

PAULO RINCOSKI COSTANTINO

**DESCRIÇÃO MORFOLÓGICA E ANÁLISE CITOQUÍMICA DOS
FOLÍCULOS OVARIANOS DE *Notothenia neglecta*, Nybelin, 1951 DA
BAÍA DO ALMIRANTADO.**

Monografia apresentada ao curso
de Ciências Biológicas da
Universidade Federal do Paraná
para a obtenção do título de
bacharel.

CURITIBA

2001

AGRADECIMENTOS

Agradeço especialmente a meus pais pelo auxílio em superar as dificuldades que surgiram ultimamente; a eles dedico este trabalho.

Ao amigo e professor Marco Antônio Ferreira Randi pela orientação e companheirismo principalmente nas fases finais deste trabalho.

Ao amigo e professor Luís Fernando Fávoro pela orientação e companheirismo principalmente nas fases iniciais deste trabalho.

À professora Edith Fanta pela doação do material estudado e pela contínua disponibilidade no empréstimo de literatura especializada e nas consultas ao fichário das expedições antárticas.

À professora Cloris D. Faraco pelo uso do micrótomo e da balança de precisão.

Ao técnico Nino pela disponibilidade no empréstimo de reagentes e pela realização de alguns cortes.

Aos professores do Laboratório de Toxicologia Celular e Reprodução em Peixes pela utilização dos materiais pertinentes ao laboratório.

Aos colegas de estágio pela constituição de um ambiente agradável e harmônico que ajudou na realização deste trabalho.

À minha querida sobrinha Giovanna Costantino Bess pela constante disponibilidade na utilização do computador.

À SECIRM pelo apoio logístico que possibilitou a coleta das amostras.

Ao CNPq pelo financiamento dos projetos 480.708/96-7; 490.233/97-0 e 480.850/97-6.

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS.....	i
SUMÁRIO.....	ii
INTRODUÇÃO.....	1
OBJETIVOS.....	6
MATERIAL E MÉTODOS.....	7
RESULTADOS.....	9
Ovogênese.....	9
Citoquímica.....	10
DISCUSSÃO.....	21
CONCLUSÕES.....	24
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	25
ANEXOS.....	28
Técnicas Histológicas	28
Hematoxilina / Eosina.....	28
Ácido Periódico – Schiff (PAS).....	28
Alcian Blue.....	29
Azul de Toluidina.....	29
Fast Green Ácido.....	30

INTRODUÇÃO

O congelamento e isolamento do continente Antártico ocorreram há cerca de 38 milhões de anos. A neve acumulada há milênios cobriu o continente com uma camada de gelo que tem em média 2160m de espessura. O peso do gelo tem afundado o continente e a costa continental em vários mil metros. Assim, uma considerável porção da massa de terra Antártica encontra-se abaixo do nível do mar. Por outro lado, algumas montanhas projetam-se 2000m acima da superfície do gelo (EASTMAN, 1993).

A formação do Oceano Antártico, bem como o total isolamento do continente, ocorreu há cerca de 25 milhões de anos, quando a passagem de Drake se abriu (EASTMAN, 1993).

As temperaturas continentais usualmente estão abaixo de 0°C durante todo o ano, tanto no interior quanto em algumas regiões costeiras. Em 1983, na Estação Soviética Vostok, foi registrada a temperatura de -89,6°C, um recorde mundial (PHILLPOT, 1985 *apud* EASTMAN, 1993).

A temperatura das águas continentais antárticas normalmente permanece em torno de 0°C durante todo o ano (EASTMAN, 1991), decrescendo e tendo pequena variação em direção ao sul, $+3,5^{\circ}\pm 0,5^{\circ}\text{C}$ a 50°S para $-1,8^{\circ}\pm 0,2^{\circ}\text{C}$ a 78°S (DUHAMEL, 1987 *apud* NORTH, 1991). O regime de luz é característico das regiões polares; assim, no inverno há longos períodos sem luz, enquanto que no verão a luz é praticamente constante, ocorrendo situações intermediárias nas outras estações do ano (RIVKIN e PUTT, 1987). As condições de penetração de luz na água do mar podem ser comparadas com as encontradas em águas

oceânicas profundas de outras áreas do mundo, pois podem ser atenuadas pelo gelo e pela neve (KOCK, 1992).

O processo de formação do gelo a partir da água do mar resulta em um aumento da salinidade e densidade da água logo abaixo do gelo, devido à expulsão de cristais de sal para a água do mar. Este aumento da salinidade e densidade induz uma movimentação vertical da água (FOSTER, 1984; EASTMAN, 1993; HEMPEL, 1994) que termina por estabilizar a coluna d'água, não afetando significativamente a salinidade. Assim, em temperatura baixa, a água torna-se duas vezes mais viscosa do que a água de mares temperados. (FOSTER, 1984; EASTMAN, 1991).

O Oceano Antártico se separa dos demais oceanos através de uma barreira natural denominada Convergência Antártica, a qual é caracterizada pelo encontro das águas mais quentes e menos densas dos Oceanos Atlântico, Pacífico e Índico com as águas geladas e mais densas do Oceano Antártico (FOSTER, 1984; CAPOZOLI, 1991; CROSSLEY, 1995).

Das mais de 20000 espécies de peixes modernos, aproximadamente 300 espécies de peixes demersais e pelágicos (1,5%) são encontradas ao sul da Convergência Antártica, sendo que a maior parte é encontrada exclusivamente nessa área (GRÖHSLER, 1994).

A costa da Península Antártica é flanqueada por inúmeras ilhas; entre estas, existe um conjunto de 62 ilhas e 52 rochedos que constituem o Arquipélago das Ilhas Shetland do Sul. A ilha Rei George, situada a oeste da Península Antártica (entre 57°35'-59°15'W e 62°S) é a maior ilha desse arquipélago, possuindo um território de 1300Km², sendo que 90% de sua superfície está revestida por gelo. A porcentagem de terra livre de gelo é pequena e está situada nas praias (VIANNA, 1998).

A Baía do Almirantado é a maior da Ilha Rei George (RAKUSA-SUSZCZEWSKI, 1980). Tem a natureza de um fiorde, cuja área superficial é de 122,08Km², volume de 24Km³

de água e profundidade máxima de 530m. Suas águas estão em contato com o Estreito de Bransfield e com as águas vindas de oeste, derivadas do Mar de Bellingshausen (MADEJSKI e RAKUSA-SUSZCZEWSKI, 1990 *apud* RAKUSA-SUSZCZEWSKI, 1993). A temperatura da água varia de $-1,7$ a $2,0^{\circ}\text{C}$ na superfície e $-1,10$ a $0,28^{\circ}\text{C}$ a 400m de profundidade; a média anual da temperatura na coluna d'água é de $-0,4^{\circ}\text{C}$ (KULESZ, 1994). Esta baía se bifurca, na sua extremidade oeste, formando as enseadas Mackellar e Martel. Ali se encontra a Estação Antártica Comandante Ferraz (EACF), que possui instalações climatizadas com condições de alojamento para 42 pessoas e com condições disponíveis para a pesquisa biológica.

Segundo LINKOWSKI et al. (1983), foi relatada a ocorrência de mais de 40 espécies de peixes na Baía do Almirantado. As famílias Nototheniidae e Channichthyidae foram representadas pela maior variedade de espécies. Além disso, os representantes da família Nototheniidae predominam também em relação ao número de indivíduos.

As condições ambientais peculiares da Antártica tornam interessantes os estudos relativos a sua fauna, especialmente no que diz respeito à fisiologia e comportamento dos animais ali presentes, como os peixes. Também deve-se levar em conta que as alterações nos ambientes aquáticos, decorrentes da atividade antropogênica, podem comprometer a manutenção das espécies nestes ambientes. Assim sendo, os estudos de conservação e preservação dos ecossistemas aquáticos e sua ictiofauna terão tanto êxito quanto mais amplos forem os conhecimentos do comportamento biológico das espécies presentes.

Devido ao isolamento geográfico do Continente Antártico e as condições climatológicas serem extremas em algumas estações do ano, o estudo da reprodução em peixes antárticos é dificultado, portanto pouco se sabe sobre tal processo.

