

MARCELO GRUMACH FALCÃO

**ANÁLISE MORFOLÓGICA E CITOQUÍMICA DA OVOGÊNESE DE
Atherinella brasiliensis (Quoy & Gaimard) (Atheriniformes, Atherinidae), EM
UMA PLANÍCIE DE MARÉ ADJACENTE A GAMBOA DO BAGUAÇU, BAÍA
DE PARANAGUÁ, PARANÁ.**

Monografia apresentada à disciplina de estágio I e II em Biologia Celular, como requisito parcial para obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná (UFPR), sob orientação do professor Luís Fernando Fávaro

CURITIBA

2003

Dedico este trabalho aos meus queridos avós Henrique e Ubirajara e a minha bisavó Adalgisa, que não puderam vê-lo concluído.

AGRADECIMENTOS

Acho que é a parte mais gostosa e complicada de se escrever, pois sem querer se esquece de alguém, não por que este não é importante, mas sim por um ato falho, então, desde já, peço desculpas aos esquecidos. Mas se serve de consolo, vocês foram, também, muito importantes para mim.

Aos meus pais Silvia e Roberto, que sem eles eu não faria nada nesta vida.

Ao meu irmão Rodrigo, por todos os momentos vividos juntos.

A Oma e a Vó, por sempre me mimarem.

À minha namorada Isabel, por ela entender perfeitamente quão difícil é o trabalho de pesquisa, e ainda me dar apoio nos momentos difíceis.

Ao Zão pela orientação, e a possibilidade de aprender e crescer profissionalmente e como pessoa, é com uma imensa gratidão que eu digo obrigado.

À Ro, por todas as ajudas e por escutar todos os meus desabafos.

Aos meus amigos de Sampa, Herby, Vico, Gordo, por me mostrarem quanto importante é uma amizade, mesmo à distância, e pelas grandes viagens.

Ao grande (literalmente) amigão Fábio por me ajudar a me adaptar a esta cidade, e a Carol pela grande amizade.

Aos grandes amigos Reis, Jú, Serjão, Jú, Fafá, Carlão, Rafa, Cassi, Karin, Ingo e Elaine, por todos os motivos de uma verdadeira amizade.

Ao Guilherme, por ser como ele é, a Ana Claudia, por ela ser corintiana, e com isso as gozações, e também por sua amizade e as grandes amigas: Juzona, Li, Tali.

À Professora Cloris, em me ajudar e as meninas de seu laboratório, e a Cris, por todos os PAS que deram errados.

Ao Nino, por me emprestar, ajudar, tirar dúvidas sobre algumas técnicas, que possibilitaram este trabalho.

Ao CEM, por possibilitar o trabalho após as coletas.

Ao Professor Henry, que abriu o seu laboratório para mim e me acolheu como um amigo.

A todos estes um MUITO OBRIGADO, e considere este trabalho de vocês.

SUMÁRIO

RESUMO	v
1- INTRODUÇÃO	1
2- OBJETIVOS	4
3- MATERIAL E MÉTODOS	5
4- RESULTADOS	6
4.1- Descrição Morfológica.....	6
4.2- Caracterização citoquímica.....	12
4.2.1- Detecção de Carboidratos nos Folículos Ovarianos.....	12
4.2.1.1- Ácido Periódico – Schiff (PAS).....	12
4.2.1.2- Alcian Blue pH 2,5 (AB pH 2,5).....	12
4.2.1.3- Alcian Blue pH 1,0 (AB pH 1,0).....	13
4.2.2- Detecção de Proteínas Totais nos Folículos Ovarianos.....	13
4.2.2.1- Fast Green (FG).....	13
5- DISCUSSÃO	20
5.1- Descrição Morfológica.....	20
5.2- Caracterização Citoquímica.....	22
6- CONCLUSÃO	25
7- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	26
8- APÊNDICES	29
8.1- Hematoxilina-Eosina (HE).....	30
8.2- Alcian Blue pH 1,0 e pH 2,5 (AB pH1,0 e pH2,5).....	31
8.3- Ácido Periódico – Schiff (PAS).....	32
8.4- Fast Green (FG).....	33

RESUMO

Devido à ausência de estudos que caracterizem o desenvolvimento ovocitário de *Atherinella brasiliensis*, este trabalho visa caracterizar a ovogênese da espécie, utilizando análises histológicas e citoquímicas. Foram realizadas coletas mensais entre novembro de 1998 a outubro de 1999 em uma planície de maré adjacente a gamboa do Baguaçu, na Baía de Paranaguá, Paraná. Os exemplares foram seccionados na região ventral e tiveram as gônadas retiradas, sendo que algumas foram fixadas em Bouin (máximo 20 horas) e em seguida armazenadas em álcool 70%. As gônadas foram preparadas para a realização de lâminas permanentes e coradas com Hematoxilina-Eosina (HE) (descrição morfológica) e com as técnicas de coloração, Ácido Periódico-Schiff (PAS) (detecção de açúcares neutros), Alcian Blue pH 2,5 (AB pH 2,5) (detecção de açúcares ácidos carboxilados e sulfatados), Alcian Blue pH 1,0 (AB pH 1,0) (detecção de açúcares ácidos sulfatados) e Fast Green (FG) (detecção de proteínas totais). Através da análise histológica dos ovários, corados com HE, foram caracterizadas 6 fases de desenvolvimento ovocitário. A análise morfológica permitiu observar entre o ovócito e as células foliculares (a partir da fase II) uma estrutura (camada) filamentosa acidófila. Através do PAS, o citoplasma mostrou uma maior intensidade de reação nas fases mais desenvolvidas. As células foliculares, a membrana vitelina e a camada dos filamentos se coraram em todas as fases. As vesículas citoplasmáticas não se coram, ao contrário dos grânulos de vitelo. Através do AB pH 2,5 detectou-se açúcares ácidos no citoplasma dos ovócitos, exceto nas fases I e VI. As vesículas citoplasmáticas, membrana vitelina e os filamentos mostram-se sem afinidade. As células foliculares e os grânulos de vitelo mostram-se corados. Através do AB pH 1,0 detectou-se açúcares ácidos sulfatados no citoplasma dos ovócitos apenas nas fases II, III e IV. As vesículas citoplasmáticas, grânulos de vitelo, membrana vitelina e camada de filamentos não apresentaram coloração e as células foliculares apenas na fase II. A utilização do FG permitiu observar que o citoplasma dos ovócitos em todas as fases de desenvolvimento apresenta-se corado (exceto a fase I). A camada de filamentos, membrana vitelina e células foliculares possuem afinidade pelo corante. Os resultados do presente estudo permitem mencionar que a estrutura filamentosa, corada por PAS e FG, possivelmente desempenha a função de fixação do folículo maduro no substrato (auxiliando na fecundação e início do desenvolvimento embrionário), além de uma função protetora dos ovócitos, sugerindo uma adaptação reprodutiva da espécie no ambiente. Os carboidratos ácidos, provavelmente, são fundamentais na manutenção da ovogênese e os carboidratos neutros e proteínas, desempenham uma função de nutrição para o embrião. A presença de carboidratos neutros na membrana vitelina pode estar relacionada com o reconhecimento do espermatozoide específico.

1. INTRODUÇÃO

Estuários são locais onde ocorre o encontro da água doce (proveniente dos rios) com a água salgada (proveniente do mar), logo possui uma salinidade intermediária entre o rio e o mar, a qual aumenta no período de seca e diminui, no chuvoso. Além da salinidade, há outros fatores atuantes (temperatura, O₂ dissolvido, pH e sedimento). Os ambientes estuarinos são locais que apresentam fauna e flora adaptáveis às pressões ambientais e estabilidade ecológica em um ambiente fisicamente favorável, porém frágil a mudanças introduzidas pelo homem (YANES-ARANCIBIA, 1986).

Os estuários possuem microambientes, tais como gamboas (rios estuarinos), áreas de manguezais e planícies de marés, locais estes, onde são necessários estudos que permitam identificar as características destas áreas, seus padrões hidrológicos e biológicos e as conseqüências de alterações em tais padrões, tendo em vista a sobrevivência das espécies dependentes desta área.

Dentre os vários ambientes do ecossistema estuarino, as áreas rasas (planícies de maré) foram pouco estudadas. As planícies de maré são locais que ficam submersos pela ação das marés, foram pouco estudadas e por isso, pouco se sabe sobre a sua utilização e sobre as espécies de peixes que a habitam.

O Complexo Estuarino Baía de Paranaguá se localiza no litoral paranaense, sendo composto por 5 baías: Guaraqueçaba, Pinheiros, Laranjeira, Paranaguá e Antonina.

Em sondagens preliminares realizadas em planícies de maré do Complexo Estuarino Baía de Paranaguá, dentre as várias espécies de peixes encontradas o peixe-rei, *Atherinella brasiliensis* (Atherinidae), apresentou a maior freqüência e abundância, sendo o objeto de estudo neste trabalho.

Esta espécie é de pequeno porte e ocorre da Venezuela ao Rio Grande do Sul (FIGUEIREDO e MENEZES, 2000). Alimenta-se basicamente de detritos vegetais e, em escala menor, de pequenos peixes e crustáceos e ocasionalmente de outros invertebrados.

É considerada uma espécie estuarina residente, pois desenvolve todo o seu ciclo de vida neste ambiente.

Dentre os estudos biológicos, a biologia reprodutiva possibilita determinar os aspectos reprodutivos das espécies e de acordo com DIAS e colaboradores (1998), para a obtenção de informações sobre a época, local e o tipo de desova, sobre a fecundidade e o entendimento do ciclo reprodutivo de indivíduos, se faz necessária uma classificação do desenvolvimento gonadal.

Nos estudos reprodutivos os ovários possuem uma maior importância perante os testículos, pois atuam como determinantes da época de desova, bem como do possível número de descendentes (CHAVES e VAZZOLER, 1984), além de sofrerem ao longo do ano uma variação cíclica, que pode ser estudada tanto do ponto de vista estrutural quanto funcional (VIZZIANO e BEROIS, 1990).

A avaliação do grau de maturação ovariana pode ser feita utilizando-se métodos macroscópicos e/ou microscópicos.

Os métodos macroscópicos levam em consideração características como: tamanho e volume que a gônada ocupa na cavidade, cor, vascularização, visualização de ovócitos (podendo ser opacos, translúcidos ou hialinos). Muitas vezes este método não é suficiente, como também pode levar a uma determinação errada do estágio de desenvolvimento ovariano, pois é bastante subjetivo e generalizado não permitindo detectar desova recente ou iminente (DIAS *et al*, 1998).

