

Laércio dos Anjos Benjamin

CARACTERIZAÇÃO DOS OVÁRIOS E DO DESENVOLVIMENTO OVOCITÁRIO,
E DA RECUPERAÇÃO OVARIANA PÓS-PARTO DO PLATY (*Xiphophorus
maculatus*)(Teleostei, Poeciliidae) EM CONDIÇÕES LABORATORIAIS
CONTROLADAS E SOB AÇÃO DO HORMÔNIO DE CRESCIMENTO

Este exemplar corresponde à redação final
da tese defendida pelo(a) candidato (a)
Laércio dos Anjos Benjamin
M. Heidi Dolder
e aprovada pela Comissão Julgadora.

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. Mary Anne Heidi Dolder
Co-Orientadora: Profa. Dra. Irani Quagio-Grassiotto

2004

UNIDADE	BC
Nº CHAMADA	B438c
V	EX
TOMBO	62038
PROC	16.P.0086-05
PREÇO	11,00
DATA	10/02/05
Nº CPD	

Bibid: 341975

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

B438c

Benjamin, Laércio dos Anjos

Caracterização dos ovários e do desenvolvimento ovocitário, e da recuperação ovariana pós-parto do platy (*Xiphophorus maculatus*) (Teleostei, Poeciliidae) em condições laboratoriais controladas e sob ação do hormônio de crescimento / Laércio dos Anjos Benjamin. -- Campinas, SP: [s.n.], 2004.

Orientadora: Mary Anne Heidi Dolder

Co-orientadora: Irani Quagio-Grassiotto

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

1. Teleósteos. 2. Reprodução. 3. Ovário. 4. Ultraestrutura. (Biologia)
I. Dolder, Mary Anne Heidi. II. Quagio-Grassiotto, Irani.
III. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. IV. Título.

Campinas, 23 de agosto de 2004.

Banca Examinadora

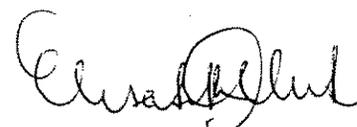
Profa. Dra. Mary Anne Heidi Dolder (Orientadora)


Assinatura

Profa. Dra. Elizete Rizzo


Assinatura

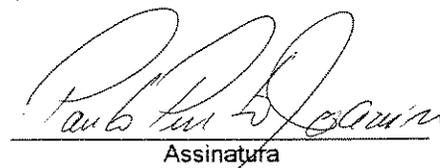
Profa. Dra. Elisabeth Criscuolo Urbinati


Assinatura

Profa. Dra. Maria Inês Borella


Assinatura

Prof. Dr. Paulo Pinto Joazeiro


Assinatura

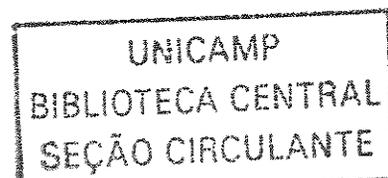
Profa. Dra. Maria Alice da Cruz-Höfling

Assinatura

Prof. Dr. Carlos Alberto Vicentini

Assinatura

200504643



Que saudade!
Agora me aguardem,
Chegaram as tardes de sol a pino.
Pelas ruas, flores e amigos,
Me encontram vestindo meu melhor sorriso.

Eu passei um tempo andando no escuro,
Procurando não achar as respostas.
Eu era a causa e a saída de tudo.
Eu cavei como um túnel
Meu caminho de volta

Me espera, amor, que eu estou chegando.
Depois do inverno é a vida em cores.
Espera, amor,
Nossa temporada das flores.

(Leoni)

DEDICATÓRIA

Ao meu avô Waldomiro,
que sempre sonhou com esse dia.

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

A Deus, pelo Dom da vida...
Por conceder-me saúde e força para lutar por meus objetivos...
Pelas oportunidades que colocou diante de mim...
E pelas dificuldades que ocorreram, importantes para futuras realizações.

À minha família,
por algo muito simples e extremamente valioso: ser minha família.

Aos meus pais, Lydio e Aparecida, por me darem muito mais que a vida....

À minha irmã, Denise
Às minhas tias Wanda e Irene

Pela minha formação pessoal...
Sem o apoio e o carinho de vocês durante toda minha vida,
talvez este momento não tivesse chegado nunca.

Devo muito desta conquista a vocês.

Obrigado!

Às minhas filhas, Clarice e Anita

Clarice, que com seu sorriso e seu mais forte abraço,
me faz esquecer os problemas do dia-a-dia.

Anita, que chegou a esse mundo na reta final deste trabalho,
e ainda pequena já me recebe com um largo sorriso.

Nem juntando todas as palavras poderia descrever o que sinto por vocês.

“Nunca deixem que lhes digam que não vale a pena acreditar nos sonhos que se
tem, ou que seus planos nunca vão dar certo.”

Com amor,
à Tereza Cristina,
que está sempre ao meu lado, acreditando em mim e em meus ideais.

“Ponho os meus olhos em você, se você está
Dona dos meus olhos é você, avião no ar
Dia pr'esses olhos sem te ver, é como o chão do mar.

Os meus olhos vidram ao te ver
São dois fã, um par
Pus nos olhos vidros prá poder melhor te enxergar
Luz nos olhos para anoitecer, é só você se afastar
Pinta os lábios para escrever, a tua boca em mim

Que a nossa música eu fiz agora
Lá fora a lua irradia a glória, porque eu te amo
Eu te peço, vem
Diga que você me quer, que eu te quero também
Eu te amo, eu te peço, vem
Siga aonde vão meus pés, que eu te sigo também
Siga se você me quer, porque eu te quero também.”

(Nando Reis)

AGRADECIMENTOS

Ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural do Departamento de Biologia Celular, IB/UNICAMP, pela oportunidade da realização de um treinamento de excelente qualidade.

Aos membros da Banca de Qualificação (Profa. Dra. Elizabeth Romagosa, Profa. Dra. Ivanira José Bechara, Profa. Dra. Maria Inês Borella) por aceitarem o convite para participar da avaliação do projeto proposto, e em um dia muito particular: o último dia letivo do ano. Muito obrigado pela atenção e sugestões.

À Profa. Dra. Ivanira José Bechara, pela disponibilidade em avaliar a prova de Proficiência em Língua Estrangeira.

Às Professoras que compuseram a Banca Prévia de avaliação deste trabalho, e que contribuíram imensamente para a apresentação final desta tese: Profa. Dra. Elisabeth Criscuolo Urbinati, Profa. Dra. Elizete Rizzo e Profa. Dra. Fabiana Laura Lo Nostro.

Antecipadamente, à Banca Examinadora desta tese, pela disponibilidade, pelas sugestões e correções finais.

Aos Professores que sempre me receberam com atenção e em muito auxiliaram no andamento deste trabalho, além da grande oportunidade de compartilhar de sua amizade: Dra. Ivanira José Bechara, Dra. Leonilda M. B. Santos, Dr. Paulo Pinto Joazeiro e Dra. Sarah Arana.

Ao Prof. Dr. Gil Guerra Jr., da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP, pela atenção, simpatia e disposição em fazer-me entender um pouco sobre o "Hormônio de Crescimento".

Aos Professores Dr. Nilo Bazzoli e Dra. Elizete Rizzo, pela utilização do Laboratório de Ictiohistologia, do Instituto de Ciências Biológicas da UFMG, para processamento de parte do material desta tese. Com vocês, durante o Mestrado, comecei a entender e aprendi a gostar desse campo tão amplo e interessante da Biologia.

À "tia" Mônica, pelo auxílio na difícil tarefa de microtomia de ovários em parafina, nas colorações de citoquímica que insistia em fazer em resina e pela atenção no laboratório. Muito obrigado.

Ao Laboratório de Patologia Experimental da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP, em especial à Dra. Gláucia, Mariza, Cristiano e Eduardo, pela simpatia e pela atenção durante a realização da técnica de imunocitoquímica.

Aos técnicos de laboratório Francisco (Biologia Celular), Marta e Baltazar (Histologia) pela grande colaboração.

Ao pessoal do Laboratório de Microscopia Eletrônica da UNICAMP: Adriane, Antônia, Aurora e Cidinha, pela prestatividade e, principalmente, pela amizade, pelos cafés, pelos bate-papos e pelos desabafos. Obrigado mesmo!

Ao Prof. Dr. Gilmar Bastos Santos, da PUCMINAS, Belo Horizonte/MG e ao Alberto da Silva Moraes, colega do Programa de Pós-Graduação, pelo auxílio e orientação na utilização dos programas estatísticos.

Ao Adriano e ao Eduardo, do Departamento de Histologia e Embriologia pelas orientações durante a utilização dos equipamentos para obtenção das imagens digitais, e à Patrícia "da Luz" Moreira, pelas "luzes" no Adobe Photoshop e Adobe Acrobat. Foram valiosíssimas suas orientações.....

Ao Centro de Microscopia Eletrônica do Instituto de Biociências (UNESP-Botucatu), especialmente à Heleninha, por atender prontamente num momento tão particular.

Ao pessoal da pH7 Aquarium e da AquariusHobby, pelo muito que aprendi sobre aquarismo e peixes ornamentais, e por semanalmente "correrem atrás" dos platis;

À Verônica, da Cooperativa dos Piscicultores de Muriaé/MG, por estar sempre selecionando os melhores animais para este trabalho.

Ao Maurício Nagata (Instituto de Pesca/São Paulo) e ao Júlio (Aquários Itaquera/São Paulo) que sempre me socorreram quando os aquários iam mal.

Aos Professores do Departamento de Morfologia do Instituto de Biociências (UNESP-Botucatu), em especial Dr. Edmir Daniel de Carvalho, Dra. Maeli Dal Pai Silva, Dra. Maria Dalva Cesário e Dra. Wilma de Grava Kempinas, pela agradável convivência e pela extrema atenção nos meus momentos em Botucatu.

Aos técnicos do Laboratório de Histofisiologia de Gônadas de Peixes Neotropicais, do Departamento de Morfologia do Instituto de Biociências (UNESP-Botucatu), Ricardo André e Antônio Vicente, pela convivência agradável, atenção e pela imensa colaboração no processamento dos ovários dos platis.

Aos funcionários da Secretaria deste Programa de Pós-Graduação, Lílian Panagio e Sidney Simões, pela árdua tarefa de atender aos mais variados questionamentos e pelas orientações no decorrer deste curso.

Às funcionárias da Biblioteca do Instituto de Biologia/UNICAMP (Norma, Zilda, Luciana e Ana Maria), pela extrema atenção, pela paciência em ajudar-me a encontrar um periódico na prateleira e que estava saltando à minha frente, e pela extrema simpatia.

Ao pessoal do Xerox do IB e da Pressing Works, sempre atenciosos e extremamente cuidadosos na realização das impressões.

Aos amigos de Botucatu: Ariene, Rafael, Gislaine e Fernanda, pela agradável convivência no laboratório e além dele. Vou sentir saudades de meus dias por aí!

Aos amigos Daclè Vilma de Carvalho e Múcio Flávio Barbosa Ribeiro, e à Tia Inah, pelo estímulo, e principalmente pela atenção e amizade. E à Daclè, especialmente, que me direcionou para a vida acadêmica.

Aos Professores: Dra. Cleida Oliveira, Dra. Elizabeth Camargos, Dr. German Mahecha, Dr. José Carlos Nogueira, do Departamento de Morfologia, ICB/UFMG, grandes amigos e conselheiros. Agradeço por tudo.

A todo pessoal do Centro de Convivência Infantil "Conviver e Crescer", onde minha pequena Clarice freqüentou estes quatro anos, especialmente à "tia" Fernanda, Maria Alice, Fátima, Célia e Sueli "Tchutchuca", e que posso dizer que

era extensão de minha casa..... Os papos, os cafezinhos, pães de queijo, e ao chá de despedida.....

À Jane, Angelino e Carla, extremamente atenciosos e agradáveis, estavam sempre prontos a me receber nos congressos, cursos e viagens a São Paulo.

Ao Lucas Marcon, bolsista de iniciação científica dentro deste projeto, pela extrema dedicação ao que fazia, pela grande amizade e pelo muito que aprendemos juntos sobre os aquários e os platis.

Aos colegas com quem cursei as disciplinas deste Programa de Pós-Graduação, especialmente à Fernanda, Helô, Marla, Ricardo Catalano e Sílvia.

Aos amigos do Departamento de Biologia Celular: Estela, Mônica, Naila e Paulo, pelas longas conversas, pelos conselhos, pelos cafés, pelos almoços e, principalmente pela confiança.

Aos meus tios Elias e Maria, aos meus primos de Campinas, especialmente à Ivana e família, Sônia e família, Onillis e família, e à "tia" Fia, pela agradável convivência e pelas inúmeras reuniões e festas nesse período.

Aos amigos de Campinas: Dona Luzia, Sr. Wilson e Dalton; Larissa, Cícero e Luíza; Pupin, Alejandra y Immi, Paloma e família, André Lopes e família, e especialmente ao Sr. Carício e família (Dona Sirlej, Débora, Adma, Andrea, Vitor, Fernanda, Gabriela, e Bárbara). Foi muito bom conhecer todos vocês!!!!

Aos amigos de Viçosa: Paulo, Renata, Paula e Gustavo; Cláudio, Simone, Manuela e Bernardo, de quem ficamos distantes, mas sempre presentes na lembrança e nas longas conversas ao telefone.....

Aos meus sogros, Luiz e Francisca; cunhados: Anna Paula, Wilson, Cristianne, Mônica e Domingos, e à Bárbara.

À Universidade Federal de Viçosa e ao Departamento de Veterinária, pela oportunidade proporcionada para a realização deste treinamento.

Aos Professores e colegas do Departamento de Veterinária da Universidade Federal de Viçosa, especialmente ao Dr. Cláudio César Fonseca, MS. Marco Túlio David das Neves e Dr. Tarcízio Antonio Rego de Paula, por assumirem a responsabilidade de meus encargos didáticos ao longo destes quatro

anos. E ao Prof. Dr. Paulo Sérgio de Arruda Pinto, pela amizade e por abraçar todos os problemas burocráticos que ficam prá trás quando se está longe de sua Instituição. Valeu.....

À CAPES, pelo suporte financeiro conferido pelo Programa Institucional de Capacitação de Docentes e Técnicos.

Ao FAEP/UNICAMP, pelos auxílios que permitiram a realização dos estágios nas Universidades de Cádiz e de Buenos Aires.

À FAPESP, pelo financiamento do projeto para desenvolvimento desta tese, sem o qual seria difícil realizar grande parte deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Juan Miguel Mancera, de la Facultad de Ciencias del Mar y Ambientales, de la Universidad de Cádiz, Cádiz/Espanha, por la oportunidad, amabilidad y disponibilidad, por la atención en mi estadia en tu terra, por la confianza, e la gentileza en regalar-me com el antisuero que permitiu la realización de las inmunos de esto trabajo!

A toda la gente de la Facultad de Ciencias del Mar y Ambientales, por la convivencia, y toda la amabilidad que tuvieron conmigo durante el tiempo que estuve allí, especialmente a Raul y Elvira, alumnos de laboratorio de Juanmi, por enseñar-me la inmuno, por los almuerzos e amistad.....e tienes que hablar español.....

A Andrea, Helena e Lucia, con ellas he compartido la convivencia en la casa durante el estagio en Cádiz.

Aos amigos brasileiros que conheci e com quem convivi: Núria, Eleny, Tânia e Maurício. Foram dias maravilhosos. "*Que nostalgia!*". Valeu demais!!!!!!!!!!!!

A las personas del Laboratorio de Embriología Animal, Departamento de Biodiversidad y Biología Experimental de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales - Universidad de Buenos Aires: Fabi, Paulinha, Andrea, Mario e Dante. Por la recepción, por el curso de inmuno, por las bromas.... .

A Fabiana, siempre muy atenciosa, siempre con algo nuevo pra enseñar..... Mientras estuvo en el laboratorio fue una fuente de optimismo y de

energía positiva. Está llena de ideas, de ganas de trabajar. Es el tipo de persona que escasea. Sus consejos me han sido muy útiles.

A Fabiana y Pablo, les agradezco su compañía y amistad durante el tiempo que estuvimos cerca en Buenos Aires. Por los paseos, almuerzos, sorvetes, e mucho fútbol.....

À Dona Irene de Godoi Quagio, que sempre me recebeu de braços abertos em sua residência em Botucatu nas inúmeras vezes que por lá estive. Pelos nossos bate-papos sobre volley, Fórmula 1 e muito esporte. E pelas deliciosas sobremesas, que sempre preparava e me ensinava a prepará-las também.....
Dona Irene, muito obrigado pelo carinho.

"A vida nos oferece diversas oportunidades, mas algumas são tão especiais que passam a ser únicas"

Àqueles que de alguma forma deixaram suas marcas nesse trabalho.

"Mais fácil julgar do que ter que olhar as próprias mentiras.
Mais fácil julgar e acreditar nas próprias mentiras.
Tentar esconder e não ter que ver onde dói a ferida da vida....."

E, finalmente, àquelas pessoas que me acompanharam mais de perto durante esses anos: às Profas. Dras. Mary Anne Heidi Dolder e Irani Quagio-Grassiotto.

Heidi, demorei a acostumar, mas consegui. A retirar o "senhora" e o "professora". Gostaria de deixar aqui registrada minha consideração por sua pessoa, meu agradecimento pela confiança depositada e, principalmente pela paciência com meu temperamento. Pela orientação deste trabalho, que acredito termos aprendido muita coisa juntos. Obrigado!!!!

Irani, que desde o início teve participação fundamental. Pois foi ela quem me encaminhou à UNICAMP e para este Programa de Pós-Graduação. Também

pelas oportunidades que criou para realização dos estágios em Cádiz e Buenos Aires. Por receber-me sempre de braços abertos em seu laboratório na UNESP e, principalmente, em sua residência em Botucatu. Pelos valiosos conselhos, que certamente serão extremamente úteis em minha vida (profissional e pessoal). E, a parte de tudo isso, pela pessoa maravilhosa que é. Obrigado por poder dividir este trabalho contigo.

Para aqueles que me acompanharam mais de perto,
recebam a minha gratidão.

"Aos platis, que me deixaram conhecer um pouco de seu incrível mundo, e que com seu sacrifício me ensinaram responsabilidade pelo que faço."

ÍNDICE

	Pág
1. RESUMO	1
2. ABSTRACT	3
3. INTRODUÇÃO	5
3.1. O hormônio de crescimento	7
3.2. O modelo biológico: <i>Xiphophorus maculatus</i>	11
4. OBJETIVOS	19
5. MATERIAL E MÉTODOS	20
5.1. Condições de manutenção dos peixes em aquários.....	20
5.2. Recuperação ovariana pós-parto e a ação do hormônio de crescimento nos ovários.....	21
5.3. Primeira maturação sexual.....	22
5.4. Obtenção de dados biométricos	23
5.5. Análise estatística.....	24
5.6. Relação peso corporal x comprimento-padrão.....	24
5.7. Microscopia de luz	25
5.8. Microscopia eletrônica de transmissão	27
5.9. Microscopia eletrônica de varredura	27
5.10. Imuno-histoquímica.....	28

6. RESULTADOS	31
6.1. Anatomia ovariana	31
6.2. Ovogênese	32
6.2.1. O crescimento primário	33
6.2.2. O crescimento secundário	34
6.3. Citoquímica da ovogênese	36
6.3.1. Os ovócitos em crescimento primário	36
6.3.2. Os ovócitos em crescimento secundário	37
6.4. Morfometria dos ovócitos e das estruturas ovocitárias	38
6.5. Recuperação ovariana pós-parto.....	39
6.5.1. Imuno-histoquímica	39
6.5.2. Recuperação ovariana pós-parto no grupo-controle..	39
6.5.3. Ação do hormônio de crescimento na recuperação ovariana pós-parto.....	40
6.5.4. Involução de folículos atrésicos e de folículos vazios	40
6.5.4.1.A atresia folicular	40
6.5.4.2. Os folículos vazios	41
6.6. Análise quantitativa da recuperação ovariana pós-parto.....	42
6.7. Relação peso corporal X comprimento-padrão	43
6.8. Primeira maturação sexual	44
6.9. Figuras.....	45
6.10. Tabelas e gráficos.....	88

7. DISCUSSÃO	95
7.1. Anatomia ovariana e a fertilização dos ovócitos	95
7.2. Dinâmica e citoquímica da ovogênese e do desenvolvi- mento ovocitário	98
7.2.1. As ovogônias	99
7.2.2. Os ovócitos primordiais.....	100
7.2.3. O crescimento primário	101
7.2.4. O crescimento secundário	102
7.3. Morfometria dos ovócitos	105
7.4. Formação, citoquímica e morfometria da zona radiata	105
7.5. O epitélio folicular	109
7.6. Recuperação ovariana pós-parto.....	110
7.6.1. Imuno-histoquímica	110
7.6.2. Os ovários pós-parto	112
7.6.3. A atresia folicular	114
7.6.4. Os folículos vazios	117
7.7. Análise quantitativa da recuperação ovariana pós-parto	119
7.8. Relação peso corporal X comprimento-padrão	121
7.9. Primeira maturação sexual	122
8. CONCLUSÕES	124
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	125
10. ARTIGO SUBMETIDO À PUBLICAÇÃO.....	142

1. RESUMO

Os poecilídeos são peixes ovovivíparos de ampla utilização na piscicultura ornamental. Apesar disso, pouco se conhece sobre aspectos reprodutivos dessas espécies. O estudo das características histológicas e ultra-estruturais dos ovócitos constitui etapa básica e primordial para se estabelecer a biologia reprodutiva das diferentes espécies de peixes, essencial para a compreensão da fertilização, desenvolvimento inicial do embrião e crescimento das larvas. Como o sucesso da criação de peixes depende basicamente do conhecimento de sua biologia, e em especial, do processo reprodutivo, o presente trabalho aborda o desenvolvimento ovocitário, a caracterização dos ovários e a recuperação ovariana pós-parto do platy (*Xiphophorus maculatus*). Por outro lado, estudos mostram que o hormônio de crescimento está também envolvido nos processos de maturação gonadal, gametogênese e ovulação, sendo um importante modulador da reprodução da fêmea. Com base nesses aspectos, foram analisados os efeitos do hormônio de crescimento na recuperação ovariana pós-parto de fêmeas em condições laboratoriais controladas. Além disso, o presente estudo determina o tamanho de primeira maturação sexual de fêmeas de platy, outro parâmetro essencial na compreensão da biologia reprodutiva dos peixes. Para tal, foram utilizadas fêmeas jovens e adultas de *X. maculatus* mantidas em aquários. Fragmentos de gônadas foram coletados e processados para estudo da ovogênese em microscopias de luz e eletrônica de transmissão e varredura. Respeitando os diferentes períodos pós-parto pré-estabelecidos, gônadas de animais do grupo-controle foram coletadas e preparadas para o estudo, em microscopia de luz, da recuperação ovariana após o parto. Foram coletadas gônadas do grupo de animais tratados com hormônio de crescimento, para estudo dos efeitos desse hormônio sobre o processo de recuperação ovariana. Fragmentos de gônadas de animais do grupo controle e do grupo tratado também foram processados para imuno-histoquímica, com o intuito de determinar a presença de imunorreatividade ao hormônio de crescimento. Além disso, foram calculados a partir de dados biométricos dos espécimes coletados, os

valores dos índices gonadossomático (IGS) e hepatossomático (IHS), e dos fatores de condição (K_1 e K_2), nos diferentes períodos de coleta para os dois grupos em estudo. Alevinos de diferentes idades foram coletados para os estudos de determinação da idade de primeira maturação sexual. A organização estrutural dos ovários mostrou que o trato genital feminino possui estruturas capazes de armazenar espermatozóides. A ovogênese de *X. maculatus*, espécie ovovivípara, parece ser similar à maioria dos teleósteos ovíparos de água doce. No estudo do tamanho de primeira maturação sexual, 50% da população (L_{50}) foi considerada madura com 2,03cm de comprimento-padrão, e a estimativa de tamanho para que toda a população seja considerada madura (L_{100}) foi de 2,5cm. Nesse último tamanho, foram observadas fêmeas gestantes, corroborando os valores de L_{100} . Não se observou imuno-marcação para hormônio de crescimento nos ovários de platy, seja no grupo-controle seja no grupo tratado. Isso pode ser decorrente da baixa concentração do hormônio no órgão, ou mesmo da meia-vida bastante curta deste hormônio, ou ainda da dosagem utilizada no tratamento. Mesmo durante a gestação, ovócitos jovens iniciavam o processo de amadurecimento. Porém, eles não são fertilizados enquanto a fêmea não se recupera da gestação anterior, entrando em atresia. Nas fêmeas tratadas com o hormônio de crescimento, os eventos de atresia continuaram a ocorrer mesmo 72, 84 e 96 horas após o parto, indicando que os ovos que iniciaram a maturação após o parto também entraram em atresia. É possível que este evento tenha sido provocado pelo tratamento hormonal. Como o estresse é fator importante na determinação da ocorrência de atresia folicular em peixes, a manipulação dos animais para anestesia e administração do hormônio pode também ter influenciado o processo de atresia folicular.

2. ABSTRACT

The platy *Xiphophorus maculatus* (Poeciliidae), is an ornamental freshwater fish, ovoviviparous and able to produce offspring throughout the year, when maintained at the ideal temperature and photoperiod. This fish is considered a promising species for wide scale production and easily adaptable to laboratory conditions. It presents internal fertilization, sperm storage in the ovary permitting successive fertilizations, intra-follicular gestation, and sexual dimorphism. Some studies have been made using the platy as an experimental model. However, considering the peculiarities of the reproductive biology of *X. maculatus* and its potential for the study of gametogenesis, little is known about germ cell morphology. The histological study leads to basic knowledge of their reproductive biology with practical application for the understanding of fertilization, initial embryo development and larvae growth. The success of fishculture basically depends on the knowledge of fish biology, and particularly of the reproductive process. The present work includes oocyte development, the characterization of the ovary and post-partum ovarian recrudescence in the platy (*Xiphophorus maculatus*), analyzing the structural events observed in controlled conditions. Research has shown that growth hormone is also involved in gonadal maturation, gametogenesis and ovulation, being an important modulator of female reproduction. Therefore, the effect of growth hormone (GH) in ovarian recrudescence has been analyzed in post-partum females. The present study also determines the size of females at first sexual maturation, that is essential for understanding of reproductive biology in fishes. In this study, juveniles and adult females of *X. maculatus* were kept in aquariums. The ovaries were removed and prepared for study of oogenesis with the light and electron microscopes. According to established post-partum periods, ovaries of the control and growth hormone (GH) treated groups were collected and prepared for the study of ovarian post-partum recrudescence with light microscopy. Gonads of the control and treated groups were also prepared for the detection of growth hormone by immunohistochemistry. Moreover, the values of the

gonadosomatic (IGS) and hepatosomatic (IHS) index were calculated, as well as the condition factors (K_1 and K_2), in the different post-partum periods for the two study groups. To determine the size of the first sexual maturation, juveniles and small pieces of their ovaries were collected. Standard body length, body weight and the age of each fish were recorded for the calculation of the L_{50} . The ovarian structural organization showed that the female genital tract possesses structures for spermatozoa storage. Oogenesis in *X. maculatus*, an ovoviviparous species, is similar to that described for most of the freshwater fish. In the study of the size of first sexual maturation (L_{50}), the platy were considered mature with 2,03cm of standard body length, and the estimated size when all the population is considered mature (L_{100}) was 2,5cm. With this size, gravid female were observed. No immunostaining was observed for the growth hormone in the ovaries, neither in the control group nor in the treated group. This result probably is related to the low concentration of the growth hormone in the ovary, or the short half-life of this hormone, or even the dosage used in the treatment which did not allow immunostaining. During gestation new oocytes initiate vitellogenesis. However, the oocytes which develop during the gestation enter atresia, and therefore will not be fertilized. In females treated with growth hormone, atresia continues to occur 72, 84 and 96 hours post-partum, indicating that the eggs that had initiated post-partum maturation also entered atresia. This event may have been due to the hormonal treatment. As estresse is an important factor causing follicular atresia in fish, the manipulation to anesthetize and administer the hormone probably stimulated the atretic process.

3. INTRODUÇÃO

O crescente interesse pelos peixes teleósteos nas últimas décadas tem fornecido valiosas informações sobre diferentes aspectos da biologia reprodutiva destes animais que, apesar de apresentarem características comuns, mostram grande variabilidade comportamental e morfofuncional que não permite generalizações. Os teleósteos, grupo mais abundante e diversificado de todos os vertebrados, com aproximadamente 20000 espécies, ocupam uma grande variedade de ambientes aquáticos (LESSMAN, 1998) e apresentam uma incrível diversidade de estratégias reprodutivas (BOND, 1996; LESSMAN, 1998). Dada esta variabilidade, os mecanismos básicos que regulam a reprodução neste grupo de animais dependem, para ser entendidos em sua amplitude, de novas e incessantes abordagens experimentais.

Dentre os setores da aquicultura nacional, a piscicultura ornamental vem obtendo destaque nos últimos anos. Porém, o potencial zootécnico das espécies ornamentais é pouco conhecido, ficando a exploração comercial restrita ao extrativismo e ao cultivo com pouca tecnologia.

As informações sobre os peixes ornamentais restringem-se, na maioria das vezes, a uma literatura pouco científica, como livros e revistas de aquarismo. Dados científicos consistentes dizem respeito principalmente a espécies da família Poeciliidae, com destaque para as espécies *Poecilia reticulata*, conhecida como guppy ou lebiste (VENKATESH et al., 1990 e 1992), *Gambusia affinis*, conhecida como peixe mosquito (KOYA et al., 1998 e 2003; KOYA & KAMIYA, 2000), e *Xiphophorus maculatus*, conhecida como platy (BURNS & KALLMAN, 1985; FLORES & BURNS, 1993; POTTER & KRAMER, 2000). Estas espécies têm grande importância na piscicultura ornamental mundial, por serem muito procuradas pelos aquarofilistas. O guppy, o peixe mosquito e o platy são teleósteos ovovivíparos, com inseminação interna seguida de fertilização e gestação intra-folicular (TURNER, 1937; THIBAUT & SCHULTZ, 1978; VENKATESH et al., 1990; KOYA et al., 1998 e 2003; POTTER & KRAMER, 2000).

Juntamente com o aprimoramento de padrões de coloração, formato das nadadeiras e tamanho dos peixes, os parâmetros reprodutivos dessas espécies podem ter sofrido alguma alteração (BOWDEN, 1970 citado por THIBAUT & SCHULTZ, 1978). Segundo COLSON (1969), citado por THIBAUT & SCHULTZ (1978), parece haver correlação positiva entre o aumento de fecundidade e peso corporal em fêmeas de Poeciliidae. Assim, é provável que estes peixes, quando mantidos em cativeiro, apresentem período de gestação, tamanho de prole e intervalo entre partos diferentes daqueles observados em espécimes selvagens. A manutenção de espécies em ambiente confinado causa alterações morfológicas e fisiológicas em diversos sistemas (NAGAHAMA, 1983). Essas alterações precisam ser conhecidas e, quando comparadas ao que ocorre em peixes provenientes do ambiente natural, poderão contribuir para um melhor entendimento da fisiologia reprodutiva desses animais.

O sistema reprodutor feminino em teleósteos é muito variável no que diz respeito a mecanismos e modalidades reprodutivas. Na maioria das espécies, o ovário é um órgão par, que se dispõe em sentido longitudinal na cavidade do corpo, unindo-se caudalmente antes de abrir na papila urogenital. Em alguns grupos, ambos ovários podem fundir-se em um único órgão durante o desenvolvimento, e em outros, um deles pode degenerar, permanecendo em ambos os casos somente um ovário funcional (NAGAHAMA, 1983).

A ovogênese de peixes teleósteos ovíparos tem sido alvo de inúmeros estudos (YAMAMOTO, 1956; ABRAHAM et al., 1984; SELMAN et al., 1986 e 1988; MICALE et al., 1987; BEGOVAC & WALLACE, 1988; SELMAN & WALLACE, 1989; BAZZOLI & RIZZO, 1990; MAYER et al., 1990; NAKAMURA et al., 1993; RIZZO & BAZZOLI, 1993; ELORDUY-GARAY & RAMIREZ-LUNA, 1994; TYLER & SUMPTER, 1996; GRIER, 2000 e 2002). Para sua melhor interpretação, o processo tem sido dividido em número variável de estádios de desenvolvimento, levando-se em conta características morfológicas, fisiológicas e bioquímicas, tais como: tamanho dos ovócitos; tipo, quantidade e distribuição de inclusões celulares, especialmente o vitelo; morfologia do núcleo, nucléolos e cromossomos

(NAGAHAMA, 1983; SELMAN & WALLACE, 1986; LESSMAN, 1998). Apesar das variações encontradas, o processo de ovogênese apresenta características gerais comuns aos teleósteos, e que são relatadas por GRIER (2002) para peixes ovíparos (Figs. 1 e 2), e por NAGAHAMA (1983) para peixes vivíparos (Fig. 3). Esse processo ocorre no interior dos folículos ovarianos, cujos envoltórios, zona radiata, camada folicular, membrana basal e teca, desempenham importante papel durante a própria ovogênese e na fertilização (SELMAN & WALLACE, 1989). Este conjunto de estruturas constitui fator importante para a troca efetiva de gases e proteção física do embrião nas espécies vivíparas (RIEHL & GREVEN, 1993). A caracterização morfológica das células germinativas em seus diferentes estádios de desenvolvimento e regressão, além de sua distribuição e freqüência nas gônadas, constitui subsídio básico na preservação e no incremento da piscicultura de espécies de interesse comercial.

Poucos são os dados científicos consistentes sobre a biologia reprodutiva de *X. maculatus* (BURNS & KALLMAN, 1985; FLORES & BURNS, 1993; POTTER & KRAMER, 2000). Esta espécie é intensamente utilizada em pesquisa médica porque alguns de seus híbridos excessivamente negros desenvolvem melanomas, um tipo de câncer encontrado em muitos peixes, em aves e em mamíferos, inclusive o homem (AXELROD, 1952).

Como base para estudos fisiológicos e aplicados em reprodução, é necessário conhecer eventos cíclicos que ocorrem nas gônadas dos animais (VAN OORDT et al., 1987). Deste modo, o conhecimento das características morfológicas dos ovários de *X. maculatus*, a recuperação gonadal após o parto e o tamanho de primeira maturação sexual fornecerão subsídios para o máximo de exploração zootécnica desta espécie e de espécies afins.

3.1. O hormônio de crescimento

O hormônio do crescimento é um peptídeo de aproximadamente 20 kDa, secretado pela hipófise de vertebrados (Fig. 4), que desempenha um papel

essencial na regulação do crescimento (YAMAGUCHI et al., 1991), por promover a divisão e a diferenciação celulares, e o crescimento corporal (CORIN et al., 1990; COPELAND & NAIR, 1994). Os efeitos metabólicos do hormônio do crescimento incluem aumento da síntese protéica, aumento da utilização de gordura para produção de energia e diminuição da utilização de glicose pelo organismo (SALMON et al., 1991; COPELAND & NAIR, 1994).

A grande maioria dos dados disponíveis sobre o hormônio de crescimento deriva de experimentos realizados com mamíferos. Em peixes, alguns estudos têm demonstrado os efeitos do hormônio de crescimento no desenvolvimento, crescimento e reprodução (DONALDSON et al., 1983; BERN, 1983; VAN DER KRAAK et al., 1990; LE GAC et al., 1993). Sabe-se, ainda, que ele influencia a osmorregulação (SAKAMOTO et al., 1993) e a resposta imune (CALDUCH-GINER et al., 1997).

Os primeiros estudos envolvendo o hormônio de crescimento na regulação gonadal mostraram que o tratamento prolongado com hormônio de crescimento bovino contribui para o restabelecimento da espermatogênese em sinergismo com o hormônio luteinizante bovino em animais hipofisectomizados, além de acelerar o desenvolvimento ovocitário (LE GAC et al., 1993). Embora essa ação direta tenha sido proposta, os mecanismos pelos quais o hormônio de crescimento age ainda não são claros, podendo o IGF-1 (fator de crescimento semelhante à insulina) ser um mediador/modulador da ação deste hormônio (GOMEZ et al., 1998; KAJIMURA et al., 2004). Revisão recente aponta para o envolvimento da ativina como potencial mediador extracelular da ação deste hormônio sobre os tecidos reprodutivos, sendo mais importante que o IGF-1 (SIROTKIN, 2004 – *in press*).

Durante o ciclo reprodutivo de peixes, ocorrem modificações morfológicas e funcionais tanto nas gônadas quanto na adenohipófise. Estudando o ciclo ovariano de *Poecilia latipinna* (Poeciliidae), YOUNG & BALL (1983) observaram que células hipofisárias ligadas à secreção do hormônio do crescimento sofrem mudanças estruturais indicativas de aumento na atividade secretora durante a vitelogênese. Concordando com esses achados, POWER (1992) detectou por meio de técnicas

imunocitoquímicas que o padrão de atividade das células secretoras de hormônio do crescimento em machos de *Pleuronectes platessa* (Teleostei, Pleuronectidae) está relacionado com a maturidade testicular. Segundo HULL & HARVEY (2001), a vitelogênese é primariamente controlada pelo estradiol e fica severamente prejudicada na ausência de hormônio de crescimento em peixes hipofisectomizados, sendo prontamente restabelecida pela administração do hormônio exógeno, o que mostra interação sinérgica entre o hormônio de crescimento e o estradiol na indução da vitelogênese. De acordo com YOUNG & BALL (1983), as células hipofisárias produtoras do hormônio de crescimento apresentam maior atividade secretora durante a vitelogênese.

Nos mamíferos, o fígado é o principal alvo de ação do hormônio do crescimento (NG et al., 1992) (Fig. 5), mas sítios de ligação também são encontrados em outros órgãos (HUGHES & FRIESEN, 1985; ISAKSSON et al., 1985). A presença e as propriedades de receptores hepáticos para hormônio de crescimento também tem sido relatada em vertebrados não-mamíferos (NICOLL et al., 1986).

A fisiologia do hormônio de crescimento em teleósteos constitui uma área rica para pesquisas. Um importante passo para se elucidar os mecanismos de ação do hormônio de crescimento nestes animais, seria a localização de receptores para o hormônio em órgãos-alvo. Em truta, além da presença de receptores em diferentes órgãos, as modificações na receptividade ao hormônio de crescimento no ovário variam durante o ciclo reprodutivo, indicando que os receptores para este hormônio estão presentes na gônada ao longo de todo ciclo, sendo importante durante o recrutamento ovocitário, vitelogênese e maturação folicular (GOMEZ et al., 1999a), com níveis mais elevados no período pré-ovulatório (GOMEZ et al., 1999a e b). A presença de receptores para este hormônio também é relatada por KAJIMURA et al. (2004) em ovócitos de tilápia *Oreochromis mossambicus* nos diferentes estádios de desenvolvimento.

Apesar dos tipos celulares que expressam receptores para o hormônio de crescimento, e respondem à sua ação, ainda não serem bem conhecidos, sugere-

se que os efeitos deste hormônio no sistema reprodutivo de ratos são mediados, mesmo que parcialmente, por células epiteliais e endoteliais nas gônadas (LOBIE et al., 1990).

Este hormônio parece ser um importante regulador do desenvolvimento folicular, atuando no folículo pré-ovulatório por interferir com a via de produção do AMPc (JIA et al., 1986). Todos estes achados estimulam investigações sobre o papel potencial de preparações puras do hormônio na gametogênese ou esteroidogênese, bem como sobre o mecanismo de ação do hormônio (LE GAC et al., 1993).

Desde que se atribuiu ao hormônio do crescimento, o papel de promotor do crescimento em peixes (HIGGS et al., 1975 e 1976), atenção crescente tem sido dada ao seu uso no sentido de demonstrar os efeitos metabólicos da administração de hormônio exógeno de diferentes fontes no crescimento de peixes (SKYRUD et al., 1989; MacLATCHY & EALES, 1990; HERTZ et al., 1991; SINGH & THOMAS, 1993; McLEAN et al., 1994 e 1997; SEIDELIN & MADSEN, 1997 e 1999). Preparações de hormônio do crescimento humano mostraram atividade somatotrópica em *Fundulus heteroclitus* hipofisectomizados (PICKFORD et al., 1959). Um rápido e pronunciado aumento do crescimento corporal em salmões jovens ocorre quando se utiliza hormônio do crescimento recombinante bovino e de frango, sugerindo que em peixes o receptor reconhece um sítio comum do hormônio de crescimento que pode estar presente entre os vertebrados (GIL et al., 1985). Resultados semelhantes foram obtidos com o hormônio do crescimento humano recombinante na truta *Salvelinus fontinalis* (SKYRUD et al., 1989).

O hormônio do crescimento humano se liga fortemente a todos receptores de hormônio do crescimento identificados em diferentes classes de vertebrados (NICOLL et al., 1986) e existem claras evidências da conservação estrutural e funcional desse receptor durante a evolução dos vertebrados (CALDUCH-GINER et al., 2000; LEE et al., 2001). Com isso, muitos estudos em peixes têm sido conduzidos utilizando preparações do hormônio de diferentes espécies de

vertebrados (SKYRUD et al., 1989; MacLATCHY & EALES, 1990; HERTZ et al., 1991; LE GAC et al., 1993).

Uma grande variedade de hormônios do crescimento de peixes e seus genes correspondentes têm sido identificados (FINE et al., 1993; MARTÍNEZ-BARBERÁ et al., 1994). Porém, nem todos os hormônios hipofisários de peixes teleósteos e seus anti-soros estão disponíveis comercialmente.

Várias vias são utilizadas para se administrar hormônio do crescimento aos peixes (administração oral, injeção intramuscular, injeção intraperitoneal, implantes de pellets). A via mais conveniente e prática é a administração oral, que não requer manipulação individual (HERTZ et al., 1991; JEH et al., 1998). Por ela, os níveis plasmáticos significativamente mais elevados ocorreram 12 horas após administração, atingindo um máximo com 15 horas e caindo a níveis basais com 24 horas em truta (MORIYAMA, 1995). Na injeção intra-peritoneal, os níveis máximos de hormônio circulante foram atingidos seis horas após a administração e caíram rapidamente (MORIYAMA, 1995), enquanto a administração intragástrica de pequenas doses de hormônio de crescimento não levou a alteração subsequente nos níveis séricos (DUAN & HIRANO, 1991). Nos estudos mais recentes, a utilização de injeção intracelomática do hormônio de crescimento tem sido preferida (McLEAN et al., 1994 e 1997; SEIDELIN & MADSEN, 1997 e 1999).

3.2. O modelo biológico: *Xiphophorus maculatus*

A piscicultura ornamental tem se desenvolvido muito, inclusive no Brasil. No entanto, pouco se sabe sobre a biologia reprodutiva dessas espécies. Foco deste estudo, o Poeciliidae *Xiphophorus maculatus* (Gunther, 1866), popularmente conhecido como platy (Fig. 6), não foge a esta regra.

A família Poeciliidae caracteriza-se pela viviparidade e pelo acentuado dimorfismo sexual (RINGUELET & ARAMBURU, 1967). Compreende cerca de 300 espécies organizadas em 30 gêneros, distribuídos desde o leste dos EUA até

o nordeste da Argentina, habitando água doce ou salobra (NELSON, 1994) (Fig. 7). Destas, somente uma espécie (*Tomeurus gracilis*) é ovípara.

O desenvolvimento de embriões dentro do organismo materno ocorre somente em duas ordens de teleósteos, Perciformes e Cyprinodontiformes (HOAR, 1969), e à última pertencem os Poeciliidae (NELSON, 1994).

Os ciclos reprodutivos em poecilídeos apresentam particularidades interessantes. É uma família de peixes de água doce tropical e, assim, a sua manutenção em regiões temperadas e/ou árticas, nas quais a variação sazonal em luminosidade é grande, exige um controle rigoroso. Praticamente todas as espécies são ovovivíparas, com os embriões sendo mantidos nos folículos ovarianos até o nascimento (TURNER, 1937), quando o estágio juvenil é atingido, isto é, apresentam características de peixes jovens e não de larvas (THIBAUT & SCHULTZ, 1978). Conseqüentemente, os ovários apresentam dupla função: a de produzir os gametas e a de oferecer um ambiente adequado para o crescimento dos embriões. Finalmente, que a superfecundação ocorre em alguns gêneros. Ou seja, duas ou mais ninhadas de embriões de diferentes idades estão presentes nos ovários (TURNER, 1937), que resultam de um processo contínuo de maturação ovocitária durante o desenvolvimento de ovócitos previamente fertilizados (HOAR, 1969; BOND, 1996).