Pesquisas ecológicas em peixes antárticos são realizadas em poucas espécies em áreas limitadas e não podem ser muito generalizadas. Na Signy Island, estudos estimaram a

biomassa de *Notothenia neglecta*, a espécie dominante em águas rasas, em 194Kg.ha⁻¹ e a produção anual em torno de 0,34g.g⁻¹ (EVERSON, 1970 *apud* EVERSON, 1984). Assim, *Notothenia neglecta* é uma espécie importante na Antártica e estudos sobre a sua biologia contribuem para a caracterização do ecossistema marítimo antártico.

As espécies *Notothenia neglecta*, *N. hansonii* e fêmeas de *N. bernacchii* possuem crescimento lento e crescem até um tamanho máximo de 30-45cm (EVERSON, 1984).

Um ciclo anual foi encontrado na glândula tiroide de *Notothenia neglecta*. Foi evidenciado que o máximo de atividade tiroidiana ocorre durante o verão (temperatura do mar maior que -0,4°C) e que esta atividade é muito maior que durante o inverno (temperatura do mar menor que -1,5°C). Coincidentemente este ciclo segue o ciclo de desenvolvimento gonadal, apesar de nenhuma relação ter sido encontrada entre eles. (TWELVES *et al.*, 1975 *apud* EVERSON, 1984).

Em *Notothenia neglecta* o ovário começa a crescer em novembro, sendo que nos seis meses anteriores, seu tamanho ocupa mais ou menos 3% do peso do corpo. O crescimento do ovário é gradual até março, quando ocorre um crescimento rápido levando esta gônada a apresentar o dobro de tamanho que possuía; a desova ocorre em maio. A redução no tamanho da gônada não deixa o ovário totalmente desprovido de ovócitos porque muitos ovócitos pequenos, que formarão a próxima desova no próximo ano, já estão sendo formados (EVERSON, 1984).

Em *Notothenia neglecta*, nos anos anteriores às fêmeas atingirem a maturação completa, o ovário se desenvolve lentamente sobre 1/4 do comprimento da cavidade do corpo. Os ovócitos neste estágio possuem em torno de 0,5 mm de diâmetro. Quando os peixes atingem a maturação pela primeira vez estes ovócitos recebem a quantidade total de vitelo; ao mesmo tempo, a deposição de vitelo começa em uma nova geração de ovócitos. Existem

assim, dois grupos de tamanhos distintos de ovócitos presentes no ovário maduro. A deposição de vitelo provavelmente continua durante todo o ano em ambos os tipos de ovócitos, embora o maior aumento de tamanho ocorra nos maiores ovócitos nos meses imediatamente anteriores a desova (EVERSON, 1984). Ainda segundo o mesmo autor, a maturação final e desova pelas fêmeas de tamanho menor ocorre, mais ou menos, um mês antes do restante da população.

O estudo da reprodução em peixes é de grande importância para a Ictiologia, devendo ser realizado para cada espécie em particular, onde são avaliados diferentes fatores, tais como: localização, temperatura, avaliação química da água, entre outros.

O conjunto de características que uma espécie deverá manifestar para ter sucesso na reprodução, garantindo assim o equilíbrio da população, é denominado de estratégia reprodutiva. Algumas características podem variar de acordo com mudanças ambientais, as quais são denominadas de táticas reprodutivas (VAZZOLER, 1996).

Conhecer o desenvolvimento das células germinativas é necessário para o entendimento do mecanismo reprodutivo, uma vez que é preciso saber as fases dos folículos para se detectar o desenvolvimento gonadal. Através da maturação das gônadas é possível identificar a época da desova, local de desova e outros parâmetros reprodutivos (FÁVARO, 1994).

Os estudos histológicos fornecem informações precisas sobre o estágio de desenvolvimento do ovócito, mas suas interpretações algumas vezes são confusas porque, em geral, os diferentes autores usam termos diferentes para uma mesma estrutura (WEST, 1990).

OBJETIVOS

Constituem os principais objetivos deste trabalho:

-descrever morfológicamente os folículos ovarianos caracterizando as diferentes fases que constituem a ovogênese de *Notothenia neglecta*.

-determinar a natureza das substâncias que são encontradas nas diversas fases de desenvolvimento ovocitário de *Notothenia neglecta*.

MATERIAL E MÉTODOS

Exemplares da espécie *Notothenia neglecta*, Nybelin, 1951 foram coletados nos meses de dezembro de 1996 a janeiro de 1997, março e abril de 1997 e entre outubro de 1997 e fevereiro de 1998. As coletas foram realizadas em profundidades de 50 a 100 m em diferentes pontos da Baía do Almirantado, utilizando-se redes de espera do tipo feiticeira por 12 a 24 horas.

Os exemplares capturados foram sacrificados por secção medular. Um corte longitudinal foi realizado ventralmente ao longo da cavidade abdominal no sentido postero-anterior com o intuito de se retirarem as gônadas desses animais.

As gônadas foram fixadas por um período de no máximo 24 horas, dependendo do tamanho da amostra, em Líquido de Bouin (CULLING et al., 1985) ou Alfac ou formol 10%. Passado o período de fixação, as amostras foram transferidas para álcool 70%, sendo dessa forma transportadas para o Brasil.

Nos laboratórios do Departamento de Biologia Celular da Universidade Federal do Paraná as gônadas foram lavadas mais algumas vezes, ainda com álcool 70%, para a retirada do excesso de fixador, desidratadas em série alcoólica crescente, diafanizadas em xilol e incluídas em parafina. Os cortes foram realizados na espessura de 5 micrômetros, distendidos em lâminas histológicas, hidratados em série decrescente de álcoois e corados com Hematoxilina-Eosina (para descrição da ovogênese), Ácido Periódico-Schiff (PAS-para a evidenciação de carboidratos neutros), Alcian Blue pH=1,0 e pH=2,5 (para a evidenciação de carboidratos ácidos sulfatados e carboidratos ácidos sulfatados e carboxilados

respectivamente), Azul de Toluidina a pH=4,0 (para a evidenciação de substâncias ácidas) e Fast Green ácido (pH=2,5-para a evidenciação de proteínas totais). Após corados, os cortes foram desidratados em série crescente de álcoois (com exceção dos cortes corados com Alcian Blue e Azul de Toluidina que foram secos ao ar), diafanizados em xilol e montados em Permount. Os detalhes de cada uma das técnicas podem ser encontrados no anexo deste trabalho.

A análise das lâminas efetuou-se com a utilização de microscópio de luz e fotomicroscópio para obtenção dos dados relativos à ovogênese e à composição química das células estudadas.

RESULTADOS

Ovogênese

Os folículos ovarianos, partindo da fase I em direção à fase IV, apresentaram aumento progressivo de tamanho.

As fêmeas coletadas de *Notothenia neglecta* apresentaram desenvolvimento ovocitário de acordo com as seguintes fases:

Fase I (ovogônias)- células pequenas com citoplasma muito escasso, onde o núcleo ocupa praticamente todo o espaço da célula; o nucléolo apresenta-se único e central.

Fase II- citoplasma do ovócito pode ser visualizado e apresenta-se extremamente basófilo; núcleo está localizado no centro da célula e apresentando vários nucléolos na sua periferia. Surgem células foliculares pavimentosas ao redor da membrana plasmática (figura 1).

Fase III- citoplasma apresenta-se menos basófilo que anteriormente; núcleo continua central e com nucléolos na periferia; células foliculares continuam pavimentosas. Surgem a membrana vitelina ao redor da membrana plasmática, externamente, e vesículas citoplasmáticas de formato oval ou circular no citoplasma do ovócito (figuras 1 e 2).

Fase IV- citoplasma apresenta-se do mesmo modo basófilo com as vesículas citoplasmáticas localizadas na, ou próximas da periferia da célula; núcleo central com nucléolos na periferia; células foliculares de modo igual a fase passada. Surgem grânulos de vitelo ao redor do núcleo expandindo-se em direção à membrana plasmática,

empurrando assim, as vesículas (figura 2). Membrana vitelina apresenta estriações e apresenta-se mais espessa que a fase anterior (figura 3).

As fases V e VI não foram encontradas no material analisado.

Citoquímica

As colorações utilizadas para a evidencição de substâncias químicas nos ovócitos foram: Alcian Blue (pH=1,0 e pH=2,5), Ácido Periódico-Schiff (PAS), Azul de Toluidina (pH=4,0) e Fast Green (pH=2,5).