Para se entender o mecanismo de desenvolvimento ovariano, faz-se necessário a compreensão da ovogênese.

A maturação dos ovócitos é um processo contínuo (CHINI *et al*, 2001). A ovogênese envolve uma série de modificações a nível nuclear, citoplasmático e folicular (MARQUES *et al*, 2000). Uma vez que as células germinativas femininas passam por profundas modificações durante seu desenvolvimento, podendo caracterizar fases ao longo do processo de ovogênese (VAZZOLER, 1996). Estas fases são usadas como

parâmetro para determinar o desenvolvimento reprodutivo, pois as células se desenvolvem desde a ovogônia até os ovócitos maduros (WEST, 1990).

Segundo FÁVARO e CHAVES (1999) conhecer o desenvolvimento das células germinativas auxilia no entendimento do mecanismo reprodutivo. Apesar de estudos histológicos fornecerem informações precisas sobre o desenvolvimento ovocitário, as interpretações algumas vezes são confusas porque os diferentes autores usam diferentes termos para uma mesma estrutura (WEST, 1990).

Devido à escassez de trabalhos sobre a biologia de *Atherinella brasiliensis* no Brasil (PESSANHA e ARAÚJO, 2001) e à ausência de estudos que caracterizem o desenvolvimento ovocitário, este trabalho visa caracterizar a ovogênese da espécie, utilizando análises histológicas e citoquímicas, fornecendo assim conhecimento que possibilite um melhor entendimento da biologia reprodutiva desta espécie, tão freqüente em nosso litoral.

2. OBJETIVOS

Este trabalho tem como objetivo descrever morfologicamente a ovogênese de *Atherinella brasiliensis*, caracterizando as diferentes fases de desenvolvimento dos folículos ovarianos, através de análises histológicas e citoquímicas (de carboidratos e proteínas totais) dos ovários, possibilitando assim um maior entendimento e conhecimento do processo reprodutivo.

3. MATERIAL E MÉTODOS

Foram realizadas coletas mensais entre novembro de 1998 a outubro de 1999 em uma planície de maré adjacente a gamboa do Baguaçu, na Baía de Paranaguá, Paraná.

Para a realização das coletas, utilizou-se rede tipo picaré com 30,0m de comprimento por 2,0m de boca e 3m de altura, e malha de 0,5cm entre nós adjacentes, com a qual se efetuou os arrastos.

Os exemplares de *Atherinella brasiliensis* foram seccionados na região ventral para exposição de suas gônadas, podendo-se desta maneira identificar o sexo macroscopicamente. Posteriormente as gônadas foram retiradas e fixadas em Bouin, no máximo por 20 horas e em seguida armazenadas em álcool 70%.

As gônadas foram desidratadas em série crescente de álcoois (etanol 70%, 80%, 90% e 100%) com 3 banhos de 20 minutos em cada concentração, diafanizadas em xilol (3 banhos de 5 minutos cada) e incluídas em parafina.

Os cortes foram realizados na espessura de 5 μ m a 7 μ m, distendidos em lâminas de vidro, hidratados em série decrescente de etanol, corados com Hematoxilina-Eosina (para descrição morfológica), e as seguintes técnicas histoquímicas, Ácido Periódico-Schiff (PAS) (detecção de carboidratos neutros), Alcian Blue pH 2,5 (AB pH 2,5) (detecção de carboidratos ácidos carboxilados e sulfatados), Alcian Blue pH 1,0 (AB pH 1,0) (detecção de carboidratos ácidos sulfatados) e Fast Green (FG) (detecção de proteínas totais).

Os controles negativos realizados na detecção de carboidratos foram:

- Ausência do ácido periódico (controle do PAS).
- Metilação (controle dos AB pH 2,5 e pH 1,0).

A análise das lâminas foi efetuada em microscópio de luz e documentada através do fotomicroscópio Zeiss Amophot do Setor de Ciências Biológicas da UFPR.

4. RESULTADOS

4.1 DESCRIÇÃO MORFOLÓGICA.

Os critérios utilizados no presente trabalho nas análises microscópicas para caracterizar as fases da ovogênese foram: tamanho dos folículos, surgimento de células foliculares, estrutura filamentosa e membrana vitelina, afinidade por corante e surgimento de inclusões citoplasmáticas, basicamente os mesmos já utilizados por SCHULTZ e colaboradores, (2002).

Através da análise histológica dos ovários, corados com hematoxilina-eosina (HE) foram caracterizadas 6 fases de desenvolvimento ovocitário.

Fase I (ovogônia) - células com núcleo grande e claro, presença de nucléolo único, basófilo e central, citoplasma escasso. As ovogônias podem se apresentar isoladas ou em ninhos de células (Fig. 1).

Fase II – O ovócito apresenta forma arredondada ou angular, núcleo com alguns nucléolos e citoplasma basófilo. Ocorre o surgimento das células foliculares, que se apresentam como uma única camada de células pavimentosas, as quais mantêm as mesmas características no decorrer do processo. Entre o ovócito e as células foliculares, forma-se uma camada filamentosa acidófila (Fig. 2).

Fase III – No ovócito não ocorrem mudanças nucleares aparentes, exceto pelo aumento no número de nucléolos. No citoplasma aumentado e agora menos basófilo, ocorre o surgimento de vesículas em seu interior. Ocorre a formação da membrana vitelina entre o ovócito e a estrutura filamentosa formada na fase II. A fase III foi subdividida em 2 sub-fases, de acordo com o número e tamanho das vesículas citoplasmáticas e do número de filamentos e espessura da camada filamentosa anexa ao ovócito.

Sub fase III inicial – apresenta poucas e pequenas vesículas citoplasmáticas e um pequeno número de filamentos, proporcionando pouca espessura à camada filamentosa (Fig. 3 e 4).

Sub fase III final – o ovócito se mostra aumentado e contém uma maior quantidade de vesículas citoplasmáticas de maior tamanho. Observa-se um maior número de filamentos e o aumento na espessura da camada filamentosa entre a membrana vitelina e as células foliculares (Fig. 4).

Fase IV – Ovócitos aumentados em relação às fases anteriores. Esta fase é caracterizada pela presença de vesículas citoplasmáticas juntamente com grânulos de vitelo no citoplasma, o qual perde a basofilia. Ocorre um aumento na espessura da camada filamentosa (Fig. 5 e 6).

Fase V - Dificil visualização do núcleo devido ao aumento do volume do citoplasma (que se torna acidófilo). Há predomínio de grânulos de vitelo. Aumento da espessura da membrana vitelina juntamente com a camada filamentosa adjacente (Fig. 5 e 6).

Fase VI - Ocorre a hidratação pré-ovulatória característica em peixes marinhos-estuarinos. Os grânulos de vitelo fundem-se, deixando o citoplasma com aspecto homogêneo (Fig. 7).

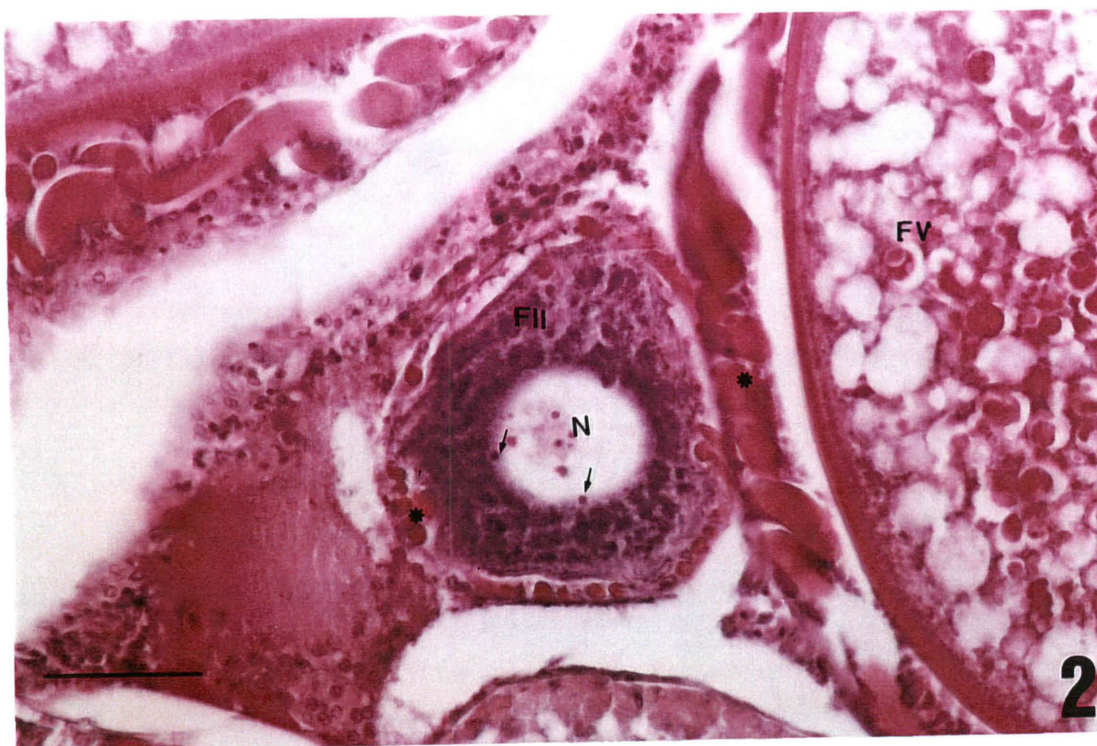
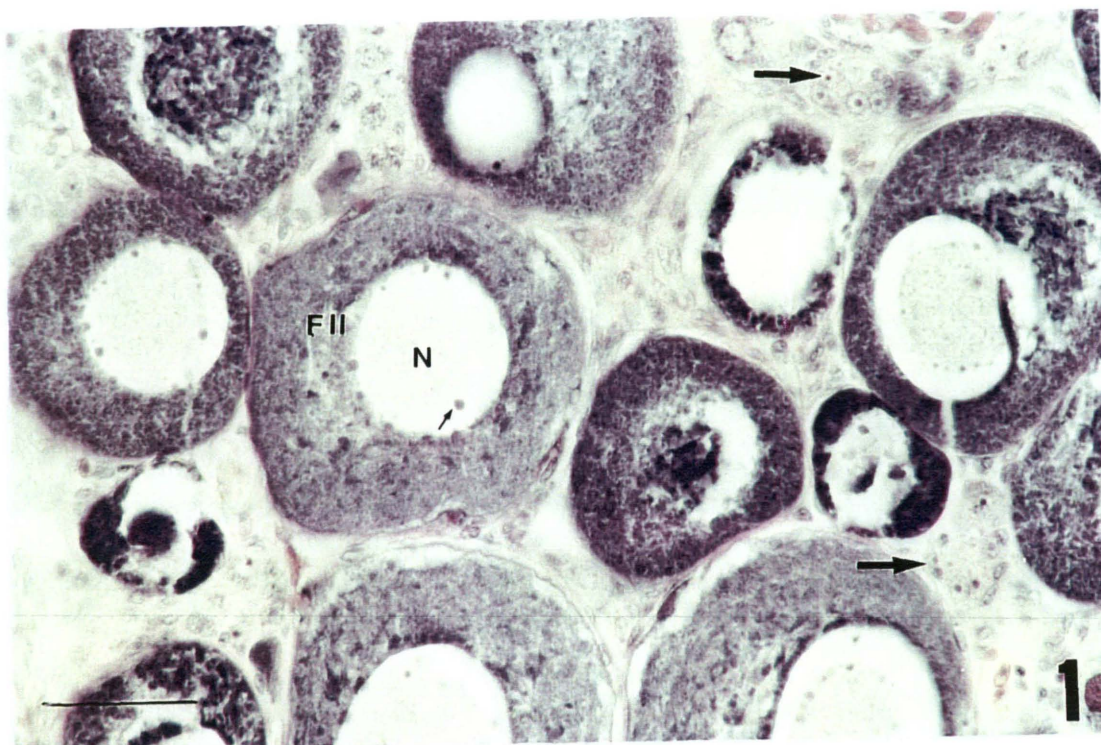