Alguns estudos têm sido conduzidos sobre a fisiologia reprodutiva dos poecilídeos, inclusive *Xiphophorus* (WOURMS, 1981); porém, na sua maioria concentram-se no gênero *Gambusia* (revisão em KOYA et al., 1998), o único adaptado à zona temperada e com ciclo reprodutivo anual.

O desenvolvimento da fertilização interna e as conseqüentes modificações anatômicas permitiram aos poecilídeos a aquisição de novas estratégias reprodutivas (POTTER & KRAMER, 2000). Sabe-se que a viviparidade é o modo mais bem sucedido de reprodução. Nos peixes, durante a transição da condição de ovíparo para vivíparo, são estabelecidas relações especializadas entre mãe-embrião (WOURMS, 1977). Diversas adaptações, estruturais e fisiológicas, estão associadas a essas relações (WOURMS, 1981; WOURMS et al., 1988).

THIBAUT & SCHULTZ (1978) dividiram os membros da família Poeciliidae em dois grandes grupos com base nas adaptações reprodutivas. Um grupo de espécies desenvolve superfecundação com tendência à viviparidade verdadeira (matrotrofia), sendo então designadas como espécies especializadas. Outro grupo não desenvolve superfecundação, e as espécies são basicamente ovovivíparas (lecitotróficas), sendo então designadas como espécies generalizadas. No tipo matrotrófico, os ovos são pequenos (0,4-0,8 milímetros de diâmetro) e com pouco vitelo, com os embriões sendo nutridos a partir de material transferido da mãe (WOURMS, 1981), numa condição conhecida como viviparidade (CONSTANTZ, 1989). No tipo lecitotrófico, os ovos têm cerca de dois milímetros de diâmetro e requerem pouca contribuição da fêmea após a fertilização (CONSTANTZ, 1989). Para espécies em que os embriões são nutridos pelo vitelo depositado no ovócito antes da fertilização (WOURMS, 1981), adota-se o termo ovoviviparidade (CONSTANTZ, 1989).

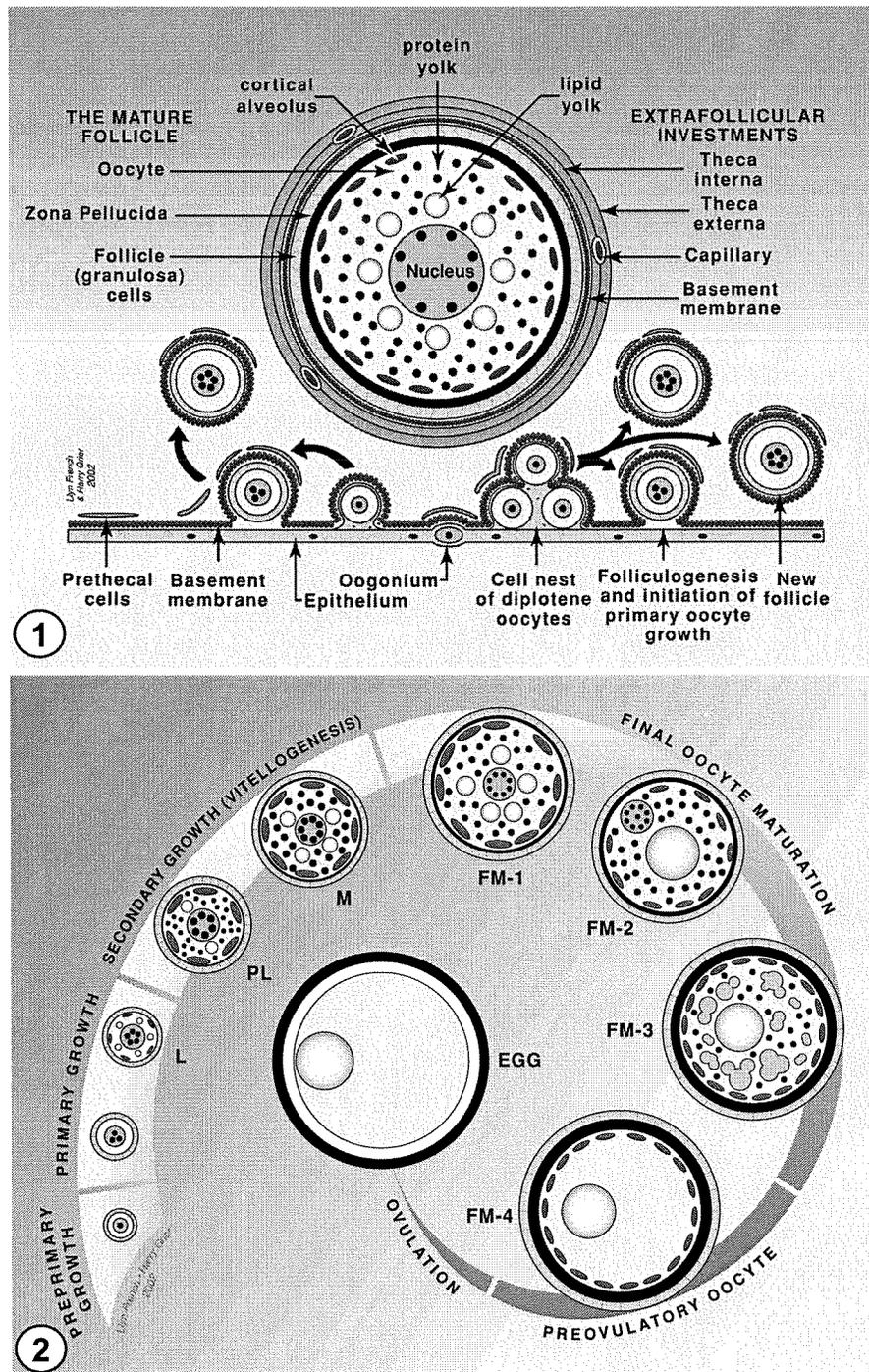
X. maculatus, como a maioria dos poecílídeos, tem como estratégia reprodutiva a ovoviviparidade (BAILEY, 1933; TURNER, 1937; THIBAUT & SCHULTZ, 1978), e é capaz de produzir crias ao longo de todo o ano desde que mantidas as condições ideais de temperatura e fotoperíodo (COLSON, 1969 e BOWDEN, 1970 citados por THIBAUT & SCHULTZ, 1978; BURNS, 1985, CONSTANTZ, 1989). Nesta espécie, como em muitos poecílídeos, após a inseminação, a fertilização é interna, e o desenvolvimento é intra-folicular (WOURMS, 1981). As fêmeas produzem ninhadas sucessivas (AXELROD, 1952; TAVOLGA, 1949; VALLOWE, 1953) as quais são fortemente dependentes do vitelo, com pouca ou nenhuma utilização de nutrientes maternos, ocorrendo, no entanto, variações no tamanho do ovo e no número de ovos produzidos (THIBAUT & SCHULTZ, 1978). O período de gestação da espécie varia de 26-90 dias (TAVOLGA, 1949), com média de 33,64 dias, podendo produzir 11 crias por ano (VALLOWE, 1953). Essas últimas são as únicas documentações do período gestacional.

Dependendo do tamanho corporal, estado sanitário e condições reprodutivas, os poecilídeos podem criar de dois a 200 filhotes a cada parto, mas usualmente criam em média 20 alevinos (AXELROD, 1952). Esta variação se deve ao sacrifício da quantidade, em função da qualidade dos alevinos gerados. Porém, este controle não ocorre nem em mesmo grau, e nem pelo mesmo mecanismo, com uma faixa de variação de produtividade persistindo inclusive dentro da mesma família (THIBAUT & SCHULTZ, 1978).

As fêmeas estocam e possivelmente nutrem os espermatozoides dentro do trato reprodutivo por vários meses (CONSTANTZ, 1989), o que permite a produção de cerca de cinco ninhadas sucessivas sem a necessidade de contato com machos (VALOWE, 1953).

X. maculatus é uma espécie pacífica, resistente e prolífica, que mostra diferenças físicas marcantes entre os sexos. Os machos são menores e apresentam corpo mais claro do que as fêmeas (AXELROD, 1952). As fêmeas maduras apresentam a mancha gravídica, uma região escura rica em cromatóforos peritoneais, acima da nadadeira anal (BURNS & KALLMAN, 1985). A nadadeira anal também é uma indicação do sexo do animal. Tem forma de leque nas fêmeas e nos machos se modifica apresentando a forma de um bastão que é mantido próximo do corpo (AXELROD, 1952). Forma um órgão ósseo intromitente, chamado gonopódio que é utilizado pelo macho durante a cópula para inseminar as fêmeas (CONSTANTZ, 1989), uma característica comum a quase todos peixes vivíparos mantidos em aquários (AXELROD, 1952).

X. maculatus é originário da América Central e, apesar de amplamente distribuído na América do Sul, não existem estudos sobre aspectos reprodutivos da espécie realizados no Brasil. Encontra-se amplamente difundida entre os aquarofilistas, e é considerada promissora para produção em larga escala, principalmente por apresentar ciclo reprodutivo curto, o que permite rápido retorno financeiro. Acrescem a isso, as facilidades de trabalho com espécies de ciclo reprodutivo curto não somente em estudos sobre reprodução, como também de nutrição e melhoramento genético, pontos-chave para a piscicultura ornamental.



Figs. 1 e 2: Representação esquemática do processo de formação (1) e desenvolvimento (2) dos folículos ovarianos em peixes teleósteos, GRIER (2002).

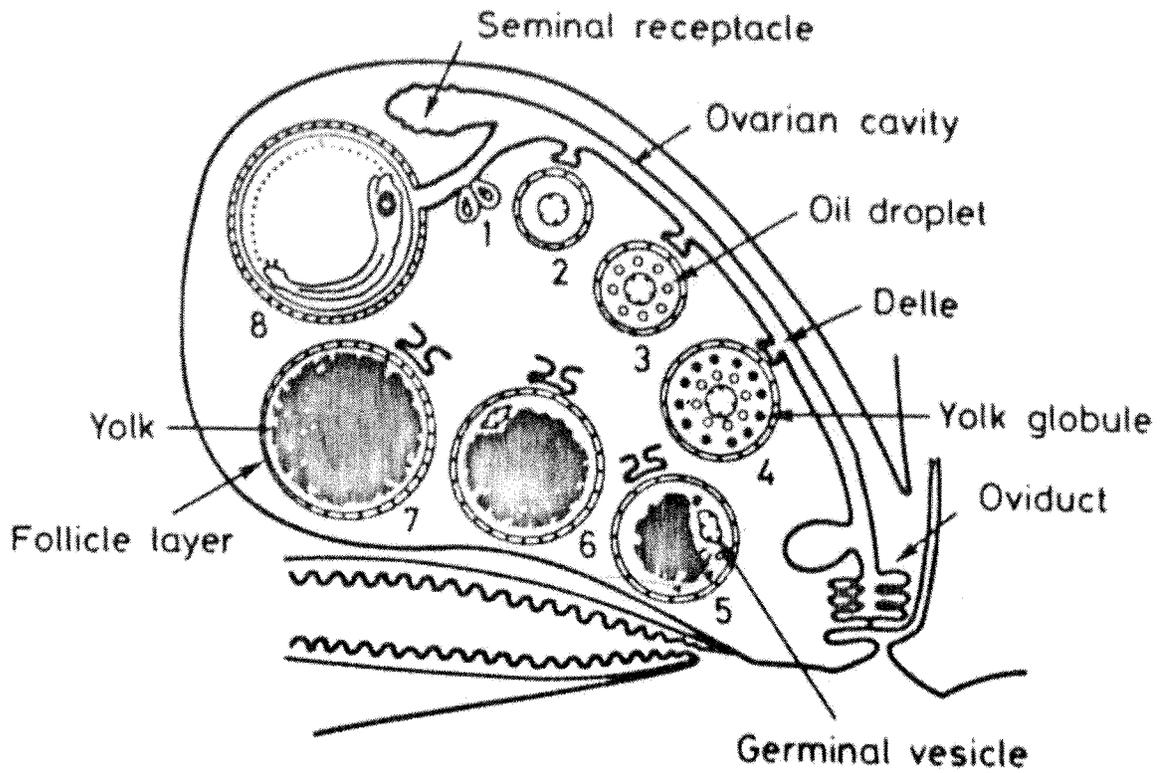


Fig. 3: Representação esquemática do ovário do guppy *Poecilia reticulata*, NAGAHAMA (1983).

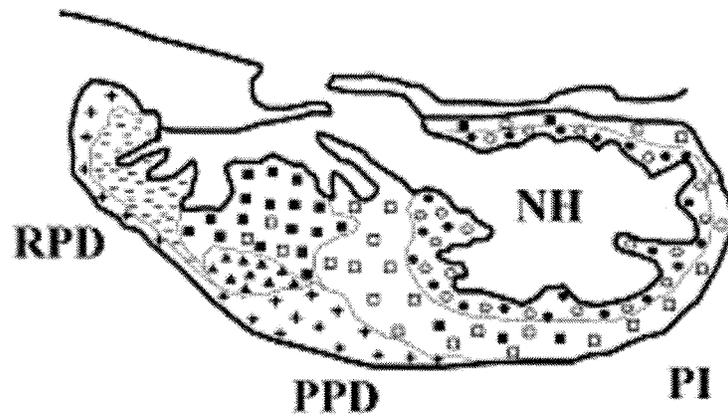


FIG. 4: Desenho esquemático de secção sagital da hipófise de um teleósteo Perciforme, mostrando a distribuição das diferentes células adeno-hipofisárias: PRL (+); ACTH (-) ; GH (■); GTH (□); TSH (▲); MSH (●); SL (O). RPD: rostral pars distalis; PPD: proximal pars distalis; PI: the pars intermedia. SANCHEZ CALA et al., 2003.

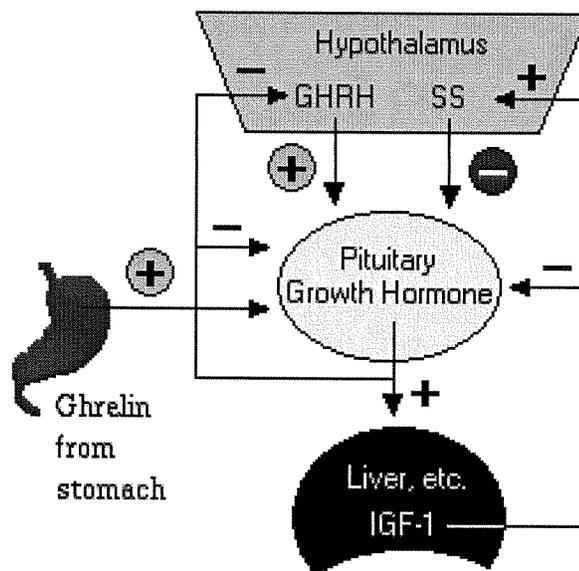


Fig. 5: Representação dos mecanismos de controle da secreção do hormônio de crescimento.

<http://www.growtaller.net/images/NegativeFeedbackCircuit.gif>
<http://arbl.cvmb.colostate.edu/hbooks/pathphys/endocrine/hypopit/gh.gif>

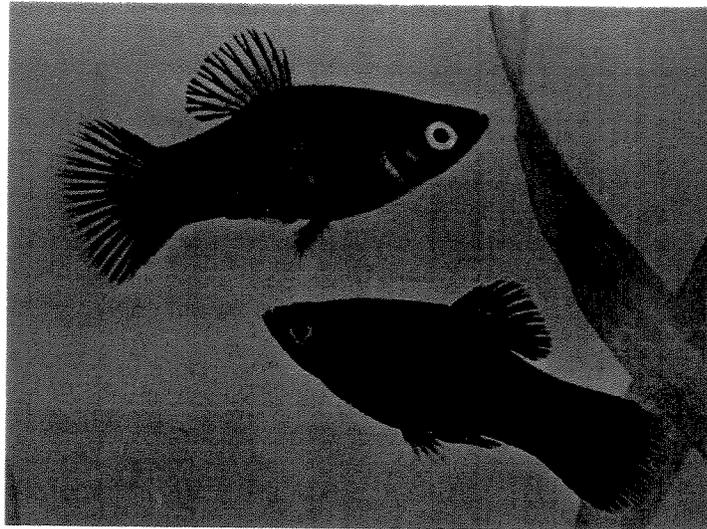


Fig. 6: Exemplar de platy *Xiphophorus maculatus*
http://www.akvariumas.lt/zuvys/poeciliidae/xiphophorus/images/xiphophorus_maculatus_1_big.jpg

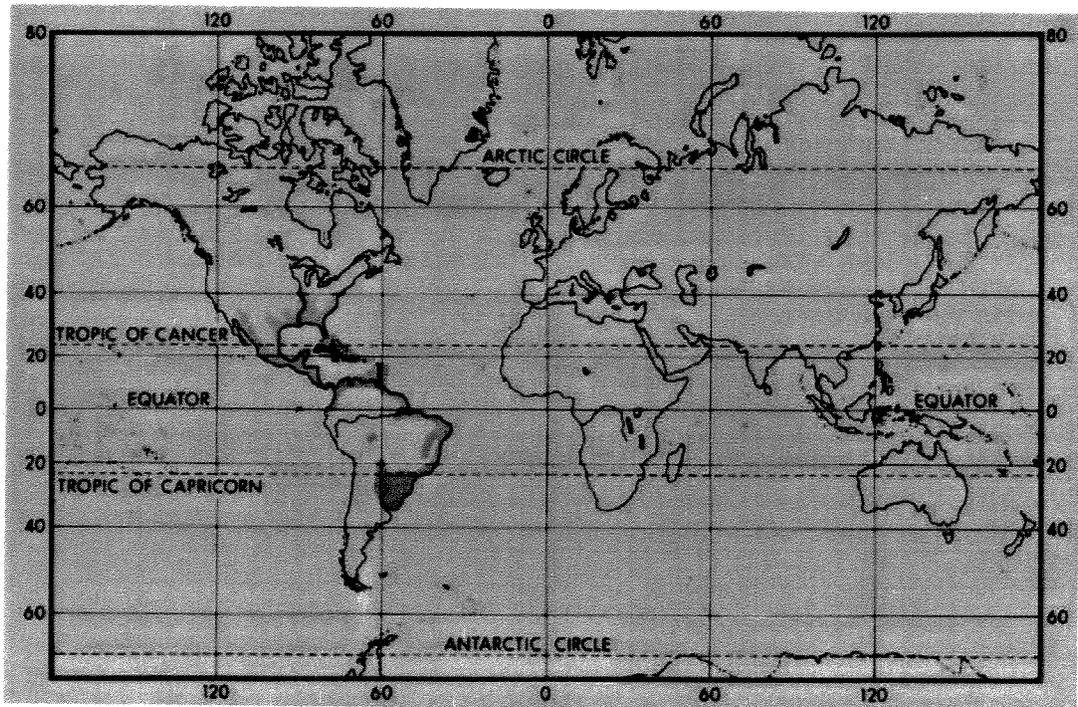


Fig. 7: Distribuição geográfica da família Poeciliidae, segundo ROSEN & BAILEY (1963) apud NELSON (1994).

4. OBJETIVOS

Considerando-se que informações disponíveis sobre os diferentes aspectos da biologia reprodutiva de fêmeas de platy, *Xiphophorus maculatus* Gunther, 1866 (Teleostei, Cyprinodontiformes, Poeciliidae) são insuficientes para subsidiar o desenvolvimento de trabalhos experimentais, o objetivo geral do presente trabalho foi estabelecer parâmetros reprodutivos da espécie e seu uso como modelo experimental. Neste contexto, os seguintes objetivos específicos foram estabelecidos:

- Descrever a morfologia dos ovários de *X. maculatus*, caracterizando em microscopias de luz e eletrônica, os diferentes estádios de desenvolvimento ovocitário;

- Determinar a idade e o tamanho de primeira maturação sexual;

- Analisar os eventos morfológicos da recuperação ovariana após o parto;

- Avaliar os efeitos da administração do hormônio de crescimento no processo de recuperação ovariana pós-parto;

- Avaliar a possibilidade da presença de imunorreatividade para o hormônio de crescimento nos ovários de animais-controle e do acúmulo deste hormônio nos animais tratados com hormônio de crescimento humano; e

- Avaliar diferenças nos valores dos índices corporais entre animais-controle e aqueles tratados com o hormônio, nos diferentes períodos pós-parto considerados nesse estudo.

5. MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi conduzido nos laboratórios e no biotério do Departamento de Biologia Celular/Instituto de Biologia/UNICAMP, e no Departamento de Morfologia/Instituto de Biociências/UNESP-Botucatu.

Para a realização do experimento foram utilizadas 400 fêmeas de platy *Xiphophorus maculatus*. Para o estudo da caracterização dos ovários, da recuperação ovariana pós-parto e para o cálculo dos índices gonadossomático e hepatossomático, e dos fatores de condição K_1 e K_2 , foram utilizadas 105 fêmeas gestantes de platy para o grupo-controle, e 78 para o grupo que foi tratado com o hormônio de crescimento. Para a descrição dos diferentes estádios de desenvolvimento ovocitário em microscopia de luz e microscopias eletrônicas de transmissão e de varredura, utilizou-se em torno de 90 fêmeas. Para a imunohistoquímica, foram utilizadas 21 fêmeas para o grupo-controle e 13 para o grupo tratado nos diferentes períodos pós-parto. Para o estabelecimento da relação peso corporal x comprimento-padrão foram utilizadas 113 fêmeas adultas adquiridas no mercado especializado, e 112 fêmeas jovens nascidas nos aquários onde o experimento foi desenvolvido. Para a determinação do tamanho de primeira maturação sexual, foram amostradas 112 fêmeas jovens nascidas nos aquários.

5.1. Condições de manutenção dos peixes em aquários

As fêmeas adultas provenientes da Cooperativa de Piscicultores de Muriaé/MG foram adquiridas no mercado especializado de Campinas/SP, e mantidas em aquários com capacidade de 50 litros (Fig. 8). Os alevinos destinados ao estudo da determinação da primeira maturação sexual também foram mantidos em aquários com capacidade de 50 litros, obedecendo a razão de um centímetro de comprimento corporal de peixe para cada litro. Cada fêmea foi

isolada em criadeira de plástico para se controlar o momento do sacrifício nos diferentes períodos estabelecidos após o parto.

Os aquários, dotados de sistema contínuo de filtração de água com fluxo de aproximadamente 4 litros/minuto, tiveram a temperatura controlada entre 24-26°C por meio de termostatos e termômetros, e o pH, aferido com “kits” comerciais para este fim, foi mantido entre 7.2-7.3. A iluminação artificial foi mantida por um período de 10 horas/dia. O monitoramento da água, no que se refere à aferição da temperatura, foi realizado duas vezes ao dia, enquanto a avaliação das condições químicas (determinação do pH), foi realizada semanalmente. Quinzenalmente, procedeu-se à substituição de 1/3 do volume da água dos aquários. Neste experimento foi utilizada água mineral, de mesma marca e procedência, para se garantir o mesmo ambiente aos peixes destinados ao estudo de recuperação ovariana e de primeira maturação, e evitar possíveis problemas com o uso de água tratada, quais sejam: variações de pH, teor de minerais dissolvidos, níveis de cloro e contaminação por microorganismos.

Os peixes foram alimentados à vontade, duas vezes ao dia, com ração comercial TetraMin contendo 42-47% de proteína bruta.

5.2. Recuperação ovariana pós-parto e a ação do hormônio de crescimento nos ovários

As fêmeas do grupo-controle foram sacrificadas imediatamente após o parto e a intervalos de 3, 6, 12, 24, 36, 48, 60, 72, 84, 96 e 108 horas pós-parto, após anestesia com solução de benzocaína 1:10000 e incisão dorsal na transição cabeça-tronco. Procedeu-se, então, uma incisão da parede corporal ventral para exposição dos órgãos e remoção dos ovários. Seguindo-se a rotina laboratorial, fragmentos de ovários foram fixados com diferentes soluções fixadoras.

Para o grupo de animais submetidos ao tratamento hormonal, o hormônio de crescimento humano (Hormotrop – Laboratório Bergamo) foi administrado na dose de 2 µg/g de peso corporal (SEIDELIN & MADSEN, 1999; BALDISSEROTO,

2002) imediatamente após o parto, por via intracelomática, depois dos animais terem sido anestesiados com solução de benzocaína 1:10000 e pesados em balança de precisão com sensibilidade de 0,01g. Os peixes foram sacrificados 3, 6, 12, 24, 36, 48, 60, 72, 84, 96 e 108 horas após o tratamento, seguindo-se o mesmo procedimento adotado para o grupo-controle.

Tanto para o grupo-controle quanto para o grupo tratado, a determinação do momento considerado como sendo imediatamente após o parto teve por base as características corporais das fêmeas utilizadas no estudo. Fêmeas gestantes apresentam cavidade corporal extremamente abaulada devido ao desenvolvimento dos alevinos e, na região ventro-caudal da cavidade corporal, observa-se uma mancha escura e de forma triangular - a mancha gravídica (Fig. 9). Imediatamente após o parto, a cavidade corporal esvaziada perde o aspecto abaulado e a mancha escura e triangular, característicos de fêmeas gestantes. A superfície corporal ventral anteriormente arredondada adquire agora um aspecto retilíneo (Fig. 9).

5.3. Primeira maturação sexual

As fêmeas jovens destinadas ao estudo do tamanho de primeira maturação também foram sacrificadas seguindo-se o mesmo procedimento, porém os animais foram colocados inteiros no fixador. Após a fixação, as gônadas foram dissecadas e seguiu-se procedimento de rotina para inclusão em historesina.

O tamanho de primeira maturação sexual foi estimado considerando-se o comprimento-padrão (CP) no qual 50% (L_{50}) dos indivíduos amostrados são adultos (SANTOS, 1978). O tamanho no qual todos os indivíduos estão aptos a reproduzirem-se foi estimado considerando-se o comprimento-padrão no qual 100% dos peixes são adultos (L_{100}). No presente estudo, fêmeas que apresentavam gônadas contendo ovócitos em vitelogênese inicial ou avançada, foram consideradas maduras, sendo classificadas como animais adultos.

5.4. Obtenção de dados biométricos

Após o sacrifício, os animais foram dissecados, e de cada fêmea adulta foram registrados o comprimento-padrão (CP), que é a distância, em centímetros, entre o focinho e o pedúnculo caudal excluindo-se a nadadeira caudal, e ainda o peso corporal (PC), o peso da gônada (PG) e o peso do fígado (PF), em gramas. O comprimento-padrão, em centímetros, foi obtido com auxílio de paquímetro. O peso foi determinado em balança de precisão com sensibilidade de 0,01g. Os dados biométricos obtidos foram utilizados para calcular, para cada fêmea adulta, os índices gonadossomático (IGS) e hepatossomático (IHS), e os fatores de condição K_1 e K_2 .

$$\text{IGS} = \frac{\text{PG}}{\text{PC}} \times 100$$

$$\text{IHS} = \frac{\text{PF}}{\text{PC}} \times 100$$

$$K_1 = \frac{\text{PC}}{\text{CP}^3} \times 100$$

$$K_2 = \frac{\text{PC}-\text{PG}}{\text{CP}^3} \times 100$$

Onde:

IGS = índice gonadossomático

IHS = índice hepatossomático

PG = peso da gônada

PF = peso do fígado

PC = peso corporal

CP = comprimento-padrão

K_1 = fator de condição (com o peso da gônada)

K_2 = fator de condição (sem o peso da gônada)

5.5. Análise estatística

O teste não paramétrico de Mann Whitney (Minitab Release 12.1 for Windows) foi utilizado para testar as variações nos valores médios dos índices calculados para cada período de coleta entre os animais do grupo-controle e do grupo tratado.

Análise de variância (ANOVA) e teste não paramétrico de Mann Whitney foram utilizados para se testar as variações nos valores de peso corporal entre o grupo-controle e o grupo tratado nos diferentes períodos de coleta, além de comparar o peso corporal no momento do parto e no momento do sacrifício do grupo tratado com hormônio.

5.6. Relação peso corporal x comprimento-padrão

A relação peso corporal x comprimento-padrão para a população de fêmeas adultas adquiridas no mercado e para a população de fêmeas jovens criadas no laboratório, utilizadas no estudo de primeira maturação sexual, foi obtida através de regressão linear segundo a equação:

$$PC = a \times CP^b$$

A transformação logarítmica dessa equação foi expressa pela seguinte fórmula:

$$\ln PC = \ln a + b \ln CP$$

Onde:

ln = logaritmo natural

PC = peso corporal

CP = comprimento-padrão

a e b = parâmetros da relação peso corporal x comprimento-padrão

5.7. Microscopia de luz

Para o estudo das características morfológicas das gônadas, os fragmentos de ovário foram fixados em glutaraldeído a 2,5% em tampão cacodilato 0,1M, pH7.2; em solução contendo 2,5% de glutaraldeído e 4% de paraformaldeído em tampão cacodilato 0,1M, pH7.2; em solução contendo 2,5% de glutaraldeído e 4% de paraformaldeído em tampão fosfato 0,1M, pH7.2; em líquido de Bouin; e em solução de formalina tamponada a 10%. O material foi fixado por um período mínimo de 24 horas e preservado em álcool 70%. Em seguida, desidratados, diafanizados e incluídos em paraplast. Do mesmo material, fragmentos foram destinados à inclusão em resina glicol-metacrilato (Historesin/Leica). Nesse caso, o material mantido em álcool 70% foi transferido para álcool 90% por 4 horas. Em seguida, foi mantido em uma solução álcool: resina 1:1, por 12 horas, transferido para resina de infiltração onde permaneceu por mais 24 horas, e logo após foi incluído.

Os fragmentos incluídos em historesina foram seccionados com 3 μm de espessura utilizando navalha de vidro, e aqueles embebidos em paraplast seccionados com 5 a 7 μm com navalha de aço, e submetidos a diferentes técnicas de coloração (hematoxilina-eosina, hematoxilina férrica-eosina, tricrômico de Gomori, tricrômico de Mallory, tricrômico de Masson, azul de toluidina pH2.5, pH4.0 e pH6.5, "xylydine ponceau" pH2.5, "fast green" pH2.5, "Alcian blue" pH2.5 e P.A.S.) para posterior análise microscópica. As colorações foram utilizadas com diferentes objetivos: o azul de toluidina pH6.5, a hematoxilina-eosina e a hematoxilina férrica-eosina, para análises morfológicas gerais; o azul de toluidina

pH4.0, para detecção de polissacarídeos ácidos e componentes celulares fosfatados (DNA e RNA); o azul de toluidina pH2.5, para detecção de polissacarídeos ácidos; "xylydine ponceau" pH2,5 e "fast green" pH2.5, para detecção de proteínas totais; o "Alcian blue" pH2.5, para detecção de polissacarídeos ácidos e sulfatados; os tricrômicos de Gomori, de Mallory e de Masson, para os componentes do tecido conjuntivo; e o PAS, para detecção de polissacarídeos neutros e glicoproteínas.

Algumas gônadas contendo ovócitos em diferentes etapas de desenvolvimento foram congeladas, embebidas em meio de inclusão "tissue-tek", próprio para congelamento em nitrogênio líquido, seccionadas em criostato e submetidas à técnica do Sudan Black.

Cortes semi-finos de material incluído em Epon foram analisados em microscópio de contraste de fase sem coloração e em microscópio de luz após coloração com azul de toluidina, para detecção da presença de lipídios.

As lâminas foram analisadas em fotomicroscópio Nikon Eclipse E800, e as imagens foram capturadas por meio de programa analisador de imagens Image-ProPlus 4.1. Algumas imagens foram obtidas em fotomicroscópio Axioskop Zeiss, utilizando filme Kodak Ultra ASA 400.

Para determinação do diâmetro dos ovócitos, utilizou-se sistema analisador de imagens Image-ProPlus 4.5 acoplado a microcomputador, para obtenção das medidas de diâmetro dos ovócitos em crescimentos primário e secundário inicial. Foram escolhidos ovócitos íntegros, com pouca retração e com corte passando pelo núcleo. Alguns ovócitos em crescimento secundário avançado foram medidos utilizando-se desse mesmo sistema; porém, os núcleos não se encontravam em posição central. Portanto, para avaliar ovócitos nesse estágio, os mesmos não foram cortados sendo medidos utilizando-se uma lupa Zeiss Stemi SV6.

Nos ovócitos em crescimento secundário inicial e avançado, foram obtidas medidas da altura das células foliculares utilizando-se sistema analisador de imagens Image-ProPlus 4.5. Medidas da espessura da zona radiata e membrana

basal foram obtidas a partir de micrografias eletrônicas, utilizando-se régua milimétrica.

5.8. Microscopia eletrônica de transmissão

Para os estudos ultra-estruturais, fragmentos de gônadas foram fixados em solução contendo glutaraldeído a 2,5%, paraformaldeído a 4% em tampão fosfato 0,1M, pH7.2 por no mínimo 24 horas, em geladeira. Após a fixação, o material foi lavado no mesmo tampão do fixador e pós-fixado em tetróxido de ósmio a 1% em tampão fosfato 0,1M, pH7.2 e em tampão imidazol 0,1M, pH7.5 por duas horas, em temperatura ambiente e/ou de geladeira, no escuro. Alguns exemplares passaram por um processo de contrastação em bloco com solução aquosa de acetato de uranila 0,5%. Os fragmentos foram desidratados em soluções crescentes de álcool etílico, seguido de duas passagens em acetona. A desidratação também foi conduzida utilizando-se somente acetona. Em seguida, fez-se a pré-infiltração em mistura de resina-acetona, infiltração e inclusão em resina. Neste estudo foram utilizadas diferentes resinas (Epon, Spurr e Araldite), com o material sendo submetido ou não à agitação em rotor durante o processo de infiltração. Cortes semi-finos obtidos em ultra-micrótomo LKB foram utilizados para a seleção de áreas destinadas a cortes ultrafinos. Após a ultramicrotomia, o material foi montado em telas de cobre e contrastado com acetato de uranila 2% e citrato de chumbo. Também se utilizou contrastação com solução alcoólica saturada de acetato de uranila, após o que, o material foi analisado em microscópio eletrônico de transmissão Leo 906 Zeiss e fotografado com filme Kodak.

5.9. Microscopia eletrônica de varredura

Para estudo em microscopia eletrônica de varredura, fragmentos de ovário foram fixados em glutaraldeído 2,5% em tampão cacodilato 0,1M, pH7.2, por um

período mínimo de 24 horas em temperatura de geladeira, e em formalina a 10% em tampão fosfato por um período mínimo de 24 horas em temperatura ambiente. Após fixação, o material foi lavado na mesma solução-tampão do fixador e transferido para solução-tampão adicionada de concentrações crescentes de sacarose (0,5-3,0M), permanecendo por 48 horas em cada uma das concentrações. Alguns fragmentos foram congelados em nitrogênio líquido e fraturados. Em seguida, foram realizadas pós-fixação com tetróxido de ósmio 1% por 2 horas a 4°C, desidratação em série crescente de etanol, secagem ao ponto crítico Balzers CPD 030, montagem sobre suportes de alumínio, cobertura com ouro no "sputter coater" Balzers SCD 050, e análise ao microscópio eletrônico de varredura JSM 5800LV JEOL.

5.10. Imuno-histoquímica

Para detectar a possível imunorreatividade para hormônio do crescimento nos ovários do platy, foi utilizada a técnica de peroxidase anti-peroxidase, e observação em microscopia de luz. Esta técnica foi conduzida no Laboratório de Patologia Experimental da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP.

Fragmentos de ovários foram fixados em solução de formalina tamponada a 10% por um período de 12-18 horas e incluídos em paraplast. Secções foram montadas em lâminas de vidro, diafanizadas em xilol, hidratadas em bateria de álcool em concentrações decrescentes e lavadas em água corrente por cinco minutos, após o que, as lâminas foram imersas em peróxido de hidrogênio 10 volumes (3X5') (Merck, Alemanha) para inativar a peroxidase endógena, e lavadas novamente em água. Em seguida, procedeu-se à recuperação antigênica das secções em panela a vapor a 95°C por 30 minutos com tampão citrato 10mM pH 6.0. Uma vez frias, foram lavadas em água e mergulhadas em PBS. A incubação com anticorpo de coelho contra hormônio do crescimento de salmão (Dr. H. Kawauchi, School of Fisheries Science, Kitasato University, Japão, gentilmente cedido pelo Dr. J. M. Mancera, Universidade de Cádiz, Espanha) foi conduzida em

câmara úmida, a 37°C por 30 minutos, e depois em refrigerador a 10°C, “overnight”. A diluição do anticorpo foi de 1:5000, conforme padronização. Após refrigeração, as lâminas passaram por três lavagens com tampão PBS em agitador, por um período de cinco minutos cada. Na seqüência, foi aplicado o anticorpo secundário (Kit EnVision Dako), em câmara úmida a 37°C por uma hora, sendo as lâminas, a seguir, lavadas em PBS e transferidas para solução de diaminobenzidina (Sigma, St. Louis, Montana) por cinco minutos a 37°C, lavadas em água corrente e água destilada, contracoradas com hematoxilina de Mayer por 30 segundos, passadas em água amoniacal, água corrente e água destilada, desidratadas e montadas com entellan.

O controle positivo foi conduzido utilizando-se secções de hipófise. Como controle negativo, secções de hipófise foram incubadas na ausência do anticorpo primário, na ausência do anticorpo secundário, e na ausência dos anticorpos primário e secundário, que foram substituídos por tampão TRIS.

As lâminas foram analisadas em fotomicroscópio Nikon Eclipse E800, e as imagens capturadas por meio de programa analisador de imagens Image-ProPlus 4.1.

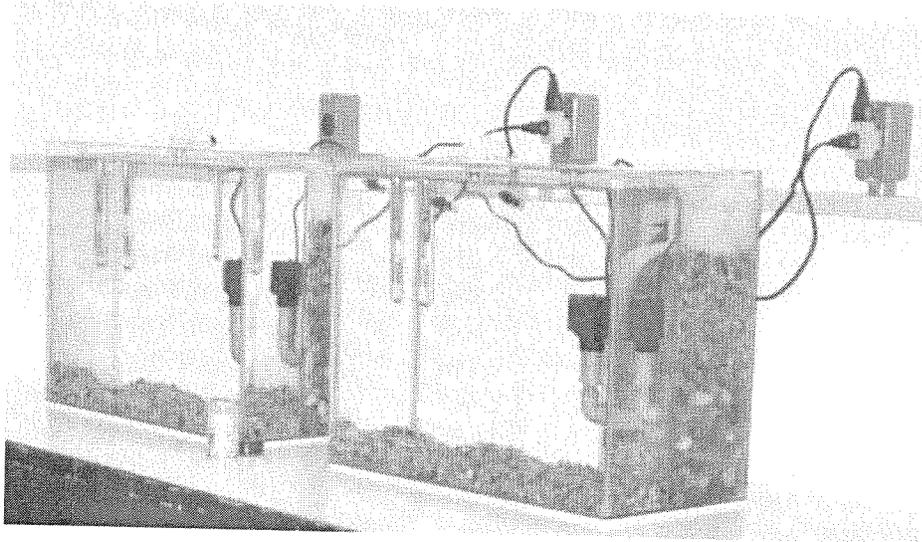


Fig. 8: Aquários utilizados durante o experimento

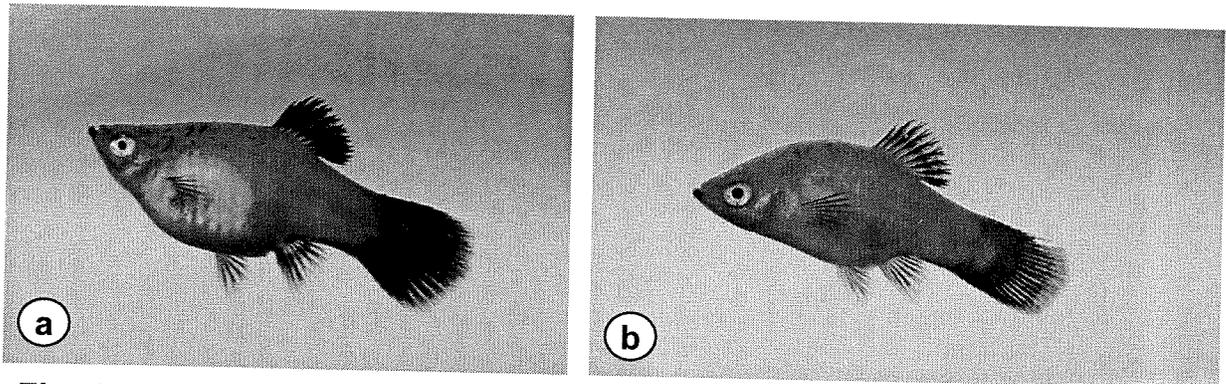


Fig. 9: Exemplos de platy gestante (a) e imediatamente após o parto (b). Observe modificação do aspecto da cavidade corporal que apresenta-se abaulada e com a mancha gravídica em (a), enquanto em (b) a superfície corporal ventral apresenta aspecto retilíneo.

6. RESULTADOS

6.1. Anatomia ovariana

O ovário de *X. maculatus* é um órgão ímpar, oval (Fig. 10), com dimensões variadas, conforme o grau de desenvolvimento. Ele situa-se entre as alças do intestino e quando ocupado por ovócitos vitelogênicos assume posição dorsal na cavidade celomática, ventralmente aos rins. O ovário encontra-se preso ao teto da cavidade por meio de uma prega peritoneal, o mesovário. Na análise macroscópica do ovário após o parto, os folículos imaturos apresentam-se esbranquiçados, tornam-se amarelados e finalmente alaranjados à medida que o vitelo é acumulado, modificando a coloração do órgão (Figs. 11 e 12). Em *X. maculatus*, o ovário maduro normalmente contém folículos em todas as etapas de desenvolvimento (Figs. 46 e 49). Microscopicamente, o ovário é envolto por um epitélio pavimentoso, e profundamente a ele, a parede ovariana contém principalmente fibras musculares. Embora essas fibras estejam orientadas em diferentes direções, elas parecem estar organizadas em duas camadas distintas (Figs. 13-15).

Em *X. maculatus*, o ovário apresenta lume reduzido e sinuoso (Fig. 16, 23 e 46), que se prolonga por um oviduto curto abrindo-se no exterior através da papila urogenital, localizada entre o poro anal e a base dos primeiros raios da nadadeira anal. No epitélio da entrada do ovário, a partir do oviduto, formam-se projeções que constituem reentrâncias onde espermatozóides permanecem armazenados em grande número (Figs. 17, 18 e 21). No tecido conjuntivo da região de armazenamento dos espermatozóides, concentra-se um grande número de eosinófilos (Figs. 19 e 20)

O lume ovariano é revestido por epitélio simples, que pode apresentar-se cúbico ou prismático (Figs. 22-27). No epitélio que se projeta na direção de folículos ovarianos em diferentes fases de desenvolvimento, forma-se uma

invaginação (Fig. 28). Essa invaginação termina num fundo de saco cego e dilatado, que aumenta com o desenvolvimento ovocitário (Figs. 29-35 e 42-45). Suas paredes laterais são constituídas por um arranjo complexo de células, assumindo um aspecto pseudo-estratificado que a tornam bastante espessa (Figs. 30-32). Sua base é constituída por uma camada única de células em contato com a superfície folicular que se torna mais delgada com o desenvolvimento ovocitário (Figs. 29-35). Nas fêmeas inseminadas naturalmente, na região dilatada dessa estrutura em forma de funil, próximo ao folículo, freqüentemente se observa a presença de numerosos espermatozóides (Figs. 33-35). Os espermatozóides também foram detectados no lume do ovário e entre as pregas desse lume, embora em pequeno número.

6.2. Ovogênese

A ovogênese inicia-se com a proliferação e diferenciação das ovogônias.

As ovogônias encontram-se presentes na superfície interna do epitélio germinativo que reveste o lume ovariano e proliferam por mitose, formando ninhos, que ao entrarem em meiose dão origem aos ovócitos. As ovogônias são pequenas, ovóides a ligeiramente arredondadas, o núcleo é grande, oval, descompactado, e com nucléolo evidente (Figs. 36-39). Apresentam citoplasma escasso (Figs. 36-39) contendo muitas mitocôndrias arredondadas e próximas ao núcleo, e pequena quantidade de retículo endoplasmático rugoso (Figs. 66 e 67).

Após divisão, as ovogônias originam ovócitos que inicialmente, à microscopia de luz, apresentam-se muito semelhantes às suas antecessoras imediatas. Estas células, designadas aqui como ovócitos primordiais, são encontradas isoladas ou formando ninhos, possuem forma esférica, citoplasma fracamente corado, com núcleo grande e esférico, e nucléolo proeminente (Figs. 39-41 e 68). Quando entram em crescimento primário, aumentam em diâmetro, o que facilita a sua identificação.