Os dados relativos às colorações estão dispostos nas tabelas a seguir:

AZUL DE TOLUIDINA

Fase II	
Citoplasma	++
Células foliculares	+
Fase III	
Membrana vitelina	-
Citoplasma	+
Vesículas	+
Células foliculares	+
Fase IV	
Membrana vitelina	Não observado
Citoplasma	Não observado
Vesículas	Não observado
Grânulos de vitelo	Não observado
Células foliculares	Não observado

Tabela 3- Resultado da coloração dos ovócitos de *Notothenia neglecta* por Azul de Toluidina pH=4,0 (-=não corado; +=pouco corado; +=intensamente corado).

Os ovócitos de fase II apresentam o citoplasma corado intensamente por esse corante indicando, assim, a grande presença de substâncias ácidas, as células foliculares também mostraram-se positivas contendo as mesmas substâncias (figura 5).

Os folículos de fase III apresentaram uma coloração mais amena para o citoplasma, as vesículas mostraram-se coradas indicando a presença de substâncias ácidas e evidenciaram as mesmas características da fase anterior para as células foliculares (figura 5). A membrana vitelina mostrou-se negativa a esse corante (figura 4).

Este corante apresenta um fenômeno chamado metacromasia que se caracteriza pela presença de um substrato polianiônico, nos ovócitos, onde as moléculas do corante se encaixam de forma a se sobreporem umas às outras. Este fenômeno vai refletir tendendo a coloração ao tom avermelhado (figura 5).

Os cortes corados com Azul de Toluidina não apresentaram ovócitos de fase IV, devido à falta de material.

FAST GREEN

Fase II	
Citoplasma	+
Células foliculares	++
Fase III	
Membrana vitelina	++
Citoplasma	+
Vesículas	+
Células foliculares	+
Fase IV	
Membrana vitelina	Não observado
Citoplasma	Não observado
Vesículas	Não observado
Grânulos de vitelo	Não observado
Células foliculares	Não observado

Tabela 4 - Resultado da coloração dos ovócitos de *Notothenia neglecta* por Fast Green pH=2,5 (-=não corado; +=pouco corado; ++=intensamente corado).

Os folículos de fase II mostraram o citoplasma respondendo positivamente a esse corante (figura 6)

Os ovócitos de fase III apresentam o citoplasma da mesma forma que a fase anterior e as células foliculares um pouco menos coradas por esse corante. As vesículas apresentam-se um pouco coradas indicando a pouca presença de proteínas e a membrana vitelina mostra-se fortemente corada indicando a grande quantidade dessas substâncias (figuras 6 e 7).

Os cortes corados com Fast Green não apresentaram ovócitos de fase IV, devido à falta de material.

PAS

Fase II	
Citoplasma	+
Células foliculares	++
Fase III	
Membrana vitelina	++
Citoplasma	+
Vesículas	+
Células foliculares	++
Fase IV	
Membrana vitelina	++
Citoplasma	+
Vesículas	+
Grânulos de vitelo	+
Células foliculares	++

Tabela 2- Resultado da coloração dos ovócitos de *Notothenia neglecta* por PAS (-=não corado; +=pouco corado; ++=intensamente corado).

Os folículos de fase II possuem o citoplasma respondendo ao PAS mostrando que possuem carboidratos neutros. As células foliculares também respondem a esse corante porém de forma mais intensa (figura 8).

Os ovócitos de fase III possuem o citoplasma apresentando coloração mais forte que a fase precedente indicando uma maior quantidade de carboidratos neutros. Suas vesículas se apresentam coradas mostrando a existência dessas substâncias, a membrana vitelina mostrou-

se fortemente corada também indicando a presença desses carboidratos e as células foliculares estão da mesma forma que a fase anterior (figura 8).

Os de fase IV apresentam o citoplasma, a membrana vitelina, as vesículas e as células foliculares da mesma forma que a fase anterior, porém o que se destaca nesta fase são os grânulos de vitelo que se apresentam corados indicando a presença de carboidratos neutros (figura 9).

ALCIAN BLUE

	pH=1,0	pH=2,5
Fase II		
Citoplasma	+	++
Células foliculares	+	++
Fase III		
Membrana vitelina	-	-
Citoplasma	+	++
Vesículas	+	++
Células foliculares	+	++
Fase IV		
Membrana vitelina	-	-
Citoplasma	-	-
Vesículas	+	++
Grânulos de vitelo	-	-
Células foliculares	+	++

Tabela 1- Resultado da coloração dos ovócitos de *Notothenia neglecta* por Alcian Blue pH=1,0 e pH=2,5 (-=não corado; +=pouco corado; ++=intensamente corado).

Os ovócitos de fase II apresentaram o citoplasma contendo carboidratos sulfatados e carboxilados. As células foliculares também possuem essas substâncias.

Os de fase III também possuem esses carboidratos no citoplasma e nas células foliculares. Porém o que se destaca nessa fase são as vesículas fortemente coradas mostrando

intensa quantidade dos carboidratos ácidos citados. A membrana vitelina mostra-se negativa quanto a presença destas substâncias (figura 12).

Os folículos de fase IV apresentam as células foliculares da mesma forma que a fase anterior; suas vesículas apresentam a mesma coloração forte e a membrana vitelina continua negativa a esse corante. O que chama a atenção nessa fase é a negatividade do citoplasma e dos grânulos de vitelo ao Alcian Blue, mostrando que não apresentam carboidratos ácidos sulfatados e carboxilados (figuras 10 e 11).

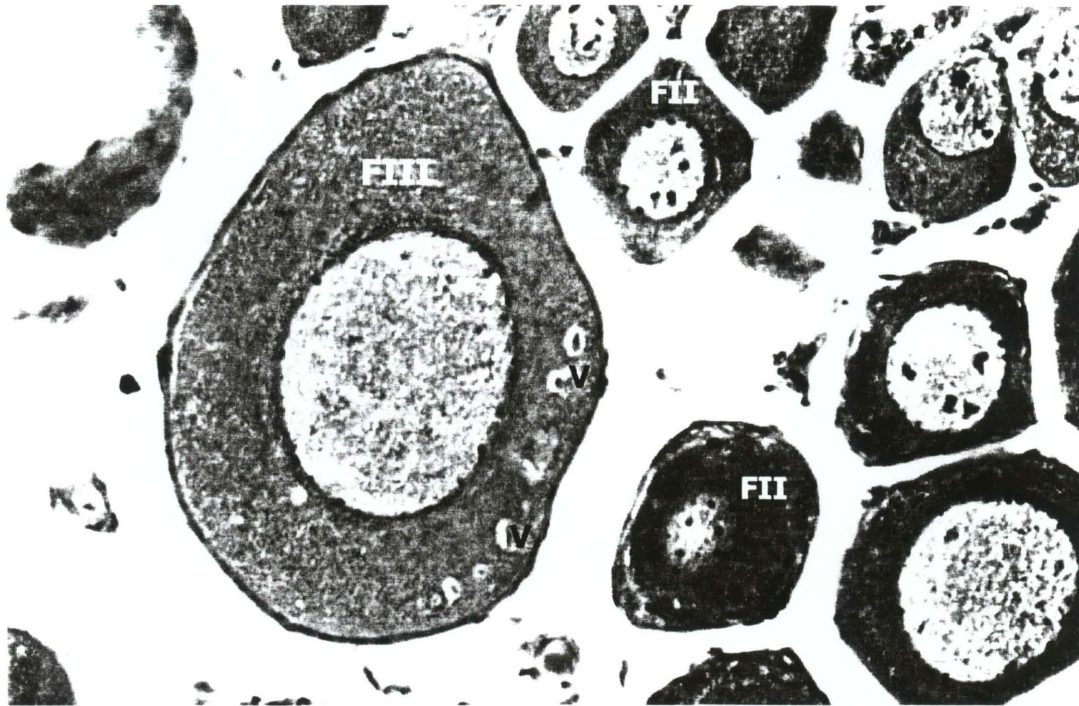


Fig. 1 - Folículo ovariano na fase II (FII). Folículo ovariano no início da fase III (FIII), observar o surgimento de vesículas (V). Hematoxilina e Eosina. 400x.



