN

- Desparafinização: 2 banhos de 5min em xilol
- Hidratação: 1 banho de 5min em álcool absoluto
1 banho de 5min em álcool 90%
1 banho de 5min em álcool 70%
1 banho de 5min em água destilada
- Coloração: 1 banho de 20min em solução de Azul de Alcian
Lavar em água destilada
Deixar secar
- Diafanização: 2 banhos de 5min em xilol
- Controle: Antes da coloração dar um banho de 5 horas, a 60°C, em uma solução composta por 0,8ml de HCL concentrado em 100ml de álcool metílico, corar, lavar em água corrente por 5min e continuar conforme o protocolo.

TÉCNICA DE ÁCIDO PERIÓDICO-SHIFF (PAS)

- Desparafinização: 2 banhos de 5min em xilol
- Hidratação: 1 banho de 5min em álcool absoluto
1 banho de 5min em álcool 90%
1 banho de 5min em álcool 70%
1 banho de 5min em água destilada
- Hidrólise: 1 banho de 20min em ácido periódico
1 banho de 30min em água destilada
- Coloração: 1 banho de 30min em solução de Schiff
3 banhos de 3min em água sulfurosa (5% HCl 1N, 5% metabissulfito sódio ou potássio em 180ml de água destilada)
1 banho de 10min em água corrente
- Desidratação: 1 banho de 1min em álcool 70%
1 banho de 1min em álcool 90%
1 banho de 5min em álcool 100%
- Diafanização: 2 banhos de 5min em xilol
- Controle: não passar o material pela etapa da hidrólise

TÉCNICA DE FAST GREEN ÁCIDO

- Desparafinização: 2 banhos de 5min em xilol
- Hidratação: 1 banho de 5min em álcool absoluto
1 banho de 5min em álcool 90%
1 banho de 5min em álcool 70%
1 banho de 5min em água destilada
- Coloração: 1 banho de 5 a 10seg em solução fast green 1% em ácido acético glacial a 1% (pH 2,7)
1 banho de 1min em ácido acético 1%
- Desidratação: 1 banho de 1min em álcool 70%
1 banho de 1min em álcool 90%
1 banho de 5min em álcool 100%
- Diafanização: 2 banhos de 5min em xilol

TÉCNICA DA REAÇÃO DE FEÜLGEN

- Desparafinização: 2 banhos de 5min em xilol
- Hidratação: 1 banho de 5min em álcool absoluto
1 banho de 5min em álcool 90%
1 banho de 5min em álcool 70%
1 banho de 5min em água destilada
- Hidrólise: 1 banho de 50min em ácido periódico
Deixar secar
- Coloração: 1 banho de 40min em solução de Schiff
3 banhos de 3min em água sulfurosa composta por 5% HCl 1N, 5% metabissulfito sódio ou potássio em 180ml de água destilada
1 banho de 10min em água corrente
- Desidratação: 1 banho de 1min em álcool 70%
1 banho de 1min em álcool 90%
1 banho de 5min em álcool 100%
- Diafanização: 2 banhos de 5min em xilol
- Controle: não passa pela etapa da hidrólise

TÉCNICA DE HEMATOXILINA-FÉRRICA

- Desparafinização: 2 banhos de 5min em xilol
- Hidratação: 1 banho de 5min em álcool absoluto
1 banho de 5min em álcool 90%
1 banho de 5min em álcool 70%
1 banho de 5min em água destilada
- Coloração: 1 banho de 3min em solução de hematoxilina-férrica
3 banhos de 3min em água corrente
- Desidratação: 1 banho de 1min em álcool 70%
1 banho de 1min em álcool 90%
1 banho de 5min em álcool 100%
- Diafanização: 2 banhos de 5min em xilol

TÉCNICA ACRIDINE-ORANGE

- Desparafinização: 2 banhos de 5min em xilol
- Hidratação: 1 banho de 5min em álcool absoluto
1 banho de 5min em álcool 90%
1 banho de 5min em álcool 70%
1 banho de 5min em água destilada
- Coloração: 1 gota de solução de *acridine-orange* (0,5mg/L), por 40min no escuro
- Montagem em água