

LUCAS MARCON

**MORFOLOGIA OVARIANA NO LAMBARI *Astyanax bimaculatus*  
SOB EFEITO DO HORMÔNIO DE CRESCIMENTO**

Dissertação apresentada à  
Universidade Federal de Viçosa, como  
parte das exigências do Programa de  
Pós-Graduação em Medicina  
Veterinária, para obtenção do título de  
*Magister Scientiae*.

VIÇOSA  
MINAS GERAIS – BRASIL  
2008

LUCAS MARCON

**MORFOLOGIA OVARIANA NO LAMBARI *Astyanax bimaculatus*  
SOB EFEITO DO HORMÔNIO DE CRESCIMENTO**

Dissertação apresentada à  
Universidade Federal de Viçosa, como  
parte das exigências do Programa de  
Pós-Graduação em Medicina  
Veterinária, para obtenção do título de  
*Magister Scientiae*.

**APROVADA:** 21 de fevereiro de 2008

---

Prof. Jorge Abdala D. dos Santos  
(Co-orientador)

---

Prof. Eduardo Arruda T. Lanna  
(Co-orientador)

---

Profa. Elizete Rizzo

---

Prof. Luis David Solis Murgas

---

Prof. Laércio dos Anjos Benjamin  
(Orientador)

## **DEDICATÓRIA**

Aos meus queridos pais, Carlos e Narcisa, pelo incentivo, carinho, amor, compreensão e constante aprendizado para a vida.

## AGRADECIMENTOS

A Deus, e aos meus amados pais, por acreditarem e confiarem em mim. Sou eternamente grato por tudo que fazem. Vocês são meu orgulho! Amo você, Pai. Amo você, Mãe.

Aos meus irmãos Luciana e Lúcio, pelo incentivo, amizade e amor que vocês me dão.

Ao meu querido sobrinho Felipe, pelo carinho e amizade que temos um pelo outro.

Ao mais novo sobrinho Mateus, desejo toda felicidade e sucesso nessa vida.

Ao meu cunhado Aldo, pela força e incentivo na hora de torcer por mim, principalmente quando o assunto se trata de futebol. Time de sorte esse seu!!!! Nem vou mencionar o nome do seu time aqui porque não vale a pena!

Ao meu orientador Laércio dos Anjos Benjamin, muito mais que profissional nas horas certas, muito mais que amizade nos momentos difíceis, muito mais que compreensão e paciência em todos os momentos. Agradeço sua confiança, incentivo, transmissão de conhecimentos e idéias para essa dissertação. Obrigado por existir e ser realmente o melhor professor.

À Tereza Cristina, por ter-me dado oportunidade de ficar em sua casa no momento em que cheguei a Viçosa. Agradeço a sua amizade, compreensão e paciência por ter-me ajudado em todos os momentos.

Às lindas garotas Clarice e Anita, pelo carinho e simpatia.

E ao mais novo filho do professor Laércio e Tereza Cristina, recém-chegado “Estêvão”, “não torce pelo time do seu pai”.

Aos estimados amigos Ronaldo, Paulo Cabral, Fabio Fabão, Laura, Beto, Karlinha (PUC), Luciana (PUC) Rogério, Leandro (PUC), Gil (PUC) e Cristina (PUC), por estarem presentes em minha vida mesmo à distância. Vocês são meus amigos eternos.

Aos amigos que conheci em Viçosa, Leandro, Luciane, Cintia, Luciana e Dona Maria, Juliana Milani, Fábio, André, Natália e Kamila, por estarem em meu dia-dia.

À minha amiga e estagiária Vivian, por ter me ajudado nesse trabalho com sua dedicação e seriedade.

Ao mais novo e grande amigo que ganhei em Viçosa, Paulo, apesar de ser de Campinas, mas foi em Viçosa que realmente eu o conheci. Obrigado pela sua paciência e compreensão por me aturar. ““O chuveiro pegou fogo...sai correndo”, “ acorda rapaz, tá pegando fogo”. “Queimou toda a pizza meu”. “Vamos pra Dubai”. Obrigado por tudo!

À Universidade Federal de Viçosa, em particular aos professores e funcionários do Departamento de Veterinária, pelo acolhimento e aprendizado.

Aos professores do Setor de Morfologia do Departamento de Veterinária, Claudio César Fonseca, Tarcízio Antonio Rêgo de Paula, e Marco Túlio David (*in memoriam*).

Ao professor Sérgio Luís Pinto da Matta, do Laboratório de Biologia Estrutural do Departamento de Biologia Geral da UFV, que tanto contribuiu para realização desde estudo, principalmente com o empréstimo dos reticulos e microscópios.

Aos professores Jorge Dergan, Ana Lúcia e Jener Alexandre, do Departamento de Biologia Animal, pelos ensinamentos transmitidos, tanto para a vida quanto para a profissão.

Ao professor Eduardo Lanna, do Departamento de Zootecnia da UFV, que disponibilizou o espaço para o experimento e pelos ensinamentos transmitidos.

À secretária e amiga Rosi, do Departamento de Veterinária da UFV, que muito me ajudou com minhas dúvidas burocráticas ao longo do mestrado.

À Piscicultura da Prata, na pessoa do colega “Taquinho” que disponibilizou o espaço e os lambaris para esse estudo na Piscicultura da Prata.

À professora Irani Quagio-Grassiotto, do Departamento de Morfologia do Instituto de Biociências da UNESP (Botucatu-SP), que disponibilizou seu laboratório para processamento histológico.

Aos técnicos dos laboratórios, “Fábio e Vicente” do Departamento de Morfologia do Instituto de Biociências da UNESP (Botucatu-SP), “Cláudio e Adão” do Laboratório de Histopatologia do Departamento de Veterinária da UFV, pela paciência e nos conselhos que vocês me deram na realização das lâminas histológicas.

À professora Heidi Dolder, pela oportunidade e transmissão de conhecimentos. Fui estagiário e bolsista de iniciação científica, nos quais adquiri e desenvolvi minha inspiração na área de reprodução de peixes até os momentos atuais.

À banca examinadora dessa dissertação, pela disponibilidade e sugestões.

À FAPEMIG, pelo apoio financeiro para o desenvolvimento do presente estudo.

A todos aqueles que, direta ou indiretamente, colaboraram para a realização deste estudo.

## BIOGRAFIA

LUCAS MARCON, filho de Carlos Marcon Filho e Narcisa das Dores Marcon, nasceu em 29 de janeiro de 1980, em Campinas-SP.

Em dezembro de 1994 concluiu o Ensino Fundamental pela Escola Estadual Monsenhor Luiz Gonzaga de Moura, em Campinas-SP.

Em fevereiro de 1995 iniciou os estudos no Ensino Médio Profissionalizante em Processamento de Dados no Colégio Politécnico Bento Quirino, em Campinas-SP.

Em fevereiro de 1999 ingressou no curso de Ciências Biológicas pela Pontifícia Universidade Católica de Campinas (PUC-Campinas), onde em janeiro de 2003 graduou-se nesta Instituição.