6.2.1. O crescimento primário

Ovócitos nas fases iniciais de crescimento primário apresentam núcleo com nucléolo esférico e compacto (Figs. 42, 46 e 47), e citoplasma basófilo (Figs. 46 e 47) e homogêneo (Figs. 42, 46, 52, 54). Na microscopia eletrônica, mostram organelas membranosas concentradas na região perinuclear (Figs. 69 e 70) e grande quantidade de ribossomos livres no citoplasma. As mitocôndrias inicialmente próximas ao núcleo, agora se distribuem periféricamente (Fig. 74). Com o avanço do desenvolvimento, o ovócito torna-se mais volumoso (Figs. 46, 47, 49 e 52-54), apresentando citoplasma com grande quantidade de ribossomos livres, retículo endoplasmático rugoso e mitocôndrias, além de complexo de Golgi desenvolvido (Figs. 76-78). Material elétron-denso é transferido para o citoplasma, através dos numerosos poros nucleares (Fig. 70). No final do crescimento primário, surgem no citoplasma vesículas fortemente PAS+, localizadas inicialmente próximas ao núcleo (Fig. 49). Em microscópio de contraste de fase, e em microscopia de luz de cortes semi-finos corados com azul de toluidina, este mesmo local é ocupado por gotículas de cor castanho-amarelado. Nesse momento, um número variável de grandes nucléolos localiza-se periféricamente junto à face interna do envoltório nuclear. A morfologia desses nucléolos pode variar com o desenvolvimento ovocitário. São mais ou menos desenvolvidos, outros compactos, redondos (Fig. 69), em forma de anel (Figs. 71 e 72), ou ainda com região fibrilar e granular evidentes (Fig. 73).

Durante o crescimento primário, a formação do folículo ovariano, que é considerado a unidade funcional do ovário, se completa. Ele consiste do ovócito circundado pela zona radiata e pela camada de células foliculares. O folículo está separado do estroma pela membrana basal. Os elementos do tecido conjuntivo se organizam e diferenciam formando a camada de células da teca. No início do crescimento primário, os ovócitos são envoltos por camada única de células foliculares pavimentosas (Figs. 47, 69, 74 e 76), pela membrana basal e células da teca, que possuem natureza conjuntiva (Figs. 74-76). As células foliculares possuem núcleo com cromatina descompactada, citoplasma rico em ribossomos,

com algumas cisternas de retículo endoplasmático rugoso e mitocôndrias (Figs. 69, 74 e 76). Estão conectadas por desmosomos situados nas suas membranas laterais próximos à região basal (Fig. 75). A partir das membranas do ovócito e das células foliculares, formam-se microvilosidades que aumentam em número e tornam-se altamente interdigitadas (Fig. 76). Ao final do crescimento primário, o oolema começa a mostrar aspecto pregueado (Fig. 49). Nessa etapa, a membrana basal apresenta-se homogênea, espessa e associada a fibrilas colágenas (Figs. 74 e 76).

6.2.2. O crescimento secundário

No início do crescimento secundário, o ovócito aumenta muito em tamanho e passa a apresentar citoplasma acidófilo em colorações com hematoxilina-eosina (Figs. 46 e 48). Nesse estágio, o citoplasma mais central, não cortical, é preenchido por numerosas vesículas de diferentes tamanhos (Figs. 43, 46, 48 e 54-59), que reagem diferentemente ao PAS (algumas são fortemente positivas, outras fracamente e outras não se coram) (Fig. 49). Na microscopia eletrônica de transmissão, as vesículas são claras, ou contêm um único grânulo eletrôn-denso ou são eletrôn-densas (Figs. 79-85). O ooplasma periférico é acidófilo (Figs. 46 e 48) e ocupado por várias organelas citoplasmáticas, principalmente mitocôndrias (Figs. 79-82). Além disso, mitocôndrias, retículo endoplasmático rugoso e complexo de Golgi também se dispersam pelo ooplasma (Fig. 83 e 84). O núcleo mantém-se central (Fig. 43, 46, 48, 49 e 58), com um número variável de nucléolos periféricamente localizados. O citoplasma do ovócito aumenta grandemente em volume levando à diminuição da relação núcleo/citoplasma (Figs. 42, 43, 46, 48, 49 e 58).

Na superfície do ovócito, entre as microvilosidades formadas a partir do ovócito e das células foliculares, deposita-se uma substância amorfa e altamente eletrôn-densa, dando início à formação da zona radiata (Fig. 80, 81 e 82). Com o desenvolvimento, a superfície do ovócito passa a mostrar-se intensamente pregueada, formando invaginações profundas (Figs. 46, 48, 49, 55, 56, 81 e 82),

que se refletem no aspecto da zona radiata (Figs. 56, 59, 81 e ,82) e das células foliculares, que se apresentam ora pavimentosas, ora cúbicas (Figs. 46, 49, 55, 56 e 80-82). As células foliculares pavimentosas em transição para cúbicas apresentam núcleo descompactado com nucléolo periférico, citoplasma rico em retículo endoplasmático rugoso e mitocôndrias, e numerosas microvilosidades que partem em direção ao ovócito (Figs. 80-82). Essas células são unidas lateralmente por estruturas juncionais localizadas na extremidade basal da célula, além de se apresentarem extremamente interdigitadas no restante de sua superfície de contato. Nessa etapa do desenvolvimento, a zona radiata é constituída de camada única de substância amorfa e elétron-densa, e possui numerosos poros ocupados pelas microvilosidades (Figs. 81 e 82).

Na seqüência do crescimento secundário, inicia-se a incorporação do vitelo que ocorre a partir da periferia do ovócito (Figs. 44, 48 e 50) e se deposita progressivamente entre as vesículas existentes no citoplasma, deslocando as organelas citoplasmáticas (mitocôndrias e retículo endoplasmático rugoso) para o ooplasma periférico (Figs. 86-88 e 90), que assim se dispõem entre os glóbulos de vitelo e as gotas lipídicas. Vesículas claras são observadas na periferia do ovócito. Ao microscópio eletrônico de transmissão, essas se revelam elétron-densas , sugerindo natureza lipídica, e aumentam em tamanho devido ao processo de fusão com gotas vizinhas (Figs. 50, 62 e 63). Nessa fase, o pregueamento da superfície ovocitária diminui e a maioria das células foliculares torna-se cúbica (Figs. 50 e 63). Essas, têm núcleo descompactado com nucléolo evidente, e citoplasma rico em retículo endoplasmático rugoso e mitocôndrias (Figs. 88-90), além da presença ocasional de corpos multilamelares. Nessa fase, já se observa a formação da segunda camada da zona radiata (Fig. 90) que é atravessada por poros por onde passam as microvilosidades (Figs. 60-62 e 88-90).

Em vitelogênese avançada, os ovócitos de *X. maculatus* apresentam citoplasma acidófilo, praticamente preenchido por uma massa homogênea resultante da fusão dos glóbulos de vitelo (Figs. 51 e 64), e organelas membranosas concentradas junto ao oolema. O núcleo contendo vários nucléolos

pequenos e periféricos começa a migrar para a periferia do ooplasma (Fig. 51). Neste período, a incorporação de glóbulos de vitelo ainda pode ser observada na periferia do ovócito (Figs. 51, 63).

Nesta etapa do desenvolvimento, as vesículas PAS+ deixam de ser visualizadas. A relação núcleo/citoplasma diminui ainda mais com o intenso crescimento do ovócito.

No final da vitelogênese, a zona radiata constituída por duas camadas (a externa mais elétron-densa que a interna) torna-se uma estrutura com aspecto linear e mais espessa que na fase anterior, e diminuem o número de poros e as microvilosidades que partem das células foliculares. As células foliculares tornam-se cúbicas, mostram espaços intercelulares evidentes (Figs. 51 e "inset"), e permanecem ligadas entre si apenas em algumas regiões das membranas laterais. Elas repousam sobre uma lâmina basal de aspecto homogêneo cuja espessura diminui ao longo do desenvolvimento ovocitário, e são circundados por duas camadas de células de natureza conjuntiva, a teca interna e a teca externa, que mantêm aspecto pavimentoso e núcleo achatado durante todo o desenvolvimento (Figs. 80-82 e 88). Entre essas células, observam-se grandes quantidades de fibrilas de colágeno.

No final da maturação, o citoplasma periférico dos ovócitos é ocupado por vesículas elétron-densas de provável conteúdo lipídico (Fig. 45 e 65).

6.3. Citoquímica da ovogênese

6.3.1. Os ovócitos em crescimento primário

Ovócitos em crescimento primário apresentam citoplasma homogêneo e fortemente basófilo. No final desta etapa, o citoplasma torna-se fracamente basófilo e de aspecto granular. Nesse momento, surgem algumas vesículas que não se coram pela maioria das metodologias tradicionalmente utilizadas em microscopia de luz. Porém, quando o material foi processado com tetróxido de ósmio em tampão imidazol, substâncias em geral removidas pelos procedimentos

para inclusão em parafina e historesina foram preservadas. As vesículas anteriormente não coradas mostram agora um conteúdo castanho-amarelado, possivelmente lipídios neutros (Fig. 91). Em microscopia de contraste de fase, utilizando cortes não-corados, essas vesículas também apresentam tonalidade castanho-amarelada. Além disso, em amostras frescas não fixadas, processadas em criostato, o conteúdo destas vesículas reage fortemente ao Sudan Black (SB), indicando a presença de lipídios em geral (Fig. 92).

6.3.2. Os ovócitos em crescimento secundário

Nos ovócitos em crescimento secundário, o aumento gradual da quantidade de vesículas que não se coram pelas colorações habituais, mas que respondem ao SB se intensifica (Fig. 93). No entanto, estas vesículas não respondem ao fast green (FG) (Figs. 96 e 100), ao xylidine ponceau (XP) (Fig. 99) e nem ao Alcian Blue (AB) pH2,5 (Fig. 94). Ao PAS, as vesículas citoplasmáticas se coram forte ou fracamente, ou não se coram (Figs. 95, 98 e 101). Outras vesículas mostram um grânulo, ou região central, fortemente corada (Fig. 97).

À medida que o ovócito se desenvolve, material de natureza acidófila ao HE, vai ocupando o citoplasma a partir da periferia. Com o início da deposição de vitelo, fortemente positivo ao FG, XP e ao PAS (Fig. 98), a resposta ao AB pH2,5 deixa de ser detectada.

Nos ovócitos vitelogênicos (crescimento secundário avançado), os grânulos de vitelo se fundem formando uma massa acidófila compacta que ocupa a região central do ovócito. Tanto a massa, como os glóbulos de vitelo que ainda estão sendo incorporados coram-se fortemente pelas técnicas para proteínas (FG e XP) e polissacarídeos neutros (PAS), mas não respondem à coloração para polissacarídeos ácidos (AB pH2,5). Nestes mesmos ovócitos, quando submetidos à técnica para lipídios (Sudan Black), o vitelo cora-se fortemente em azul e as vesículas não coradas pelas técnicas anteriores, coram-se preto-azuladas (Figs. 102 e 103). Essas vesículas mostram-se acinzentadas em microscopia eletrônica de transmissão (Fig. 104).

A zona radiata dos ovócitos de *X. maculatus* mostrou-se fortemente acidófila em colorações com HE, e positiva para FG (Figs. 96 e 100), PAS (Figs. 97, 101 e 106) e XP (Fig. 99). A positividade ao PAS é observada desde as fases iniciais de crescimento secundário. Além disso, a membrana basal, sobre a qual se apóiam as células foliculares, também responde ao PAS (Figs. 101 e 106). Nos ovócitos em início e mesmo durante o crescimento secundário, a zona radiata é positiva ao AB pH2,5 (Fig. 105), mas deixa de responder a este corante nos ovócitos vitelogênicos.

6.4. Morfometria dos ovócitos e das estruturas ovocitárias

O aumento no diâmetro do ovócito no decorrer do desenvolvimento se deve principalmente ao acúmulo de vitelo e foi acompanhado através da mensuração de ovócitos esféricos, íntegros e com corte passando pelo núcleo. Porém, em vitelogênese avançada, somente sete ovócitos íntegros, com o corte passando pelo núcleo, puderam ser mensurados. O valor médio obtido para estas células foi de $442,45 \pm 111,47 \mu\text{m}$, com o menor ovócito medindo $210,85 \mu\text{m}$ e o maior medindo $543,25 \mu\text{m}$. Na tentativa de sanar o problema, e obter um valor mais próximo do real, ovócitos inteiros de *X. maculatus* nesse estágio de desenvolvimento foram medidos em lupa, conforme metodologia descrita. Os valores médios, desvios-padrão e amplitude do diâmetro dos ovócitos estão expressos na tabela 1.

Os envoltórios dos ovócitos se modificam, acompanhando o desenvolvimento ovocitário. Assim, tanto a altura das células foliculares quanto a espessura da zona radiata aumentam com o desenvolvimento, enquanto a espessura da membrana basal diminui. A espessura máxima obtida para a zona radiata em *X. maculatus* foi de $0,41 \mu\text{m}$ (Tabela 2).

6.5. Recuperação ovariana pós-parto

6.5.1. Imuno-histoquímica

Não foi detectada imunorreação para hormônio de crescimento nos ovários do platy, tanto nos animais do grupo-controle quanto nos animais do grupo tratado, nos diferentes períodos considerados nesse estudo (Figs. 109-114).

Contra-prova clara é obtida tanto pela marcação positiva de hipófise de peixe, quanto pela ausência total de imuno-marcação dos controles negativos na omissão do anticorpo primário, na omissão do anticorpo secundário, e dos anticorpos primário e secundário (Figs. 107 e 108).

6.5.2. Recuperação ovariana pós-parto no grupo-controle

A análise dos fragmentos de ovários mostrou que ovócitos primários e secundários estão sempre presentes nas gônadas, independentemente do período de coleta considerado (Figs. 115, 116, 118, 120 e 122). Os ovócitos vitelogênicos iniciais e avançados observados nos ovários de *X. maculatus* imediatamente após o parto provavelmente iniciaram seu amadurecimento durante a gestação (Figs. 123 e 124). Ovogônias e ovócitos pré-primários, apesar de estarem presentes, dificilmente são visualizados devido ao seu pequeno tamanho.

A avaliação dos ovários de *X. maculatus* nos diferentes períodos de coleta mostra, no entanto, que estes ovócitos entram em processo de atresia. À medida que ocorre involução dos folículos vazios e os ovários se reorganizam e se preparam para a nova gestação, os ovócitos que se encontram em vitelogênese inicial amadurecem e se preparam para a fertilização.

Nesses animais, assim como nos animais do grupo que foi tratado com o hormônio, também foi possível observar a presença de embriões nos ovários de *X. maculatus* após o parto.

6.5.3. Ação do hormônio de crescimento na recuperação ovariana pós-parto

A análise dos fragmentos de ovários mostrou que ovócitos primários e secundários estavam sempre presentes nas gônadas, independentemente do período de coleta considerado (Figs. 117, 119 e 121).

Nas fêmeas de *X. maculatus*, submetidas ao tratamento com hormônio de crescimento, os eventos da atresia folicular são mais duradouros e atingem um número maior de ovócitos. Além dos eventos observados imediatamente após o parto em ovócitos vitelogênicos, nos espécimes analisados às 60, 72 e 84 horas pós-parto, os ovócitos em vitelogênese inicial, e que provavelmente se desenvolveram após o parto, também entram em atresia. Nestes grupos, os valores de K_1 e K_2 são menores do que aqueles dos animais do grupo-controle (Tabelas 3 e 4).

6.5.4. Involução de folículos atrésicos e de folículos vazios

6.5.4.1. A atresia folicular

A atresia folicular foi um processo freqüentemente observado nos ovários de *X. maculatus*. Durante este processo, os ovócitos envolvem, passando por várias fases de degeneração e reabsorção (Figs. 125-136).

Em *X. maculatus*, figuras de atresia foram observadas em ovócitos em crescimento secundário (inicial e avançado), principalmente naqueles em vitelogênese avançada.

Na seqüência, os eventos de atresia levam ao aparecimento de fendas na zona radiata (Figs. 125, 126, 130 e 131), desorganização do citoplasma periférico tanto nos ovócitos em vitelogênese inicial quanto naqueles em vitelogênese avançada (Figs. 126, 127 e 131), hipertrofia das células foliculares que se tornam vacuolizadas em decorrência da ingestão e digestão do vitelo (Figs. 126, 127, 131-133), fragmentação e dissolução da zona radiata (Figs. 127 e 128) e invasão do

citoplasma pelas células foliculares (Figs. 129 e 134) que, no final, acumulam pigmento castanho-amarelado (Figs. 135 e 136).

Durante a atresia folicular, em *X. maculatus*, o tecido conjuntivo que circunda o ovócito em degeneração torna-se ricamente vascularizado e eosinófilos conduzidos a estes sítios pelo aumento da vascularização local estão presentes desde as etapas iniciais do processo (Fig. 130). Em *X. maculatus* (presente estudo), o número de eosinófilos foi maior nas fêmeas tratadas com o hormônio de crescimento do que naquelas mantidas em condições controladas .

Nos estádios finais da atresia folicular, os eosinófilos são encontrados no interior dos folículos atrésicos, entremeados às células que agora contêm pigmentos castanho-amarelados (Fig. 136).

6.5.4.2. Os folículos vazios

Em *X. maculatus*, os folículos vazios, estruturas remanescentes nos ovários após o parto, são contínuos com o lume do ovário. Eles apresentam um lume amplo e irregular, e parede constituída por camada única de células foliculares, pela teca e por uma camada de células musculares lisas (Fig. 137).

As células foliculares, que inicialmente são cúbicas e parecem estar alinhadas, tornam-se hipertróficas, apresentam núcleo grande, com nucléolo evidente, localizado na porção basal da célula, e perdem o arranjo linear (Figs. 137 e 138). O citoplasma é acidófilo (Figs. 137 e 138), e as vesículas observadas no citoplasma dessas células, fortemente acidófilas em HE (Fig. 143), são também PAS+, além de elétron-densas ao MET.

Em *X. maculatus*, a cavidade remanescente no folículo vazio após a expulsão do alevino, tem o lume gradativamente obstruído pela proliferação e hipertrofia de células foliculares (Figs. 139-141), pela liberação de restos celulares e por uma secreção de natureza acidófila (Fig. 142 e 143) e PAS+. Com o avanço do processo de involução do folículo vazio, as dobras da parede do folículo diminuem, mas ainda mantêm sua forma irregular. Hemácias em grande quantidade sempre estiveram presentes entre as células do folículo vazio, nas

diferentes etapas da involução (Figs. 137, 139, 141 e 142); porém, eosinófilos só foram observados no interior dos folículos vazios nas etapas mais avançadas do processo de involução, quando o lume já se encontrava praticamente obliterado pelas células foliculares (Figs. 141 e 144). As células foliculares que preenchem o lume do folículo vazio apresentam núcleo descompactado e nucléolo evidente; porém, células foliculares apresentando cromatina condensada em grumos espalhados pelo núcleo também são encontradas no interior deste folículo (Figs. 140 e 141).

Durante a involução dos folículos vazios, a estrutura ovariana é restabelecida, e o lume se reorganiza. Até 108 horas de coleta pós-parto, em cortes em que a detecção de folículos vazios não é mais possível, uma quantidade razoável de conjuntivo ovariano se mantém entre os ovócitos em desenvolvimento. Nos ovários em que a maioria dos ovócitos encontra-se em vitelogênese avançada, a visualização do tecido conjuntivo do estroma ovariano é dificultada pelo grande tamanho que estes ovócitos atingem.

6.6. Análise quantitativa da recuperação ovariana pós-parto

A análise quantitativa da recuperação pós-parto de *X. maculatus* foi conduzida tomando-se por base os índices IGS, IHS, K_1 e K_2 . O cálculo dos valores médios para esses índices utilizou, para o grupo-controle, 105 fêmeas distribuídas em diferentes grupos em função dos diferentes períodos de coleta pós-parto. Para o grupo tratado com hormônio, o cálculo utilizou 78 fêmeas.

Nos períodos considerados, comparando-se os valores de IGS, IHS, K_1 e K_2 , entre os grupos controle e tratado, os maiores valores foram encontrados no grupo-controle, principalmente para os fatores de condição (Tabelas 3 e 4). Entretanto, a análise estatística não mostrou diferenças significativas nos valores de IGS entre os grupos controle e tratado, nos diferentes períodos de coleta analisados. Diferenças significativas nos valores de IHS entre os grupos foram observadas apenas 84 horas pós-parto (Tabelas 3 e 4).

Diferenças estatísticas para os valores de K_1 e K_2 , são observadas às 36, 60 e 72 horas pós-parto, apesar de diferenças significativas ainda serem encontradas para os valores de K_1 com 84 e 96 horas pós-parto (Tabelas 3 e 4).

Nesse mesmo sentido, foram conduzidas análises para se comparar o peso corporal dos animais do grupo-controle e do grupo tratado no momento do sacrifício, e o peso corporal dos animais tratados após o parto e no momento do sacrifício. Diferenças estatísticas foram encontradas quando foram comparados os grupos controle e tratado no momento do sacrifício, com maiores valores sendo observados no grupo-controle. As diferenças foram constatadas tanto pela utilização de análise de variância (ANOVA) como pela utilização de testes não-paramétricos (Mann Whitney). No que diz respeito à comparação entre os grupos controle e tratado nos diferentes períodos de coleta, diferenças significativas foram observadas às 36, 60 e 72 horas (Tabelas 3 e 4). A análise no momento do parto e ao sacrifício das fêmeas que receberam a dose do hormônio não mostrou diferenças significativas nos valores de peso corporal com a utilização dos métodos mencionados.

6.7. Relação peso corporal x comprimento-padrão

A relação entre o peso corporal (PC) e o comprimento padrão (CP) foi estabelecida para fêmeas jovens de *X. maculatus* utilizadas no estudo de primeira maturação sexual, e também para as fêmeas adultas utilizadas para o estudo da recuperação ovariana (Gráficos 1 e 2), sendo representadas pelas equações a seguir:

$$\ln PC = \ln a + b \ln CP$$

$$\text{Fêmeas jovens: } \ln PC = \ln 0,0365 + 2,9958 \ln CP \quad r^2 = 0,9149$$

$$\text{Fêmeas adultas: } \ln PC = \ln 0,0395 + 2,857 \ln CP \quad r^2 = 0,9113$$

6.8. Primeira maturação sexual

Utilizando-se as características macroscópicas e microscópicas (Figs. 145-150) dos ovários coletados de fêmeas jovens mantidas em condições controladas, determinou-se pelo método do L_{50} , o tamanho de primeira maturação sexual das fêmeas de *X. maculatus*, e através do L_{100} , o tamanho no qual todos os exemplares são adultos. O tamanho de primeira maturação sexual (L_{50}) foi estimado em 2,03 cm de comprimento-padrão (Tabela 5 e Gráfico 3). O tamanho no qual toda a população está apta a reproduzir (L_{100}) foi estimado em 2,5 cm de comprimento-padrão (Gráfico 3). Fêmeas gestantes, com comprimento-padrão de 2,5 cm, confirmam o valor estimado para L_{100} .

Em *X. maculatus*, peixes a partir de 100 dias de idade apresentando gônadas com ovócitos em vitelogênese inicial ou avançada, encontravam-se em fase ativa de maturação gonadal, sendo, portanto, estes animais classificados como adultos (Tabela 6).

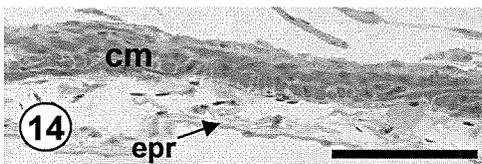
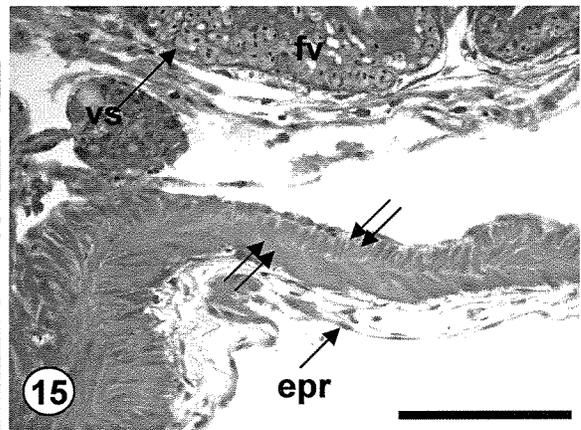
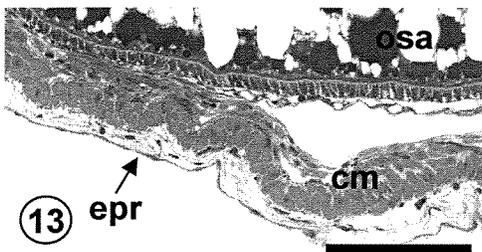
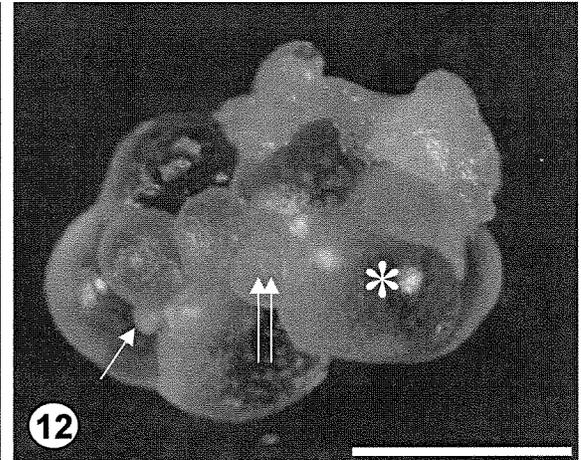
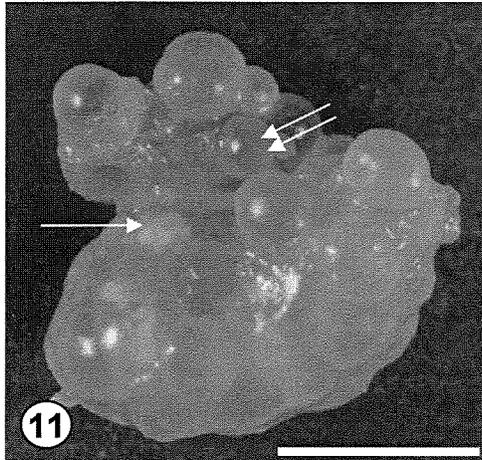
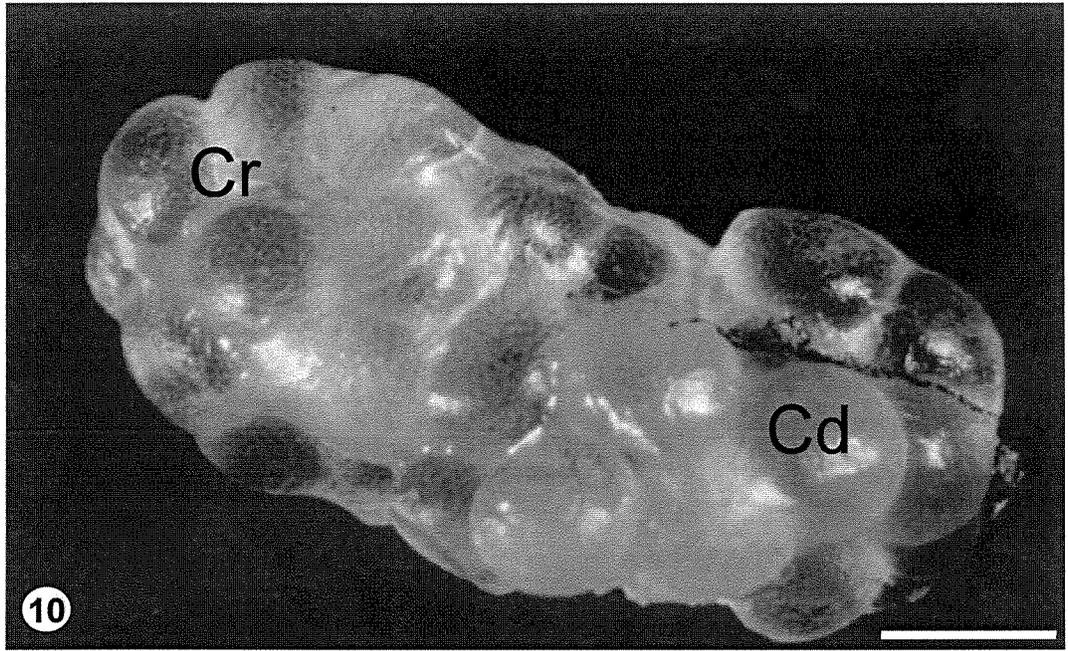
6.9. Figuras

Figs. 10-12 - Ovários *X. maculatus* contendo ovócitos em diferentes fases de desenvolvimento: ovócito primário (seta simples); ovócito secundário inicial (setas duplas); ovócito secundário avançado (asterisco). Cr- região cranial; Cd- região caudal.

Figs. 13-15- Epitélio de revestimento do ovário (epr) constituído por células pavimentosas. Profundamente ao epitélio, albugínea ovariana dotada de grande quantidade de células musculares lisas (cm) dispostas em duas camadas (setas duplas). fv- folículo vazio; osa- ovócito secundário avançado; vs- vaso sanguíneo.

Coloração: Figs. 13 e 15- AT; Fig. 14- HE

Barra: 10-12 (2000 μ m); 13-15 (100 μ m).



Figs. 16, 17 e 18- Secção de ovário de *X. maculatus* mostrando entrada para a gônada (asterisco) que conduz ao lume (Lu) do órgão. Nessa região, criptas (setas) onde ocorre o armazenamento dos espermatozóides.

fv- folículo vazio; ml- músculo liso; opi- ovócito primário inicial; osi- ovócito secundário inicial; osa- ovócito secundário avançado.

Fig. 19- Maior aumento da região delimitada em 18.

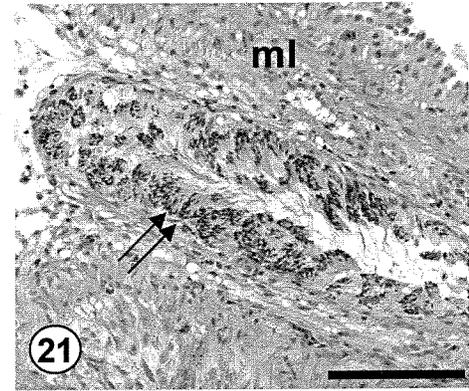
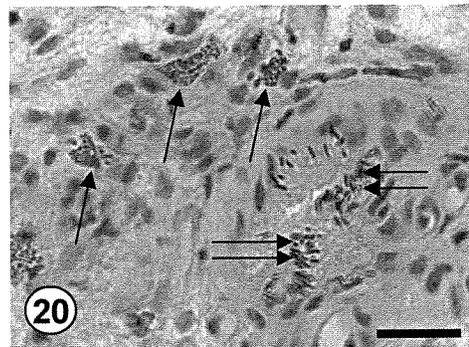
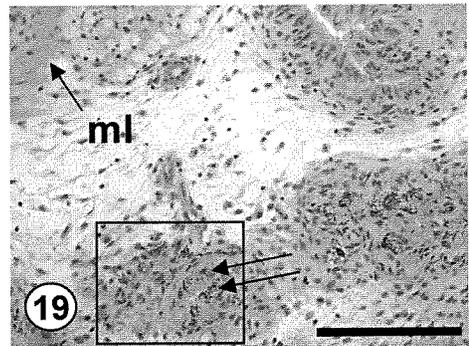
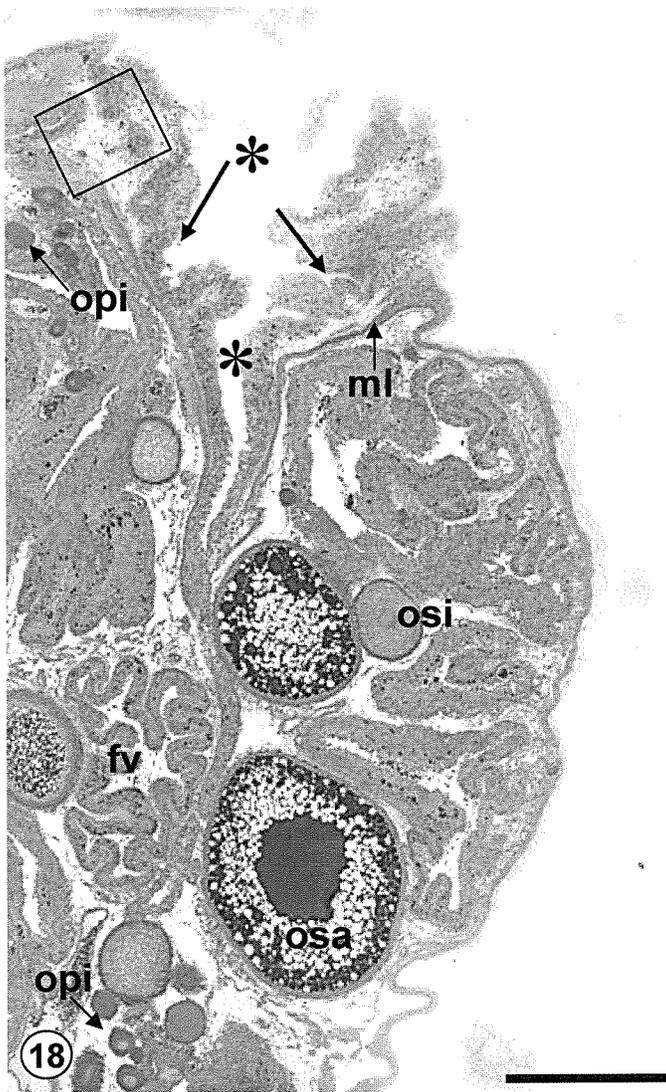
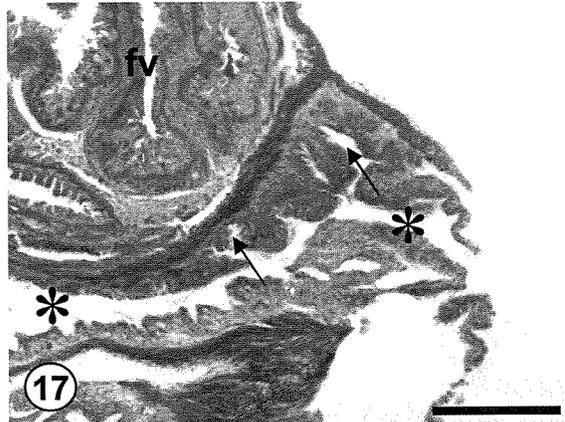
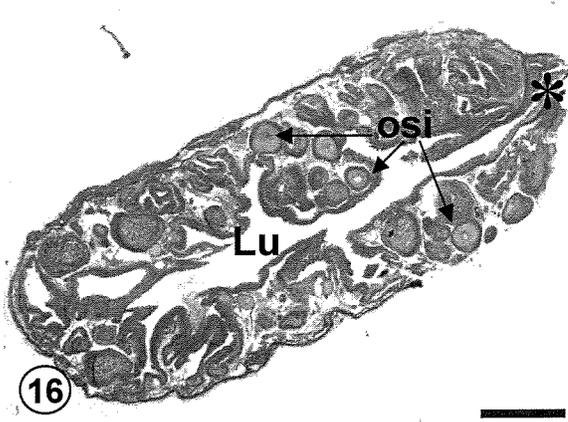
Fig. 20- Maior aumento da região delimitada em 19.

Nas duas figuras acima, espermatozóides (setas duplas) localizam-se entre as células da cripta. Presença de numerosos eosinófilos (seta).

Fig. 21- Detalhe de uma cripta repleta de espermatozóides (setas duplas).

Coloração: Figs. 16 e 17- Tricrômico de Gomori; Figs. 18-21- HE

Barra: 16, 18 (500 μ m); 19, 21 (100 μ m); 17 (150 μ m); 20 (20 μ m).

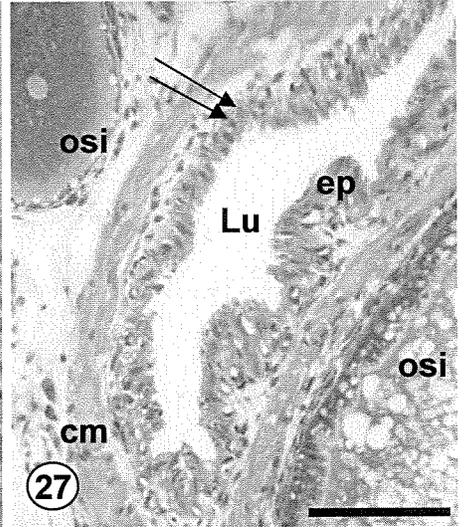
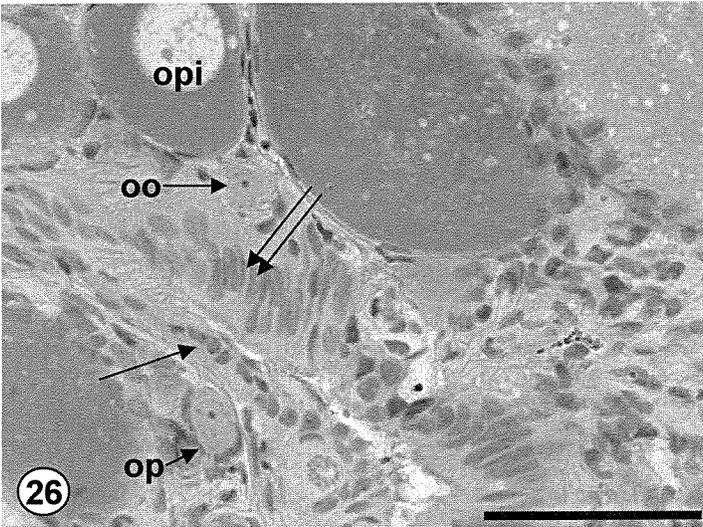
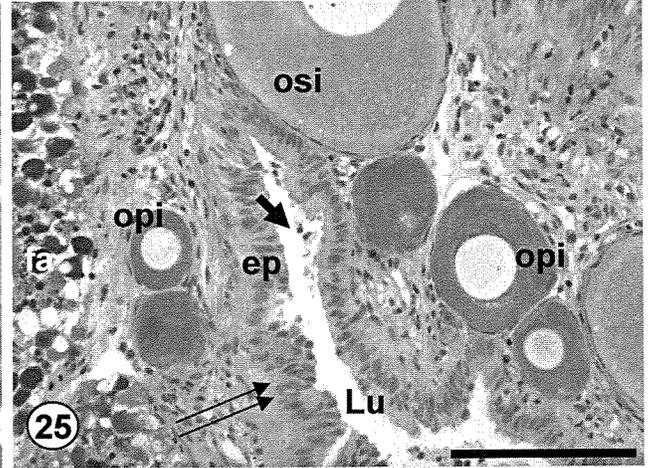
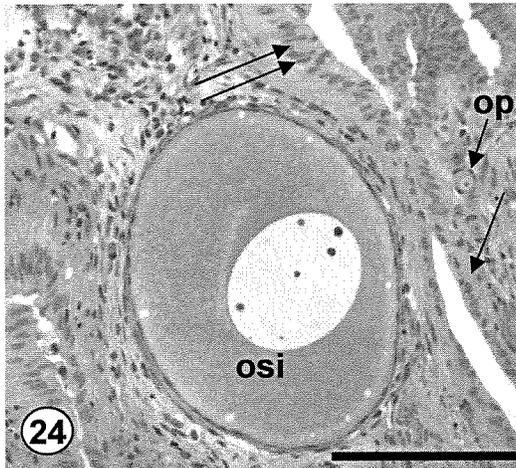
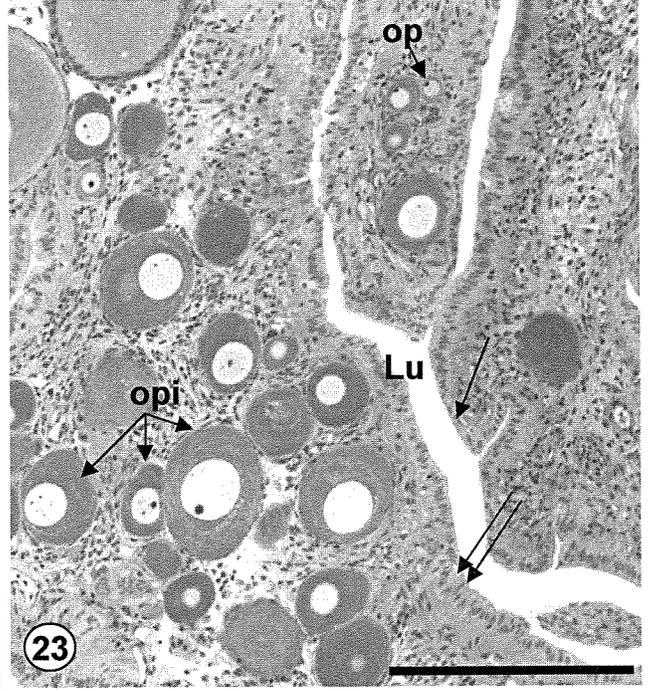
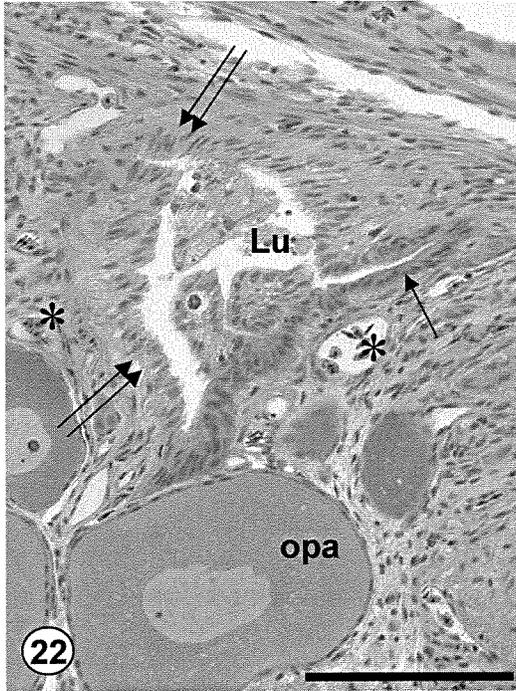


Figs. 22 a 27- Lume ovariano (Lu) revestido por epitélio simples cúbico (seta simples) ou prismático (seta dupla) e circundado por células musculares lisas (cm). Presença de células descamadas no lume (seta larga).

ep- epitélio do lume; fa- folículo atrésico; oo- ovogônia; op- ovócito primórdial; opi- ovócito primário inicial; opa- ovócito primário avançado; osi- ovócito secundário inicial; * vaso sanguíneo.

Coloração: Figs. 22 e 26- HE; Figs. 23-25 e 27- AT

Barra: 22-25 (100 μ m); 26, 27 (50 μ m).



Figs. 28 e 29- Início do processo de formação da invaginação em forma de funil, partindo do lume ovariano em direção a ovócitos (setas). Células prismáticas formam o epitélio desta estrutura. Na figura 29, estabelecimento de contato entre o ovócito primário avançado (opa) e a invaginação.

Fig. 30- Invaginação do epitélio do lume em ovócito secundário inicial (osi). Base da estrutura formada por células cúbicas (cb), e paredes laterais (cpl) constituídas por células prismáticas que formam um epitélio pseudo-estratificado. asterisco- lume da invaginação; zr- zona radiata; cf- células foliculares cúbicas.

Figs. 31 e 32- Aspecto da invaginação (seta) em ovócito secundário avançado (osa). A base da estrutura (cb) é constituída por células cúbicas e suas paredes (cpl) apresentam células prismáticas mostrando epitélio que varia de simples a pseudo-estratificado. Raras células tecais entre as células da base da invaginação e as células foliculares (cf). mb- membrana basal; zr- zona radiata.

Figs. 33, 34 e 35- Detalhes da invaginação em ovócito vitelogênico avançado (osa). As células que constituem a base da estrutura (cb) podem apresentar-se prismáticas (Fig. 33) ou cúbicas (Figs. 34 e 35). No lume dessa invaginação (*) presença de espermatozóides (setas).

Coloração: Figs. 28, 29, 31-34- HE; Fig. 30- AT; Fig. 35- Tricrômico de Gomori

Barra: 28, 29 (100 μ m); 30, 33 (30 μ m); 31 (150 μ m); 32 (50 μ m); 34 (15 μ m); 35 (25 μ m).