Fig. 2 - Folículo ovariano na fase III (FIII), observar vesículas (V). Folículo ovariano na fase IV (FIV), observar células foliculares (CF), membrana vitelina (MV), vesículas (V) e grânulos de vitelo (GV). Hematoxilina e Eosina. 100x.

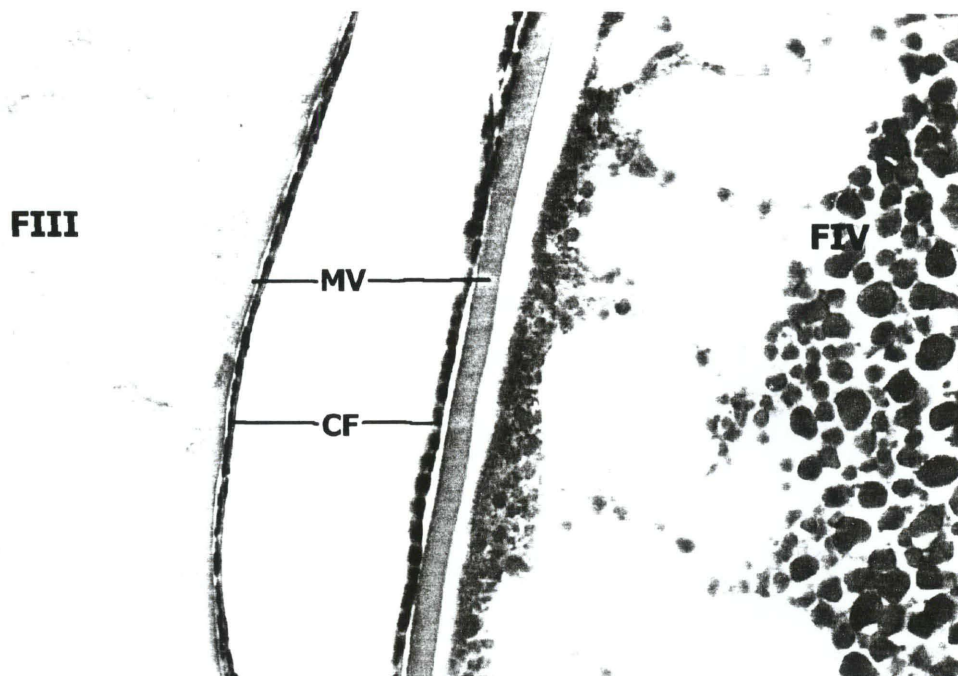


Fig. 3 - Folículo ovariano na fase III (FIII), evidenciar membrana vitelina (MV) e células foliculares (CF). Folículo ovariano na fase IV (FIV), observar membrana vitelina (MV) mais espessa. Hematoxilina e Eosina. 400x.

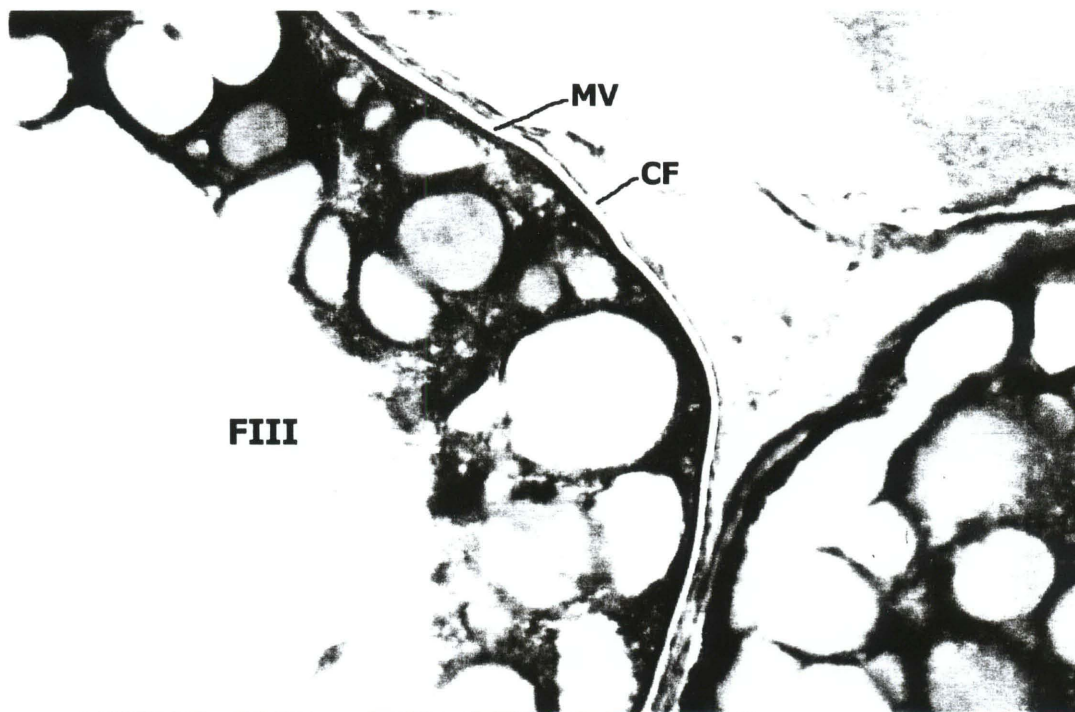


Fig. 4 - Folículo na fase III (FIII), observar membrana vitelina (MV) negativa ao corante e células foliculares (CF). Azul de Toluidina. 400x.

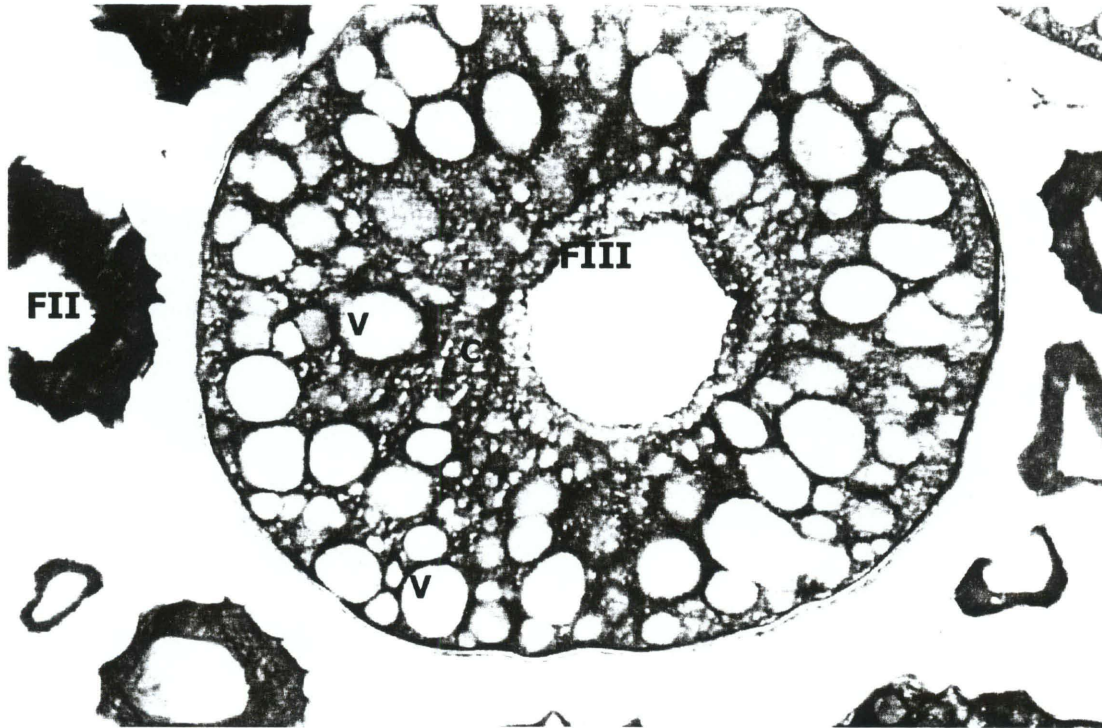


Fig. 5 - Folículo na fase II (FII), observar citoplasma com intensa coloração azul. Folículo na fase III (FIII), observar citoplasma (C) com coloração avermelhada e vesículas (V) tendendo para o vermelho. Azul de Toluidina. 200x.