No ano de 2002 foi bolsista de iniciação científica pela FAPESP no Departamento de Biologia Celular, Instituto de Biologia/Unicamp.

Entre fevereiro de 2003 e dezembro de 2005 ministrou aulas em escolas estaduais no Estado de São Paulo como professor de Ciências e Biologia para o ensino fundamental e médio.

No ano de 2005 trabalhou em um projeto “Escola da Família”, desenvolvido pelo Governo do Estado de São Paulo em parceria com a UNESCO, onde desenvolveu atividades de socialização e conscientização de crianças e adolescentes.

Em maio de 2006 ingressou no Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária na Universidade Federal de Viçosa – MG, sob orientação do professor Laércio dos Anjos Benjamin, com área de concentração em Morfofisiologia de Animais Domésticos e Selvagens (Reprodução de Peixes), defendendo a dissertação em fevereiro de 2008 para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

## ÍNDICE

	Pág.
RESUMO.....	vii
ABSTRACT.....	ix
1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1. O lambari <i>Astyanax bimaculatus</i> .....	1
1.2. Reprodução em peixes teleósteos.....	2
2. JUSTIFICATIVA.....	6
3. OBJETIVOS.....	6
3.1. Objetivo geral.....	6
3.2. Objetivos específicos.....	7
4. MATERIAL E METODOS.....	7
4.1. Animais.....	8
4.2. Tratamentos.....	8
4.3. Procedimentos para estudo histológico.....	9
4.4. Análises morfométricas da recuperação ovariana.....	10
4.5. Análise quantitativa da atividade reprodutiva.....	10
4.6. Análises estatísticas.....	11
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	15
5.1. Eficiência da hipofiseção.....	15
5.2. Morfologia dos ovários.....	17
5.2.1. O desenvolvimento primário.....	20
5.2.2. O desenvolvimento secundário.....	21
5.2.3. Morfometria dos ovócitos.....	26
5.3. Recuperação ovariana.....	27
5.3.1. Dinâmica do desenvolvimento ovocitário nos grupos experimentais.....	27
5.3.2. Atresia folicular.....	29
5.3.3. Foliculos pós-ovulatórios.....	32
5.3.4. Análise quantitativa da recuperação ovariana.....	35
5.5. Figuras.....	38
5.6. Tabelas.....	57
5.7. Gráficos.....	61
6. CONCLUSÕES.....	68
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	69

## RESUMO

Marcon, Lucas, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2008.

**Morfologia ovariana no lambari *Astyanax bimaculatus* sob efeito do hormônio de crescimento.** Orientador: Laércio dos Anjos Benjamin. Co-orientadores: Jorge Abdala Dergam dos Santos e Eduardo Arruda Teixeira Lanna.

*Astyanax bimaculatus*, peixe ovíparo, apresenta atividade reprodutiva o ano todo e desova parcelada, características promissoras para seu cultivo. É importante conhecer a biologia reprodutiva para facilitar o manejo, minimizar os gastos com a reprodução e desenvolver novas técnicas para aprimorar a reprodução com interesse comercial e de preservação. Estudos demonstram a importância do hormônio de crescimento nos processos de gametogênese e maturação gonadal, sendo um importante modulador da reprodução da fêmea. O presente trabalho avalia histologicamente os ovários de lambaris submetidos à técnica de desova induzida com extrato bruto de hipófise de carpa, e o efeito do hormônio de crescimento no processo de recuperação ovariana após a desova. Após a desova induzida, ovários de peixes do grupo-controle e do grupo tratado com hormônio de crescimento foram analisados em microscopia de luz, visando caracterizar a morfologia ovariana pós-desova. A partir de dados biométricos obtidos, foram calculados os valores dos índices gonadossomático (IGS) e hepatossomático (IHS), e do fator de condição  $K_2$  nos diferentes horários de coleta para os grupos em estudo. Cerca de 60% das fêmeas hipofisadas responderam satisfatoriamente à injeção do extrato bruto de hipófise. A extrusão dos ovócitos ocorreu entre 225 a 234 horas-grau após hipofisação. A ovogenese de *A. bimaculatus* parece ser similar à maioria dos teleósteos de água doce. A análise dos fragmentos de ovários demonstrou a presença constante de ovócitos em todas as etapas de desenvolvimento, folículos pós-ovulatórios, além de atresia folicular. Ovócitos em crescimento primário estiveram presentes em maior número no grupo-controle, enquanto ovócitos em crescimento secundário foram mais numerosos no grupo tratado. Folículos pós-ovulatórios foram mais numerosos no grupo-controle que no

grupo tratado, e sua detecção tornou-se mais difícil entre 96 e 120 horas após a desova. A atresia foi observada em maior intensidade no grupo tratado que no grupo-controle. Diferenças significativas ( $P < 0,05$ ) na contagem de folículos atrésicos entre os grupos experimentais foram registradas as seis e às 48 horas pós-desova. Não foram constatadas diferenças significativas ( $P > 0,05$ ) para a contagem de eosinófilos dentro dos grupos experimentais. Observou-se maior quantidade de eosinófilos no grupo tratado, coincidindo com as maiores quantidades de folículos atrésicos nesse grupo. Diferença significativa ( $P < 0,05$ ) foi observada quando foram associados os valores de atresia e eosinófilos e comparados os mesmos entre os grupos experimentais. Por ser espécie de desova parcelada e não apresentar variação brusca no tamanho das gônadas, não foram encontradas diferenças significativas ( $P > 0,05$ ) para IGS nos diferentes horários de coleta e nem entre os grupos experimentais. Diferenças estatísticas ( $P < 0,05$ ) para os valores de IHS foram encontradas entre os grupos experimentais as nove e às 96 horas pós-desova. Valores mais altos de IHS registrados no grupo que recebeu a dose de hormônio de crescimento coincidem com a maior quantidade de ovócitos em vitelogênese observada nesse grupo. Não foram encontradas diferenças estatísticas ( $P > 0,05$ ) para o fator de condição  $K_2$ .

## ABSTRACT

Marcon, Lucas, M.Sc., Federal University of Viçosa, February 2008. **Ovarian morphology in lambari *Astyanax bimaculatus* under the effect of the growth hormone.** Adviser: Laércio dos Anjos Benjamin. Co-advisers: Jorge Abdala Dergam dos Santos and Eduardo Arruda Teixeira Lanna.