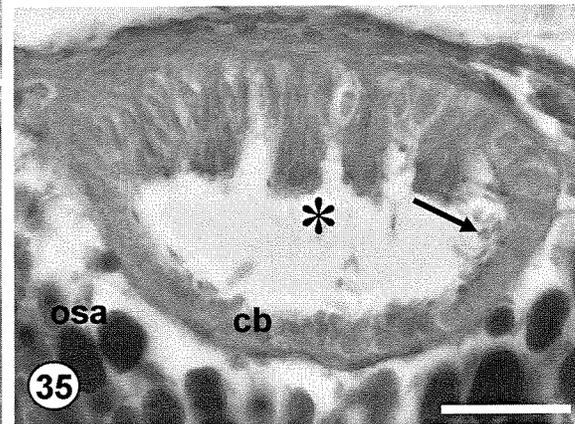
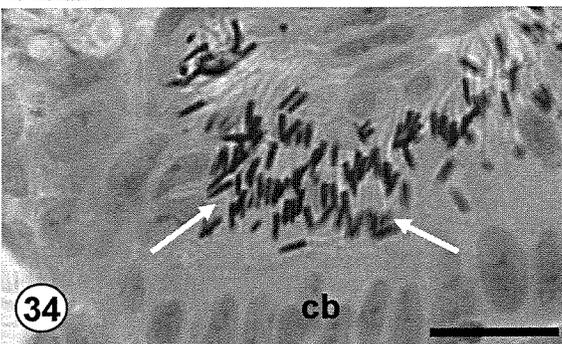
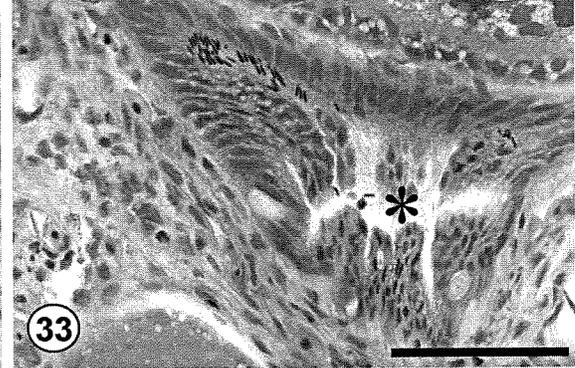
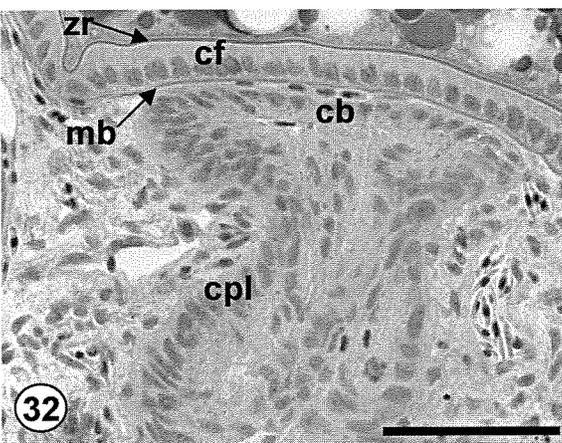
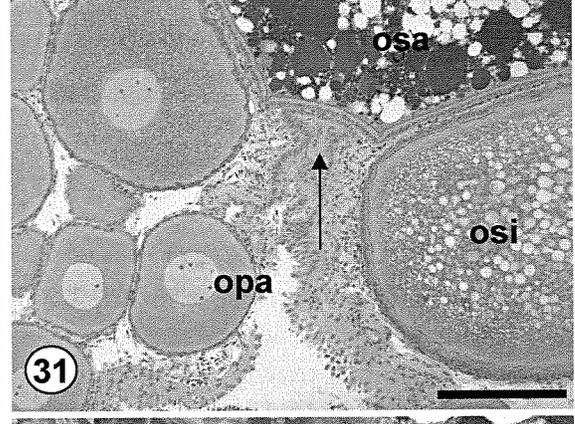
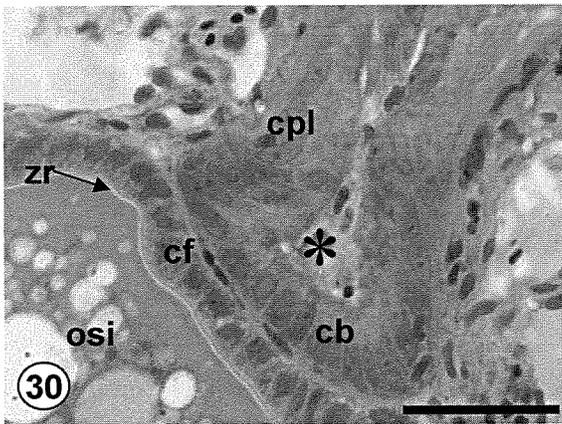
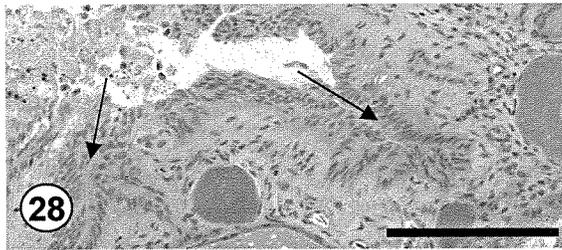


Fig. 36- Ovogônia (seta dupla) submergindo no tecido ovariano a partir do epitélio do lume (ep). Nessa região, célula do epitélio do lume apresenta aspecto prismático. Ovócito primordial isolado e em grupo (seta simples) próximo ao epitélio do lume (ep).

Figs. 37 e 38- Ovogônias (setas duplas). Células pré-foliculares (setas duplas curtas) iniciam o envolvimento das ovogônias.

Fig. 39- Grupo de ovogônias e de ovócitos primordiais (setas) envoltos por células de aspecto triangular (seta curta).

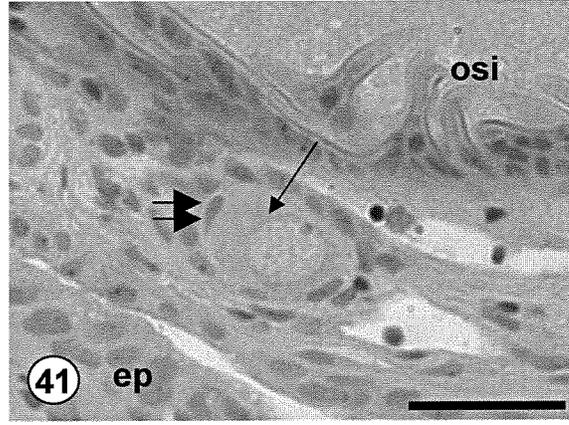
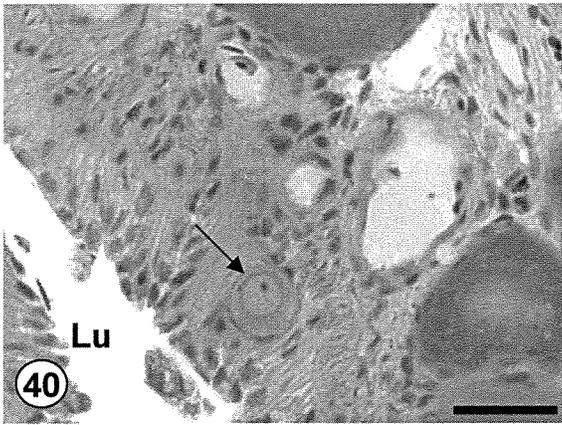
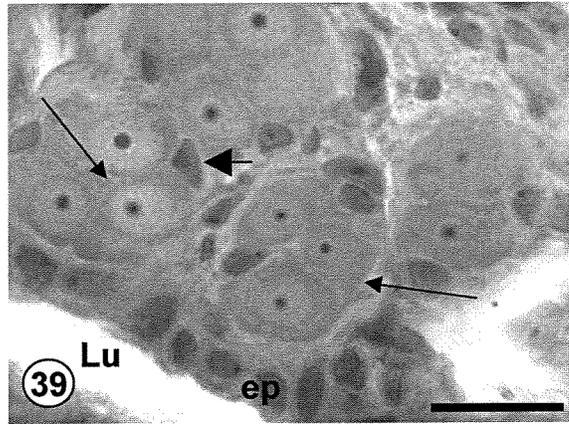
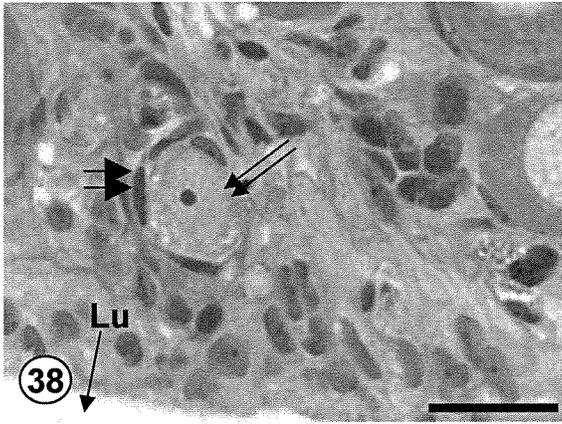
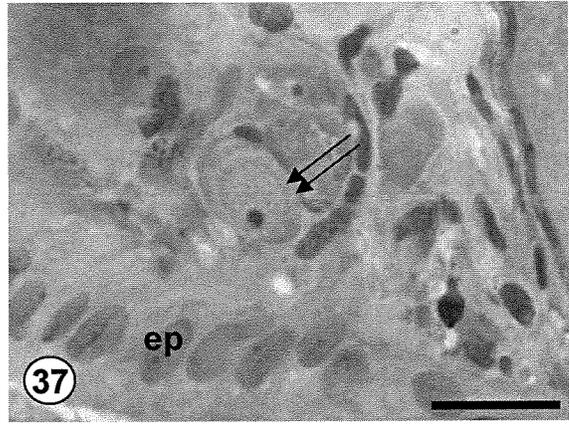
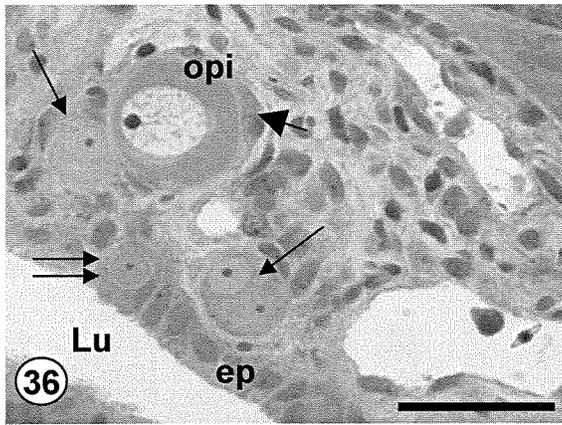
Fig. 40- Ovócito primordial (seta simples) com citoplasma fracamente basófilo e núcleo volumoso com nucléolo evidente próximo ao epitélio do lume. Esse ovócito parece estar envolvido por célula pré-folicular.

Fig. 41- Ovócito primordial (seta) com núcleo arredondado, nucléolo evidente e citoplasma fracamente basófilo, envolto por célula pré-folicular (seta dupla curta)

Lu- lume ovariano; ep- epitélio do lume; opi- ovócito primário inicial envolvido por célula folicular de aspecto pavimentoso (seta curta); osi- ovócito secundário inicial.

Coloração: Figs. 36-39- AT; Figs. 40 41- HE

Barra: 37-39 (15 μ m); 36, 40, 41 (30 μ m).



Figs. 42-46- Secções de ovário de *X. maculatus* apresentando ovócitos em diferentes estádios de desenvolvimento. Nas figuras 42 a 44, lume do ovário (Lu) forma uma invaginação (asterisco) que se projeta em direção ao ovócito. Essa mesma invaginação é observada em 45.

opi- ovócito primário inicial; opa- ovócito primário avançado; osi- ovócito secundário inicial; osa- ovócito secundário avançado; Nu- nucléolo; gv- glóbulos de vitelo; cf- célula folicular; vs- vaso sanguíneo; Li- gota lipídica; Lu- lume ovariano; V- vitelo.

Coloração: Figs. 42 e 43- AT; Figs. 44-46- HE

Barra: 42-45 (50 μ m); 46 (240 μ m).

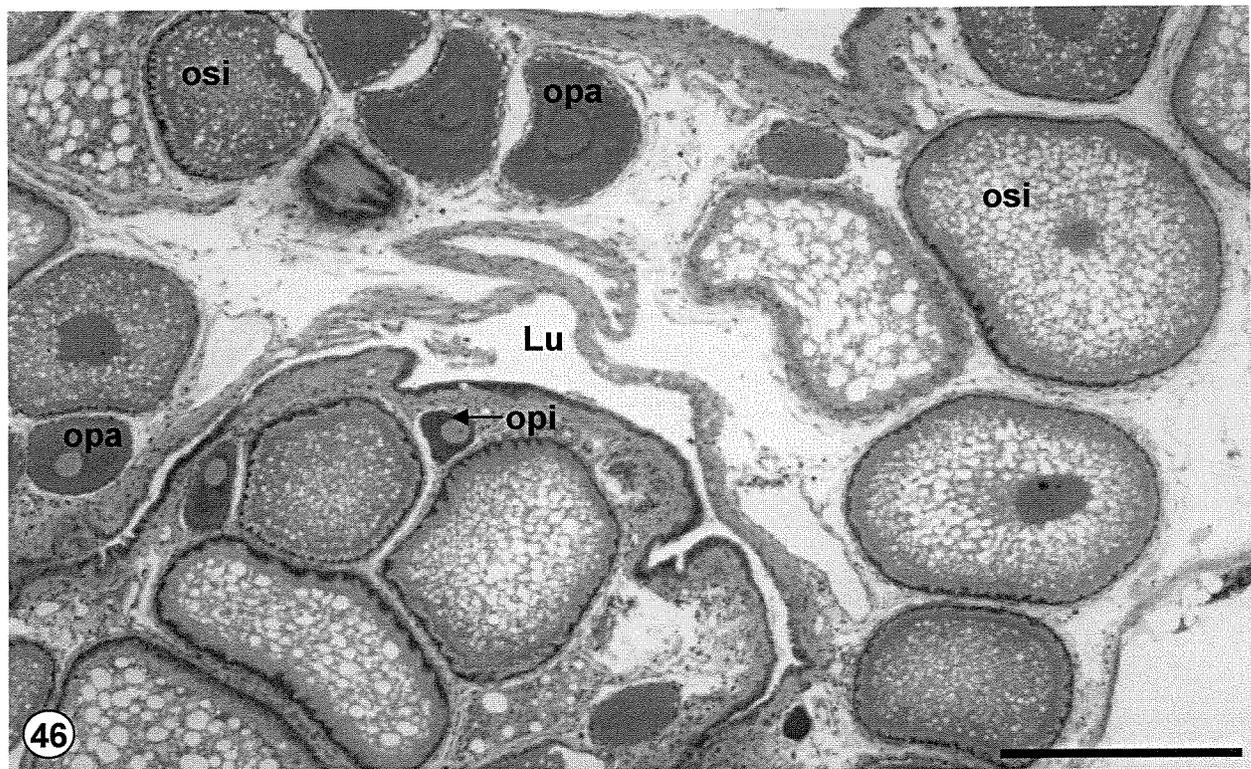
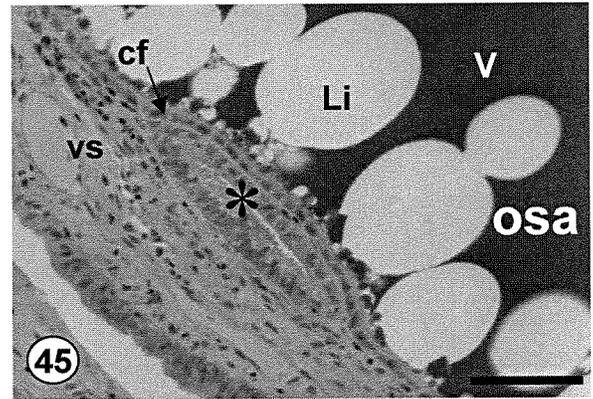
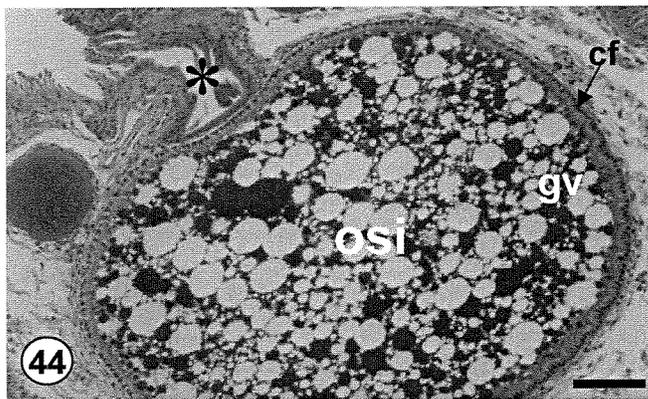
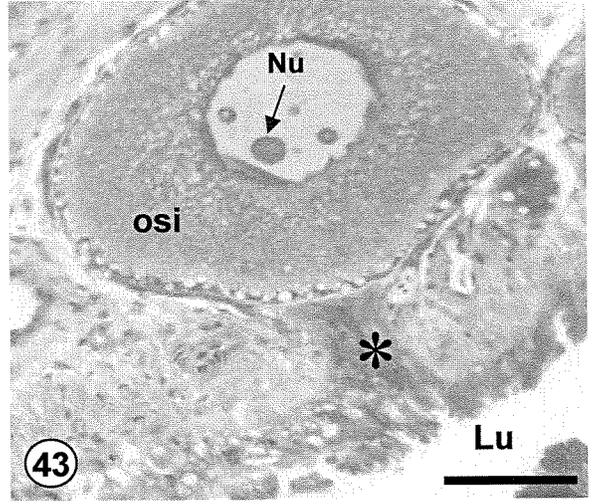
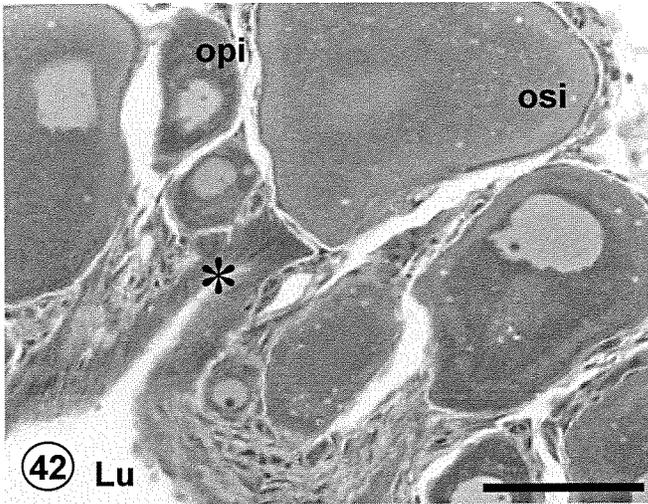


Fig. 47- Ovócitos em crescimento primário inicial (opi) e avançado (opa). Ovócitos primários avançados envoltos por células foliculares pavimentosas (cf).

Fig. 48- Ovócitos em crescimento secundário inicial (osi). Citoplasma ocupado por vesículas que não se coram, periferia acidófila, indicando deslocamento de organelas citoplasmáticas para essa região. Início do processo de deposição de vitelo observado pela presença de glóbulos periféricos fortemente corados (gv).

Fig. 49- Ovócitos em crescimento primário avançado (opa) e em crescimento secundário inicial (osi). Nesses ovócitos, presença de vesículas fortemente PAS+, outras fracamente PAS+ e vesículas que não se coram. Nesses osi presença de zona radiata pregueada (zr) e periferia do citoplasma ovocitário fortemente corada pelo Fast Green.

Fig. 50- Ovócito secundário inicial mostrando vitelo incorporado na periferia.

Fig. 51- Ovócito secundário avançado mostrando núcleo deslocado para a periferia. *Inset-* Detalhe mostrando espaços entre células foliculares.

cf- célula folicular; gv- glóbulos de vitelo; Li- gotas lipídicas; N- núcleo; nu- nucléolo; opi- ovócito primário inicial; opa- ovócito primário avançado; osi- ovócito secundário inicial; t- teca; tc- tecido conjuntivo ovariano contendo músculo liso; V- vitelo; zr- zona radiata.

Coloração: Figs. 47, 48, 50, 51 e *Inset-* HE; Fig. 49- PAS/FG

Barra: 47, 48, 50, *Inset* (50µm); 49, 51 (150µm).

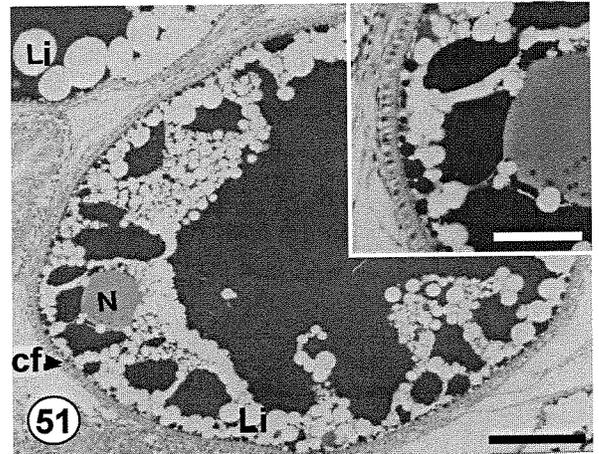
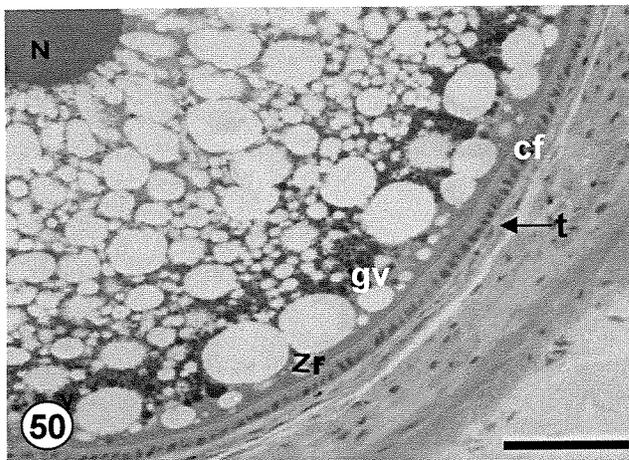
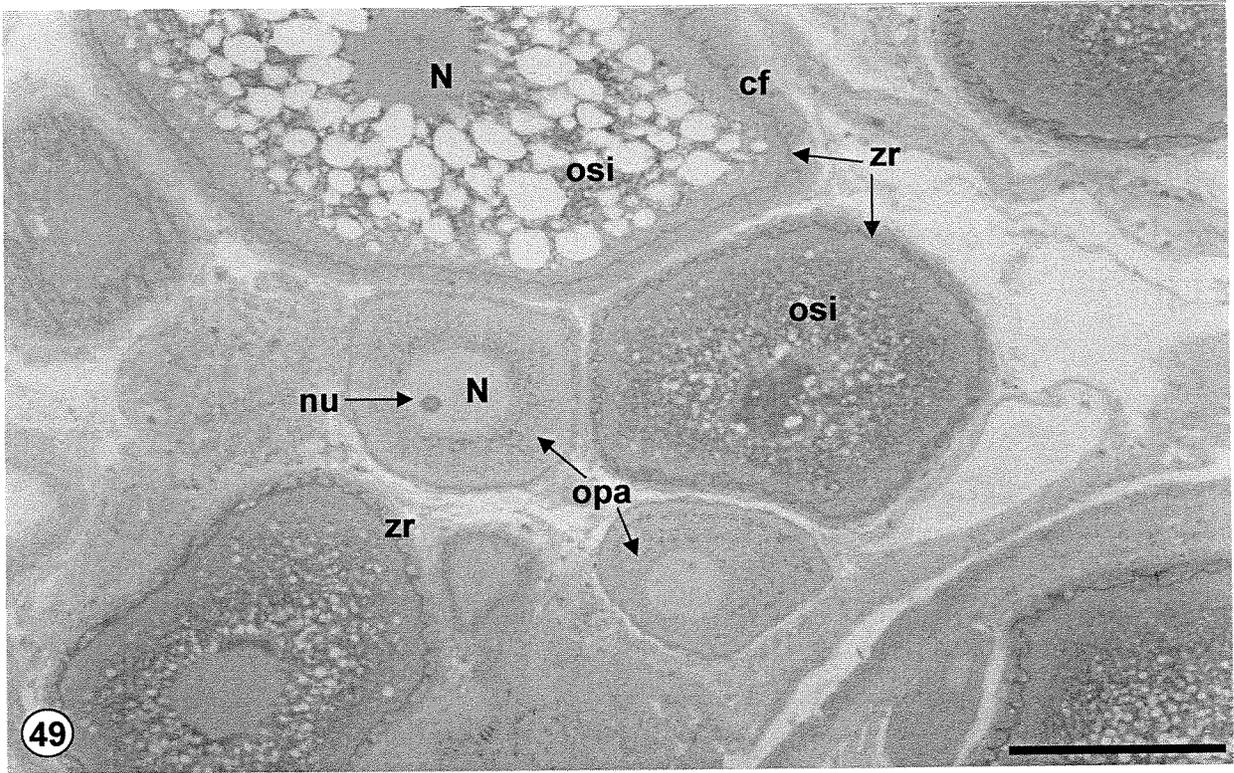
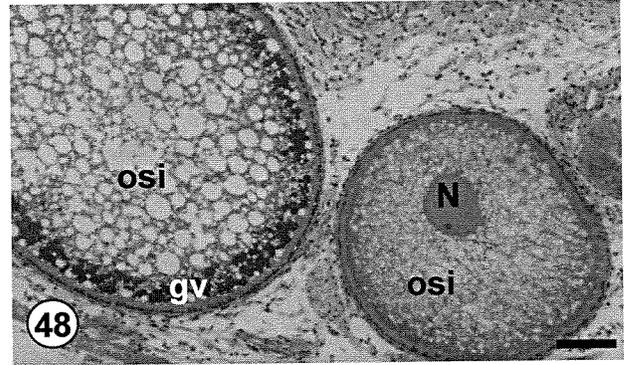
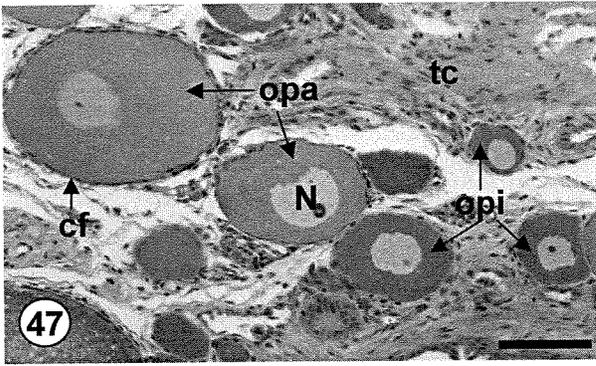


Fig. 52- Ovário apresentando ovócitos em crescimento primário (op) e secundário (os). Lume do ovário (Lu) e formação de invaginação (*) que se projeta em direção a ovócitos.

Fig. 53- Ovócito em crescimento primário avançado, mostrando citoplasma (co) com aspecto granular. N- núcleo.

Fig. 54- Ovário com ovócitos em diferentes fases de desenvolvimento. Vesículas espalhadas pelo ooplasma no ovócito secundário inicial (osi).

Figs. 55 e 56- Ovócito secundário inicial com citoplasma apresentando vesículas de diferentes tamanhos, além do pregueamento da superfície ovocitária e da zona radiata (zr). Células foliculares (cf) apresentam formatos variados.

Fig. 57- Região de transição núcleo/citoplasma, mostrando citoplasma ocupado por vesículas.

Fig. 58- Ovócito secundário inicial com gotas lipídicas (Li) espalhadas pelo citoplasma ovocitário.

Fig. 59- Maior aumento da periferia do ovócito observado na figura 58.

cf- célula folicular; fv- folículo vazio; N- núcleo; opa- ovócito primário avançado; opi- ovócito primário inicial; osi- ovócito secundário inicial; t- teca; vs- vaso sanguíneo; zr- zona radiata.

Barra: 52, 55 (50 μ m); 53, 58 (20 μ m); 54, 56, 57, 59 (5 μ m).

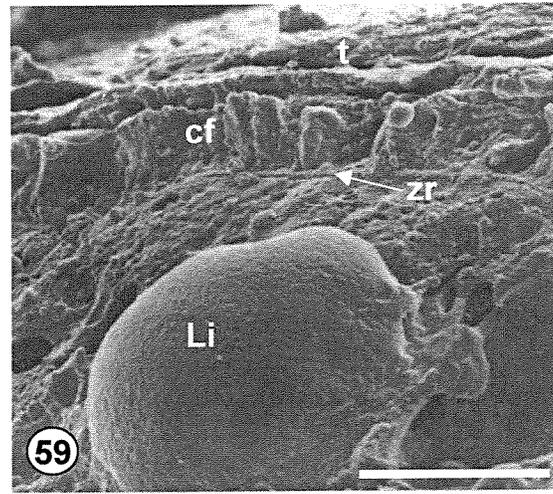
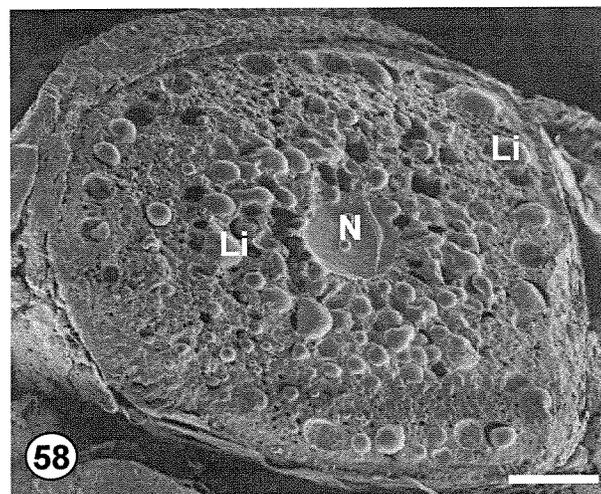
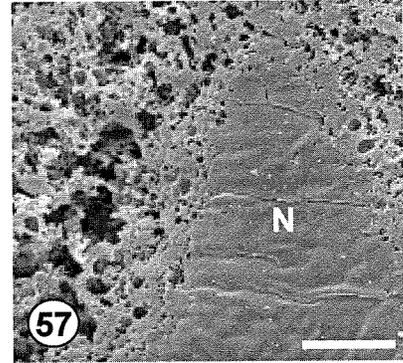
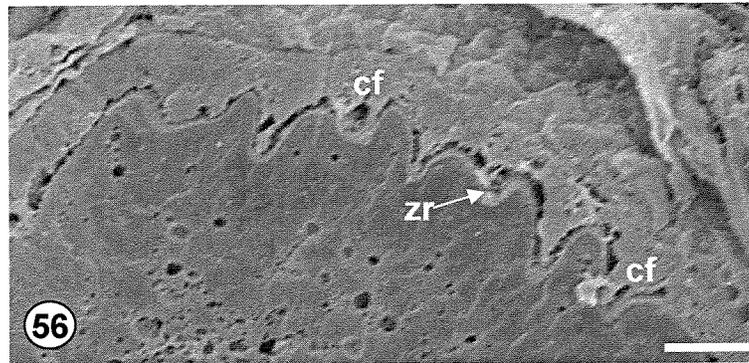
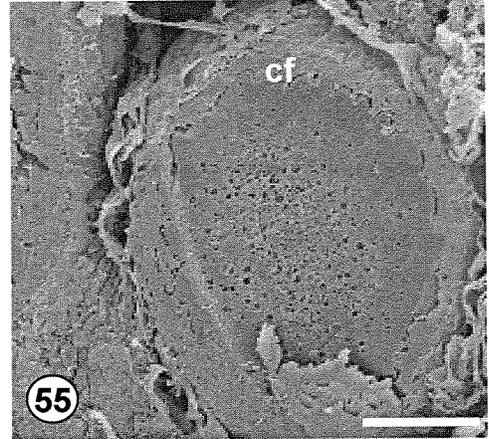
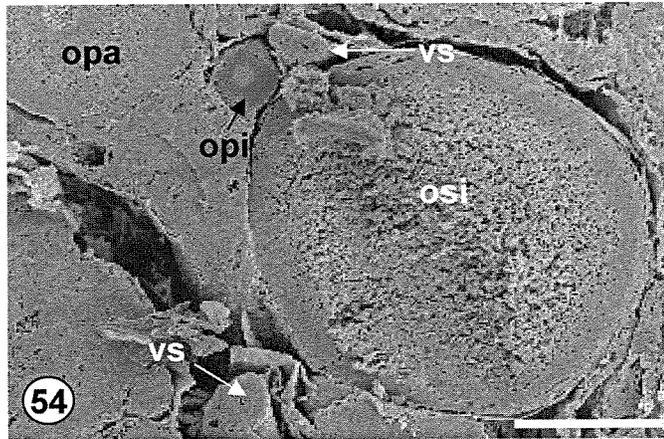
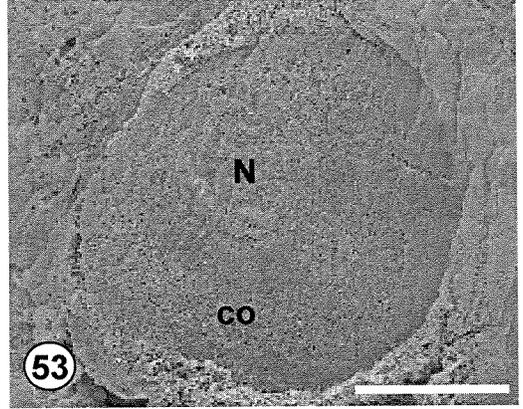
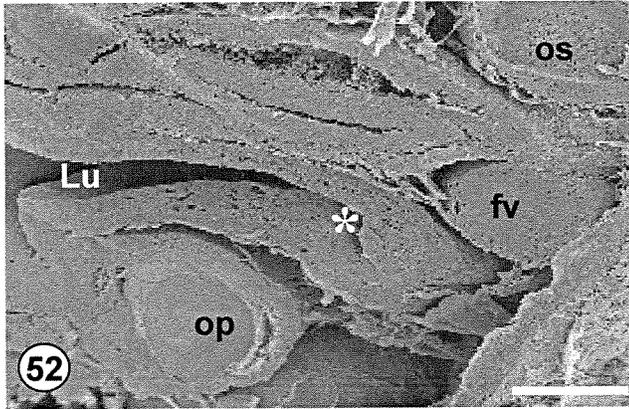


Fig. 60- Membrana do ovócito (mo) mostrando microvilosidades que atravessam a zona radiata (zr). cf- célula folicular.

Fig. 61- Zona radiata (zr) atravessada por poros, onde se observam microvilosidades (seta) das células foliculares (cf).

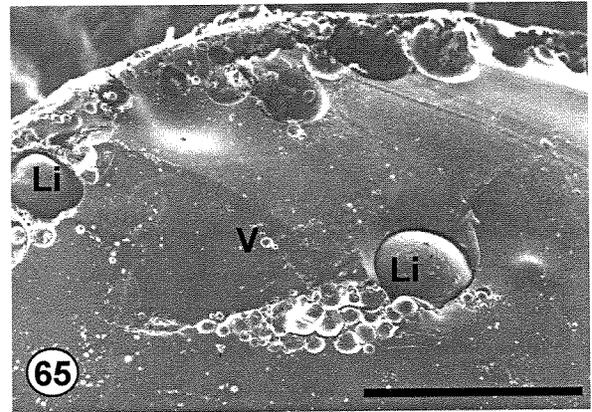
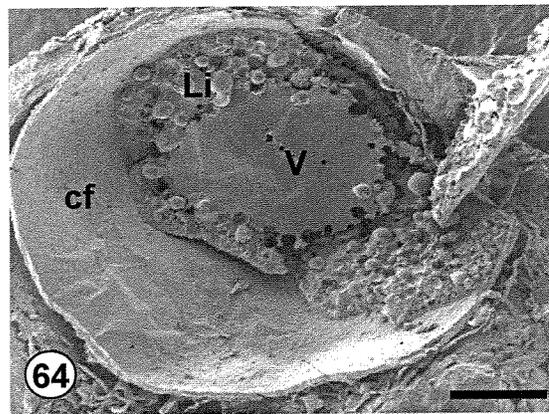
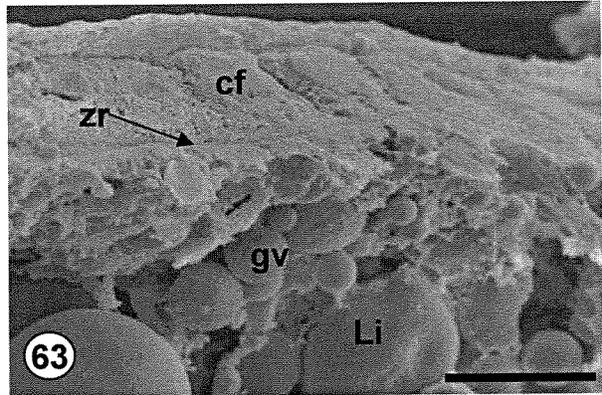
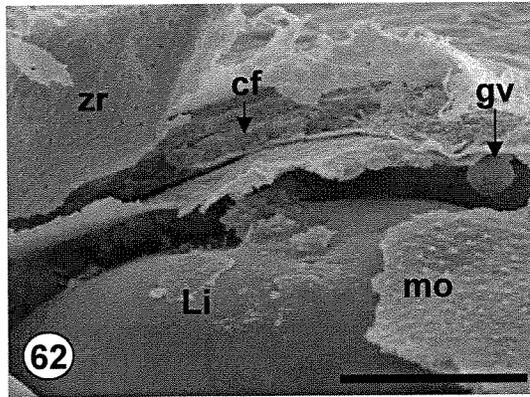
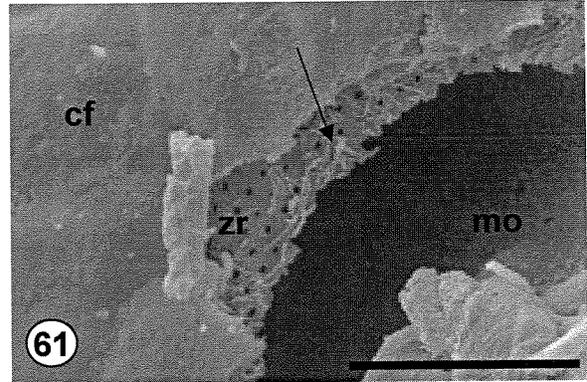
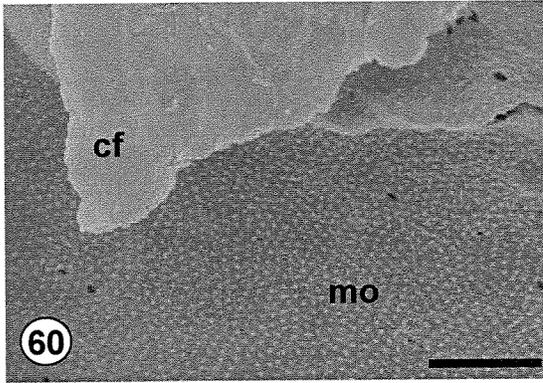
Fig. 62- Zona radiata (zr) mostrando poros. Células foliculares (cf), membrana do ovócito (mo), gota lipídica (Li) e glóbulo de vitelo (gv).

Fig. 63- Periferia de ovócito mostrando gotas lipídicas (Li) e incorporação de glóbulos de vitelo (gv). Células foliculares (cf) cúbicas e zona radiata (zr) linear.

Fig. 64- Aspecto de ovócito secundário avançado. Vitelo observado como massa homogênea localizada centralmente (V), e periferia do citoplasma repleta de gotas lipídicas (Li).

Fig. 65- Ovócito secundário avançado. Citoplasma ovocitário constituído por massa única de vitelo (Y) e na periferia, presença de gotas lipídicas (Li).

Barra: 60-63 (4 μ m); 64, 65 (40 μ m).



Figs. 66 e 67- Ovogônia. Grande quantidade de mitocôndrias (m) presentes no ooplasma.

Fig. 68 - Ovócito primordial mostrando núcleo (N) grande. No citoplasma, presença de numerosas mitocôndrias (m) e material denso (seta). Célula folicular pavimentosa (cf) envolvendo o ovócito, e externamente a ela, membrana basal (mb) evidente.

Fig. 69- Ovócito primário inicial envolvido por célula folicular pavimentosa (cf). No citoplasma, presença de mitocôndrias (m). Núcleo grande (N) com nucléolo (nu) único.

Fig. 70- Transição núcleo/citoplasma, com material nuclear denso (seta) que foi transportado através de poros da membrana nuclear em direção ao citoplasma. Riqueza de mitocôndrias (m) no citoplasma perinuclear.

Figs. 71 e 72- Ovócito primário inicial mostrando núcleo (N) com nucléolo (nu) em forma de anel.

Fig. 73- Ovócito primário apresentando nucléolo (nu) com região granular (g) e fibrilar (f) evidentes.

C- citoplasma; cpf- célula pré-folicular; Li- gota lipídica; m- mitocôndria; mb- membrana basal; N- núcleo; ng- nuage; nu- nucléolo.

Barra: 66-68, 70 (2 μ m); 69, 71, 72 (4 μ m); 73 (1 μ m).

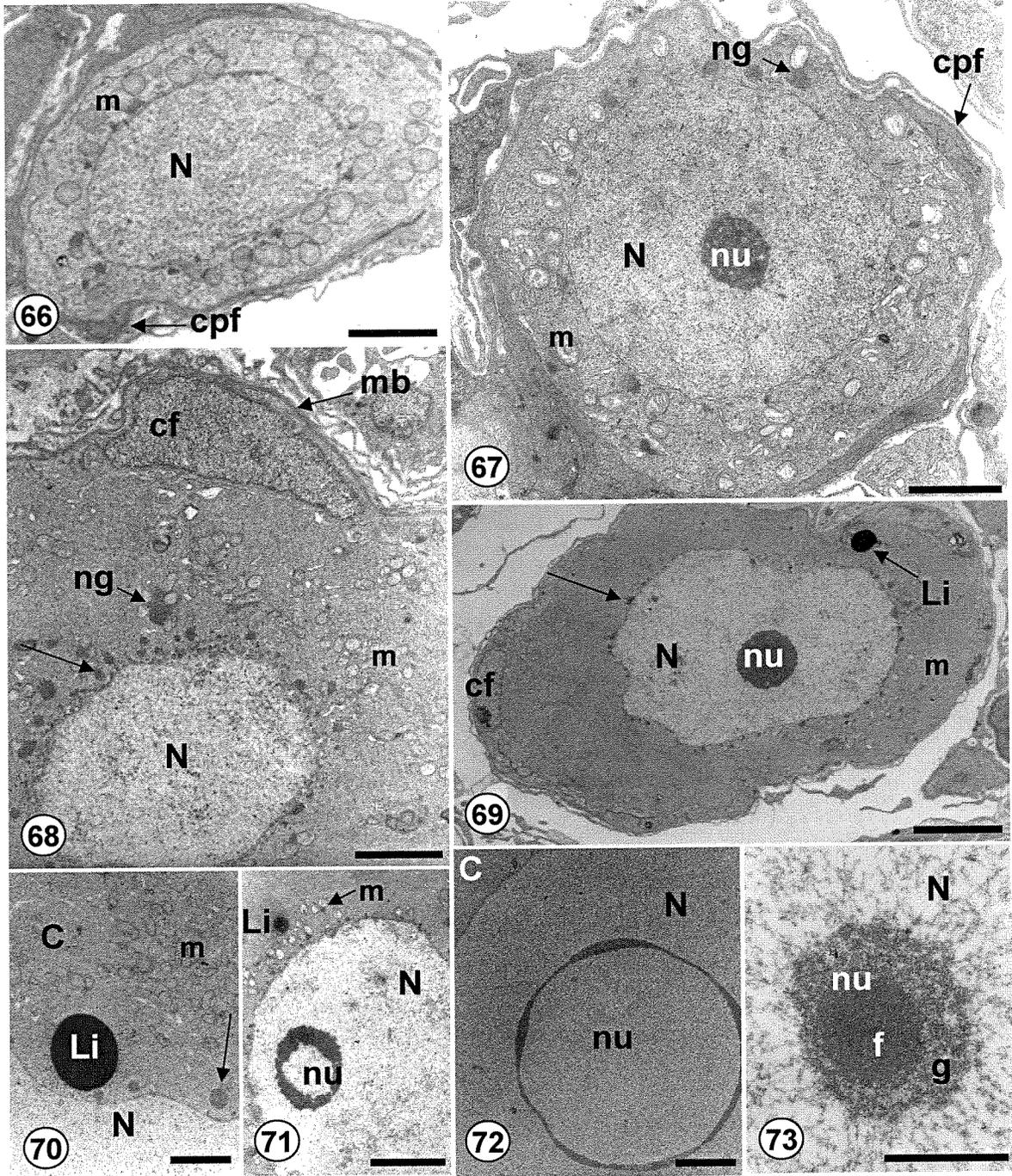


Fig. 74- Ovócito primário inicial envolto por célula folicular pavimentosa (cf). Externamente, membrana basal (mb) homogênea.

