

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

Ariene Cristina Dias Guimarães

**ESTUDO CITOQUÍMICO ESTRUTURAL E ULTRA-ESTRUTURAL DO
DESENVOLVIMENTO OOCITÁRIO EM *SERRASALMUS SPILOPLEURA*
(TELEOSTEI, CHARACIFORMES, SERRASALMINAE)**

Tese apresentada ao Instituto de
Biologia para obtenção do Título
de Doutor em Biologia Celular e
Estrutural na área de Biologia
Celular.

Orientadora: Profa. Dra. Irani Quagio-Grassiotto

2004

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA – UNICAMP**

G947e

Guimarães, Ariene Cristina Dias

Estudo citoquímico, estrutural e ultra-estrutural, do desenvolvimento oocitário em *Serrasalmus spilopleura* (Teleostei, Characiformes, Serrasalminae) / Ariene Cristina Dias Guimarães.--
Campinas, SP: [s.n.], 2004.

Orientadora: Irani Quagio-Grassiotto

Tese (Doutorado) – Universidade Estadual de Campinas .
Instituto de Biologia.

1. Peixes. 2. Citoquímica. 3. Oogênese. I. Quagio-Grassiotto.
II.Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III.
Título.

*Não percas a tua fé entre as sombras do mundo.
Ainda que os teus pés estejam sangrando, segue para
frente, erguendo-a por luz celeste acima de ti mesmo.*

Crê e trabalha.

Esforça-te no bem e espera com paciência.

Tudo passa e tudo se renova na

Terra, mas o que vem do céu

permanecerá...

Eleva, pois, o teu olhar e caminha.

Luta e serve. Aprende e adianta-te.

Brilha a alvorada além da noite.

*Hoje é possível que a tempestade te amarfanche o
coração, te atormente o ideal, aguilhoando-te com a*

aflição ou ameaçando-te com a morte...

Não esqueça, porém, de que amanhã será outro dia.

Meimei

Ao meu marido Fernando.

Aos meus Pais Crismene e Ariel.

*Aos meus Avós Eliane e Hélio,
Nora e Emirene (in memoriam).*

À amiga Irani.

Agradecimentos

À Profa. Dra. Irani Quagio-Grassiotto pela orientação, dedicação e persistência sem as quais certamente não conseguiria chegar até aqui.

Ao Centro de Microscopia Eletrônica, IB - Unesp – Botucatu, na pessoa da supervisora, Profa. Dra. Elisa Aparecida Gregório, pelo uso das instalações para o desenvolvimento desse trabalho.

Aos funcionários do Centro de Microscopia Eletrônica, IB - Unesp – Botucatu, Sra. Maria Eulêda Lino Peres, Sra. Maria Helena Moreno, Sr. Nivalde Antonio Basso, pela presteza, sem a qual não seria possível a realização da parte prática desse trabalho.

À Sra. Maria Helena Moreno pela especial paciência na confecção das eletromicrografias e auxílio no desenvolvimento das técnicas citoquímicas ultra-estruturais.

À Profa. Dra. Maeli Dal Pai Silva pelo auxílio e uso das instalações do Laboratório de Histoquímica e outros auxílios, e à Sra. Sueli Cruz Michelin pelo auxílio no desenvolvimento de algumas técnicas realizadas nesse trabalho.

Aos técnicos do Laboratório de Biologia da Reprodução de Peixes Neotropicais do Depto. de Morfologia, IB, Unesp - Botucatu, Sr. Ricardo André dos Santos Teixeira e Sr. Antônio Vicente Salvador pela colaboração e amizade.

À Sra. Terezinha Biondo Sauer pela presteza, colaboração e amizade.

Às funcionárias da Secretaria do Depto. de Morfologia, IB, Unesp - Botucatu, Srta. Patrícia Luciane Souza Ramos e Srta. Luciana Cristina Montes pelos auxílios.

À todos os Professores do Departamento de Morfologia que de alguma forma contribuíram para minha formação não só durante o Doutorado, mas durante toda a última década.

Ao Departamento de Morfologia, IB, Unesp - Botucatu, pela oportunidade de utilização das instalações e por tão bem me acolher nos últimos dez anos.

À Profa. Dra. Daniela Carvalho dos Santos, à Profa. Dra. Elizete Rizzo, à Profa. Dra. Irene Bastos Franceschini Vicentini, à Profa. Dra. Mary Anne Heidi Dolder e à Profa. Dra. Sônia Nair Bão pelas sugestões feitas no decorrer da banca prévia formal e informal.

Ao Prof. Dr. Luis Edvaldo Pezzato, à Profa. Dra. Margarida Maria Barros e à Profa. Dra. Irene Bastos Franceschini Vicentini pelos auxílio no decorrer da qualificação.

Aos Professores do curso de pós-graduação em Biologia Celular - IB – Unicamp, pelos ensinamentos, dedicação e amizade.

Ao Depto. de Biologia Celular IB – Unicamp pela oportunidade de realizar esse curso de pós-graduação.

Aos funcionários da secretaria do Depto. de Biologia Celular IB – Unicamp, Sra. Liliam Alves Senne Panagio e Sr. Sidnei Henrique Simões, por preciosos serviços prestados, paciência e amizade.

À Fapesp pelo apoio financeiro destinado à esse trabalho.

À UEL pela oportunidade de trabalho.

Aos amigos Mário, Fernanda, Sra. Neuza e Sr. Alaerte por tão bem me acolher em Londrina.

À todos os colegas de pós-graduação e graduação do Depto. de Morfologia, IB – Unesp – Botucatu e do Depto. De Biologia Celular, IB – Unicamp, pelos bons momentos de convivência nos últimos anos.

Aos eternos amigos Carol, Homer, Nereide e Paula que apesar do distanciamento estão sempre presentes no coração e pensamento.

Aos amigos Beto, Daniel, Érico, Fernanda, Gustavo, Laurindo, Lucas, Jussara, Marinho, Nathália, Polato, Priscila, Ricardo, Zé Antônio pelos agradáveis momentos.

À mais que amiga Maria, que mesmo de tão longe torce tanto por mim.

À nova amiga Neusa, que em tão pouco tempo já me ajudou tanto.

Ao Sr. Cesário, Sr. Lafayette, Sr. Waldyr e Sr. Zé Motta pelas agradáveis conversas, incentivos e auxílios.

Ao Sr. Fernando e Sra. Sílvia por me acolherem como uma filha e me tornarem parte da família Bassoli.

À Giovanna, Sandra e Simone pelo carinho.

Aos meus Avós, Tios e Primos que sempre acreditaram e confiaram em mim.

À Lili e Mel, minhas filhas companheiras, por todo carinho e amor que nenhum ser humano pode dar e que alguns não podem entender.

Aos meus Pais pela confiança, incentivo, amor, carinho e amizade. Sem vocês minha vida não teria cores.

Ao meu marido Fernando pelo amor, carinho, paciência e dedicação. Pelo incentivo de seguir em frente mesmo quando as coisas não iam bem, e me fazer acreditar que melhorariam.

À Deus por ter nos dado a vida, por nos provar a cada dia ainda mais o quanto ela é grandiosa e valiosa, e por colocar pessoas maravilhosas ao nosso lado.

Índice

1 RESUMO	1
2 ABSTRACT	3
3 INTRODUÇÃO	5
4 OBJETIVOS	12
5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	13
6 ARTIGOS	24
6.1 “Development and activity of the endomembranous system during the oocyte primary growth of <i>Se Matsalmus spilopleura</i> (Teleostei, Characiformes, Characidae).” Submetido para publicação: Tissue & Cell.	25
6.2 “Desenvolvimento e atividade do sistema de endomembranas durante o crescimento secundário dos oócitos de <i>Se Matsalmus spilopleura</i> (Teleostei, Characiformes, Characidae).”	58
6.3 “Citoquímica, estrutural e ultra-estrutural, do desenvolvimento oocitário de <i>Se Matsalmus spilopleura</i> (Teleostei, Characiformes, Characidae).”	88
7 Conclusões	122

1Resumo

Durante o desenvolvimento oocitário o metabolismo celular é intenso. Várias vias biossintéticas interagem na formação dos componentes e estruturas celulares, destinadas a viabilizar a fertilização e o desenvolvimento inicial do embrião e da larva. Nos oócitos dos teleósteos aparecem e se desenvolvem com esse objetivo, o envelope oocitário, os alvéolos corticais, as inclusões lipídicas e os grânulos de vitelo. Estudos morfológicos, fisiológicos e bioquímicos apontam diferentes sítios e organelas celulares como participantes nesse processo.

As modificações morfo-fisiológicas que têm início durante o crescimento primário e completam-se ao longo do crescimento secundário foram acompanhadas nos oócitos de *Serrasalmus spilopleura* mediante a utilização de técnicas citoquímicas (estruturais e ultra-estruturais). Durante o crescimento primário, as células foliculares mostram corpos densos sob ação do ósmio-imidazol (Im), enquanto no envelope oocitário, a substância amorfa é positiva ao método do vermelho de rutênio (VR). No citoplasma desses oócitos, corpos positivos ao Im estão associados aos grupamentos mitocondriais e ao retículo endoplasmático, grande quantidade de ribossomos é evidenciada pelo EDTA ou método de Bernhard e o corpúsculo de Balbiani responde à técnica da prata amoniaca (AgA). Além disto, elementos do retículo endoplasmático, cisternas e vesículas do complexo de Golgi, lisossomos, corpos multivesiculares e algumas vesículas elétron-densas reagem positivamente à detecção de fosfatases ácidas (AcPase). Elementos do retículo endoplasmático, vesículas do complexo de Golgi e algumas vesículas elétron-densas também respondem positivamente à impregnação com tetróxido de ósmio e iodeto de zinco (ZIO). Elementos do retículo endoplasmático, algumas cisternas e vesículas do complexo de Golgi, algumas microvesículas dos corpos multivesiculares e outras vesículas respondem positivamente à impregnação pelo tetróxido de ósmio e iodeto de potássio (KI). Durante o crescimento secundário, no envelope oocitário a substância amorfa é positiva à AgA e as microvilosidades respondem ao Im e ao VR. No citoplasma dos oócitos, depósitos lipídicos esparsos respondem ao Im, os

alvéolos corticais são positivos ao VR, ao Im e à AgA, enquanto os grânulos de vitelo reagem à AgA. Ainda nos oócitos em crescimento secundário, elementos do retículo endoplasmático incluindo espaço intermembranoso do envoltório nuclear, alguns dictiossomos, lisossomos, grânulos de vitelo, regiões do envelope oocitário e sítios nas células foliculares respondem à AcPase. Alvéolos corticais, estruturas citoplasmáticas heterogêneas, regiões do envelope oocitário e sítios nas células foliculares respondem ao ZIO. Ainda, elementos do retículo endoplasmático, outras vesículas e sítios nas células foliculares respondem positivamente ao KI. As respostas às técnicas utilizadas são discutidas em relação à biologia dos oócitos.

2 Abstract

During oocyte development metabolic activity is intense. Many biosynthetic pathways interact during the formation of the cell structural components, destined to promote the fertilization and the initial embryo and larval development. Therefore, the egg envelope, the cortical alveoli, lipidic inclusions and yolk granules appear and develop in the Teleostei oocytes. Morphological, physiological and biochemical studies show that different cell sites and organelles are at work in these processes.

The morphophysiological changes that occur during oocyte primary and secondary growths in *Serrasalmus spilopleura* were studied under cytochemistry techniques (ultrastructural and structural). During oocyte primary growth, follicular cells show dense bodies when submitted to osmium-imidazole (Im), while in the egg envelope, the amorphous material react to ruthenium red technique (VR). In the oocyte cytoplasm, dense bodies, positive to Im, are associated to mitochondrial clusters and to endoplasmic reticulum, submitted to EDTA or Bernhard method large amounts of ribosomes are evident, and the Balbiani body reacts to amoniacal silver technique (AgA). Also in the previtellogenic oocytes, endoplasmic reticulum components, Golgi complex cisternae and vesicles, lysosomes, multivesicular bodies and some electron-dense vesicles react positively to AcPase detection. These endoplasmic reticulum components, Golgi complex cisternae and vesicles also react positively to osmium tetroxide and potassium iodide impregnation (KI). These structures, except for the Golgi complex cisternae, are already strongly contrasted in response to osmium tetroxide and zinc iodide impregnation (ZIO). Some electron-dense vesicles are stained with ZIO, while microvesicles of multivesicular bodies and other large vesicles, which are isolated in the cytoplasm, are contrasted by KI. During oocyte secondary growth, in the egg envelope, the amorphous material react to AgA and the microvilli react positively to Im and to VR. In the oocyte cytoplasm, scattered lipidic depositions react to Im, the cortical alveoli are positive to VR, to Im and to AgA, while the yolk granules react to AgA. Endoplasmic reticulum components including the nuclear envelope intermembrane

space, some dictiosomes, lysosomes, yolk granules, egg envelope regions and follicular cell sites are reactive to AcPase. The cortical alveoli, heterogeneous cytoplasmic structures, egg envelope regions and follicular cell sites are reactive to ZIO. Still, endoplasmic reticulum components, other vesicles and follicular cell sites react to KI. The reactions to the applied techniques are discussed in relation to the oocytes biology.

3 Introdução

A OOGÊNESE

Na maioria dos peixes teleósteos, o desenvolvimento das gônadas é cíclico, ajustado aos fatores ambientais e sazonais, passando por modificações de caráter morfo-fisiológico ao longo do ano (Nagahama, 1983).

Nesses animais, o ovário é, em geral, um órgão par, cavitário, de formato alongado, envolto pela túnica albugínea e situado na região dorso-caudal da cavidade celomática (Takano, 1968; Guraya *et al.*, 1975; Brummett *et al.*, 1982; Isaac-Nahum *et al.*, 1983; Koya *et al.*, 1995; Lahnsteiner *et al.*, 1997). Internamente, lamelas ovígeras, constituídas por dobras digitiformes de tecido conjuntivo frouxo, altamente innervado e vascularizado, revestidas pelo epitélio germinativo (Koya *et al.*, 1995), são projetadas na cavidade ou lúmen ovariano (Guraya *et al.*, 1975; Brummett *et al.*, 1982; Koya *et al.*, 1995).

Nos teleósteos, as células tronco da linhagem germinativa feminina (oogônias) persistem (Billard, 1987; Selman *et al.*, 1993; Tyler & Sumpter, 1996) e continuam a se dividir durante a vida do animal, não havendo um limite para o número de oócitos que podem produzir (Tyler & Sumpter, 1996).

A proliferação das oogônias dá-se, em geral, em períodos determinados do ciclo reprodutivo do animal, e o recrutamento dos oócitos para a vitelogênese ocorre em um ou mais lotes, que se desenvolvem de forma sincrônica e cuja desova acontece em uma ou mais parcelas na estação de reprodução. Em algumas espécies, a proliferação das oogônias e o recrutamento dos oócitos para a vitelogênese são contínuos, o desenvolvimento é assincrônico, formam-se vários lotes de oócitos em diferentes fases de desenvolvimento e a desova ocorre em múltiplas parcelas ao longo da vida do animal (de Vlaming, 1983).

Na oogênese, as oogônias individuais presentes no epitélio germinativo das lamelas ovígeras, dividem-se várias vezes por mitose. Formam um conjunto ou ninho de células que entram em meiose dando origem aos oócitos que estacionam no estágio de diplóteno da primeira prófase da meiose (de Vlaming, 1983; Wallace & Selman, 1981; Selman & Wallace, 1989, Tyler & Sumpter, 1996, Grier, 2000).

Conforme a meiose avança, as células epiteliais associam-se com os oócitos, esses complexos de células epiteliais e oócitos submergem para debaixo da superfície do epitélio germinativo e as células epiteliais tornam-se células pré-foliculares. Durante a foliculogênese, a membrana basal é sintetizada ao redor do folículo em formação. O folículo é completamente separado do epitélio germinativo pela membrana basal (Grier, 2000). É em diplóteno, portanto, que os oócitos primários deixam os ninhos acompanhados pelas células foliculares que os envolvem (de Vlaming, 1983; Wallace & Selman, 1981; Selman & Wallace, 1989; Bazzoli & Rizzo, 1990; West, 1990; Grier, 2000; Guimarães & Quagio-Grassiotto, 2001). Conforme o folículo se desenvolve, células do conjuntivo dispõem-se ao seu redor, dando origem ao complexo folicular. Esse último é constituído pelo oócito envolto pelo epitélio folicular apoiado na lâmina basal e por duas camadas de células da teca (Grier, 2000).

O CRESCIMENTO PRIMÁRIO DOS OÓCITOS

Constituídos os complexos foliculares, os oócitos entram em crescimento primário e aumentam drasticamente em volume (Wallace & Selman, 1981; Nagahama, 1983; Selman & Wallace, 1989; West, 1990; Bazzoli & Rizzo, 1990; Rizzo & Bazzoli, 1993; Guimarães & Quagio-Grassiotto, 2001). Nesse período, a síntese de RNA é intensa (Guraya, 1986; Tyler & Sumpter, 1996). Este se associa a proteínas (Alberts *et al.*, 2002), é transferido para o citoplasma onde se acumula (Guraya, 1986; Mazabrand *et al.*, 1975; Wallace & Selman, 1990), formando as nuages (Edy, 1975; Clérot, 1976; Toury *et al.*, 1977).

Durante esse período surgem múltiplos nucléolos na região periférica do núcleo (Yamamoto, 1964; Droller & Roth, 1966; Beams & Kessel, 1973; Cruz-Landim & Cruz-Höfling, 1979; Bruslé, 1980; Wallace & Selman, 1981; Nagahama, 1983; de Vlaming, 1983; Lopes *et al.*, 1987; Begovac & Wallace, 1988; Selman & Wallace, 1989; Makeyeva & Yemel'Yanova, 1989; Bazzoli & Rizzo, 1990; West, 1990; Rizzo & Bazzoli, 1993; Guimarães & Quagio-Grassiotto, 2001); os cromossomos plumulados tornam-se visíveis (Nagahama, 1983; Selman & Wallace, 1989); organiza-se o núcleo de vitelo, ou corpúsculo de Balbiani, um

aglomerado de organelas membranosas nas proximidades do núcleo (Hubbard, 1894 *apud* Selman & Wallace, 1989); tem início a formação do envelope oocitário (Anderson, 1967, Quagio-Grassiotto & Guimarães, 2003) e a diferenciação do envoltório folicular (Quagio-Grassiotto & Guimarães, 2003).

A formação do envelope oocitário inicia-se com o aparecimento de pequenas microvilosidades que se projetam na superfície do oócito, bem como na superfície das células foliculares (Wallace & Selman, 1981; Selman & Wallace, 1989; Quagio-Grassiotto & Guimarães, 2003). Durante o desenvolvimento oocitário, as microvilosidades aumentam em número e comprimento, e se estendem por poros ou canais resultantes da deposição de material elétron-denso ao seu redor (Droller & Roth, 1966; Anderson, 1967; Laale, 1980; Cotelli *et al.*, 1988; Begovac & Wallace, 1988, 1989; Cruz-Landim & Cruz-Höfling, 1989; Quagio-Grassiotto & Guimarães, 2003). O material elétron-denso se organiza em camadas variáveis em número, espessura, composição química, estrutura e elétron-densidade (Yamamoto, 1963; Droller & Roth, 1966; Anderson, 1967; Wourms, 1976; Laale, 1980; Cotelli *et al.*, 1988; Begovac & Wallace, 1988, 1989; Cruz-Landim & Cruz-Höfling, 1989; Quagio-Grassiotto & Guimarães, 2003). Entre os microvilos do oócito e os das células foliculares formam-se junções comunicantes (Toshimori & Yasuzumi, 1979).

O CRESCIMENTO SECUNDÁRIO DOS OÓCITOS

O crescimento secundário dos oócitos, ou fase de crescimento gonadotrofina-dependente (Wallace & Selman, 1981; Nagahama, 1983; de Vlaming, 1983; Guraya, 1986) que se segue, caracteriza-se pelo aparecimento dos alvéolos corticais (Anderson, 1968; Wallace & Selman, 1981; Nagahama, 1983; Guraya, 1986; Selman & Wallace, 1989; Bazzoli & Godinho, 1994), ou de seus precursores (de Vlaming, 1983; Makeyeva & Yemel'Yanova, 1989; West, 1990; Guimarães & Quagio-Grassiotto, 2002).

Os alvéolos corticais, cujo conteúdo protéico e de carboidratos é de síntese endógena (Anderson, 1968; Tesoriero, 1980; Wallace & Selman, 1981; Nagahama, 1983; de Vlaming, 1983; Selman & Wallace, 1989; Tyler & Sumpter,

1996), são responsáveis pelo endurecimento do envelope oocitário (Tyler & Sumpter, 1996) e pela prevenção da poliespermia (Ohta *et al.*, 1990; Tyler & Sumpter, 1996) durante a fecundação.

Característicos desses oócitos são ainda: o núcleo de contorno irregular, com ondulações nas quais localizam-se os nucléolos (Yamamoto, 1964; Anderson, 1968, Lopes *et al.*, 1987; Bazzoli & Rizzo, 1990; Guimarães & Quagio-Grassiotto, 2002); a inclusão de corpos lipídicos (Tyler & Sumpter, 1996); a formação do envelope oocitário propriamente dito (Yamamoto, 1963; Droller & Roth, 1966; Anderson, 1967, 1968; Hirose, 1972; Wourms, 1976; Tesoriero, 1977; Laale, 1980; Lopes *et al.*, 1982; 1987; Cotelli *et al.*, 1988; Begovac & Wallace, 1988; Cruz-Landim & Cruz-Höfling, 1989; Makeyeva & Yemel'Yanova, 1989; West, 1990; Rizzo & Bazzoli, 1993; Quagio-Grassiotto & Guimarães, 2003); e o aparecimento da célula micropilar entre as células foliculares, determinando o polo animal (Kobayashi & Yamamoto, 1985; Begovac & Wallace, 1988; Nakashima & Iwamatsu, 1989, 1994).

Avançando em seu crescimento secundário, os oócitos entram em vitelogênese. Nesse processo, a vitelogenina (precursora da proteína vitelínica) sintetizada e secretada pelo fígado, sob efeito de estrógeno circulante, é entregue via circulação na superfície dos oócitos em crescimento, capturada por endocitose mediada por receptores, translocada para o citoplasma; quebrada por proteólise em lipovitelina e fosfovítina (as subunidades polipeptídicas das proteínas vitelínicas) e utilizadas na formação dos grânulos de vitelo (Wallace, 1985).

Nessa fase, os oócitos aumentam drasticamente em volume devido ao acúmulo de vitelo (Wallace & Selman, 1981; Nagahama, 1983; de Vlaming, 1983; Selman & Wallace, 1989; West, 1990; Tyler & Sumpter, 1996; Guimarães & Quagio-Grassiotto, 2002), que ocorre em grânulos, limitados por membrana, formados pela fusão de vesículas cobertas menores, que aparecem inicialmente na periferia citoplasmática (Yamamoto, 1964; Droller & Roth, 1966; Anderson, 1968; Ulrich, 1969; Selman & Wallace, 1983; Begovac & Wallace, 1988; Guimarães & Quagio-Grassiotto, 2002).

Nesses oócitos, o núcleo torna-se menos volumoso e de formato irregular

(Yamamoto, 1964), pode estar localizado na região central do oócito e conter nucléolos periféricos (Lopes *et al.*, 1987), ou ainda estar migrando para o polo animal, e, portanto, ser excêntrico e conter nucléolos pequenos e irregulares, sendo alguns vacuolizados (Rizzo & Bazzoli, 1993). O envelope oocitário sofre um espessamento considerável, devido ao alongamento dos microvilos e à deposição de substância amorfa, e no final da vitelogênese está completamente formado (Yamamoto, 1963; Anderson, 1967; Laale, 1980; Abraham *et al.*, 1984; Cruz-Landim & Cruz-Höfling, 1989; Quagio-Grassiotto & Guimarães, 2003). As células foliculares aumentam em número e podem tornar-se cilíndricas ou cúbicas (Lopes *et al.*, 1987), apresentando sistema de endomembranas desenvolvido, muitos ribossomos livres, e inúmeras mitocôndrias (Wourms, 1976; Begovac & Wallace, 1988; Cruz-Landim & Cruz-Höfling, 1989; Guimarães & Quagio-Grassiotto, 2002).

Ao final do crescimento secundário, o oócito entra em maturação final, e retoma o processo meiótico (Nagahama, 1983; de Vlaming, 1983; Selman & Wallace, 1989; West, 1990). Neles, o núcleo (vesícula germinativa) migra para a periferia celular, o envoltório nuclear fragmenta-se, os cromossomos condensam-se e avançam para a metáfase da primeira meiose, o primeiro corpúsculo polar é eliminado e, completa-se a primeira meiose; por fim, os cromossomos remanescentes avançam para a metáfase da segunda meiose, onde permanecem. Nas espécies marinhas, nova proteólise das proteínas vitelínicas provoca a hidratação dos oócitos maduros e novo aumento do volume celular (Selman & Wallace, 1989).

ESTUDOS BIOQUÍMICOS E ULTRA-ESTRUTURAIS DO DESENVOLVIMENTO OOCITÁRIO.

Estudos bioquímicos e ultra-estruturais do desenvolvimento oocitário nos teleósteos mostram que, nos oócitos em crescimento primário, é intenso o processo de síntese e transferência de RNAs, do núcleo para o citoplasma, onde se acumulam (Mazabrand *et al.*, 1975; Wallace & Selman, 1990). Os RNAs citoplasmáticos estão sempre associados a proteínas (Alberts *et al.*, 2002) e os seus depósitos constituem as “nuages”, comuns às células germinativas iniciais, tanto femininas como masculinas, nos mais variados grupos de animais (Edy,

1975; Clérot, 1976; Toury *et al.*, 1977).

Os alvéolos corticais contêm proteínas e glicoconjugados ácidos (Tesoriero, 1980; Selman *et al.*, 1988), e propõe-se que sua síntese seja endógena e associada ao complexo de Golgi (Selman *et al.*, 1988). Os lipídios podem ser estruturais (fosfolipídios) ou de reserva (triglicerídios), e sua ocorrência, localização e quantidade nos oócitos dos teleósteos parece ser espécie-específica (Tyler & Sumpter, 1996).

Os grânulos de vitelo contêm proteínas de origem exógena. Porém, a proteína exógena e as do vitelo apresentam diferenças bioquímicas (Selman & Wallace, 1989; Matsubara & Sawano, 1995) resultantes da ação do sistema endosoma/lisosoma do oócito (Hart & Pontier, 1979; Wall & Meleka, 1985; Opresko & Karpf, 1987; Sire *et al.*, 1994). Corpos multivesiculares, freqüentemente observados nos oócitos vitelogênicos (Shackley & King, 1977; Begovac & Wallace, 1988; Selman & Wallace, 1989) podem participar desse processo (Wall & Patel, 1987; Hart *et al.*, 1987).

Outra estrutura constituída por proteínas e também por glicoproteínas nos oócitos dos teleósteos é a zona radiata ou envelope oocitário. Localizado entre a superfície do oócito e o epitélio folicular, tem sua formação atribuída ao próprio oócito (Anderson, 1967; Wourms, 1976; Cotelli *et al.*, 1988, Begovac & Wallace, 1988).

PROBLEMÁTICA DE INTERESSE

A localização das organelas e sítios celulares que participam da síntese e processamento dos componentes dos oócitos pode ser feita através de análises citoquímicas estruturais e ultra-estruturais.

Assim, o uso de técnicas que contrastam ribonucleoproteínas (Bernhard, 1969), lipídios (Angermüller & Fahimi, 1982), proteínas básicas (MacRae & Meetz, 1970) podem se prestar à sua detecção e ao acompanhamento da sua dinâmica de deposição e utilização pelos oócitos. Já a contrastação do sistema de endomembranas (Reincke & Walther, 1978; Locke & Huie, 1983; McDonald, 1984) pode levar a um maior esclarecimento do papel do mesmo na formação dos

alvéolos corticais, dos grânulos de vitelo e do envelope oocitário. A contrastação dos glicoconjugados ácidos (Luft, 1971) pode auxiliar no estudo dos alvéolos corticais.

Além disto, os procedimentos citoquímicos para detecção de fosfatases ácidas (Pino *et al.*, 1981) podem permitir a localização dos sítios celulares envolvidos no processamento das proteínas do vitelo.

ESPÉCIME EM ESTUDO

As informações sobre o desenvolvimento das células germinativas dos teleósteos são oriundas de um número pequeno de espécies, considerando-se que vivem no ambiente aquático marinho e de água doce cerca de 20.000 espécies desses animais (Tyler & Sumpter, 1996). Das cerca de 8.000 espécies neotropicais de água doce, 1.300 são Characíformes (Vari & Malabarba, 1998).

Na América do Sul, espécies dessa Ordem sustentam as principais pescarias de águas continentais e apresentam táticas reprodutivas diversificadas (Vazzoler & Menezes, 1992).

Dentre os Characíformes da família Characidae, as espécies do gênero *Serrasalmus* spp compreendem as piranhas verdadeiras, mais agressivas, e as pirambebas, peixes menos agressivos, como *S. spilopleura* (Braga, 1976), são não migradoras, de período reprodutivo longo e coincidente com o período chuvoso (Rodrigues *et al.*, 1978; Leão *et al.*, 1991; Vazzoler & Menezes, 1992). Os *Serrasalmus* spp adaptam-se bem aos ambientes lênticos, e são comuns nos reservatórios brasileiros onde apresentam reprodução contínua, não sazonal e desenvolvimento oocitário assincrônico com desovas em múltiplas parcelas (Paiva, 1958; Braga, 1976; Lamas & Godinho, 1996; Teles & Godinho, 1997; Fujihara, 1997).

As peculiaridades da biologia reprodutiva desse animal o tornam um modelo biológico em potencial para os estudos sobre a morfo-fisiologia das gônadas.