*Astyanax bimaculatus*, oviparous fish, presents reproductive activity the year round and multiple spawning. It is important to know the reproductive biology to facilitate the reproductive management, minimize the expenses with the reproduction and develop new techniques that can to improve the reproduction with commercial and preservation interests. Studies demonstrate the importance of the growth hormone in the gametogenesis and gonadal ripening, as being an important factor of female reproduction. In this way, the present study histologically evaluates the *Astyanax bimaculatus* ovaries submitted to the induced spawning technique with a crude carp pituitary extract and the effect of the growth hormone in the ovarian recrudescence process after spawning. Respecting the different periods after induced spawning, the ovaries of fishes of the control group and the growth hormone treated group were analyzed using a light microscope, aiming to characterize the post-spawning ovarian morphology. From the biometric data obtained, the gonadosomatic index (GSI) and hepatosomatic index (HSI) values were calculated, and also the condition factor ( $K_2$ ), in the different collection schedules for the two groups under study. Around 60% of the females reacted satisfactorily to the crude carp pituitary extract injection. The extrusion of the oocytes occurred between 225 and 234 h-degrees after hypophysation. The oogenesis of *A. bimaculatus* seems to be similar to the majority of the fresh water teleosts. The analysis of the fragments of ovaries showed the constant presence of oocytes in the gonads during all pphases of development, post-ovulatory follicles, besides follicular atresia. Oocyte in primary growth were present in great number in the group-control, while oocytes in secondary growth were more numerous in the treated group. Post-ovulatory follicles were more numerous in the control group than in the treated group, and between 96<sup>th</sup> and 120<sup>th</sup> hours after spawning in both control group and treated group its detection became more difficult. The

follicular atresia was observed in greater intensity in the treated group than in the control group. Significant differences ( $P < 0.05$ ) between the experimental were recorded at six and at 48<sup>th</sup> hours after spawning. Significant differences were not observed ( $P > 0.05$ ) for the eosinophyle counting inside the experimental groups. A greater quantity of eosinophyles was observed in the treated group, coinciding with the largest quantities of atretic follicles in this group. A significant difference ( $P < 0.05$ ) was noticed when the follicular atresia and eosinophyle values were associated and compared between the experimental groups. Due to a multiple spawning and not presenting abrupt variations in the size of the gonads, significant differences were not found ( $P > 0.05$ ) for the GSI in the different collecting periods and not even between the experimental groups. Statistical differences ( $P < 0.05$ ) for the HSI values were found between the experimental groups at the nine and 96<sup>th</sup> hours post-spawning. Higher values of HSI were registered in the group that received the hormone growth coinciding with the largest quantity of vitelogenesis oocyte observed in this group. Statistical differences were not found ( $P > 0.05$ ) for the condition factor ( $K_2$ ).

# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1. O lambari *Astyanax bimaculatus*

Os peixes representam aproximadamente 50% dos vertebrados, englobando cerca de 24.000 espécies que ocupam ambientes aquáticos dos mais diversos tipos. Dessas 24.000 espécies, cerca de 23.400 são peixes teleósteos (Vazzoler, 1996). O lambari *Astyanax bimaculatus* (Linnaeus, 1758), é um Characiforme que pertence à família Characidae. Revisões recentes colocam o gênero em “Incertae sedis”, com 88 gêneros e 620 espécies, junto às 86 espécies que pertencem ao gênero *Astyanax* (Lima et al., 2003).

Peixes do gênero *Astyanax* são conhecidos popularmente pelos nomes de lambaris, piabas, lambari-guaçu, mojarra, crioula, tabuão, piaba da lagoa, entre outros (Barbieri et al, 1982, citado por Drummond, 1996). *Astyanax bimaculatus* é um peixe de pequeno porte, atingindo aproximadamente 20 cm de comprimento e pesando até 40 gramas. Possui corpo irregularmente elíptico, com nadadeiras amarelas, quatro a cinco dentes na série externa e cinco na série interna do pré-maxilar, escamas com reflexos prateados, mancha umeral ovalada, pedúnculo caudal com mancha alongada que se prolonga até a ponta dos raios caudais medianos (Britski et al., 1988; CEMIG/CETEC, 2000).

O gênero *Astyanax* possui ampla distribuição geográfica, sendo encontrado desde o sudoeste dos Estados Unidos até a bacia do rio da Prata (Moreira Filho, 1989, citado por Pereira Filho, 2000). Os lambaris são encontrados em cabeceiras de riachos, rios e lagos, e vivem sempre em cardumes, realizando curtas migrações na época das cheias para sua reprodução. Esses peixes são considerados onívoros, se alimentando de algas, vegetais, larvas e insetos adultos (CEMIG/CETEC, 2000). Em estudo conduzido com o lambari *Astyanax janeiroensis* nas fases larvais, verificaram-se que os principais hábitos alimentares se baseavam em algas, microcrustáceos, pequenos invertebrados e esporos vegetais (Santin et al., 2005).

É importante conhecer a biologia e o tipo de desova da espécie que se pretende cultivar para facilitar o manejo reprodutivo e minimizar os gastos com

a reprodução. O lambari *Astyanax scabripinnis* é um peixe de reprodução externa, sem cuidado com a prole, atividade reprodutiva o ano todo e desova parcelada. *Astyanax fasciatus* possui desova total ocorrendo de novembro a maio. *Astyanax bimaculatus* possui desova parcelada e seu período de desova vai de setembro a março (Vazzoler e Menezes, 1992, citados por Pereira Filho, 2000).

## **1.2. Reprodução em peixes teleósteos**

O aumento do número de lagos artificiais interfere no comportamento migratório e reprodutivo de várias espécies economicamente importantes (Tundisi, 1978). As espécies de maior valor comercial no Brasil, com potencial para cultivo, são exatamente os peixes que realizam migração reprodutiva e que podem ter a propagação e a perpetuação prejudicadas em consequência da construção de barragens hidrelétricas (Lima et al., 1991). Com o represamento dos rios, torna-se difícil para os peixes realizarem esses movimentos migratórios para desova. Por isso, estudos sobre a atividade reprodutiva de peixes nos períodos pré e pós-barramento são necessários para avaliar impactos causados pela construção desses reservatórios (Bazzoli et al., 1991). Desmatamento ciliar, poluição industrial e doméstica, destruição de várzeas e lagoas marginais por empreendimentos agrícolas também constituem ameaça em várias regiões, além da pesca predatória ilegal em períodos de reprodução (CEMIG/CETEC, 2000).

Assim, têm surgido no Brasil, estações de piscicultura com objetivo de incrementar estudos biológicos e limnológicos dos ecossistemas aquáticos. As Estações de Hidrobiologia e Piscicultura de Três Marias (CODEVASFCEMIG) no Rio São Francisco/MG, e de Furnas Centrais Elétricas no Rio Grande/MG, vêm desenvolvendo atividades de pesquisa nas áreas de reprodução, larvicultura, alevinagem, limnologia e biologia pesqueira com a preocupação de recuperar as populações ameaçadas pela degradação constante.

Várias pisciculturas também têm proliferado com o intuito de se produzir alevinos. Entre elas, a Piscicultura da Prata, localizada na Fazenda da Prata, município de Eugenópolis-MG, micro-região de Muriaé, na Zona da Mata de

Minas Gerais. A Piscicultura da Prata há mais de 15 anos dedica-se à produção de peixes ornamentais e há quatro anos especializou-se na produção de alevinos de diversas espécies para repovoamento e consumo. São peixes produzidos através de matrizes selecionadas com tecnologia necessária para oferecer produto de qualidade.