Figura 1: Ovogônias em ninhos (→), folículo ovariano fase II (FII), núcleo (N) e nucléolo (→). HE, escala = 30 μ m.

Figura 2: Folículo ovariano fase II (FII), núcleo (N) e nucléolo (→), folículo ovariano fase V (FV), filamentos (*). HE, escala = 45 μ m.

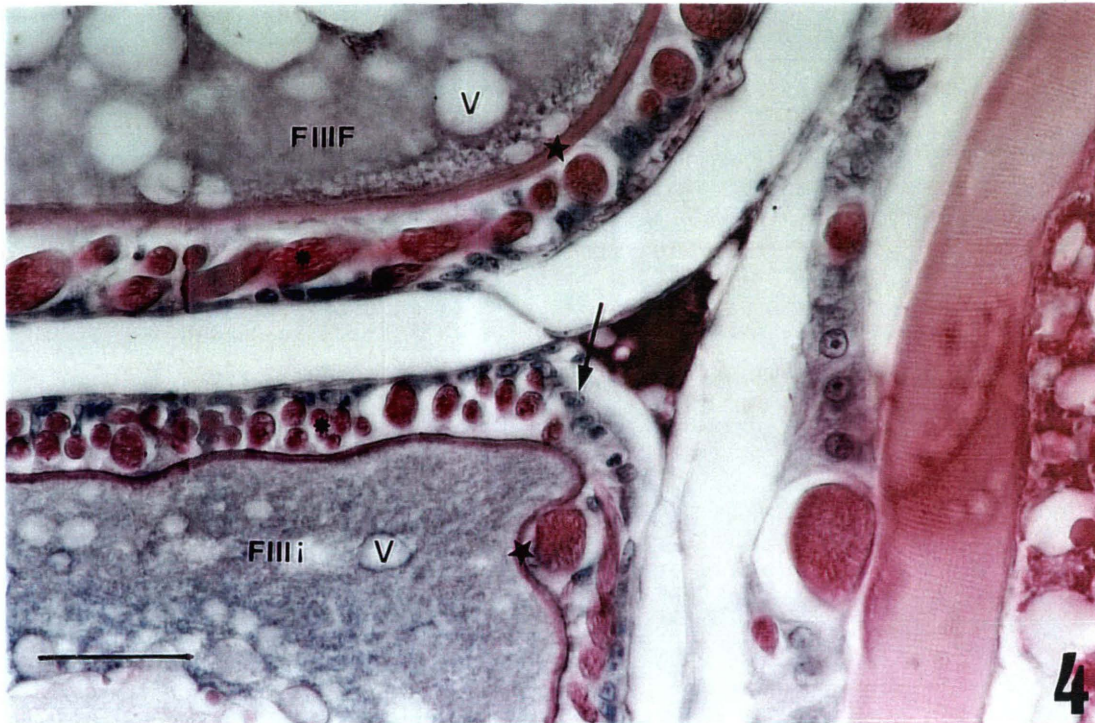
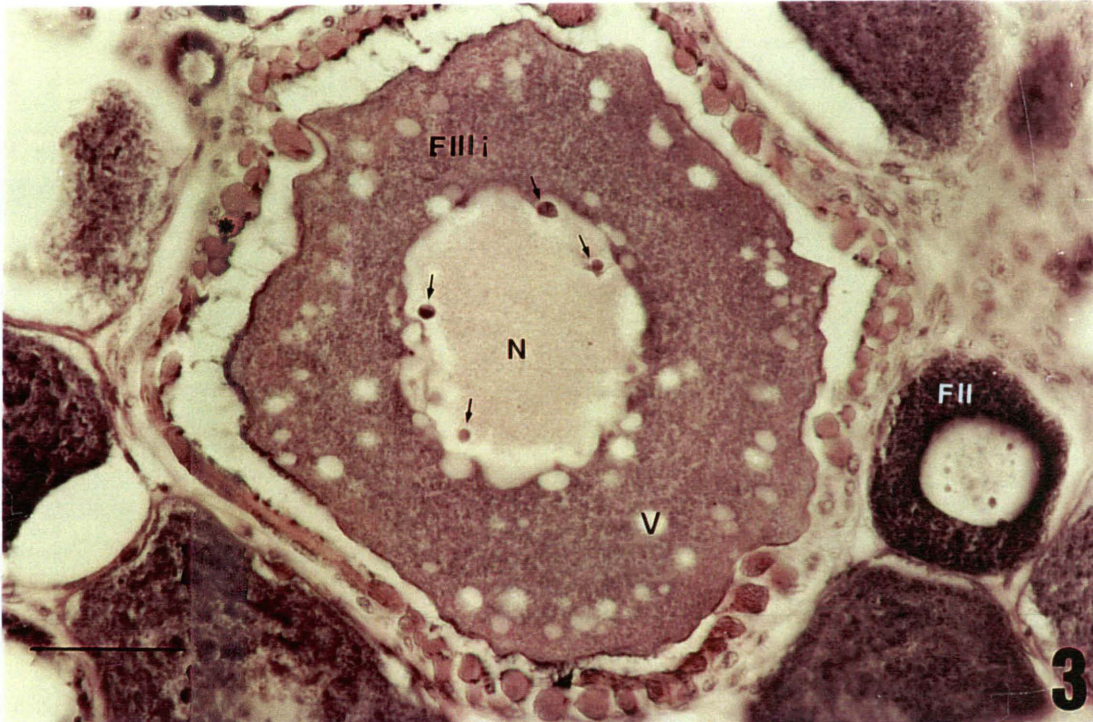


Figura 3: Folículo ovariano fase II (FII), folículo ovariano fase III inicial (FIII i) núcleo (N), nucléolo (→), vesícula (V) e filamentos (*). HE, escala = 30 μ m.

Figura 4: Folículo ovariano fase III inicial (FIII i), vesícula (V), folículo ovariano fase III final (FIII F), filamentos (*), membrana vitelina (★) e células foliculares (↔). HE, escala = 30 μ m.

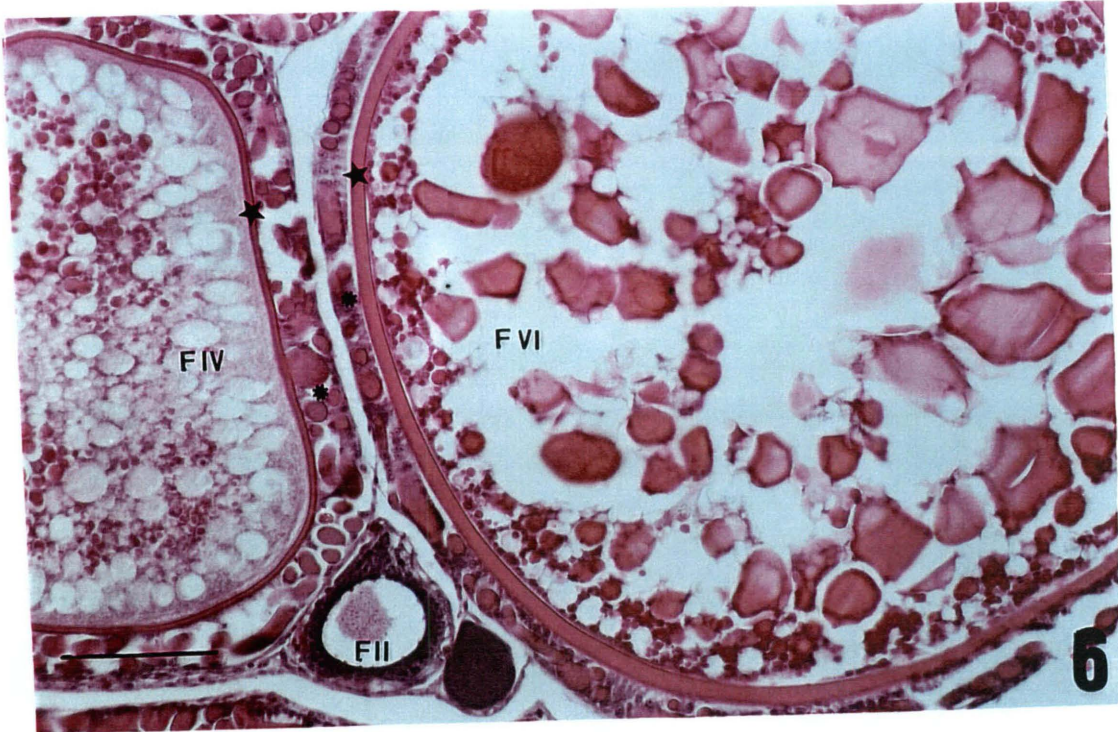
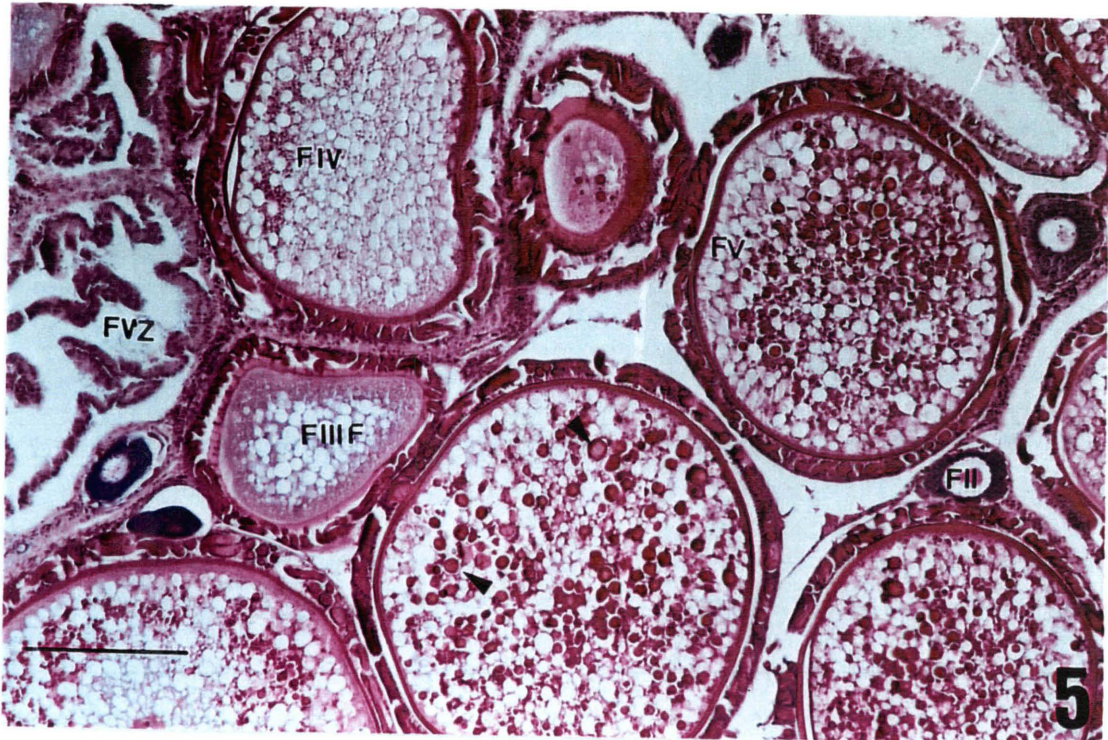