Fig. 75- Detalhe de junção do tipo desmosomo (seta dupla) entre células foliculares (cf).

Fig. 76- Periferia de ovócito primário avançado com superfície pregueada formando microvilosidades (mv). col- colágeno.

Figs. 77 e 78- Aspectos do citoplasma de ovócito primário avançado, mostrando riqueza em mitocôndrias e presença de complexo de Golgi (G).

cf- célula folicular; m- mitocôndrias; mb- membrana basal; mv- microvilosidade; t-teca.

Barra: 74 (4 μ m); 75-78 (1 μ m).

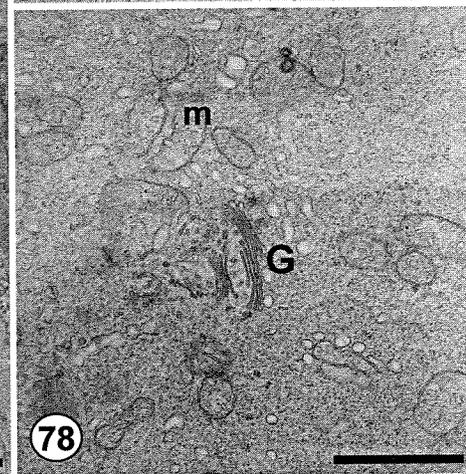
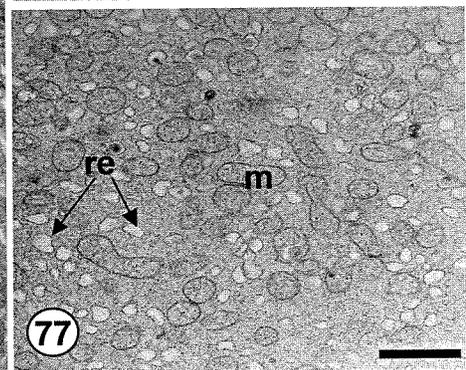
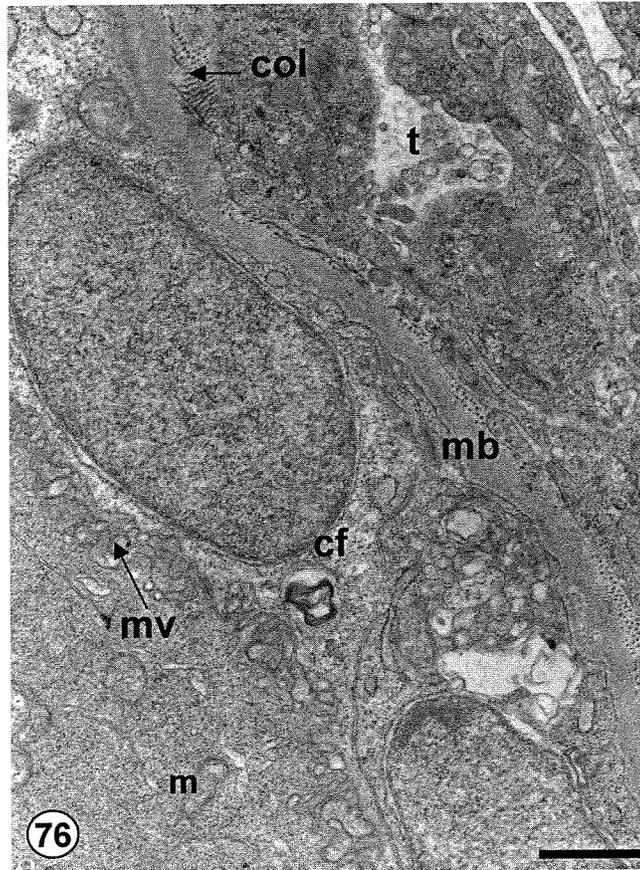
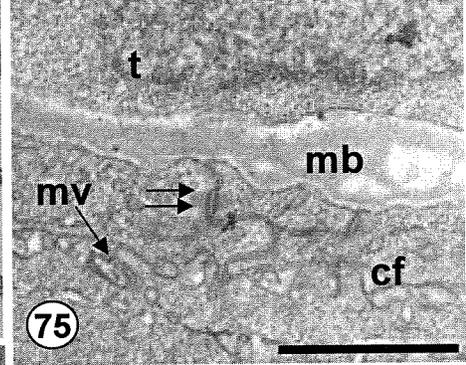
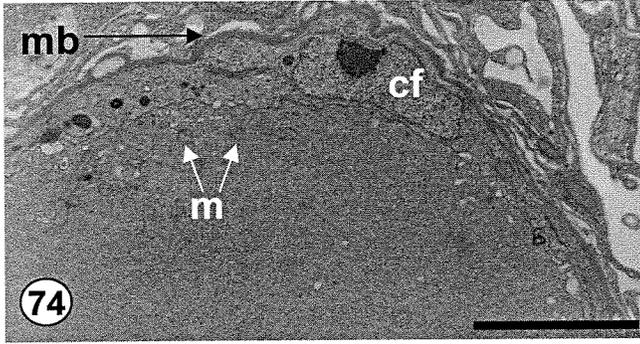


Fig. 79- Ovócito secundário em fase inicial de desenvolvimento. Presença de microvilosidades entre o ovócito e as células foliculares (cf). No citoplasma ovocitário observa-se surgimento de vesículas claras com grânulo elétron-denso (vn), além de riqueza em mitocôndrias (m).

Fig. 80- Ovócito secundário inicial com riqueza de mitocôndrias no citoplasma periférico e presença de vesículas claras (vc). Presença de material elétron-denso depositado entre microvilosidades de ovócito e células foliculares (cf) marcando início de formação da zona radiata (zr).

Figs. 81 e 82- Ovócito secundário inicial mostrando zona radiata (zr) com camada única elétron-densa atravessada por microvilosidades do ovócito e de células foliculares (cf) que mostram transição de pavimentosas para cúbicas. Pregueamento da superfície ovocitária e da zona radiata, e presença de vesículas claras (vc) e vesículas claras com grânulo denso (vn).

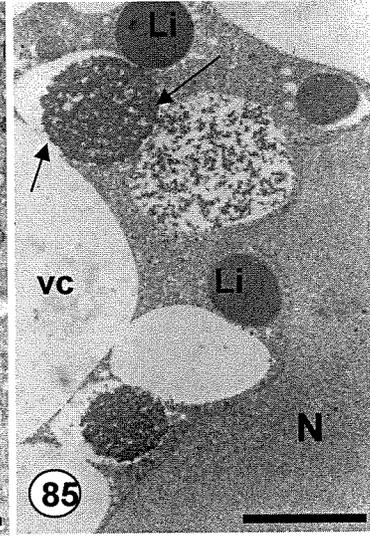
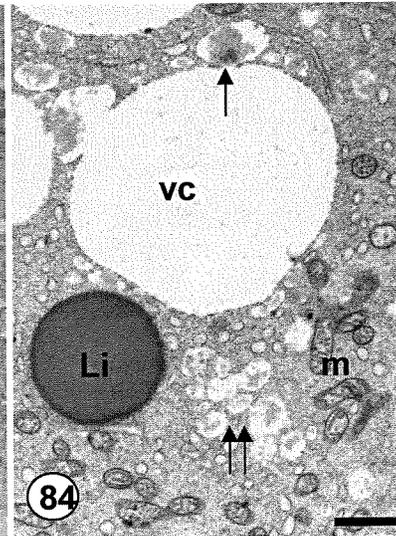
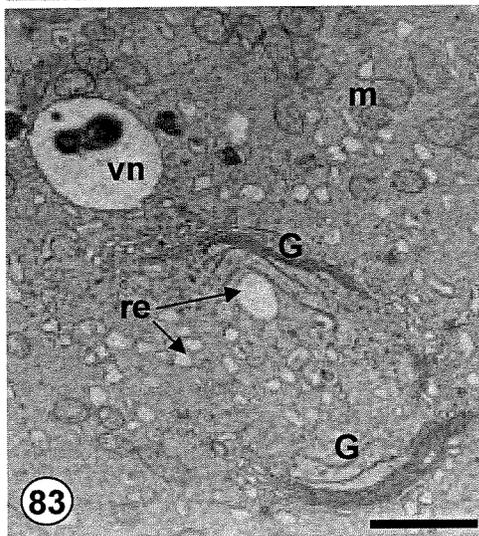
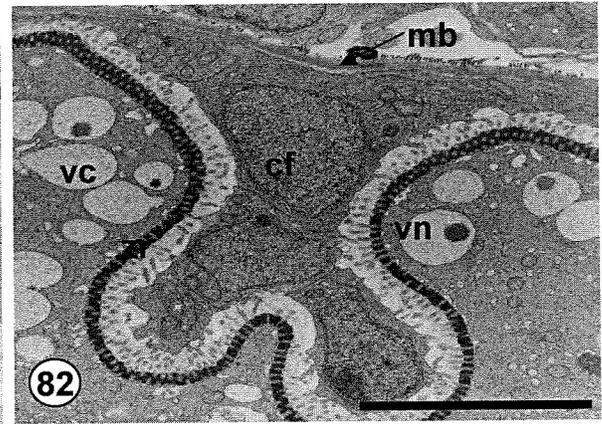
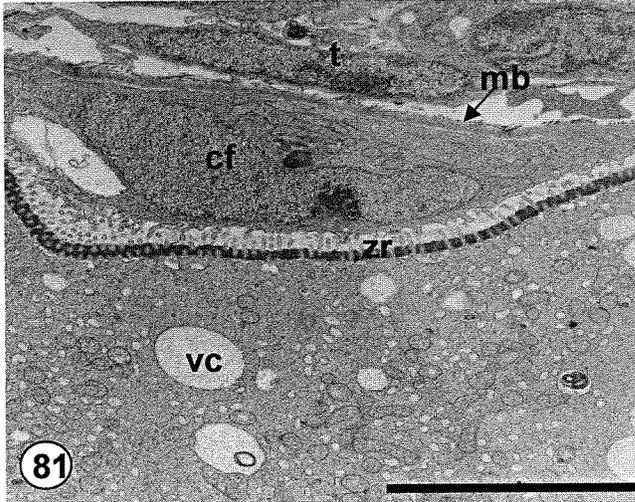
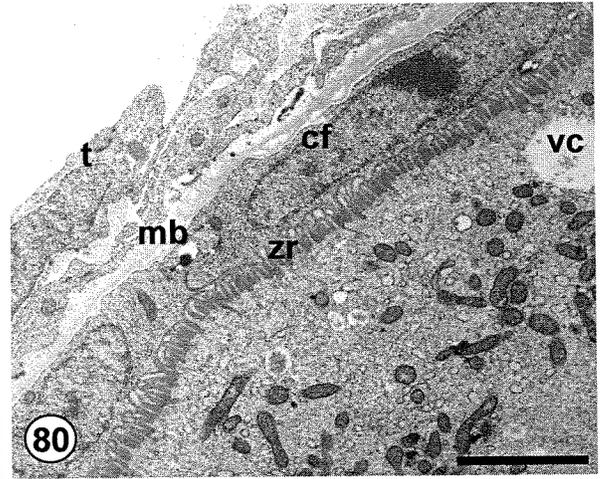
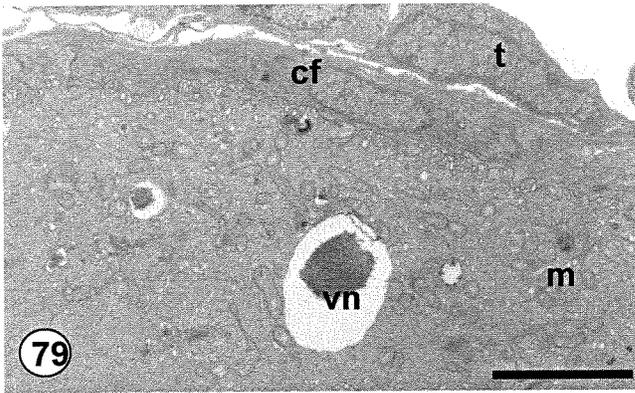
Fig. 83- Citoplasma de ovócito secundário inicial apresentando mitocôndrias (m), complexo de Golgi (G), retículo endoplasmático rugoso (re), e vesículas claras com núcleo denso (vn).

Fig. 84- Aspecto do citoplasma de ovócito secundário inicial, mostrando mitocôndrias (m), vesículas claras (vc) e gota lipídica (Li). Início de deposição de material amorfo no interior de vesículas claras (seta dupla) e processo de fusão entre vesículas claras grandes e vesículas pequenas que contém material amorfo elétron-denso (seta simples).

Fig. 85- Transição núcleo/citoplasma em ovócito secundário. Processo de fusão entre vesículas de diferentes tamanhos e conteúdos com diferentes elétron-densidades.

Li- gota lipídica; mb- membrana basal; N- núcleo; t- teca.

Barra: 79, 80, 85 (2 μ m); 81, 82, 84 (5 μ m); 83 (1 μ m).



Figs. 86 e 87- Aspecto do citoplasma periférico de ovócito secundário avançado, mostrando mitocôndrias (m), complexo de Golgi (G), gota lipídica (Li) e glóbulo de vitelo (gv).

Figs. 88 a 90- Ovócito em crescimento secundário avançado mostrando zona radiata constituída por duas camadas (ci- camada interna; ce- camada externa). No citoplasma periférico ocupado por organelas, presença de gotas lipídicas (Li), glóbulo de vitelo (gv) e vesículas claras (vc). Células foliculares (cf) cúbicas com núcleo descompactado (N) e nucléolo periférico.

mb- membrana basal; t- teca; zr- zona radiata; seta branca- microvilosidade ovocitária; seta preta- microvilosidade da célula folicular.

Barra: 86 (1 μ m); 87 (3 μ m); 88-90 (5 μ m).

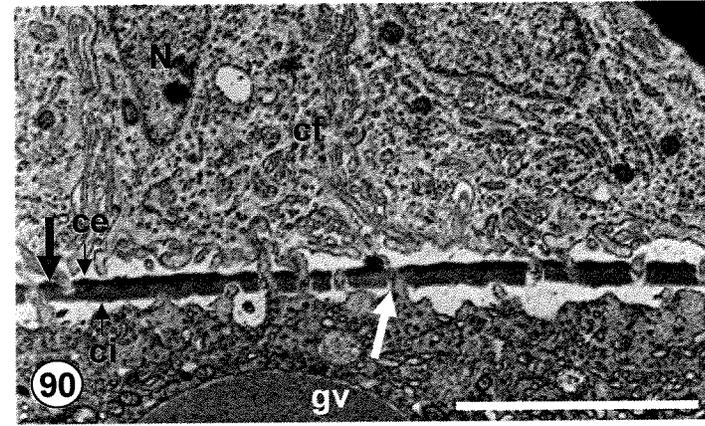
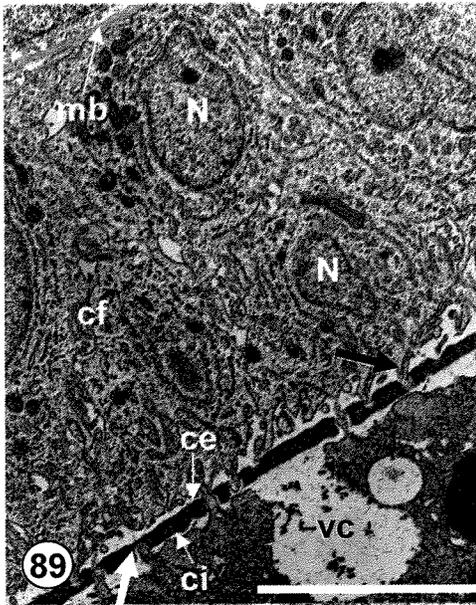
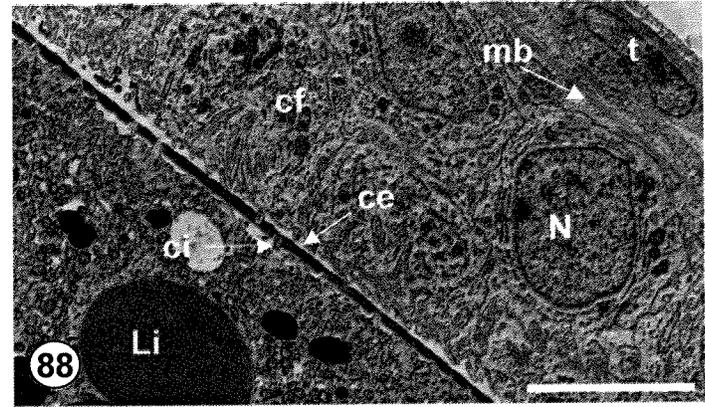
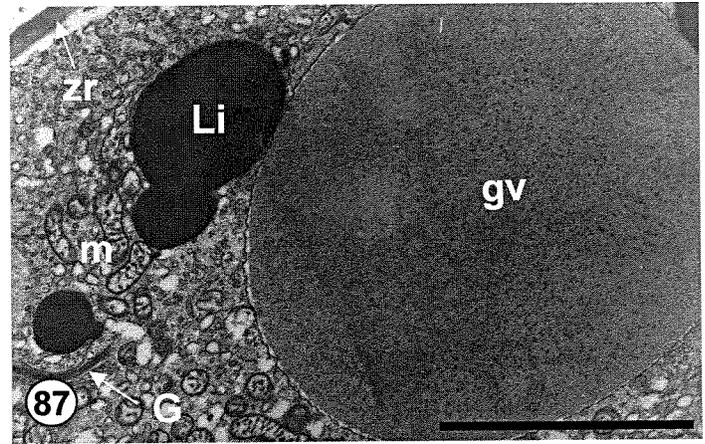
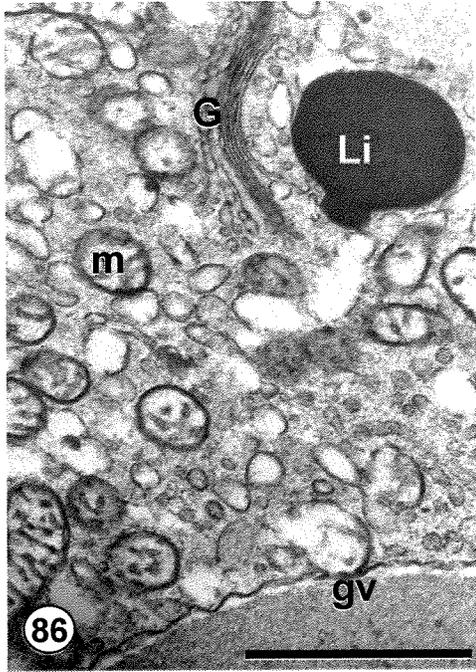


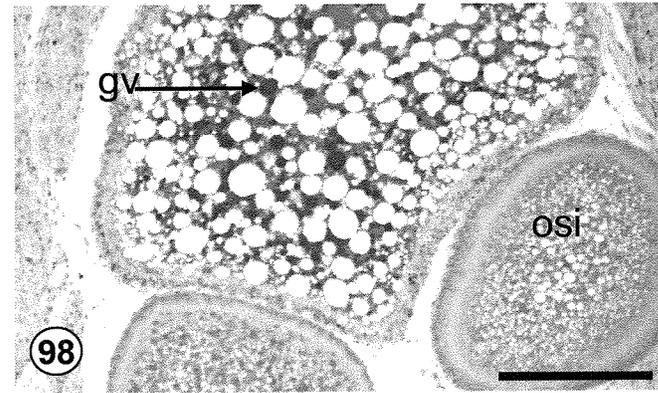
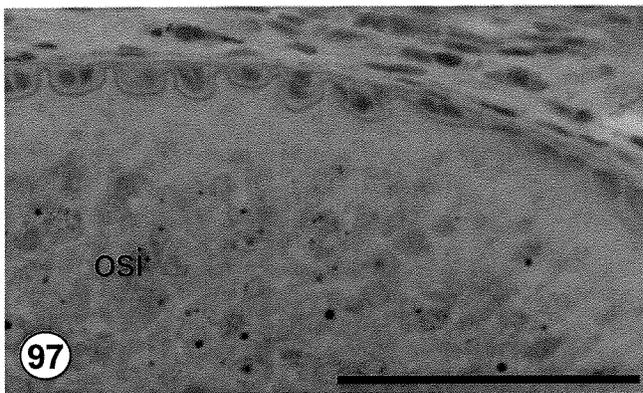
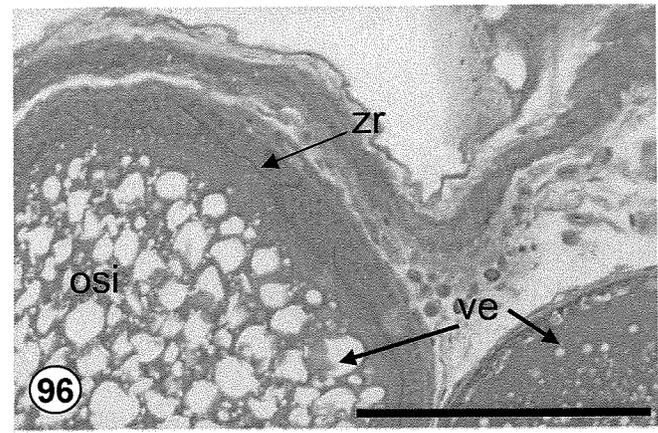
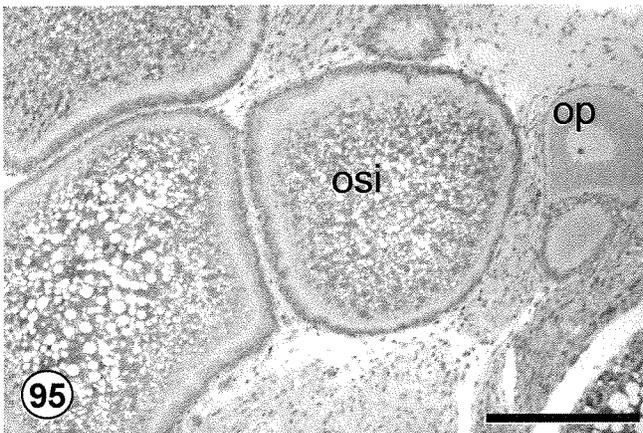
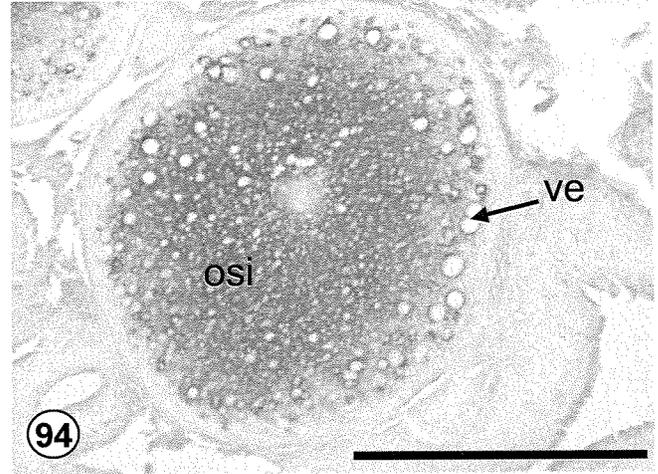
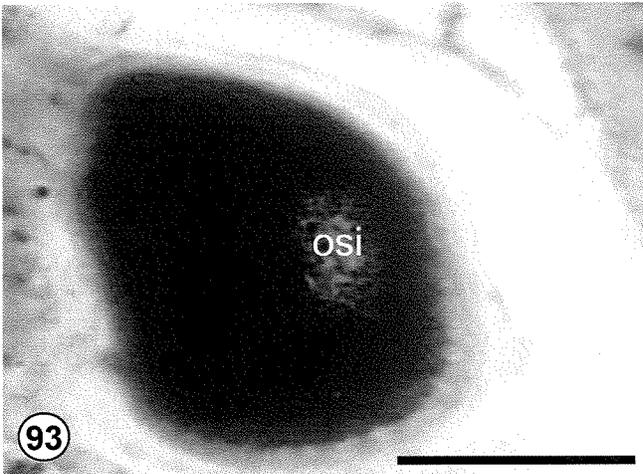
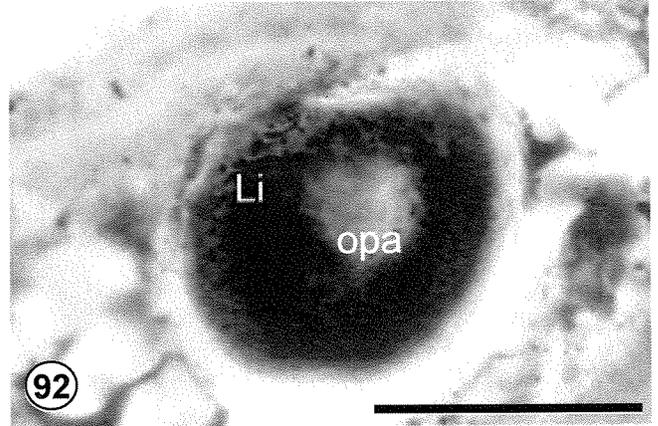
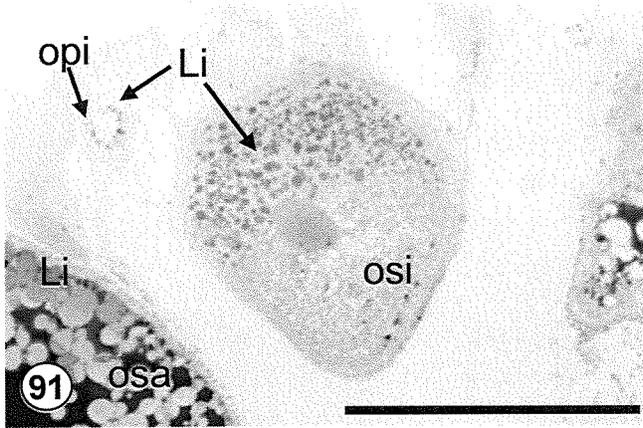
Fig. 91- Corte semi-fino de ovário de *X. maculatus* com ovócito primário inicial (opi) e ovócito secundário inicial (osi), pós-fixado com tetróxido de ósmio/imidazol. Li- gota lipídica; osa- ovócito secundário avançado.

Figs. 92 e 93- Ovócito primário avançado (opa) e secundário inicial (osi) mostrando reação positiva para Sudan Black.

Fig. 94- Ovócito secundário inicial (osi) apresentando reação citoplasmática positiva para Alcian blue pH2,5 e vesículas (ve) que não se coram.

Figs. 95 a 98. Ovócitos em crescimento secundário (osi) mostrando vesículas que não se coram pelo PAS (Figs. 95 e 98) nem por FG (Fig. 96). Em coloração pelo PAS observam-se vesículas fortemente coradas e fracamente coradas (Figs. 95 e 98), além de vesículas fracamente coradas e que apresentam um grânulo central fortemente corado (Fig. 97). op- ovócito primário; zr- zona radiata; gv- glóbulo de vitelo. ve- vesícula. Figs. 95, 97 e 98- PAS/Hematoxilina.

Barra: 91, 94-96, 98 (150 μm); 92, 93 (100 μm); 97 (50 μm).



Figs. 99 e 100- Ovócitos secundários iniciais mostrando vesículas (ve) que não se coram por xylidíne ponceau (Fig. 99) nem FG (Fig. 100). op- ovócito primário; zr- zona radiata.

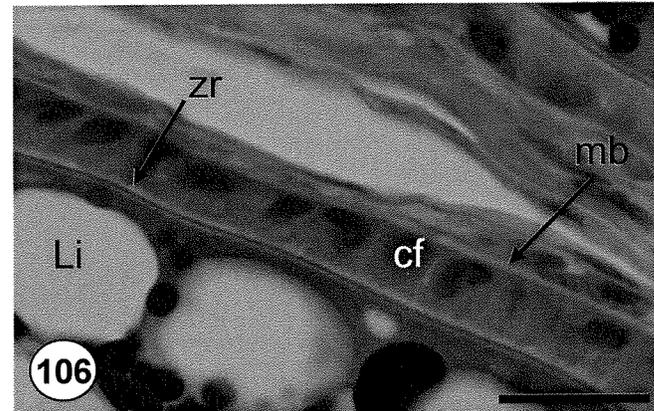
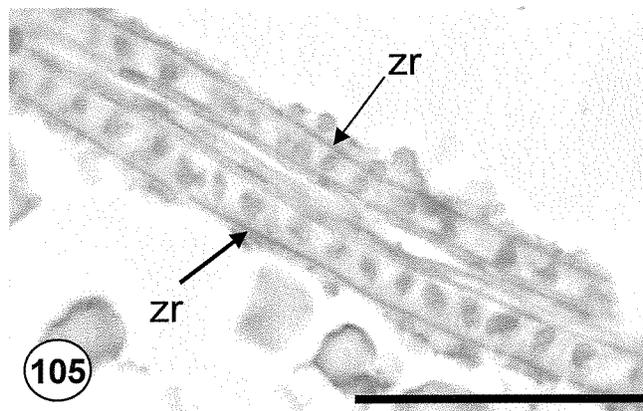
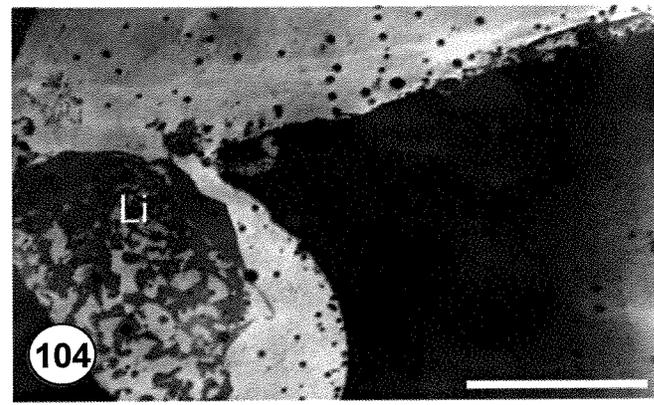
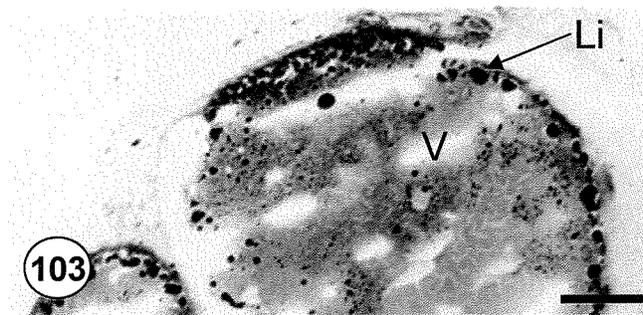
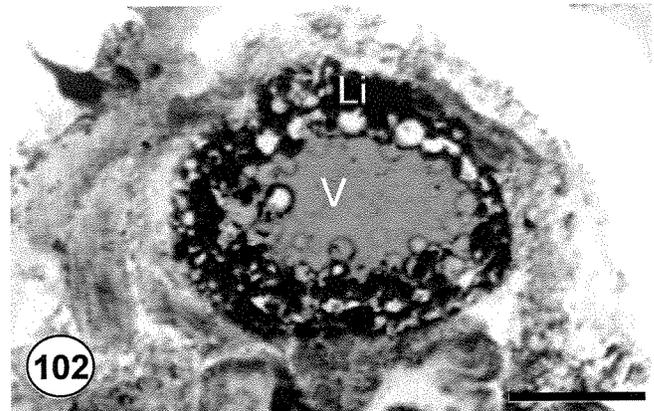
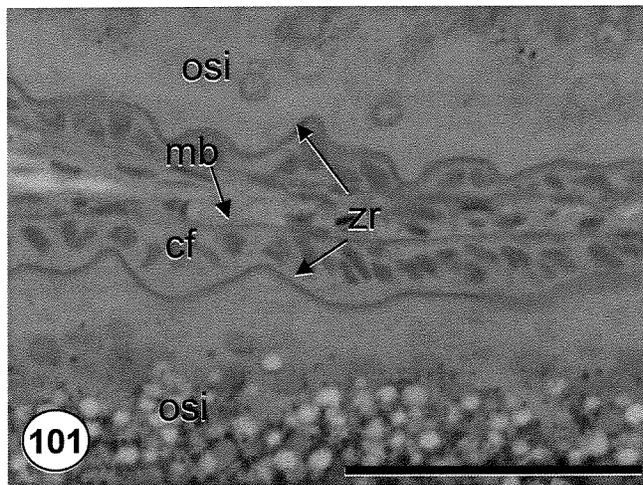
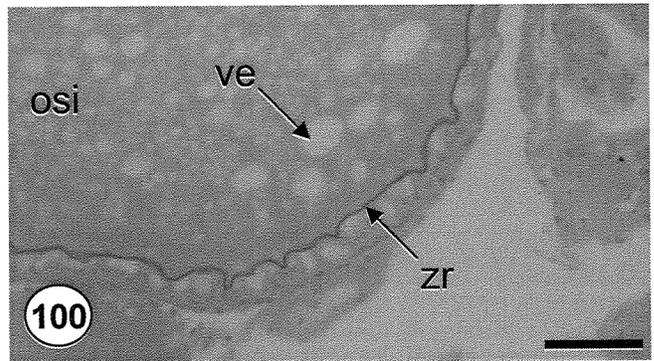
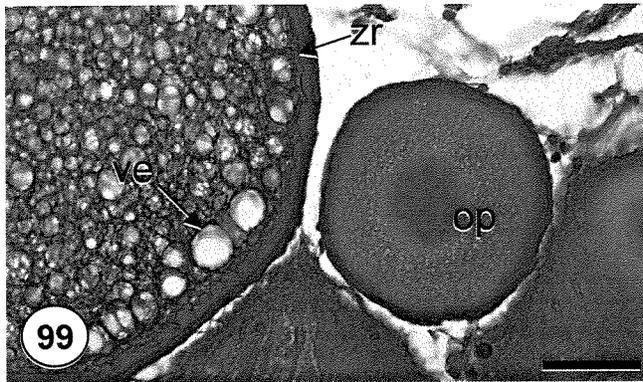
Fig. 101- Ovócitos em crescimento secundário inicial (osi) mostrando vesículas fortemente coradas, fracamente coradas e vesículas que não se coram pelo PAS. zr- zona radiata; cf- célula folicular; mb- membrana basal. PAS/Hematoxilina.

Figs. 102 e 103- Ovócitos vitelogênicos avançados mostrando reação positiva para Sudan Black. V- massa central de vitelo; Li- gota lipídica.

Fig. 104- Micrografia eletrônica de transmissão de ovócito vitelogênico avançado pós-fixado com tetróxido de ósmio/imidazol, onde se observa gota lipídica (Li).

Figs. 105 e 106- Reação positiva para AB (Fig. 105) e PAS (Fig. 106) na zona radiata (zr) e membrana basal (mb) de ovócito vitelogênico avançado. cf- célula folicular. Li- gota lipídica.

Barra: 99-101, 105 (50 μm); 102, 103 (300 μm); 104, 106 (15 μm).



Figs. 107 e 108- Secções de hipófise. Em 107, controle negativo, e em 108, controle positivo da reação de imunohistoquímica para hormônio de crescimento.

Figs. 109 a 114- Reação negativa para hormônio de crescimento em secções de ovário de *X. maculatus* dos grupos controle e tratado. Figs. 109 (0 hs pós-parto) e 112 (60 hs pós-parto), pertencem a animais do grupo-controle. Figs. 110 (24 hs pós-parto), 111 (48 hs pós-parto), 113 (84 hs pós-parto) e 114 (108 hs pós-parto), pertencem a animais do grupo tratado.

fv- folículo vazio; H- hipófise; Lu- lume ovariano; opi- ovócito primário; osi- ovócito secundário inicial; osa- ovócito secundário avançado; tco- tecido conjuntivo ovariano.

Contra-coloração com hematoxilina de Mayer: Figs. 109-114

Barra: 107-110 (500 μ m); 111-114 (150 μ m).

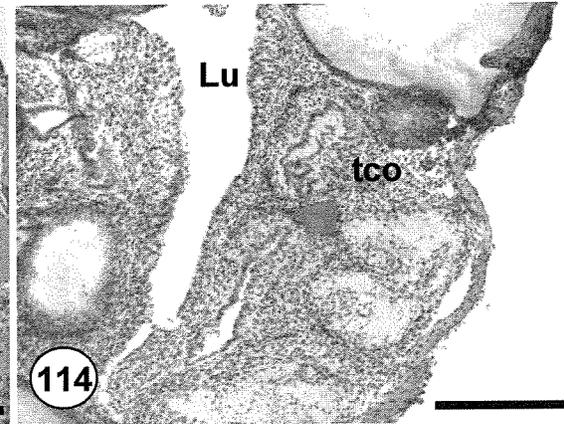
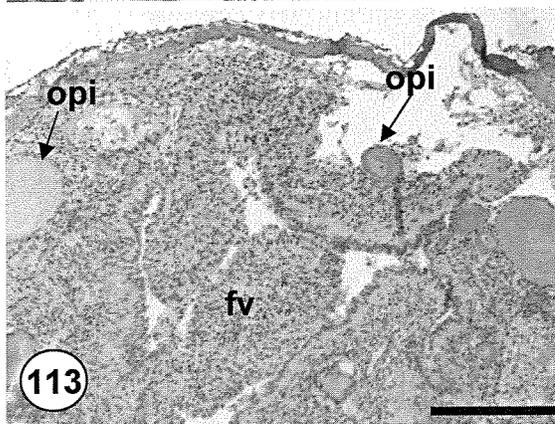
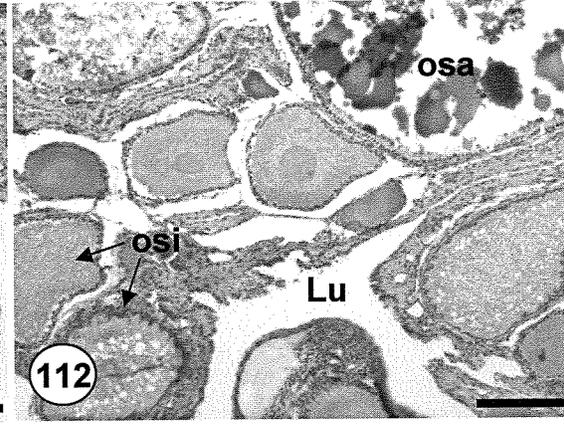
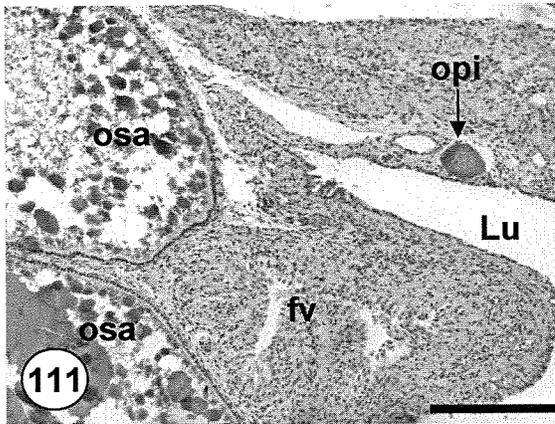
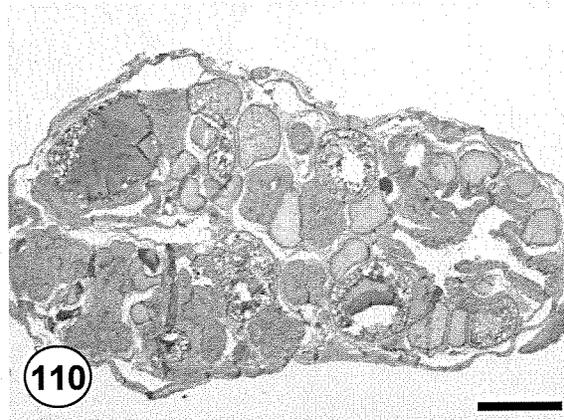
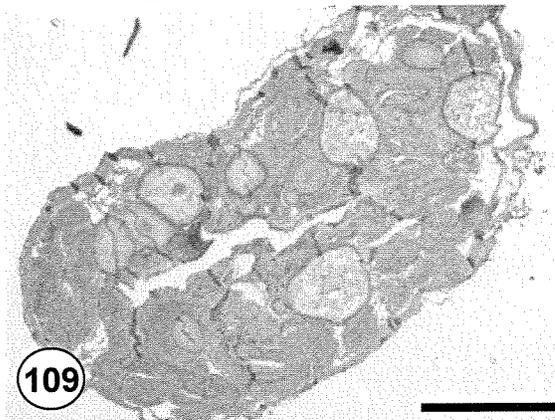
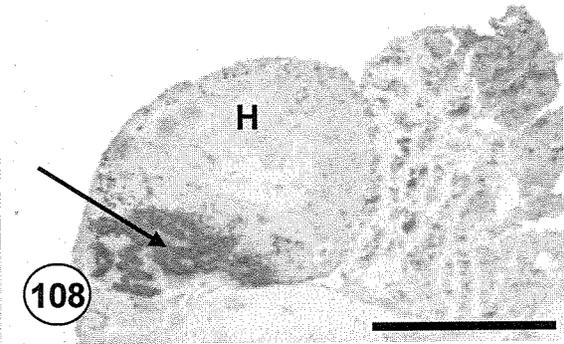
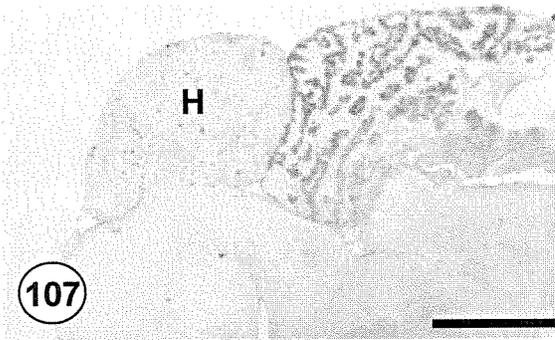


Fig. 115- Ovário de animal imediatamente após o parto (zero horas).

Fig. 116- Ovário de animal do grupo-controle três horas após o parto.

Fig. 117- Ovário de animal do grupo tratado três horas após o parto.

Fig. 118- Ovário de animal do grupo-controle 12 horas após o parto.

Fig. 119- Ovário de animal do grupo tratado 12 horas após o parto.

Fig. 120- Ovário de animal do grupo-controle 36 horas após o parto.

Fig. 121 - Ovário de animal do grupo tratado 48 horas após o parto.

Fig. 122 - Ovário de animal do grupo-controle 60 horas após o parto.

As figuras acima mostram ovócitos em todos os estádios de desenvolvimento, além da presença de folículos atrésicos e folículos vazios.

fa- folículo atrésico; fv- folículo vazio; osa- ovócito secundário avançado; osi- ovócito secundário inicial.

Coloração: Figs. 115, 116, 118 e 121- AT; Figs. 117, 119, 120 e 122- HE

Barra: 115-122 (500 μ m).