4 Objetivos

Na busca dos sítios e organelas celulares envolvidos nas principais vias biossintéticas das células germinativas femininas e dos componentes químicos presentes nas estruturas oocitárias dos Teleostei, estudou-se em *S. spilopleura*:

- a dinâmica e composição das nuages;
- a atuação do sistema de endomembranas;
- a presença de lipídios;
- a dinâmica e a composição dos alvéolos corticais;
- o processamento e a composição do vitelo;
- a dinâmica e a composição do envelope oocitário;
- a atividade biossintética das células foliculares.

Para tanto, diferentes técnicas citoquímicas (estruturais e ultra-estruturais) foram utilizadas:

- EDTA ou método de Bernhard para a detecção de ribonucleoproteínas (Bernhard, 1969);
- Prata amoniacal para a detecção de proteínas básicas (MacRae & Meetz, 1970);
- Vermelho de rutênio para a detecção de glicoconjugados ácidos (Luft, 1971);
- Ósmio-imidazol para a detecção de lipídios (Angermüller & Fahimi, 1982);
- Tetróxido de ósmio e ferrocianeto de potássio (McDonald, 1984), tetróxido de ósmio e iodeto de potássio (Locke & Huie, 1983) e tetróxido de ósmio e iodeto de zinco (Reincke & Walther, 1978) para a contrastação do sistema de endomembranas;
- Detecção de fosfatases ácidas (Pino *et al.*, 1981) para localização de enzimas hidrolíticas.

5 Referências Bibliográficas

Abraham, M., Higle, V., Lisos, S., Tibika, H. The cellular envelope of oocytes in teleosts. Cell Tissue Res., v. 235, p. 493-410, 1984.

Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Walter, P. Molecular Biology of the Cell. 4^a ed. Garland Publishing, Inc, New York & London, p.1463, 2002.

Anderson, E. The formation of the primary envelope during oocyte differentiation in teleosts. J. Cell Biol., v. 35, p. 193-212, 1967.

Anderson, E. Cortical alveoli formation and vitellogenesis during oocyte differentiation in pipefish, *Syngnathus fuscus*, and killifish, *Fundulus heteroclitus*. J. Morphol., v. 125, p 23-60, 1968.

Angermüller, S., Fahimi, D.H. Imidazole-buffered osmium tetroxide: an excellent stain for visualization of lipids in transmission electron microscopy. Histochem. J., v. 14, p. 823-825, 1982.

Bazzoli, N., Godinho, H.P. Cortical alveoli in the oocytes of the freshwater neotropical teleost fish. Boll. Zool., v. 61, p. 301-308, 1994.

Bazzoli, N., Rizzo, E. A comparative cytological and cytochemical study of oogenesis in ten Brazilian teleost fish species. Eur. Arch. Biol., v. 101, p. 399-410, 1990.

Beams, H.W., Kessel, R.G. Oocyte structure and early vitellogenesis in the trout, *Salmo gairdneri*. Am. J. Anat., v. 136, p. 105-122, 1973.

Begovac, P.C., Wallace, R.A. Stages of oocyte development in the pipefish, *Syngnathus scovelli*. J. Morphol., v. 197, p. 353-369, 1988.

Begovac, P.C., Wallace, R.A. Major vitelline envelope proteins in pipefish oocytes originate within the follicle and are associated with the Z3 layer. J. Exp. Zool., v. 251, p. 56-73, 1989.

Bernhard, W. A new staining procedure for electron microscopical cytology. J. Ultrastruct. Res., v. 27, p. 259-265, 1969.

Billard, R. The reproductive cycle of male and female brown trout (*Salmo trutta fario*), a quantitative study. Reprod. Nutr. Develop., v.27, p. 29-44, 1987.

Braga, R.A. Ecologia e etologia de piranhas no nordeste do Brasil (Pisces – *Serrasalmus lacépède*, 1803). Tese (Doutorado) – IB, USP, São Paulo, 268p., 1976.

Brummett, A.R., Dumont, J.N., Larkin, J.R. The ovary of *Fundulus heteroclitus*. J. Morphol., v. 173, p 1-16, 1982.

Bruslé, S. Fine structure of early previtellogenic oocytes in *Mugil (Liza) auratus* Risso, 1810 (Teleostei, Mugilidae). Cell Tissue Res., v. 207, p. 123-134, 1980.

Clérot, J.C. Les groupements mitochondriaux des cellules germinales des poissons téléostéens cyprinidés. I. Étude ultrastructurale. J. Ultrast. Res., v. 54, p. 461-475, 1976.

Cotelli, F., Andronico, F., Brivio, M. Lamia, C.L. Structure and composition of the fish egg chorion (*Carassius auratus*). J. Ultrast. Mol. Struct. Res., v. 99, p. 70-78, 1988.

Cruz-Landim, C., Cruz-Höfling, M.A. Comportamento dos nucléolos e mitocôndrios durante a ovogênese de peixes teleósteos de água doce. Acta Amazônica, v. 9, p. 723-728, 1979.

Cruz-Landim, C., Cruz-Höfling, M.A. Estudo ao microscópio eletrônico da deposição do envoltório do oócito de peixes: I. *Plogiocion squamosissimum* (Teleostei – Scianidae). Naturalia, v. 14, p. 97-105, 1989.

de Vlaming, V. Oocyte development patterns and hormonal involvements among teleosts. In: Rankin, J.C., Pitcher, T.J. and Duggan, R.T. Control Processes in Fish Physiology. Croom Helm Ltd., London & Canbrra, p. 176-199, 1983.

Droller, M.J., Roth, T.F. An electron microscopic study of yolk formation during oogenesis in *Lebistes reticulatus guppyi*. J. Cell Biol., v. 28, p. 209-232, 1966.

Edy, E.M. Germ plasm and the differentiation of the germ cell line. Int. Rev. Cytol., v. 43, p. 229-280, 1975.

Fujihara, C.Y. Dinâmica populacional de *Serrasalmus spilopleura*, Kner, 1860 no reservatório de Jurumirim (rio Paranapanema, SP): aspectos do crescimento, estrutura populacional, reprodução e nutrição. Dissertação (Mestrado), IB, UNESP, Botucatu, SP, 91p., 1997.

Grier, H. Ovarian germinal epithelium and folliculogenesis in the Common Snook, *Centropomus undecimalis* (Teleostei: Centropomidae). J. Morphol., n. 243, p. 265-281, 2000.

Guimarães, A.C.D., Quagio-Grassiotto, I. Ultrastructural aspects of oogenesis and oocyte primary growth in *Serrasalmus spilopleura* (Teleostei, Characiformes, Characidae). Tissue Cell, v.33, p.241 - 248, 2001.

Guimarães, A.C.D., Quagio-Grassiotto, I. The ultrastructural aspects of vitellogenesis or oocyte secondary growth in *Serrasalmus spilopleura* (Teleostei, Characiformes, Serrasalminae) J. Submicrosc. Cytol. Pathol., v.34, p.199 - 206, 2002.

Guraya, S.S. The cell and molecular biology of fish oogenesis. Monographs in Development Biology. Karger, New York, v. 18, 223p., 1986.

Guraya, S.S., Kaur, R., Saxena, P. K. Morphology of ovarian changes during the reproductive cycle of the fish, *Mystus tengara* (Ham.). Acta Anat., v. 91, p. 222-260, 1975.

Hart, N., Pontier, P. Acid fosfatase in eggs of the zebrafish, *Brachidanio rerio*. Experientia, v. 35, p. 999-1001, 1979.

Hart, N., Wolenski, J.S., Donovan, M.J. Ultrastructural localization of lysosomal enzymes in the egg cortex of *Brachidanio*. J. Exp. Zool., v. 244, p. 17-32, 1987.

Hirose, K. The ultrastructure of the ovarian follicle of Medaka, *Onzyzas latipes*. Z. Zellf., v. 123, p. 316-329, 1972.

Isaac-Nahum, V.J., Vazzoler, A.E.A.M., Zanetti-Prado, E.M. Estudos sobre estrutura, ciclo de vida e comportamento de *Sardinella brasiliensis* (Steindachner, 1879), na área entre 22°S e 28°S, Brasil. 3. Morfologia e histologia de ovários e escala de maturidade. Bol. Inst. Oceanogr., v. 32, p. 1-16, 1983.

Kobayashi, W., Yamamoto, T.S. Fine structure of the micropylar cells and its change during oocyte maturation in the chum salmon, *Oncarhynchus keta*. J. Morph., v. 184, p. 263-276, 1985.

Koya, Y., Takano, K., Takahashi, H. Annual changes in fine structure of inner lining of the ovary of a marine sculpin, *Alcichthys alcicornis* (Teleostei: Scorpeoniformes), with internal gametic association. J. Morphol., v. 223, p. 85-97, 1995.

Laale, H.W. The perivitelline space and egg envelopes of bony fish: a review. Copeia, v. 2, p. 210-226, 1980.

Lahnsteiner, F., Weismann, T., Patzner, R. A. Structure and function of the ovarian cavity and oviduct and composition of the ovarian fluid in the bleak, *Alburnus alburnus* (Teleostei, Cyprinidae). Tissue Cell, v. 29, p. 305-314, 1997.

Lamas, I.R., Godinho, A.L. Reproduction in the piranha *Serrasalmus spilopleura*, a neotropical fish with an unusual pattern of sexual maturity. Environ. Biol. Fishes, v. 45, p. 161-168, 1996.

Leão, E.L.M., Leite, R.G., Chaves, P.T.C., Ferraz, E. Aspectos da reprodução, alimentação e parasitofauna de uma espécie rara de piranha, *Serrasalmus altuvei* Ramírez, 1956 (Pisces, Serrasalminae) do baixo rio Negro. Rev. Bras. Biol., v. 51, p. 545-553, 1991.

Locke, M., Huie, P. The mystery unstained Golgi complex cisternae. J. Histochem. Cytochem., v. 31, n. 8, p. 1019-1032, 1983.

Lopes, R.A., Leme dos Santos, H.S., Costa, J.R.V., Pelizaro, M.G., Castignoli, N. Histochemical study of oocyte zona radiata of the Lambari *Astyanax bimaculatus lacustris* – Linnaeus, 1758 (Osteichthyes: Characidae). Zool. Anz., Jena, v. 208, p. 265-268, 1982.

Lopes, R.A., Watanabe, I., Nuti-Sobrinho, A., Santos, H.S.L., Paula-Lopes, O.V. On the reproduction of brazilian fishes. XIII. Scanning electron microscopic study of the rhythm of the development in oocyte of the lambari (*Astianax bimaculatus*)

Reinhardt 1874 (Piscies, Characidae). Rev. Bras. Ciên. Morfol., v. 4, n. 2, p. 99-105, 1987.

Luft, J.H. Ruthenium red and violet. II. Fine structural localization in animal tissues. Anat. Rec., v. 171, p. 369-376, 1971.

MacRae, E.K., Meetz, G.D. Electron microscopy of the ammoniacal silver reaction for histones in the erythropoietic cells of the chick. J. Cell Biol., v. 45, p. 235-245, 1970.

Makeyeva, A.P., Yemel'Yanova, N.G. Periodization of oogenesis in cyprinids. J. Ichthyol. v. 29, p. 55-67, 1989.

Matsubara, T., Sawano, K. Proteolytic cleavage of the vitellogenin and yolk proteins during vitellogenin uptake and oocyte maturation in Barfin Flounder (*Verasper moseri*). J. Exp. Zool., v. 272, p. 34-35, 1995.

Mazabrand, T., Wegnez, M., Denis, H. Biochemical research on the oogenesis. RNA accumulation in the oocytes of teleost. Develop. Biol., v. 44, p. 326-332, 1975.

McDonald, K. Osmium ferricyanide fixation improves microfilament preservation and membrane visualization in a variety of animal cell types. J. Ultrastruct. Res., v. 86, p. 107-118, 1984.

Nagahama, Y. The functional morphology of teleost gonads. In: Hoar, W.S., Randall, D.J., Donaldson, E.M. eds, Fish Physiology, Academic Press Inc. New York. v. IXA, p. 233-273, 1983.

Nakashima, S., Iwamatsu, T. Ultrastructural changes in micropylar cells and formation of the micropyle during oogenesis in the Medaka *Oryzias latipes*. J. Morphol., v. 202, p. 339-349, 1989.

Nakashima, S., Iwamatsu, T. Ultrastructural changes in micropylar and granulosa cells during in vitro oocyte maturation in the Medaka, *Oryzias latipes*. J. Exp. Zool., v. 270, p. 547-556, 1994.

Ohta, T., Iwamatsu, T., Takama, M., Yoshimoto, Y. Cortical alveolus breakdown in the eggs of the freshwater teleost *Rhodeus ocellatus ocellatus*. Anat. Rec., v. 227, p. 486-496, 1990.

Opresko, L.K., Karpf, R.A. Specific proteolysis regulates fusion between endocytic compartments in *Xenopus* oocytes. Cell. v. 51, p. 557-568, 1987.

Paiva, M.P. Sobre o controle da pirambeca *Serrasalmus rhombeus* (L. 1766) Lacépède, 1803, no Açude Lima Campos (Icó, Ceará) através da pesca seletiva. Rev. Brasil. Biol., v. 18, p. 251-266, 1958.

Pino, R.M., Pino, L.C., Bankston, P.W. The relationships between the Golgi apparatus, GERL, and lysosomes of the fetal rat liver Kupffer cells examined by ultrastructural phosphatase cytochemistry. J. Histochem. Cytochem., v. 29, p. 1061-1064, 1981.

Quagio-Grassiotto, I., Guimarães, A.C.D., Follicular epithelium, theca and egg envelope formation in *Serrasalmus spilopleura* (Teleostei, Characiformes, Characidae). Acta Zoologica (Stockholm) v. 84, 121-129, 2003.

Reincke, M., Walther, C. Aspects of turnover and biogenesis of synaptic vesicles at locust neuromuscular junctions as revealed by zinc iodide-osmium tetroxide (ZIO) reacting with intravesicular SH-groups. J. Cell Biol., v. 78, p. 839-855, 1978.

Rizzo, E., Bazzoli, N. Oogenesis, oocyte surface and micropylar apparatus of *Prochilodus affinis* Reinhardt, 1874 (PISCES, Characiformes). Eur. Arch. Biol., v. 104, p. 1-6, 1993.

Rodrigues, J.D., Mota, A., Moraes, M.N., Ferreira, A.E. Curvas de maturação gonadal e crescimento de fêmeas de pirambeba, *Serrasalmus spilopleura* Kner, 1859 (Pisces, Cypriniformes). Bol. Inst. Pesca, v. 5, n. 2, p. 51-63, 1978.

Selman, K., Wallace, R.A. Cellular aspects of oocyte growth in teleosts. Zool. Scien., v. 6, p. 211-231, 1989.

Selman, K., Wallace, R.A., Barr, V. Oogenesis in *Fundulus heteroclitus*. V. The relationship of yolk vesicle and cortical alveoli. J. Exp. Zool., v. 246, p. 42-56, 1988.

Selman, K., Wallace, R.A., Sarka, A., Xiaoping, Q. Stages of development in the zebrafish *Brachydanio rerio*. J. Morphol., v. 218, p. 203-224, 1993.

Shackley, S.E., King, P.E. Oogenesis in a marine teleost, *Blennius pholis* L. Cell Tissue Res., v. 181, p. 105-128, 1977.

Sire, M.F., Babin, P.J., Vernier, J.M. Involvement of the lysosomal system in yolk protein deposit and degradation during vitellogenesis and embrionic development in trout. J. Exp. Zool., v. 269, p. 69-83, 1994.

Takano, K. Fine structure of the wall of the ovarian lumen in the teleost, *Oryzias latipes*. Bull. Fac. Fish. Hokkaido Univ., v. 19, p. 76-82, 1968.

Teles, M.E.O., Godinho, H.P. Ciclo reprodutivo da pirambeba *Serrasalmus branditii* (Teleostei, Characidae) na Represa de Três Marias, Rio São Francisco. Rev. Bras. Biol., v. 57, p. 177-84, 1997.

Tesoriero, J.V. Formation of the chorion (zona pellucida) in the teleost *Oryzias latipes*. II. Polysaccharide cytochemistry of early oogenesis. J. Histochem. Cytochem., v. 25, p. 1376-1380, 1977.

Tesoriero, J.V. The distribution and fate of ^3H -glucose and ^3H -galactose in oocytes of *Oryzias latipes*. Cell Tissue Res., v. 209, p. 117-129, 1980.

Toshimori, K. Yasuzumi, F. Gap junctions between microvilli of an oocyte and follicle cells in teleost (*Plecoglossus altivelis*). Z. mikrosk-anat. Forsh, Leipzig, v. 93, n. 3, p. 458-464, 1979.

Toury, R., Clérot, J.C., André, J. Les groupements mitochondriaux des cellules germinales des poissons téléostéens Cyprinides. IV. Analyse biochimique des constituants du "ciment" intermitochondrial isolé. Biol. Cell, v. 30, p. 225-232, 1977.

Tyler, C.R., Sumpter, J.P. Oocyte growth and development in teleosts. Rev. in Fish Biol. Fisher., v. 6, p. 287-318, 1996.

Ulrich, E. Étude des ultrastructures au cours de l'ovogenèse d'un poisson téléostéen, le Danio *Brachydanio rerio* (Hamilton-Buchanan). J. Microscopie, v. 8, p. 447-478, 1969.

Vari, R.P., Malabarba, L.R. Neotropical ichthyology: An overview. In: Phylogeny and classification of neotropical fishes. Malabarba, L. R., Reis, R. E., Vari, R. P., Lucena, Z. M. S., Lucena, C. A. eds. EDIPUCRS, Porto Alegre, p. 1-11, 1998.

Vazzoler, A.E.A.M., Menezes, N.A. Síntese do conhecimento sobre o comportamento reprodutivo dos Characiformes da América do Sul (Teleostei, Ostariophysi). Rev. Bras. Biol., v. 52, p. 627-640, 1992.

Wall, D.A., Meleka, I. An unusual lysosome compartment involved in vitellogenin endocytosis by *Xenopus* oocytes. J. Cell. Biol., v. 101, p. 1651-1664, 1985.

Wall, D.A., Patel, S. Multivesicular bodies play a key role in vitellogenin endocytosis by *Xenopus* oocytes. Develop. Biol., v. 119, p. 275-289, 1987.

Wallace, R.A. Vitellogenesis and oocyte growth in nonmammalian vertebrates. In: Develop. Biol., Browder, L. W. New York: Plenum Press. v. 1, p. 127-77, 1985.

Wallace, R.A., Selman, K. Cellular and dynamic aspects of oocyte growth in teleosts. Scien. Zool., v. 21, p. 325-343, 1981.

Wallace, R.A., Selman, K. Ultrastructural aspects of oogenesis and oocyte growth in fish and amphibians. J. Electron Microsc. Tech., v. 16, p. 175-201, 1990.

West, G. Methods of assessing ovarian development in fish: a review. Aust. J. Mar. Freshw. Res., v. 41, p. 199-222, 1990.

Wourms, J.P. Annual fish oogenesis. I. Differentiation of the mature oocyte and formation of the primary envelop. Develop. Biol., v. 50, p. 335-354, 1976.

Yamamoto, M. Electron microscopy of fish development. II. Oocyte follicle cell relationship and formation of chorion in *Oryzias latipes*. J. Fac. Sci. Univ. Tokio, v. 10, p. 123-126, 1963

Yamamoto, M. Electron microscopy of fish development. III. Changes in the ultrastructure of the nucleus and cytoplasm of the oocyte during its development in *Oryzias latipes*. J. Fac. Sci. Univ. Tokio, v. 10, p. 335-346, 1964.

6 ARTIGOS

6.1 “Development and activity of the endomembranous system during the oocyte primary growth of *Serrasalmus spilopleura* (Teleostei, Characiformes, Characidae).” Submetido para publicação: Tissue & Cell.

6.2 “Desenvolvimento e atividade do sistema de endomembranas durante o crescimento secundário dos oócitos de *Serrasalmus spilopleura* (Teleostei, Characiformes, Characidae).”

6.3 “Citoquímica, estrutural e ultra-estrutural, do desenvolvimento oocitário de *Serrasalmus spilopleura* (Teleostei, Characiformes, Characidae).”

6.1

Development and activity of the endomembranous system during the oocyte primary growth of *Serrasalmus spilopleura* (Teleostei, Characiformes, Characidae).

A. C. D. Guimarães^{a,b} and I. Quagio-Grassiotto^a

^aDepto. de Morfologia, IB, Unesp, Botucatu, SP, Brasil – CP 510, CEP 18618-000

^bDepto. de Biologia Celular, IB, Unicamp.

Running title: Activity of the oocyte organelles and of the endomembranous system

Key-words: ultrastructural cytochemistry, acid phosphatase, oocyte, *Serrasalmus spilopleura*

Acknowledgements: We would like to thank the Centro de Microscopia Eletrônica, IB, Unesp, Botucatu, for use their facilities. This research was supported by Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP nº00/00430-5), SP, Brasil.

Correspondence to: Dra. Irani Quagio-Grassiotto, Departamento de Morfologia, IB, Unesp, Botucatu, SP, Brasil – CP 510, CEP 18618-000. Fax: 550xx1438116264

e-mail: grassiotto@laser.com.br

Original Article

ABSTRACT

The morphophysiological changes that occur during oocyte primary growth in *Serrasalmus spilopleura* were studied under ultrastructural cytochemical techniques. In the previtellogenic oocytes endoplasmic reticulum components, Golgi complex cisternae and vesicles, lysosomes, multivesicular bodies and some electron-dense vesicles react positively to AcPase detection. These endoplasmic reticulum components, Golgi complex cisternae and vesicles also react positively to osmium tetroxide and potassium iodide impregnation (KI). These structures, except for the Golgi complex cisternae, are already strongly contrasted in response to osmium tetroxide and zinc iodide impregnation (ZIO). Some electron-dense vesicles are stained with ZIO, while microvesicles of multivesicular bodies and other large vesicles, which are isolated in the cytoplasm, are contrasted by KI. The synthesis pathway of proteins destined to secretion or to intracellular membranous compartments, such as acid phosphatase, involves passage through the endoplasmic reticulum, Golgi complex, vesicles which are inactive hydrolytic enzymes and finally the lysosomes. One of the central activities of the primary growth is to prepare the oocytes for the vitellogenesis events. This activity occurs through the proliferation of membranous organelles and in answer to different components of the oocyte endomembranous system to AcPase. Also, these compartments have reduction capacity due to KI reaction and are involved in the metabolism of proteins rich in SH groups as shown by the answer to ZIO.

INTRODUCTION

Teleostei female gametogenesis comprises the oocyte formation from oogonia or oogenesis, primary and secondary oocyte growths, maturation, and culminates with ovulation (Grier, 2000).

During oogenesis, the individual oogonia, which are present in the germinal epithelium of the ovigerous lamellae, divide many times by mitosis forming a cell cluster or nest. They enter into meiosis originating oocytes, which remain in arrested diplotene of the first meiotic prophase (Grier, 2000). The epithelial cells associate with oocytes, sink below the germinal epithelium surface and epithelial cells become prefollicle cells. During folliculogenesis, the basement membrane is synthesized surrounding the follicle in formation. The follicle is totally separated from the germinal epithelium by the basement membrane (Grier, 2000). It is in diplotene that the primary oocytes leave the nests accompanied by the follicle cells that encompass them (de Vlaming, 1983; Wallace & Selman, 1981; Selman & Wallace, 1989; Bazzoli & Rizzo, 1990; West, 1990; Grier, 2000). As the follicle develops, connective cells encompass it, originating the follicular complex. This is made up by the follicle (oocyte surrounded by follicular epithelium), its surrounding basal lamina, and two cell layers (the theca interna and the theca externa) (Grier, 2000).

Once the follicular complex has been constituted, the oocytes enter primary growth and increase greatly in volume (Wallace & Selman, 1981; Nagahama, 1983; Selman & Wallace, 1989; West, 1990; Bazzoli & Rizzo, 1990; Rizzo & Bazzoli, 1993). During this period, RNA synthesis is intense (Guraya, 1986; Tyler & Sumpter, 1996). RNA associates with proteins (Alberts *et al.*, 2002), is transferred

to the cytoplasm where it accumulates (Guraya, 1986; Mazabrand *et al.*, 1975; Wallace & Selman, 1990) forming nuages (Edy, 1975; Clérot, 1976; Toury *et al.*, 1977).

In previtellogenic oocytes, the Balbiani body, which is a group of membranous organelles, appears next to the nucleus. At final primary growth, these organelles scatter in the peripheral cytoplasm (Hubbard, 1894 *apud* Selman & Wallace, 1989). The Balbiani body seems to be related to membranous organelle biogenesis (Tyler & Sumpter, 1996).

Several of these oocyte metabolic processes occur in the endomembranous system and can be studied by the application of ultrastructural cytochemical techniques. Techniques such as osmium tetroxide and potassium ferricyanide membrane impregnation (McDonald, 1984), osmium tetroxide and potassium iodide impregnation (Locke & Huie, 1983) and osmium tetroxide and zinc iodide impregnation (Reincke & Walther, 1978), when applied to these cells could, respectively, give important data about membranous organelle biogenesis, the presence of reducing environments and the presence of proteins rich in SH groups.

Acid phosphatases (AcPase) are enzymes produced by endomembranous system and are involved in synthesis and degradation processes that occur in different cell types (Kessel & Decker, 1972; Hart & Pontier, 1979; Steinert & Hanocq, 1979; Deltour *et al.*, 1981; Weakley *et al.*, 1981; Busson-Mabillot, 1984; Rune, 1984; Raikhel & Lea, 1986; Sangha & Guraya, 1989; Sire *et al.*, 1994; Azeredo-Oliveira & Mello, 1997, 1998; Santos, 2001; Fialho *et al.*, 2002; Weaver *et al.*, 2002). These enzymes are able to catalyze the hydrolysis of organic ester phosphates in a wide range of substrates at low pH (Fialho *et al.*, 2002). Their

activity during oocyte development seems to be common to different animal species (Hart & Pontier, 1979; Steinert & Hanocq, 1979; Weakley *et al.*, 1981; Busson-Mabillot, 1984; Rune, 1984; Raikhel & Lea, 1986; Sangha & Guraya, 1989; Sire *et al.*, 1994; Santos, 2001; Fialho *et al.*, 2002; Weaver *et al.*, 2002). AcPase activity might be a general requirement for different yolk protein processing systems (Fialho *et al.*, 2002), and could be related to the transformation of reserve material into a storable form in lower vertebrate oocytes (Korfsmeier, 1979).

In the Characiformes from Characidae family, the Serrasalminae subfamily consists of true piranhas, most aggressive species, and pirambebas, which are less aggressive, such as *Serrasalmus spilopleura* (Braga, 1976). The Serrasalminae are non-migratory fish, with a long reproductive period, which coincides with the rainy season (Rodrigues *et al.*, 1978; Leão *et al.*, 1991; Vazzoler & Menezes, 1992). The *Serrasalmus* spp are well adapted to lentic environments and commonly found in Brazilian reservoirs where they have continuous non-seasonal reproduction, and asynchronous ovarian development with multiple spawning (Paiva, 1958; Braga, 1976; Lamas & Godinho, 1996; Teles & Godinho, 1997; Fujihara, 1997). These peculiarities of their reproductive biology make them a potential biological model for studies on gonadal morphophysiology.

The sites and membranous organelles involved with metabolic activities typical of the teleost oocyte primary growth are still poorly studied (Hart & Pontier, 1979; Busson-Mabillot, 1984; Sire *et al.*, 1994). Therefore seeking a better comprehension of active biosynthetic pathways during primary growth, *S. spilopleura* oocytes at this developmental stage were studied with the application of ultrastructural cytochemical techniques specific to the endomembranous system.

MATERIALS AND METHODS

Adult female specimens of *S. spilopleura* were collected monthly from the Jurumirim reservoir, Alto Paranapanema River (23°31'10"S-48°42'35"W), São Paulo State, Brazil, from March 2000 to December 2003. The specimens were anesthetized by immersion in aqueous 1µg/ml benzocain solution, and their ovaries were removed, cut into small segments, and submitted to different ultrastructural cytochemical techniques.

Osmium Tetroxide/Potassium Ferricyanide Impregnation (KFe) (McDonald, 1984)

The ovary segments were fixed overnight in 2.5% glutaraldehyde, 5 mM CaCl₂ in 0.1M sodium cacodylate buffer, pH 7.2. After fixation, the specimens were rinsed in the same buffer, post-fixed in 1% osmium tetroxide, 0.8% potassium ferricyanide and 5 mM CaCl₂ in the same buffer for 2h in the dark, rinsed again several times in 0.1M sodium cacodylate buffer. Block-staining was carried out using 2% uranyl for 2h, followed by dehydration in acetone, embedding in Araldite, sectioned and post-stained in saturated uranyl acetate in 50% alcohol and lead citrate 0.2% in 1N NaOH.

Acid Phosphatase detection (AcPase) (Pino *et al.*, 1981)

The ovary segments were briefly fixed for 1h, at 4°C, in 1% glutaraldehyde in 0.1M sodium cacodylate buffer, pH 7.2. After fixation, the specimens were rinsed in the same buffer, incubated for 1h, at 37°C in 25mg of cytidine-5'-monophosphate, 12ml distilled water, 10ml of 0.05M acetate buffer, pH 5.0, 3ml of 1% lead nitrate (Pino *et al.*, 1981). After the incubation the specimens were fixed

again in 2.5% glutaraldehyde, in 0.1M sodium cacodylate buffer, pH 7.2, post-fixed in 1% osmium tetroxide, in the same buffer for 2h in the dark, rinsed again several times in 0.1M sodium cacodylate buffer, block-stained using 2% uranyl for 2h, dehydrated in acetone, embedded in Araldite, sectioned and observed unstained. The control was incubated in medium without the substrate.