Figura 5: Folículo ovariano fase II (FII), folículo ovariano fase III final (FIII F), folículo ovariano fase IV (FIV), folículo ovariano fase V (FV), folículo vazio (FVZ) e grânulo de vitelo (\blacktriangleright). Coloração HE, escala = 180 μ m.

Figura 6: Folículo ovariano fase II (FII), folículo ovariano fase IV (FIV), folículo ovariano fase VI (FVI), filamentos (*) e membrana vitelina (★). HE, escala = 90 μ m.

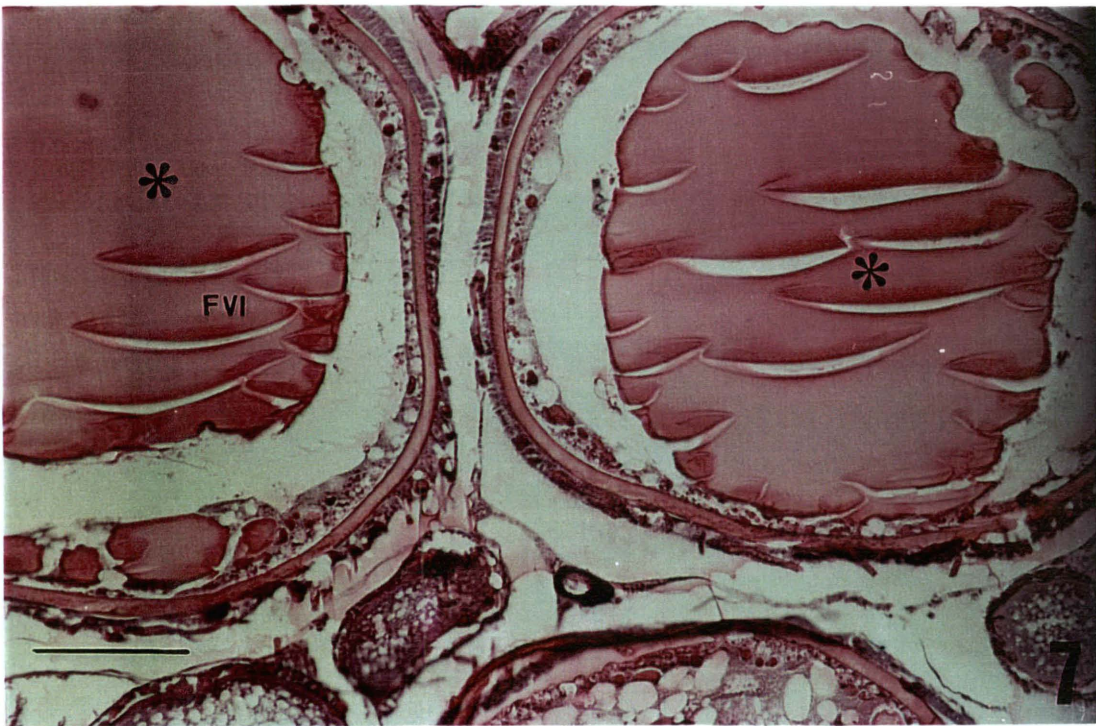


Figura 7: Folículo ovariano fase VI (FVI), fusão dos grânulos de vitelo (*). HE, escala = 180 μ m.

4.2 CARACTERIZAÇÃO CITOQUÍMICA

4.2.1 Detecção Dos Carboidratos Nos Folículos Ovarianos

Na utilização do PAS, estruturas coradas em magenta indicam reação positiva, detectando açúcares neutros. Utilizando as técnicas do AB pH 2,5 e pH 1,0 as estruturas coradas em azul, indicam reação positiva, demonstrando os açúcares ácidos.

Os controles negativos, realizados para as técnicas de detecção de açúcares, não apresentaram-se corados.

4.2.1.1 Ácido Periódico-Schiff (PAS) (detecção de carboidratos neutros)

A detecção dos carboidratos neutros foi realizada através da técnica do PAS. Todas as fases do desenvolvimento ovocitário, exceto a fase I, mostraram afinidade pelo corante.

O citoplasma dos ovócitos possui maior intensidade de coloração nas fases mais desenvolvidas (Figs. 8, 9 e 10).

Os carboidratos neutros estão presentes nas células foliculares e na membrana vitelina em todas as fases.

As vesículas citoplasmáticas não se apresentam coradas, ao contrário dos grânulos de vitelo. A camada dos filamentos apresenta afinidade pelo PAS, desde o seu surgimento na fase II (Figs. 8, 9 e 10).

4.2.1.2 Alcian Blue pH 2,5 (AB pH 2,5) (detecção de carboidratos ácidos carboxilados e sulfatados).

A detecção de carboidratos ácidos (carboxilados e sulfatados) foi realizada através do AB pH 2,5. Esta técnica permitiu detectar açúcares ácidos no citoplasma dos ovócitos em todas as fases da ovogênese, exceto nas fases I e VI (Figs. 11 e 12).

As vesículas citoplasmáticas e a membrana vitelina mostraram-se não coradas ao contrário dos grânulos de vitelo, que apresentaram reação positiva. As células foliculares

mostraram-se pouco coradas. A camada filamentosa adquiriu fraca coloração entre os filamentos, os quais mostram-se sem afinidades pelo AB pH 2,5 (Figs. 11 e 12).

4.2.1.3 Alcian Blue pH 1,0 (AB pH 1,0) (detecção de carboidratos ácidos sulfatados).

A detecção de carboidratos ácidos sulfatados foi realizada através do AB pH 1,0. Esta técnica permitiu detectar açúcares ácidos no citoplasma dos ovócitos apenas nas fases II, III e IV da ovogênese, não mostrando reação positiva nas fases I, V e VI (Figs. 13 e 14).

As vesículas citoplasmáticas mostraram-se não coradas e os grânulos de vitelo corados. Os carboidratos ácidos sulfatados estão presentes nas células foliculares apenas na fase II, nas demais fases é perdida a afinidade desta estrutura pelo corante.

A membrana vitelina e a camada de filamentos não adquiriram coloração (Figs. 13 e 14).

4.2.2 Detecção Das Proteínas Totais Nos Folículos Ovarianos

4.2.2.1 Fast Green (FG)

A detecção de proteínas totais foi realizada através da técnica do Fast Green.

O citoplasma dos ovócitos mostra-se corados em todas as fases do desenvolvimento, exceto na fase I.

A camada de filamentos, a membrana vitelina e as células foliculares demonstraram afinidade pelo corante, apresentando diferentes graus de intensidade de coloração (Figs. 15, 16 e 17).

Os resultados da citoquímica de carboidratos e proteínas totais se encontram na tabela 1.

Tabela 1: Detecção de carboidratos e proteínas totais pelas técnicas: Ácido Periódico-Schiff (PAS), Alcian Blue pH 2,5 (AB pH 2,5), Alcian Blue pH 1,0 (AB pH 1,0) e Fast Green (FG). Cf (células foliculares), Ct (citoplasma), Vv (vesículas vitelínicas), Mv (membrana vitelina), Gv (grânulo de vitelo), EF (estrutura filamentosa). Reação negativa (-), reação positiva fraca (+), reação positiva moderada (++) e reação positiva intensa (+++).