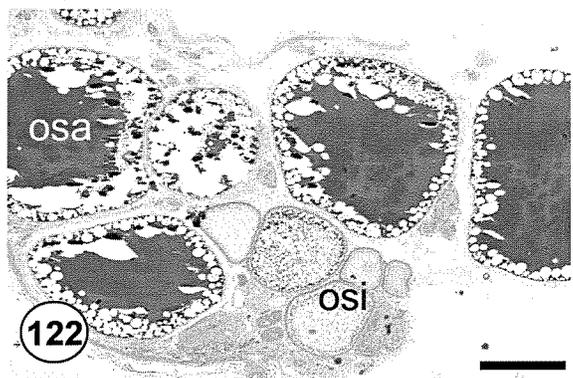
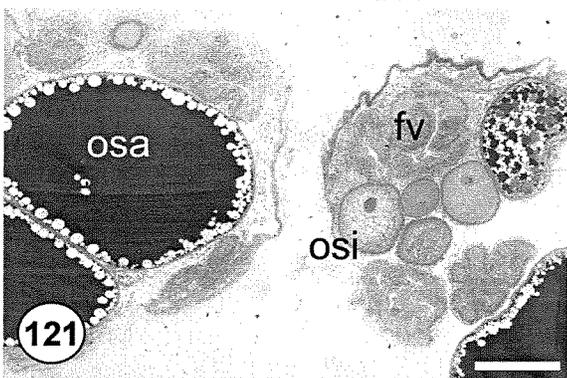
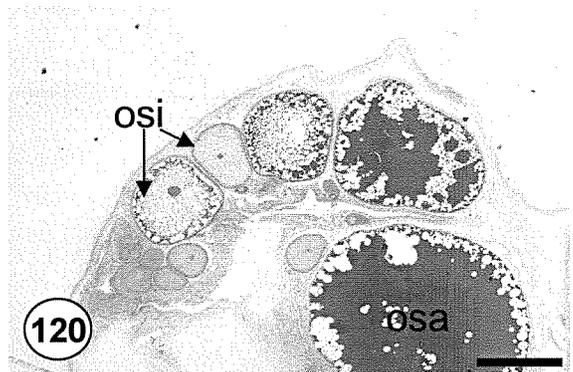
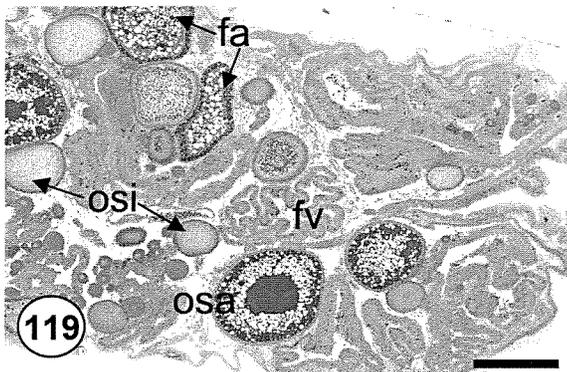
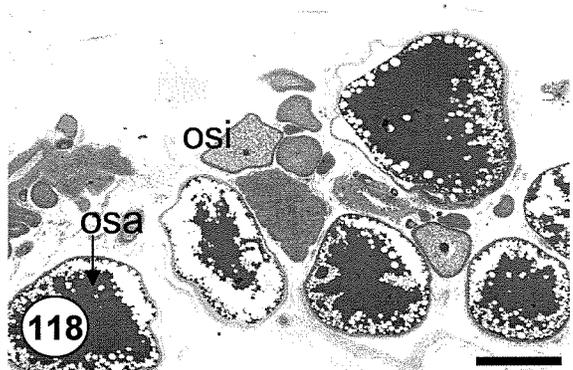
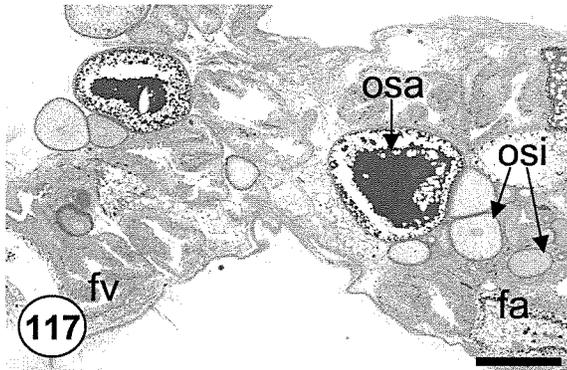
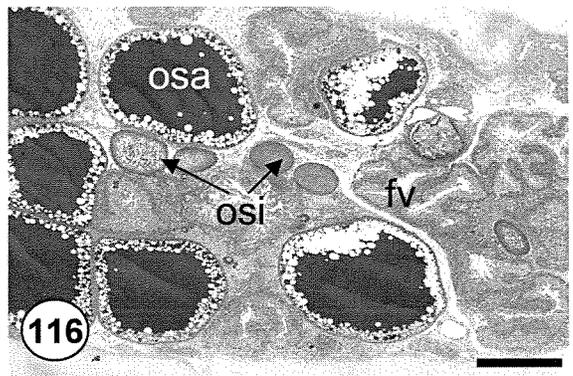
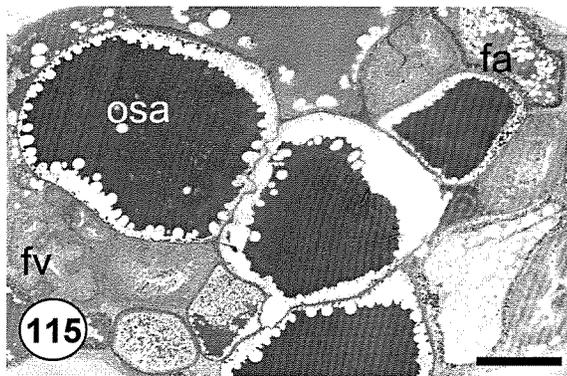
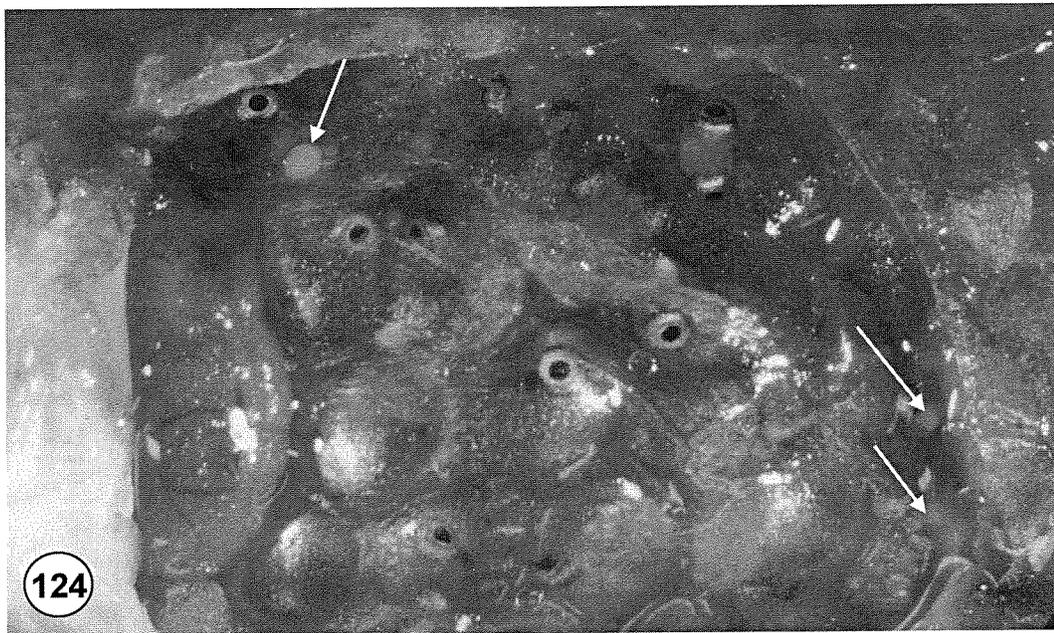
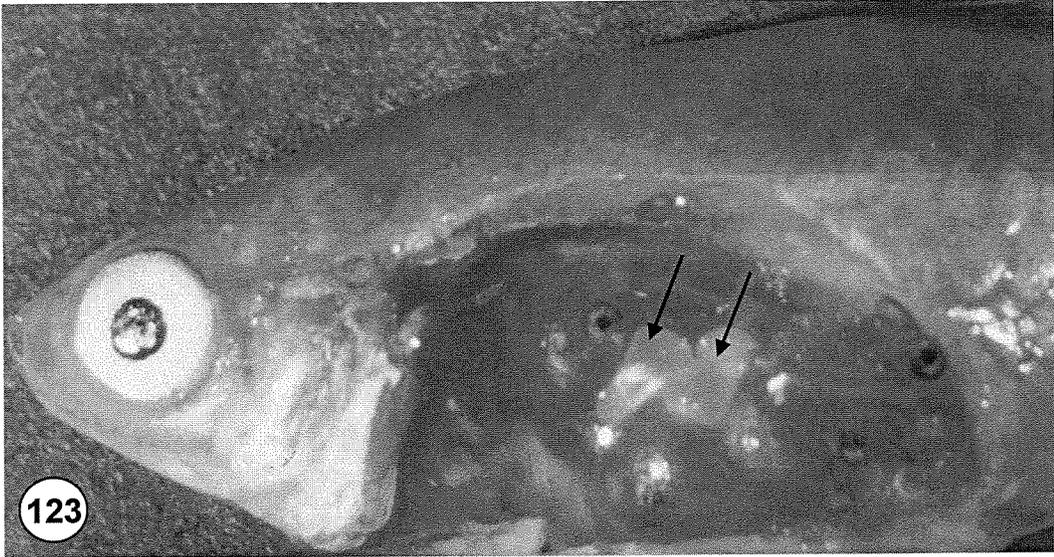


Fig. 123– Fêmea adulta, em primeira gestação. Ovário com pequeno número de filhotes e presença de ovócitos em processo de vitelogênese (setas).

Fig. 124– Fêmea múltipara em gestação. Ovário com grande número de filhotes e presença de ovócitos em desenvolvimento (setas).



Figs. 125 e 126- Atresia inicial de ovócito em crescimento secundário inicial. Citoplasma ovocitário (Ci) ocupado por vesículas, mostra desorganização estrutural na periferia (126). Células foliculares (cf) apresentam-se hipertrofiadas e com aspecto vacuolado. Zona radiata (zr) fragmentada. t- teca, hc- hemácia.

Fig. 127- Atresia inicial de ovócito secundário inicial. Células foliculares (cf) hipertrofiadas contendo material eosinofílico no citoplasma, e zona radiata (zr) fragmentada. Ci- citoplasma ovocitário periférico; t- teca.

Figs. 128 e 129- Atresia intermediária de ovócito secundário inicial. Células foliculares (cf) hipertrofiadas contendo material eosinofílico no citoplasma, zona radiata (zr) em dissolução, além da presença de hemácias (hc) observadas internamente à teca (t). Ci- citoplasma ovocitário.

Figs. 130 e 131- Atresia inicial de ovócito em crescimento secundário avançado. Células foliculares que inicialmente mostram-se pouco coradas (130), na sequência apresentam-se hipertrofiadas e com aspecto vacuolado (131). Nessa fase, observa-se também, zona radiata (zr) fragmentada e presença de eosinófilos (e) internamente à teca.

Figs. 132 e 133- Atresia intermediária de ovócito secundário avançado, mostrando células foliculares (cf) hipertrofiadas contendo material eosinofílico em seu interior. No citoplasma ovocitário, vesículas (asterisco) ocupam o espaço inicialmente preenchido por vitelo. Zona radiata (zr) fragmentada (Fig. 132) não é mais observada na Fig. 133. t- teca.

Fig. 134- Atresia avançada, mostrando citoplasma ovocitário preenchido por vesículas (asterisco) entremeadas com células foliculares (cf), além da presença de hemácias (hc).

Figs. 135 e 136- Atresia final, mostrando diminuição do tamanho do ovócito, poucas células (setas) entremeadas a vesículas preenchidas por pigmento castanho-amarelado (pca), além da presença de eosinófilos (e) no interior desses folículos atrésicos.

Coloração: Figs. 125-136- HE

Barra: 125-127, 130-132, 136 (40 μ m); 128, 129, 134 (15 μ m); 133, 135 (100 μ m).

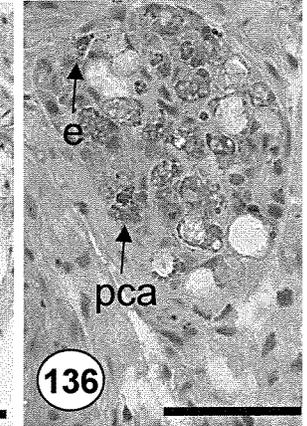
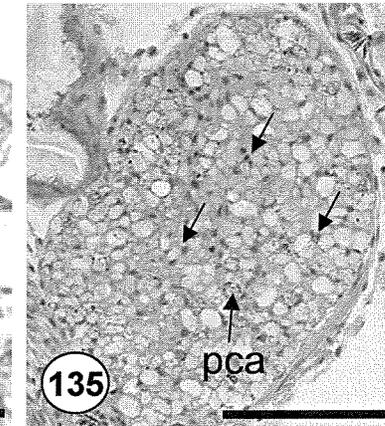
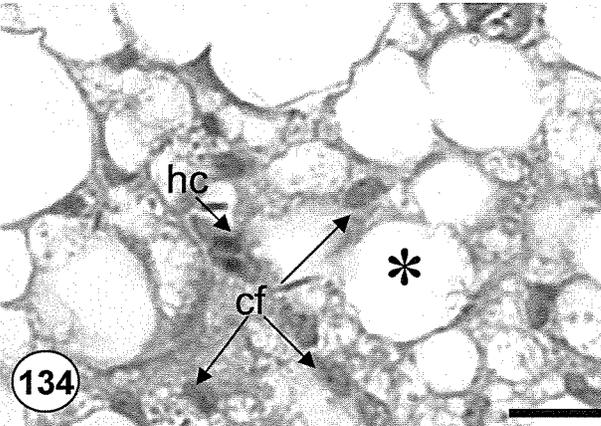
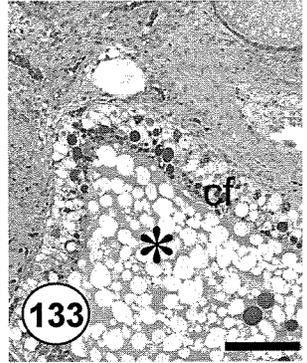
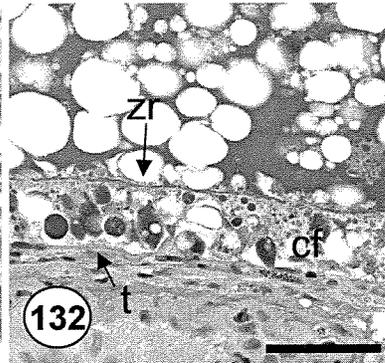
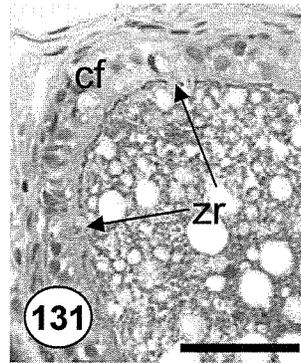
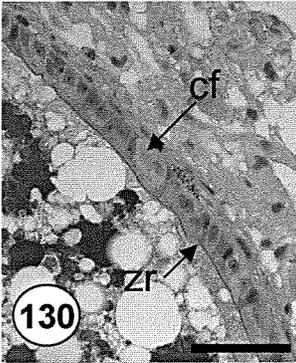
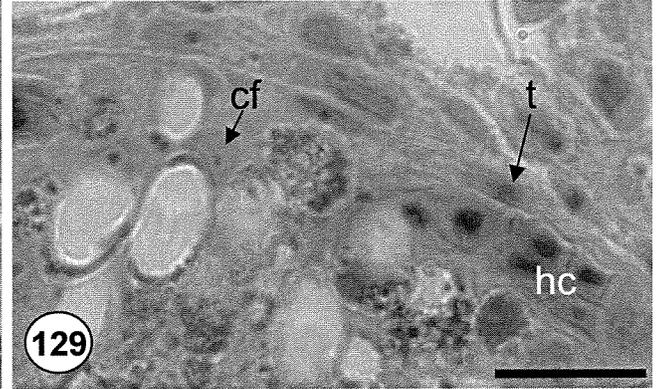
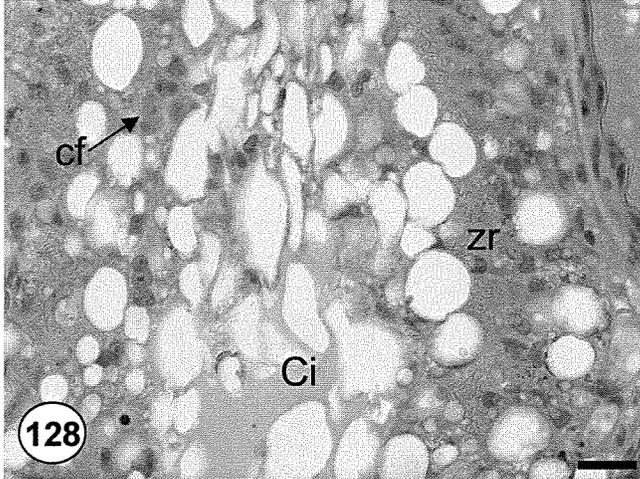
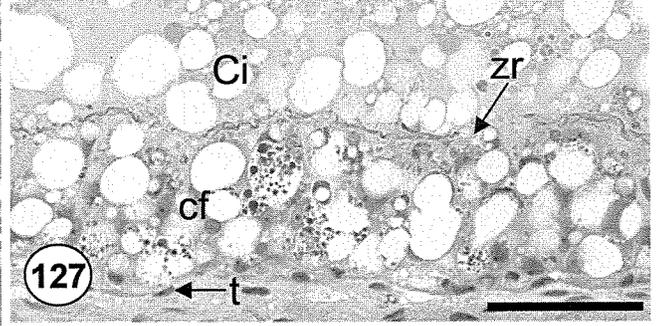
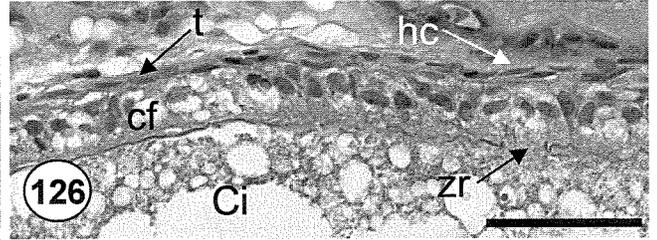
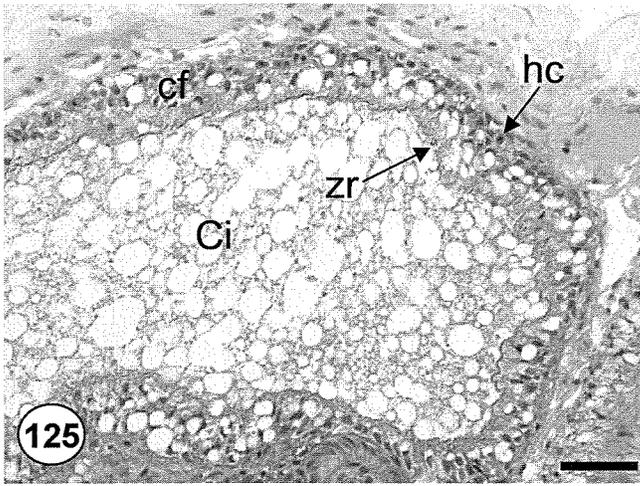


Fig. 137- Folículo vazio, com lume aberto (asterisco), e com lume parcialmente ocluído por células foliculares (cf). No folículo com lume aberto, a parede é formada por camada única de células foliculares (seta) que assumem aspecto prismático. Camada de células musculares lisas (ml) envolve o folículo. hc- hemácias.

Fig. 138- Maior aumento da Fig. 137. Presença de projeções citoplasmáticas partindo da superfície apical das células foliculares (seta dupla) que apresentam núcleo descompactado e nucléolo evidente (seta).

Fig. 139- Folículo vazio apresentando lume ocluído por células foliculares (cf). Grande número de vasos sanguíneos (setas) presentes na parede do folículo.

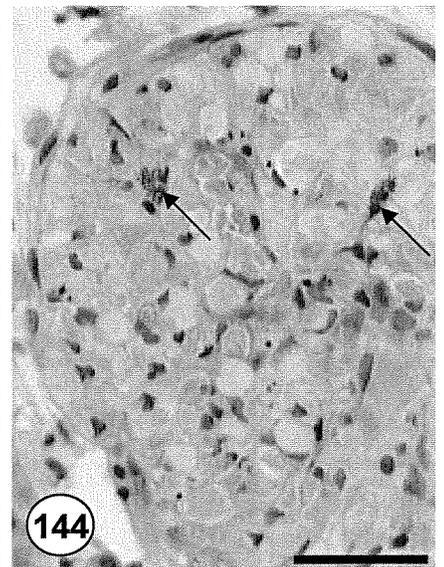
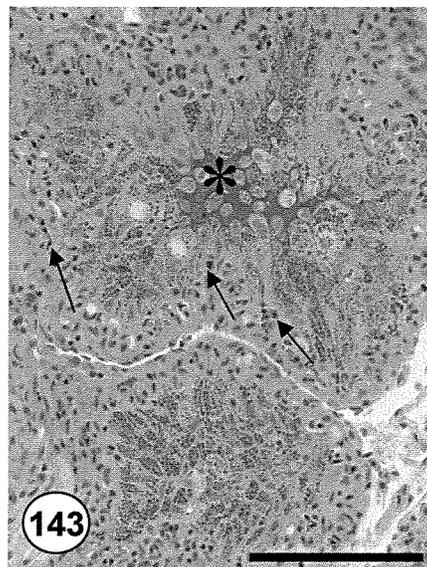
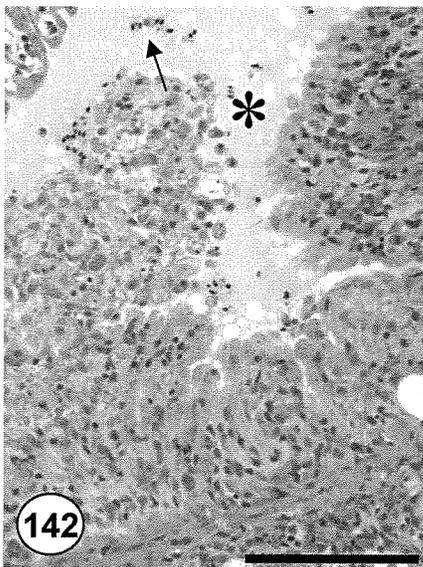
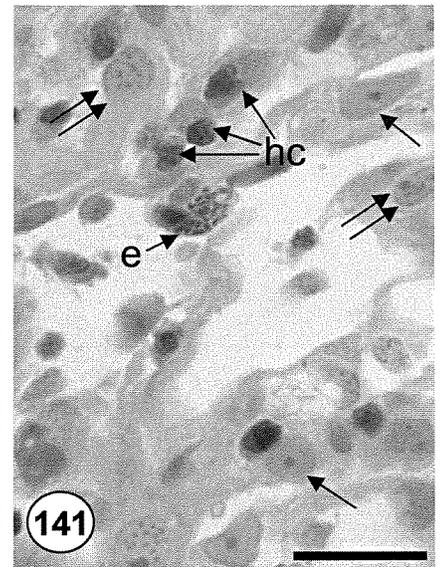
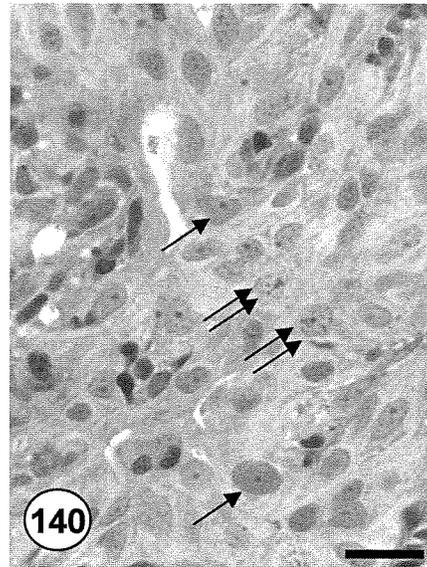
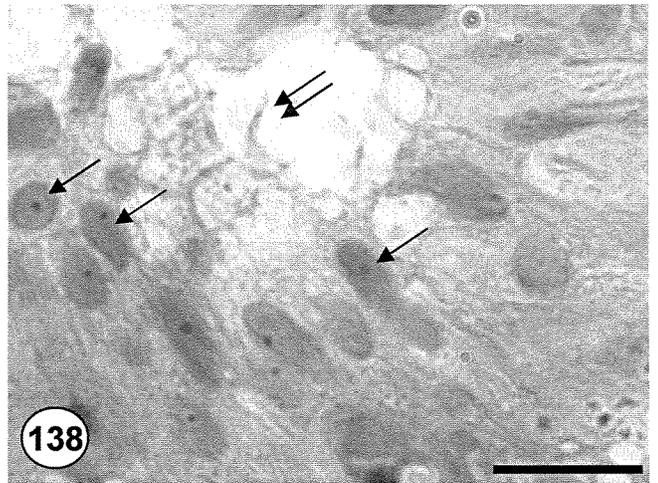
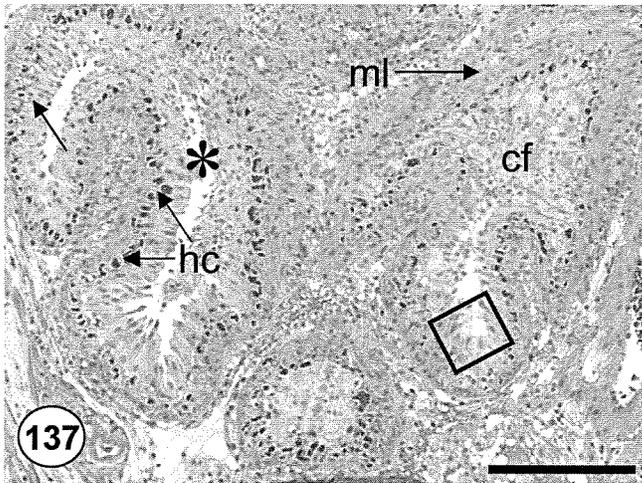
Figs. 140 e 141- Células foliculares preenchem o lume do folículo vazio. Observam-se aí, células foliculares com núcleo descompactado e nucléolo evidente (seta), além de células foliculares apresentando cromatina condensada em grumos espalhados pelo núcleo (seta dupla). hc- hemácia; e- eosinófilo.

Figs. 142 e 143- Folículo vazio apresentando lume ocupado por secreção (asterisco) de natureza acidófila (Fig. 143). Grande quantidade de hemácias (setas). Material acidófilo no citoplasma das células foliculares (Fig. 143).

Fig. 144- Estádio final de involução do folículo vazio. No interior dessa estrutura, presença de eosinófilos (seta).

Coloração: Figs. 137, 138, 141, 143 e 144- HE; Figs. 139, 140 e 142- AT

Barra: 137 (150 μ m); 138, 140, 141 (15 μ m); 139, 142, 143 (100 μ m); 144 (60 μ m).



Figs. 145 a 150- Secções de ovário de exemplares jovens de *X. maculatus* em primeira maturação sexual.

Fig. 145- Animal imaturo, com 1,8 cm de comprimento-padrão e 85 dias de idade, apresentando somente ovogônias e ovócitos primários iniciais.

Fig. 146- Animal com 1,7 cm de comprimento-padrão e 130 dias de idade, em processo de maturação.

Fig. 147- Animal com 1,9 cm de comprimento-padrão e 85 dias de idade, em processo de maturação.

Fig. 148- Animal com 1,9 cm de comprimento-padrão e 70 dias de idade, em processo de maturação.

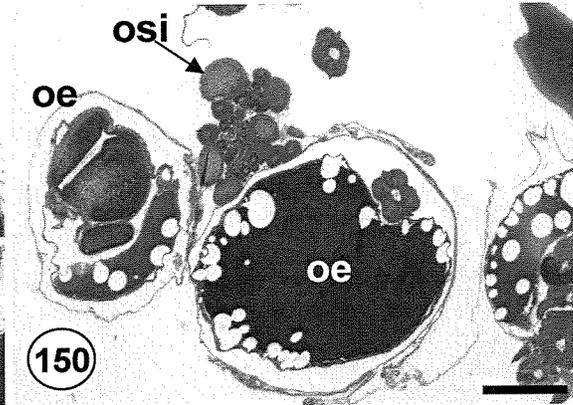
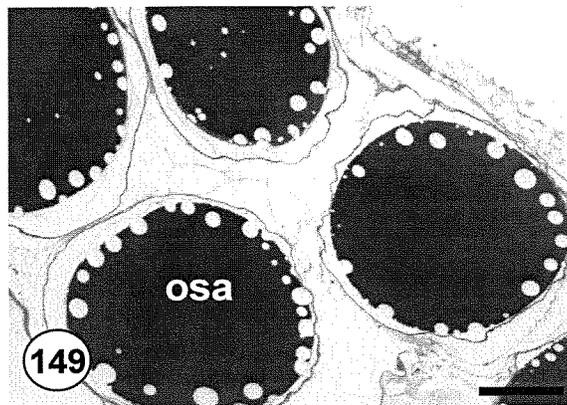
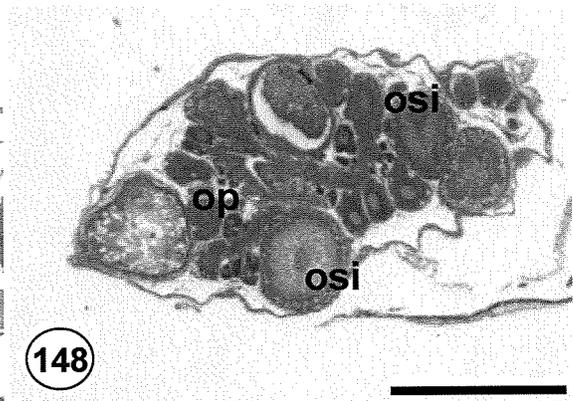
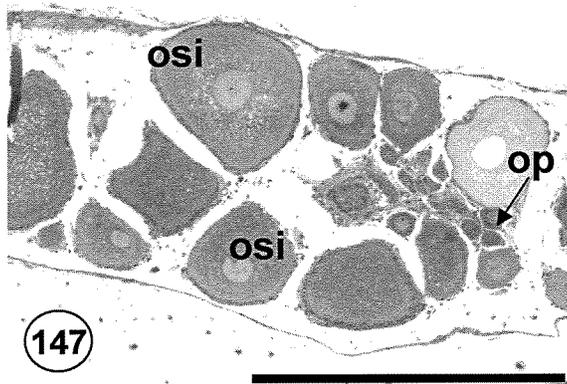
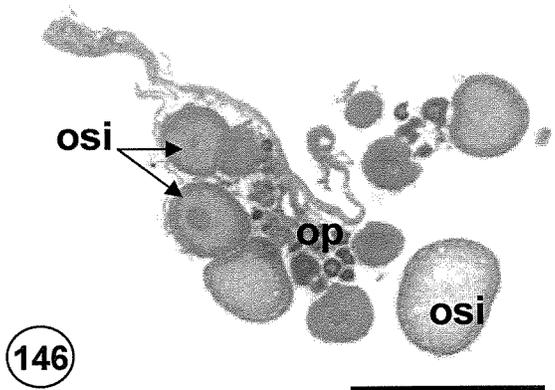
Fig. 149- Animal maduro com 2,4 cm de comprimento-padrão e 91 dias de idade, apresentando ovários contendo ovócitos secundários avançados.

Fig. 150- Animal gestante com 2,2 cm de comprimento-padrão e 130 dias de idade.

oe- ovo embrionado; op- ovócito primário; osi- ovócito secundário inicial; osa- ovócito secundário avançado.

Coloração: Figs. 145, 147-150- AT; Fig. 146- HE

Barra: 145 (50 μm); 146-150 (500 μm).



6.10. Tabelas e gráficos

Tabela 1. Diâmetro dos ovócitos, em μm , para os diferentes estádios de desenvolvimento.

EDO	n	Diâmetro M \pm DP	Amplitude
opi	46	47,78 \pm 15,85	21,43-92,03
opa	52	105,65 \pm 32,16	58,86-172,16
osi	48	293,71 \pm 92,96	111,22-470,68
osa	110	2078,20 \pm 180,50	1550,00-2500,00

EDO: estágio de desenvolvimento ovocitário; n: número de medidas; opi: ovócito primário inicial; opa: ovócito primário avançado; osi: ovócito secundário inicial; osa: ovócito secundário avançado; M: média; DP: desvio-padrão.

Tabela 2. Medidas dos envoltórios dos ovócitos, em μm , nos diferentes estádios de desenvolvimento ovocitário.

EDO	Zona radiata (Espessura) M \pm DP	Célula folicular (Altura) M \pm DP	Membrana basal (Espessura) M \pm DP
opi	-	0,93 \pm 0,57 (8)	0,24 \pm 0,10 (8)
opa	-	4,79 \pm 1,95 (12)	0,21 \pm 0,03 (3)
osi	0,38 \pm 0,12 (23)	4,33 \pm 1,91 (196) (cb) 10,77 \pm 2,58 (70) (ca)	0,30 \pm 0,15 (14)
osa	0,41 \pm 0,19 (52)	9,43 \pm 3,23 (83)	0,22 \pm 0,09 (33)

EDO: estágio de desenvolvimento ovocitário; valores entre parênteses correspondem ao número de células medidas; opi: ovócito primário inicial; opa: ovócito primário avançado; osi: ovócito secundário inicial; osa: ovócito secundário avançado; cb: células baixas; ca: células altas; M: média; DP: desvio-padrão.

Tabela 3. Peso corporal (PC) em gramas no momento do sacrifício, índice gonadosossômico (IGS), índice hepatossômico (IHS) e fatores de condição (K₁ e K₂), por período de coleta pós-parto, de fêmeas de *X. maculatus* do grupo controle.

Horas pós-parto	n	PC	IGS	IHS	K ₁	K ₂
		M±DP	M±DP	M±DP	M±DP	M±DP
0 (zero)	14	0,98±0,43	3,99±1,46	2,44±0,71	3,26±0,74	3,13±0,72
3	15	0,99±0,31	3,98±1,98	2,41±0,50	3,12±0,39	3,00±0,37
6	10	1,01±0,41	3,96±1,96	2,38±0,91	2,92±0,38	2,80±0,36
12	11	1,44±0,57	4,42±1,25	2,65±1,18	3,35±0,38	3,20±0,38
24	9	1,08±0,36	3,60±1,48	2,35±0,54	3,64±0,66	3,51±0,61
36	9	1,31±0,59*	2,58±1,11	2,34±0,61	3,46±0,34*	3,37±0,31*
48	6	1,14±0,35	4,13±1,61	3,22±1,19	3,65±0,79	3,50±0,77
60	6	1,74±0,83*	4,85±3,33	3,16±1,07	3,79±0,56*	3,60±0,53*
72	6	1,18±0,17*	3,39±1,39	2,78±0,64	3,67±0,35*	3,55±0,38*
84	6	1,22±0,59	4,74±3,44	3,30±0,69*	3,48±0,26*	3,31±0,23
96	6	1,22±0,44	4,11±3,89	3,30±1,05	3,54±0,41*	3,40±0,49
108	7	1,02±0,21	3,98±3,15	3,00±0,86	3,47±0,54	3,33±0,50

n = número de exemplares por período de coleta, *: valores estatisticamente diferentes em relação ao grupo tratado. M: média; DP: desvio-padrão.

Tabela 4. Peso corporal (PC) em gramas no momento do parto e do sacrifício, índice gonadosomático (IGS), índice hepatossomático (IHS) e fatores de condição (K₁ e K₂), por período de coleta pós-parto, de fêmeas de *X. maculatus* tratadas com hormônio de crescimento.

Horas pós-parto	n	PC (parto)		PC (sacrifício)		IGS		IHS		K ₁		K ₂	
		M±DP	M±DP	M±DP	M±DP	M±DP	M±DP	M±DP	M±DP	M±DP	M±DP	M±DP	M±DP
3	5	0,99±0,42	1,23±0,32	4,88±3,05	2,56±0,73	3,12±0,32	2,97±0,34						
6	5	0,98±0,41	0,81±0,24	4,12±1,15	2,32±0,25	2,94±0,14	2,82±0,15						
12	8	0,87±0,22	0,84±0,25	3,97±0,83	3,02±0,45	3,22±0,19	3,09±0,20						
24	7	0,87±0,22	0,77±0,18	3,21±1,13	2,24±0,51	3,11±0,32	3,01±0,33						
36	9	0,91±0,35	0,78±0,22*	3,93±1,86	3,10±0,75	2,99±0,21*	2,88±0,18*						
48	7	0,94±0,38	1,14±0,15	3,70±2,05	3,18±0,89	2,98±0,26	2,87±0,28						
60	7	1,02±0,37	1,11±0,15*	3,50±2,07	3,35±0,65	2,94±0,29*	2,87±0,23*						
72	8	1,03±0,37	1,03±0,26*	3,70±1,49	2,97±0,73	3,09±0,29*	3,01±0,29*						
84	6	0,92±0,50	1,02±0,25	3,10±2,34	2,18±0,85*	3,14±0,13*	3,05±0,16						
96	7	0,87±0,44	1,03±0,12	3,02±2,01	3,05±0,68	3,07±0,39*	2,98±0,40						
108	9	1,16±0,29	0,91±0,07	5,67±4,00	2,68±0,97	3,11±0,43	2,94±0,44						

n = número de exemplares por período de coleta, *: valores estatisticamente diferentes em relação ao grupo-controle. M: média; DP: desvio-padrão.

Tabela 5. Classes de comprimento-padrão (cm), número total de animais (n) e número de animais maduros por classe de comprimento para fêmeas jovens de *X. maculatus*.

Classe de comprimento	Ponto médio	n	Maduros	% Maduros
1,5-1,6	1,55	7	0	0
1,7-1,8	1,75	15	1	6,7
1,9-2,0	1,95	27	16	59,3
2,1-2,2	2,15	18	16	88,8
2,3-2,4	2,35	19	16	84,2
2,5-2,6	2,55	18	18	100
2,7-2,8	2,75	3	3	100
2,9-3,0	2,95	5	5	100
TOTAL	-	112	75	-

n = número de exemplares

Tabela 6. Idade de coleta (dias), comprimento-padrão médio e amplitude (cm), número total de animais (n), e número de animais por estágio de maturação gonadal para fêmeas jovens de *X. maculatus*.

IDADE	CP médio	AMPLITUDE	n	MADURO	IMATURO
80	2,10	1,8-2,3	6	3	3
85	1,82	1,6-2,0	13	1	12
90	2,03	1,6-2,4	10	5	5
95	1,75	1,6-1,9	2	0	2
100	2,68	2,4-3,0	10	9	1
105	2,22	1,6-2,5	10	8	2
110	2,65	2,3-2,9	5	4	1
115	2,12	1,6-2,6	12	7	5
120	2,21	1,7-2,5	10	8	2
125	1,86	1,5-2,4	6	2	4
130	2,02	1,9-2,2	4	4	0
135	2,62	2,5-2,9	4	4	0
140	2,19	1,9-2,7	9	9	0
155	2,08	1,9-2,3	8	8	0
160	2,26	2,2-2,3	3	3	0
TOTAL	-	-	112	75	37

CP médio: comprimento-padrão médio; n = número de exemplares.

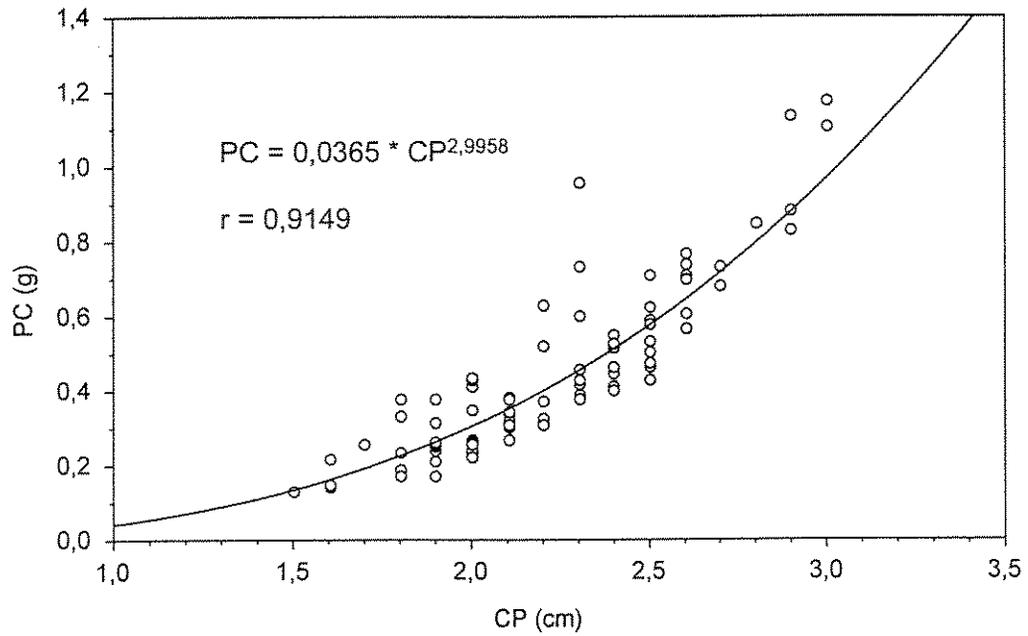


Gráfico 1. Relação peso corporal X comprimento-padrão para fêmeas jovens de *X. maculatus*.

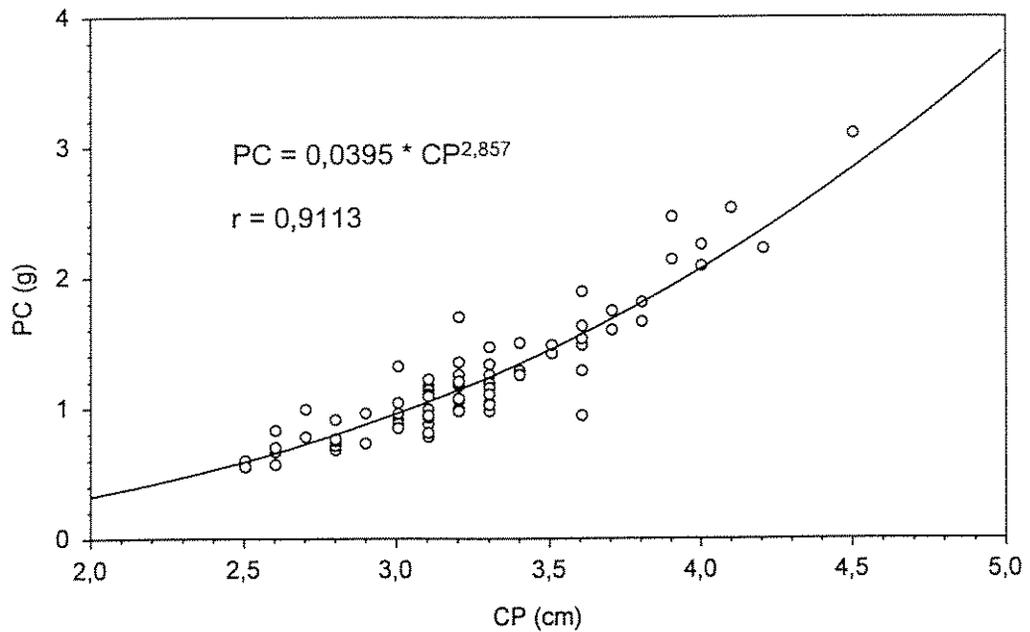


Gráfico 2. Relação peso corporal X comprimento-padrão para fêmeas adultas de *X. maculatus*.

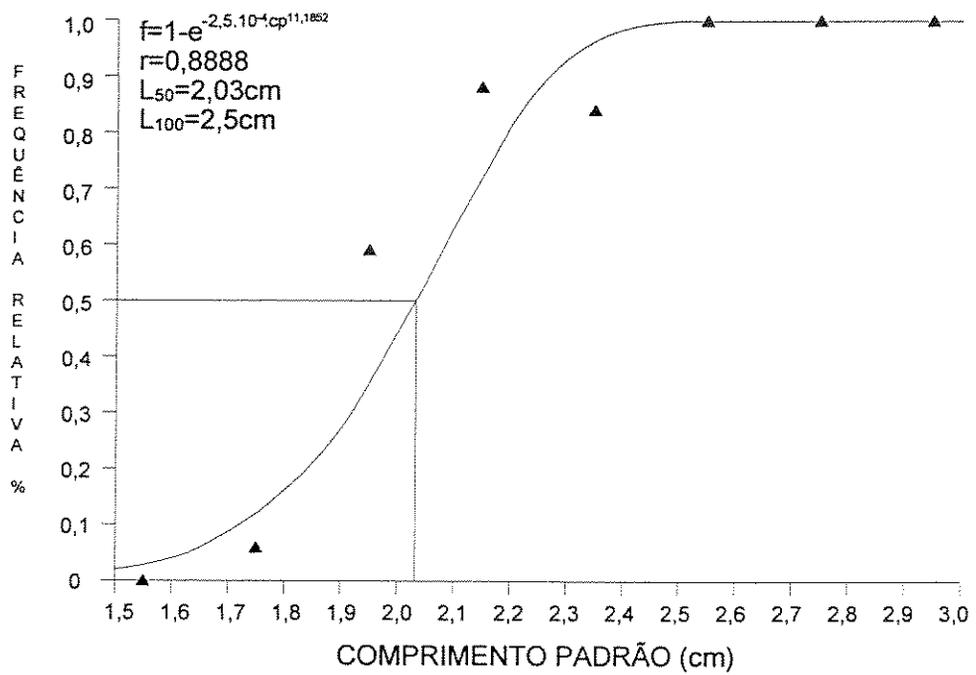


Gráfico 3. Frequência relativa (%) de fêmeas jovens de *X. maculatus* por classes de comprimento-padrão. F= frequência; r= coeficiente de correlação; L_{50} = tamanho no qual 50% dos peixes são adultos; L_{100} = tamanho no qual 100% dos peixes são adultos.