A grande vantagem na reprodução artificial de peixes é o aumento da taxa de fertilização, proteção contra inimigos naturais, condições ambientais favoráveis para crescimento e sobrevivência de larvas, redução dos custos operacionais e, além disso, não necessita de tecnologia avançada (Woynarovich & Horvath, 1980). Sendo assim, as pisciculturas vêm utilizando preparações hormonais com hipófises, hormônio luteinizante (LH), hormônio folículo-estimulante (FSH) e gonadotrofina coriônica humana (hCG) para propagação artificial de peixes (Baldisserotto, 2002; Furtado, 1995). Na prática, o extrato de hipófise é o agente mais utilizado para induzir a ovulação (Sato, 1999; Szabó, 2003).

A sobrevivência das espécies depende da produção de ovos viáveis. Em peixes, o desenvolvimento ovocitário tem sido descrito por vários pesquisadores (Begovac & Wallace, 1988; Bazzoli & Rizzo, 1990; Tyler & Sumpter, 1996; Grier, 2000 e 2002) e, como nos animais em geral, compreende os períodos pré-meiótico, pré-vitelogênico, vitelogênico e maturação final. Os ovócitos passam por diversas fases de desenvolvimento, diferenciação e maturação, de acordo com o período reprodutivo do animal (Wallace & Selman, 1981). Essas fases ocorrem no interior de folículos cuja parede constituída de zona radiata, camada folicular, membrana basal, e teca (Grier, 2000) desempenham um importante papel durante a ovogênese e na fertilização.

Muitas das espécies nativas não desovam espontaneamente em ambientes lênticos. Algumas espécies nativas quando mantidas em cativeiro se preparam para a reprodução, mas não desovam naturalmente, e sofrem regressão ovariana, com conseqüente atresia dos ovócitos. A atresia folicular é um processo degenerativo de ocorrência comum nos ovários de vertebrados e os ovócitos podem sofrer atresia em diferentes fases do desenvolvimento ou diferenciação (Guraya, 1986). No entanto, este fenômeno tem séria influência nos procedimentos de cultivo e desova induzida, uma vez que processos

degenerativos do ovário reduzem a taxa de fertilização (Miranda, 1996). A utilização de técnicas de indução hormonal pode minimizar o problema (Fenerich-Verani et al., 1984; Godinho et al., 1984; Guraya, 1986) e auxiliar na propagação artificial destas espécies.

A ovulação refere-se à expulsão do ovócito maduro do folículo (Redding & Patiño, 1993). Na natureza, a ovulação é regulada por dois hormônios os quais estimulam o desenvolvimento gonadal em peixes, GtH-I (hormônio folículo estimulante) e GtH-II (hormônio luteinizante), os quais são semelhantes ao hormônio folículo estimulante (FSH) e ao hormônio luteinizante (LH), respectivamente (Connaughton & Aida, 1998; Klausen et al., 2001). Esses hormônios gonadotróficos agem nos órgãos reprodutores, promovendo o desenvolvimento e maturação das células gametogênicas. O processo de transporte dos hormônios para as células reprodutoras é lento em ambientes naturais; mas, na reprodução artificial, com a técnica de hipofiseção, esse processo torna-se mais rápido em relação ao processo natural (Woynarovich & Horvath, 1980).

Nos ovários de peixes teleósteos com fertilização externa, os folículos pós-ovulatórios, estruturas remanescentes da desova, são freqüentes. Um aspecto interessante é saber a duração da reabsorção dos folículos pós-ovulatórios nos procedimentos de desova induzida para as espécies em criação. Drummond (1996) estudou a reabsorção dos folículos pós-ovulatórios no estroma ovariano em maturação avançada de lambaris (*Astyanax bimaculatus lacustris*), e observou que cinco dias após a desova os folículos haviam sido reabsorvidos. Durante esse processo, figuras de apoptose foram observadas em fêmeas submetidas à hipofiseção (Drummond et al., 2000), o mesmo ocorrendo em *Leporinus taeniatus* (Anostomidae) (Santos et al., 2003).

O hormônio de crescimento, um peptídeo de aproximadamente 20 kDa secretado pela hipófise de vertebrados (Yamaguchi et al., 1991), atua no crescimento (Hull & Harvey, 2001; Yamaguchi et al., 1991) e desenvolvimento, promovendo a divisão celular, diferenciação e crescimento (Corin et al., 1990; Copeland & Nair, 1994), atuando também no metabolismo de carboidratos, lipídeos, proteínas e ácidos nucléicos (Ho et al., 1996, citados por Klausen et al., 2001). A grande maioria dos dados disponíveis deriva de experimentos realizados com mamíferos. Nos peixes, o hormônio de crescimento além de

sua atuação no desenvolvimento e no crescimento (Donaldson et al., 1983; Bern, 1983), exerce influência na osmorregulação (Sakamoto et al., 1993; Sangiao-Alvarellos et al., 2006), na resposta imune (Calduch-Giner et al., 1997), e na reprodução (Donaldson et al., 1983; Van Der Kraak et al., 1990; Le Gac et al., 1993).

Alguns trabalhos foram conduzidos com hormônio de crescimento, como o exemplo citado por Nicoll et al. (1986), mostrando que o hormônio de crescimento humano (GH) se liga fortemente a todos os receptores de hormônio de crescimento em diferentes classes de vertebrados. Gomez et al. (1999) estudaram modificações na receptividade ao hormônio de crescimento no ovário da truta durante o ciclo reprodutivo, e concluíram que receptores para este hormônio estão presentes no ovário ao longo do ciclo reprodutivo e são de grande importância na vitelogênese e maturação ovocitária. Segundo Hull & Harvey (2001), a vitelogênese é controlada pelo estradiol e fica severamente prejudicada na ausência de hormônio de crescimento em peixes hipofisectomizados, sendo estabelecida pela administração do hormônio exógeno. Outra importância é que este hormônio pode atuar como regulador do desenvolvimento folicular, atuando no folículo pré-ovulatório por interferir com a via de transdução do AMPc (Van Der Kraak et al., 1990). Esses achados estimulam investigações sobre o papel potencial de preparações puras do hormônio de crescimento na gametogênese.

Várias vias são utilizadas para se administrar hormônio de crescimento em peixes: injeção intramuscular, injeção intra-celomática e implantes de pellets. Nos estudos mais recentes, a utilização de injeção intra-celomática do hormônio de crescimento tem sido a mais utilizada (MacLean et al., 1994 e 1997; Seidelin & Madsen, 1997 e 1999). Nas injeções intra-celomáticas, os níveis máximos de hormônio de crescimento circulante foram atingidos seis horas após a administração, mas caíram rapidamente, diferentemente da administração oral onde os níveis mais elevados foram observados com 15 horas, caindo a níveis basais com 24 horas (Moriyama, 1995).

## **2. JUSTIFICATIVA**

A indução artificial da desova em peixes é recomendada para várias espécies de interesse comercial que não reproduzem em ambientes confinados. O domínio e o aprimoramento desta técnica são de grande importância para aumentar a produção de alevinos destas espécies. A desova induzida também é um procedimento utilizado para conservação de espécies ameaçadas de extinção. Apesar disso, estudos experimentais sobre a reprodução de espécies brasileiras ainda são escassos, sendo menos comuns ainda aqueles enfocam o mecanismo e os eventos morfológicos ocasionados pela indução.