Fases		PAS	AB pH 2,5	AB pH 1,0	FG	
I		-	-	-	-	
II	Cf	+	+	+	+	
	EF	+	+	-	+++	
	Ct	+	++	+	++	
III	Inicial	Cf	+	+	-	+
		EF	+	+	-	+++
		Mv	++	-	-	+++
		Ct	+	++	++	++
		Vv	-	-	-	-
	Final	Cf	+	+	-	+
		EF	+	+	-	+++
		Mv	++	-	-	+++
		Ct	+	++	++	+
		Vv	-	-	-	-
IV	Cf	+	+	-	+	
	EF	+	+	-	+++	
	Mv	++	-	-	+++	
	Ct	+	++	+	+	
	Vv	-	-	-	-	
	Gv	+++	++	+	++	
V	Cf	+	+	-	+	
	EF	+	+	-	+++	
	Mv	++	-	-	+++	
	Ct	+	+	+	+	
	Vv	-	-	-	-	
	Gv	+++	+	+	++	
VI	Cf	+	+	-	+	
	EF	+	+	-	+++	
	Mv	++	-	-	+++	
	Ct	+++	-	-	++	

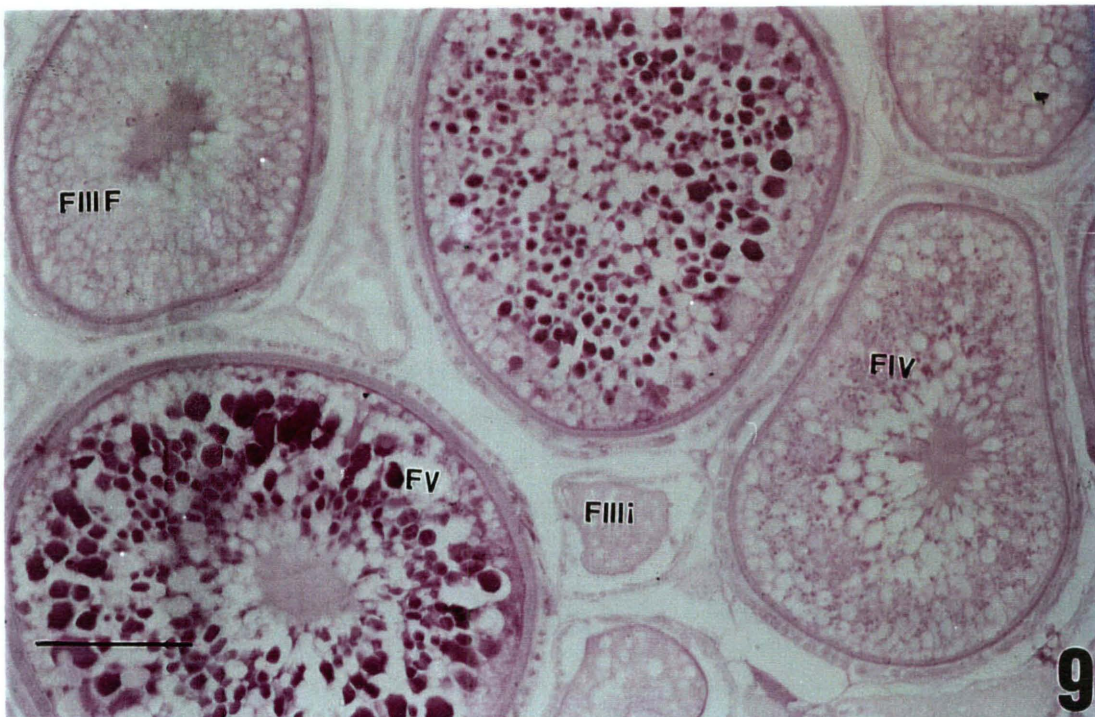
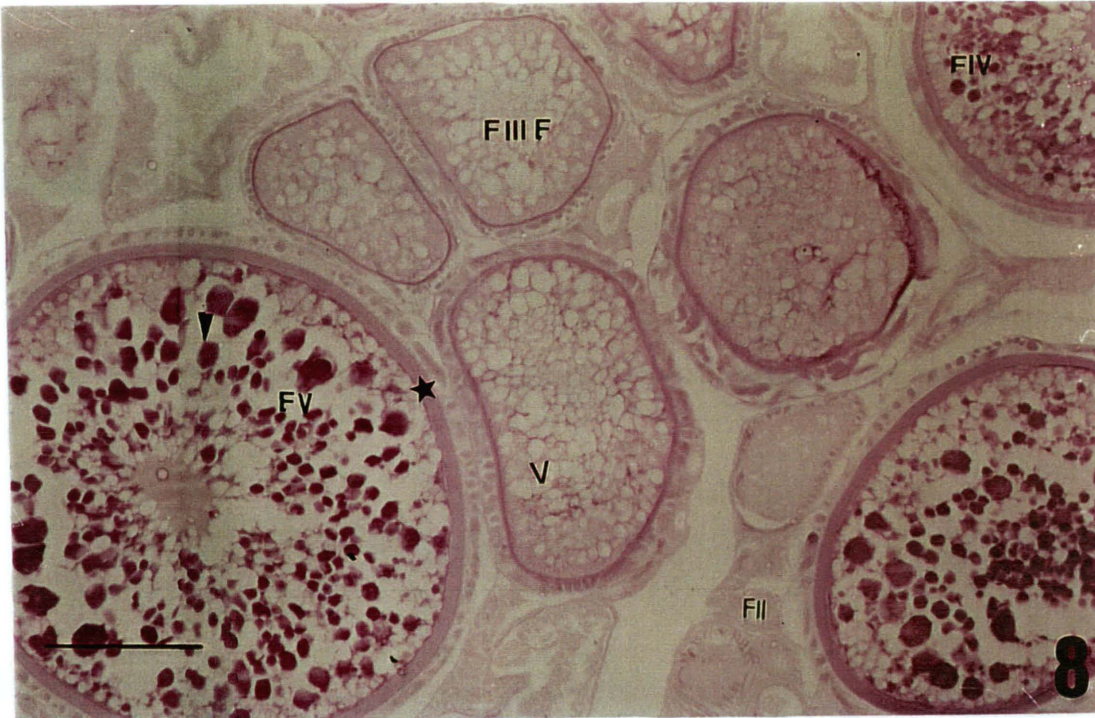


Figura 8: Folículo ovariano fase II (FII), folículo ovariano fase III final (FIII F), folículo ovariano fase IV (FIV), folículo ovariano fase V (FV), membrana vitelina (★), vesícula citoplasmática e grânulo de vitelo. PAS, escala = 180 μ m.

Figura 9: Folículo ovariano fase III inicial (FIII i), folículo ovariano fase III final (FIII F), folículo ovariano fase IV (FIV), folículo ovariano fase V (FV). PAS, escala = 180 μ m.

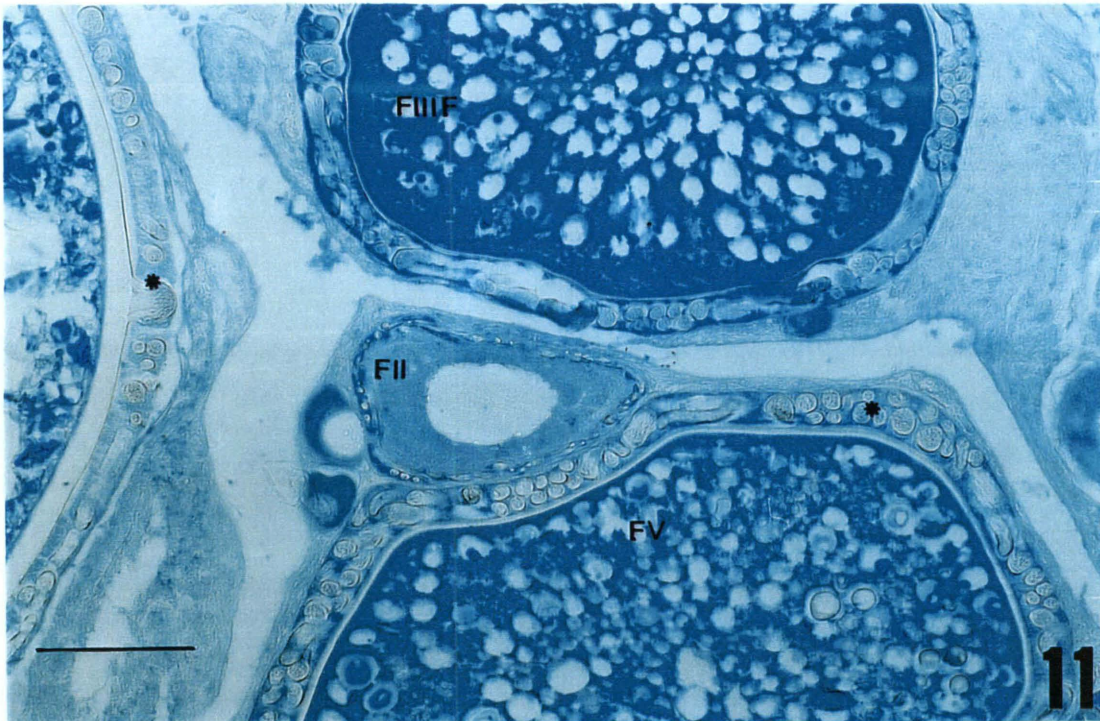
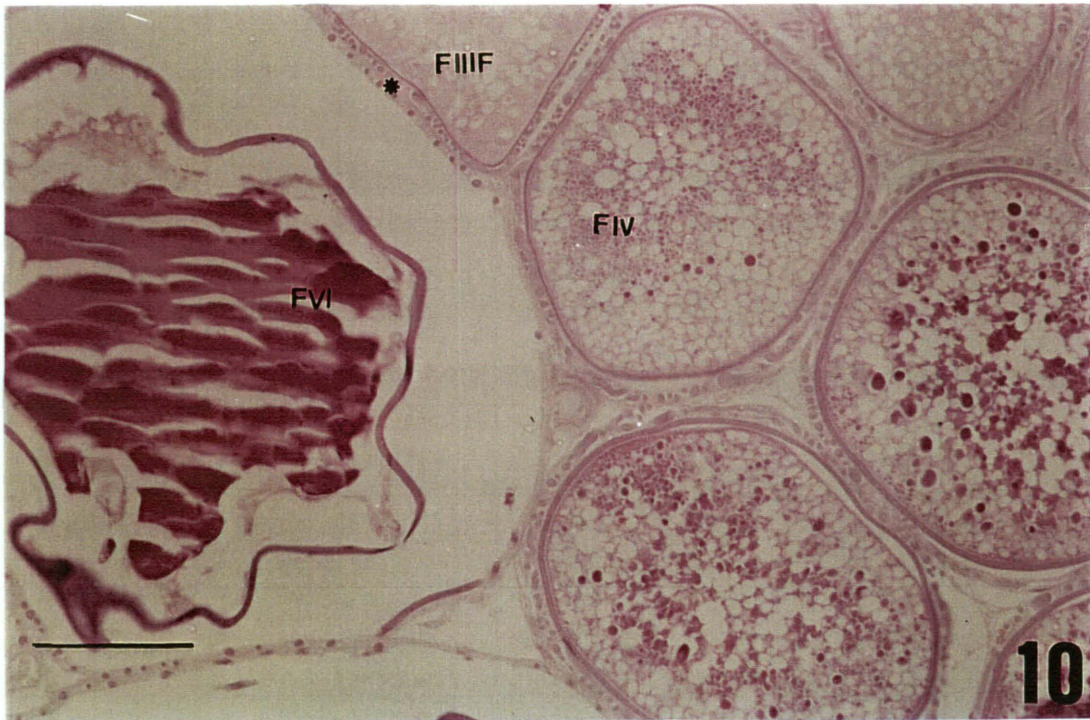


Figura 10: Folículo ovariano fase III final (FIII F), folículo ovariano fase IV (FIV), folículo ovariano fase VI (FVI), filamentos (*). PAS, escala = 180 μ m.