7. DISCUSSÃO

7.1. Anatomia ovariana e a fertilização dos ovócitos

Nas espécies do gênero *Xiphophorus*, o ovário é um órgão ímpar, envolto por um epitélio pavimentoso, ocupando a porção dorsal da região caudal da cavidade celomática (BAILEY, 1933; AZEVEDO, 1976; POTTER & KRAMER, 2000; presente trabalho). Corresponde ao tipo cisto-ovariano (NAGAHAMA, 1983; CONNAUGHTON & AIDA, 1998), padrão entre os teleósteos, e portanto, encontrado também nas demais espécies de Poeciliídeos cujas gônadas femininas já foram descritas (DROLLER & ROTH, 1966; GROOVE & WOURMS, 1994). Este tipo de ovário é um saco cego com um lume que se continua num oviduto curto e tubular, o qual conduz a uma abertura localizada caudalmente ao ânus (SELMAN & WALLACE, 1986). Nos *Xiphophorus* (AZEVEDO, 1976; presente trabalho), esta abertura ou poro genital localiza-se entre o poro anal e a base dos primeiros raios da barbatana anal.

Em *Xiphophorus* (BAILEY, 1933; presente trabalho), o desenvolvimento folicular é do tipo assincrônico, isto é, o ovário maduro normalmente contém folículos em todas as etapas de desenvolvimento (WALLACE & SELMAN, 1981). No ovário após o parto, os folículos imaturos apresentam-se esbranquiçados, e tornam-se amarelados à medida que o vitelo é acumulado, modificando a coloração do órgão. Entre os folículos grandes e de cor amarelo-ouro podem ser vistos ovócitos pequenos e esbranquiçados localizados próximos à cavidade central, ou lume (BAILEY, 1933; presente trabalho).

O epitélio que reveste o lume ovariano nos Poeciliidae, a despeito de recentemente descrito como pseudo-estratificado (POTTER & KRAMER, 2000) em *X. maculatus* (presente trabalho), varia claramente de cúbico a prismático, dependendo da região considerada. Este epitélio se projeta em direção a ovócitos individuais numa invaginação afunilada com o menor diâmetro voltado para o

lume. Porém, o epitélio que constitui a parede lateral dessa invaginação pode apresentar aspecto pseudo-estratificado. A invaginação se distende conforme o ovócito desenvolve e afunda no conjuntivo, e a camada de células que contacta a superfície folicular se adelgaça (KOBAYASHI & IWAMATSU, 2002; presente trabalho). Esta dinâmica faz com que nos ovários contendo ovócitos vitelogênicos, os folículos apareçam ligeiramente separados uns dos outros à semelhança de um cacho de uvas (BAILEY, 1933; presente trabalho). Ao final da vitelogênese, o lume ovariano colapsa devido à pressão exercida pelos ovócitos completamente desenvolvidos (RAVAGLIA & MAGGESE, 2002; presente trabalho).

Nas fêmeas inseminadas naturalmente, os espermatozóides viáveis são estocados por períodos relativamente longos (NAGAHAMA, 1983) permitindo a produção de várias ninhadas sucessivas sem a necessidade de contato com o macho (VALOWE, 1953). Em peixes vivíparos, a presença de espermatozóides na cavidade ovariana é utilizada como uma confirmação de que a fertilização é interna (BURNS et al., 1995). As células que revestem as invaginações e o lume ovariano, como comum às células epiteliais, estão unidas por desmosomos e junções íntimas, o que impede a passagem dos espermatozóides (KOBAYASHI & IWAMATSU, 2002). Conforme suspeita anterior (BURNS et al., 1997), os espermatozóides estabelecem associações com o epitélio, podendo se localizar dentro de depressões em células especializadas ou ser incorporados ao citoplasma dessas células. Não degeneram (POTTER & KRAMER, 2000) e nem mesmo células fagocíticas são encontradas na região (POTTER & KRAMER, 2000; presente trabalho). Apenas uma pequena quantidade de granulócitos e outros indicadores de processos imunológicos ou inflamatórios encontra-se relatada no tecido conjuntivo ovariano (POTTER & KRAMER, 2000). No entanto, em *X. maculatus* (presente trabalho), chama a atenção a grande quantidade de eosinófilos no tecido conjuntivo da entrada do ovário, onde os espermatozóides são inicialmente depositados, concentrando-se em maior número. Essa região apresenta-se organizada na forma de criptas onde os espermatozóides se alojam. Nessa mesma espécie, POTTER & KRAMER (2000) consideraram esta estrutura

como espermateca. A presença de complexos juncionais nas células do epitélio isola o esperma armazenado de qualquer resposta imune materna. Porém, quando essas junções são desfeitas, é possível que os espermatozóides residuais sejam reconhecidos como substâncias estranhas e eliminados (KOYA et al., 1997).

Os espermatozóides presentes na luz do ovário alcançam a invaginação que se forma a partir do lume ovariano e atingem o ovócito maduro através de uma abertura diminuta no epitélio folicular (BAILEY, 1933). Talvez o espermatozóide penetre o ovo por um ponto de fragilidade do epitélio folicular, já que este epitélio não é removido antes da fertilização (KOBAYASHI & IWAMATSU, 2002). Exceto pela abertura no epitélio, situação idêntica ocorre em *X. maculatus* (presente trabalho). Porém, nos ovócitos em vitelogênese avançada, as células foliculares permaneceram unidas apenas em pequenas regiões de suas superfícies laterais. Considerando que os complexos juncionais são estruturas dinâmicas, é possível que os espermatozóides atinjam os ovócitos através de passagens abertas especificamente para isto, oriundas do afastamento proposital entre as células epiteliais no contato com a superfície folicular. No entanto, este aspecto do processo de fertilização ainda precisa ser esclarecido nos Poeciliidae (BREUCKMANN & BRUCKER, 2002).

A despeito da busca exaustiva, a micrópila parece ser inexistente em *X. maculatus* (presente trabalho), sendo possível que a micrópila não exista em peixes vivíparos (KOBAYASHI & IWAMATSU, 2002). Estudos de fertilização *in vitro* mostram que nem sempre o espermatozóide penetra no ovócito pelo pólo onde se encontra o núcleo. O fato de que a penetração ocorre inclusive pelo pólo oposto ao pólo animal reforça a idéia da inexistência da micrópila e indica que algum outro mecanismo possa atuar como facilitador para o espermatozóide (KOBAYASHI & IWAMATSU, 2002). No medaka *Oryzias latipes* (Beloniformes, Adrianichthyidae), o ovócito sofre uma rotação dentro do folículo, trazendo o núcleo para o local de penetração do espermatozóide (IWAMATSU, 1994).

Como característico dos Teleostei (JAMIESON, 1991; MATTEI, 1970), os espermatozoides de poecilídeos não possuem acrossoma. Na maioria das espécies animais, o acrossom, libera o seu conteúdo no momento da fecundação, permitindo que o espermatozoide atravessasse a zona radiata e atinja a superfície do ovo. Porém, nas espermátides do Poeciliidae *Gambusia affinis*, ou mesmo nos espermatozoides ainda presos às células de Sertoli, observa-se uma vesícula alongada partindo do ápice nuclear. Embora esta vesícula não persista no espermatozoide livre, acredita-se que ela seja homóloga do acrossoma (JAMIESON, 1991). Na tentativa de solucionar esta questão, testículos e espermatozoides presentes na espermateca da fêmea de *X. helleri* foram submetidos a reações de imunocitoquímica para detecção do antígeno acrossomal específico (SAA-1). O SAA-1, que parece estar envolvido na regulação da reação acrossômica, foi detectado por meio de anticorpo monoclonal mostrando uma marcação restrita à periferia da cabeça do espermatozoide. Este tipo de marcação indica imunorreatividade na membrana plasmática, senão nela própria, em sítios citoplasmáticos a ela associados. É possível, portanto, que ao invés de um acrossoma compacto como em mamíferos, existam microvesículas no citoplasma da cabeça do espermatozoide dos Poeciliidae e talvez de outros Teleostei, que contenham enzimas líticas do tipo das hialuronidases (BREUCKMANN & BRUCKER, 2002).

7.2. Dinâmica e citoquímica da ovogênese e do desenvolvimento ovocitário

Na ovogênese (sensu GRIER, 2000), as ovogônias presentes no epitélio germinativo proliferam por mitose formando conjuntos de células habitualmente conhecidos como ninhos, e ao entrarem em meiose, dão origem aos ovócitos. Os ovócitos se mantêm em diplóteno e, acompanhados por células de origem epitelial (pré-foliculares), abandonam os ninhos, submergem no tecido conjuntivo das lamelas, e formam os folículos nos quais entram em crescimento primário.

Durante o desenvolvimento, os ovócitos em diferenciação sofrem inúmeras modificações que resultam na extrema especialização do gameta maduro (FRANCOLINI et al., 2003). O critério para classificação das diferentes etapas de desenvolvimento dos ovócitos tem por base as modificações que ocorrem no núcleo, no citoplasma e nos envoltórios ovocitários, e varia conforme os autores (YAMAMOTO, 1956; BEGOVAC & WALLACE, 1988; BAZZOLI & RIZZO, 1990; ELORDUY-GARAY & RAMIREZ-LUNA, 1994; TYLER & SUMPTER, 1996; GRIER, 2000).

Descrito no Poeciliidae *X. helleri*, o desenvolvimento ovocitário foi classificado em duas etapas: hiperplasia de organelas e vitelogênese (AZEVEDO, 1976). Em *X. maculatus* (presente trabalho), no entanto, foram considerados nessa descrição os grandes períodos de desenvolvimento ovocitário, compreendendo o crescimento primário (pré-vitelogênese), o crescimento secundário (formação das vesículas corticais e vitelogênese) e a maturação final (migração do núcleo para o pólo animal). Estes grandes períodos refletem com maior fidelidade os eventos biológicos que ocorrem nestas células germinativas (AZEVEDO, 1976; TYLER & SUMPTER, 1996; GUIMARÃES & QUAGIO-GRASSIOTTO, 2001; GRIER, 2002).

7.2.1. As ovogônias

Em *X. maculatus*, como nos demais teleósteos, as ovogônias são as menores células da linhagem germinativa feminina (BAZZOLI e RIZZO, 1990; TYLER & SUMPTER, 1996). São encontradas esparsas no epitélio germinativo ou junto dele no estroma ovariano subjacente, sempre agrupadas em ninhos, e associadas a células pré-foliculares (GRIER, 2000; FRANCOLINI et al., 2003; RAVAGLIA & MAGGESE, 2003). Apresentam citoplasma escasso contendo muitas mitocôndrias arredondadas e pequena quantidade de retículo endoplasmático rugoso. O núcleo é grande, oval, descompactado e fracamente basófilo, com nucléolo único e fortemente basófilo (DROLLER & ROTH, 1966; FLORES & BURNS, 1993). Apesar do nucléolo muito desenvolvido, a atividade de

síntese protéica vinculada à membrana deve ser baixa neste tipo celular, dada a pequena quantidade de retículo endoplasmático rugoso presente no citoplasma (GUIMARÃES & QUAGIO-GRASSIOTTO, 2001).

7.2.2. Os ovócitos primordiais

Os ovócitos, células meióticas oriundas das ovogônias, ao se desprenderem dos ninhos, carregam consigo células de origem epitelial que os envolvem. As células pré-foliculares que circundam o ovócito sintetizam a membrana basal ao redor do folículo em formação, e células indiferenciadas no estroma ovariano associam-se ao folículo recém-formado. Estas últimas se diferenciam constituindo as duas camadas da teca, interna e externa. Nesse ponto, o folículo ovariano está completamente formado (WALLACE & SELMAN, 1981; SELMAN & WALLACE, 1989; GRIER, 2000; RAVAGLIA & MAGGESE, 2002; QUAGIO-GRASSIOTTO & GUIMARÃES, 2003).

Os ovócitos nos folículos recém-formados caracterizam-se pela presença de complexos sinaptonêmicos no núcleo e pela localização perinuclear das organelas citoplasmáticas (DROLLER & ROTH, 1966; BEGOVAC & WALLACE, 1988; SELMAN & WALLACE, 1989). Nestes ovócitos, o material granular de origem nuclear migra para o ooplasma através do complexo de poros (GURAYA, 1986) onde se associa com as mitocôndrias (GURAYA, 1986; FRANCOLINI et al., 2003; presente trabalho). Durante os estádios iniciais de desenvolvimento, o ovócito parece uma célula relativamente indiferenciada com citoplasma basofílico devido à presença de polirribosomos, e pobre em organelas membranosas, exceto pela grande quantidade de mitocôndrias (ABDALLA & CRUZ-LANDIM, 2003).

7.2.3. O crescimento primário

Durante o crescimento primário ocorre a proliferação de organelas membranosas e, com o avanço do desenvolvimento, o ovócito torna-se mais volumoso. O aumento no volume do ovócito decorre do acúmulo de RNA e proteínas no ooplasma (SELMAN & WALLACE, 1989). Nesse momento, um número variável de nucléolos (BAZZOLI & RIZZO, 1990), normalmente grandes, localizam-se periféricamente no núcleo, e indicam a intensa atividade de transcrição de RNA ribossomal, característica dessa fase do desenvolvimento (GUIMARÃES & QUAGIO-GRASSIOTTO, 2001). A morfologia desses nucléolos pode variar com o desenvolvimento ovocitário, e eles podem apresentar-se compactos, arredondados, em forma de anel, ou ainda, com região fibrilar e granular evidentes (DROLLER & ROTH, 1966; AZEVEDO, 1976; BAZZOLI & RIZZO, 1990). Taxas mais elevadas de síntese e exportação de material nucleolar parecem ocorrer quando nucléolos em forma de anel são formados (AZEVEDO & COIMBRA, 1980).

A membrana plasmática do ovócito torna-se pregueada, e na base das microvilosidades, observa-se presença de vesículas contendo material eletrônico que irá constituir a zona radiata (FRANCOLINI et al., 2003).

No citoplasma dos ovócitos de *X. maculatus*, vesículas assumem um conteúdo castanho-amarelado pela técnica do tetróxido de ósmio em tampão Imidazol. O tampão imidazol estabiliza os lipídios neutros que seriam extraídos no processamento histológico, permitindo que sejam impregnados pelo tetróxido de ósmio. No material a fresco, estas mesmas vesículas são fortemente coradas pelo Sudan Black, confirmando o seu conteúdo lipídico. Outras técnicas empregando tetróxido de ósmio em associação com o bicromato de potássio, têm detectado a presença de lipídios neutros nos ovócitos em crescimento primário (SARASQUETE et al., 2002). As gotas lipídicas são as primeiras estruturas vitelogênicas que surgem no citoplasma ovocitário e precedem o aparecimento dos glóbulos de vitelo (RAVAGLIA & MAGGESE, 2002; SARASQUETE et al., 2002; FRANCOLINI et al., 2003; presente trabalho). No final do crescimento

primário, vesículas fortemente PAS+, indício da presença de polissacarídeos neutros, surgem inicialmente próximas ao núcleo, e depois se dispersam pelo citoplasma (presente trabalho).

7.2.4. O crescimento secundário

Durante o crescimento secundário, o ovócito aumenta muito em tamanho, devido ao acúmulo de nutrientes na forma de glóbulos de vitelo (FRANCOLINI et al., 2003) preparando-se para a reprodução (GUIMARÃES & QUAGIO-GRASSIOTTO, 2002).

Nos ovócitos de *X. maculatus* em crescimento secundário inicial a incorporação de lipídios não é interrompida, e vesículas citoplasmáticas continuam respondendo ao Sudan Black e à técnica do tetróxido de ósmio em tampão imidazol. Outras vesículas contendo polissacarídeos ácidos e/ou neutros mostram-se fortemente coradas pelo Alcian Blue pH2.5 e pelo PAS, fracamente coradas pelo PAS, ou ainda não se coram, nem pelo Alcian Blue pH2.5 e nem pelo PAS. A ausência de coloração pelo Alcian Blue pH2,5 e pelo PAS sugere, para essas vesículas um provável conteúdo lipídico que deve ter sido removido nos procedimentos rotineiros de fixação. Outras vesículas, ainda mostram apenas um grânulo, ou região central fortemente corada. As vesículas PAS positivas são numerosas e têm diferentes tamanhos.

Na microscopia eletrônica de transmissão, vesículas claras, ou com um grânulo elétron-denso ou elétron-densas fundem-se umas as outras, formando vesículas cada vez maiores, que por sua vez devem contribuir para a formação da massa central compacta de vitelo.

As vesículas com grânulo denso ou corado, que circundam o ooplasma periférico no Poeciliidae ovovivíparo, *L. reticulatus*, supostamente correspondem ao alvéolo cortical (DROLLER & ROTH, 1966). Porém, vesículas corticais, parecem não estar presentes nos Poeciliidae ovovivíparos do gênero *Xiphophorus* (PENNA, 1986; presente trabalho). A não ocorrência de alvéolo cortical típico em peixes vivíparos pode ser uma estratégia do processo reprodutivo em que a

fertilização e desenvolvimento interno do embrião dispensariam a impermeabilização do ovo. Por outro lado, as diferentes famílias de peixes ovíparos podem apresentar diferentes padrões de organização e disposição do alvéolo cortical (BAZZOLI & GODINHO, 1994).

A origem das vesículas corticais tem sido atribuída a diferentes componentes celulares (GURAYA, 1986). Supõe-se que possuam um conteúdo glicoprotéico e que sua formação resulte da ação do retículo endoplasmático rugoso na produção de componentes protéicos e glicosilação inicial, que por sua vez seriam transportados para o complexo de Golgi onde o componente polissacarídico é processado (NAGAHAMA, 1983; BAZZOLI & GODINHO, 1994). Essa fase do desenvolvimento, denominada de ovócito com alvéolos corticais nos peixes ovíparos, (BAZZOLI & RIZZO, 1990), parece não ocorrer em *X. maculatus*.

Na seqüência do crescimento secundário, inicia-se a vitelogênese, com a incorporação do vitelo que ocorre a partir da periferia do ovócito e se deposita progressivamente entre as vesículas existentes no citoplasma (RIDEOUT et al., 1999). O vitelo resulta do processamento da vitelogenina, uma proteína sintetizada nos hepatócitos de fêmeas sob ação de estrógenos, que é transportada para o ovário através da corrente sanguínea, sendo internalizada por micropinocitose seletiva e processada no interior dos ovócitos para formar os glóbulos de vitelo (DROLLER & ROTH, 1966; SELMAN & WALLACE, 1989; TYLER & SUMPTER, 1996). Nesta etapa do desenvolvimento, as vesículas PAS+ deixam de ser visualizadas. O seu conteúdo de natureza glicídica aparentemente agrega-se aos grânulos de vitelo em formação e torna-se parte do vitelo que é PAS+. Alternativamente, poderiam tratar-se de vesículas contendo enzimas hidrolíticas oriundas do Golgi e que, incorporadas aos grânulos, seriam utilizadas no processamento da vitelogenina presente no vitelo recém-pinocitado. Ainda nestes ovócitos, o ooplasma periférico é acidófilo e ocupado por várias organelas citoplasmáticas. A intensa atividade de transporte na região poderia justificar este posicionamento.

Em peixes ovíparos, o aumento na deposição dos glóbulos de vitelo nos ovócitos em vitelogênese atinge a região central do ovócito deslocando as vesículas corticais em direção à periferia, levando à formação dos alvéolos corticais (SELMAN & WALLACE, 1989; BAZZOLI & RIZZO, 1990; BAZZOLI & GODINHO, 1994; RIDEOUT et al., 1999; RAVAGLIA & MAGGESE, 2002). Com a deposição do vitelo, as organelas citoplasmáticas são deslocadas para o ooplasma periférico (FRANCOLINI et al., 2003; presente trabalho), dispendo-se entre os glóbulos de vitelo e as gotas lipídicas.

Nos ovócitos vitelogênicos de *X. maculatus* (presente trabalho), tanto a massa de vitelo quanto os glóbulos de vitelo que ainda estão sendo incorporados respondem fortemente ao fast green, xylidine ponceau e ao PAS, mas não respondem à coloração para polissacarídeos ácidos (Alcian Blue pH2.5). Reações positivas ao fast green, xylidine ponceau, PAS e Sudan Black indicam a presença de lipídios, glicolipídios e glicoproteínas neutras na composição do vitelo. A presença de complexos polissacarídios-lipídios-proteína constituindo os glóbulos de vitelo dos ovócitos é comum aos teleósteos dos mais diferentes taxa (van den HURKE & PEUTE, 1985; SARASQUETE et al., 2002), incluindo os teleósteos neotropicais (BAZZOLI & RIZZO, 1990; BAZZOLI et al., 1996).

Os ovócitos em vitelogênese avançada apresentam citoplasma acidófilo, constituído por uma massa homogênea resultante da fusão dos glóbulos de vitelo (BAILEY, 1933; DROLLER & ROTH, 1966; AZEVEDO, 1976; presente trabalho). A fusão pode, no entanto, restringir-se somente à zona central do ovócito (AZEVEDO, 1976). Neste período, a incorporação de glóbulos de vitelo ainda pode ser observada na periferia do ovócito (DROLLER & ROTH, 1966; AZEVEDO, 1976, presente trabalho). Nos Poeciliidae do gênero *Xiphophorus*, o vitelo central é envolto por uma camada periférica de gotas lipídicas com tendência a confluir (PENNA, 1986; presente trabalho).

Com o intenso crescimento do ovócito, a relação núcleo/citoplasma diminui ainda mais e nessa fase, o dobramento da superfície ovocitária diminui (DROLLER & ROTH, 1966).

7.3. Morfometria dos ovócitos

O aumento no diâmetro do ovócito no decorrer do desenvolvimento se deve principalmente ao acúmulo de vitelo e é atestado pelos valores tomados no início e ao final do processo, que mostram ser este aumento da ordem de 25 vezes em *X. maculatus*. No entanto, em vitelogênese avançada o núcleo tende a se deslocar para o pólo animal. Como o referencial para a mensuração é o núcleo central, a medida dos ovócitos no final do processo pode não corresponder ao diâmetro real (KOBAYASHI & IWAMATSU, 2002; presente trabalho). Mensurações realizadas a partir de cortes de ovócitos em vitelogênese avançada, nos quais o núcleo muitas vezes não é visível, podem não corresponder ao real diâmetro do ovócito (KOBAYASHI & IWAMATSU, 2002). Na tentativa de sanar o problema, e obter um valor mais próximo do real, ovócitos íntegros de *X. maculatus* (presente trabalho) nesse estágio de desenvolvimento foram mensurados em microscopia estereoscópica.

7.4. Formação, citoquímica e morfometria da zona radiata

A formação da zona radiata, as modificações estruturais que ocorrem nas células foliculares e na superfície ovocitária, assim como as características da membrana basal e teca, acompanham o desenvolvimento ovocitário.

Os ovócitos no início do crescimento primário são envoltos por uma camada única de células pavimentosas, derivadas de células somáticas pré-foliculares (BEGOVAR & WALLACE, 1988; GRIER, 2000). As células foliculares são unidas na região baso-lateral por estruturas juncionais, repousam sobre uma membrana basal, delimitam uma luz e não são vascularizadas. Preenchem, portanto, os requisitos que caracterizam um epitélio (GRIER, 2000).

Nestes ovócitos, no espaço entre o oolema e a superfície apical das células foliculares, tem início a deposição de substância de natureza amorfa, que

constituirá a zona radiata. As substâncias são depositadas entre as microvilosidades formadas a partir do ovócito e das células foliculares (DROLLER & ROTH, 1966; ANDERSON, 1967; AZEVEDO, 1976; SELMAN & WALLACE, 1989; RIEHL & GREVEN, 1993; QUAGIO-GRASSIOTTO & GUIMARÃES, 2003; e presente trabalho). Assim, formam-se os canais-poro, arranjados de maneira ordenada e ocupados pelas microvilosidades ovocitárias (FRANCOLINI et al., 2003).

Com o desenvolvimento, a superfície do ovócito torna-se intensamente pregueada, formando invaginações profundas (DROLLER & ROTH, 1966; presente trabalho), numa suposta preparação do ovócito para a entrada de proteínas do vitelo extra-ovariano (DROLLER & ROTH, 1966). Esse aspecto se reflete na conformação estrutural da zona radiata que se torna ondulada. Uma acomodação das células foliculares, que se apresentam ora pavimentosas, ora cúbicas, (DROLLER & ROTH, 1966; AZEVEDO, 1976; presente trabalho), parece ser conseqüência desta alteração. Variações na forma das células foliculares ao longo do desenvolvimento ovocitário são relatadas por vários autores (NAKAMURA et al., 1993; RIZZO & BAZZOLI, 1993; NAKASHIMA & IWAMATSU, 1994; BENJAMIN, 1996; FRANCOLINI et al., 2003), e podem ocorrer num mesmo ovócito (BENJAMIN, 1996). Nessa etapa do desenvolvimento, a zona radiata é constituída de camada única de substância amorfa e elétron-densa, e possui numerosos poros ocupados pelas microvilosidades (DROLLER & ROTH, 1966; AZEVEDO, 1976; presente trabalho).

Durante o crescimento secundário inicial e intermediário, a zona radiata dos ovócitos de *X. maculatus* é positiva ao Alcian Blue pH2.5, e deixa de responder a este corante nos ovócitos vitelogênicos. Essa positividade pode ser provocada pela passagem de moléculas para o interior do ovo. Apesar da presença de glicoconjugados ácidos na zona radiata de *X. maculatus* em algumas fases do desenvolvimento, os principais componentes dessa estrutura são glicoproteínas neutras, que respondem fortemente ao fast green pH2.5 e ao PAS (presente trabalho), e que parecem estar amplamente distribuídos entre os teleósteos (van

den HURKE & PEUTE, 1985; BAZZOLI & RIZZO, 1990; CHINI et al., 2001; GARCIA et al., 2001; SARASQUETE et al., 2002). Algumas vezes, essas substâncias mostram uma distribuição preferencial, com polissacarídeos mais concentrados na camada externa, enquanto a interna é rica em proteínas (TESORIERO, 1977b).

Estudos histoquímicos da zona radiata de diferentes espécies de peixes forrageiros mostram, ainda, que a camada externa da zona radiata pode conter glicoconjugados ácidos carboxilados, ou mesmo glicoproteínas ricas em ácido siálico (BAZZOLI et al., 1996).

Embora a composição da zona radiata e suas características bioquímicas tenham sido definidas para alguns teleósteos (NAGAHAMA, 1983; BEGOVAC & WALLACE, 1989; BAZZOLI, 1992), sua origem ainda é controversa. A responsabilidade pela síntese, deposição e associação dos componentes da zona radiata tem sido atribuída ao ovócito (ANDERSON; 1967; TESORIERO 1977a, 1977b, 1978; BEGOVAC & WALLACE; 1989; RIZZO & BAZZOLI, 1991). Por outro lado, além da participação das células foliculares (WOURMS, 1976), supõe-se que alguns componentes protéicos da zona radiata tenham origem extra-ovariana (HAMAZAKI, 1989; HYLNNER & HAUX, 1992; OPEN-BERNTSEN et al., 1992).

No final do desenvolvimento ovocitário, o número de poros da zona radiata e as microvilosidades que partem das células foliculares diminuem (GROOT & ALDERDICE, 1985; MATSUYAMA et al., 1991; RAVAGLIA & MAGGESE, 2003; presente trabalho). As células foliculares retraem seus prolongamentos deixando os canais-poros (SELMAN et al., 1993) que se tornam às vezes vazios (KOBAYASHI, 1985; SCHMEL & GRAHAM, 1987; BAZZOLI & RIZZO, 1992; NAKASHIMA & IWAMATSU; 1994).

No final da vitelogênese, a zona radiata é constituída por duas camadas e apresenta aspecto linear, sendo mais espessa que na fase anterior (presente trabalho).

Nos Teleostei em geral, e conseqüentemente em *X. maculatus*, a altura das células foliculares e a espessura da zona radiata aumentam ao longo do

desenvolvimento ovocitário, enquanto a espessura da membrana basal diminui. Relatos isolados informam, no entanto, que a espessura da zona radiata pode diminuir durante este período (FORMACIÓÑ et al., 1993). Comparada às espécies ovíparas, a zona radiata em *X. maculatus* é bastante delgada, característica compartilhada pela maioria dos ovócitos das espécies vivíparas. Esse fato pode estar relacionado à viviparidade (RIEHL & GREVEN, 1990; RIEHL & GREVEN, 1993), em que o desenvolvimento do embrião ocorre em ambiente mais protegido (RIEHL & GREVEN, 1993). Desse modo, uma zona radiata delgada facilitaria a troca mais efetiva de gases, enquanto uma zona radiata espessa proporcionaria proteção física contra exigências ambientais externas, situação normalmente observada em espécies ovíparas (BAZZOLI & GODINHO, 1994). Este fato pode também justificar a provável ausência de reação cortical nos peixes vivíparos.

Especificamente em *X. maculatus* (presente trabalho), a espessura máxima atingida pela da zona radiata é da ordem de 0,4 μm . Dados anteriores informam, no entanto, que a zona radiata em *X. maculatus* pode atingir 0,8 μm de espessura (EHARDT & GÖTTING, 1970 - apud RIEHL & GREVEN, 1993). Interferências dos métodos de preparo do material para análise podem eventualmente responder por conflitos desta ordem. Dados mais conclusivos dependeriam, portanto, de um procedimento comparativo que utilizasse exemplares dos espécimes de ambos os estudos, submetidos rigorosamente às mesmas condições de preparo – fixação, meio de inclusão.

Por outro lado, em *X. maculatus*, a diminuição de espessura da membrana basal nos ovócitos maduros (presente trabalho) indica que seu processo de síntese, intenso durante os crescimentos primário e secundário, se desacelera na maturação final, situação em que o aumento do diâmetro do ovócito levaria ao estiramento da estrutura com conseqüente diminuição da sua espessura. Situação similar pode ocorrer com a zona radiata, justificando a redução de sua espessura no final da maturação ovocitária.

7.5. O epitélio folicular

Durante o crescimento primário, o citoplasma das células foliculares contém ribossomos livres, poucas mitocôndrias, e núcleo alongado e descompactado, e não forma microvilosidades (CRUZ-LANDIM & CRUZ-HÖFLING, 1989, QUAGIO-GRASSIOTTO & GUIMARÃES, 2003; presente trabalho). Com o desenvolvimento do ovócito, ocorrem nessas células mudanças morfológicas acompanhadas pelo aumento das organelas envolvidas no suporte e na síntese de proteínas, como mitocôndrias, ribossomos, retículo endoplasmático e complexo de Golgi. (GURAYA, 1986; CRUZ-LANDIM & CRUZ-HÖFLING 1989, QUAGIO-GRASSIOTTO & GUIMARÃES, 2003; RAVAGLIA & MAGGESE, 2003; presente trabalho).

Em *X. maculatus* (presente trabalho), essas células são unidas por estruturas juncionais localizadas na extremidade baso-lateral e interdigitações no restante da sua superfície de contato. Considerando a sua natureza epitelial, a presença de complexos juncionais seria uma característica das células foliculares e, portanto, sempre presentes neste tipo celular em Teleostei dos mais diferentes taxa (GRIER, 2000; QUAGIO-GRASSIOTTO & GUIMARÃES, 2003; RAVAGLIA & MAGGESE, 2003).

Relatos informam, no entanto, que ao final da ovogênese as células foliculares podem não apresentar nenhum tipo de estrutura juncional (KOBAYASHI, 1985). Não se descarta a sua ocorrência durante a ovogênese (KOBAYASHI, 1985), pois como estruturas dinâmicas essas junções podem ser desfeitas e novamente restabelecidas ao longo do processo (KOYA et al., 1997).

Nos ovócitos maduros, a forma das células foliculares é variável mesmo em espécies pertencentes a uma mesma família. Nos Poeciliidae, os relatos em *L. reticulatus* as apontam como pavimentosas (DROLLER & ROTH, 1966), e em *X. helleri* como cúbicas (AZEVEDO, 1976), sendo prismáticas em *X. maculatus*.

Nos folículos vazios de *X. maculatus* (presente trabalho), imediatamente após o parto, as células foliculares continuam presas por complexos juncionais

que se mantém inclusive durante a gestação. Diferentemente do período de desenvolvimento ovocitário, em que as junções tinham uma localização basolateral, agora as junções se concentram na região apical, enquanto no restante da superfície lateral o contato entre células adjacentes se faz por inúmeras interdigitações .

7.6. Recuperação ovariana pós-parto

O estudo de aspectos morfológicos da recuperação ovariana pós-parto em condições laboratoriais controladas e sob ação do tratamento com hormônio de crescimento em exemplares de *X. maculatus*, vem preencher uma das lacunas no conhecimento da biologia reprodutiva desta espécie.

7.6.1. Imuno-histoquímica

A estrutura do hormônio de crescimento é altamente conservada ao longo da evolução dos vertebrados, porém aquela dos teleósteos diverge consideravelmente daquela dos peixes primitivos e dos vertebrados superiores (HAYASHIDA & LAGIOS, 1969; HAYASHIDA, 1970; FARMER et al., 1981 apud VISSIO et al., 1996).

Em *X. maculatus*, justificativas para a ausência de marcação poderiam ser vinculadas à quantidade de hormônio presente no órgão, já que nem mesmo o tratamento dos animais com o hormônio de crescimento permitiu a obtenção de uma resposta positiva. Uma explicação alternativa poderia, portanto, advir da natureza química deste hormônio que é glicoprotéico, tem meia-vida bastante curta, e rápida metabolização pelo organismo. Contra-prova clara é obtida tanto pela marcação positiva de hipófise de peixe, quanto pela ausência total de imunomarcação dos controles negativos na omissão do anticorpo primário somente, e dos anticorpos primário e secundário.

Mesmo a recuperação antigênica não logrou uma resposta positiva. A recuperação antigênica expõe sítios que poderiam estar mascarados pelo processo de fixação (SHI et al., 2001).

Além disso, uma possível remoção do hormônio pelas passagens sucessivas em banhos de água e álcool durante as etapas de fixação e inclusão, não pode deixar de ser considerada.

Como não há evidências de síntese e secreção de hormônio de crescimento pelos ovários de peixes, um procedimento alternativo na busca dos efeitos do hormônio de crescimento sobre o ovário seria a imuno-marcação visando os receptores deste hormônio. Em truta, os receptores para hormônio de crescimento estão presentes no ovário ao longo de todo o ciclo reprodutivo. Este hormônio é importante durante o recrutamento ovocitário, vitelogênese e maturação folicular (VAN DER KRAAK et al., 1990; GOMEZ et al., 1999a), com os seus níveis mais altos ocorrendo no período pré-ovulatório (GOMEZ et al., 1999b). No testículo deste mesmo animal, os receptores para hormônio de crescimento também estão presentes durante todo ciclo reprodutivo, ocorrendo em maior concentração nas células somáticas, principalmente nas células de Sertoli (GOMEZ et al., 1998). Nos ovários da tilápia *Oreochromis mossambicus*, (KAJIMURA et al., 2004) os receptores para este hormônio presentes no citoplasma e no núcleo de ovócitos jovens, passam a se concentrar nas células foliculares e tecais de ovócitos vitelogênicos. Neste caso, a detecção da presença desses receptores no ovário poderia permitir a sua quantificação frente a diferentes situações experimentais, seja durante ou mesmo após o período de tratamento. Um empecilho para os procedimentos em peixes é o fato de que no mercado o único anticorpo existente é contra o receptor de hormônio de crescimento humano. Diferenças entre estes receptores nas diferentes classes de animais poderiam, no entanto, levar a respostas negativas. Porém, o hormônio de crescimento humano se liga fortemente a todos os receptores identificados em diferentes classes de vertebrados (NICOLL et al., 1986), sugerindo a conservação

estrutural e funcional desses receptores durante a evolução dos vertebrados (CALDUCH-GINER et al., 2000; LEE et al., 2001).

7.6.2. Os ovários pós-parto

Em *X. maculatus*, nos ovários pós-parto, são encontrados ovócitos em todos estádios de desenvolvimento independentemente do período de coleta considerado. Os ovócitos vitelogênicos iniciais e avançados devem iniciar seu amadurecimento durante a gestação, e acumular vitelo para a gestação seguinte. Resultados semelhantes foram relatados em *Gambusia affinis* (Poeciliidae) mantidos em condições controladas entre dois partos sucessivos (KOYA et al., 1998). Porém, considerando que os ovários de *X. maculatus* encontram-se desorganizados e repletos de folículos vazios resultantes do parto, é possível que estes ovócitos não sejam fertilizados. Ao que parece, a involução dos folículos vazios, além da reorganização e preparação dos ovários, deve preceder uma nova gestação, pois a quantidade de folículos atrésicos no período pós-parto é grande. A quantidade de folículos atrésicos parece ser variável dependendo da espécie estudada. São mais freqüentes em *G. affinis* (KOYA et al., 2000) que em outros poecílídeos, especialmente em *Poecilia reticulata* (LAMBERT, 1970), onde ocorrem numa freqüência relativamente baixa.

Em *X. maculatus*, tanto no grupo-controle quanto no grupo tratado com hormônio de crescimento, alguns embriões ainda permaneceram nos ovários. A despeito do aspecto corporal das fêmeas que já haviam concluído o parto, algum filhote pode ter permanecido no ovário aguardando o momento do parto ou mesmo não ter sido eliminado. Como não é relatada a ocorrência de superfetação para a espécie (CONSTANTZ, 1989), estes embriões provavelmente serão reabsorvidos pelo organismo materno.

Nas fêmeas submetidas ao tratamento com hormônio de crescimento que os eventos de atresia são mais duradouros. Supostamente, o tratamento hormonal associado ao estresse do manejo poderiam ser responsáveis pelo efeito detectado. Esses resultados podem ser associados aos menores valores de K_1 e

K₂ desse grupo, se comparados aos animais do grupo-controle, cujas diferenças são estatisticamente significativas. Porém, o estresse resultante do manuseio, anestesia e administração do hormônio nas fêmeas, e que poderia estar determinando uma pior condição nesses animais, não pode ser olvidado. Assim, a afirmativa de que as fêmeas podem reabsorver ovócitos maduros se as condições ambientais tornarem-se indesejáveis, poderia, se generalizada, abranger também ovócitos nas demais etapas da vitelogenese (BURNS et al., 1997).

Efeitos específicos do hormônio de crescimento sobre a reprodução ainda não são claros. Estudos sugerem que o hormônio influencia a regulação gonadal, o controle da produção ovariana de IGF-1 na estimulação da produção de estradiol e a aceleração do desenvolvimento ovocitário (LE GAC, 1993). Nos peixes, o papel do hormônio de crescimento na maturação ainda não está claro, uma vez que seus níveis encontram-se mais elevados tanto durante o período de crescimento gonadal quanto no período de vitelogenese exógena (BJORNSSON et al., 1994). Sabe-se que o hormônio de crescimento aumenta o efeito estimulador de baixas doses de estradiol sobre os níveis plasmáticos de vitelogenina (LE GAC, 1993). Em mamíferos, o hormônio de crescimento parece não ter qualquer efeito na eficiência da espermatogênese (SANTOS et al., 1999). No entanto, muitos dos resultados são contraditórios e podem ser reflexo de diferentes respostas das gônadas em função do estágio de maturação e do uso de diferentes doses hormonais. Se o hormônio de crescimento é essencial para a puberdade, gametogênese ou fertilidade ainda é questão em debate (LE GAC, 1993).

Além disso, os valores circulantes de hormônio de crescimento para as diferentes espécies de peixes, em condições fisiológicas distintas, não são conhecidos. Com isso, um tratamento adotado para uma espécie pode não ser o mais adequado para outras. Assim, metodologia proposta por SEIDELIN & MADSEN (1999) e por BALSISSEOTO (2002), com uma dosagem de 2 µg/g de peso vivo, e adotada neste trabalho, não foi eficaz em acelerar a recuperação ovariana pós-parto em *X. maculatus*, mas pode ter influência na atresia folicular.

7.6.3. A atresia folicular

A atresia folicular é um processo freqüentemente observado nos ovários de vertebrados, em condições naturais ou experimentais (SAIDAPUR, 1978). Durante este processo, os ovócitos regridem, passando por várias fases de degeneração e reabsorção (LAMBERT, 1970). A atresia pode ser induzida por diferentes fatores, tais como estresse, jejum, agentes tóxicos, luz, temperatura, confinamento e níveis hormonais inadequados (NAGAHAMA, 1983; GURAYA, 1986).

A atresia dos ovócitos secundários é dita hipertrófica, devido à hipertrofia e hiperplasia das células foliculares. A que ocorre nos ovócitos em vitelogênese lipídica, ou ovócitos primários, é conhecida como não hipertrófica (VIZZIANO & BEROIS, 1990).

Em *X. maculatus*, a atresia atingiu os ovócitos em crescimento secundário e foi mais intensa nas fêmeas tratadas. Estresse e níveis hormonais têm sido apontados como fatores determinantes na atresia ovocitária (NAGAHAMA, 1983).

As alterações morfológicas observadas durante a atresia foram comparadas com as características dos ovócitos normais. Apesar da atresia folicular ser um processo contínuo e dinâmico reconhece-se na sua evolução quatro etapas bem determinadas (LAMBERT, 1970; BAZZOLI & RIZZO, 1995; RIZZO & BAZZOLI, 1995; RIZZO & BAZZOLI, 1997; MIRANDA et al., 1999) que também se sucedem durante a atresia folicular em *X. maculatus*. Na primeira, ocorre hipertrofia de células foliculares e degeneração ovocitária, com as células foliculares e as da teca penetrando o ovócito; na segunda, o ovócito desaparece e sua cavidade é preenchida por células foliculares que são agora bastante numerosas; a terceira é marcada pela acentuada diminuição de tamanho do folículo e acúmulo de pigmento castanho-amarelado; e a última, caracteriza-se pela contínua diminuição de tamanho e permanência no ovário, por longos períodos, de um grupo de células com grânulos castanho-amarelados.

Além da participação das células foliculares hipertrofiadas no processo de reabsorção do vitelo, os vasos sanguíneos da teca que aumentam em número também têm uma atuação ativa nesse processo (LANG, 1981a; BAZZOLI &

RIZZO, 1995). Durante a atresia folicular em *X. maculatus*, o tecido conjuntivo que circunda o ovócito em degeneração torna-se ricamente vascularizado e eosinófilos conduzidos a estes sítios pelo aumento da vascularização local estão presentes desde as etapas iniciais do processo. Outros relatos, a despeito de coincidentes no que se refere ao aumento da vascularização, registram a presença de granulócitos ativos próximos a folículos atrésicos somente no estágio final de reabsorção (MIRANDA et al., 1999). Sugere-se ainda, que os eosinófilos também teriam uma ação sinérgica com as células foliculares no processo de reabsorção folicular, invadindo o ovócito em atresia e liberando seus grânulos que contêm enzimas líticas (BESSEAU & FALIEUX, 1994).

Em *X. maculatus* (presente estudo), os eosinófilos são encontrados em maior número nas fêmeas tratadas com o hormônio de crescimento do que naquelas mantidas em condições controladas. Os eosinófilos são fonte importante de numerosos fatores de crescimento e citocinas, e são rapidamente mobilizados por macrófagos. Eles liberam mediadores inflamatórios que controlam o recrutamento leucocitário, a degradação da membrana basal e a angiogênese (REIBIGER & SPANEL-BOROWSKI, 2000). Em bovinos, os eosinófilos atuam na degradação da parede folicular no momento da ovulação e têm influência na neovascularização do corpo lúteo (ROHM et al., 2002). Em peixes, baixas doses de hormônio de crescimento induzem resposta proliferativa dos leucócitos do sangue periférico (SAKAI et al., 1996b) e aumentam significativamente o índice de fagocitose (SAKAI et al., 1996a; SAKAI et al., 1997; NARNAWARE et al., 1997). Estes relatos constituem um forte indício de que o hormônio de crescimento possa atuar como um fator ativador de fagocitose. A aposição desses dados com a maior duração da atresia folicular e o maior número de eosinófilos que ocorrem no local, nas fêmeas de *X. maculatus* tratadas com o hormônio de crescimento, condizem com a idéia de que este hormônio atue como um fator ativador de fagocitose.

Os leucócitos de peixes estão envolvidos na resposta imune não-específica. Eles aumentam muito em número nas primeiras 24 horas após o peixe ter passado por estresse; porém, sua viabilidade decresce drasticamente após 48

horas (SECOMBES, 1996). Em *X. maculatus* (presente trabalho), apesar de não avaliados quanto a sua viabilidade, os eosinófilos ocorrem em grande número durante todo o período analisado. Estudos *in vivo* e *in vitro* têm mostrado que macrófagos e granulócitos (neutrófilos e, em alguns casos, eosinófilos) de peixe são fagocíticos e englobam uma grande variedade de partículas antigênicas e inertes. Além disso, a fagocitose realizada por macrófagos pode ser dependente de uma série de fatores, entre eles, as citocinas (SECOMBES, 1996) liberadas por eosinófilos (REIBIGER & SPANEL-BOROWSKI, 2000). O hormônio de crescimento é um hormônio que apresenta similaridades estruturais com as citocinas (SECOMBES, 1996), podendo, então, ser ele o ativador dos macrófagos que por sua vez podem estar recrutando os eosinófilos para os ovários.