Considerando-se que, como base para estudos fisiológicos e aplicados em reprodução, é necessário conhecer eventos cíclicos que ocorrem nas gônadas dos animais, entende-se que o conhecimento das características morfológicas dos ovários do lambari e da recuperação dessas gônadas após a indução da desova em condições de confinamento e também em resposta ao tratamento com hormônio de crescimento, fornecerão informações importantes para o aprimoramento das técnicas de reprodução artificial nessa espécie, além de fornecer suporte para estabelecimento de protocolos de desova induzida em diferentes espécies comercialmente importantes.

A escolha do lambari se deve ao fato de ser uma espécie rústica, de fácil manejo e mantida em tanques na Piscicultura da Prata e em número suficiente para realização do experimento. Também contribuiu para a escolha o fato de ser um peixe de pequeno porte, ciclo reprodutivo curto e desova parcelada.

## **3. OBJETIVOS**

### **3.1. Objetivo Geral**

- Avaliar a dinâmica ovariana em lambaris submetidos à desova induzida e ao tratamento com hormônio de crescimento após a desova induzida.

### **3.2. Objetivos Específicos**

- Verificar a eficiência do processo de hipofisação;
- Descrever a morfologia dos ovários, caracterizando os diferentes estádios de desenvolvimento ovocitário;
- Descrever os eventos morfológicos que ocorrem nos ovários dos peixes após desova induzida por hipofisação;
- Estudar os folículos pós-ovulatórios em nível histológico, e determinar a duração da recuperação ovariana de peixes submetidos à desova induzida por hipofisação;
- Verificar os processos degenerativos nos ovários;
- Avaliar os efeitos do hormônio de crescimento humano no processo da recuperação ovariana em peixes submetidos à desova induzida por hipofisação; e
- Avaliar diferenças nos valores dos índices gonadossomático (IGS) e hepatossomático (IHS) e do fator de condição  $K_2$  de animais submetidos à desova induzida e naqueles submetidos ao tratamento com hormônio de crescimento após a desova.

## **4. MATERIAL E MÉTODOS**

O experimento foi realizado na Piscicultura da Prata (Eugenópolis/MG, 21°05'56"S 42°11'13"O), nos Departamentos de Veterinária, Biologia Geral e Zootecnia (Universidade Federal de Viçosa), e no Departamento de Morfologia (IB/UNESP-Botucatu).

A indução hormonal à desova, o tratamento com hormônio de crescimento e a coleta de fragmentos de ovários para o presente estudo foram realizadas na Piscicultura da Prata no período de janeiro a fevereiro de 2006.

O presente experimento seguiu as normas preconizadas pelo "Manual de Conduta no Uso de animais no Ensino, Pesquisa e Extensão do DVT/UFV", elaborado pela Comissão de Ética do DVT/UFV (protocolo n. 59/2005)

#### 4.1. Animais

Foram utilizadas para indução à desova, 200 fêmeas do lambari *Astyanax bimaculatus* mantidos em tanques de terra. Para o presente estudo, foram selecionadas fêmeas de lambari em maturação avançada (Figs.1 e 2). As características para a escolha dos reprodutores se basearam em aspectos corporais como ventre abaulado, e poro genital dilatado e vascularizado.

Os peixes foram retirados dos viveiros (Fig. 3) um dia antes da hipofiseção e transferidos para tanques de alvenaria (Fig. 4) dotados de circulação de água constante e temperatura mantida em torno de  $25\pm 1^{\circ}\text{C}$ , onde permaneceram durante todo o período experimental. Após hipofiseção, as fêmeas foram mantidas nesses tanques de alvenaria até o momento da desova (Fig. 4). Para se determinar o momento da desova procurou-se observar a presença de ovos no fundo do tanque, e dessa forma, os peixes foram coletados para massagem abdominal e extrusão dos ovócitos.

Após a desova, os peixes foram separados em dois grupos: o grupo controle, constituído por fêmeas desovadas artificialmente após administração de extrato de hipófise, e o grupo tratado, com as fêmeas que receberam uma dose de hormônio de crescimento (GH) após a desova induzida. Os peixes foram alimentados com ração comercial Purina contendo 35% de proteína, duas vezes ao dia, de acordo com o manejo da piscicultura.

#### 4.2. Tratamentos

Para verificar a interferência do processo de reprodução induzida na recuperação ovariana foram adotados os seguintes procedimentos:

- Injeção intra-celomática, em dose dupla, de extrato bruto de hipófise de carpa-comum (*Cyprinus carpio*) (Figs. 5 e 6), sendo a primeira injeção na dose de 0,5 mg/kg de peso corporal (dose preparatória) e, após 14 horas, a segunda injeção na dose de 6mg/kg (Woynarovich & Horvath, 1980; Sato, 1999).

- Extrusão dos ovócitos, realizada manualmente por compressão da parede da cavidade celômica (Fig. 7). No momento da desova, foi calculado o tempo em horas-grau, considerando-se a temperatura da água e o tempo

decorrido após a aplicação da segunda dose do extrato hipofisário [horas-grau para extrusão dos ovócitos = temperatura da água (°C) x tempo (horas)] (Woynarovich & Horvath, 1980).

No grupo-controle (59 animais), os peixes foram anestesiados com solução de benzocaína 1:10000 (Fig. 9) e eutanasiados por meio de incisão na transição cabeça-tronco imediatamente após a desova e em intervalos de três horas nas primeiras 12 horas, e depois às 18, 24, 48, 72, 96 e 120 horas para coleta dos ovários.

No grupo de animais submetidos ao tratamento hormonal (52 animais) (Fig. 8), o hormônio de crescimento humano (Saizen®, Serono) foi administrado na dosagem de 2µg/g de peso corporal (Seidelin & Madsen, 1999) imediatamente após a desova, por via intra-celomática (Fig. 6). Para esse grupo, foram seguidos os mesmos procedimentos de coleta adotados para o grupo-controle, com as fêmeas sendo eutanasiadas a cada três horas nas primeiras 12 horas, e depois às 18, 24, 48, 72, 96 e 120 horas após a desova.

### **4.3. Procedimentos para estudo histológico**

Para o estudo das características morfológicas das gônadas, os fragmentos de ovários coletados (Fig. 10) foram fixados em formaldeído a 10% em tampão fosfato 0.1 M pH 7.2. O material foi fixado por um período mínimo de 24 horas e preservado em álcool 70%. Em seguida, os fragmentos foram transferidos para solução de álcool 95% por quatro horas. Após isso, os fragmentos de ovários foram imersos em solução de álcool 95%:resina glicolmetacrilato ( Leica, Historesin) na proporção de 1:1 por 12 horas, seguida de resina pura por 24 horas, e inclusão (Figs. 11 e 12), seccionados com 1-3 µm de espessura e corados com hematoxilina-eosina, azul de toluidina em pH 0.5, pH 4.0 e pH 6.5, PAS (Periodic Acid-Schiff) e PAS/metanil-amarelo.

Após a coloração, os ovários das fêmeas de lambaris do grupo-controle e do grupo tratado com hormônio de crescimento foram analisados em microscópio de luz. Essa análise levou em consideração os estádios de desenvolvimento ovocitático, a involução dos folículos pós-ovulatórios e a presença de folículos atrésicos.