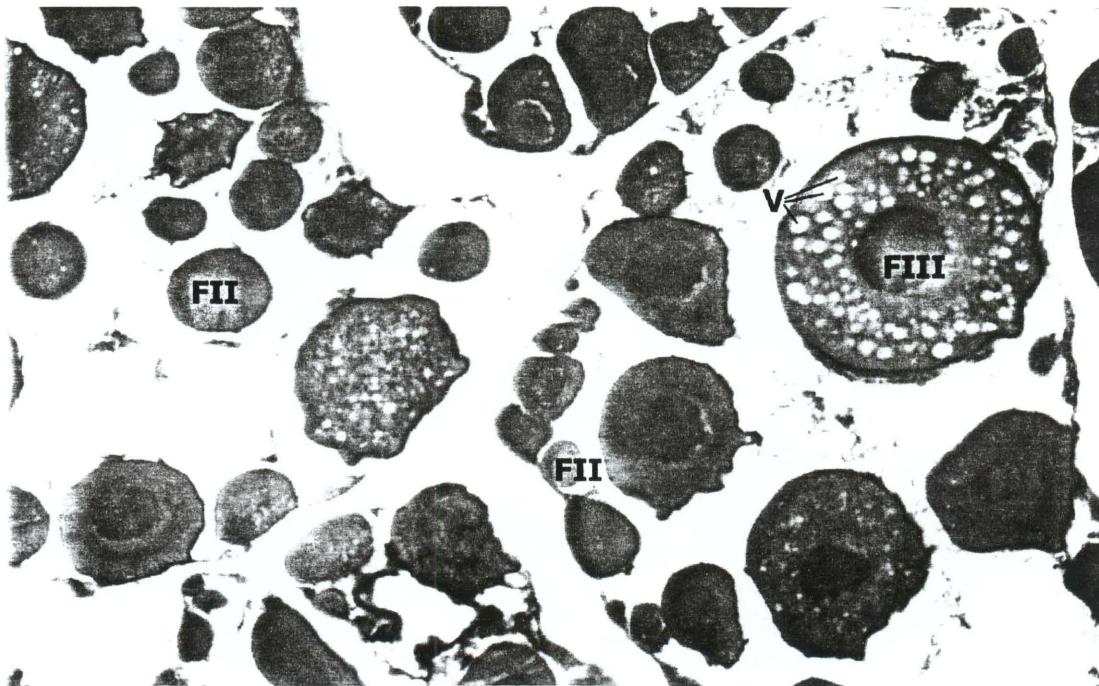


Fig. 6 - Folículo na fase II (FII), observar células foliculares (CF). Folículo na fase III (FIII), observar vesículas (V) um pouco coradas. Fast Green. 100x.

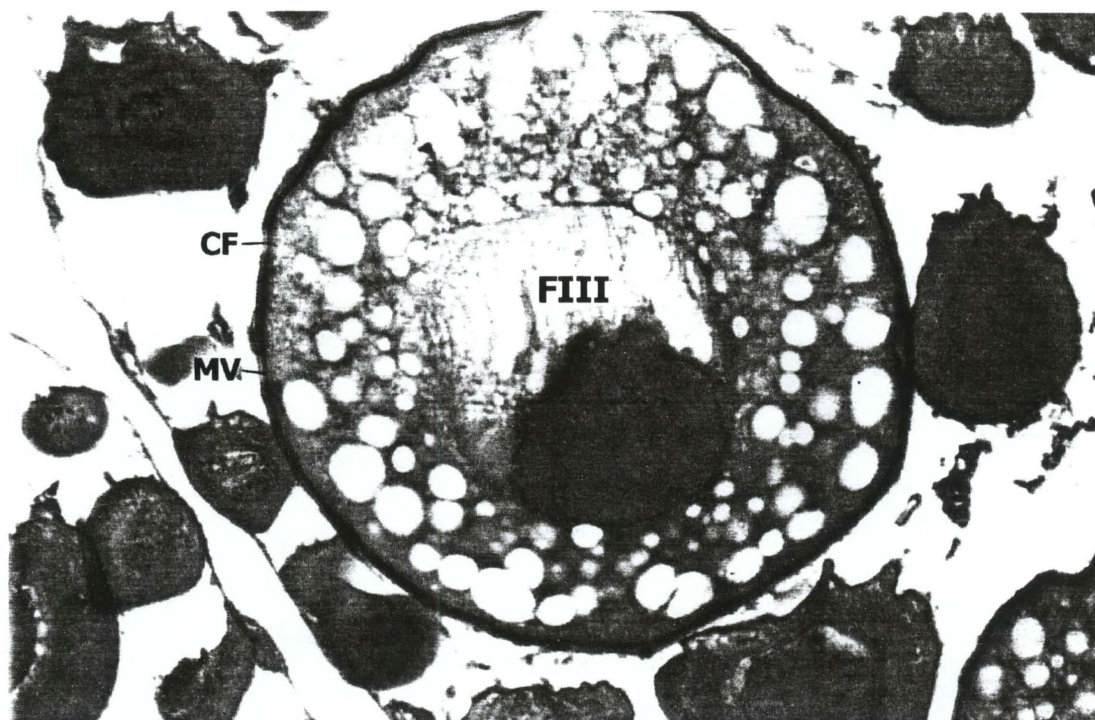


Fig. 7 - Folículo na fase III (FIII), observar células foliculares (CF) e membrana vitelina (MV). Fast Green. 200x.

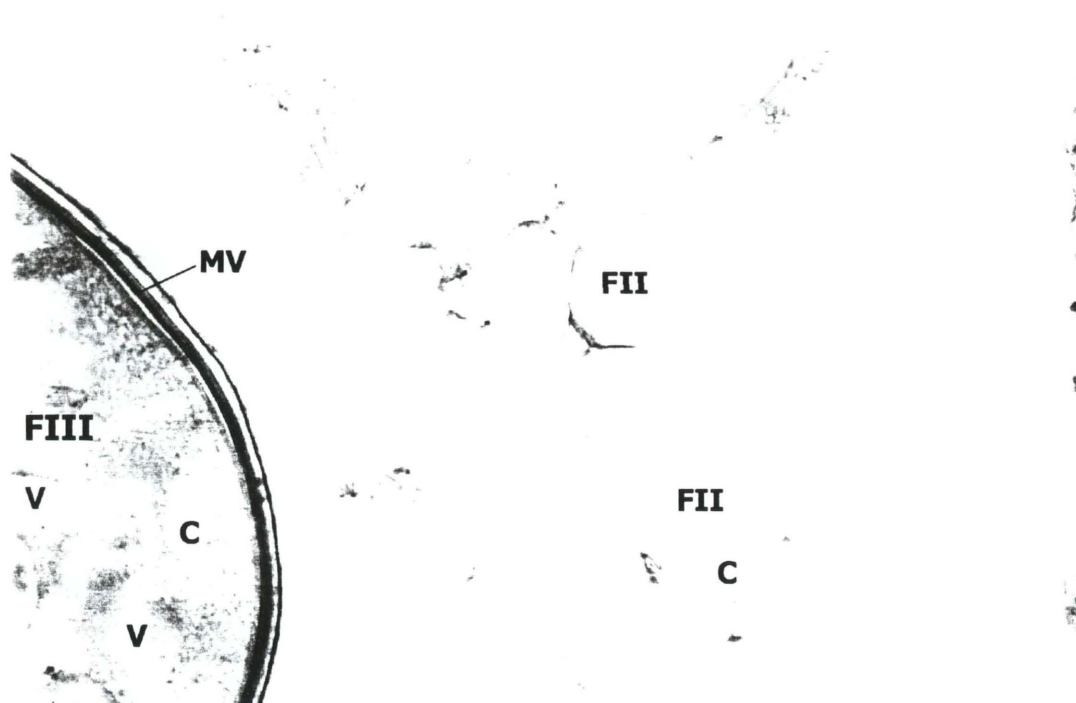


Fig. 8 - Folículo na fase II (FII), observar citoplasma (C) fracamente corado. Folículo na fase III (FIII), observar citoplasma (C) fortemente corado, vesículas (V) e membrana vitelina (MV). PAS. 400x.