Osmium Tetroxide/Zinc Iodide Impregnation (ZIO) (Reincke & Walther, 1978)

The ovary segments were fixed overnight in 2.5% glutaraldehyde, in 0.1M phosphate buffer, pH 7.2. After fixation, the specimens were rinsed in the same buffer, and then in TRIS-aminometane buffer, pH 4.5. They were incubated for 22h, at room temperature in 3g of zinc powder, 1g of iodine resublimated in 20ml of distilled water mixed with TRIS-aminometane buffer, pH 4.5 in the ratio 1:1 and then mixed in the ratio 4:1 with 2% aqueous osmium tetroxide (Reincke & Walther, 1978). They were rinsed again in TRIS-aminometane buffer, pH 4.5, block-stained in using 2% aqueous uranyl for 2h, followed by dehydration in acetone and embedding in Araldite. Sections were post-stained in saturated uranyl acetate solution in 50% alcohol and in lead citrate 0.2% in 1N NaOH.

Osmium Tetroxide/Potassium Iodide Impregnation (KI) (Locke & Huie, 1983)

The ovary segments were fixed overnight in 2.5% glutaraldehyde, in 0.1M sodium cacodylate buffer, pH 7.2. After fixation, the specimens were rinsed in the same buffer, and then in a solution of 1% potassium iodide in distilled water. They were left for 48h at room temperature in the dark in a solution of 1% osmium tetroxide and 1% potassium iodide (Locke & Huie, 1983), and rinsed again in 1%

potassium iodide in distilled water. Block-stained using 2% aqueous uranyl solution for 2h was followed by dehydration in acetone, and embedding in Araldite. The sections were observed unstained.

All ovary sections were examined and photographed using a C.M. 100 Philips transmission electron microscope.

RESULTS

In the *S. spilopleura* follicles, different cell structures of oocytes at primary growth and of follicular epithelium are positive to acid phosphatase (AcPase) detection, osmium tetroxide and potassium zinc impregnation (ZIO), and osmium tetroxide and potassium iodide impregnation (KI). The membranous organelles present in these oocytes are strongly stained by osmium tetroxide and potassium ferricyanide (KFe) impregnation.

In the layers that encompass the oocytes during primary growth, the increase of membrane impregnation due to KFe shows that: squamous follicular cells are rich in endoplasmic reticulum, mitochondria, Golgi complex and many vesicles; the basement membrane becomes thicker as the follicle complex develops; a layer of thecal cells, highly vascularized, organize themselves encompassing many collagen fibers; microvilli project from the oolema and from apical follicular cell surfaces and between the microvilli an amorphous substance is deposited (Figs. 1, 2).

In epithelial follicular cells, vesicles of highly electron-dense content react to AcPase (Figs. 23 and 24). When submitted to ZIO, at the beginning of primary

growth, these cells show many spherical electron-dense marks (reaction products) scattered throughout the cytoplasm (Fig. 7). As they develop, the ZIO reaction products are intensified and almost all endomembranous system and vesicles became highly electron-dense (Fig. 8), while the reaction to KI is limited to multilamellar bodies (Fig. 15). In the external layer of the egg envelope the reaction to KI occurs between microvilli (Fig. 16).

Under KFe action, in the cytoplasm of previtellogenic oocytes, the membrane electron-density of different organelles is intensified (Figs. 1 to 6), especially of mitochondria (Figs. 3 and 4). Besides this, many cisternae of endoplasmic reticulum scattered through the cytoplasm, which react to KFe (Fig. 5), are also positive to AcPase (Figs. 23 and 29). While in the peripheral cytoplasmic region of oocytes submitted to ZIO and to KI, cistern groups of endoplasmic reticulum are totally impregnated (Figs. 9, 10, 19 and 20).

The multivesicular bodies present in the same cytoplasmic region, when submitted to KFe have their limiting membrane intensely impregnated. In some of them all inner vesicles are dense while in others the electron-density is variable (Fig. 3). The reaction to AcPase is limited to inner vesicle membranes (Figs. 30), and to KI the same organelles might present all or just some marked inner vesicles (Fig. 17).

In the peripheral cytoplasmic region of previtellogenic oocytes, submitted to ZIO, the non-electron-dense vesicles exhibit spherical electron-dense marks associated to their membrane luminal faces (Fig. 7).

Abundant in the cytoplasm of previtellogenic oocytes submitted to KFe, the dyctiosomes present three or more cisternae and many associated vesicles with

their membranes highly impregnated (Figs. 4 and 5). Some of these dyciosomes and vesicles are totally marked by AcPase (Fig. 25). When submitted to ZIO the negative answer of Golgi complex cisternae contrasts with the positive answer of associated vesicles (Figs. 11 and 12), while other vesicular structures close to the Golgi cisternae also show peripheral marking (Fig. 11). Besides this, when submitted to KI, some of the dyciosomes have strongly marked external trans cisterna, as also occurs in the most part of associated vesicles (Figs. 21 and 22).

Submitted to AcPase and ZIO, many multilamellar bodies scattered through the oocyte cytoplasm are marked (Figs. 10, 24, 28 and 29). In the cytoplasmic region next to the nucleus, electron-dense vesicles vary in their reaction to ZIO, from a weak, heterogeneous marking up to a strong, homogeneous one (Figs. 13 and 14). The same organelles, in the oocytes submitted to AcPase, might be negative (Fig. 27 and 31) or positive. When positive the marks are heterogeneous (Figs. 27, 29 and 31). To KI electron-dense vesicles are negative while around them little vesicles show a dense content (Fig. 18).

In the nucleus of previtellogenic oocytes, with their typical multiple nucleoli, the nucleoplasm shows positive spots next to the nuclear envelope when submitted to AcPase (Figs. 23 and 26).

DISCUSSION

The ultrastructural cytochemical techniques used to study biosynthetic pathways that occur in the endomembranous system of *S. spilopleura* oocytes at primary growth as the postfixation with osmium tetroxide associated with potassium ferricyanide (McDonald, 1984), potassium iodide (Locke & Huie, 1983) or with

potassium zinc (Reincke & Walther, 1978), are based on osmium reduction and increase the contrast of the endomembranous system.

Osmium tetroxide in the presence of potassium ferricyanide is reduced (McDonald, 1984), becoming less aggressive to proteins, and interacting better with some cell sites, especially with membranes (White *et al.*, 1979). In the osmium tetroxide and potassium iodide impregnation (Locke & Huie, 1983), the osmium tetroxide is slowly reduced to osmium black, by combining osmium with labile S-S bridges present in newly formed proteins in the endomembranous system, before they reach tertiary structure (Locke & Huie, 1983). In the osmium tetroxide and potassium zinc impregnation (Reincke & Walther, 1978) a modification of the osmium tetroxide and potassium iodide technique (Maillet, 1962 *apud* Reincke & Walther, 1978), the substrates that react with ZIO show SH groups, and are proteins rich in free sulfhydryl groups (Pellegrino de Iraldi, 1976, 1977 *apud* Reincke & Walther, 1978; Reincke & Walther, 1978).

Acid phosphatases are responsible for hydrolyses of organic ester phosphates in a wide range of substrates and are active at low pH typical of lysosomal compartments (Fialho *et al.*, 2002; Alberts *et al.*, 2002). Its detection is based on a heavy metal deposition due to enzymatic activity sites at low pH. It occurs by the hydrolysis of the substrate by the enzyme forming a primary product, and the combination of this primary product with the heavy metal forms an insoluble product (Meirelles, 1998).

In the *S. spilopleura* oocytes at primary growth, endoplasmic reticulum components, Golgi complex cisternae and vesicles, lysosomes, multivesicular bodies and some electron-dense vesicles react positively to AcPase detection.

These same endoplasmic reticulum components, Golgi complex cisternae and vesicles are also positive to KI. The same structures, except for the Golgi complex cisternae, are strongly contrasted in response to ZIO. Some electron-dense vesicles react to ZIO, while microvesicles inside multivesicular bodies and other large vesicles, which are alone in the cytoplasm, are contrasted by KI.

The synthesis pathway of proteins for secretion or for intracellular membranous compartments, among them acid phosphatase, involves the passage through the endoplasmic reticulum, Golgi complex, vesicles with inactive hydrolytic enzymes and finally lysosomes (Hasilik, 1992; Lodish *et al.*, 2000; Karp, 2002; Cooper & Hausman, 2003). They are involved in synthesis and degradation processes that occur in different cell types (Kessel & Decker, 1972; Hart & Pontier, 1979; Steinert & Hanocq, 1979; Deltour *et al.*, 1981; Weakley *et al.*, 1981; Busson-Mabillot, 1984; Rune, 1984; Raikhel & Lea, 1986; Sangha & Guraya, 1989; Sire *et al.*, 1994; Azeredo-Oliveira & Mello, 1997; Santos, 2001; Fialho *et al.*, 2002; Weaver *et al.*, 2002). Their activity during oocyte development seems to be common to different animal species (Hart & Pontier, 1979; Steinert & Hanocq, 1979; Weakley *et al.*, 1981; Busson-Mabillot, 1984; Rune, 1984; Raikhel & Lea, 1986; Sangha & Guraya, 1989; Sire *et al.*, 1994; Santos, 2001; Fialho *et al.*, 2002; Weaver *et al.*, 2002). AcPase activity might be a general requirement for different yolk protein processing systems (Fialho *et al.*, 2002), and could be related to the transformation of reserve material into a storable form in lower vertebrate oocytes (Korfsmeier, 1979).

Pioneer studies in amphibians show that about 99% of yolk proteins are originated from vitellogenin processing, which is produced by the liver and is

captured by the oocytes at secondary growth, through receptor mediated pinocytosis (Wallace *et al.*, 1972). The first descriptions of cell processes that happen during teleost vitellogenesis indicated a possible formation of initial yolk components inside endoplasmic reticulum of oocytes (Beams & Kessel, 1973). Later, sites of AcPase activity, located around the nucleus of oocytes in early vitellogenesis, of the same animal group, were considered previtellogenic bodies (Hart & Pontier, 1979), suggesting that other cell processes could be involved in the yolk formation (Wallace, 1985). On the other hand, it is known that vitellogenin undergoes an intense processing inside the oocytes at secondary growth (Wallace, 1985). The observation of *S. spilopleura* oocytes submitted to different ultrastructural cytochemical techniques (present paper), shows that the initial or endogenous yolk or previtellogenic bodies might actually be vesicles with hydrolytic enzymes that are synthesized during primary growth, packed and stocked to be used during secondary growth, when vitellogenin is processed.

Multivesicular bodies with lysosomal enzymatic activity, be it AcPase or other enzymes, in oocytes at primary growth, occur in different teleost species (Busson-Mabillot, 1984; Sire *et al.*, 1994), in amphibians (Wall & Meleka, 1985; Wall & Patel, 1987; Wallace & Selman, 1990) and in rodents (Weakley *et al.*, 1981). The multivesicular body formation has been associated to receptor mediated pinocytosis, and consequently to the uptake and metabolism of vitellogenin, which occur during vitellogenesis or secondary growth (Wallace & Selman, 1990). The receptor mediated pinocytosis with the consequent formation of multivesicular bodies is a typical cellular event, and might be intense in the previtellogenic oocytes in general, as observed in teleost (Busson-Mabillot, 1984;

Sire *et al.*, 1994; present paper), in amphibians (Wall & Meleka, 1985; Wallace & Selman, 1990) or in rodents (Weakley *et al.*, 1981).

In the *S. spilopleura* oocytes, multivesicular bodies marked or not by AcPase and by KI, occur during primary growth. They are associated with electron-dense vesicles, which are ZIO positive, and the result of these associations become positive to AcPase detection. The electron-dense vesicles are originated in the endomembranous system (Guimarães & Quagio-Grassiotto, 2001). These vesicles have hydrolytic enzymes, such as acid phosphatase, that participate in the intracellular digestion processes, and variable quantities of proteins rich in SH groups and/or cysteine, according to the ZIO reaction.

Numerous multilamellar bodies marked by AcPase, KI and ZIO, that are present in the cytoplasm of *S. spilopleura* previtellogenic oocytes, as well as that marked by KI in the cytoplasm of follicular cells, is result from the recycling of intracellular components in autophagosomes. This is particularly the case of mitochondria, abundant in these cells. In amphibian oocytes, autophagic vacuoles occasionally show AcPase activity (Kessel & Decker, 1972). The autophagic process is a determining factor for cell homeostasis, because it allows sub cellular components to be degraded and reused. The recycling of cell constituents described for different cell types is autophagocytosis dependent (Glaumann *et al.*, 1981). The records of AcPase detection in autophagosomes have shown their involvement in the metamorphosis of many tissues in different animal species (Weber, 1964 *apud* Glaumann *et al.*, 1981) and their involvement in the production of the surfactant substance in the lung epithelial cells (Weaver *et al.*, 2002).

In *S. spilopleura* previtellogenic oocyte follicular epithelium, large vesicles, possibly lysosomes, react intensely to AcPase. Similar structures, also considered lysosomes, are observed in the follicular cells at the equivalent oocyte development stages in rodents (Weakley *et al.*, 1981) and in insects (Santos, 2001). The presence of large lysosomes in the follicular cells might be related to the events of capture and processing of material coming from the blood to the developing oocytes, named transcytosis.

In the periphery of *S. spilopleura* previtellogenic oocytes, spherical electron-dense structures, positive to ZIO, are associated to the inner face of the non-electron-dense endocytic vesicle membranes. This suggests the presence of proteins rich in SH groups that might be taken up at the same time as the vesicle formation, which occurs during oocyte primary growth (Guimarães & Quagio-Grassiotto, 2001). The no electron-dense endocytic vesicles, thus, will fuse with cortical alveolus precursors (Guimarães & Quagio-Grassiotto, 2002). In the follicular cells, ZIO marks, initially spherical dots, scatter through all endomembranous system, showing an intense production of proteins rich in SH groups. The coordinated dynamic coincidence (follicular cell/oocyte) suggests that the oocyte is up taking material from the follicular cell, and that this material could have been incorporated into the cortical alveolus precursors. This evidence contradicts the general precept that the cortical alveolus is only formed by the oocytes (Anderson, 1968; Tesoriero, 1980; Wallace & Selman, 1981; Nagahama, 1983; de Vlaming, 1983; Selman & Wallace, 1989; Tyler and Sumpter, 1996).

Very controversial, the presence of AcPase activity in the nucleus has been observed in various cell types of different animal groups. It has been considered a

artifact, and alternatively could result from lysosomal phosphatase diffusion to the nucleus (Azeredo-Oliveira & Mello, 1997). Also, AcPase activity, as found with biochemical and ultrastructural studies, has been related to the nuclear transcription tax in cells with high metabolic activity (Deltour *et al.*, 1981). Again, due to the intensity of metabolic processes that occur in the oocytes, the nuclear marking observed in *S. spilopleura* might be thus justified.

One of the central activities of the primary growth is the preparation for the processing and packaging of yolk. This activity is evident in the intense proliferation of membranous organelles (Guimarães & Quagio-Grassiotto, 2001) in which different components of oocyte endomembranous system respond to AcPase, in amphibians or in teleost fish (Kessel & Decker, 1972; present paper). Still, independent from the studied cell types these compartments have reduction capacity (Locke & Huie, 1983; Fernandes *et al.*, 1998; present paper) and are involved in the proteins rich in SH groups' metabolism (Reincke & Walther, 1978; Santos, 2001; present paper).

REFERENCES

Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K. and Walter, P. 2002. Molecular Biology of the Cell. 4^a ed. Garland Publishing, Inc, New York & London, p1463.

Anderson, E. 1968. Cortical alveoli formation and vitellogenesis during oocyte differentiation in pipefish, *Syngnathus fuscus*, and killifish, *Fundulus heteroclitus*. J. Morphol., 125, p 23-60.

Azeredo-Oliveira, M.T.V. and Mello, M.L.S. 1997. Acid phosphatase activity in Malpighian tubules of *Triatoma infestans* Klug. Cytobios, 92, 23-28.

Azeredo-Oliveira, M.T.V. and Mello, M.L.S. 1998. Ultrastructural aspects of acid phosphatase activity in Malpighian tubules of *Triatoma infestans* Klug. Cytobios, 93, 33-42.

Bazzoli, N. and Rizzo, E. 1990. A comparative cytological and cytochemical study of oogenesis in ten Brazilian teleost fish species. Eur. Arch. Biol., 101, 399-410.

Beams, H.W. and Kessel, R. G. 1973. Oocyte structure and early vitellogenesis in the trout, *Salmo gairdneri*. Am. J. Anat., 136, 105-122.

Braga, R.A. 1976. Ecologia e etologia de piranhas no nordeste do Brasil (Pisces – *Serrasalmus lacépède*, 1803). Tese (Doutorado em Ciências) – Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, São Paulo, p.268.

Busson-Mabillot, S. 1984. Endosomes transfer yolk proteins to lysosomes in the vitellogenic oocyte of the Trout. Biol. Cell, 51, 53-66.

Clérot, J.C. 1976. Les groupements mitochondriaux des cellules germinales des poissons téléostéens cyprinidés. I. Étude ultrastructurale. *J. Ultrastruct. Res.*, 54, 461-475.

Cooper, G.M. and Hausman, R.E. 2003. *The Cell: A Molecular Approach*. 3^a ed. Sinauer Associates Inc., Oxford, p713.

de Vlaming, V. 1983. Oocyte development patterns and hormonal involvements among teleosts. In: Rankin, J. C., Pitcher, T. J. and Duggan, R. T. *Control Processes in Fish Physiology*. Croom Helm Ltd., London & Canbrra, 176-199.

Deltour, R., Fransolet, S. and Loppes, R. 1981. Inorganic phosphate accumulation and phosphatase activity in the nucleus of maize embryo root cells. *J. Cell Sci.*, 47, 77-89.

Edy, E.M. 1975. Germ plasm and the differentiation of the germ cell line. *Int. Ver. Cytol.*, 43, 229-280.

Fernandes, A.P., Curi, G. and Bão, S.N. 1998. Contribution of the Golgi complex-endoplasmic reticulum system during spermiogenesis in three species of phytophagous bugs (Hemiptera: Pentatomidae). *Int. J. Insect Morphol. Embryol.*, 27, 235-240.

Fialho, E., Silveira, A.B., Masuda, H. and Silva-Neto, M.A.C. 2002. Oocyte fertilization triggers acid phosphatase activity during *Rhodnius prolixus* embryogenesis. Insect Biochem. Mol. Biol., 32, 871-880.

Fujihara, C.Y. 1997. Dinâmica populacional de *Serrasalmus spilopleura*, Kner, 1860 no reservatório de Jurumirim (rio Paranapanema, SP): aspectos do crescimento, estrutura populacional, reprodução e nutrição. Dissertação (mestrado), IB, UNESP, Botucatu, SP, p91.

Glaumann, H., Ericsson, J.L.E and Marzella, L. 1981. Mechanisms of intralysosomal degradation with special reference to autophagocytosis and heterophagocytosis of cell organelles. Iter. Rev. Cytol., 73, 149-182.

Grier, H. 2000. Ovarian germinal epithelium and folliculogenesis in the Common Snook, *Centropomus undecimalis* (Teleostei: Centropomidae). J. Morphol., 243, 265-281.

Guimarães, A.C.D. and Quagio-Grassiotto, I. 2001. Ultrastructural aspects of oogenesis and oocyte primary growth in *Serrasalmus spilopleura* (Teleostei, Characiformes, Characidae). Tissue & Cell, 33, 241 – 248.

Guimarães, A.C.D. and Quagio-Grassiotto, I. 2002. The ultrastructural aspects of vitellogenesis or oocyte secondary growth in *Serrasalmus spilopleura* (Teleostei, Characiformes, Serrasalminae) J. Submicrosc. Cytol. Pathol., 34, 2, 199 – 206.

Guraya, S.S. 1986. The cell and molecular biology of fish oogenesis. Monographs in Development Biology., Karger, New York, 18, p223.

Hasilik, A. 1992. The early processing of lysosomal enzymes: proteolysis and compartmentation. *Experimentia*, 8, 130-151.

Hart, N. and Pontier, P. 1979. Acid fosfatase in eggs of the zebrafish, *Brachidanio rerio*. *Experientia*, 35, 999-1001.

Karp, G. 2002. Cell and Molecular Biology: Concepts and Experiments. 3^a ed. John Wilwy & Sons, Inc, New York, p785.

Kessel, R.G. and Decker, R.S. 1972. Cytodifferentiation in the *Rana pipiens* oocyte. V. Ultrastructural localization of acid phosphatase activity in diplotene oocytes and their associated follicle envelope. *J. Microscopie*, 14, 169-182.

Korfsmeier, K.H. 1979. Acid phosphatase in the guinea-pig oocytes. *Histochemistry*, 63, 123-127.

Lamas, I.R. and Godinho, A.L. 1996. Reproduction in the piranha *Serrasalmus spilopleura*, a neotropical fish with an usual pattern of sexual maturity. *Environ. Biol. Fishes*, 45, 161-168.

Leão, E.L.M., Leite, R.G., Chaves, P.T.C. and Ferraz, E. 1991. Aspectos da reprodução, alimentação e parasitofauna de uma espécie rara de piranha, *Serrasalmus altuvei* Ramírez, 1956 (Pisces, Serrasalminidae) do baixo rio Negro. Rev. Bras. Biol., 51, 545-553.

Locke, M. and Huie, P. 1983. The mystery unstained Golgi complex cisternae. J. Histochem. Cytochem., 31, 1019-1032.

Lodish, H., Berk, A., Zipursky, S.L., Matsudaria, P., Baltimore, D. and Darnell, J.E. 2000. Molecular Cell Biology. 4^a ed. Scientific American Books, Inc, New York, p1084.

Mazabrand, T., Wegnez, M. and Denis, H. 1975. Biochemical research on the oogenesis. RNA accumulation in the oocytes of teleost. Develop. Biol., 44, 326-332.

McDonald, K. 1984. Osmium ferricyanide fixation improves microfilament preservation and membrane visualization in a variety of animal cell types. J. Ultrastruct. Res., 86, 107-118.

Meirelles, M.N.L. 1998. Localização de fosfatases. In: Souza, W. ed. Técnicas básicas de microscopia eletrônica aplicadas às ciências biológicas. Sociedade Brasileira de Microscopia, Rio de Janeiro, 84-93.

Nagahama, Y. 1983. The functional morphology of teleost gonads. In: Hoar, W.S., Randall, D.J., Donaldson, E.M. eds, Fish Physiology,. Academic Press Inc. New York., IXA, 233-273.

Paiva, M.P. 1958. Sobre o controle da pirambeba *Serrasalmus rhombeus* (L. 1766) Lacépède, 1803, no Açude Lima Campos (Icó, Ceará) através da pesca seletiva. Rev. Brasil. Biol., 18, 251-266.

Pino, R.M., Pino, L.C. and Bankston, P.W. 1981. The relationships between the Golgi apparatus, GERL, and lysosomes of the fetal rat liver Kupffer cells examined by ultrastructural phosphatase cytochemistry. J. Histochem. Cytochem., 29, 1061-1064.

Raikhel, A.S. and Lea, A.O. 1986. Internalized proteins directed into accumulative compartments of mosquito oocytes by the specific ligand, vitellogenin. Tissue & Cell, 18, 559-574.

Reincke, M. and Walther, C. 1978. Aspects of turnover and biogenesis of synaptic vesicles at locust neuromuscular junctions as revealed by zinc iodide-osmium tetroxide (ZIO) reacting with intravesicular SH-groups. J. Cell Biol., 78, 839-855.

Rizzo, E. and Bazzoli, N. 1993. Oogenesis, oocyte surface and micropylar apparatus of *Prochilodus affinis* Reinhardt, 1874 (PISCES, Characiformes). Eur. Arch. Biol., 104, 1-6.

Rodrigues, J.D., Mota, A., Moraes, M.N. and Ferreira, A.E. 1978. Curvas de maturação gonadal e crescimento de fêmeas de pirambema, *Serrasalmus spilopleura* Kner, 1859 (Pisces, Cypriniformes). B. Inst. Pesca, 5, 51-63.

Rune, G. 1984. Histochemical investigation of the folliculogenesis in the ovary of the Mongolian gerbil (*Meriones unguiculatus*)., Histochemistry, 80, 299-306.

Sangha, G.K. and Guraya, S.S. 1989. Histochemical changes in acid and alkaline phosphatase activities in the growing follicles and corpora lutea of the rat ovary. Acta Morphol. Neerl.-Scand., 26, 43-49.

Santos, D.C. 2001. Vitelogênese e coriogênese em *Diatrea saccharalis* (Lepdoptera: Pyralidae): estudo morfológico e citoquímico. Tese (doutorado), IB, UNESP, Botucatu, SP, p151.

Selman, K. and Wallace, R.A. 1989. Cellular aspects of oocyte growth in teleosts. Zool. Scien, 6, 211-231.

Sire, M.F., Babin, P.J. and Vernier, J.M. 1994. Involvement of the lisosomal system in yolk protein deposit and degradation during vitellogenesis and embrionic development in trout. J. Exp. Zool., 269, 69-83.

Steinert, G. and Hanocq, J. 1979. Ultrastructural localization of acid phosphatase activity in matured *Xenopus laevis* oocyte. Biol. Cellulaire, 34, 247-254.

Teles, M.E.O. and Godinho, H.P. 1997. Ciclo reprodutivo da pirambeba *Serrasalmus branditii* (Teleostei, Characidae) na Represa de Três Marias, Rio São Francisco. Rev. Bras. Biol., 57, 177-84.

Tesoriero, J.V. 1980. The distribution and fate of ^3H -glucose and ^3H -galactose in oocytes of *Oryzias latipes*. Cell Tissue Res., 209, 117-129.

Toury, R., Clérot, J.C. and André, J. 1977. Les groupements mitochondriaux des cellules germinales des poissons téléostéens Cyprinides. IV. Analyse biochimique des constituants du "ciment" intermitochondrial isolé. Biol. Cell, 30, 225-232.

Tyler, C.R. and Sumpter, J.P. 1996. Oocyte growth and development in teleosts. Reviews in Fish Biol. And Fisheries, 6, 287-318.

Vazzoler, A.E.A.M. and Menezes, N.A. 1992. Síntese do conhecimento sobre o comportamento reprodutivo dos Characiformes da América do Sul (Teleostei, Ostariophysi). Rev. Bras. Biol., 52, 627-640.

Wall, D.A. and Meleka, I. 1985. An usual lysosome compartment involved in vitellogenin endocytosis by *Xenopus* oocytes. J. Cell. Biol., 101, 1651-1664.

Wall, D.A. and Patel, S. 1987. Multivesicular bodies play a key role in vitellogenin endocytosis by *Xenopus* oocytes. Develop. Biol., 119, 275-289.

Wallace, R.A. 1985. Vitellogenesis and Oocyte Growth in Nonmammalian Vertebrates. In: Developmental Biology. Browder, L. W. New York: Plenum Press. 1, 127-177.

Wallace, R.A., Nickol, J.M., Ho, T. and Jared, D.W. 1972. Studies on amphibian yolk. X. The relative roles of autotrophic and heterotrophic processes during yolk protein assembly by isolated oocytes. *Dev. Biol.*, 29, 255-272.

Wallace, R.A. and Sellman, K. 1981. Cellular and dynamic aspects of oocyte growth in teleosts. *Scien. Zool.*, 21, 325-343.

Wallace, R.A. and Selman, K. 1990. Ultrastructural aspects of oogenesis and oocyte growth in fish and amphibians. *J. Electron Microsc. Tech.*, 16, 175-201.

Weaver, T.E., Na, C. and Stahlman, M. 2002. Biogenesis of lamellar bodies, lysosome-related organelles involved in storage and secretion of pulmonary surfactant. *Cell Develop. Biol.*, 13, 263-270.

Weakley, B.S., Webb, P. and James, J.L. 1981. Cytochemistry of the Golgi apparatus in developing ovarian germ cells of the Syrian hamster. *Cell Tissue Res.*, 220, 349-372.

West, G. 1990. Methods of assessing ovarian development in fish: a review. *Aust. J. Mar. Freshw. Research*, 41, 199-222.

White, D.L., Mazurkiewicz, J.E. and Barnett, R.J. 1979. A chemical mechanism for tissue staining by osmium tetroxide-ferricyanide mixtures. *J. Histochem. Cytochem.* 27, 1084-1091.

LEGENDS

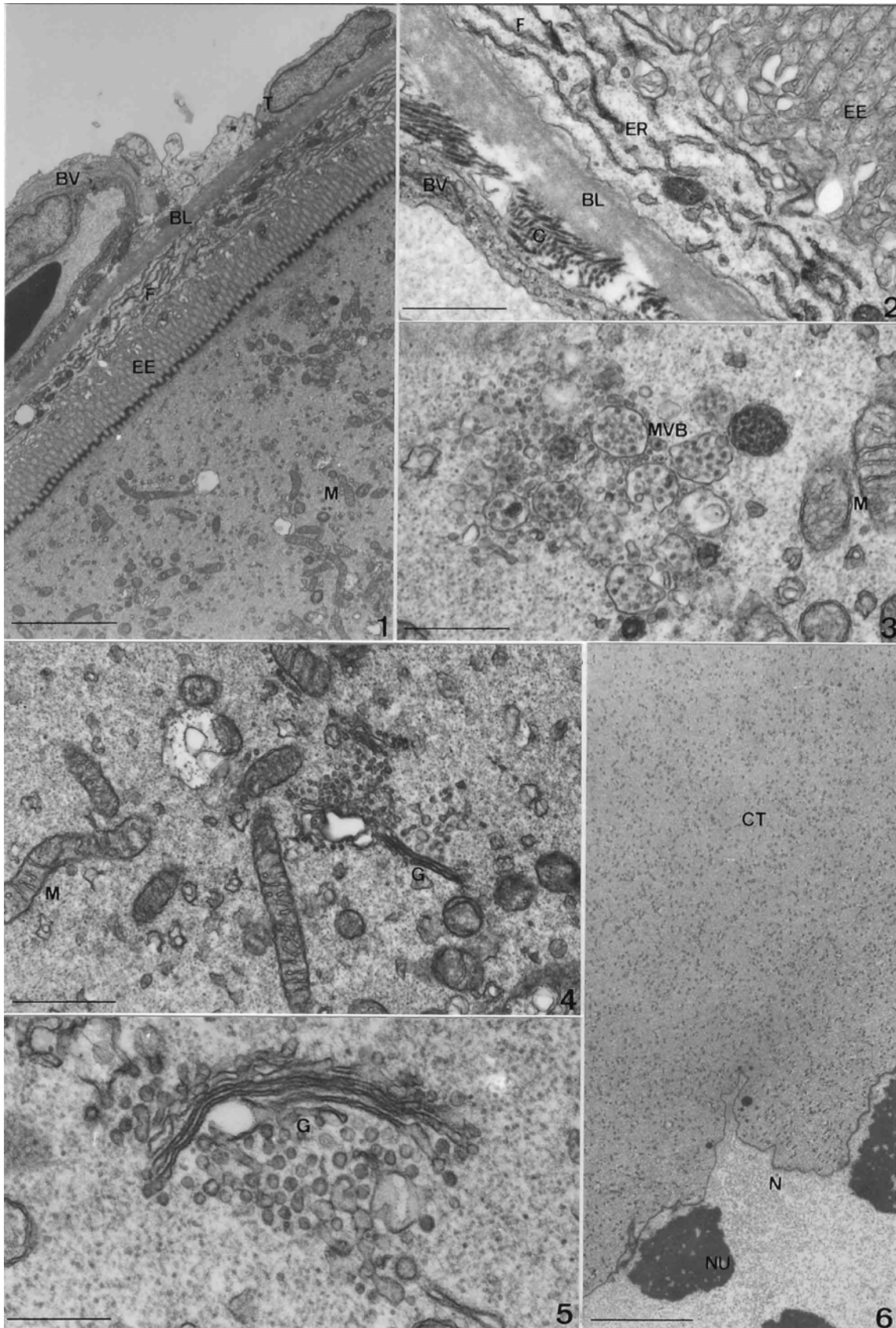
Figure 1 – Peripheral cytoplasmic region of previtellogenic oocyte submitted to KFe. BL: basal lamina; BV: blood vessel; EE: egg envelope; F: follicular cell; M: mitochondria; T: theca. Bar = 3.5 μ m.