#### **4.4. Análises morfométricas da recuperação ovariana**

Nesta etapa, foram medidos os diâmetros de 50 ovócitos em cada estágio de desenvolvimento, em lâminas escolhidas ao acaso, a partir de ovócitos íntegros, esféricos, com pouca retração e corte passando pelo núcleo. Estas medidas foram feitas utilizando-se ocular micrométrica de 10X e objetivas de 10X e 40X em função do estágio de desenvolvimento ovocitário. Os diâmetros dos ovócitos foram calculados após utilização de fator de correção apropriado para os aumentos.

Para a avaliação da recuperação ovariana foram feitas contagens dos diferentes estágios de desenvolvimento ovocitário, ocorrência de atresia e folículos pós-ovulatórios. Utilizou-se microscópio Olympus BX40 dotado de retículo micrométrico (1 mm de lado e 100 subdivisões) em ocular de 10X e objetiva de 10X. As contagens foram realizadas em 10 campos escolhidos ao acaso para cada animal nos dois grupos experimentais. Também foi realizada a contagem de eosinófilos associados aos folículos atrésicos, utilizando-se microscópio Olympus BX40 (ocular de 10X e objetiva de 40X) em 10 campos escolhidos ao acaso para cada animal nos dois grupos experimentais.

Para todas as contagens, foram calculados os valores médios e desvios-padrão para cada período de coleta em cada grupo, para se avaliar o processo de recuperação ovariana.

As imagens digitais foram obtidas com fotomicroscópio Olympus AX70 TRF, no Laboratório de Anatomia Vegetal, do Departamento de Biologia Vegetal da UFV.

#### **4.5. Análise quantitativa da atividade reprodutiva**

Para analisar quantitativamente a atividade reprodutiva do *A. bimaculatus*, foram registrados, para cada exemplar, os seguintes dados biométricos: comprimento padrão (em cm), peso corporal (em g), peso dos ovários (em g) e peso do fígado (em g). Os valores médios e desvios-padrão dos índices gonadossomático e hepatossomático, e do fator de condição  $K_2$  (sem o peso dos ovários) foram calculados para cada animal, em cada um dos grupos propostos no presente estudo.

a) Índice gonadossomático (IGS)

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

PG= peso dos ovários

PC= peso corporal

b) Índice hepatossomático (IHS)

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

PF= peso do fígado

PC= peso corporal

c) Fator de condição ( $K_2$ )

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

PC= peso corporal

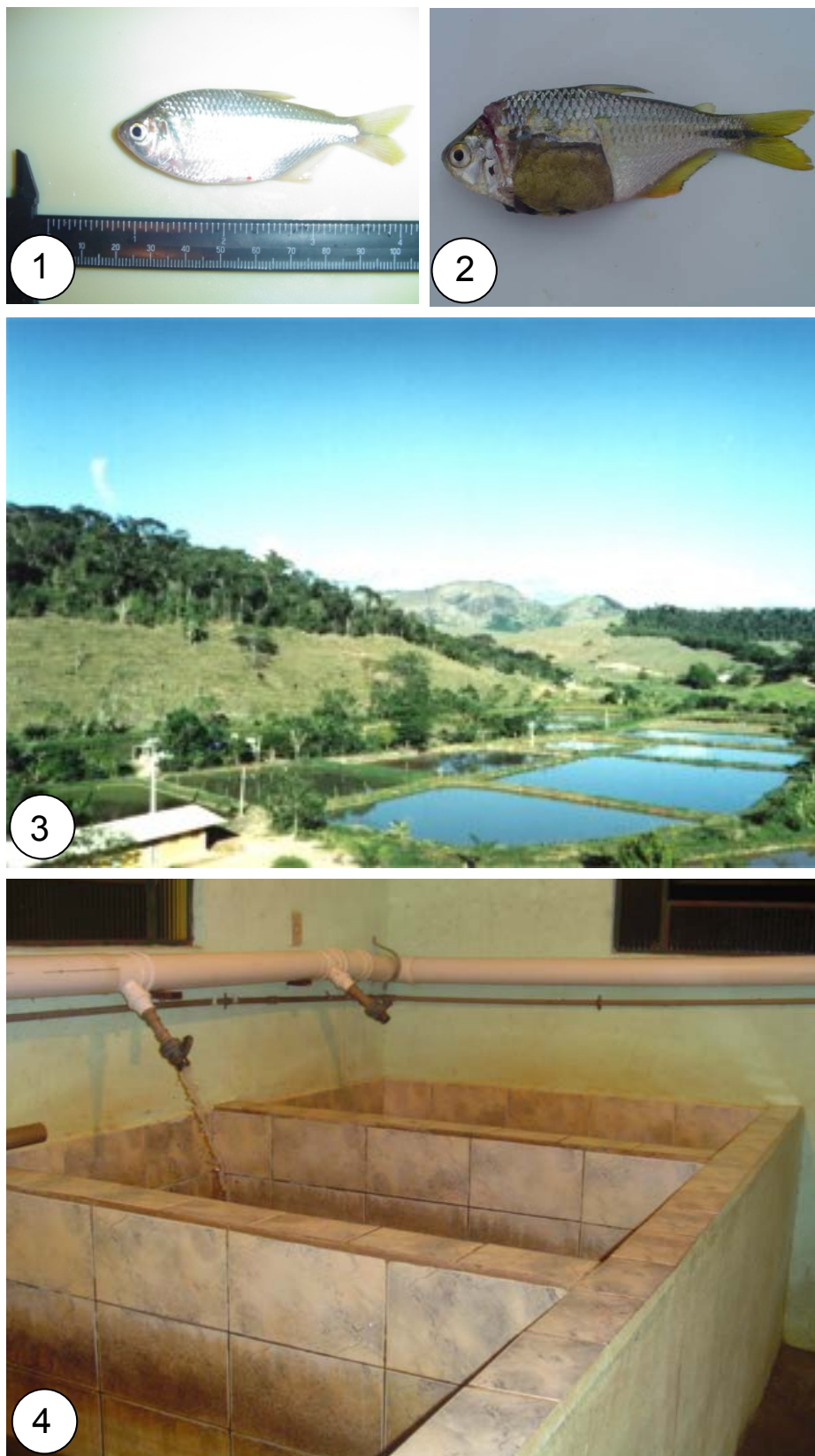
PG= peso dos ovários

CP= comprimento-padrão

#### 4.6. Análises estatísticas

As variáveis quantitativas foram submetidas aos testes de normalidade (Lilliefors) e homocedasticidade (Cochran & Bartlett) e, posteriormente à análise de variância para testar as variações nos valores médios dos índices calculados (IGS, IHS,  $K_2$ ) para cada período de coleta. Quando apresentaram significância, foi realizado o teste de Duncan ( $P < 0,05$ ) para comparar os índices médios quando foram registradas diferenças significativas. Teste de Duncan ( $P < 0,05$ ) foi utilizado para comparar valores médios de IGS, IHS e  $K_2$  entre os grupos controle e tratado. Quando não atenderam às premissas de normalidade e homocedasticidade, mesmo após as transformações apropriadas, os dados foram submetidos aos testes não-paramétricos de Kruskal-Wallis e de Wilcoxon (SAEG, 1999).