Figura 11: Folículo ovariano fase II (FII), folículo ovariano fase III final (FIII F), folículo ovariano fase V (FV), filamentos (*). AB pH 2,5, escala = 90 μ m.



Figura 12: Folículo ovariano fase II (FII), folículo ovariano fase III final (FIII F), filamentos (*), membrana vitelina (★). AB pH 2,5, escala = 180 μ m.

Figura 13: Folículo ovariano fase II (FII), folículo ovariano III final (FIII F), folículo ovariano fase IV (FIV), folículo ovariano fase V (FV), filamentos (*). AB pH 1,0, escala = 180 μ m.

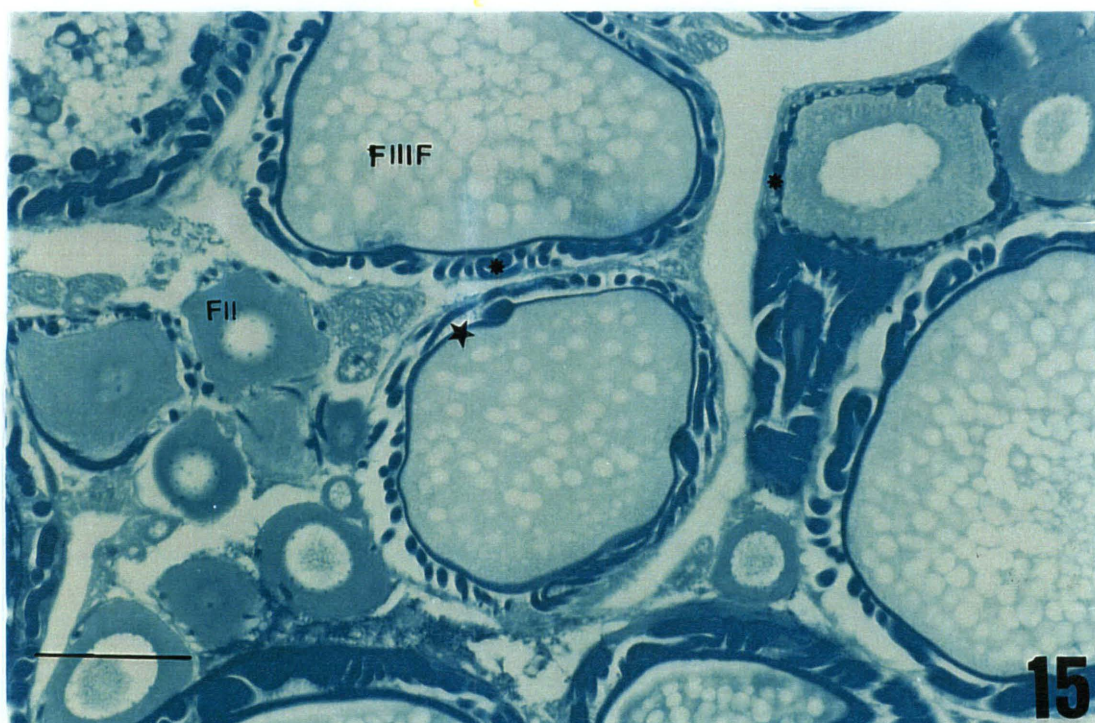
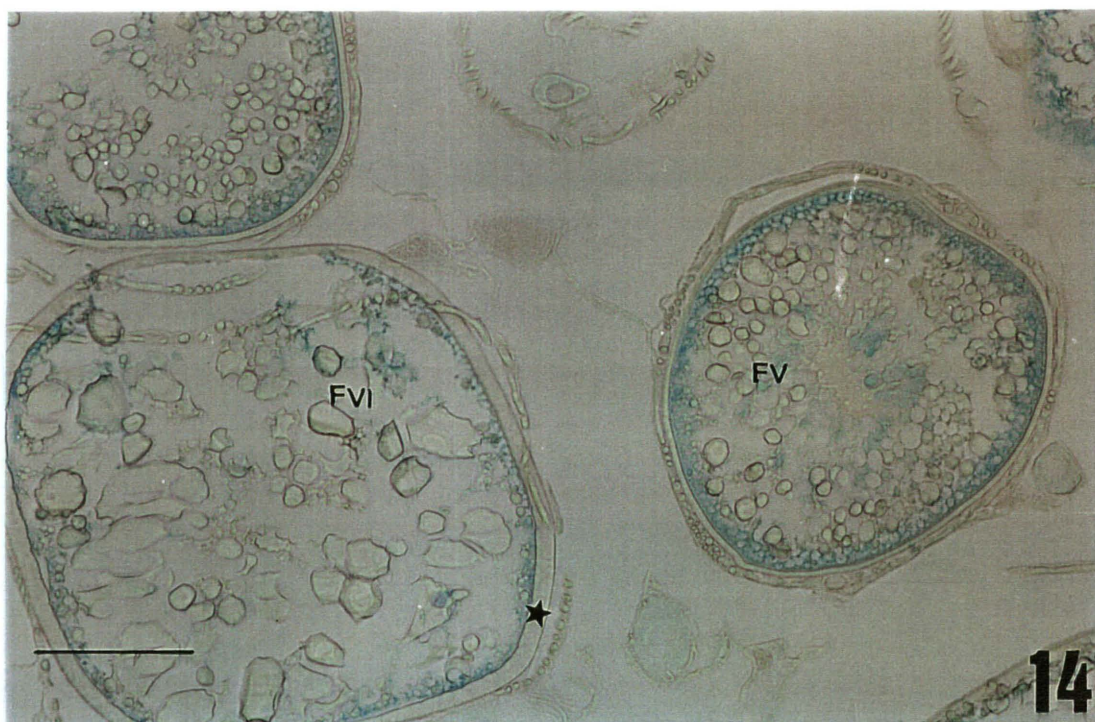


Figura 14: Folículo ovariano fase V (FV), folículo ovariano fase VI (FVI), membrana vitelina (★). AB pH 1,0, escala = 180 μ m.

Figura 15: Folículo ovariano fase II (FII), folículo ovariano fase III final (FIII F), filamentos (*), membrana vitelina (★). FG, escala = 90 μ m.

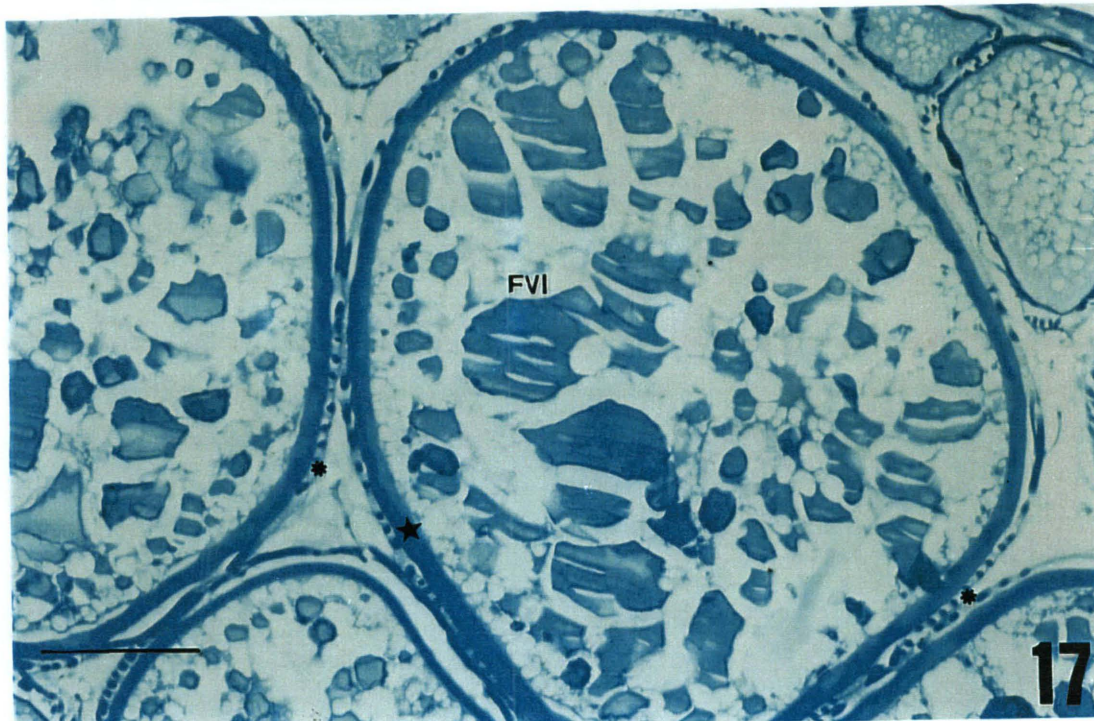
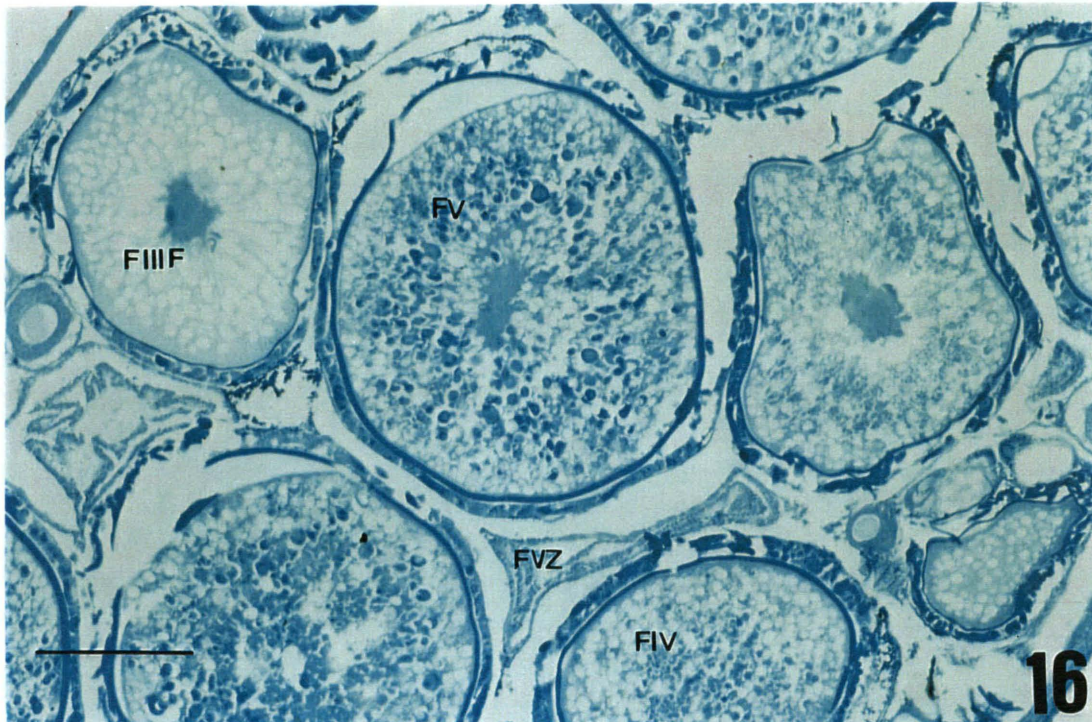


Figura 16: Folículo ovariano fase III final (FIII F), folículo ovariano fase IV (FIV), folículo ovariano fase V (FV), folículo vazio (FVZ). FG, escala = 180 μ m.