Figure 2 – Follicular envelope region of previtellogenic oocyte submitted to KFe. BL: basal lamina; BV: blood vessel; C: collagen fibers; EE: egg envelope; ER: endoplasmic reticulum; F: follicular cell. Bar = 0.95 μ m.

Figure 3 – Peripheral cytoplasmic region of previtellogenic oocyte submitted to KFe. M: mitochondria; MVB: multivesicular body. Bar = 2.1 μ m.

Figures 4 and 5 – Cytoplasmic region of previtellogenic oocyte submitted to KFe. ER: endoplasmic reticulum; G: Golgi complex; M: mitochondria. 4 - Bar = 0.95 μ m; 5 – Bar = 0.42 μ m.

Figure 6 – Perinuclear region and nucleus of previtellogenic oocyte submitted to KFe. CT: cytoplasm; N: nucleus; NU: nucleolus. Bar = 6 μ m.



Figures 7 and 8 – Follicular envelope region of previtellogenic oocyte submitted to ZIO. Asterisk: ZIO reactive region; BL: basal lamina; CAP: cortical alveolus precursor; EE: egg envelope; ES: endomembranous system; F: follicular cell; T: theca. 7 - Bar = 2.6 μ m; 8 – Bar = 1.25 μ m.

Figures 9 to 12 – Cytoplasmic region of previtellogenic oocyte submitted to ZIO. Asterisk: ZIO reactive region; ER: endoplasmic reticulum; G: Golgi complex; MB: multilamellar body. 9 – Bar = 0.73 μ m; 10 – X Bar = 0.47 μ m; 11 – Bar = 0.55 μ m; 12 – Bar = 0.25 μ m.

Figures 13 and 14 – Perinuclear cytoplasmic region of previtellogenic oocyte submitted to ZIO. 14 – Detail of fig. 13. Asterisk: ZIO reactive region; EDV: electron-dense vesicle; N: nucleus. 13 – Bar = 3.2 μ m; 14 – Bar = 1.4 μ m.

Figures 15 and 16 – Follicular envelope region of previtellogenic oocyte submitted to KI. BL: basal lamina; EE: egg envelope; F: follicular cell; little asterisk: KI reactive region; M: mitochondria; MB: multilamellar body; O: oocyte; T: theca. 15 – Bar = 1.4 μ m; 16 – Bar = 0.6 μ m.

Figures 17 to 22 – Cytoplasmic region of previtellogenic oocyte submitted to KI. EDV: electron-dense vesicle; ER: endoplasmic reticulum; G: Golgi complex; little asterisk: KI reactive region; MVB: multivesicular body. 17 – Bar = 0.25 μ m; 18 – Bar = 0.30 μ m; 19 to 21 – Bar = 0.62 μ m; 22 – Bar = 1 μ m.

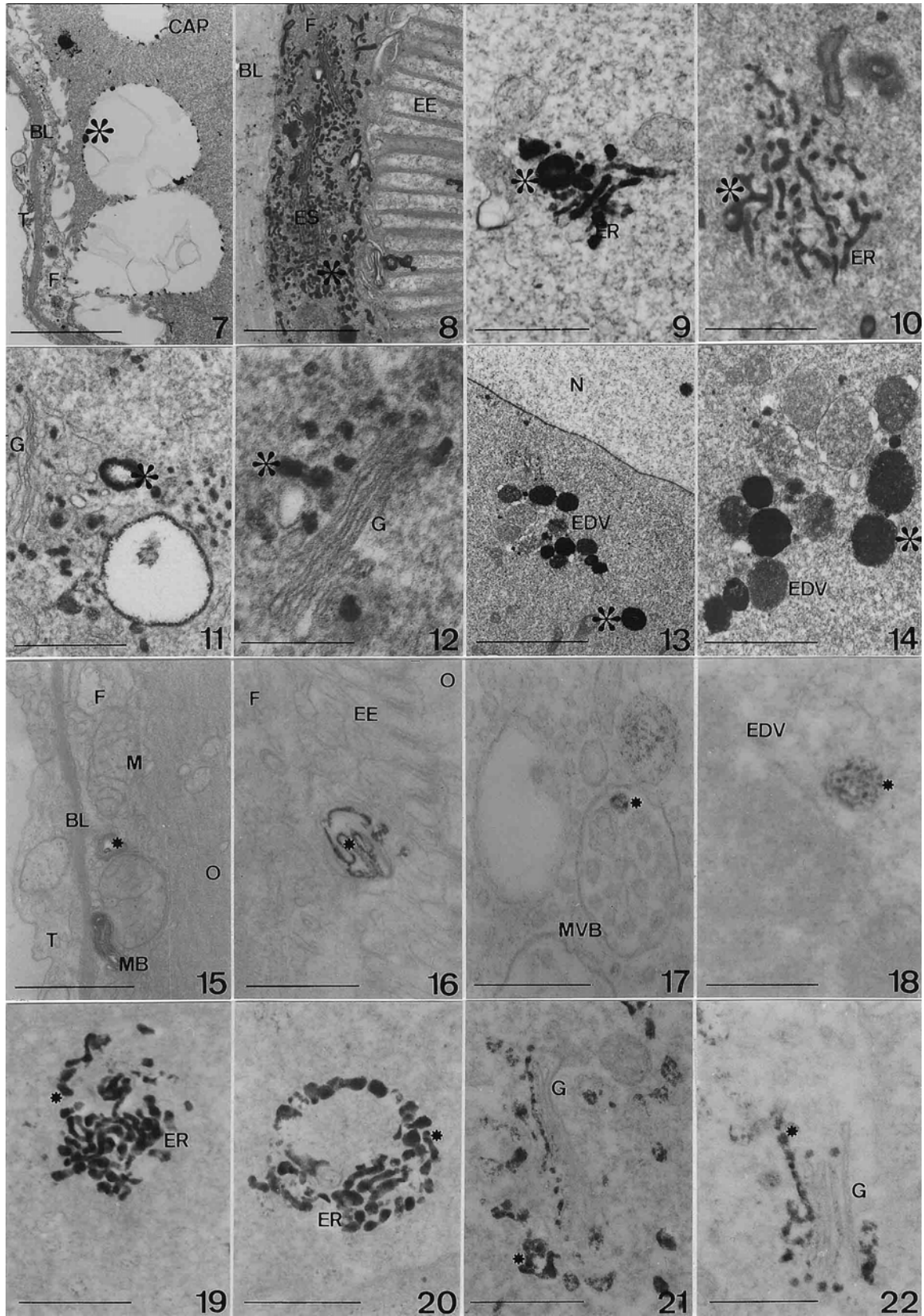
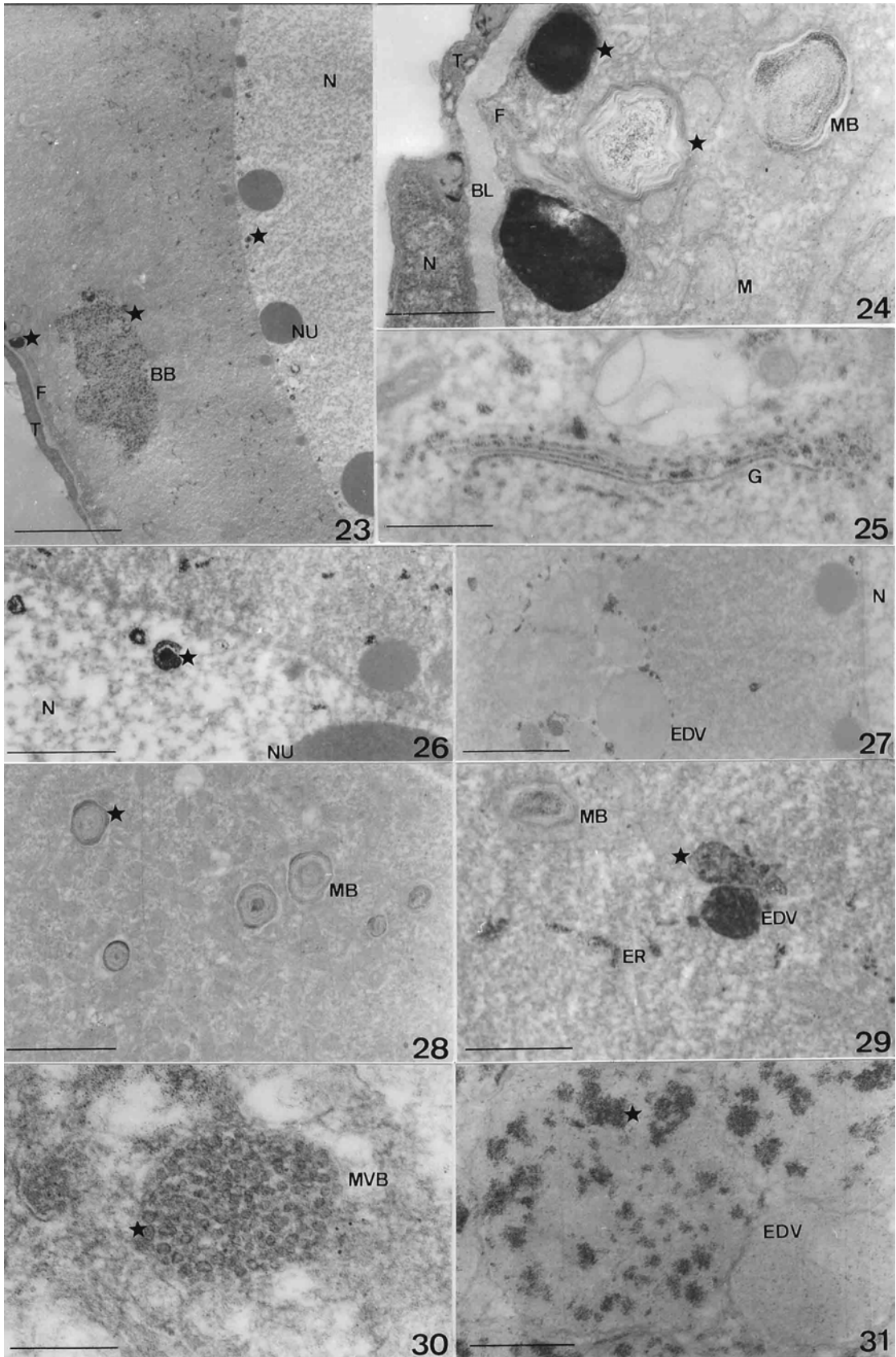


Figure 23 – Previtellogenic oocyte submitted to AcPase. BB: Balbiani body; F: follicular cell; N: nucleus; NU: nucleolus; rectangle: area magnified in Fig. 24; star: AcPase reactive region; T: theca; triangle: area amplified in Fig. 29. Bar = 4.6 μ m.

Figure 24 – Follicular envelope region of previtellogenic oocyte submitted to AcPase. BL: basal lamina; F: follicular cell; M: mitochondria; MB: multilamellar body; N: nucleus; star: AcPase reactive region; T: theca. Bar = 0.47 μ m.

Figures 25, 28 to 31 – Cytoplasmic region of previtellogenic oocyte submitted to AcPase. EDV: electron-dense vesicle; ER: endoplasmic reticulum; G: Golgi complex; MB: multilamellar body; MVB: multivesicular body; star: AcPase reactive region. 25 – Bar = 0.54 μ m; 28 – Bar = 1.5 μ m; 29 – Bar = 0.63 μ m; 30 – Bar = 0.30 μ m; 31 – Bar = 0.33 μ m;.

Figures 26 and 27 – Perinuclear cytoplasmic region of previtellogenic oocyte submitted to AcPase. EDV: electron-dense vesicle; N: nucleus; NU: nucleolus; star: AcPase reactive region. 26 – Bar = 0.83 μ m; 27 – Bar = 1.2 μ m.



6.2

Desenvolvimento e atividade do sistema de endomembranas durante o crescimento secundário dos oócitos de *Serrasalmus spilopleura* (Teleostei, Characiformes, Characidae).

A. C. D. Guimarães^{a,b} and I. Quagio-Grassiotto^a

^aDepto. de Morfologia, IB, Unesp, Botucatu, SP, Brasil – CP 510, CEP 18618-000
(e-mail: grassiotto@laser.com.br)

^bDepto. de Biologia Celular, IB, Unicamp.

Palavras-chave: citoquímica, ultra-estrutura, fosfatase ácida, oócito, *Serrasalmus spilopleura*

RESUMO

A utilização de técnicas citoquímicas estruturais e ultra-estruturais possibilitou o acompanhamento das modificações morfo-fisiológicas decorrentes do crescimento secundário em *Serrasalmus spilopleura*. Elementos do retículo endoplasmático incluindo espaço intermembranoso do envoltório nuclear, alguns dictiossomos do complexo de Golgi, lisossomos, grânulos de vitelo, regiões do envelope oocitário e sítios nas células foliculares respondem à AcPase. Alvéolos corticais, estruturas citoplasmáticas heterogêneas, regiões do envelope oocitário e sítios nas células foliculares respondem à impregnação pelo tetróxido de ósmio e iodeto de zinco (ZIO). Ainda, elementos do retículo endoplasmático, outras vesículas e sítios nas células foliculares respondem positivamente à impregnação pelo tetróxido de ósmio e iodeto de potássio (KI). A rota de síntese de proteínas destinadas à secreção ou aos compartimentos membranosos intracelulares, entre elas as fosfatases ácidas, envolve o trânsito pelo retículo endoplasmático, complexo de Golgi, vesículas contendo enzimas hidrolíticas inativas e por fim os lisossomos. Assim as respostas à AcPase em diferentes componentes do sistema de endomembranas dos oócitos em crescimento secundário de *S. spilopleura* indicam o empenho desses compartimentos na produção das enzimas necessárias para a vitelogênese, bem como no processamento de componentes exógenos do vitelo. Já a resposta ao ZIO nesses mesmos componentes do sistema de endomembranas pode indicar o processamento de proteínas ricas em grupamentos SH, bem como a resposta positiva ao KI informa que tais compartimentos apresentam propriedades redutoras. Ainda, as respostas às técnicas utilizadas são discutidas em relação à biologia dos oócitos.

INTRODUÇÃO

A gametogênese feminina nos peixes teleósteos compreende a oogênese, ou formação dos oócitos primários iniciais a partir das oogônias, os crescimentos primário e secundário, a maturação final e culmina com a ovulação (Grier 2000).

Na oogênese, as oogônias dividem-se várias vezes por mitose, formam um conjunto ou ninho de células que entram em meiose dando origem aos oócitos primários (Grier, 2000). Conforme a meiose avança, ocorre a foliculogênese, ou seja, as células epiteliais associam-se com os oócitos, tornando-se células pré-foliculares e a membrana basal é sintetizada ao redor do folículo em formação separado-o do epitélio germinativo (Grier, 2000). Em diplóteno, os oócitos primários deixam os ninhos acompanhados pelas células foliculares que os envolvem (de Vlaming, 1983; Wallace & Selman, 1981; Selman & Wallace, 1989; Bazzoli & Rizzo, 1990; West, 1990; Grier, 2000). Conforme o folículo desenvolve, células do conjuntivo dispõem-se ao seu redor, dando origem ao complexo folicular. Esse último é constituído pelo oócito envolto pelo epitélio folicular apoiado na lâmina basal e por duas camadas de células da teca (Grier. 2000).

Constituídos os complexos foliculares, os oócitos entram em crescimento primário e aumentam drasticamente em volume (Wallace & Selman, 1981; Nagahama, 1983; Selman & Wallace, 1989; West, 1990; Bazzoli & Rizzo, 1990; Rizzo & Bazzoli, 1993) devido à intensa síntese de RNA e a proliferação das organelas membranosas (Guraya, 1986; Tyler & Sumpter, 1996).

O crescimento secundário dos oócitos, ou fase de crescimento gonadotrofina-dependente (Wallace & Selman, 1981; Nagahama, 1983; de Vlaming, 1983; Guraya, 1986) tem início com o aparecimento dos precursores dos alvéolos corticais (Wallace & Selman, 1981; de Vlaming, 1983; Nagahama, 1983; Guraya, 1986; Selman & Wallace, 1989; Makeyeva & Yemel'yanova, 1989; West, 1990; Bazzoli & Rizzo, 1990; Rizzo & Bazzoli, 1993, Tyler & Sumpter, 1996), estruturas esféricas de membrana única (Yamamoto, 1964; Selman *et. al.*, 1988; Begovac & Wallace, 1988) e conteúdo fibroso (Yamamoto, 1964) ou flocado (Anderson, 1968). A síntese do conteúdo dos alvéolos corticais, que responde a colorações específicas para proteínas e carboidratos (Wallace & Selman, 1981;

Nagahama, 1983; de Vlaming, 1983; Selman & Wallace, 1989; West, 1990; Tyler & Sumpter, 1996), parece ser endógena e organelas como retículo endoplasmático e complexo de Golgi podem estar envolvidas (Anderson, 1968; Tesoriero, 1980; Wallace & Selman, 1981; Nagahama, 1983; de Vlaming, 1983; Selman & Wallace, 1989; Tyler & Sumpter, 1996). À medida que o citoplasma é preenchido pelos grânulos de vitelo, os alvéolos corticais são deslocados para a região periférica do ooplasma (Wallace & Selman, 1981; Kobayashi & Yamamoto, 1985; Selman *et al.*, 1988; Selman & Wallace, 1989; West, 1990). Na fertilização, o conteúdo dos alvéolos é liberado no espaço perivitelínico, atuando no endurecimento do envelope oocitário (Tyler & Sumpter, 1996) e prevenindo a poliespermia (Ohta *et al.*, 1990; Tyler & Sumpter, 1996).

Durante o crescimento secundário, os oócitos sofrem novo aumento de volume devido ao acúmulo de vitelo (Wallace & Selman, 1981; Nagahama, 1983; de Vlaming, 1983; Selman & Wallace, 1989; West, 1990; Tyler & Sumpter, 1996). O aumento de volume decorre da pinocitose mediada por receptores de proteínas extra-ovarianas (as vitelogeninas), sintetizadas e secretadas pelo fígado, que são processadas e embaladas no sistema de endomembranas dos oócitos (Wallace, 1985; Tyler & Sumpter, 1996). O acúmulo de vitelo ocorre em grânulos, que são estruturas esféricas, elétrons-densas, limitadas por membrana, resultantes da fusão de vesículas cobertas menores que aparecem inicialmente no citoplasma periférico (Yamamoto, 1964; Droller & Roth, 1966; Anderson, 1968; Ulrich, 1969; Begovac & Wallace, 1988). A formação do vitelo nos teleósteos é tida como heterossintética (exógena) (de Vlaming, 1983; Selman & Wallace, 1989; Tyler & Sumpter, 1996). No entanto, uma contribuição autossintética (endógena) tem sido considerada (Anderson, 1968; Nagahama, 1983).

Vários dos processos metabólicos que ocorrem nesses oócitos tem como sede o sistema de endomembranas e podem ser estudados mediante a aplicação de técnicas citoquímicas ultra-estruturais. Técnicas como a contrastação de membranas pelo tetróxido de ósmio e ferrocianeto de potássio (McDonald, 1984), a impregnação pelo tetróxido de ósmio e iodeto de potássio (Locke & Huie, 1983) e a impregnação pelo tetróxido de ósmio e iodeto de zinco (Reincke & Walther,

1978), se aplicadas a essas células, podem nessa ordem, fornecer dados valiosos sobre a biogênese das organelas membranosas, presença de ambientes redutores e de ambientes contendo proteínas ricas em grupamentos SH.

O mesmo ocorre com as fosfatases ácidas, enzimas produzidas pelo sistema de endomembranas, que estão envolvidas em processos de atividades de síntese e degradação em diferentes tipos celulares (Kessel & Decker, 1972; Hart & Pontier, 1979; Steinert & Hanocq, 1979; Deltour *et al.*, 1981; Weakley *et al.*, 1981; Busson-Mabillot, 1984; Rune, 1984; Raikhel & Lea, 1986; Sangha & Guraya, 1989; Sire *et al.*, 1994; Azeredo-Oliveira & Mello, 1997; Santos, 2001; Fialho *et al.*, 2002; Weaver *et al.*, 2002). Essas enzimas são responsáveis pela hidrólise dos fosfatos de ésteres orgânicos de diferentes substratos em baixos valores de pH (Fialho *et al.*, 2002). Sua atividade durante o desenvolvimento oocitário parece comum às diferentes espécies de animais (Hart & Pontier, 1979; Steinert & Hanocq, 1979; Weakley *et al.*, 1981; Busson-Mabillot, 1984; Rune, 1984; Raikhel & Lea, 1986; Sangha & Guraya, 1989; Sire *et al.*, 1994; Santos, 2001; Fialho *et al.*, 2002; Weaver *et al.*, 2002), e deve ser uma condição geral aos diferentes sistemas de processamento das proteínas do vitelo (Fialho *et al.*, 2002) e ainda pode estar relacionada com a transformação do material de reserva em uma forma estocável no interior dos oócitos dos vertebrados inferiores (Korfsmeier, 1979).

Dentre os Characiformes da família Characidae, a subfamília Serrasalminae congrega as piranhas verdadeiras, mais agressivas, e as pirambebas, peixes menos agressivos, como *Serrasalmus spilopleura* (Braga, 1976). Os Serrasalminae são não migradores, de período reprodutivo longo e coincidente com o período chuvoso (Rodrigues *et al.*, 1978; Leão *et al.*, 1991; Vazzoler & Menezes, 1992). Os *Serrasalmus* spp adaptam-se bem aos ambientes lênticos, e são comuns nos reservatórios brasileiros onde apresentam reprodução contínua, não sazonal e desenvolvimento oocitário assincrônico com desovas em múltiplas parcelas (Paiva, 1958; Braga, 1976; Lamas & Godinho, 1996; Teles & Godinho, 1997; Fujihara, 1997). Tais peculiaridades da biologia reprodutiva desse animal o tornam um modelo biológico em potencial para os estudos sobre a morfofisiologia das gônadas.

A despeito das proposições existentes, os sítios e organelas membranosas envolvidos com as atividades metabólicas características do crescimento secundário dos oócitos de teleósteos, permanecem pouco conhecidos (Hart & Pontier 1979; Busson-Mabillot, 1984; Sire *et al.*, 1994). Assim na busca de uma melhor compreensão das vias biossintéticas ativas durante o crescimento secundário, os oócitos de *S. spilopleura*, nesse período do desenvolvimento, foram estudados mediante a aplicação de técnicas citoquímicas estruturais e ultra-estruturais específicas para o sistema de endomembranas.

MATERIAL E MÉTODOS

Fêmeas adultas de *S. spilopleura* foram coletadas mensalmente na Represa de Jurumirim, Alto do Rio Paranapanema (23°31'10"S-48°42'35"W), São Paulo, Brasil, de Março de 2000 a Dezembro de 2003. Os espécimes foram anestesiados por imersão em solução aquosa de benzocaína, na concentração de 1µg/ml, tiveram seus ovários retirados, cortados em pequenos fragmentos e submetidos a diferentes técnicas citoquímicas estruturais e ultra-estruturais.

Impregnação com Tetróxido de Ósmio e Ferrocianeto de Potássio (KFe) (McDonald, 1984)

Os fragmentos de ovário foram fixados "overnight" em glutaraldeído 2.5%, com 5 mM CaCl₂ em tampão cacodilato de sódio 0.1M, pH 7.2. Após a fixação os fragmentos foram lavados no mesmo tampão, pós-fixados em Tetróxido de Ósmio a 1%, Ferrocianeto de Potássio a 0,8% e 5 mM CaCl₂ no mesmo tampão por duas horas no escuro. Novamente foram lavados por várias vezes no mesmo tampão e contrastados em bloco com uranila 2% em solução aquosa por duas horas. Seguiu-se então a desidratação em série crescente de acetona e a inclusão em Araldite. Os cortes ultra-finos foram pós-contrastados em solução saturada de acetato de uranila em álcool 50% e citrato de chumbo 0,2% em NaOH, 0,1N.

Detecção de Fosfatase Ácida (AcPase)

Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET) (Pino *et al.*, 1981)

Os fragmentos de ovário foram fixados por uma hora, a 4°C em glutaraldeído 1% em tampão cacodilato de sódio 0.1M, pH 7.2. Após a fixação os fragmentos foram lavados no mesmo tampão, incubados a 37°C por uma hora em 25mg de citidina-5'-monofosfato, 12ml de água destilada, 10ml de tampão acetato 0.05M, pH 5.0, 3ml nitrato de chumbo 1% (Pino *et al.*, 1981). Após a incubação, os fragmentos foram refixados em glutaraldeído 2.5% em tampão cacodilato de sódio 0.1M, pH 7.2, pós-fixados em Tetróxido de Ósmio a 1% no mesmo tampão, por duas horas no escuro, lavados por várias vezes no mesmo tampão, contrastados em bloco com uranila 2% em solução aquosa por duas horas. Seguiu-se então a desidratação em série crescente de acetona e a inclusão em Araldite. Os cortes ultra-finos foram observados sem pós-contrastação. Para o controle omitiu-se o substrato do meio de incubação.

Microscopia Fotônica (MF) (Gömori, 1950)

Criocortes de ovário foram incubados a 37°C por 30 minutos em meio apropriado (Gömori, 1950). Após a incubação os fragmentos foram lavados por várias vezes em água destilada, imersos em solução de sulfeto de amônia 1% por um minuto, novamente lavados e montados para observação em microscópio fotônico. Para o controle omitiu-se o substrato do meio de incubação.

Impregnação com Tetróxido de Ósmio e Iodeto de Zinco (ZIO) (Reincke & Walther, 1978)

Os fragmentos de ovário foram fixados “overnight” em glutaraldeído 2.5% em tampão fosfato de sódio 0.1M, pH 7.2. Após a fixação os fragmentos foram lavados no mesmo tampão, e posteriormente no tampão TRIS-aminometano, pH 4.5. Foram então incubados por 22h, à temperatura ambiente em 3g de zinco em pó, 1g de iodo ressublimado em 20ml de água destilada, misturados com tampão TRIS-aminometano, pH 4,5 na proporção de 1:1, e posterior mistura com tetróxido de ósmio 2% aquoso na proporção 4:1 (Reincke & Walther, 1978), lavados no

tampão TRIS-aminometano, pH 4.5, contrastados em bloco com uranila 2% em solução aquosa por duas horas. Seguiu-se então a desidratação em série crescente de acetona e a inclusão em Araldite. Os cortes ultra-finos foram pós-contrastados em solução saturada de acetato de uranila em álcool 50% e citrato de chumbo 0,2% em NaOH, 0,1N.

Impregnação com Tetróxido de Ósmio e Iodeto de Potássio (KI) (Locke & Huie, 1983)

Os fragmentos de ovário foram fixados “overnight” em glutaraldeído 2.5% em tampão cacodilato de sódio 0.1M, pH 7.2. Após a fixação os fragmentos foram lavados no mesmo tampão e posteriormente em solução aquosa de iodeto de potássio a 1%, incubados por 48h a temperatura ambiente, no escuro, em solução de tetróxido de ósmio 1% e iodeto de potássio 1% (Locke & Huie, 1983). Novamente foram lavados em solução aquosa de iodeto de potássio a 1%, contrastados em bloco com uranila 2% em solução aquosa por duas horas. Seguiu-se então a desidratação em série crescente de acetona e a inclusão em Araldite. Os cortes ultra-finos foram observados sem pós-contrastação.

Todos os cortes ultra-finos de ovário assim preparados foram observados em Microscópio Eletrônico de Transmissão Philips C.M. 100. Já os cortes destinados à Microscopia Fotônica foram observados em fotomicroscópio Zeiss Axelphoto.

RESULTADOS

Nos folículos ovarianos de *S. spilopleura*, diferentes estruturas celulares, presentes nos oócitos em crescimento secundário ou em vitelogênese e no epitélio folicular, respondem positivamente às técnicas de impregnação com tetróxido de ósmio e iodeto de zinco (ZIO), impregnação com tetróxido de ósmio e iodeto de potássio (KI) e de localização de fosfatases ácidas (AcPase), tanto em microscopia fotônica (MF) quanto em microscopia eletrônica de transmissão

(MET). As organelas membranosas existentes nesses tipos celulares também contrastam fortemente pela utilização do ferrocianeto de potássio (KFe).