Em peixes, nos folículos atrésicos, células foliculares hipertrofiadas pela ingestão e digestão do vitelo contêm numerosos vacúolos heterogêneos, inclusões elétron-densas como figuras de mielina e lipofuscina, elementos citoplasmáticos em degeneração (MIRANDA et al., 1999), além do próprio vitelo (MIRANDA, 1996), num claro indicativo da atividade fagocitária dessas células durante a atresia. Na busca do papel exercido pelas células foliculares no processo de reabsorção dos folículos atrésicos, testou-se a ação destas células frente ao azul de tripan, porém em ovócitos vitelogênicos de *Astyanax bimaculatus lacustris* em cativeiro. Em resposta, as células foliculares dos ovócitos vitelogênicos incorporaram o azul de tripan injetado na circulação, através do fenômeno de granulopexia, muito conhecido nos macrófagos (BAZZOLI & RIZZO, 1995). Por outro lado, estudos histoquímicos demonstram que a fraca atividade fosfatase ácida de células foliculares de folículos normais aumenta fortemente durante o estágio inicial da atresia (LAMBERT, 1970). Estes experimentos indicam que as suposições de que as células foliculares ingerem vitelo e têm participação ativa no processo de atresia (LANG, 1981a; BESSEAU & FALIEUX, 1994) estavam corretas.

A detecção da presença de enzimas lisosomais (fosfatase ácida) nos folículos em atresia, considerada como indicativo de processos degenerativos, conduziu à conclusão de que os folículos atrésicos não produzem hormônios

esteróides (LAMBERT, 1970). Acredita-se, no entanto, que os folículos atrésicos não teriam eles próprios capacidade esteroidogênica, mas induziriam a diferenciação de células intersticiais do ovário que secretariam hormônios esteróides necessários para crescimento, diferenciação e maturação de folículos normais (GURAYA, 1986). A análise ultra-estrutural de folículos atrésicos demonstrou que estas estruturas não possuem características esteroidogênicas (MIRANDA et al., 1999).

7.6.4. Os folículos vazios

Os folículos vazios, estruturas remanescentes nos ovários após o parto e que são contínuos com o lume do ovário, apresentam um lume amplo e irregular, parede constituída por camada única de células foliculares, pela teca e por uma camada de músculo liso (LANG 1981a; presente trabalho).

As primeiras modificações no folículo após o parto são mecânicas, ou seja, formam-se dobras no epitélio após a expulsão do alevino devido à contração da musculatura lisa presente na teca. Essas dobras diminuem com a regressão do folículo (GOLDBERG et al., 1984; FITZHUGH & HETTLER, 1995; presente trabalho). Em *X. maculatus*, o lume do folículo é gradativamente obstruído pela proliferação e hipertrofia de células foliculares, pela liberação de restos celulares, por uma secreção de natureza acidófila e PAS+, e pela pressão exercida pelos ovócitos em desenvolvimento. A secreção observada no interior dos folículos parece ser do tipo holócrina e como este lume comunica-se com o lume do ovário, é provável que o material secretado retorne ao tecido ovariano por atividade pinocítica das células do epitélio ovariano (LANG, 1981b).

Diferenciar folículos vazios de folículos atrésicos torna-se difícil a partir dessa fase (GOLDBERG et al., 1984; FITZHUGH & HETTLER, 1995). Em *X. maculatus*, um claro marcador para os folículos atrésicos é a presença de pigmentos castanho-amarelados, que não ocorrem nos folículos vazios (LAMBERT, 1970, presente trabalho). A formação desses pigmentos pode ser atribuída à deficiência dos lisosomos para a digestão de lipídios (LANG, 1981a) e

reconhece-se no seu conteúdo pigmentado, a presença de grãos de lipofuscina (MIRANDA et al., 1999).

Nas espécies em que as células foliculares são pavimentosas, durante a involução dos folículos, estas células hipertrofiam tornando-se prismáticas (DRUMMOND et al., 2000). As células foliculares hipertróficas têm citoplasma claro e núcleo grande, com nucléolo evidente, e superfície apical irregular com várias projeções citoplasmáticas. Os relatos existentes sobre a hipertrofia das células foliculares dos folículos vazios mostram que o processo obedece a um padrão comum aos diferentes taxa dos teleósteos, seja nos Cyprinodontiformes (BAILEY, 1933; presente trabalho) ou nos Characiformes (DRUMMOND et al., 2000).

Numa analogia ao processo de atresia folicular (MIRANDA et al., 1999), a reação PAS+ do citoplasma das células foliculares em *X. maculatus*, além da presença de material elétron-denso em microscopia eletrônica de transmissão, constitui um forte indicativo do envolvimento dessas células nos processos degenerativos que caracterizam a involução dos folículos vazios. Porém, diferentemente da atresia folicular em que se relata um papel fagocítico para as células foliculares, nos folículos vazios elas podem apresentar atividade esteroidogênica. Utilizando técnicas ultra-estruturais, histoquímicas e enzimáticas, VAN DEN HURK & PEUTE (1979; 1985) concluíram que após a indução de ovulação em *Clarias gariepinus* com injeções de HCG, os folículos pós-ovulatórios jovens (entre 16-28 horas após a injeção) são capazes de produzir esteróides e que a atividade fagocítica das células dos folículos pós-ovulatórios aumenta progressivamente após 32 horas da injeção. Apesar da atividade de síntese não ter sido confirmada, em *Perca fluviatilis*, as células foliculares dos folículos pós-ovulatórios apresentam características ultra-estruturais de células produtoras de esteróides (LANG, 1981b). A presença de gotas lipídicas (GURAYA, 1968; VAN NASSAUW & CALLEBAUT, 1991) e lipoproteínas difusas (GURAYA, 1968) no citoplasma constituem outros indicadores do seu envolvimento na

esteroidogênese. Porém, essas características não são uma constante nos folículos pós-ovulatórios dos teleósteos (DRUMMOND, 1996).

Eosinófilos têm sido detectados no lume dos folículos vazios desde os estádios iniciais de degeneração (FITZHUGH & HETTLER, 1995). Porém, em *X. maculatus* (presente trabalho), nas fases iniciais de involução dos folículos vazios, eosinófilos são observados no tecido conjuntivo que circunda esses folículos, e atingem o lume dos folículos somente nas fases avançadas de involução.

Durante o processo de regressão dos folículos vazios, os vasos da teca aumentam de calibre e tornam-se mais numerosos (DRUMMOND, 1996; presente trabalho). Em *X. maculatus*, os vasos sanguíneos tornam-se numerosos durante a gestação garantindo o transporte de nutrientes necessários para o desenvolvimento do embrião. Após o parto, contribuem para o processo de involução dos folículos vazios por permitirem o aporte de células envolvidas na reabsorção.

Já no final da fase degenerativa, o lume dos folículos é ocupado principalmente por células foliculares com núcleo picnótico (GOLDBERG et al., 1984; VIZZIANO & BEROIS 1990).

A involução dos folículos pós-ovulatórios pode ainda estar associada com a reabsorção de fragmentos celulares pelas próprias células foliculares, com a fagocitose por células granulares, e apoptose (DRUMMOND, 1996).

Paralelos com *X. maculatus* (presente trabalho) que abordem os possíveis efeitos do hormônio de crescimento na recuperação ovariana, seja de peixes ovíparos ou vivíparos, ficam inviabilizados pela ausência de dados sobre o assunto.

7.7. Análise quantitativa da recuperação ovariana pós-parto

A análise quantitativa da recuperação ovariana de *X. maculatus* foi conduzida tomando-se por base os índices IGS, IHS, K_1 e K_2 .

O IGS é um indicador do estado biológico do peixe (VAZZOLER, 1982), que tem sido amplamente utilizado para determinar os estádios do ciclo reprodutivo em espécies ovíparas (LE CREN, 1951). É considerado o melhor indicador da época da reprodução, pelo fato da maturação das células germinativas ser concomitante com o aumento de peso da gônada. Isso porque os ovócitos durante a prófase da primeira divisão meiótica começam a crescer e continuam a acumular metabólitos até a ovulação (NAGAHAMA, 1983), aumentando desse modo o peso da gônada.

Já o IHS reflete o possível papel de substâncias hepáticas na maturação gonadal, principalmente no período de formação dos glóbulos de vitelo, o que é sugerido pela redução brusca nos valores do IHS de fêmeas em maturação avançada (BAZZOLI & GODINHO, 1991), e que comprova a transferência de substâncias hepáticas para o ovário (SELMAN & WALLACE, 1989; TYLER & SUMPTER, 1996).

Comparando-se os valores dos índices estudados entre os grupos controle e tratado, os maiores valores foram encontrados no grupo-controle, principalmente para os fatores de condição, o que poderia sugerir que o hormônio de crescimento estaria contribuindo para uma pior condição dos animais tratados. Já a não detecção de diferenças significativas para os valores de IGS nos diferentes períodos analisados, pode ser atribuída à continuidade da vitelogênese, mesmo durante a gestação. Assim, não ocorrem grandes variações no peso da gônada entre o período imediatamente após o parto e os demais períodos considerados. Observações semelhantes foram feitas por KOYA et al. (1998) em *G. affinis*. Estes resultados indicam que o IGS não é um bom indicador da maturação gonadal para peixes vivíparos.

O fator de condição (LE CREN, 1951) é um parâmetro quantitativo do estado de bem-estar do peixe, e suas variações podem ser interpretadas como medidas de vários eventos biológicos, tais como reserva de gordura, adequação ao meio ambiente e desenvolvimento gonadal. Diferenças estatisticamente significativas para os valores de K_1 e K_2 foram observadas às 36, 60 e 72 horas pós-parto, apesar de diferenças significativas ainda serem encontradas para os

valores de K_1 com 84 e 96 horas pós-parto. Diferenças estatísticas também foram detectadas quando comparados o peso corporal dos animais do grupo-controle e do grupo tratado no momento do sacrifício, com maiores valores sendo observados no grupo-controle. Quando comparados os grupos controle e tratado nos diferentes períodos de coleta, diferenças foram observadas as 60 e 72 horas. O estresse induzido pelo manuseio, pela anestesia e pela administração hormonal, poderia responder pela pior condição desses animais no momento do sacrifício, se comparados aos animais do grupo-controle.

7.8. Relação peso corporal x comprimento-padrão

A relação peso corporal X comprimento-padrão mede a variação do peso esperado em função do comprimento e vice-versa e indica a condição do peixe através do acúmulo de gordura, bem-estar geral e desenvolvimento gonadal. O local de origem, sexo e etapa de vida são fatores que interferem no valor de b (parâmetro de correlação na relação peso corporal x comprimento-padrão) (SANTOS, 1978), que pode variar de 2,5 a 4,0 (ROSSI-WONGTSCHOWSKI, 1977).

A diferença observada no valor de b entre as duas populações analisadas (fêmeas adquiridas já adultas e aquelas que nasceram nos aquários), pode ser devido a diferenças na manutenção dos animais, pois as fêmeas jovens nasceram e foram mantidas em aquários com condições controladas, sendo alimentadas duas vezes ao dia, à vontade, com ração contendo 42-47% de proteína, enquanto as fêmeas adultas adquiridas no mercado são provenientes de piscicultura onde são mantidas em tanques de terra recebendo alimentação conforme técnica de manejo da propriedade.

Segundo LE CREN (1951), se o valor do parâmetro b na regressão linear dessa relação for próximo de 3,0, a espécie tem crescimento isométrico. Para *X. maculatus*, a relação peso corporal X comprimento-padrão em ambas situações consideradas no estudo, apesar de apresentarem valores diferentes, estão

próximos de 3,0. Isso indica crescimento isométrico para essa espécie e conseqüente utilização da formula simplificada de Fulton para o cálculo do fator de condição, como adotado por GODINHO (1994).

7.9. Primeira maturação sexual

Entende-se por início da primeira maturação sexual, o momento em que 50% dos indivíduos que constituem uma população entram ativamente na fase de maturação gonadal, apresentando ovócitos em crescimento secundário. Segundo VAZZOLER (1982), pode-se expressar o início da primeira maturação sexual através do comprimento total médio ou idade média dos indivíduos da população que atingem esta etapa. De um modo geral, pode-se utilizar tanto o comprimento total quanto o comprimento-padrão para esse cálculo (GODINHO, 1994; SOARES et al.,1996). Este dado é parâmetro essencial na compreensão da biologia reprodutiva de peixes e importante para populações sujeitas à exploração, fornecendo subsídios para a análise de como a atividade exploratória poderia atuar sobre os reprodutores.

Em *X. maculatus*, peixes a partir de 100 dias de idade apresentaram gônadas com ovócitos em vitelogênese inicial ou avançada, em fase ativa de maturação gonadal, sendo, portanto, estes animais classificados como adultos. Nesse grupo de animais, o menor animal coletado e considerado maduro apresentava 1,8 cm de comprimento-padrão, 105 dias de idade e 334 mg de peso corporal. Apesar de RIZZO et al. (1996) considerarem que o tamanho do menor exemplar em maturação pode ser utilizado, na natureza, como parâmetro para primeira maturação sexual, o exemplar mais jovem de *X. maculatus* (presente estudo) considerado maduro (70 dias de idade) apresentou 1,9 cm de comprimento-padrão e o menor valor para peso corporal (210 mg). Portanto, o tamanho corporal poderia representar um parâmetro mais confiável para determinar a maturação sexual do que a idade do animal. Trabalhando com esta mesma espécie, na região sudeste da Austrália, MILTON & ARTHINGTON (1983)

encontraram numa população de 60 exemplares, tamanho de 1,86 cm para primeira maturação sexual, extensivo a fêmeas gestantes.

Diferenças na idade, comprimento-padrão e peso corporal entre o menor animal e o animal mais jovem em primeira maturação podem ser creditadas a variações intraespecíficas determinadas por taxas de crescimento diferenciadas (NIKOLSKY, 1963), já que os animais foram mantidos no mesmo ambiente, com condições controladas de temperatura da água ($25\pm 1^{\circ}\text{C}$), pH(7,2-7,3) e iluminação artificial diária (10 horas/dia). Tem-se a considerar ainda que animais maiores tendem a exercer domínio territorial na população, impedindo que os animais menores tenham acesso à alimentação. Experimentos conduzidos com machos de Poeciliidae (*Poecilia reticulata*) geneticamente similares mostraram que a disponibilidade de alimento influencia a idade e o tamanho em que a maturidade é atingida (REZNICK, 1991 - apud SIDDIQUI et al., 1997). Porém, MCKENZIE et al. (1983), avaliando idade, peso e fatores genéticos da maturação sexual em dois genótipos de machos de platy, mostraram que para os mesmos valores de peso corporal, o genótipo P¹P⁴ inicia a maturação mais tardiamente que o genótipo P¹P³. Em ambos os genótipos, para espécimes com a mesma idade, a maturação tem início nos maiores tamanhos (MCKENZIE et al., 1983), o mesmo ocorrendo com as fêmeas de *X. maculatus* (presente estudo).

8. CONCLUSÕES

1. Os ovários do platy possuem estruturas capazes de armazenar espermatozóides.
2. A ovogênese de *X. maculatus*, espécie ovovivípara, parece ser similar à maioria dos teleósteos ovíparos de água doce.
3. No estudo da idade e tamanho de primeira maturação sexual, observou-se que 50% (L_{50}) foi considerada madura com 2,03cm de comprimento-padrão, e a estimativa de tamanho para que toda a população seja considerada madura (L_{100}) foi de 2,5cm. Fêmeas gestantes com este tamanho corroboram os valores de L_{100} .
4. Não se detectou imuno-marcação para hormônio de crescimento humano nos ovários de platy, seja no grupo-controle, seja no grupo tratado. A ausência de imuno-marcação pode ser atribuída à baixa concentração do hormônio no órgão, à meia-vida curta, ou à dosagem utilizada no tratamento que pode ter sido insuficiente.
5. Mesmo durante a gestação, ovócitos jovens iniciavam o processo de amadurecimento. Porém, eles não são fertilizados, entrando em atresia, enquanto a fêmea não se recupera da gestação anterior.
6. Em fêmeas tratadas com hormônio de crescimento, a atresia continua a ocorrer mesmo nos animais observados 72, 84 e 96 horas pós-parto, indicando que os ovos que iniciaram a maturação após o parto também entraram em atresia. Esse evento pode ter sido decorrente do tratamento hormonal. Como o estresse é fator de extrema importância na determinação da ocorrência de atresia folicular em peixes, talvez a manipulação dos animais para anestesia e administração do hormônio pode ter induzido o processo de atresia folicular.
7. Eosinófilos em maior número foram observados nas fêmeas tratadas com hormônio de crescimento, independente do período de coleta. Esse fato pode estar associado à maior ocorrência de atresia folicular. Talvez essas células estejam envolvidas na remodelação tecidual ovariana.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABDALLA, F. C.; CRUZ-LANDIM, C. Some histological and ultrastructural aspects of oogenesis in *Piaractus mesopotamicus* HOLMBERG, 1887 (Teleostei). **Braz. J. morphol. Sci.**, 20: 3-10, 2003.
- ABRAHAM, M.; HILGE, V.; LISON, S.; TIBIKA, H. The cellular envelope of oocytes in teleosts. **Cell Tissue Res.**, 235: 403-410, 1984.
- ANDERSON, E. The formation of the primary envelope during oocyte differentiation in teleosts. **J. Cell Biol.**, 35: 193-212, 1967.
- AXELROD, H. R. **Tropical fish as a hobby**. New York: Mc Graw-Hill Book Company, 1952. 264p.
- AZEVEDO, C. J. C. **Estudo ultra-estrutural do ovário de *Xiphophorus helleri* durante a ovogênese**. Univ. Porto, Portugal, 1976. 293 p. (Tese: Doutorado).
- AZEVEDO, C.; COIMBRA, A. Evolution of nucleoli in the course of oogenesis in a viviparous teleost (*Xiphophorus helleri*). **Biol. Cellulaire**, 38: 43-48, 1980.
- BAILEY, R. J. The ovarian cycle in the viviparous teleost *Xiphophorus helleri*. **Biol. Bull.**, 64: 206-225, 1933.
- BALDISSEROTO, B. **Fisiologia de peixes aplicada á piscicultura**. Santa Maria: Ed. UFSM. cap. 7, p. 139-178, 2002.
- BAZZOLI, N. **Ovogênese em peixes teleósteos neotropicais de água doce**. Belo Horizonte: Instituto de Ciências Biológicas, UFMG, 1992. 182p. (Tese: Doutorado).
- BAZZOLI, N.; GODINHO, H. P. Reproductive biology of the *Acestrorhynchus lacustris* (Reinhardt, 1874) (Pisces: Characidae) from Tres Marias reservoir, Brazil. **Zool. Anz.**, 226: 285-297, 1991.
- BAZZOLI, N.; GODINHO, H. P. Cortical alveoli in oocytes of freshwater neotropical teleost fish. **Boll. Zool.**, 61: 301-308, 1994.
- BAZZOLI, N.; RIZZO, E. A comparative cytological and cytochemical study of the oogenesis in ten Brazilian teleost fish species. **Eur. Arch. Biol.**, 101: 399-410, 1990.
- BAZZOLI, N.; RIZZO, E. Poros da zona pelúcida de *Serrasalmus brandtii* Reinhardt, 1874 (Pisces, Characiformes): estudo ultra-estrutural. IN: SIMP. TÉC. ESP. ULTRA-ESTRUTURA DE MEMBRANAS, 1, 1992, Nova Friburgo. **Resumos...** Nova Friburgo: 1992. p.65.

- BAZZOLI, N.; RIZZO, E. Reabsorção de folículos atrésicos em *Astyanax bimaculatus lacustris* (Pisces, Teleostei) mantidos em confinamento. *BIOS, Cadernos de Ciências Biológicas da PUC-MG*, 2: 37-41, 1995.
- BAZZOLI, N.; RIZZO, E.; SANTOS, J. E.; SATO, Y. Dinâmica da ovogênese em peixes forrageiros da represa de Três Marias, Minas Gerais: estudo histológico e histoquímico. *BIOS, Cadernos de Ciências Biológicas da PUC-MG*, 4: 5-10, 1996.
- BEGOVAC, P. C.; WALLACE, R. A. Stages of oocyte development in the pipefish, *Syngnathus scovelli*. *J. Morphol.*, 197: 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.*, 51: 56-73, 1989.
- BENJAMIN, L. A. **Biologia reprodutiva e estudo ultra-estrutural da parede de folículos ovarianos de *Schizodon nasutus* (Pisces: Anostomidae) nos reservatórios de Furnas e Estreito, rio Grande, MG.** UFMG, Belo Horizonte, 1996. 131 p. (Dissertação: Mestrado).
- BERN, H. A. Functional evolution of prolactin and growth hormone in lower vertebrates. *Am. Zool.*, 23: 663-671, 1983.
- BESSEAU, L.; FALIEUX, E. Resorption of unemitted gametes in *Lithognathus mormyrus* (Sparidae, Teleostei): a possible synergic action of somatic and immune cells. *Cell Tissue res.*, 276: 123-132, 1994.
- BJORNSSON, B. T.; TARANGER, G. L.; HANSEN, T.; STEFANSSON, S. O.; HAUX, C. The interrelation between photoperiod, growth hormone, and sexual maturation of adult atlantic salmon (*Salmo salar*). *Gen. Com. Endocrinol.*, 93: 70-81, 1994.
- BOND, C. E. Reproduction. In: BOND, C. E. **Biology of fishes**, Orlando: Saunders College Publishing. cap.26, p.451-480, 1996.
- BOWDEN, B. S. **The relationship of light and temperature to reproduction in the guppy, *Poecilia reticulata* Peters.** Univ. of Conn., 1970, 107p. (Thesis, Ph.D.) IN: THIBAUT, R. E.; SCHULTZ, R. J. Reproductive adaptations among viviparous fishes (Cyprinodontiformes: Poeciliidae). *Evolution*, 32: 320-333, 1978.
- BREUCKMANN, A.; BRUCKER, C. Sperm acrossoma antigen-1. Specific tissue distribution of immunoreactivity in a teleost fish, the swordtail (*Xiphophorus helleri*). *Cell Tissue Res.*, 308: 267-275, 2002.

- BURNS, J. R. The effect of low-latitude photoperiods on the reproduction of female and male *Poeciliopsis gracilis* and *Poecilia sphenops*. *Copeia*, 4: 961-965, 1985.
- BURNS, J. R.; KALLMAN, K. D. An ovarian regression syndrome in the platfish, *Xiphophorus maculatus*. *J. Exp. Zool.*, 233: 301-316, 1985.
- BURNS, J. R.; WEITZMAN, S. H.; GRIER, H. J.; MENEZES, N. A. Internal fertilization, testis and sperm morphology in glandulocaudinae fishes (Teleostei: Characidae: Glandulocaudinae). *J. Morphol.*, 224: 131-145, 1995.
- BURNS J. R.; WEITZMAN, S. H.; MALABARBA, L. R. Insemination in eight species of cherodontine fishes (Teleostei: Characidae: Chorodontinae). *Copeia*, 2: 433-438, 1997.
- CALDUCH-GINER, J. A.; SITJA-BOBADILLA, A.; ALVAREZ-PELLITERO, P.; PEREZ-SANCHEZ, J. Growth hormone as an *in vitro* phagocyte-activating factor in the gilthead sea bream (*Sparus aurata*). *Cell. Tiss. Res.*, 287: 535-540, 1997
- CALDUCH-GINER, J. A.; DUVAL, H.; CHESNEL, F.; BOUEF, G.; PEREZ-SANCHEZ, J.; BOUJARD, D. Fish growth hormone receptor: molecular characterization of two membrane-anchored forms. *Endocrinol.*, 142: 3269-3273, 2000.
- CHINI, H. A. S.; GARCIA, J. A. D.; MAISTRO, E. L.; QUAGIO-GRASSIOTTO, I. Dynamics and cytochemistry of oogenesis in *Leporinus striatus* Kner (Teleostei, Characiformes, Anostomidae) from the Rio Sapucaí, Minas Gerais, Brazil. *Revta. bras. Zool.*, 18: 1065-1072, 2001.
- COLSON, C. M. **Effects of day length and temperature on the reproduction of *Heterandria formosa***. Univ. of Florida, 1969, 93p. (Thesis, Ph.D.) IN: THIBAUT, R. E.; SCHULTZ, R. J. Reproductive adaptations among viviparous fishes (Cyprinodontiformes: Poeciliidae). *Evolution*, 32: 320-333, 1978.
- CONNAUGHTON, M. A.; AIDA, K. Female reproductive system, fish. IN: KROBIL, E.; NEILL, J. D. **Encyclopedia of reproduction**. San Diego: Academic Press. p. 193-205. 1998.
- CONSTANTZ, G. D. Reproductive biology of poeciliid fishes. IN: MEFFE, G. K.; SNELSON Jr., F. F. **Ecology and evolution of livebearing fishes**. Englewood Cliffs, NJ: Prentice Hall, p.33-50, 1989.
- COPELAND, K. C.; NAIR, K. S. Acute growth hormone effects on amino acid and lipid metabolism. *Endocrinol. Metabol.*, 78: 1040-1047, 1994.

- CORIN, R. E.; GULLER, S.; WU, K. Y.; ONENBERG, M. Growth hormone and adipose differentiation: growth hormone-induced antimitogenic state in 3T3-F442A preadipose cells. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, 87: 7507-7511, 1990.
- CRUZ-LANDIM, C., CRUZ-HÖFLING, M. A. Electron microscopic studies on the development of the chorion oh *Astyanax bimaculatus* (Teleostei, Characidae). **Zool. Jb. Anat.**, 119: 241-249, 1989.
- DONALDSON, E. M.; FAGERLUND, U. H. M.; HIGGS, D. A.; McBRIDE, J. R. Hormonal enhancement of growth. In: HOAR, W. S., RANDALL, D. J.; BRETT, J. R. **Fish physiology**. New York: Academic Press. 8: 455-597, 1983.
- DROLLER, M. J.; ROTH, T. F. An electron microscope study of yolk formation during oogenesis in *Lebistes reticulatus* guppyi. **J. Cell Biol.**, 28: 209-232, 1966.
- DRUMMOND, C. D. Folículo pós-ovulatório de lambari *Astyanax bimaculatus lacustris* (Pisces, Characidae) submetido a desova induzida: estudo histológico e ultra-estrutural. UFMG, Belo Horizonte, 1996, 123p. (Dissertação, Mestrado).
- DRUMMOND, C. D.; BAZZOLI, N.; RIZZO, E.; SATO, Y. Postovulatory follicle: a model for experimental studies of programmed cell death or apoptosis in teleosts. **J. Exp. Zool.** 287: 176-182, 2000.
- DUAN, C.; HIRANO, T. Plasma kinetics of growth hormone in the japanese eel, *Anguilla japonica*. **Aquaculture**, 95: 179-188, 1991.
- EHARDT, H.; GÖTTING, K. J. Licht- und elektronen-mikroskopische Untersuchungen an Eizellen und Eihülen von *Platyopocilus maculates*. **Cytobiologie**, 2: 429-440, 1970. IN: RIEHL, R.; GREVEN, H. Fine structure of egg envelopes in some viviparous goodeid fishes, with comments on the relation of envelope thiness to viviparity. **Can. J. Zool.**, 71: 91-97, 1993.
- ELORDUY-GARAY, J. F.; RAMÍREZ-LUNA, S. Gonadal development and spawning of female ocean whitefish, *Caulolatilus princeps* (Pisces: Branchiostegidae) in the Bay of La Paz, B. C. S., Mexico. **J. Fish Biol.**, 44: 553-566, 1994.
- FARMER, S. W.; HAYASHIDA, T.; PAPKOFF, H.; POLENOV, A. L. Characteristics of growth hormone isolated from sturgeon (*Acipenser guldenstadtii*) pituitaries. **Endocrinol.**, 108: 377-381, 1981. IN: VISSIO, P; PAZ, D.A.; MAGGESE, C. The adenohipophysis of the swamp eel, *Synbranchus marmoratus*, an immunocytochemical analysis. **Biocell**, 20: 155-161, 1996.

- FINE, M.; SAKAL, E.; VASHDI, D.; DANIEL, V.; LEVANON, A.; LIPSHITZ, O.; GERTLER, A. Recombinant carp (*Cyprinus carpio*) growth hormone: expression, purification, and determination of biological activity *in vitro* and *in vivo*. **Gen. Comp. Endocrinol.**, 89: 51-61, 1993.
- FITZHUGH, G. R.; HETTLER, W. F. Temperature influence on postovulatory follicle degeneration in Atlantic menhaden, *Brevoortia tyrannus*. **Fish. Bull.**, 93: 568-572, 1995.
- FLORES, J. A.; BURNS, J. R. Ultrastructural study of embryonic and early adult germ cells, and their support cells, in both sexes of *Xiphophorus* (Teleostei: Poeciliidae). **Cell Tissue Res.**, 271: 263-270, 1993.
- FORMACION, M. J., HORI, R., LAM, T. J. Overripening of ovulated eggs in goldfish. I. Morphological changes. **Aquaculture**, 114: 155-168, 1993.
- FRANCOLINI, M.; LORA LAMIA, C.; BONSIGNORIO, C.; COTELLI, F. Oocyte development and egg envelope formation in *Oreochromis niloticus*, a mouth-brooding cichlid fish. **J. Submicrosc. Cytol. Pathol.**, 35: 49-60, 2003.
- GARCIA, J. A. D.; CHINI, H. A. S.; MAISTRO, E. L.; QUAGIO-GRASSIOTTO, I. Dynamics and cytochemistry of oogenesis in the *Astyanax fasciatus* (Cuvier)(Teleostei, Characiformes, Characidae) from Rio Sapucaí, Minas Gerais, Brazil. **Revta. bras. Zool.**, 18: 1057-1064, 2001.
- GIL, J. A.; SUMPTER, J. P.; DONALDSON, E. M.; DYE, H. M.; SOUZA, L.; BERG, T.; WYPYCH, J.; LANGLEY, K. Recombinant chicken and bovine growth hormones accelerate growth in aquacultured juvenile Pacific salmon (*Oncorhynchus kisutch*). **Biotechnol.**, 3: 643-646, 1985.
- GODINHO, A. L. Biologia reprodutiva da piaba-facão, *Triporthus guentheri* (Characiformes, Characidae) e o manejo hidrológico da represa de Três Marias. **Rev. Bras. Biol.**, 54: 515-524, 1994.
- GOLDBERG, S. R.; ALARCON, V. H.; ALHEIT, J. Postovulatory follicle histology of the Pacific sardine, *Sardinops sagax*, from Peru. **Fish. Bull.**, 82:443-445, 1984.
- GOMEZ, J. M.; LOIR, M.; LE GAC, F. Growth hormone receptors in testis and liver during the spermatogenetic cycle in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Biol. Reprod.**, 58: 483-491, 1998.
- GOMEZ, J. M.; MOUROT, B.; FOSTIER, L.; Growth hormone receptors in ovary and liver during gametogenesis in female rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **J. Reprod. Fertil.**, 11: 275-285, 1999a.

- GOMEZ, J. M.; WEIL, C.; OLLITRAUT, M.; LE BAIL, P. Y.; BRETON, B.; LE GAC, F. Growth hormone (GH) and gonadotropin subunit gene expression and pituitary and plasma changes during spermatogenesis and oogenesis in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Gen. Comp. Endocrinol.**, 113: 413-428, 1999b.
- GRIER, H. J. Ovarian germinal epithelium and folliculogenesis in the common snook, *Centropomus undecimalis* (Teleostei:Centropomidae). **J. Morphol.**, 243: 265-281, 2000.
- GRIER, H. J. The germinal epithelium: its dual role in establishing male reproductive classes and understanding the basis for indeterminate egg production in female fishes. **Proceedings of the 53 Annual Gulf and Caribbean Fisheries Institute**, 2002.
- GROOT, E. P.; ALDERDICE, D. F. Fine structure of the external egg membrane of five species of Pacific salmon and steelhead trout. **Can. J. Zool.**, 65: 552-566, 1985.
- GROOVE, B. D.; WOURMS, J. P. Follicular placenta of the viviparous fish, *Heterandria Formosa*. II. Ultrastructure and development of the follicular epithelium. **J. Morphol.**, 220: 167-184, 1994.
- GUIMARÃES, A. C. D.; QUAGIO-GRASSIOTTO, I. Ultrastructural aspects of oogenesis and oocyte primary growth in *Serrasalmus spilopleura* (Teleostei, Characiformes, Characidae). **Tissue Cell.**, 33: 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.**, 34: 199-206, 2002.
- GURAYA, S. S. Histochemical study of granulosa (follicular) cells in the preovulatory and postovulatory follicles of amphibian ovary. **Gen. Comp. Endocrinol.**, 10: 138-46, 1968.
- GURAYA, S. S. **The cell and molecular biology of fish oogenesis**. Basel: Ed. Sauer, H. W. Karger, 1986. 223p.
- HAMAZAKI, S. T., NAGAHAMA, Y., IUCHI, I., YAMAGAMI, K. A glycoprotein from the liver constitutes the inner layer of the egg envelope (zona pellucida interna) of the fish, *Oryzias latipes*. **Dev. Biol.**, 133: 101-110, 1989.

- HAYASHIDA, T. Immunological studies with rat pituitary growth hormone (RGH). II. Comparative immunochemical investigation of GH from representatives of various vertebrate classes with monkey antiserum to rGH. **Gen. Comp. Endocrinol.**, 15: 432-452, 1970. IN: VISSIO, P; PAZ, D.A.; MAGGESE, C. The adenohypophysis of the swamp eel, *Synbranchus marmoratus*, an immunocytochemical analysis. **Biocell**, 20: 155-161, 1996.
- HAYASHIDA, T.; LAGIOS, M. Fish growth hormone: a biological, immunochemical and ultrastructural study of sturgeon and paddle fish pituitaries. **Gen. Comp. Endocrinol.**, 13: 403-411, 1969. IN: VISSIO, P; PAZ, D.A.; MAGGESE, C. The adenohypophysis of the swamp eel, *Synbranchus marmoratus*, an immunocytochemical analysis. **Biocell**, 20: 155-161, 1996.
- HERTZ, Y.; TCHELET, A.; MADAR, Z.; GUTTER, A. Absorption of bioactive human growth hormone after oral administration in the common carp (*Cyprinus carpio*) and its enhancement by deoxycholate. **J. Comp. Physiol. B**, 161: 159-163, 1991.
- HIGGS, D. A.; DONALDSON, E. M.; DYE, H. M.; McBRIDE, J. R. A preliminary investigation of the effect of bovine growth hormone on growth and muscle composition of coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*). **Gen. Comp. Endocrinol.**, 27: 240-253, 1975.
- HIGGS, D. A.; DONALDSON, E. M.; DYE, H. M.; McBRIDE, J. R. Influence of bovine growth hormone and L-thyroxine on growth, muscle composition, and histological structure of the gonads, thyroid, pancreas, and pituitary of coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*). **J. Fish. Res. Board Can.**, 33: 1585-1603, 1976.
- HOAR, W. S. Reproduction. IN: HOAR, W. S., RANDALL, D. J. **Fish physiology, Reproduction and growth bioluminescence, pigments and poisons**. New York: Academic Press. v.3, p.1-72, 1969.
- HUGHES, J. P.; FRIESEN, H. G. The nature and regulation of the receptors for pituitary growth hormone. **Ann. Rev. Physiol.**, 47: 469-482, 1985.
- HULL, K. L.; HARVEY, S. Growth hormone: roles in female reproduction. **J. Endocrinol.**, 168: 1-23, 2001.
- HYLLNER, S. J., HAUX, C. Immunochemical detection of the major vitelline envelope proteins in the plasma and oocytes of the maturing female rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. **J. Endocrinol.**, 135: 303-309, 1992.
- ISAKSSON, O. G. P.; EDEN, S.; JANSSON, J. O. Mode of action of pituitary growth hormone on target cells. **Ann. Rev. Physiol.**, 47: 483-499, 1985.

- IWAMATSU, T. Medaka oocytes rotate within the ovarian follicles during oogenesis. **Dev. Growth Diff.**, 36: 177-186, 1994.
- JAMIESON, B. G. M. Atherinomorpha. In: _____ **Fish Evolution and Systematics: Evidence from Spermatozoa**. Cambridge University Press, Cambridge. cap. 17, p. 195-214, 1991.
- JEH, H. S.; KIM, C. H.; LEE, H. K.; HAN, K. Recombinant flounder growth hormone from *Escherichia coli*: overexpression, efficient recovery, and growth-promoting effect on juvenile flounder by oral administration. **J. Biotechnol.**, 60: 183-194, 1998.
- JIA, X. C.; KALMIJN, J.; HSUEH, A. J. Growth hormone enhances follicle-stimulating hormone-induced differentiation of cultured rat granulosa cells. **Endocrinol.**, 118: 1401-1409, 1986.
- KAJIMURA, S.; KAWAGUCHI, N.; KANEKO, T.; KAWAZOE, I.; HIRANO, T.; VISITACION, N.; GRAU, E. G.; AIDA, K. (2004). Identification of the growth hormone receptor in an advanced teleost, the tilapia (*Oreochromis mossambicus*) with special reference to its distinct expression pattern in the ovary. *Journal of Endocrinology*, **181**, 65-76.
- KOBAYASHI, W. Communications of oocyte-granulosa cells in the chum salmon ovary detected by transmission electron microscopy. **Develop. Growth. & Differ.**, 25: 553-561, 1985.
- KOBAYASHI, H; IWAMATSU, T. Fine structure of the storage micropocket of spermatozoa in the ovary of the guppy *Poecilia reticulata*. **Zoolog. Sci.**, 19: 545-555, 2002.
- KOYA, Y.; FUJITA, A.; NIKI, F.; ISHIHARA, E.; MIYAMA, H. Sex differentiation and pubertad development of gonads in the viviparous mosquitofish, *Gambusia affinis*. **Zool. Sci.**, 20: 1231-1242, 2003.
- KOYA, Y.; ITAZU, T.; INOUE, M. Annual reproductive cycle based on histological changes in the ovary of the female mosquitofish, *Gambusia affinis*, in central Japan. **Ichthyol. Res.**, 45: 241-248, 1998.
- KOYA, Y.; KAMIYA, E. Environmental regulation of annual reproductive cycle in the mosquitofish, *Gambusia affinis*. **J. Exp. Zool.**, 286: 204-211, 2000.
- KOYA, Y.; MUNEHARA, H.; TAKANO, K. Sperm storage and degeneration in the ovary of a marine copulating sculpin, *Alcichthys alcicornis* (Teleostei: Scorpaeniformes): role of intercellular junctions between inner ovarian epithelial cells. **J. Morphol.**, 233: 153-163, 1997.

- LAMBERT, J. G. The ovary of the guppy *Poecilia reticulata*, the atretic follicle, a corpus atreticum or a corpus luteum preovulations. **Z. Zellforsch.**, 107: 54-67, 1970.
- LANG, I. Electron microscopic and histochemical investigations of the atretic oocyte of *Perca fluviatilis* L. (Teleostei). **Cell Tissue Res.**, 220: 201-212, 1981a.
- LANG, I. Electron microscopic and histochemical study of the postovulatory follicles of *Perca fluviatilis* L. (Teleostei). **Gen. Comp. Endocrinol.**, 45: 219-233, 1981b.
- LESSMAN, C.A. Oogenesis, in nonmammalian vertebrates. IN: KROBIL, E.; NEILL, J. D. **Encyclopedia of reproduction**. San Diego: Academic Press. p. 498-508. 1998.
- LE CREN, E. D. The length-weight relationship and seasonal cycle in gonad weight and condition in the perch (*Perca fluviatilis*). **J. Anim. Ecol.**, 20: 201-219, 1951.
- LE GAC, F.; BLAISE, O.; FOSTIER, A.; LE BAIL, P. Y.; LOIR, M.; MOURROT, B.; WEIL, C. Growth hormone (GH) and reproduction: a review. **Fish Physiol. Biochem.**, 11: 219-232, 1993.
- LEE, L. T. O.; NONG, G.; CHAN, Y. H.; TSE, D. L. Y.; CHENG, C. H. K. Molecular cloning of a teleost growth hormone receptor and its functional interaction with human growth hormone. **Gene**, 270: 121-129, 2001.
- LOBIE, P. E.; BREIPOHL, W.; ARAGON, J. G.; WATERS, M. J. Cellular localization of the growth hormone receptor/binding protein in the male and female reproductive systems. **Endocrinol.**, 126: 2214-2221, 1990.
- MaC LATCHY, D.; EALES, J. G. Growth hormone stimulates hepatic thyroxine 5'-monodeiodinase activity and 3,5,3'-triiodothyronine levels in rainbow trout (*Salmo gairdneri*). **Gen. Comp. Endocrinol.**, 78: 164-172, 1990.
- MARTÍNEZ-BARBERÁ, J. P.; PENDÓN, C.; RODRÍGUEZ, R. B.; PÉREZ-SÁNCHEZ, J.; VALDIVIA, M. M. Cloning, expression, and characterization of a recombinant gilthead seabream growth hormone. **Gen. Comp. Endocrinol.**, 96: 179-188, 1994.
- MATSUYAMA, M., NAGAHAMA, Y., MATSUURA, S. Observations on ovarian follicle ultrastructure in the marine teleost, *Pagrus major*, during vitellogenesis and oocyte maturation. **Aquaculture**, 92: 67-82, 1991.
- MATTEI, X. Spermiogenèse comparée des poissons. In: BACCETTI, B. **Comparative spermatology**. Academic Press, New York. p. 57-70, 1970.

- MAYER, I.; SHACKLEY, S. E.; WITTHAM, P. R. Aspects of the reproductive biology of the bass, *Dicentrarchus labrax* L. II. Fecundity and pattern of oocyte development. **J. Fish Biol.**, 36: 141-148, 1990.
- MCKENZIE JR., W. D.; CREWS, D.; KALLMAN, K. D.; POLICANSKY, D.; SOHN, J. Age, weight and the genetics of sexual maturation in the platyfish, *Xiphophorus maculatus*. **Copeia**, 3: 770-774, 1983.
- McLEAN, E.; DEVLIN, R. H.; BYATT, J. C.; CLARKE, W. C.; DONALDSON, E. M. Impact of a controlled release formulation of recombinant bovine growth hormone upon growth and seawater adaptation in coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*) and chinook (*Oncorhynchus tshawytscha*) salmon. **Aquacult.**, 156: 113-128, 1997.
- McLEAN, E.; DONALDSON, E. M.; MAYER, I.; TESKEREDZIC, Z.; PITT, C.; SOUZA, L. M. Evaluation of a sustained-release polymer-encapsulated form of recombinant porcine somatotropin upon long-term growth performance of coho salmon, *Oncorhynchus kisutch*. **Aquacult.**, 122: 359-368, 1994.
- MICALE, V.; PERDICHIZZI, F.; SANTANGELO, G. The gonadal cycle of captive white bream, *Diplodus sargus* (L.). **J. Fish Biol.**, 31: 435-440, 1987.
- MILTON, D. A.; ARTHINGTON, A. H. Reproductive biology of *Gambusia affinis holbrooki* Baird and Girardi, *Xiphophorus helleri* (Günther) and *X. maculatus* (Heckel) (Pisces; Poeciliidae) in Queensland, Australia. **J. Fish Biol.**, 23: 23-41, 1983.
- MIRANDA, A. C. L. **Reprodução de *Astyanax bimaculatus lacustris* em viveiros e estudo histológico e ultra-estrutural da atresia folicular de *A. bimaculatus lacustris* e *Leporinus reinhardti* em gaiolas de aquicultura.** UFMG, Belo Horizonte, 1996, 138p. (Dissertação, Mestrado).
- MIRANDA, A. C. L.; BAZZOLI, N.; RIZZO, E.; SATO, Y. Ovarian follicular atresia in two teleost species; a histological and ultrastructural study. **Tissue and Cell**, 31: 480-488, 1999.
- MORIYAMA, S. Increased plasma insulin-like growth factor-I (IGF-I) following oral and intraperitoneal administration of growth hormone to rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. **Growth Regul.**, 5: 164-167, 1995.
- NAGAHAMA, Y. The functional morphology of teleost gonads. In: HOAR, W. S., RANDALL, D. J.; BRETT, J. R. **Fish physiology, Reproduction Part. A.**, New York: Academic Press. v.9, p.223-275, 1983.