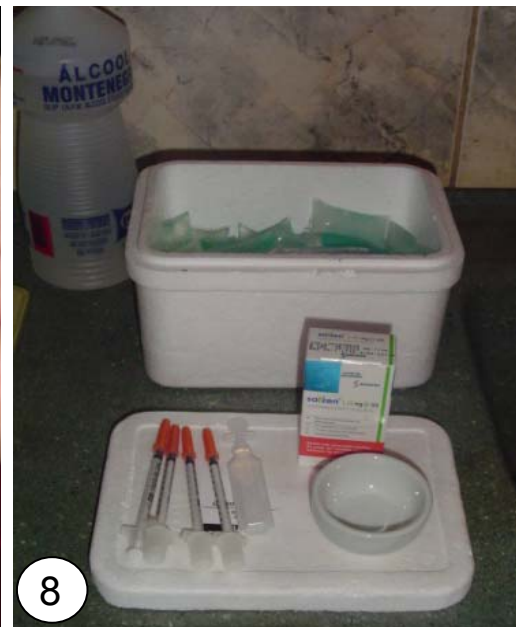
Foi utilizado teste de Tukey ( $P < 0,05$ ) para comparar valores médios dos diferentes estádios de desenvolvimento ovocitário, de folículos atrésicos, de eosinófilos e de folículos pós-ovulatórios entre os grupos experimentais. Teste de correlação de Pearson foi usado para comparar a proporção de eosinófilos associados aos folículos atrésicos entre o grupo-controle e o grupo tratado (BioEstat 3.0).



**Figs. 1 e 2:** Exemplares de *Astyanax bimaculatus* em maturação avançada. Em 1, fêmeas com ventre abaulado. Em 2, aspecto de ovário em maturação avançada, com ovócitos visíveis a olho nu.

**Fig. 3:** Vista panorâmica dos tanques de terra da Piscicultura da Prata, Eugenópolis/MG.

**Fig. 4:** Tanques de alvenaria utilizados para condução do experimento.



**Fig. 5:** Material utilizado para preparo e administração de extrato hipofisário.

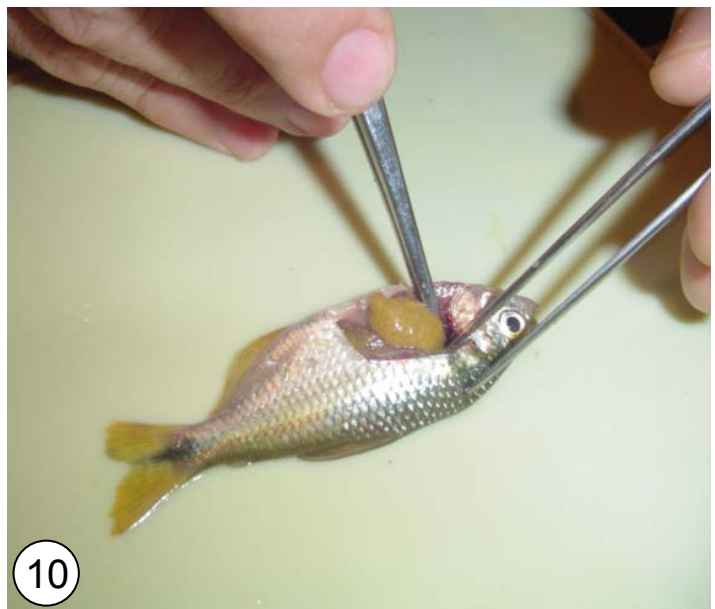
**Fig. 6:** Aplicação do extrato hipofisário para indução à desova, ou do hormônio de

crescimento em fêmeas desovadas artificialmente.

**Fig. 7:** Extrusão dos ovócitos de *Astyanax bimaculatus* por meio de massagem da

parede da cavidade celômica.

**Fig. 8:** Hormônio de crescimento para aplicação em fêmeas após a desova.



**Fig. 9:** Esquema de anestesia dos peixes.

**Fig. 10:** Coleta de fragmentos de ovário.

**Figs. 11 e 12:** Inclusão de fragmentos de ovário em historesina.

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1. Eficiência da hipofisação

Foram hipofisadas 200 fêmeas adultas de *Astyanax bimaculatus* em fase avançada de maturação, das quais 120 responderam ao estímulo hormonal com extrato de hipófise de carpa-comum, de forma semelhante aos valores relatados na literatura em espécies diferentes do mesmo gênero (Woynarovich & Horvath, 1980; Miranda, 1996; Drummond, 1996; Sato, 1999).

São vários os agentes indutores que podem ser utilizados para indução da ovulação. Podem ser utilizados o hormônio liberador de LH (LHRH), o hormônio folículo-estimulante (FSH) e a gonadotrofina coriônica humana (hCG) (Furtado, 1995; Baldisserotto, 2002; Garcia-Alonso & Vizziano, 2004). No estudo realizado com a corvina da espécie *Micropogonias furnieri* ([Perciformes: Sciaenidae](#)), foram utilizadas três doses de hCG (100, 300 e 500 UI por Kg de peixe) sendo que a maturação dos ovócitos foi atingida 48 horas após o tratamento com 300 e 500 UI de hCG, e 72 horas após o tratamento na dosagem de 100 UI de hCG (Garcia-Alonso & Vizziano, 2004). Em trabalho realizado com a espécie *Brycon insignis* (Characiformes:Characidae) (piabanha) mantida em cativeiro, os peixes foram submetidos em três tratamentos com diferentes doses e combinações de hCG para indução à desova. Os peixes mostraram uma melhor desova com uma única dose de 5 UI de hCG que os outros grupos (Talmelli et al, 2002).

Para se obter sucesso na desova, devem ser conhecidos a técnica utilizada para induzir a ovulação, a ação do hormônio, e o tipo de peixe que está sendo trabalhado. Dessa forma, a literatura descreve a ação de alguns hormônios já utilizados, como é o caso do LHRH, que estimula o desenvolvimento ovocitário e a desova em várias espécies. As dosagens com o LHRH podem variar de 1 a 5 mg/kg quando forem aplicados por via intracelomática ou intramuscular no peixe. Essas dosagens podem ser até dez vezes menores se forem aplicadas diretamente nas regiões intracraniais. Uma forma análoga do LHRH, modificada em seu grupo de aminoácidos, visa tornar essa substância mais potente, permitindo um efeito mais prolongado das gonadotrofinas no órgão reprodutor da fêmea (Baldisserotto, 2002).