Envelope Oocitário

Nas camadas que envolvem os oócitos durante o crescimento secundário, o aumento de contraste provocado pelo KFe mostra que duas camadas de células da teca (teca interna e teca externa) envolvem o folículo, que a teca interna é organizada sobre vários feixes de fibras colágenas (Figs. 1) e que as células do epitélio folicular apresentam complexo de Golgi desenvolvido (Fig. 2). Ainda no citoplasma das células foliculares, a resposta ao KI resulta em marcações heterogêneas em estruturas vesiculares e corpos multilamelares (Figs. 14 e 15), a resposta ao ZIO ocorre em estruturas vesiculares (Fig. 10), enquanto a resposta à AcPase ocorre na forma de granulações altamente elétron-densas no citoplasma periférico próximo aos microvilos e no núcleo (Figs. 19 e 20).

O aumento de contraste provocado pelo KFe evidencia ainda o envelope oocitário completamente formado com sua característica estrutura trilaminar (Figs. 1 e 10), e destaca a membrana e o conteúdo das microvilosidades (Figs. 1 a 3), sendo que o interior das mesmas também responde ao ZIO (Figs. 10). A resposta à AcPase no envelope oocitário ocorre na altura da sua camada mais externa como marcações internas no ápice das microvilosidades (Fig. 19 e 20), enquanto que na altura da camada mais interna - na região de contato com o oócito - as marcações são detectadas na substância amorfa depositada ao redor das microvilosidades (Fig 21).

Oócitos

Sob a ação do KFe, no citoplasma dos oócitos em vitelogênese, a elétron-densidade das membranas das diferentes organelas se intensifica, evidenciando as vesículas pinocíticas no oolema (Fig. 3), a dupla membrana e as cristas das mitocôndrias, os elementos do retículo endoplasmático, as cisternas e vesículas do Golgi, a membrana limitante dos grânulos de vitelo, as membranas de figuras mielínicas, bem como o envoltório nuclear (Figs. 4 a 6). As figuras mielínicas ou

corpos multilamelares, predominantemente no citoplasma perinuclear, e o próprio espaço intermembranoso do envoltório nuclear são positivos à AcPase (Figs. 27 e 28).

Os inúmeros componentes do retículo endoplasmático espalhados pelo citoplasma são positivos ao KI e à AcPase (Figs. 16 e 25 a 26), enquanto que as cisternas de alguns dictiossomas do complexo de Golgi que respondem à AcPase (Fig. 25) são sempre negativas ao KI e ao ZIO (Fig. 12). Outros sítios próximos a porções do retículo endoplasmático, aos alvéolos corticais e aos grânulos de vitelo apresentam marcações heterogêneas em resposta ao ZIO (Fig. 13), ao KI (Fig. 17 e 18) e à AcPase (Fig. 21 e 22).

Por fim, nas demais estruturas características dos oócitos em vitelogênese, o conteúdo dos alvéolos corticais, cujo aspecto filamentoso lembra os proteoglicanos, responde positivamente ao ZIO (Fig. 10 e 11), e o conteúdo dos grânulos de vitelo, que preenchem gradativamente o citoplasma, apresenta marcação heterogênea à AcPase. Aos grânulos de vitelo, sejam os próximos aos alvéolos corticais (Fig. 23) ou aqueles associados à organelas como o retículo endoplasmático e o complexo de Golgi (Fig. 25), fundem-se vesículas elétrondensas não marcadas pela AcPase (Fig. 24).

À MF, nos oócitos em fase inicial da vitelogênese, a resposta à detecção de AcPase ocorre em granulações no citoplasma perinuclear e em granulações próximas aos alvéolos corticais (Fig. 29). Nos oócitos em vitelogênese final a marcação ocorre nos grânulos de vitelo que se espalham por todo o citoplasma, na camada mais interna e na camada mais externa (com menor intensidade) do envoltório oocitário, e nas células foliculares (Fig. 30).

DISCUSSÃO

As técnicas citoquímicas estruturais e ultra-estruturais utilizadas no estudo das vias biossintéticas que ocorrem no sistema de endomembranas dos oócitos em crescimento secundário de *S. spilopleura*, como as pós-fixações com tetróxido de ósmio associado ao ferrocianeto de potássio, (McDonald, 1984); ao iodeto de potássio (Locke & Huie, 1983) ou ao iodeto de zinco (Reincke & Walther, 1978),

têm por base a redução do ósmio e provocam como efeito final o aumento de contraste do sistema de endomembranas.

O tetróxido de ósmio em presença de ferrocianeto de potássio é reduzido (McDonald, 1984), torna-se menos agressivo às proteínas, e se deposita melhor em certos sítios celulares, particularmente nas membranas (White *et al.*, 1979). Na impregnação pelo tetróxido de ósmio e iodeto de potássio, o tetróxido de ósmio é reduzido a ósmio preto lentamente, pela combinação do ósmio com as pontes dissulfeto presentes nas moléculas de proteínas recém formadas, no sistema de endomembranas e que ainda não atingiram a estrutura terciária (Locke & Huie, 1983; Fernandes *et al.*, 1998). Na impregnação com tetróxido de ósmio e iodeto de zinco (ZIO), uma modificação da técnica de impregnação com tetróxido de ósmio e iodeto de potássio (Maillet, 1962 *apud* Reincke & Walther, 1978), o substrato que reage ao ZIO também apresenta grupos SH, e se trata de proteínas ricas em grupos sulfidril livres (Pellegrino de Iraldi, 1976, 1977 *apud* Reincke & Walther, 1978; Reincke & Walther, 1978).

Já as fosfatases ácidas, responsáveis pela hidrólise dos fosfatos de ésteres orgânicos de diferentes substratos, são ativas em baixos valores de pH característicos dos compartimentos lisossomais (Fialho *et al.*, 2002; Alberts *et al.*, 2002). Sua detecção tem por base a deposição de um metal pesado no sítio ativo da enzima quando em baixos valores de pH. Isto se deve à hidrólise do substrato pela enzima formando um produto primário, e à combinação desse produto com o metal pesado forma um produto insolúvel (Meirelles, 1998).

O crescimento secundário dos oócitos nos teleósteos, assim como o crescimento primário, ocorre no interior dos folículos ovarianos. É caracterizado pela formação dos alvéolos corticais, dos grânulos de vitelo e pelo espessamento do envelope oocitário. Prepara os oócitos para a ovulação e posterior fecundação (Wallace & Selman, 1981; Nagahama, 1983; de Vlaming, 1983; Guraya, 1986; Selman & Wallace, 1989; West, 1990). A participação das fosfatases ácidas na formação dessas estruturas é demonstrada pela positividade à técnica detectada nas diferentes etapas do processo seja em *S. spilopleura* (presente trabalho) ou em outros teleósteos (Hart & Pontier, 1979; Busson-Mabillot, 1984).

A atividade ácido-fosfatásica nas células foliculares, relatada em mamíferos (Weakley *et al.*, 1981; Rune, 1984) e em *S. spilopleura* (presente trabalho) pode estar envolvida com a difusão e o processamento de substâncias exógenas para o interior do oócito (Rune, 1984, presente trabalho). A resposta positiva à presença da enzima detectada na região mais periférica dos oócitos em crescimento secundário em *S. spilopleura* (presente trabalho), localizada no interior das microvilosidades, na substância amorfa da camada mais interna do envelope vitelínico e no citoplasma periférico junto ao oolema, traçam a via utilizada nesse processo. Ainda, a marcação em resposta ao ZIO no interior das microvilosidades reforça a idéia da via de difusão de substâncias exógenas das células foliculares para o interior do oócito.

A presença de fosfatase ácida em determinadas populações dos alvéolos corticais tem sido registrada em algumas espécies de teleósteos (Kudo, 1978; Hart *et al.*, 1987). No entanto, apesar do consenso sobre o seu conteúdo polissacarídico (Wallace & Selman, 1981; Nagahama, 1983; Selman & Wallace, 1989; West, 1990), pouco se conhece sobre as proteínas, enzimas ou não, que possam estar presentes nessa estrutura. À semelhança do relatado em echinodermatas, anfíbios e mamíferos (Hart & Pontier, 1979; Steinert & Hanocq, 1979; Busson-Mabillot, 1984), em *S. spilopleura* os alvéolos corticais não respondem à técnica de detecção de fosfatase ácida seja à MF ou à MET (presente trabalho). Entretanto, a resposta ao ZIO encontrada em *S. spilopleura* reforça a idéia de que além de polissacarídeos, o conteúdo dos alvéolos corticais apresenta natureza protéica (Wallace & Selman, 1981; Nagahama, 1983; de Vlaming, 1983; Guraya, 1986; Selman & Wallace, 1989; West, 1990; Tyler & Sumpter, 1996), e que essas proteínas são ricas em grupamentos SH (presente trabalho).

Detectada em *S. spilopleura*, tanto à MF quanto à MET, a natureza lisossomal dos grânulos de vitelo demonstrada pela presença de atividade ácido-fosfatásica e outras enzimas lisossomais, tem sido observada em oócitos em crescimento secundário em diferentes grupos de animais (Hart & Pontier, 1979;

Steinert & Hanocq, 1979; Weakley *et al.*, 1981; Rune, 1984; Busson-Mabillot, 1984; Raikhel & Lea, 1986; Sire *et al.*, 1994; Santos, 2001).

Além disto, em *S. spilopleura*, durante o crescimento secundário dos oócitos, vesículas elétron-densas oriundas do sistema de endomembranas (Guimarães & Quagio-Grassiotto, 2001) fusionam-se aos grânulos de vitelo positivos a fosfatase ácida (presente trabalho). Os grânulos de vitelo aumentam em tamanho pela fusão de grânulos menores, provenientes das proximidades do oolema, e que se formam a partir da captura de substâncias de origem exógena (Guimarães & Quagio-Grassiotto, 2002). A elétron-densidade e homogeneidade do conteúdo das vesículas produzidas internamente pelos oócitos é característica de grânulos de natureza protéica. Seu aspecto, dinâmica de formação e destino assemelha-se à rota de síntese de proteínas destinadas à secreção ou aos compartimentos membranosos intracelulares, entre elas as fosfatases ácidas, envolvendo o trânsito pelo retículo endoplasmático, complexo de Golgi, vesículas contendo enzimas hidrolíticas inativas que por fim se tornam ativas em ambientes ácidos, ou seja, nos lisossomos (Hasilik, 1992; Lodish *et al.*, 2000; Karp, 2002; Cooper & Hausman, 2003). Seria, portanto, razoável supor que as vesículas oriundas do sistema de endomembranas em *S. spilopleura* contêm enzimas hidrolíticas inativas, que se tornam ativas nos grânulos de vitelo, e participam do processamento das substâncias aí contidas, como por exemplo, da vitelogenina.

Assim como em *S. spilopleura*, um sistema de endomembranas homogeneamente reativo à fosfatase ácida, incluindo complexo de Golgi e retículo endoplasmático e envoltório nuclear, tem sido descrito em oócitos em crescimento secundário de diferentes grupos de animais (Weakley *et al.*, 1981; Rune, 1984; Busson-Mabillot, 1984; Raikhel & Lea, 1986). Essa distribuição da fosfatase ácida em oócitos maduros aparentemente não associada a compartimentos lisossomais (Rune, 1984), tem sido relacionada ao armazenamento de material nutricional (Korfsmeier, 1979, 1980; Schmidtler, 1980). Essas suposições não comprovadas, apenas permitem apontar a presença e a atividade da enzima nesses compartimentos e, no momento nada pode ser acrescentado quanto a sua possível função.

Corpos multilamelares marcados pela fosfatase ácida, assim como no crescimento primário (Guimarães & Quagio-Grassiotto, submetido), continuam presentes ao longo de todo o crescimento secundário dos oócitos de *S. spilopleura*, concentram-se ao redor do núcleo e no citoplasma periférico, nas regiões não ocupadas pelos grânulos de vitelo, bem como aqueles marcados pelo KI encontrados no citoplasma das células foliculares. Essas estruturas, lisossomos muito possivelmente resultantes de processos autofágicos, devem responder pela intensa reciclagem de organelas e outros componentes citoplasmáticos, necessários e decorrentes da alta atividade metabólica desse tipo celular. Em oócitos de anfíbio, vacúolos autofágicos ocasionais também apresentam atividade ácido-fosfatásica (Kessel & Decker, 1972). O processo de autofagia é imprescindível para a homeostase celular, já que permite que componentes subcelulares sejam degradados e reutilizados. Desse processo, descrito em diferentes tipos celulares, depende a reciclagem de seus constituintes (Glaumann *et al.*, 1981). Relatos de detecção de atividade ácido-fosfatásica em autofagossomos vão desde o seu envolvimento na metamorfose de vários tecidos em diferentes espécies animais (Weber, 1964 *apud* Glaumann *et al.*, 1981), até o seu envolvimento na produção da substância surfactante pelas células do epitélio pulmonar (Weaver *et al.*, 2002).

Nos oócitos de *S. spilopleura* diferentes estruturas parecem contribuir para o status final do vitelo. As vesículas elétron-densas oriundas do sistema de endomembranas (Guimarães & Quagio-Grassiotto, 2001) formadas e armazenadas nos oócitos podem conter enzimas hidrolíticas inativas. A captura da vitelogenina durante o crescimento secundário dos oócitos (Wallace, 1985) resulta na formação de inúmeras vesículas pinocíticas, de cuja fusão surgem os grânulos de vitelo (Guimarães & Quagio-Grassiotto, 2002). As fosfatases ácidas inativas, previamente sintetizadas e armazenadas em vesículas nos oócitos primários (Guimarães & Quagio-Grassiotto, submetido), e incorporadas ao vitelo bruto durante o crescimento secundário ou vitelogênese via transporte vesicular, por fim responderiam pelo processamento endógeno da vitelogenina.

Assim sendo, independente dos tipos celulares estudados, os compartimentos que possuem capacidade redutora (Locke & Huie, 1983; Fernandes *et al.*, 1998; presente trabalho) respondem ao KI e aqueles que estão envolvidos no processamento de proteínas ricas em grupamentos SH (Reincke & Walther, 1978 Santos, 2001; presente trabalho) respondem ao ZIO.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Walter, P. Molecular Biology of the Cell. 4^a ed. Garland Publishing, Inc, New York & London, p1463. 2002.

Anderson, E. Cortical alveoli formation and vitellogenesis during oocyte differentiation in pipefish, *Syngnathus fuscus*, and killifish, *Fundulus heteroclitus*. J. Morphol., v. 125, p. 23-60, 1968.

Azeredo-Oliveira, M.T.V., Mello, M.L.S. Acid phosphatase activity in Malpighian tubules of *Triatoma infestans* Klug. Cytobios, v. 92, p. 23-28, 1997.

Bazzoli, N., Rizzo, E. A comparative cytological and cytochemical study of oogenesis in ten Brazilian teleost fish species. Eur. Arch. Biol., v. 101, p. 399-410, 1990.

Begovac, P.C., Wallace, R. A. Stages of oocyte development in the pipefish, *Syngnathus scovelli*. J. Morphol., v. 197, p. 353-369, 1988.

Braga, R.A. Ecologia e etologia de piranhas no nordeste do Brasil (Pisces – *Serrasalmus lacépède*, 1803). Tese (Doutorado em Ciências) – Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, São Paulo, p268, 1976.

Busson-Mabillot, S. Endosomes transfer yolk proteins to lysosomes in the vitellogenic oocyte of the trout. Biol. Cell, v. 51, p. 53-66, 1984.

Cooper, G.M., Hausman, R.E. The Cell: A Molecular Approach. 3^a ed. Sinauer Associates Inc., Oxford, p713, 2003.

de Vlaming, V. Oocyte development patterns and hormonal involvements among teleosts. In: Rankin, J.C., Pitcher, T.J. and Duggan, R.T. Control Processes in Fish Physiology. Croom Helm Ltd., London & Canbrra, p. 176-199, 1983.

Deltour, R., Fransolet, S., Loppes, R. Inorganic phosphate accumulation and phosphatase activity in the nucleus of maize embryo root cells. J. Cell Sci., v. 47, p. 77-89, 1981.

Droller, M.J., Roth, T.F. An electron microscopic study of yolk formation during oogenesis in *Lebistes reticulatus guppyi*. J. Cell Biol., v. 28, p. 209-232, 1966.

Fernandes, A.P., Curi, G., Bão, S.N. Contribution of the Golgi complex-endoplasmic reticulum system during spermiogenesis in three species of phytophagous bugs (Hemiptera: Pentatomidae). Int. J. Insect Morphol. Embryol., v. 27, p. 235-240, 1998.

Fialho, E., Silveira, A.B., Masuda, H., Silva-Neto, M.A.C. Oocyte fertilization triggers acid phosphatase activity during *Rhodnius prolixus* embryogenesis. Insect Biochem. Mol. Biol., v. 32, p. 871-880, 2002.

Fujihara, C.Y. Dinâmica populacional de *Serrasalmus spilopleura*, Kner, 1860 no reservatório de Jurumirim (rio Paranapanema, SP): aspectos do crescimento, estrutura populacional, reprodução e nutrição. Dissertação (mestrado), IB, UNESP, Botucatu, SP, p91, 1997.

Glaumann, H., Ericsson, J.L.E, Marzella, L. Mechanisms of intralysosomal degradation with special reference to autophagocytosis and heterophagocytosis of cell organelles. Inter. Rev. Cytol., v. 73, p. 149-182, 1981.

Gömöri, G. An improved histochemical technique for acid phosphatase. Stain Technol., v. 25, 81-85, 1950.

Grier, H. Ovarian germinal epithelium and folliculogenesis in the Common Snook, *Centropomus undecimalis* (Teleostei: Centropomidae). J. Morphol., v. 243, p. 265-281, 2000.

Guimarães, A.C.D., Quagio-Grassiotto, I. Ultrastructural aspects of oogenesis and oocyte primary growth in *Serrasalmus spilopleura* (Teleostei, Characiformes, Characidae). Tissue Cell, v.33, p.241 - 248, 2001.

Guimarães, A.C.D., Quagio-Grassiotto, I. The ultrastructural aspects of vitellogenesis or oocyte secondary growth in *Serrasalmus spilopleura* (Teleostei, Characiformes, Serrasalminae) J. Submicrosc. Cytol. Pathol., v.34, p.199 - 206, 2002.

Guimarães, A.C.D., Quagio-Grassiotto, I. Development and activity of the membranous organelles and of the endomembranous system during the oocyte primary growth of *Serrasalmus spilopleura* (Teleostei, Characiformes, Characidae). Submetido.

Guraya, S.S. The cell and molecular biology of fish oogenesis. Monographs in Development Biology. Karger, New York, v. 18, p223, 1986.

Hasilik, A. The early processing of lysosomal enzymes: proteolysis and compartmentation. Experimentia, v. 8, p. 130-151, 1992.

Hart, N., Pontier, P. Acid fosfatase in eggs of the zebrafish, *Brachidanio rerio*. Experientia, v. 35, p. 999-1001, 1979.

Hart, N., Wolenski, J.S., Donavan, M.J. Ultrastructural localization of lysosomal enzymes in the egg cortex of *Brachidanio*. J. Exp. Zool., v. 244, p. 17-32, 1987.

Karp, G. Cell and Molecular Biology: Concepts and Experiments. 3^a ed. John Wilwy & Sons, Inc, New York, p785, 2002.

Kessel, R.G., Decker, R.S. Cytodifferentiation in the *Rana pipiens* oocyte. V. Ultrastructural localization of acid phosphatase activity in diplotene oocytes and their associated follicle envelope. J. Microscopie, v. 14, p. 169-182. 1972.

Korfsmeier, K.H. Acid phosphatase in the guinea-pig oocytes. Histochemistry, v. 63, p. 123-127, 1979.

Korfsmeier, K.H. Lysosomal enzymes in oocytes of Mongolian gerbil, *Meriones unguiculatus*. Histochemistry, v. 70, p. 91-93, 1980.

Kobayashi, W., Yamamoto, T.S. Fine structure of the micropylar cells and its change during oocyte maturation in the chum salmon, *Oncarhynchus keta*. J. Morphol., v. 184, p. 263-276, 1985.

Kudo, S. Enzyme-cytochemical observations on the cortical change in the eggs of *Cyprinus carpio* and *Carassius auratus*. Develop. Growth and Differ., v. 20, p. 133-142, 1978.

Lamas, I.R., Godinho, A.L. Reproduction in the piranha *Serrasalmus spilopleura*, a neotropical fish with an usual pattern of sexual maturity. Environ. Biol. Fishes, v. 45, p. 161-168, 1996.

Leão, E.L.M., Leite, R.G., Chaves, P.T.C., Ferraz, E. Aspectos da reprodução, alimentação e parasitofauna de uma espécie rara de piranha, *Serrasalmus altuvei* Ramírez, 1956 (Pisces, Serrasalminae) do baixo rio Negro. Rev. Bras. Biol., v. 51, p. 545-553, 1991.

Locke, M., Huie, P. The mystery unstained Golgi complex cisternae. J. Histochem. Cytochem., v. 31, p. 1019-1032, 1983.

Lodish, H., Berk, A., Zipursky, S.L., Matsudaria, P., Baltimore, D., Darnell, J.E. 2000. Molecular Cell Biology. 4^a ed. Scientific American Books, Inc, New York, p1084.

Makeyeva, A.P., Yemel'Yanova, N.G. Periodization of oogenesis in cyprinids. J. Ichthyol. v. 29, p. 55-67, 1989.

McDonald, K. Osmium ferricyanide fixation improves microfilament preservation and membrane visualization in a variety of animal cell types. J. Ultrastruct. Res., v. 86, p. 107-118, 1984.

Meirelles, M.N.L. Localização de fosfatases. In: Souza, W. ed. Técnicas básicas de microscopia eletrônica aplicadas às ciências biológicas. Sociedade Brasileira de Microscopia, Rio de Janeiro, p. 84-93, 1998.

Nagahama, Y. The functional morphology of teleost gonads. In: Hoar, W.S., Randall, D.J., Donaldson, E.M. eds, Fish Physiology, Academic Press Inc. New York, v. IXA, p. 233-273, 1983.

Ohta, T., Iwamatsu, T., Takama, M., Yoshimoto, Y. Cortical alveolus breakdown in the eggs of the freshwater teleost *Rhodeus ocellatus ocellatus*. Anat. Rec., v. 227, p. 486-496, 1990.

Paiva, M.P. Sobre o controle da pirambeba *Serrasalmus rhombeus* (L. 1766) Lacépède, 1803, no Açude Lima Campos (Icó, Ceará) através da pesca seletiva. Rev. Brasil. Biol., v. 18, p. 251-266, 1958.

Pino, R.M., Pino, L.C., Bankston, P.W. The relationships between the Golgi apparatus, GERL, and lysosomes of the fetal rat liver Kupffer cells examined by ultrastructural phosphatase cytochemistry. J. Histochem. Cytochem., v. 29, p. 1061-1064, 1981.

Raikhel, A.S., Lea, A.O. Internalized proteins directed into accumulative compartments of mosquito oocytes by the specific ligand, vitellogenin. Tissue & Cell, v. 18, p. 559-574, 1986.

Reincke, M., Walther, C. Aspects of turnover and biogenesis of synaptic vesicles at locust neuromuscular junctions as revealed by zinc iodide-osmium tetroxide (ZIO) reacting with intravesicular SH-groups. J. Cell Biol., v. 78, p. 839-855, 1978.

Rizzo, E., Bazzoli, N. Oogenesis, oocyte surface and micropylar apparatus of *Prochilodus affinis* Reinhardt, 1874 (PISCES, Characiformes). Eur. Arch. Biol., v. 104, p. 1-6, 1993.

Rodrigues, J.D., Mota, A., Moraes, M.N., Ferreira, A.E. Curvas de maturação gonadal e crescimento de fêmeas de pirambeba, *Serrasalmus spilopleura* Kner, 1859 (Pisces, Cypriniformes). Bol. Inst. Pesca, v. 5, p. 51-63, 1978.

Rune, G. Histochemical investigation of the folliculogenesis in the ovary of the Mongolian gerbil (*Meriones unguiculatus*). Histochemistry, v. 80, p. 299-306, 1984.

Sangha, G.K. and Guraya, S.S. Histochemical changes in acid and alkaline phosphatase activities in the growing follicles and corpora lutea of the rat ovary. Acta Morphol. Neerl.-Scand., v. 26, p. 43-49. 1989.

Santos, D.C. Vitelogênese e coriogênese em *Diatrea saccharalis* (Lepdoptera: Pyralidae): estudo morfológico e citoquímico. Tese (doutorado), IB, UNESP, Botucatu, SP, p. 151, 2001.

Selman, K., Wallace, R.A. Cellular aspects of oocyte growth in teleosts. Zool. Scien., v. 6, p. 211-231, 1989.

Selman, K., Wallace, R.A., Barr, V. Oogenesis in *Fundulus heteroclitus*. V. The relationship of yolk vesicle and cortical alveoli. J. Exp. Zool., v. 246, p. 42-56, 1988.

Schmidtler, W. Lysosomale enzyme in der oogenese und follikulogenese des meerschweinchens. Histochemistry, v. 70, p. 77-90, 1980.

Sire, M.F., Babin, P.J., Vernier, J.M. Involment of the lisosomal system in yolk protein deposit and degradation during vitellogenesis and embrionic development in trout. J. Exp. Zool., v. 269, p. 69-83, 1994.

Steinert, G., Hanocq, J. Ultrastructural localization of acid phosphatase activity in matured *Xenopus laevis* oocyte. Biol. Cellulaire, v. 34, p. 247-254, 1979.

Teles, M.E.O., Godinho, H.P. Ciclo reprodutivo da pirambeba *Serrasalmus branditii* (Teleostei, Characidae) na Represa de Três Marias, Rio São Francisco. Rev. Bras. Biol., v. 57, p. 177-84, 1997.

Tesoriero, J.V. The distribution and fate of ^3H -glucose and ^3H -galactose in oocytes of *Oryzias latipes*. Cell Tissue Res., v. 209, p. 117-129. 1980.

Tyler, C.R., Sumpter, J.P. Oocyte growth and development in teleosts. Rev. in Fish Biol. And Fisher., v. 6, p. 287-318, 1996.

Ulrich, E. Étude des ultrastructures au cours de l'ovogenèse d'un poisson téléostéen, le Danio *Brachydanio rerio* (Hamilton-Buchanan). J. Microscopie, v. 8, p. 447-478, 1969.

Vazzoler, A.E.A.M., Menezes, N.A. Síntese do conhecimento sobre o comportamento reprodutivo dos Characiformes da América do Sul (Teleostei, Ostariophysi). Rev. Bras. Biol., v. 52, p. 627-640, 1992.

Wallace, R.A. Vitellogenesis and oocyte growth in nonmammalian vertebrates. In: Developmental Biology. Browder, L. W. New York: Plenum Press. v. 1, p. 127-77, 1985.

Wallace, R.A., Selman, K. Cellular and dynamic aspects of oocyte growth in teleosts. Scien. Zool., v. 21 p. 325-343, 1981.

Weaver, T.E., Na, C., Stahlman, M. Biogenesis of lamellar bodies, lysosome-related organelles involved in storage and secretion of pulmonary surfactant. Cell Develop. Biol., v. 13, p. 263-270, 2002.

Weakley, B.S., Webb, P., James, J.L. Cytochemistry of the Golgi apparatus in developing ovarian germ cells of the Syrian hamster. Cell Tissue Res., v. 220, p. 349-372, 1981.

West, G. Methods of assessing ovarian development in fish: a review. Aust. J. Mar. Freshw. Res., v. 41, p. 199-222, 1990.

White, D.L., Mazurkiewicz, J.E., Barnett, R.J. A chemical mechanism for tissue staining by osmium tetroxide-ferricyanide mixtures. J. Histochem. Cytochem., v. 27, p. 1084-1091, 1979.

Yamamoto, M. Electron microscopy of fish development. III. Changes in the ultrastructure of the nucleus and cytoplasm of the oocyte during its development in *Oryzias latipes*. J. Fac. Sci. Univ. Tokio, v. 10, p. 335-346, 1964.