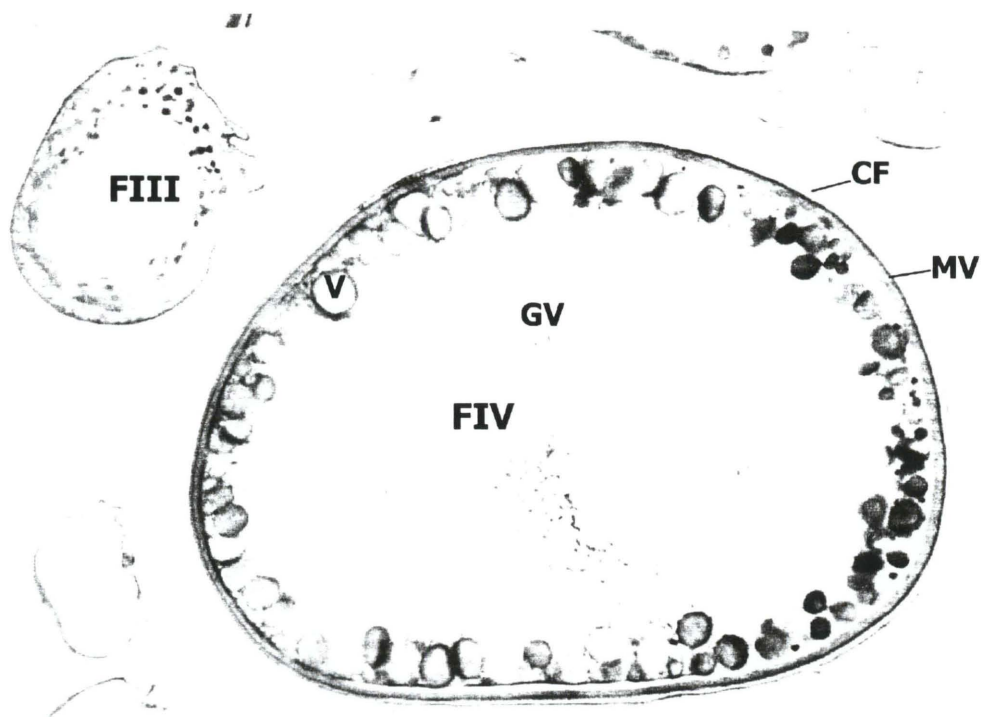


Fig. 9 - Folículo na fase IV (FIV), observar células foliculares (CF), membrana vitelina (MV), vesículas (V) e grânulos de vitelo (GV). PAS. 100x.

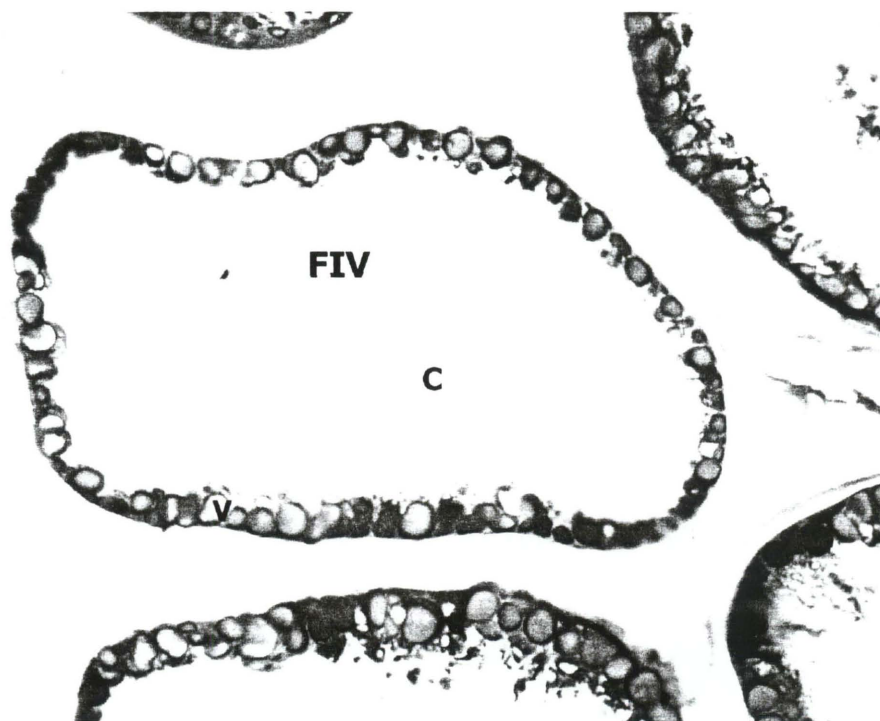


Fig. 10 - Folículo na fase IV (FIV), observar vesículas (V) e citoplasma (C) negativo ao corante. Alcian Blue. pH=2,5. 100x.

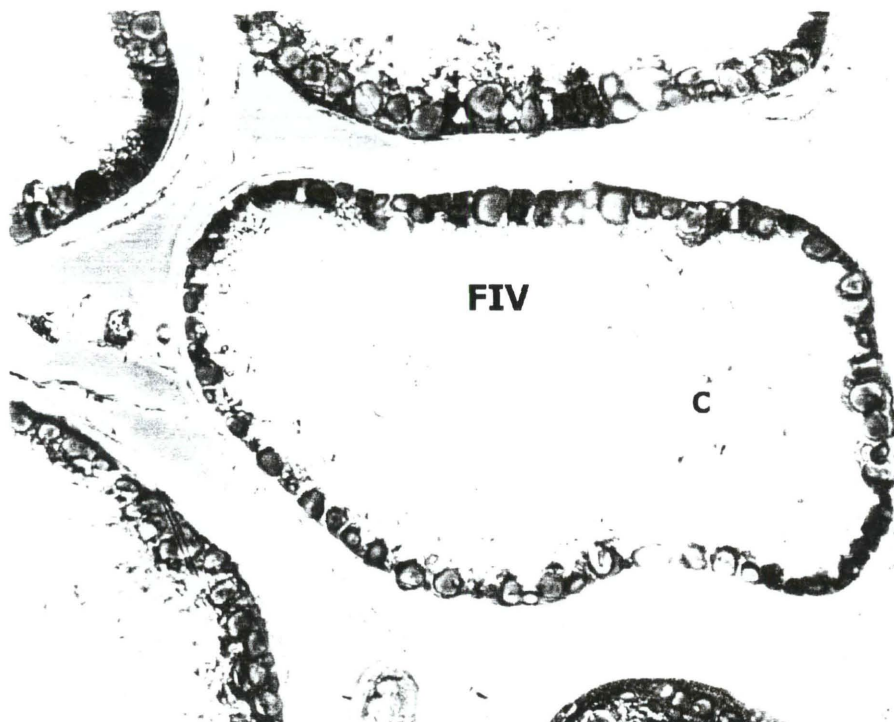


Fig. 11 - Mesmo folículo de fase IV (FIV) da foto anterior com contraste de fase, observar conteúdo citoplasmático (C). Alcian Blue. pH=2,5. 100x.

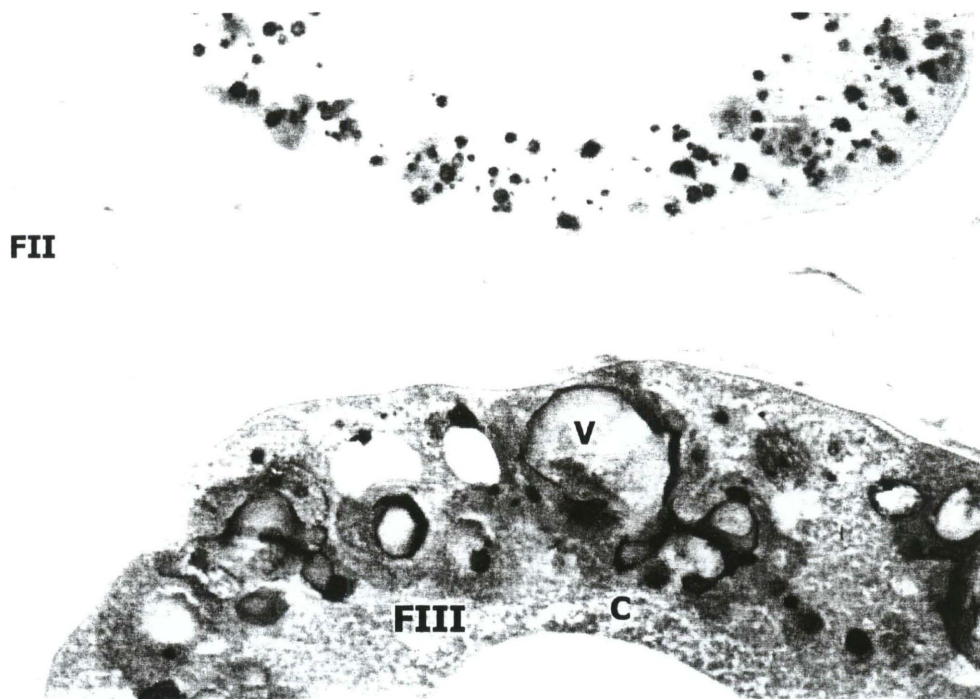


Fig. 12 - Folículo da fase III (FIII), observar membrana vitelina (MV) negativa ao corante, vesículas (V) e citoplasma (C). Alcian Blue. pH=2,5. 400x.