Figura 17: Folículo ovariano fase VI (FVI), filamentos (*), membrana vitelina (★). FG, escala = 180 μ m.

5. DISCUSSÃO

A necessidade da análise microscópica das gônadas, preferencialmente os ovários, se expressa nos estudos de reprodução que visam associar época e tipo de desova, bem como a determinação do período reprodutivo das espécies.

DIAS e colaboradores (1998) relatam que muitos erros ocorrem quando é utilizada apenas a análise macroscópica dos ovários e recomendam a utilização da análise microscópica. Devido a isso, é necessário conhecer a ovogênese da espécie que se está trabalhando para posteriormente montar uma escala de desenvolvimento gonadal que condiz com a biologia reprodutiva da espécie.

Associando a análise macroscópica e microscópica, consegue-se chegar a uma classificação que reflita a verdadeira dinâmica reprodutiva apresentada pela espécie (ISSAC-NAHUM *et al*, 1984).

5.1 DESCRIÇÃO MORFOLÓGICA

No presente estudo, a caracterização de 6 fases de desenvolvimento ovocitário de *A. brasiliensis*, condiz com o utilizado por diversos autores que trabalharam com diferentes espécies de peixes marinhos-estuarinos: ISSAC-NAHUM e colaboradores (1984); CHAVES (1989); SILVA e ESPER (1991); BERNARDES e DIAS (2000); SCHULTZ e colaboradores (2002); ROCHA e colaboradores (2002).

VAZZOLER (1996) descreveu 5 fases de ovogênese para as espécies de peixes de água doce e 6 para peixes marinhos. Esta diferença no número de fases no desenvolvimento ovocitário é devida à hidratação pré-ovulatória observada somente em peixes marinhos-estuarinos. Segundo CHAVES (1989) é uma característica adquirida através de uma convergência adaptativa ao meio.

As características descritas para as ovogônias de *Atherinella brasiliensis* são as mesmas descritas para outros teleósteos e segundo CHINI e colaboradores (2001), as características destas células demonstram uma alta atividade de síntese de RNA, que

serão necessários ao longo do processo de maturação. De acordo com FÁVARO e CHAVES (1999) a fase II (fortemente basófila), demonstra intensa síntese protéica, necessária para a manutenção do desenvolvimento ovocitário. Desta maneira as sínteses de RNA e protéica que ocorrem nas fases I e II respectivamente, são eventos essenciais para a vitelogênese que se iniciará a partir da fase III.

A subdivisão da fase III em duas subfases, se deu em decorrência de modificações em estruturas relacionadas ao ovócito e anexas a ele (vesículas citoplasmáticas e estrutura filamentosa).

Através da análise microscópica, foi verificada a presença de uma camada filamentosa ao redor dos ovócitos (entre as células foliculares e a membrana vitelina). As maiores das descrições das fases da ovogênese em teleósteos, não mencionam a ocorrência desta camada de filamentos.

Estes filamentos também foram verificados por HUAQUÍN (1980) em *Basilichthys australis*, espécie pertencente à mesma família de *A. brasiliensis* (Família Atherinidae). Os filamentos observados em microscopia óptica surgem em diferentes fases ovocitárias nestas espécies. Em *A. brasiliensis* aparecem na fase II enquanto em *B. australis*, na fase III.

FALCÃO e colaboradores (2003) também observaram estes filamentos em *Strongylura marina*, pertencentes a Família Belonidae, e relataram que os filamentos surgem no folículo ovariano no final da fase II e a sua espessura aumenta até a fase V, diminuindo na fase VI (hialinização).

A existência destes filamentos em diferentes grupos de peixes sugere uma adaptação reprodutiva das espécies ao ambiente, provavelmente possibilitando que os ovos destas espécies se fixem no substrato além de ser mais uma camada do folículo ovariano desempenhando proteção contra os choques mecânicos.

FÁVARO e CHAVES (1999) compreendem por folículo ovariano o ovócito, membrana vitelínica e células foliculares. No presente trabalho, além dos componentes citados por estes autores, também faz parte do folículo ovariano a camada de filamentos

que ocorre entre a membrana vitelina e as células foliculares, tendo o folículo quatro componentes.

O padrão da ovogênese em *Atherinella brasiliensis* não difere muito dos já descritos para outras espécies de teleósteos de ambiente marinho-estuarino. Concordando com os resultados de ROCHA e colaboradores (2002) e SCHULTZ e colaboradores (2002), os folículos vazios e atrésicos de *A. brasiliensis* não foram considerados como fases do desenvolvimento ovocitário pelo fato destas estruturas surgirem em decorrência de tal processo. O folículo vazio surge ao ocorrer a desova e o folículo atrésico ocorre quando folículos em fases adiantadas de vitelogênese, estacionam o seu desenvolvimento, se desintegram e posteriormente são absorvidos pelo ovário.

5.2 CARACTERIZAÇÃO CITOQUÍMICA

A detecção de carboidratos e proteínas não foi observada na fase I de desenvolvimento ovocitário. Isto ocorre por que estas substâncias podem estar realmente ausentes ou se manterem em quantidades muito pequenas nesta fase.

O citoplasma dos ovócitos de *A. brasiliensis* em todas as fases da ovogênese (exceto na fase I) apresenta carboidratos neutros. Os carboidratos ácidos (carboxilados e/ou sulfatados) surgem na fase II, diminuindo na fase V e desaparecendo na fase VI. A análise de proteínas totais revelou a ausência deste composto somente na fase I.

Os resultados citoquímicos dos folículos em vitelogênese de *A. brasiliensis*, são similares aos obtidos por GUTIÉRREZ e colaboradores (1985) para *Solea senegalensis* e RAMADAM e colaboradores (1987) que detectaram tais substâncias em algumas fases vitelogênicas de *Sparus aurata*.

Isto implica em uma diferente forma de utilização destes compostos, durante o desenvolvimento do ovócito em diferentes espécies de peixes. Os carboidratos ácidos parecem estar envolvidos com a manutenção do processo de desenvolvimento ovocitário (desaparecem antes do final da ovogênese), enquanto os carboidratos neutros podem estar relacionados com a nutrição do embrião no início do desenvolvimento, pois é

demonstrado na fase VI de desenvolvimento do folículo. A mesma inferência foi proposta por FÁVARO e CHAVES (1999) e SCHULTZ e colaboradores (2002).

FALCÃO e colaboradores (2003) relataram que em *Strongylura marina* os filamentos possuem conteúdo protéico e glicídico (predominantemente açúcares neutros), além de carboidratos ácidos carboxilados nas fases iniciais da ovogênese. Em *A. brasiliensis* a composição citoquímica destes filamentos é semelhante ao descrita para *S. marina*, possibilitando assim hipotetizar que os filamentos nestas espécies são uma adaptação reprodutiva ao meio, possibilitando assim a fixação do ovo no substrato.

Em *A. brasiliensis* a membrana vitelina apresentou carboidratos neutros juntamente com proteínas, sugerindo assim a presença de glicoproteínas, concordando com o encontrado por CHINI e colaboradores (2001) em *Leporinus striatus* e por GARCIA e colaboradores (2001) que detectou a presença de glicoproteínas neutras em *Astyanax fasciatus*.

No presente estudo os grânulos de vitelo não apresentaram carboidratos ácidos sulfatados, porém, tiveram uma leve reação positiva ao Alcian Blue pH 2,5, demonstrando a presença de carboidratos ácidos carboxilados. Apresentam uma grande afinidade pelo PAS e Fast Green, detectando, assim, a presença de carboidratos neutros e proteínas. Segundo SESHACHAR e BAGGA (in RAMADAN *et al*, 1979) corpos PAS positivo no citoplasma produzem uma reação positiva com a maioria dos testes para proteína, indicando que existe uma contaminação do complexo carboidrato-proteína. Este fato permite hipotetizar a formação de complexos entre carboidratos neutros e proteínas no citoplasma dos ovócitos durante a ovogênese.

Os glóbulos de vitelo de *Oligosarcus argenteus* não apresentam polissacarídeos, mas detectaram glicogênio nos grânulos observados entre os glóbulos de vitelo (NEVES *et al*, 1992).

RAMADAN e colaboradores (1979), relatam que a formação do vitelo em peixes tem mostrado numerosas variações na origem, no número e nas transformações de

inclusões de vitelo durante a ovogênese e que as inclusões podem conter gordura ou proteína ou glicogênio (podendo conter os 2 últimos associados).