LEGENDAS

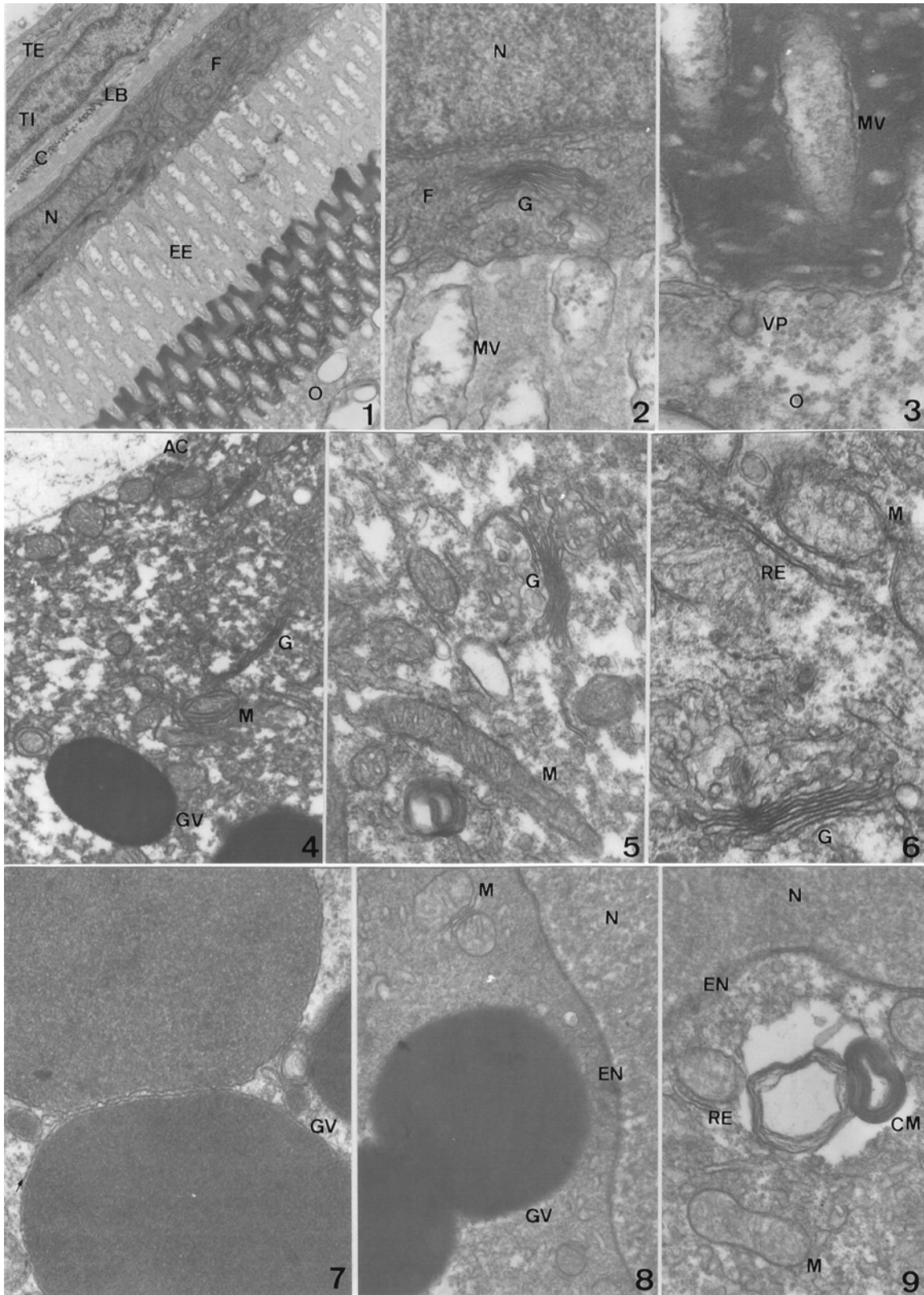
Figura 1 – Região do envoltório folicular de oócito em vitelogênese submetido ao KFe. C: fibras colágenas; EE: envelope oocitário; F: célula folicular; LB: lâmina basal; N: núcleo; O: oócito; TE: teca externa; TI: teca interna x 8500.

Figura 2 – Detalhe da região do envoltório folicular de oócito em vitelogênese submetido ao KFe. F: célula folicular; G: complexo de Golgi; MV: microvilosidade; N: núcleo.x 46000.

Figura 3 – Detalhe da região do envoltório folicular de oócito em vitelogênese submetido ao KFe. MV: microvilosidade; O: oócito; VP: vesícula pinocítica. x 57500.

Figuras 4 a 7 – Região citoplasmática de oócito em vitelogênese submetido ao KFe mostrando organelas membranosas. AC: alvéolo cortical; G: complexo de Golgi; GV: grânulo de vitelo; M: mitocôndria; RE: retículo endoplasmático; seta: membrana do grânulo de vitelo. 4 - x 17200; 5 – x 31500; 6 – x 57500; 7 – x 46000.

Figuras 8 e 9 – Região perinuclear e porção do núcleo de oócito em vitelogênese submetido ao KFe. CM: corpo multilamelar; EN: envoltório nuclear; GV: grânulo de vitelo; M: mitocôndria; RE: retículo endoplasmático; N: núcleo. 8 - x 12300; 9 – x 19800.

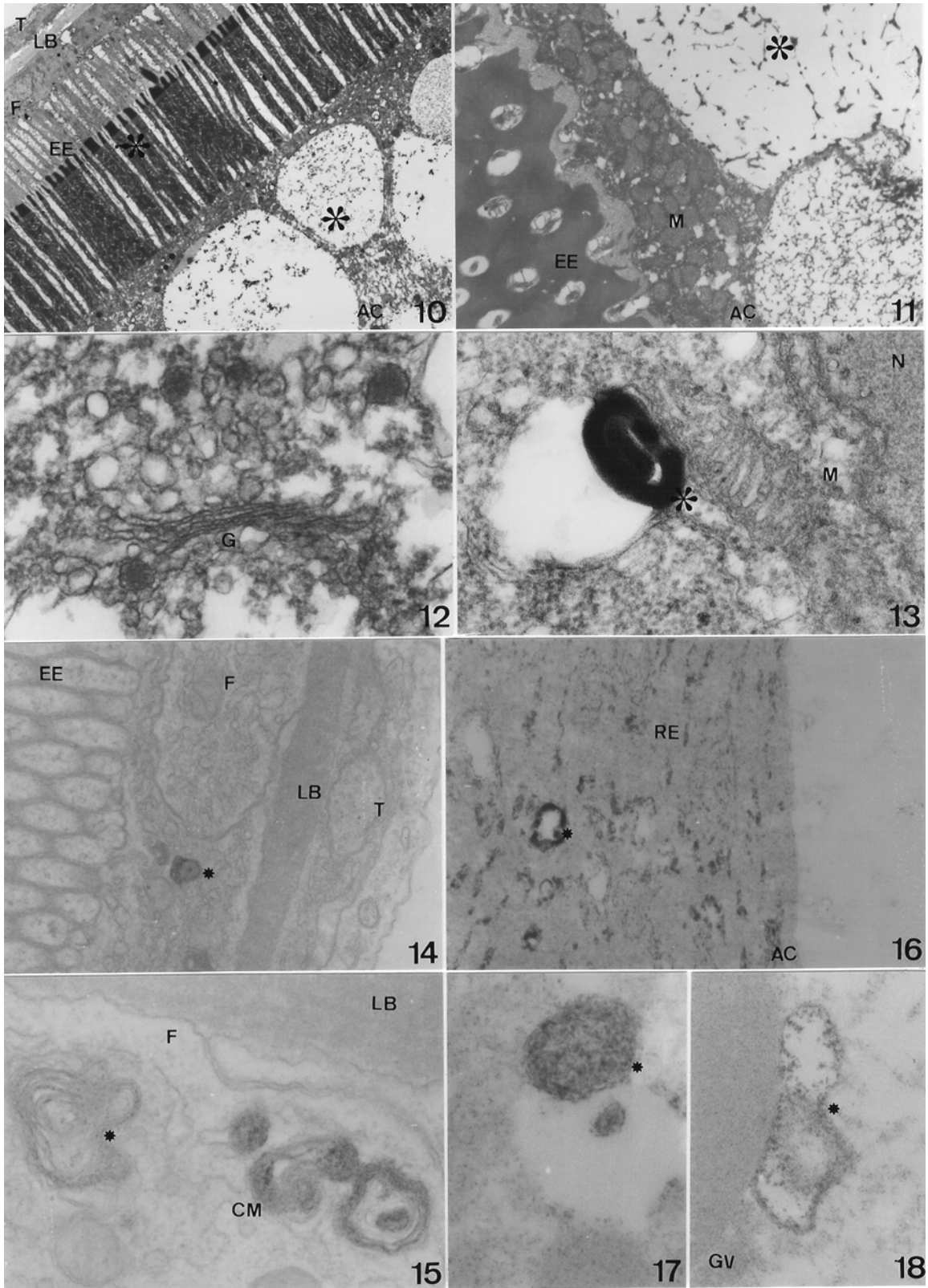


Figuras 10 e 11 – Região do envoltório folicular de oócito em vitelogênese submetido ao ZIO. AC: alvéolo cortical; asterisco: região de resposta ao ZIO; EE: envelope oocitário; F: célula folicular; LB: lâmina basal; M: mitocôndria; T: teca. 10 - x 3200; 11 – x 10200.

Figuras 12 e 13 – Região citoplasmática de oócito em vitelogênese submetido ao ZIO. Asterisco: região de resposta ao ZIO; G: complexo de Golgi; M: mitocôndria; N: núcleo. 12 – x 58800; 13 – x 57500.

Figuras 14 e 15 – Região do envoltório folicular de oócito em vitelogênese submetido ao KI. CM: corpo multilamelar; EE: envelope oocitário; F: célula folicular; mini asterisco: região de resposta ao KI; LB: lâmina basal; T: teca. 14 – x 21000; 15 – x 47200.

Figuras 16 a 18 – Região citoplasmática de oócito em vitelogênese submetido ao KI. AC: alvéolo cortical; GV: grânulo de vitelo; mini asterisco: região de resposta ao KI; RE: retículo endoplasmático. 16 - x 41000; 17 - x 65600; 18 – x 37800.



Figuras 19 e 20 – Região do envoltório folicular de oócito em vitelogênese submetido à AcPase. EE: envelope oocitário; estrela: região de resposta à AcPase; F: célula folicular; MV: microvilosidade; N: núcleo. 19 – x 22500; 20 – x 34500.

Figura 21 – Região citoplasmática periférica de oócito em vitelogênese submetido à AcPase. AC: alvéolo cortical; EE: envelope oocitário; estrela: região de resposta à AcPase. x 32000.

Figuras 22 a 26 – Região citoplasmática de oócito em vitelogênese submetido à AcPase. AC: alvéolo cortical; CM: corpo multilamelar; estrela: região de resposta à AcPase; G: complexo de Golgi; GV: grânulo de vitelo; RE: retículo endoplasmático; VED: vesícula elétron-densa. 22 – x 15900; 23 – x 13200; 24 – x 24000; 25 – x 31500; 26 – x 77500.

Figuras 27 e 28 – Região citoplasmática perinuclear e núcleo de oócito em vitelogênese submetido à AcPase. CM: corpo multilamelar; EN: envoltório nuclear; estrela: região de resposta à AcPase; N: núcleo; NU: nucléolo; RE: retículo endoplasmático. 27 – x 31500; 28 – x 13200.

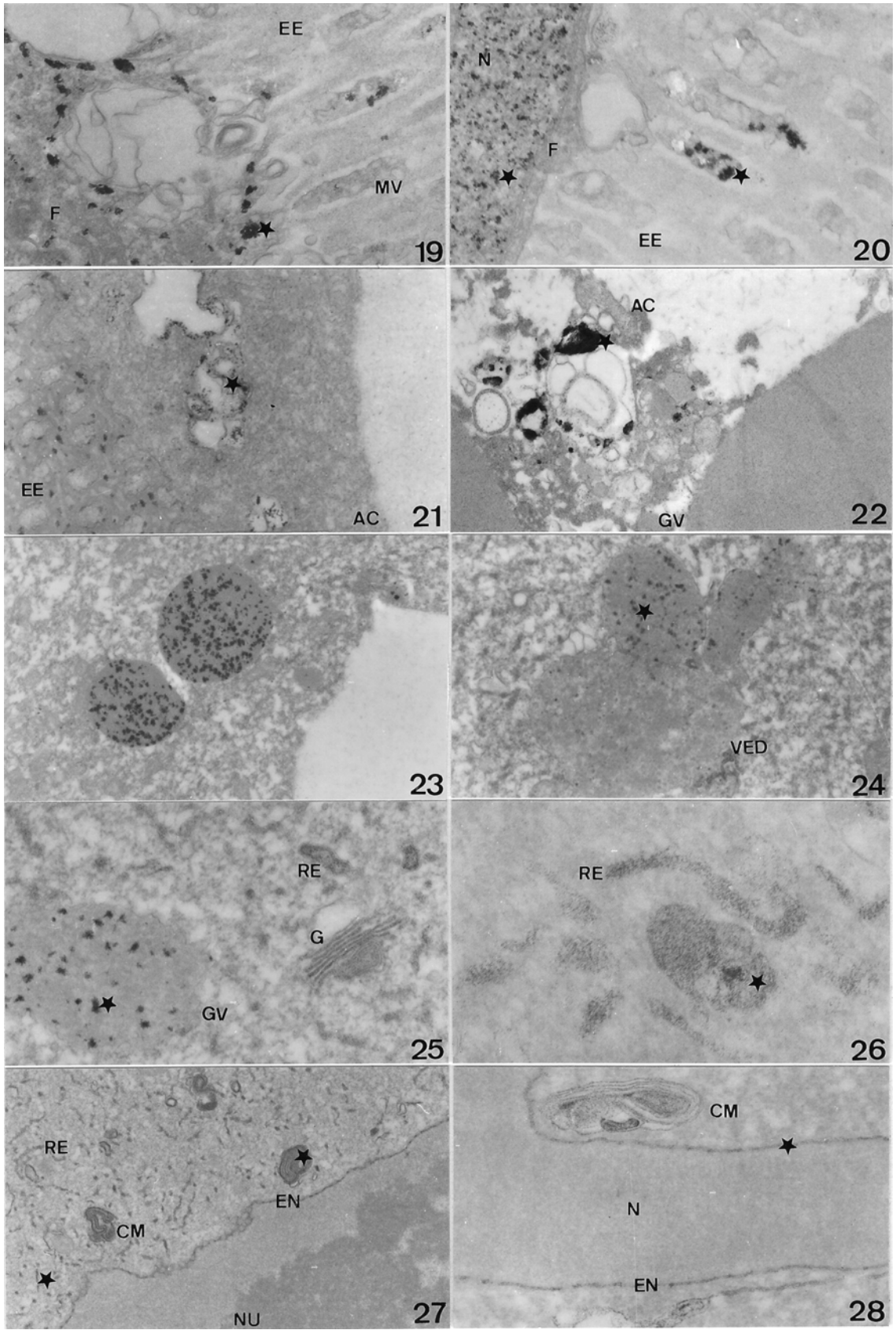
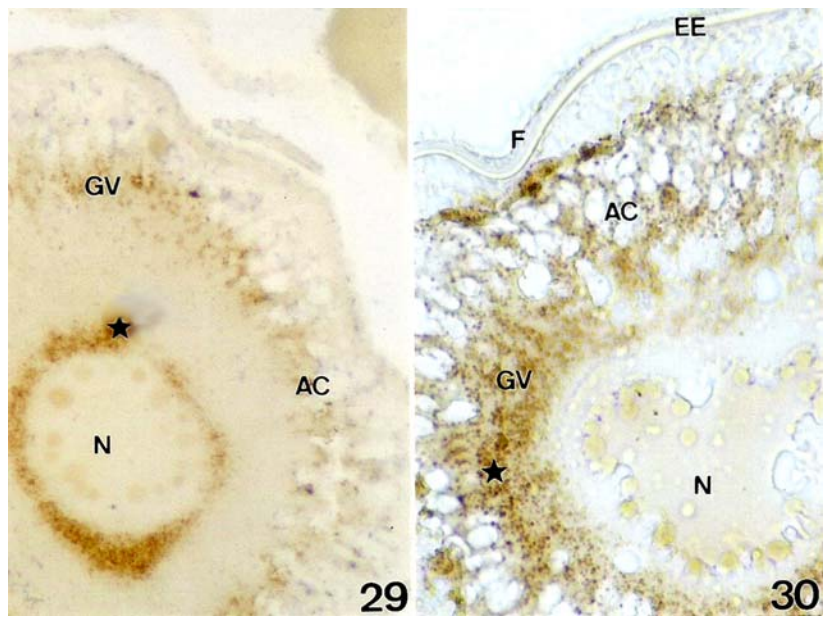


Figura 29– Região de oócito em vitelogênese inicial submetido à AcPase. AC: alvéolo cortical; GV: grânulo de vitelo; estrela: região de resposta à AcPase; N: núcleo. x 400.

Figura 30 – Região de oócito em vitelogênese submetido à AcPase. AC: alvéolo cortical; EE: envelope oocitário; F: célula folicular; GV: grânulo de vitelo; estrela: região de resposta à AcPase; N: núcleo. x 200.



6.3

Citoquímica, estrutural e ultra-estrutural, do desenvolvimento oocitário de *Serrasalmus spilopleura* (Teleostei, Characiformes, Characidae).

A. C. D. Guimarães^{a,b} and I. Quagio-Grassiotto^a

^aDepto. de Morfologia, IB, Unesp, Botucatu, SP, Brasil – CP 510, CEP 18618-000

(e-mail: grassiotto@laser.com.br)

^bDepto. de Biologia Celular, IB, Unicamp.

Palavras-chave: citoquímica, estrutura, ultra-estrutura, oócito, *Serrasalmus spilopleura*.

RESUMO

As modificações morfo-fisiológicas decorrentes dos crescimentos primário e secundário dos oócitos foram acompanhadas nos folículos ovarianos de *Serrasalmus spilopleura* através da utilização de técnicas citoquímicas estruturais e ultra-estruturais. Diferentes estruturas celulares presentes nos oócitos e nas camadas que os envolvem, respondem positivamente às técnicas de detecção de polissacarídeos ácidos – método do vermelho de rutênio (VR), detecção de proteínas básicas – técnica da prata amoniacal (AgA), detecção de lipídios – método ósmio-imidazol (Im) e detecção de ribonucleoproteínas – método de Bernhard ou EDTA. Durante o crescimento primário, as células foliculares mostram corpos densos sob ação do Im e a substância amorfa do envelope oocitário é positiva ao VR; no citoplasma dos oócitos, corpos positivos ao Im estão associados aos grupamentos mitocondriais e ao retículo endoplasmático, grande quantidade de ribossomos é evidenciada pelo EDTA e o corpúsculo de Balbiani responde à AgA. Durante o crescimento secundário, no envelope oocitário a substância amorfa é positiva à AgA e as microvilosidades respondem ao Im e ao VR; no citoplasma dos oócitos depósitos lipídicos esparsos respondem ao Im, os alvéolos corticais são positivos ao VR, ao Im e à AgA, enquanto os grânulos de vitelo reagem à AgA. As respostas às técnicas utilizadas são discutidas em relação à biologia dos oócitos.

INTRODUÇÃO

A gametogênese feminina nos peixes teleósteos compreende a oogênese, ou formação dos oócitos primários iniciais a partir das oogônias, os crescimentos primário e secundário, a maturação final e culmina com a ovulação (Grier, 2000).

Na oogênese, as oogônias individuais presentes no epitélio germinativo das lamelas ovígeras, dividem-se várias vezes por mitose. Formam um conjunto ou ninho de células que entram em meiose dando origem aos oócitos que estacionam no estágio de diplóteno da primeira prófase da meiose (Grier, 2000).

Conforme a meiose avança, as células epiteliais associam-se com os oócitos, esses complexos de células epiteliais e oócitos submergem para debaixo da superfície do epitélio germinativo e as células epiteliais tornam-se células pré-foliculares. Durante a foliculogênese, a membrana basal é sintetizada ao redor do folículo em formação. O folículo é completamente separado do epitélio germinativo pela membrana basal (Grier, 2000). É em diplóteno, portanto que os oócitos primários deixam os ninhos acompanhados pelas células foliculares que os envolvem (de Vlaming, 1983; Wallace & Selman, 1981; Selman & Wallace, 1989; Bazzoli & Rizzo, 1990; West, 1990; Grier, 2000). Conforme o folículo desenvolve, células do conjuntivo dispõem-se ao seu redor, dando origem ao complexo folicular. Esse último é constituído pelo oócito envolto pelo epitélio folicular apoiado na lâmina basal e por duas camadas de células da teca (Grier, 2000).

Constituídos os complexos foliculares, os oócitos entram em crescimento primário e aumentam drasticamente em volume (Wallace & Selman, 1981; Nagahama, 1983; Selman & Wallace, 1989; West, 1990; Bazzoli & Rizzo, 1990; Rizzo & Bazzoli, 1993). Nesse período a síntese de RNA é intensa e múltiplos nucléolos surgem no núcleo (Guraya, 1986; Tyler & Sumpter, 1996). O RNA associa-se a proteínas (Alberts *et al.*, 2002), é transferido para o citoplasma onde se acumula (Guraya, 1986; Mazabrand *et al.*, 1975; Wallace & Selman, 1990), formando as nuages (Edy, 1975; Clérot, 1976; Toury *et al.*, 1977).

Nos oócitos pré-vitelogênicos, o corpúsculo de Balbiani, um conjunto de organelas membranosas, surge próximo ao núcleo, essas organelas proliferam e se dispersam. No final do crescimento primário, se distribuem no citoplasma

periférico (Hubbard, 1894 *apud* Selman & Wallace, 1989). O corpúsculo de Balbiani parece assim, estar relacionado com a biogênese de organelas membranosas (Tyler & Sumpter, 1996).

O crescimento secundário dos oócitos, ou fase de crescimento gonadotrofina-dependente (Wallace & Selman, 1981; Nagahama, 1983; de Vlaming, 1983; Guraya, 1986) tem início com o aparecimento dos precursores dos alvéolos corticais (Wallace & Selman, 1981; de Vlaming, 1983; Nagahama, 1983; Guraya, 1986; Selman & Wallace, 1989; Makeyeva & Yemel'yanova, 1989; West, 1990; Bazzoli & Rizzo, 1990; Rizzo & Bazzoli, 1993; Tyler & Sumpter, 1996), estruturas esféricas de membrana única (Yamamoto, 1964; Selman *et al.*, 1988; Begovac & Wallace, 1988) e conteúdo fibroso (Yamamoto, 1964) ou flocado (Anderson, 1968). A síntese do conteúdo dos alvéolos corticais, que responde à colorações específicas para proteínas e carboidratos (Wallace & Selman, 1981; Nagahama, 1983; de Vlaming, 1983; Selman & Wallace, 1989; West, 1990; Tyler & Sumpter, 1996), parece ser endógena e organelas como retículo endoplasmático e complexo de Golgi podem estar envolvidas (Anderson, 1968; Tesoriero, 1980; Wallace & Selman, 1981; Nagahama, 1983; de Vlaming, 1983; Selman & Wallace, 1989; Tyler & Sumpter, 1996). Os alvéolos corticais são deslocados gradualmente para o citoplasma periférico, o espaço perivitelínico (Wallace & Selman, 1981; Kobayashi & Yamamoto, 1985; Selman *et al.*, 1988; Selman & Wallace, 1989; West, 1990). Essa localização permite que, durante o processo de fertilização, seu conteúdo seja liberado, atuando no processo de endurecimento do envelope oocitário (Tyler & Sumpter, 1996) e prevenindo a poliespermia (Ohta *et al.*, 1990; Tyler & Sumpter, 1996).

Durante o crescimento secundário os oócitos sofrem novo aumento de volume devido ao acúmulo de vitelo (Wallace & Selman, 1981; Nagahama, 1983; de Vlaming, 1983; Selman & Wallace, 1989; West, 1990; Tyler & Sumpter, 1996), relacionado à pinocitose mediada por receptores de proteínas extra-ovarianas, sintetizadas e secretadas pelo fígado, que são processadas e embaladas no sistema de endomembranas dos oócitos (Wallace, 1985; Tyler & Sumpter, 1996). O acúmulo de vitelo ocorre em grânulos, que são estruturas esféricas, elétrôn-

densas ao MET, limitadas por membrana resultantes da fusão de vesículas cobertas menores, que aparecem inicialmente no citoplasma periférico (Yamamoto, 1964; Droller & Roth, 1966; Anderson, 1968; Ulrich, 1969; Begovac & Wallace, 1988). A formação do vitelo nos teleósteos é tida como heterossintética (exógena) (de Vlaming, 1983; Selman & Wallace, 1989; Tyler & Sumpter, 1996). No entanto, uma contribuição autossintética (endógena) tem sido considerada (Anderson, 1968; Nagahama, 1983).

Característicos desses oócitos são ainda: o núcleo de contorno irregular, com reentrâncias e saliências nas quais localizam-se os nucléolos (Yamamoto, 1964; Anderson, 1968, Lopes *et al.*, 1987; Bazzoli & Rizzo, 1990); a inclusão de corpos lipídicos (Tyler & Sumpter, 1996), e a formação do envelope vitelínico propriamente dito (Yamamoto, 1963; Droller & Roth, 1966; Anderson, 1967, 1968; Hirose, 1972; Wourms, 1976; Tesoriero, 1977; Laale, 1980; Lopes *et al.*, 1982, 1987; Cotelli *et al.*, 1988; Begovac & Wallace, 1988; Cruz-Landim & Cruz-Höfling, 1989; Makeyeva & Yemel'yanova, 1989; West, 1990; Rizzo & Bazzoli, 1993).

O período do desenvolvimento em que ocorrem a síntese e o processamento das diferentes substâncias químicas, características dos oócitos, bem como sua natureza e localização, podem ser traçados através de análises citoquímicas estruturais e ultra-estruturais. Assim, o uso de técnicas que contrastam ribonucleoproteínas (Bernhard, 1969), lipídios (Angermüller & Fahimi, 1982) e proteínas básicas (MacRae & Meetz, 1970) podem ser úteis para detecção e acompanhamento da dinâmica de deposição e utilização dessas substâncias pelos oócitos. Já a contrastação dos glicoconjugados ácidos (Luft, 1971) pode vir a ser um auxiliar interessante no estudo dos alvéolos corticais.

Dentre os Characiformes da família Characidae, a subfamília Serrasalminae congrega as piranhas verdadeiras, mais agressivas, e as pirambebas, peixes menos agressivos, como *Serrasalmus spilopleura* (Braga, 1976). Os Serrasalminae são não migradores, de período reprodutivo longo e coincidente com o período chuvoso (Rodrigues *et al.*, 1978; Leão *et al.*, 1991; Vazzoler & Menezes, 1992). Os *Serrasalmus* spp adaptam-se bem aos ambientes lênticos, e são comuns nos reservatórios brasileiros onde apresentam reprodução contínua,

não sazonal e desenvolvimento oocitário assincrônico com desovas em múltiplas parcelas (Paiva, 1958; Braga, 1976; Lamas & Godinho, 1996; Teles & Godinho, 1997; Fujihara, 1997). Tais peculiaridades da biologia reprodutiva desse animal o tornam um modelo biológico em potencial para os estudos sobre a morfofisiologia das gônadas.

Os vários estudos existentes, sobre a natureza química dos diferentes componentes oocitário dos Teleostei têm por base análises à microscopia fotônica (Gomes *et al.*, 1979; Hart & Pontier, 1979, Bazzoli & Rizzo, 1990; Neves *et al.*, 1995; Guimarães & Quagio-Grassiotto, 1995a, b, 1996; 1997; Guimarães *et al.*, 1995, 1997), permanecendo pouco conhecidas a sua dinâmica de deposição e caracterização ultraestrutural (Busson-Mabillot, 1984; Begovac & Wallace, 1988; Sire *et al.*, 1994). Assim, visando a ampliação desses conhecimentos, nesse grupo de animais, técnicas citoquímicas estruturais e ultraestruturais para diferentes substâncias químicas foram aplicadas aos oócitos de *S. spilopleura*, em diferentes momentos do desenvolvimento.

MATERIAL E MÉTODOS

Fêmeas adultas de *S. spilopleura* foram coletadas mensalmente na Represa de Jurumirim, Alto do Rio Paranapanema (23°31'10"S-48°42'35"W), São Paulo, Brasil, de Março de 2000 a Dezembro de 2003. Os espécimes foram anestesiados por imersão em solução aquosa de benzocaína, na concentração de 1µg/ml, tiveram seus ovários retirados, cortados em pequenos fragmentos e submetidos a diferentes técnicas citoquímicas estruturais e ultra-estruturais.

Detecção de Ribonucleoproteínas - EDTA ou método de Bernhard (Bernhard, 1969)

Os fragmentos de ovário foram fixados "overnight" em glutaraldeído 2.5% e paraformaldeído 4% em tampão fosfato Sorensen 0,1M; pH 7,3. Após a fixação os fragmentos foram lavados no mesmo tampão, desidratados em série crescente de acetona e incluídos em Araldite. Os cortes ultra-finos foram contrastados em solução aquosa de acetato de uranila 0,5%, por 1 minuto; imersos em solução de

EDTA a 0,2M em água destilada por 15 minutos e pós-contrastados em citrato de chumbo por 1 minuto.

Detecção de Polissacarídios Ácidos – Método do Vermelho de Rutênio (VR) (Luft, 1971)

Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)

Os fragmentos de ovário foram fixados “overnight” em glutaraldeído 2,5% em tampão cacodilato de sódio 0,1M, pH 7.2, contendo 5mg/ml de vermelho de rutênio. Após a fixação os fragmentos foram lavados no mesmo tampão por duas vezes de 10 minutos, pós-fixados em tetróxido de ósmio a 1% no mesmo tampão por duas horas no escuro. Novamente foram lavados no mesmo tampão por duas vezes de 10 minutos. Seguiu-se então a desidratação em série crescente de acetona e a inclusão em Araldite. Os cortes ultra-finos foram observados sem pós-contrastação.

Microscopia Fotônica (MF)

Os fragmentos de ovário foram fixados “overnight” em glutaraldeído 2,5% em tampão cacodilato de sódio 0,1M, pH 7.2, contendo 5mg/ml de vermelho de rutênio. Após a fixação os fragmentos foram lavados no mesmo tampão por duas vezes de 10 minutos. Seguiu-se então a rotina para inclusão em historesina. As lâminas foram observadas em microscópio fotônico.

Detecção de Proteínas Básicas – Técnica da Prata Amoniacal (AgA) (MacRae & Meetz, 1970).

Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)

Os fragmentos de ovário foram fixados “overnight” em glutaraldeído 2.5% em tampão fosfato Sorensen 0,1M; pH 7,3. Após a fixação os fragmentos foram lavados várias vezes em água destilada, incubados à temperatura ambiente na solução de prata amoniacal (MacRae & Meltz, 1970) preparada imediatamente antes de usar, durante 5 minutos; foram lavados por três vezes em água destilada e incubados em solução de formaldeído 3% durante 5 minutos. Foram novamente

lavados em água destilada, pós-fixados em tetróxido de ósmio a 1% em tampão fosfato Sorensen 0,1M; pH 7,3 por duas horas no escuro, lavados por várias vezes no mesmo tampão, contrastados em bloco com uranila 2% em solução aquosa por duas horas. Seguiu-se então a desidratação em série crescente de acetona e a inclusão em Araldite. Os cortes ultra-finos foram pós-contrastados em solução saturada de acetato de uranila em álcool 50% e citrato de chumbo.