DISCUSSÃO

O desenvolvimento ovocitário do material analisado de *Notothenia neglecta* permitiu a caracterização de quatro fases onde o ovócito aumenta progressivamente de tamanho. Por dados de literatura, pode-se supor que duas fases, as de final de maturação, não foram observadas neste trabalho, uma vez que as coletas não se estenderam por todo o ano, se concentrando nos meses de dezembro de 1996 a janeiro de 1997, março e abril de 1997 e entre outubro de 1997 e fevereiro de 1998. AGOSTINHO *et al.* (1982), ISSACNAHUN *et al.* (1983) e CHAVES (1989b) estabeleceram 6 fases para o desenvolvimento ovocitário. A última fase é encontrada somente em peixes marinhos e é caracterizada pela pré-hidratação (CHAVES, 1989a). Assim, pode-se supor que as coletas não abrangeram períodos de desova da espécie.

Na fase I, representada pelas ovogônias, o espaço celular é tomado praticamente pelo núcleo apresentando um nucléolo central. Desta forma não se pode analisar o conteúdo químico citoplasmático. Sendo uma célula principalmente proliferativa, que garante a manutenção de novos ovócitos a cada ciclo, é de se esperar que não seja uma célula que cresça muito. O núcleo com aspectos morfológicos que denotam alto metabolismo comprova o caráter proliferativo dos ovócitos nesta fase.

Na fase II o tamanho celular é maior, com núcleo centralizado e apresentando vários nucléolos na periferia, o que pode sugerir um fenômeno de amplificação gênica, como apresentado por ROCHA (2000); o citoplasma apresentou-se extremamente basófilo pela técnica do Azul de Toluidina (pH=4,0); este fato é devido à presença de radicais fosfato encontrados nas moléculas de RNAs, visto que os radicais sulfato e carboxila provenientes de carboidratos ácidos detectados pela técnica do Alcian Blue (pH=1,0 e pH=2,5), contribuem muito menos para a coloração observada. O suposto é confirmado

pela técnica do Fast Green que indicou a presença de proteínas citoplasmáticas em quantidade nessa fase. O citoplasma desse ovócito também apresentou-se positivo ao PAS, podendo-se inferir que existam glicoproteínas nesse citoplasma, como já encontrado por RAMADAN *et al.*, 1987. As células foliculares apresentaram carboidratos ácidos (sulfatados e carboxilados) e por serem PAS e Fast Green positivas, também podem conter glicoproteínas.

Os ovócitos de fase III apresentaram um tamanho maior em relação à fase anterior e um citoplasma menos basófilo, indicando uma redução na síntese de proteínas; situação semelhante já foi descrita por GUTIERREZ *et al* (1985) para *Solea senegalensis*. Apresenta carboidratos ácidos (sulfatados e carboxilados) e grande quantidade de carboidratos neutros (PAS positivo). Nesta fase surgem as vesículas que mostraram-se como reservatórios de carboidratos sulfatados e carboxilados, além de glicoproteínas (em menor quantidade). Nesta fase aparece, também, a membrana vitelina, que deve ser constituída por glicoproteínas (PAS e Fast Green positiva). As células foliculares não apresentaram mudanças significativas. A coloração do citoplasma pelo Fast Green apresentou-se menos intensa que nos ovócitos de fase II, provavelmente por conta de uma diminuição da concentração em função do aumento do volume celular.

Os ovócitos de fase IV apresentaram o citoplasma contendo carboidratos neutros, provavelmente com função de reserva metabólica. As vesículas que surgem na fase anterior contêm carboidratos sulfatados, carboxilados e carboidratos neutros. O movimento das vesículas à periferia da célula e a presença de carboidratos neutros em sua composição leva a crer que ocorre uma deposição desses carboidratos na membrana vitelina provocando o seu espessamento (juntamente com a ação das células foliculares); dessa forma a membrana vitelina apresenta grande quantidade de carboidratos neutros. Os grânulos de vitelo mostraram-se compostos por esses carboidratos, para reserva alimentar

do embrião, e as células foliculares apresentaram carboidratos sulfatados, carboxilados e neutros.

Assim, pode-se dizer que o desenvolvimento ovocitário de *Notothenia neglecta* inicia-se com um intenso metabolismo de síntese proteica, seguido do acúmulo de proteínas e carboidratos neutros no citoplasma e acúmulo de carboidratos ácidos principalmente nas vesículas que se encaminham para a periferia da célula. A membrana vitelina surge na fase III e tem um espessamento contínuo até a fase IV, sendo principalmente constituída por proteínas e carboidratos neutros. As células foliculares permanecem inalteradas durante todo o desenvolvimento do folículo.

CONCLUSÕES

O estudo do desenvolvimento ovocitário e da citoquímica dos folículos ovarianos de *Notothenia neglecta* permitem as seguintes conclusões:

- Não foram capturadas fêmeas com ovócitos nas fases V e VI, indicando que as coletas não foram realizadas próximas à época de desova.
- O material analisado permitiu descrever quatro fases do desenvolvimento ovocitário.
- A fase II é caracterizada, principalmente, pela síntese de proteínas.
- As vesículas provavelmente são responsáveis pelo espessamento da membrana vitelina na fase IV juntamente com as células foliculares.
- Os carboidratos neutros surgem a partir da fase II do ovócito, mantendo-se até a fase IV no citoplasma, nas vesículas e nos grânulos de vitelo.
- Os carboidratos ácidos sulfatados e carboxilados surgem na fase II do ovócito mantendo-se até a fase IV onde são encontrados nas vesículas, que se deslocam para a periferia celular.
- As glicoproteínas entram na composição da membrana vitelina e das células foliculares.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGOSTINHO, A. A.; NARAHARA, M. Y.; GODINHO, H. M. Morfologia dos ovários de *Plecostomus commersonii* (VALENCIENNES, 1840) Osteichthyes – Loricariidae: desenvolvimento dos ovócitos e Escala de maturidade. **Rev. Bras. Biol.**, Rio de Janeiro, v.42, n.1, p.71-77, 1982.
- CAPOZOLI, U. **Antártida - A Última Terra**. São Paulo: Editora da Universidade de São Paulo, 1991.
- CHAVES, P. T. C. Hidratação pré ovulatória em peixes: Um caráter de origem marinha? **Rev. Bras. Zool.**, Curitiba, v.6, n.3, p.463-472, 1989a.
- CHAVES, P. T. C. Desenvolvimento dos ovócitos em *Harengula clupeola*, *Urophycis brasiliensis*, *Eucinostomus argenteus*, *Isopisthus parvipinnis* e *Menticirrhus americanus* (Teleostei). **Bol. Inst. oceanogr.**, São Paulo, v.37, n.2, p.81-93, 1989b.
- CROSSLEY, L. **Explore Antarctica**. Cambridge University Press: Melbourne. Australian Antarctic Foundation, 1995, 112p.
- CULLING, C. F. A.; ALLISON, R. T.; BARR, W. T. **Cellular pathology technique**. 4.ed. London: Butterworth, 1985. 642p.
- EASTMAN, J. T. Evolution and diversification of antarctic notothenioid fish. **Am. Zool.**, Lawrence, v.31, n.1, p.93-109, 1991.
- EASTMAN, J. T. **Antarctic Fish Biology: Evolution in a Unique Environment**. San Diego: Academic Press, Inc., 1993. 322p.
- EVERSON, I. Fish Biology, In: LAWS, R. M. **Antarctic Ecology**. v.2, London: Academic Press Inc., 1984. p491-532.
- FÁVARO, L. F. Aspectos Morfológicos e Citoquímicos da Ovogênese em *Hypostomus tietensis* (Lhering, 1905) (Siluriformes, Loricariidae) Curitiba 1994, 51p, tese de mestrado, Universidade Federal do Paraná.