6. CONCLUSÃO

Através das análises histológicas e citoquímicas realizadas em ovários de *Atherinella brasiliensis* podemos concluir que:

- A ovogênese foi caracterizada contendo 6 fases de desenvolvimento dos folículos ovarianos;
- Folículo ovariano compreende o ovócito, membrana vitelina, camada filamentosa e células foliculares;
- Foi observada uma camada filamentosa ao redor dos ovócitos (entre as células foliculares e a membrana vitelina).
- Possivelmente a camada de filamentos desempenha as funções de: 1) fixação do folículo maduro no substrato (auxiliando na fecundação e início do desenvolvimento embrionário), 2) proteção do ovócito. A formação desta camada de filamentos sugere uma adaptação reprodutiva da espécie no ambiente;
- A presença de carboidratos ácidos no início da ovogênese e a ausência dos mesmos na fase final demonstram a importância destas substâncias na manutenção do processo de ovogênese;
- A detecção de carboidratos neutros e proteínas em todas as fases da ovogênese (exceto na fase I), e a intensificação destes compostos no folículo maduro (verificados através de técnicas citoquímicas), sugere a fundamental importância destas substâncias no início do desenvolvimento embrionário, servindo como nutrientes;
- A presença de proteínas e carboidratos neutros na membrana vitelina, sugere que além da proteção que esta confere ao ovócito, a sua constituição química possa permitir o reconhecimento do espermatozóide específico.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BERNARDES, R. A. & DIAS, J. F. 2000. Aspectos da reprodução de peixe-porco, *Balistes capriscus* (Gmelin) (Actinopterygii, Tetraodontiformes, Balistidae) coletado na costa sul do Estado de São Paulo, Brasil. **Revta. Bras. Zool.**, 17 (3): 687-696.
- CHAVES, P. T. C. & VAZZOLER, A. E. A. 1984. Aspectos biológicos de peixes amazônicos. II. Anatomia microscópica de ovários, escala de maturidade e tipo de desova das espécies do gênero *Semaprochilodus*. **Rev. Brasil. Biol.** 44 (3): 347-359.
- CHAVES, P. T. C. 1989. Hidratação pré-ovulatória em peixes: um caráter de origem marinha?. **Revta. Bras. Zool.** 6 (3): 463-472.
- CHINI, H. A. S.; GARCIA, J. A. D.; MAISTRO, E. L. & QUAGIO-GRASSIOTTO, I. 2001. Dynamics and cytochemistry in *Leporinus striatus* Kner (Teleostei, Characiformes, Anostomidae) from the Rio Sapucaí, Minas Gerais State, Brazil. **Revta. Bras. Zool.** 18 (4): 1065-1072.
- DIAS, J. F.; PERE-RIOS, E.; CHAVES, P. C.T. & ROSSI-WONGTSCHOWSKI, C. L. D. B. 1998. Análise macroscópica dos ovários de teleósteos: problemas de classificação e recomendações de procedimentos. **Revta Bras. Biol.**, 58(1): 55-69.
- FALCÃO, M.G.; FÁVARO L.F. & FENERICH VERANI, N. 2003. Descrição histoquímica dos filamentos de fixação do ovo do peixe Agulha *Strongylura marina*, durante a ovogênese. **Anais do XV Encontro Brasileiro de Ictiologia**, São Paulo, p. 282.
- FÁVARO, L. F. & CHAVES, P. T. C. 1999. Aspectos morfológicos e citoquímicos da ovogênese de *Hypostomus cf. tietensis* (Loricariidae) do Lago Igapó (Londrina, PR, Brasil). **Acta Biol. Par.** 28 (1, 2, 3, 4): 125-139.
- FIGUEIREDO, J. L. & MENEZES, N. A. 2000. **Manual de Peixes Marinhos do Sudoeste do Brasil, II Teleostei (1)**. Museu de Zoologia Universidade de São Paulo, São Paulo.

- GARCIA, J. A. D.; CHININ, H. A. S.; MAISTRO, E. L. & QUAGIO-GRASSIOTTO, I. 2001. Dynamics and cytochemistry of oogenesis in *Astyanax fasciatus* (Cuvier) (Teleostei, Characiformes, Characidae) from rio Sapucari, Minas Gerais Satae, Brazil. **Revta. Bras. Zool.** 18 (4): 1057-1064.
- GUTIÉRREZ, M.; SARASQUETE, M. C.; RODRIGUEZ, R. B. 1985. Caracteres citohistoquímicos de carboidratos y proteínas durante la ovogénesis del linguado, *Solea senegalensis* Kaup, 1885. **Invest. Pesq.**, Barcelona, 49 (3): 353-363.
- HUAQUÍN, L. G. 1980. Filamentos coriales em ovócitos *Basilichthys australis* Eigermann (Osteichthyes: Atherinidae). **Arquivos de biologia y medicina experimentales** 13 (1) p. 75.
- ISSAC-NAHUM, V.J; VAZZOLLER, A. E. A. & ZANETTI-PRADO, E. M. 1984. Estudos sobre estrutura, ciclo de vida e comportamento de *Sardinella brasiliensis* (Steindachner, 1879), na área entre 22°S e 28°S, Brasil, Morfologia e histologia de ovários e escala de maturidade. **Bolm. Inst. Oceanogr.** 32 (1): 1-16.
- MARQUES, D. K. S.; ROSA, I. L.; GURGEL, H. C. B. 2000. Descrição histológica de gônadas de traíra *Hoplias malabaricus* (Bloch) (Osteichthyes, Erythrinidae) da barragem do rio Gramame, Alhandra, Paraíba, Brasil. **Revta. Bras. Zool.** 17 (3): 573-582.
- NEVES, C. A.; ANDRADE, D. R.; MATTA, S. L. P.; VIDAL Jr, M. V. & SANTOS, A.A. 1992. Citoquímica dos carboidratos dos glóbulos de vitelo nos ovócitos do lambari-bocarra (*Oligosarcus argenteus* GUNTHER, 1864). **Encontro anual de aqüicultura de Minas Gerais**, (10): 12-16.
- PESSANHA, A. L. M. & ARAÚJO, F. G. 2001. Recrutamento do peixe-rei, *Atherinella brasiliensis* (Quoy & Gaimard) (Atheriniformes, Atherinopsidae), na margem continental da Baía de Sepetiba, Rio de Janeiro, Brasil. **Revta. Bras. Zool.** 18 (4): 1265-1274.

- RAMADAN, A. A. ; EZZAT, A. A. ; KHANDRE, S. E. M. ; MEGUID, N. A. & AZIZ, El-S. H. A. 1987. Cytological and cytochemical changes in the ovary of *Sparus aurata* during the annual reproductive cycle. **Folia Morphol.** Prague, 39 (3): 237-250.
- RAMADAN, A. A., EZZAT, A. & HAFEZ, S. 1979. Studies on fish oogenesis. III. Cytochemical studies on developing oocytes os *Merluccius*. **Folia Morphol.** Prague, 27 (3): 172-181.
- ROCHA, C.; FÁVARO, L. F. ; SPACH, H. L. 2002. Biologia reprodutiva de *Sphoeroides testudineus* (Linnaeus) (Pisces, Osteichthues, Tetraodontidae) da gamboa do Baguaçu, Baía de Paranaguá, Paraná, Brasil. **Revta. Bras. Zool.** 19 (1): 57-63.
- SCHULTZ, Y. D. ; FÁVARO, L. F. ; SPACH, H. L. 2002. Aspectos reprodutivos de *Sphoeroides greeleyi* (Gilbert), Pisces, Osteichthues, Tetraodontidae, da Gamboa do Baguaçu, Baía de Paranaguá, Paraná, Brasil. **Revta. Bras. Zool.** 19 (1): 65-79.
- SILVA, R. M. P. C. & ESPER, M. L. P. 1991. Observações 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.
- VAZZOLER, A. E. A. 1996. **Biologia da Reprodução de Peixes Teleósteos: Teoria e Prática.** Editora da Universidade Estadual de Maringá, Maringá, 169p.
- VIZZIANO, D. & BEROIS, N. 1990. Histologia del ovário de *Macrodon ancylodon* (Bloch y Scheneider, 1801) Teleostei: (Sciaenidae) ovogénesis, folículos post-ovulatórios, atresia. **Rev. Brasil. Biol.** .50 (2): 523-536.
- WEST, G. 1990. Methods of assessing ovarian development in fishes: a review. **Aust. J. Mar. Freshwater Res.**, East Melbourne, v. 41, p. 199-222.
- YANES-ARANCIBA, A. 1986. **Ecologia de la zona costeira.** AGT Editor, Mexico, DF. 187 p.

8. ANEXOS

8.1 Hematoxilina e Eosina (HE)

- Desparafinização

Xilol I: 10 minutos

Xilol II: 10 minutos

- Hidratação

Álcool 100 %: 5 minutos

Álcool 90 %: 5 minutos

Álcool 70 %: 5 minutos

Água destilada: 5 minutos

- Corante

Hematoxilina: 10 segundos

Água destilada corrente: 5 minutos

Eosina: 10 segundos

Água destilada: lavagem

- Desidratação

Álcool 70 %: 1 minuto

Álcool 90 %: 2 minutos

Álcool 100 %: 5 minutos

Álcool 100 %: 5 minutos

- Montagem

Xilol I: 5 minutos

Xilol II: montagem da lâmina

8.2 Alcian Blue pH 1,0 e pH 2,5

- Desparafinização

Xilol I: 10 minutos

Xilol II: 10 minutos

- Hidratação

Álcool 100 %: 5 minutos

Álcool 90 %: 5 minutos

Álcool 70 %: 5 minutos

Água destilada: 5 minutos

- Corante

Alcian Blue de pH 1,0 ou pH 2,5: 30 minutos

Água destilada: lavagem

- Desidratação

Álcool 70 %: 1 minuto

Álcool 90 %: 2 minutos

Álcool 100 %: 5 minutos

Álcool 100 %: 5 minutos

- Montagem

Xilol I: 5 minutos

Xilol II: montagem da lâmina

Controle negativo: Metilação

A lâmina controle foi desparafinizada, hidratada e antes de ser submetida ao corante, foi submersa em solução contendo 100 ml de álcool metílico + 0,8 ml de ácido clorídrico concentrado (em estufa a 60°C) por 5 horas. Posteriormente foi lavada em água, corada, desidratada e montada. O material não se apresentou corado.

8.3 Ácido Periódico - Schiff (PAS)

- Desparafinização

Xilol I: 10 minutos

Xilol II: 10 minutos

- Hidratação

Álcool 100 %: 5 minutos

Álcool 90 %: 5 minutos

Álcool 70 %: 5 minutos

Água destilada: 5 minutos

- Corante

Ácido Periódico 0,5%: 20 minutos

Água destilada: 30 segundos

Reativo de Schiff: 40 minutos

Água sulfurosa: 3 banhos de 5 minutos cada

Água corrente: 10 minutos

- Desidratação

Álcool 70 %: 1 minuto

Álcool 90 %: 2 minutos

Álcool 100 %: 5 minutos

Álcool 100 %: 5 minutos

- Montagem

Xilol I: 5 minutos

Xilol II: montagem da lâmina

Controle negativo:

A lâmina utilizada como controle não foi submetida ao ácido Periódico. Após a completa hidratação foi submersa diretamente no Reativo de Schiff. Posteriormente foi desidratada e montada, não adquirindo coloração.

8.4 Fast Green.

- Desparafinização

Xilol I: 10 minutos

Xilol II: 10 minutos

- Hidratação

Álcool 100 %: 5 minutos

Álcool 90 %: 5 minutos

Álcool 70 %: 5 minutos

Água destilada: 5 minutos

- Corante

Fast green 1% em ácido acético glacial a 1% (pH 2,7): 15 segundos

- Desidratação

Álcool 90 %: 2 minutos

Álcool 100 %: 5 minutos

Álcool 100 %: 5 minutos

- Montagem

Xilol I: 5 minutos

Xilol II: montagem da lâmina