Microscopia Fotônica (MF)

Os fragmentos de ovário foram fixados “overnight” em glutaraldeído 2.5% em tampão fosfato Sorensen 0,1M; pH 7,3. Após a fixação os fragmentos foram lavados no mesmo tampão, seguindo-se então a rotina para inclusão em historesina. Os cortes de ovários em historesina foram incubados em banho maria na solução de prata amoniacal até que obtivessem uma coloração amarelada (30” a 2’). As lâminas foram observadas em microscópio fotônico.

Detecção de Lipídios – método Ósmio-Imidazol (Im) (Angermüller & Fahimi, 1982)

Os fragmentos de ovário foram fixados “overnight” em glutaraldeído 2.5% em tampão fosfato Sorensen 0,1M; pH 7.2. Após a fixação os fragmentos foram lavados no mesmo tampão por duas vezes de 10 minutos, pós-fixados em tetróxido de ósmio 2% em tampão imidazol 0,1M, pH 7.5 (solução estoque: OsO₄ 4% em água; tampão imidazol 0,2M, pH 7.5), por 30 minutos, a temperatura ambiente e no escuro. Novamente foram lavados em tampão imidazol 0,1M, pH 7.5 por duas vezes de 10 minutos. Seguiu-se então a desidratação em série crescente de acetona e a inclusão em Araldite. Os cortes ultra-finos foram pós-contrastados em citrato de chumbo por 1 minuto.

RESULTADOS

Nos folículos ovarianos de *S. spilopleura*, diferentes estruturas celulares presentes nos oócitos em crescimento primário e secundário e nas camadas que os envolvem, respondem positivamente às técnicas estruturais e ultraestruturais para detecção de polissacarídeos ácidos – método do vermelho de rutênio (VR),

detecção de proteínas básicas – técnica da prata amoniacal (AgA), detecção de lipídios – método ósmio-imidazol (Im) e detecção de ribonucleoproteínas – método de Bernhard ou EDTA.

Crescimento Primário

Células foliculares

À microscopia eletrônica de transmissão (MET), durante o crescimento primário, as células foliculares apresentam pequenos corpos densos positivos ao Im, possivelmente lipídios ou lipoproteínas associadas ao retículo endoplasmático, e uma estrutura volumosa, não homogênea e fortemente elétron-densa na região apical da célula, próximo ao oolema, aparentemente um aglomerado de moléculas lipídicas (Fig. 4). A resposta positiva à técnica do VR é detectada em corpos multilamelares (altamente elétron-densos) nas células foliculares (Fig. 7).

Envelope oocitário

Na microscopia fotônica (MF) o envelope oocitário apresenta reação positiva ao VR, indicando a presença de polissacarídeos ácidos no início da formação dessa estrutura (Fig. 33). Conforme o oócito se desenvolve, a marcação ao VR em MET, em forma de depósitos elétron-densos, está presente ao redor dos microvilos que começam a se formar na superfície oocitária e na região apical das células foliculares (Figs. 8 e 9).

Oócitos

Nos oócitos pré-vitelogênicos, aos grupamentos mitocondriais espalhados pelo citoplasma, tanto na região citoplasmática periférica (Fig. 3) quanto nas regiões mais internas, inclusive próximos ao núcleo, estão associados depósitos elétron-densos, prováveis corpos lipídicos, positivos ao Im (Figs. 1 e 2). Esses corpos também são detectados junto à cisternas do retículo endoplasmático. Além disto, as membranas mitocondriais e do retículo endoplasmático se mostram intensamente contrastadas pelo Im (Figs. 1 a 3). Ainda, próximo à mitocôndrias,

nos oócitos submetidos ao VR na MET, corpos multivesiculares e possíveis corpos multilamelares em formação apresentam-se marcados (Figs. 5 e 6). Quando submetidos ao EDTA, a grande quantidade de ribossomos no citoplasma é evidenciada (Fig. 27), além de algumas áreas elétron-densas no citoplasma perinuclear (Fig. 28).

À MF os oócitos apresentam, em resposta à AgA, uma reação fraca, de tom amarelado, na região do corpúsculo de Balbiani. Ultra-estruturalmente, a reação à AgA aparece como partículas elétron-densas em organelas celulares, como mitocôndrias, corpos multilamelares e complexo de Golgi (Figs. 10 a 13).

No núcleo desses oócitos, em resposta à AgA em MF, surgem marcações pontuais espalhadas ao acaso no nucleoplasma e os múltiplos nucléolos assumem um tom marrom (Fig. 36). Quando submetidos ao EDTA, áreas elétron-densas são encontradas no nucleoplasma junto ao envoltório nuclear, enquanto os nucléolos aparecem elétron-densos com áreas elétron-lúcidas (Figs. 26 e 28).

Crescimento Secundário

Células foliculares

Durante o crescimento secundário as células foliculares, quando submetidas ao VR em MF tornam-se avermelhadas (Fig. 35), enquanto na MET essas mesmas células apresentam corpos multilamelares também marcados pelo VR (Fig. 22).

Envelope oocitário

O envelope oocitário, agora quase totalmente formado, não responde ao VR seja na MF ou na MET, e a marcação em forma de depósitos elétron-densos é encontrada no interior das microvilosidades, ao longo das três camadas que o formam (Figs. 22 a 24). As microvilosidades também apresentam regiões marcadas pelo Im, como depósitos elétron-densos aderidos à membrana (Fig. 15). À AgA em MF, o envelope oocitário apresenta resposta positiva em tom marrom na camada mais interna, desde o início de sua formação até posterior espessamento (Fig. 37 e 38). Na MET, nessa mesma região, são observadas

marcações pontuais, altamente elétron-densas, ao redor das microvilosidades (Fig. 18).

Oócitos

Nos oócitos, em crescimento secundário, os alvéolos corticais, em resposta ao VR, mostram um conteúdo avermelhado à MF (Figs. 34 e 35) e elétron-denso filamentosos à MET (Figs. 24 e 25). Ao Im e ao EDTA marcações pontuais elétron-densas são encontradas no interior destas estruturas (Fig. 14 e 16, 29 e 30). Quando submetidos à AgA em MF, a maior parte dos alvéolos corticais assume um tom marrom (Fig. 37), e no decorrer da vitelogênese mudam de tonalidade, tornando-se mais amarelados (Fig. 38). À MET a maioria dos alvéolos corticais responde à AgA com marcações pontuais, altamente elétron-densas, que se dispõem em forma de cordão (Fig. 18, 19 e 21).

Na região citoplasmática periférica, próxima à oolema, em MET algumas vesículas com membrana elétron-densa e conteúdo elétron-lucente respondem ao VR (Fig. 24). Espalhados pelo citoplasma, alguns poucos depósitos elétron-densos, possíveis corpos lipídicos são marcados em resposta ao Im. Esses corpos são homogêneos ou mostram um halo mais denso, ao redor de uma região interna menos elétron-densa (Figs. 16 e 17). Ao EDTA, no citoplasma dos oócitos em vitelogênese, os ribossomos livres ou associados ao retículo endoplasmático tornam-se altamente elétron-densos (Fig. 30 a 32).

Nos oócitos submetidos à AgA, quando observados em MF, os grânulos de vitelo em formação, presentes ao redor do núcleo tomam tons que variam do amarelo predominante ao marrom (Fig. 37). Ao longo da vitelogênese, os grânulos de vitelo em tons variados (amarelo/marrom) vão se espalhando por todo o citoplasma (Fig. 38). Em MET a resposta desses grânulos à AgA é constante, e ocorre na forma de pontos altamente elétron-densos (Figs. 19 e 20).

No núcleo desses oócitos, submetidos à AgA em MF, os nucléolos mostram uma marcação heterogênea, com granulações de tom marrom e regiões de tom amarelado (Fig. 37 e 38).

DISCUSSÃO

As técnicas citoquímicas estruturais e ultra-estruturais aplicadas aos oócitos de *S. spilopleura* em desenvolvimento primário e secundário obedecem a diferentes princípios de ação e prestam a diferentes finalidades.

Lipídios e sua resposta ao Ósmio-Imidazol

Desenvolvido para a observação de lipídios em microscopia eletrônica de transmissão, o método do ósmio-imidazol (Angermüller & Fahimi, 1982) tem por base a afinidade do tetróxido de ósmio por lipídios insaturados. A sua utilização em combinação com o imidazol intensifica a reação, formando depósitos altamente elétron-densos em sítios que contenham principalmente lipídios insaturados (Angermüller & Fahimi, 1982).

Durante o crescimento primário, as células foliculares de *S. spilopleura* apresentam pequenos corpos densos positivos ao Im no interior do retículo endoplasmático. Tratadas por essa mesma técnica ou por variações dela, células do fígado e do rim de roedores mostram o mesmo tipo de estrutura (Angermüller & Fahimi, 1982; Thiéry *et al.*, 1995). Nesses tipos celulares, dadas as suas características funcionais (Lodish *et al.*, 2000; Karp, 2002; Alberts *et al.*, 2002, Cooper & Hausman, 2003) os pequenos corpos densos no interior do retículo endoplasmático, foram interpretados como sendo lipoproteínas de muito baixa densidade (VLDL) (Angermüller & Fahimi, 1982; Thiéry *et al.*, 1995). Às células foliculares de *S. spilopleura*, por similaridade de resposta ao Im, poder-se-ia atribuir uma síntese discreta de lipoproteínas. Sugerido pelos grandes corpos densos apicais, positivos ao Im, é possível ainda que esse produto seja reunido e o seu conteúdo liberado pela célula, podendo eventualmente ser capturado pelo oócito.

Nos oócitos pré-vitelogênicos de *S. spilopleura*, as membranas das mitocôndrias e do retículo endoplasmático contrastam fortemente pelo Im e, corpos densos positivos ao Im, estão presentes nos grupamentos mitocondriais pressupondo a sua utilização como fonte de energia nesse tipo celular. A forte contrastação das organelas membranosas dos oócitos, mais uma vez não difere

dos resultados de Angermüller e Fahimi (1982) e de Thiéry e colaboradores (1995). Um alto teor de lipídios insaturados pode responder por esse efeito.

Durante o crescimento secundário, em resposta ao Im, no envelope oocitário de *S. spilopleura*, as microvilosidades apresentam depósitos elétron-densos aderidos à membrana. Considerando serem os lipídios de reserva exógenos, a presença de substância densa, em resposta ao Im, próxima à face externa do oolema, na região periférica do oócito e na região das microvilosidades coincide com o seu provável trajeto e processo de captura pelo oócito.

No citoplasma dos oócitos de *S. spilopleura*, os corpos lipídicos marcados em resposta ao Im, são raros e esparsos. Nas células do fígado dos roedores o lipídio insaturado apresenta-se altamente elétron-denso, podendo ou não conter o centro (core) mais claro, formado por lipoproteínas e fosfolipídios (Angermüller & Fahimi, 1982). Essas características se repetem em *S. spilopleura* indicando que os lipídios de reserva, além de serem escassos, podem estar associados a outras moléculas como proteínas e lipídios formando lipoproteínas e fosfolipídios.

A baixa quantidade de lipídios, detectada nos oócitos de *S. spilopleura*, não é incomum entre os Teleostei (Tyler & Sumpter, 1996). Concorde com a característica não flutuante dos ovos dos Serrasalminae (Bracker, 1963), já que a presença de lipídios em grande quantidade tem sido relacionada com a flutuabilidade dos ovos nas espécies marinhas de peixe (Craig & Harvey, 1987).

Polissacarídeos ácidos e sua resposta ao VR

O vermelho de rutênio é um componente inorgânico policatiônico que apresenta capacidade de interação com diferentes tipos de polissacarídeos ácidos (Luft, 1971; Crivelatto *et al.*, 1990). Devido ao seu grande tamanho molecular, tem baixa penetração e difícil acesso às estruturas citoplasmáticas, sendo por isto utilizado como marcador de superfície (Luft, 1971). Ainda sugere-se a afinidade desse corante por fosfolipídios (Luft, 1971).

O envelope oocitário de *S. spilopleura*, durante o crescimento primário, apresenta reação positiva ao VR, indicando a presença de polissacarídeos ácidos. A presença de polissacarídeos nessa estrutura, de caráter ácido ou não, geralmente formando glicoproteínas, tem sido detectada tanto nos teleósteos

(Kudo, 1982; Tesoriero, 1980), quanto em outros grupos animais (Favard & Sèrèno-Favard, 1968). Mesmo sendo uma ocorrência comum nas várias ordens animais, nos oócitos de *S. spilopleura* os polissacarídeos ácidos parecem estar envolvidos apenas com as etapas iniciais da formação do envelope oocitário.

Durante o crescimento secundário, as células foliculares em *S. spilopleura*, quando submetidas ao VR em MET, apresentam corpos multilamelares marcados. Tal resposta poderia ser justificada pela sugerida afinidade desse corante por fosfolipídios (Luft, 1971). Entretanto, a presença de corpos multilamelares é comum nos oócitos e nas células foliculares de *S. spilopleura* durante todo o desenvolvimento oocitário, e essas estruturas são positivas a diferentes técnicas, como detecção de fosfatase ácida e de ambientes redutores (Guimarães & Quagio-Grassiotto, submetido), e à AgA (presente trabalho). Tais estruturas, lisossomos muito possivelmente decorrentes de processos autofágicos, devem responder pela intensa reciclagem de organelas e outros componentes citoplasmáticos, necessários e decorrentes da alta atividade metabólica desses tipos celulares. Em *S. spilopleura* a reatividade dos corpos lamelares ao VR poderia, ainda, ser atribuída a restos celulares contendo polissacarídeos ácidos.

No envelope oocitário dos oócitos em vitelogênese de *S. spilopleura*, a marcação em forma de depósitos elétron-densos, que é encontrada no interior das microvilosidades em resposta ao VR, chama a atenção. As estruturas, microvilosidades e microvesículas, marcadas pelo VR nos oócitos de *S. spilopleura* poderiam estar envolvidas com a liberação de polissacarídeos na superfície celular. Porém, como a substância amorfa do envelope oocitário não responde ao VR, a marcação detectada pode ser resultado de estruturas de captura, por exemplo, microvesículas pinocíticas, contendo substâncias a serem utilizadas na formação de diferentes componentes oocitários.

A presença de grande quantidade de polissacarídeos ácidos nos alvéolos corticais dos oócitos de *S. spilopleura* é revelada pela sua resposta à MF ao AT, pH 2,5 (Guimarães & Quagio-Grassiotto, 1995b) e ao VR tanto à MF como MET (presente trabalho). Os alvéolos corticais em diferentes espécies de Teleostei respondem a colorações específicas para proteínas e carboidratos (Tesoriero,

1980; Selman *et al.*, 1988; Bazzoli & Godinho, 1994; Bazzoli *et al.*, 1996). Glicoproteínas de natureza química variada têm sido detectadas nos alvéolos corticais de diferentes espécies de Teleostei neotropicais (Bazzoli *et al.*, 1996), entretanto, aquelas de natureza ácida estão restritas a apenas algumas espécies, incluindo o gênero *Serrasalmus* (Bazzoli & Godinho, 1994; Bazzoli *et al.*, 1996, presente trabalho). As variações químicas no conteúdo dos alvéolos corticais de peixes teleósteos podem indicar desempenho de funções espécie-específicas no processo de fertilização (Verma & Thakur, 1988).

RNAs, RIBONUCLEOPROTEÍNAS E SUA RESPOSTA AO EDTA

O método do EDTA funciona como uma coloração regressiva, já que o EDTA age removendo a uranila ligada ao DNA, fazendo com que todas as desoxirribonucleoproteínas percam sua capacidade de contrastação pelo chumbo e as ribonucleoproteínas sejam contrastadas pelo mesmo (Bernhard, 1969).

À MF, uma característica dos oócitos pré-vitelogênicos dos Teleostei é a sua intensa basofilia citoplasmática em resposta a corantes como o AT e a Hematoxilina (Gomes *et al.*, 1979; Bazzoli & Rizzo, 1990; Neves *et al.*, 1995; Guimarães & Quagio-Grassiotto, 1995a, b; 1996; 1997; Guimarães *et al.*, 1995; 1997). A resposta dos oócitos pré-vitelogênicos de *S. spilopleura* ao EDTA em MET, mostrando uma grande quantidade de ribossomos no citoplasma e áreas elétron-densas no citoplasma perinuclear, confirma os dados obtidos na MF (Guimarães & Quagio-Grassiotto, 1995a, b, 1996; 1997; Guimarães *et al.*, 1995, 1997) e atesta o comprometimento desse tipo celular no preparo para as intensas atividades de síntese protéica que ocorrem durante o crescimento secundário. Tal como revelado pela aplicação do EDTA, nos oócitos de roedores (Takeuchi & Sonta, 1983; Antoine *et al.*, 1988), a grande quantidade de ribossomos no citoplasma é uma característica comum aos óocitos dos diferentes grupos animais.

PROTEÍNAS BÁSICAS E SUA RESPOSTA À AGA

A técnica da Prata Amoniacal foi desenvolvida para demonstrar diferenças de coloração em MF de histonas ricas em lisina, que apresentam coloração amarelada, e ricas em arginina, que apresentam coloração marrom (Black & Ansley, 1966 *apud* MacRae & Meetz, 1970). Apesar das bases moleculares da reação serem desconhecidas, essa técnica foi expandida para MET. Em células eritropoiéticas de ave, observou-se que o produto da reação, um depósito de partículas elétron-densas presente no núcleo desses tipos celulares em MET, equivale à coloração marrom, característica das histonas ricas em arginina em MF (MacRae & Meetz, 1970). Ainda, a resposta à técnica, em grânulos de secreção de granulócitos de ave e em associação a polissomos sugere que a mesma detecte proteínas citoplasmáticas básicas, não histônicas, similares ou idênticas às histonas, ricas em arginina (MacRae & Meetz, 1970).

Estrutura característica dos oócitos pré-vitelogênicos, o corpúsculo de Balbiani em *S. pilopleura* responde sutilmente à AgA em MF. Algumas de suas organelas como mitocôndrias e complexo de Golgi respondem à AgA em MET, indicando a presença de proteínas básicas nesses locais. Proteínas básicas respondendo à AgA em MF também são observadas no núcleo dos oócitos pré-vitelogênicos, tanto em seus múltiplos nucléolos quanto em marcações pontuais espalhadas pelo nucleoplasma. A tonalidade marrom dos nucléolos indica que essas proteínas devem ser ricas em arginina.

A resposta dos alvéolos corticais à AgA em MF, muda no decorrer da vitelogênese, passando de marrom a amarelado. Mostra a presença de proteínas básicas no interior dos alvéolos. Inicialmente ricas em arginina, essas proteínas parecem ser gradualmente substituídas por outras ricas em lisina. Numa outra visão dos dados, depósitos iniciais de proteínas ricas em arginina seriam gradualmente mascarados por depósitos subseqüentes contendo proteínas ricas em lisina. Em MET em resposta à AgA, marcações pontuais em forma de cordões no interior dos alvéolos lembram o core protéico dos proteoglicanos. Alterações no conteúdo dos alvéolos corticais indicando a modificação na composição química dessas estruturas durante a maturação oocitária foi observada em outros

teleósteos (Neves *et al.*, 1995; Bazzoli *et al.*, 1996) e novamente poderia indicar o desempenho de funções espécie-específicas no processo de fertilização (Verma & Thakur, 1988).

Nos oócitos de *S. spilopleura*, a resposta à AgA em MF nos grânulos de vitelo muda de amarelo para marrom ao longo da vitelogênese, mostrando a presença de proteínas básicas no interior dos grânulos. Inicialmente ricas em lisina, essas proteínas parecem ser gradualmente substituídas por outras ricas em arginina. Alternativamente, depósitos iniciais de proteínas ricas em lisina seriam gradualmente mascarados por depósitos subseqüentes contendo proteínas ricas em arginina, numa dinâmica inversa àquela observada nos alvéolos corticais. Nenhuma dessas inferências têm suporte na MET dado o tipo de resposta obtido nesse sistema de microscopia. No entanto, a marcação nos grânulos de vitelo observada em MET mostra que proteínas de natureza básica são uma constante na composição do vitelo.

Por fim, o envelope oocitário é uma estrutura multilamelar, constituído por proteínas e polissacarídeos (Anderson, 1967; Laale, 1980; Nagahama, 1983; Guraya, 1986). Nas espécies ovíparas é mais espesso do que nas vivíparas e as variações na estrutura e natureza química refletem as adaptações dos ovos ao meio de postura (Guraya, 1986). A presença de glicoproteínas neutras e ácidas no envelope oocitário dos Teleostei tem sido descrita (Rizzo & Bazzoli, 1991; Bazzoli, 1992; Bazzoli *et al.*, 1996), inclusive em representantes da sub-família Serrasalminae (Rizzo & Bazzoli, 1991). Entretanto, durante toda a vitelogênese, no envelope oocitário de *S. spilopleura*, a substância amorfa do envelope primário, camada mais interna do envelope oocitário, mostra-se marcada em resposta à AgA indicando que proteínas básicas também fazem parte da sua composição.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K. and Walter, P. Molecular Biology of the Cell. 4ª ed. Garland Publishing, Inc, New York & London, p1463, 2002.

Anderson, E. The formation of the primary envelop during oocyte differentiation in teleosts. J. Cell Biol., v. 35, p. 193-212, 1967.

Anderson, E. Cortical alveoli formation and vitellogenesis during oocyte differentiation in pipefish, *Syngnathus fuscus*, and killifish, *Fundulus heteroclitus*. J. Morph., v. 125, p 23-60, 1968.

Angermüller, S., Fahimi, D. H. Imidazole-buffered osmium tetroxide: an excellent stain for visualization of lipids in transmission electron microscopy. Histochem. J., v. 14, p. 823-825, 1982.

Antoine, N., Lepoint, A., Baeckeland, E., Goessens, G. Ultrastructural cytochemistry of the nucleolus in rat oocytes at the end of the folliculogenesis. Histochemistry, v.89, p. 221-226, 1988.

Bazzoli, N. Ovogênese em peixes teleósteos neotropicais de água doce. Tese (doutorado), IB, UFMG, Belo Horizonte, p182, 1992.

Bazzoli, N., Godinho, H.P. Cortical alveoli in the oocytes of the freshwater neotropical teleost fish. Boll. Zool., v. 61, p. 301-308, 1994.

Bazzoli, N., Rizzo, E. A comparative cytological and cytochemical study of oogenesis in ten Brazilian teleost fish species. Eur. Arch. Biol., v. 101, p. 399-410, 1990.

Bazzoli, N., Rizzo, E. and Santos, J.E. Dinâmica da ovogênese em peixes forrageiros da represa de Três Marias, Minas Gerais: estudo histológico e histoquímica. BIOS, v. 4, p. 5-10, 1996.

Begovac, P.C., Wallace, R. A. Stages of oocyte development in the pipefish, *Syngnathus scovelli*. J. Morphol., v. 197, p. 353-369, 1988.

Bernhard, W. A new staining procedure for electron microscopical cytology. J. Ultrastruct. Res., v. 27, p. 259-265, 1969.

Bracker, W.P. Black piranhas spawned at Shed Aquarium. Aquarium Phila., v. 32, p. 12-4, 1963.

Braga, R.A. Ecologia e etologia de piranhas no nordeste do Brasil (Pisces – *Serrasalmus lacépède*, 1803). Tese (Doutorado em Ciências) – Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, São Paulo, 268p., 1976.

Busson-Mabillot, S. Endosomes transfer yolk proteins to lysosomes in the vitellogenic oocyte of the Trout. Biol. Cell, v. 51, p. 53-66, 1984.

Clérot, J.C. Les groupements mitochondriaux des cellules germinales des poissons téléostéens cyprinidés. I. Étude ultrastructurale. J. Ultastr. Res., v. 54, p. 461-475, 1976.

Cotelli, F., Andronico, F., Brivio, M. Lamia, C.L. Structure and composition of the fish egg chorion (*Carassius auratus*). J. Ultrast. Mol. Struct. Res., v. 99, n. 70-78, 1988.

Cooper, G.M., Hausman, R.E. The Cell: A Molecular Approach. 3^a ed. Sinauer Associates Inc., Oxford, p713, 2003.

Craik, J. C. A., Harvey, S. M. The causes of buoyance in eggs of marine teleosts. J. Mar. Biol. Ass. U. K., v. 67, p. 169-82, 1987.

Crivelatto, E. Zweyer, M., Basa, M., Mallardi, F. A ruthenium red – toluidine blue procedure for staining epoxy sections in light microscopy. Z. mikrosk. Anat. Forsch., v. 104, p. 769-778, 1990.

Cruz-Landim, C., Cruz-Höfling, M.A. Estudo ao microscópio eletrônico da deposição do envoltório do oócito de peixes: I. *Plagioscion squamosissimum* (Teleostei – Scianidae). Naturalia, v. 14, p. 97-105, 1989.

de Vlaming, V. Oocyte development patterns and hormonal involvements among teleosts. In: Rankin, J.C., Pitcher, T.J. and Duggan, R.T. Control Processes in Fish Physiology. Croom Helm Ltd., London & Canbrra, p. 176-199, 1983.

Droller, M.J., Roth, T.F. An electron microscopic study of yolk formation during oogenesis in *Lebistes reticulatus* Guppyi. J. Cell Biol., v. 28, p. 209-232, 1966.

Edy, E.M. Germ plasm and the differentiation of the germ cell line. Int. Rev. Cytol., v. 43, p. 229-280, 1975.

Favard, P., Favard-Séréno, C. Electron microscope study of polysaccharides in the amphibian oocytes. J. Submicrosc. Cytol., p. 91-111, 1968.

Fujihara, C.Y. Dinâmica populacional de *Serrasalmus spilopleura*, Kner, 1860 no reservatório de Jurumirim (rio Paranapanema, SP): aspectos do crescimento, estrutura populacional, reprodução e nutrição. Dissertação (mestrado), IB, UNESP, Botucatu, SP, 91p., 1997.

Gomes, M.G., Macha, N., Sawaya, P., Carvalho, H.A. Histoquímica dos ovários de *Macrobrachium acanthrus* (Weigman, 1836) nos diferentes estádios de desenvolvimento gonadal. II Lipídeos. Bol. Fisiol. Animal, Univ. São Paulo, v.3, p. 23-31, 1979.

Grier, H. Ovarian germinal epithelium and folliculogenesis in the Common Snook, *Centropomus undecimalis* (Teleostei: Centropomidae). J. Morphol., n. 243, p. 265-281, 2000.

Guimarães, A. C. D., Carvalho, E. D., Quagio-Grassiotto, I. Preliminary aspects of vitellogenesis in *Serrasalmus spilopleura* (Teleostei, Characiforme, Serrasalminae) In: I Encontro Nacional de Pós-Graduação em Áreas de Biologia Estrutural, 1997, Campinas. Braz. J. Morphol. Sci., v.14. p.70. 1997.

Guimarães, A. C. D., Quagio-Grassiotto, I. Análise histológica dos ovários de *Serrasalmus spilopleura* (Serrasalminae, Teleostei): Aspectos da deposição de vitelo In: 2a Jornada Nacional de Iniciação Científica, 1995, São Luis do Maranhão. Anais da 2a Jornada Nacional de Iniciação Científica/47º Reunião Anual da Sociedade Brasileira para o Progresso da Ciência. p.182. 1995a.

Guimarães, A. C. D., Quagio-Grassiotto, I. Análise histológica dos ovários de *Serrasalmus spilopleura* (Teleostei, Characidae, Serrasalminae) corados pelo Azul de Toluidina: Aspectos da deposição de vitelo In: VII Congresso de Iniciação Científica da UNESP, 1995, Guaratinguetá. Resumos do VII Congresso de Iniciação Científica da UNESP. 1995. p.147b

Guimarães, A. C. D., Quagio-Grassiotto, I. Análise histológica preliminar do ciclo de maturação das gônadas de *Serrasalmus spilopleura* (Teleostei, Characiformes, Serrasalminae) do Reservatório de Jurumirim (Rio Paranapanema) In: VIII Congresso de Iniciação Científica da UNESP, 1996, Guaratinguetá. Resumos do VIII Congresso de Iniciação Científica da UNESP. 1996. p.144.

Guimarães, A. C. D., Quagio-Grassiotto, I. Aspectos da biologia da reprodução em *Serrasalmus spilopleura* (Teleostei, Characidae, Serrasalminae), acompanhamento histológico do ciclo de maturação gonadal In: IX Congresso de Iniciação Científica da UNESP. 1997, Jaboticabal. Resumos do IX Congresso de Iniciação Científica da Unesp. 1997.

Guimarães, A.C.D., Quagio-Grassiotto, I. Development and activity of the membranous organelles and of the endomembranous system during the oocyte primary growth of *Serrasalmus spilopleura* (Teleostei, Characiformes, Characidae). Submetido.

Guimarães, A. C. D., Quagio-Grassiotto, I., Nóbile, P. M., Carvalho, E. D. Análise histológica das gônadas de pirambebas (*Serrasalmus spilopleura* Kner, 1860, Serrasalminae, Teleostei) com Inclusão em Metacrilato In: II Semana sobre Histologia de Peixes, 1995, Jaboticabal. Resumos da II Semana sobre Histologia de Peixes. 1995.

Guraya, S.S. The cell and molecular biology of fish oogenesis. Monographs in Development Biology. Vol. 18, Karger, New York, 223p, 1986.

Hart, N., Pontier, P. Acid fosfatase in eggs of the zebrafish, *Brachidanio rerio*. Experientia, v. 35, p. 999-1001, 1979.

Hirose, K. The ultrastructure of the ovarian follicle of Medaka, *Oryzias latipes*. Z. Zellf., v. 123, p. 316-329, 1972.

Karp, G. Cell and Molecular Biology: Concepts and Experiments. 3ª ed. John Wilwy & Sons, Inc, New York, p785, 2002.

Kobayashi, W., Yamamoto, T.S. Fine structure of the micropylar cells and its change during oocyte maturation in the chum salmon, *Oncarhynchus keta*. J. Morphol., v. 184, p. 263-276, 1985.

Kudo, S. Ultrastructure and ultracytochemistry of fertilization envelope formation in the carp egg. Develop. Growth and Differ., v. 24, p. 327-339, 1982.