- FOSTER, T. D. The Marine Environment, In: LAWS, R. M. **Antarctic Ecology**. v.2, London: Academic Press Inc., 1984. p345-371.
- GRÖHSLER, T. Feeding habits as indicators of ecological niches: Investigations Antarctic fish conducted near Elephant Island in late autumn / winter 1986. **Arch. Fish. Mar. Res.**, Stuttgart, v.42, n.1, 1994.
- GUTIERREZ, M.; SARASQUETE, M. C.; RODRIGUEZ, R. B.. Caracteres citohistoquímicos de carbohidratos y proteínas durante la ovogénesis del lenguado, *Solea senegalensis* Kaup, 1858. **Instituto de Investigaciones Pesqueras de Cádiz**, v. 49, n. 3, p. 353-363, 1985.
- HEMPEL, G. **Antarctic Science Global Concerns**. Berlin: Springer-Verlag, 1994.
- ISSAC-NAHUN, V. J.; VAZZOLER, A. E. A. M.; ZANETTI-PRADO, E. M. Estudo sobre estrutura, ciclo de vida e comportamento de *Sardinella brasiliensis* (STEINDACHNER, 1879) na área 22°S e 28°S, Brasil, 3, Morfologia e histologia de ovários e escala de maturidade. **Bol. Inst. oceanogr.**, São Paulo, v.32, n.1, p.1-16, 1983.
- KOCK, K. H. **Antarctic fish and fisheries**. Cambridge: University Press, 1992. 359p.
- KULESZ, J. Seasonal biology of *Notothenia gibberifrons*, *N. rossi* and *Trematomus newnesi*, as well as respiration of young fish from Admiralty Bay (King George, South Shetland Islands). **Pol. Arch. Hydrobiol.**, Lamianki, v.41, n.1, p.79-102, 1994.
- LINKOWSKI, T. B.; PRESLER, P.; ZUKOWSKI, C. Food habits of nototheniid fishes (Nototheniidae) in Admiralty Bay (King George Island, South Shetland Island). **Pol. Polar Res.**, Warsaw, v.4, n.1-4, p.79-95, 1983.
- NORTH, A. W. Review of the early life history of Antarctic notothenioid fish. In: Di PRISCO, G.; MARESCA, B.; TOTA, B. **Fish Biology of Antarctic**. Berlin: Springer-Verlag, 1991. p.71-86.
- RAKUSA-SUSZCZEWSKI, S. Environmental conditions and the functioning of Admiralty Bay (South Shetland Island) as part of the near-shore Antarctic ecosystem. **Pol. Polar Res.**, Warsaw v.1, n.1, p.11-27, 1980.

- RAKUSA-SUSZCZEWSKI, S. The structure and functioning of the nearshore ecosystem.
In: **The maritime antarctic coastal ecosystem of the Admiralty Bay**. Warsaw: Polish Academy of Sciences, 1993. p.7-14.
- RAMADAN, A.A.; EZZAT, T.A.A.; KHADRE, S.E.M.; MEGUID, N.A.; AZIZ, E.L.S.H.A. Cytological and cytochemical changes in the ovary of *Sparus aurata* during the annual reproductive cycle. **Folia Morph. Prague**, v.35, n.3, p.237-250, 1987.
- RIVKIN, R. B.; PUTT, M. Diel periodicity of photosynthesis in polar phytoplankton: influence on primary production. **Science (Washington DC)**, v.238, p.1285-1288, 1987.
- ROCHA, C. Análises histoquímicas da ovogênese de *Sphoeroides testudineus* (Linnaeus, 1758), Tetraodontidae. **Monografia de conclusão de Bacharelado em Ciências Biológicas**. UFPR, Curitiba, PR. 26 pp., 2000.
- VAZZOLER, A.E.A. de M. (1996) *Biologia da Reprodução de Peixes Teleósteos: Teoria e Prática*. Editora da Universidade Estadual de Maringá. 169p.
- VIANNA, A. C. C. Estudo Comparativo Do Intestino De *Notothenia neglecta* Nybelin, 1961 E *Trematomus newnesi* Boulenger, 1902 E sua relação Com O Hábito Alimentar: Histologia E Ultraestrutura. Curitiba 1998, 147p, tese de mestrado, Universidade Federal do Paraná.
- WEST, G. Methods of assessing ovarian development in fishes: a review. **Aust. J. Mar. Freshwater Res.**, East Melbourne, v. 41, p. 199-222, 1990.

ANEXOS

Técnicas Histológicas

Hematoxilina / Eosina

Desparafinização:

Xilol I - 5 minutos

Xilol II - 5 minutos

Hidratação:

Álcool 100% - 5 minutos

Álcool 90% - 5 minutos

Álcool 70% - 5 minutos

Água destilada - 1 minuto

Coloração:

Hematoxilina - 15 segundos

Água corrente - 5 minutos

Eosina - 15 segundos

Água destilada - 1 banho

Desidratação:

Álcool 70% - 1 minuto

Álcool 90% - 1 minuto

Álcool 100% - 5 minutos

Diafanização:

Xilol I - 5 minutos

Xilol II - montagem

Ácido Periódico – Schiff (PAS)

Desparafinização:

Xilol I - 5 minutos

Xilol II - 5 minutos

Hidratação:

Álcool 100% - 5 minutos

Álcool 90% - 5 minutos

Álcool 70% - 5 minutos

Água destilada - 5 a 10 minutos

Hidrólise:

Ácido periódico - 20 minutos

Água destilada - 30 segundos

Coloração:

Reativo Schiff - 40 minutos

Água sulfurosa (metabissulfito de sódio ou potássio a 10% - 15 mL, HCl 1N - 15 mL, água destilada - 270 mL) - 3 banhos de 5 minutos cada

Água corrente - 10 minutos

Desidratação:

Álcool 70% - 1 minuto
 Álcool 90% - 1 minuto
 Álcool 100% - 5 minutos

Diafanização:

Xilol I - 5 minutos
 Xilol II - montagem

Alcian Blue

Desparafinização:

Xilol I - 5 minutos
 Xilol II - 5 minutos

Hidratação:

Álcool 100% - 5 minutos
 Álcool 90% - 5 minutos
 Álcool 70% - 5 minutos
 Água destilada - 5 minutos

Coloração:

Solução de Alcian Blue (pH=1,0 ou pH=2,5) - 20 minutos
 Água destilada - 1 banho
 Deixar secar ao ar

Diafanização:

Xilol I - 5 minutos
 Xilol II - montagem

Azul de Toluidina

Desparafinização:

Xilol I - 5 minutos
 Xilol II - 5 minutos

Hidratação:

Álcool 100% - 2 minutos
 Álcool 90% - 2 minutos
 Álcool 70% - 2 minutos
 Álcool 50% - 2 minutos
 Água destilada - 2 banhos

Coloração:

Azul de Toluidina 0,025% a pH 4,0 em tampão McIlvaine - 20 minutos
 Água destilada - 3 banhos
 Deixar secar ao ar

Diafanização:

Xilol I - 5 minutos
 Xilol II - montagem

Fast Green Ácido

Desparafinização:

Xilol I - 5 minutos

Xilol II - 5 minutos

Hidratação:

Álcool 100% - 2 minutos

Álcool 90% - 2 minutos

Álcool 70% - 2 minutos

Água destilada - 2 minutos

Coloração:

Fast Green 1% em ácido acético 2,0% (pH 2,5) - 5 segundos

Água destilada - 1 banho

Desidratação:

Álcool 70% - 2 minutos

Álcool 90% - 2 minutos

Álcool 100% - 5 minutos

Diafanização:

Xilol I - 5 minutos

Xilol II - montagem