Laale, H.W. The perivitelline space and egg envelopes of bony fish: a review. Copeia, v. 2, p. 210-226, 1980.

Lamas, I.R., Godinho, A.L. Reproduction in the piranha *Serrasalmus spilopleura*, a neotropical fish with an usual pattern of sexual maturity. Environ. Biol. Fishes, v. 45, p. 161-168, 1996.

Leão, E.L.M., Leite, R.G., Chaves, P.T.C., Ferraz, E. Aspectos da reprodução, alimentação e parasitofauna de uma espécie rara de piranha, *Serrasalmus altuvei* Ramírez, 1956 (Pisces, Serrasalminae) do baixo rio Negro. Rev. Bras. Biol., v. 51, n. 3, p. 545-553, 1991.

Lodish, H., Berk, A., Zipursky, S.L., Matsudaria, P., Baltimore, D., Darnell, J.E. 2000. Molecular Cell Biology. 4^a ed. Scientific American Books, Inc, New York, p1084.

Lopes, R.A., Leme dos Santos, H.S., Costa, J.R.V., Pelizaro, M.G., Castignoli, N. Histochemical study of oocyte zona radiata of the lambari *Astyanax bimaculatus lacustris* – Linnaeus, 1758 (Osteichthyes: Characidae). Zool. Anz., Jena, v. 208, n. 3/4, p. 265-268, 1982.

Lopes, R.A., Watanabe, I., Nuti-Sobrinho, A., Santos, H.S.L., Paula-Lopes, O.V. On the reproduction of brazilian fishes. XIII. Scanning electron microscopic study of the rhythm of the development in oocyte of the lambari (*Astianax bimaculatus*) Reinhardt 1874 (Piscies, Characidae). Rev. Bras. Ciên. Morfol., v. 4, n. 2, p. 99-105, 1987.

Luft, J.H. Ruthenium red and violet. II. Fine structural localization in animal tissues. Anat. Rec., v. 171, p. 369-376, 1971.

MacRae, E.K., Meetz, G.D. Electron microscopy of the ammoniacal silver reaction for histones in the erythropoietic cells of the chick. J. Cell Biol., v. 45, p. 235-245, 1970.

Makeyeva, A.P., Yemel'Yanova, N.G. Periodization of oogenesis in cyprinids. J. Ichthyol. v. 29, n. 8, p. 55-67, 1989.

Mazabrand, T., Wegnez, M., Denis, H. Biochemical research on the oogenesis. RNA accumulation in the oocytes of teleost. Develop. Biol., v. 44, p. 326-332, 1975.

Nagahama, Y. The functional morphology of teleost gonads. In: Hoar, W.S., Randall, D.J., Donaldson, E.M. eds, Fish Physiology, Academic Press Inc. New York. Vol IXA p. 233-273, 1983.

Neves, C.A., Andrade, D.R., Matta, S.L.P., Vidal Jr., M.V., Santos, A.A. Cytochemical analyses of polysaccharides from the cortical alveoli of the oocytes of the lambari-bocarra (*Oligosarcus argenteus* Gunther, 1864) (Pisces, Characidae). Rev. Brasil. Biol., v. 5, p. 693-696, 1995.

Ohta, T., Iwamatsu, T., Takama, M., Yoshimoto, Y. Cortical alveolus breakdown in the eggs of the freshwater teleost *Rhodeus ocellatus ocellatus*. Anat. Rec., v. 227, p. 486-496, 1990.

Paiva, M.P. Sobre o controle da pirambeba *Serrasalmus rhombeus* (L. 1766) Lacépède, 1803, no Açude Lima Campos (Icó, Ceará) através da pesca seletiva. Rev. Brasil. Biol., v. 18, n. 3, p. 251-266, 1958.

Rizzo, E., Bazzoli, N. The zona pellucida of the white piranha *Serrasalmus brandtii* Reinhardt, 1874 (Pisces, Characiformes): a cytological and cytochemical study. Func. Dev. Morphol., v. 1, p. 21-24, 1991.

Rizzo, E., Bazzoli, N. Oogenesis, oocyte surface and micropylar apparatus of *Prochilodus affinis* Reinhardt, 1874 (Pisces, Characiformes). Eur. Arch. Biol., v. 104, p. 1-6, 1993.

Rodrigues, J.D., Mota, A., Moraes, M.N., Ferreira, A.E. Curvas de maturação gonadal e crescimento de fêmeas de pirambeba, *Serrasalmus spilopleura* Kner, 1859 (Pisces, Cypriniformes). Bol. Inst. Pesca, v. 5, n. 2, p. 51-63, 1978.

Selman, K., Wallace, R.A. Cellular aspects of oocyte growth in teleosts. Zool. Scien., v. 6, p. 211-231, 1989.

Selman, K., Wallace, R.A., Barr, V. Oogenesis in *Fundulus heteroclitus*. V. The relationship of yolk vesicle and cortical alveoli. J. Exp. Zool., v. 246, p. 42-56, 1988.

Sire, M.F., Babin, P.J., Vernier, J.M. Involvement of the lisosomal system in yolk protein deposit and degradation during vitellogenesis and embrionic development in trout. J. Exp. Zool., v. 269, p. 69-83, 1994.

Takeuchi, I.K., Sonta, S. Electron microscopic study on glycogen particles in ovarian oocytes of the Chinese hamster. Annot. Zool. Jap., v.56, p. 167-173, 1983.

Teles, M.E.O., Godinho, H. P. Ciclo reprodutivo da pirambeba *Serrasalmus branditii* (Teleostei, Characidae) na Represa de Três Marias, Rio São Francisco. Rev. Bras. Biol., v. 57, p. 177-84, 1997.

Tesoriero, J.V. Formation of the chorion (zona pellucida) in the teleost *Oryzias latipes*. II. Polysaccharide cytochemistry of early oogenesis. J. Histochem. Cytochem., v. 25, p. 1376-1380, 1977.

Tesoriero, J.V. The distribution and fate of ^3H -glucose and ^3H -galactose in oocytes of *Oryzias latipes*. Cell Tissue Res., v. 209, p. 117-129, 1980.

Thiéry, G., Bernier, J., Bergeron, M. A simple technique for staining of cell membranes with Imidazole and Osmium Tetroxide. J. Histochem. Cytochem., v. 43, p. 1079-1084, 1995.

Toury, R., Clérot, J.C., André, J. Les groupements mitochondriaux des cellules germinales des poissons téléostéens Cyprinides. IV. Analyse biochimique des constituants du "ciment" intermitochondrial isolé. Biol. Cell, v. 30, p. 225-232, 1977.

Tyler, C.R., Sumpter, J.P. Oocyte growth and development in teleosts. Rev. in Fish Biol. And Fisher., v. 6, p. 287-318, 1996.

Ulrich, E. Étude des ultrastructures au cours de l'ovogenèse d'un poisson téléostéen, le Danio *Brachydanio rerio* (Hamilton-Buchanan). J. Microscopie, v. 8, p. 447-478, 1969.

Vazzoler, A.E.A.M., Menezes, N.A. Síntese do conhecimento sobre o comportamento reprodutivo dos Characiformes da América do Sul (Teleostei, Ostariophysi). Rev. Bras. Biol., v. 52, n. 4, p. 627-640, 1992.

Verma, G.P., Thakur, C. Origin and composition of cortical granules in oocytes of a teleost, *Mastacembelus armatus armatus* (Lacépède). Arch. Biol., v. 99, p. 325-334, 1988.

Wallace, R.A. Vitellogenesis and Oocyte Growth in Nonmammalian Vertebrates. In: Develop. Biol., Browder, L. W. New York: Plenum Press. v. 1, p. 127-77, 1985.

Wallace, R.A., Selman, K. Cellular and dynamic aspects of oocyte growth in teleosts. Scien. Zool., v. 21 p. 325-343, 1981.

Wallace, R.A., Selman, K. Ultrastructural aspects of oogenesis and oocyte growth in fish and amphibians. J. Electron Microsc. Tech., v. 16 p. 175-201, 1990.

West, G. Methods of assessing ovarian development in fish: a review. Aust. J. Mar. Freshw. Res., v. 41, n. 2, p. 199-222, 1990.

Wourms, J.P. Annual fish oogenesis. I. Differentiation of the mature oocyte and formation of the primary envelop. Develop. Biol., v. 50, p. 335-354, 1976.

Yamamoto, M. Electron microscopy of fish development. II. Oocyte follicle cell relationship and formation of chorion in *Oryzias latipes*. J. Fac. Sci. Univ. Tokio, Sec IV, v. 10, p. 123-126, 1963

Yamamoto, M. Electron microscopy of fish development. III. Changes in the ultrastructure of the nucleus and cytoplasm of the oocyte during its development in *Oryzias latipes*. J. Fac. Sci. Univ. Tokio, v. 10, p. 335-346, 1964.

LEGENDAS

Figuras 1 e 2 – Oócito pré-vitelogênico submetido ao Im. Asterisco: região de resposta ao Im; M: mitocôndria; N: núcleo; NU: nucléolo; RE: retículo endoplasmático. 1 - x 3900; 2 – x 21000.

Figura 3 – Região periférica de oócito pré-vitelogênico submetido ao Im. Asterisco: região de resposta ao Im; M: mitocôndria; LB: lâmina basal; T: teca. x 23100.

Figura 4 – Região do envoltório folicular de oócito pré-vitelogênico submetido ao Im. Asterisco: região de resposta ao Im; F: célula folicular; M: mitocôndria; O: oócito; EE: envelope oocitário; RE: retículo endoplasmático. x 13400.

Figura 5 – Região citoplasmática de oócito pré-vitelogênico submetido ao VR. Estrela: região de resposta ao VR; CMV: corpo multivesicular. x 23800.

Figura 6 – Região perinuclear e núcleo (N) de oócito pré-vitelogênico submetido ao VR. Estrela: região de resposta ao VR; M: mitocôndria; NU: nucléolo. x 5800.

Figura 7 – Região do envoltório folicular e região citoplasmática periférica de oócito pré-vitelogênico submetido ao VR. CML: corpo multilamelar; estrela: região de resposta ao VR; LB: lâmina basal; M: mitocôndria; T: teca. x 17000.

Figuras 8 e 9 – Região periférica de oócito (O) pré-vitelogênico mostrando início da formação do envelope oocitário (EE). Estrela: região de resposta ao VR; F: célula folicular; LB: lâmina basal; M: mitocôndria; T: teca. 8 – x 9300; 9 – x 14300.

Figuras 10 a 12 – Região citoplasmática de oócito pré-vitelogênico submetido à AgA. CML: corpo multilamelar; G: complexo de Golgi; M: mitocôndria; mini-asterisco: região de resposta à AgA; VED: vesícula elétron-densa. 10 – x 9300; 11 – x 42000; 12 -x 42000.

Figura 13 – Detalhe de corpo multilamelar (CML) marcado pela AgA. Mini-asterisco: região de resposta à AgA. x 109000.

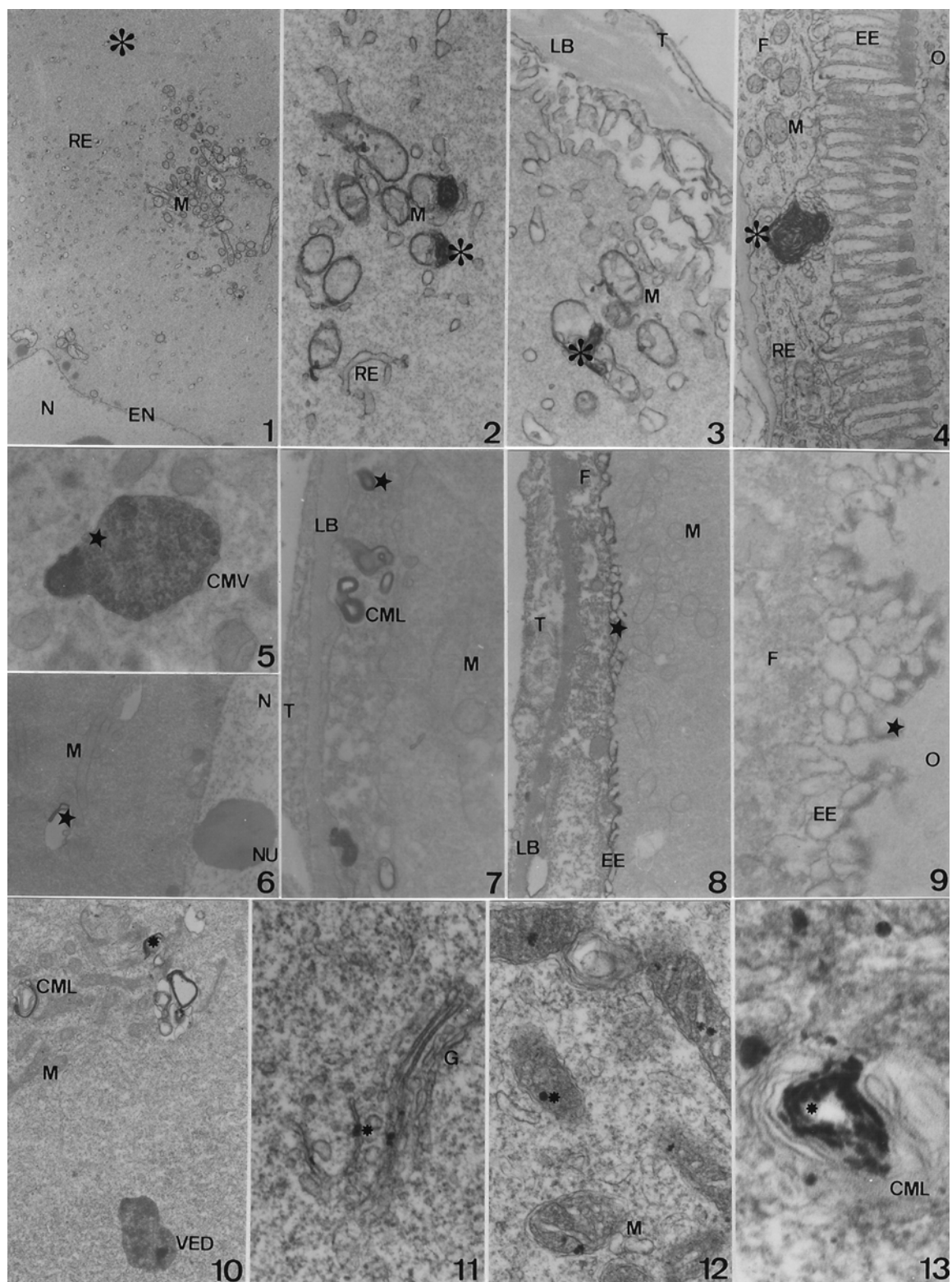


Figura 14 – Região do envoltório folicular de oócito em vitelogênese submetido ao Im. AC: alvéolo cortical; asterisco: região de resposta ao Im; EE: envelope oocitário; F: célula folicular; T: teca. x 4000.

Figura 15 – Detalhe do envelope oocitário com microvilosidades (MV) respondendo ao Im. Asterisco: região de resposta ao Im. x 27000.

Figuras 16 e 17 – Região citoplasmática de oócito em vitelogênese submetido ao Im. AC: alvéolo cortical; asterisco: região de resposta ao Im; GV: grânulo de vitelo; M: mitocôndria. 16 – x 6000; 17 – x 21000.

Figura 18 – Região citoplasmática periférica de oócito em vitelogênese submetido à AgA. AC: alvéolo cortical; EE: envelope oocitário; mini-asterisco: região de resposta à AgA. x 31500.

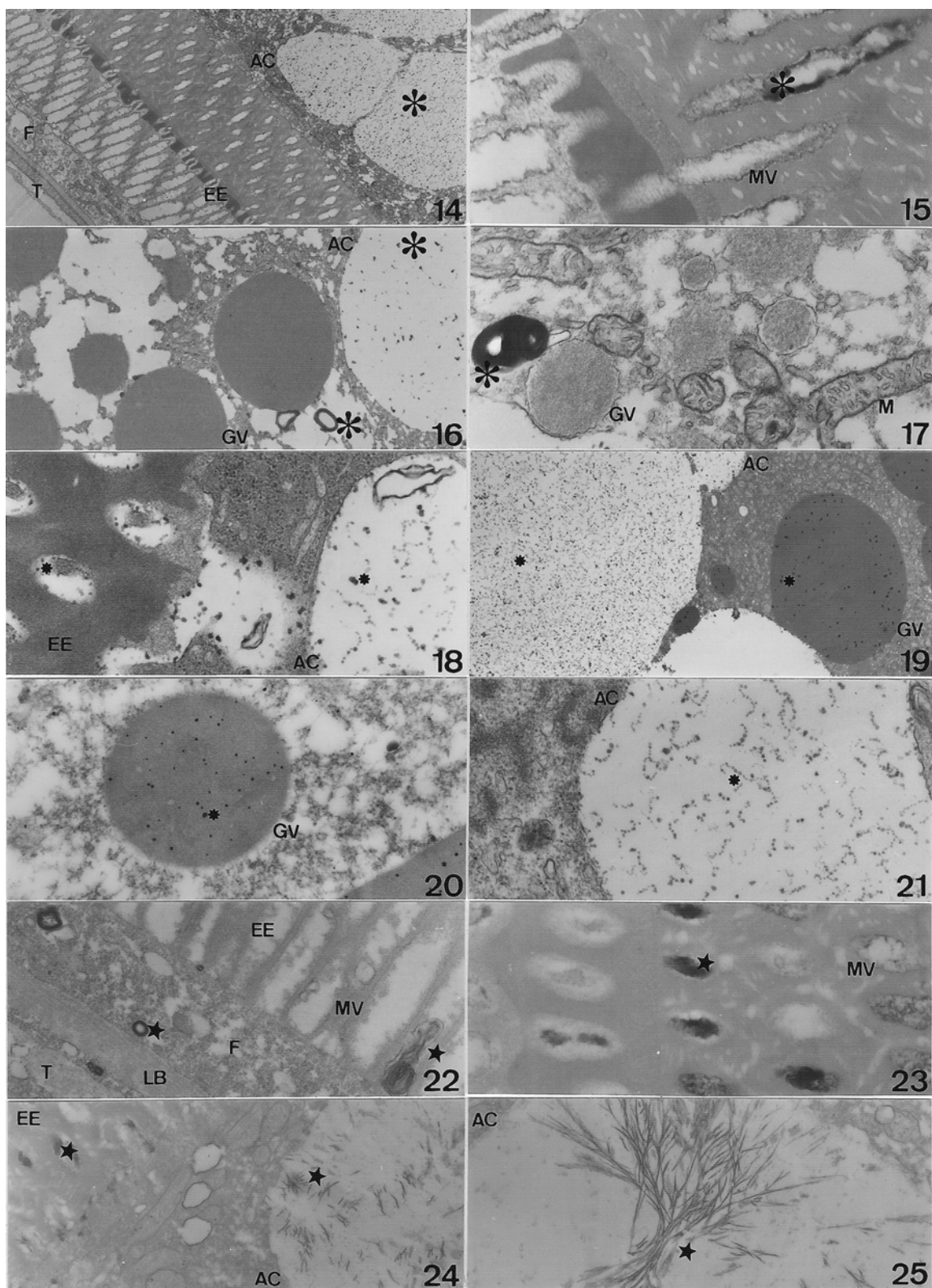
Figuras 19 a 21 – Região citoplasmática de oócito em vitelogênese submetido à AgA. AC: alvéolo cortical; GV: grânulo de vitelo; mini-asterisco: região de resposta à AgA. 19 – x 4300; 20 – x 29400; 21 - x 29400.

Figura 22 – Região do envoltório folicular de oócito em vitelogênese submetido ao VR. EE: envelope oocitário; estrela: região de resposta ao VR; F: célula folicular; LB: lâmina basal; T: teca. x 17000.

Figura 23 – Detalhe do envelope oocitário com microvilosidades (MV) respondendo ao VR. Estrela: região de resposta ao VR. x 73000.

Figura 24 – Região citoplasmática periférica de oócito em vitelogênese submetido ao VR. AC: alvéolo cortical; EE: envelope oocitário; estrela: região de resposta ao VR. x 16100.

Figura 25 – Detalhe de região citoplasmática periférica de oócito em vitelogênese submetido ao VR. AC: alvéolo cortical; estrela: região de resposta ao VR. x 16100.



Figuras 26 e 27 – Região citoplasmática de oócito pré-vitelogênico submetido ao EDTA. M: mitocôndria; N: núcleo; NU: nucléolo; RS: ribossomo; seta: região de resposta ao EDTA. 26 – x 4300; 27 - x 31500.

Figura 28 – Região citoplasmática perinuclear de oócito pré-vitelogênico submetido ao EDTA. N: núcleo; NU: nucléolo; seta: região de resposta ao EDTA no citoplasma; seta dupla: região de resposta ao EDTA no núcleo. x 17000.

Figuras 29 e 30– Região citoplasmática periférica de oócito em vitelogênese submetido ao EDTA. AC: alvéolo cortical; EE: envelope oocitário; RE: retículo endoplasmático; RS: ribossomo; seta: região de resposta ao EDTA. 29 – x 7700; 30 – x 57500.

Figuras 31 e 32– Região citoplasmática de oócito em vitelogênese submetido ao EDTA. GV: grânulo de vitelo; M: mitocôndria; RE: retículo endoplasmático; RS: ribossomo; seta: região de resposta ao EDTA. x 42000.

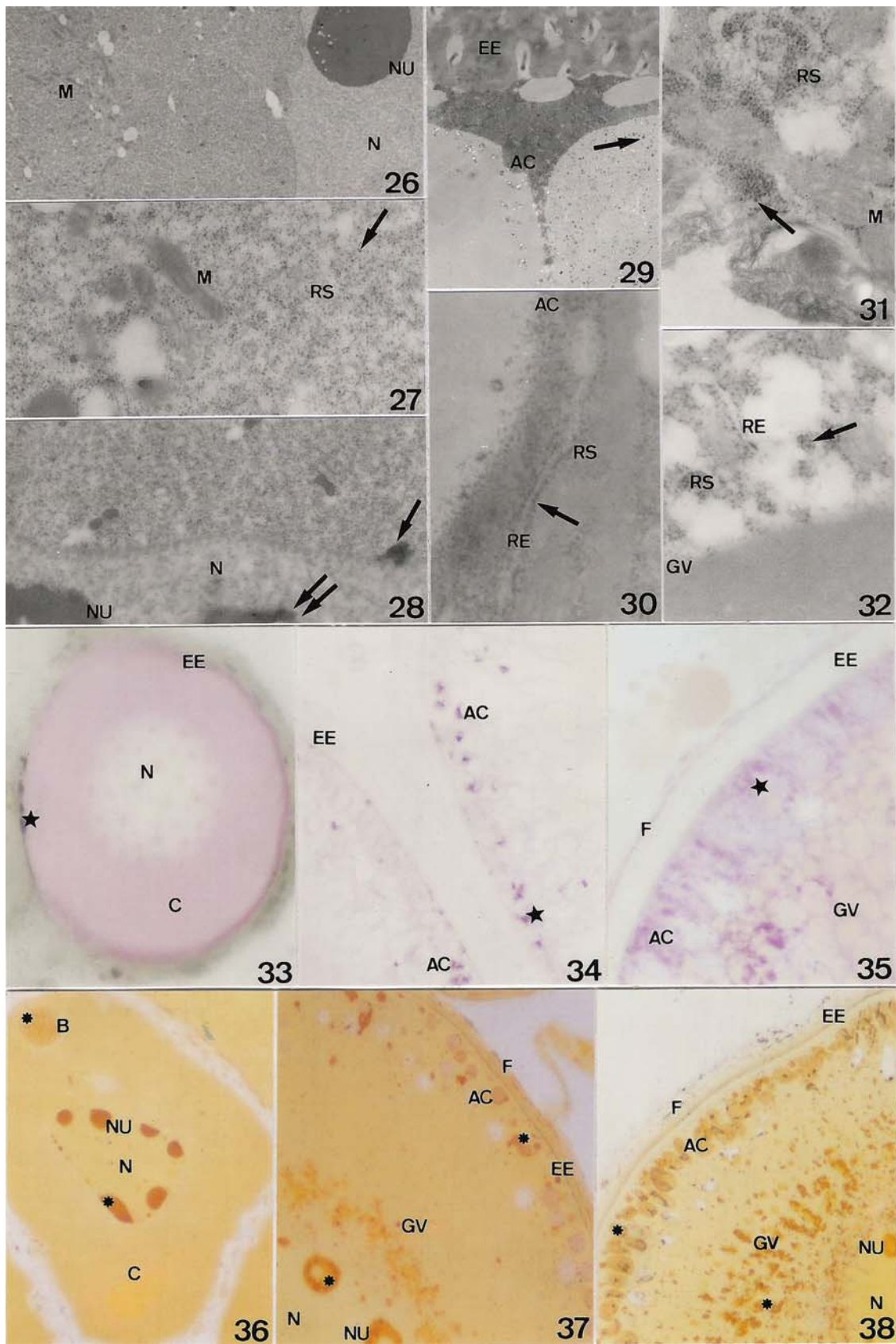
Figura 33 – Oócito pré-vitelogênico submetido ao VR. C: citoplasma; EE: envelope oocitário; estrela: região de resposta ao VR; N: núcleo. x 400.

Figuras 34 e 35 – Região de oócito em vitelogênese submetido ao VR. AC: alvéolo cortical; EE: envelope oocitário; estrela: região de resposta ao VR; F: célula folicular; GV: grânulo de vitelo. 34 – x 200; 35 – x 400.

Figura 36 – Região de oócito pré-vitelogênico submetido à AgA. B: corpúsculo de Balbiani; C: citoplasma; mini asterisco: região de resposta à AgA; N: núcleo; NU: nucléolo. x 400.

Figura 37 – Região de oócito em vitelogênese inicial submetido à AgA. AC: alvéolo cortical; EE: envelope oocitário; F: célula folicular; GV: grânulo de vitelo; mini asterisco: região de resposta à AgA; N: núcleo; NU: nucléolo. x 400.

Figura 38 – Região de oócito em vitelogênese submetido à AgA. AC: alvéolo cortical; EE: envelope oocitário; F: célula folicular; GV: grânulo de vitelo; mini asterisco: região de resposta à AgA; N: núcleo; NU: nucléolo. x 200.



7 Conclusões

Os resultados obtidos pela utilização de diferentes técnicas citoquímicas (estruturais e ultra-estruturais) ao longo da diferenciação das células germinativas femininas de *Serrasalmus spilopleura* permitem inferir que:

EDTA OU MÉTODO DE BERNHARD

Nos oócitos em crescimento primário o trânsito de ribonucleoproteínas no sentido núcleo citoplasma é intenso, e resulta na formação das “nuages” e no aumento progressivo de ribossomos no citoplasma. Nos oócitos em vitelogênese grande parte dos ribossomos associa-se a cisternas membranosas. As “nuages” vão sendo consumidas ao longo do desenvolvimento oocitário, e inexistem nos oócitos maduros. “Nuages” e ribossomos livres ou aderidos à membranas respondem pela alta taxa de síntese protéica característica desse tipo celular.

IMPREGNAÇÃO COM TETRÓXIDO DE ÓSMIO E IODETO DE ZINCO (ZIO) E IMPREGNAÇÃO COM TETRÓXIDO DE ÓSMIO E IODETO DE POTÁSSIO (KI)

O processamento de proteínas ricas em grupamentos SH no ambiente redutor do sistema de endomembranas é uma constante em todo o desenvolvimento oocitário, tanto no próprio oócito quanto nas células foliculares. A incorporação dessas proteínas aos oócitos em crescimento primário aponta para uma ativa interação entre as células germinativas e foliculares. Proteínas ricas em grupamentos SH, inclusive nos corpos multilamelares, são uma evidência de sua ampla participação como constituintes das diferentes estruturas celulares dos oócitos.

TÉCNICA DA PRATA AMONICAL (AGA)

As proteínas básicas encontram-se amplamente distribuídas, participando de diferentes estruturas oocitárias. Durante o crescimento primário estão presentes nos nucléolos, em componentes do sistema de endomembranas e outras organelas membranosas. Nos oócitos em crescimento secundário também fazem parte da composição do envelope oocitário, do conteúdo dos alvéolos corticais e dos grânulos de vitelo.

DETECÇÃO DE FOSFATASE ÁCIDA (ACPASE)

A síntese de enzimas hidrolíticas nos oócitos tem início durante o crescimento primário e mantém-se ao longo de todo o crescimento secundário. As enzimas hidrolíticas estão envolvidas na degradação e reutilização dos componentes celulares e no processamento do vitelo.

Nas células foliculares dos oócitos em crescimento primário, a ação das enzimas hidrolíticas está restrita aos compartimentos lisossomais, porém sua síntese intensifica-se com o aumento das atividades metabólicas inerentes ao crescimento secundário.

MÉTODO DO ÓSMIO-IMIDAZOL (IM)

Durante o crescimento primário, compostos de base lipídica são sintetizados pelas células foliculares, enquanto que nos oócitos corpos lipídicos são utilizados como substrato no metabolismo energético ou em outras vias biossintéticas celulares. Apesar de não detectada durante o crescimento primário, a captura de corpos lipídicos pelos oócitos em crescimento secundário é evidente, sugerindo mais uma vez uma interação entre as células foliculares e as germinativas. Além disto, mesmo que pequena, a presença de lipídios no conteúdo dos alvéolos corticais pressupõe a sua participação na impermeabilização do ovo após a fecundação.

MÉTODO DO VERMELHO DE RUTÊNIO (VR)

Polissacarídeos ácidos estão entre os componentes iniciais do envelope oocitário e encontram-se ausentes da estrutura final. Nos oócitos em crescimento secundário uma pequena quantidade dessa substância é detectada junto à face externa do oolema. Considerando a seqüência temporal dos eventos ao longo do desenvolvimento, a localização dos polissacarídeos ácidos em relação à superfície oocitária sugere a sua incorporação pelas células germinativas femininas. Por outro lado, os polissacarídeos ácidos são um dos componentes majoritários dos alvéolos corticais desde as etapas iniciais de sua formação.