Porém, a técnica mais utilizada pelas pisciculturas e com menor gasto financeiro, é o extrato de hipófise de carpa-comum (Szabó, 2003). No presente experimento também se utilizou hipófise de carpa-comum pelos motivos anteriormente citados. A metodologia de indução à desova seguiu a rotina adotada na Piscicultura da Prata (Eugenópolis/MG), adaptada a partir de Woynarovich & Horvath (1980). Esses pesquisadores utilizaram extrato bruto de hipófise de carpa-comum na dose de 6 mg/kg para induzir a ovulação, uma vez que os mesmos relatam que espécies de pequeno porte respondem com uma única injeção. Nesse experimento, diferentemente da metodologia proposta por esses autores, foram utilizadas duas injeções; porém, a porcentagem de fêmeas que respondeu positivamente é semelhante à utilização de uma única dose, como relatado por Miranda (1996), Drummond (1996) e Sato (1999).

A resposta à aplicação de diferentes hormônios que induzem a liberação de gonadotrofinas, assim como o extrato de hipófise, pode variar de espécie para espécie. Dessa forma, o ajuste nos níveis hormonais a serem utilizados deve evitar a inibição da ovulação com conseqüente perda dos reprodutores (Zaniboni Filho & Barbosa, 1996).

Na técnica de hipofisação, as hipófises são extraídas de peixes doadores (carpa-comum) na época imediatamente anterior à desova, justamente para coincidir com os altos níveis das gonadotrofinas (Baldisserotto, 2002).

Nos processos rotineiros com extrato de hipófise, segundo Woynarovich & Horvath (1980), as fêmeas recebem geralmente duas doses, sendo a primeira dose introdutória avaliada em 10% da segunda, que é a dose decisiva ou final. Para se determinar a dose a ser injetada, devem-se considerar o sexo, o peso e o estágio de maturação dos peixes. Esses autores também afirmam que com a administração de uma dose de hormônio as horas-grau serão altas, e que quanto menores forem as fêmeas mais rápida será a ovulação.

Utilizando uma única dosagem, Drummond (1996) obteve 300 horas-grau para a desova em *A. bimaculatus lacustris*, enquanto Miranda (1996) utilizando a mesma espécie registrou 305-312 horas-grau. No presente trabalho, a desova ocorreu mais rapidamente devido à utilização de duas doses, concordando com Woynarovich & Horvath (1980). A desova no presente

estudo ocorreu por volta de nove horas após aplicação da segunda injeção hormonal, com a temperatura da água variando entre 25 e 26°C, perfazendo um total de 225 a 234 horas-grau após a hipofiseção.

As fêmeas que ovularam foram separadas daquelas que não responderam positivamente ao estímulo com extrato bruto de hipófise. Os peixes que não responderam à ação hormonal apresentaram ovários volumosos, ovócitos em várias fases de desenvolvimento e raros folículos pós-ovulatórios, como também observado em *Astyanax bimaculatus lacustris* por Miranda (1996) e Drummond (1996). Nas fêmeas que ovularam, observou-se que após desova induzida o ovário mostrava a presença de lamelas ovulíferas com ovócitos em diferentes estádios de desenvolvimento, folículos pós-ovulatórios e folículos atrésicos.

## 5.2. Morfologia dos ovários

Os ovários das fêmeas *Astyanax bimaculatus* seguem os padrões descritos para a maioria dos teleósteos, sendo órgãos pares, alongados e foliáceos, sofrendo modificações na espessura, volume e coloração durante as diferentes fases do ciclo reprodutivo, conforme observado também em outras espécies do gênero (Drummond, 1996; Miranda, 1996; Melo et al., 2005; Mazzoni et al., 2005; Rodrigues et al., 2005). Nesses peixes, o ovário é do tipo cistovariano, onde o lume ovariano se estende até o oviduto, como na maioria dos peixes teleósteos (Nagahama, 1983; Connaughton & Aida, 1998; Selman & Wallace, 1986).

Nas observações histológicas do ovário de *Astyanax bimaculatus*, verificaram-se ovários envolvidos externamente por uma serosa peritoneal, constituída por mesotélio e lâmina do tecido conjuntivo fibroso (Fig. 13). Profundamente a essa estrutura, observa-se túnica albugínea de natureza conjuntiva, contendo fibrócitos e vasos sanguíneos (Fig. 14). A túnica albugínea emite septos para o interior do órgão, formando lamelas ovulíferas, nas quais encontram-se ovogônias e ovócitos em diferentes fases de desenvolvimento (Figs. 14 a 17). No lambari, o tipo de desenvolvimento ovocitário é assincrônico, com a presença de ovócitos em diferentes estádios

de desenvolvimento (Figs. 13 a 17), o que foi também observado por Miranda (1996), Drummond (1996) e Pereira Filho (2000).

Nos ovários onde predominam ovócitos primários, uma quantidade razoável de tecido conjuntivo se mantém entre os ovócitos em desenvolvimento. Nos ovários em que a maioria dos ovócitos encontra-se em vitelogenese avançada, a visualização do tecido conjuntivo do estroma ovariano é dificultada pelo tamanho que estes ovócitos atingem.

O processo de desenvolvimento dos ovócitos parece ser o mesmo para as diferentes espécies de teleósteos, observando-se variações na estrutura do ovócito, como diâmetro, características do núcleo, camadas envoltoras, composição e distribuição do vitelo. Quando maduros, os ovócitos são eliminados e surgem os folículos pós-ovulatórios no estroma ovariano. No presente trabalho, observou-se grande quantidade de folículos pós-ovulatórios nas primeiras horas após a desova induzida como também relatado por Miranda (1996), Drummond (1996), Pereira Filho (2000) e Santos et al. (2003).

O epitélio que envolve a lamela ovulígera de *A. bimaculatus* possui células pavimentosas e cúbicas (Fig. 18).

Quando se inicia a ovogênese, dois tipos celulares originados do tecido epitelial ovariano migram em direção ao estroma, as células somáticas (pré-foliculares) e as células gametogênicas (ovogônias) (Figs. 18 e 19).

As ovogônias organizadas em ninhos ou encontradas isoladamente são envoltas por células epiteliais (Figs. 19 e 20) e por uma membrana basal que as separam do estroma ovariano, para mais tarde se tornarem ovócitos (Grier et al., 2007). Estas células se caracterizam por possuírem formas arredondadas, citoplasma reduzido e pouco basófilo, núcleo grande com nucléolo único e central (Figs. 18 a 21). As ovogônias se multiplicam por mitose e entram em meiose, permanecendo “estacionadas” em prófase I (diplóteno) e seguem nessa fase da divisão celular até o momento pré-ovulatório (Wallace & Selman, 1981). Em estudos utilizando microscopia eletrônica, foi observado no escasso citoplasma das ovogônias, muitas mitocôndrias e pequena quantidade de retículo endoplasmático rugoso (Benjamim, 2004). Com isso, pode-se inferir a baixa síntese protéica apresentada por estas células, mesmo com nucléolo desenvolvido (Grier, 2000; Guimarães & Quagio-Grassiotto, 2001). Como nos demais teleósteos (Bazzoli

& Riizzo, 1990; Chini et al., 2001; Guimarães & Quagio-Grassiotto, 2001; Ravaglia & Maggese, 2003), as ovogônias de *A. bimaculatus* são as menores células da linhagem germinativa feminina.

As células epiteliais que envolvem as ovogônias (Figs. 18 a 22) são designadas células pré-foliculares e se tornarão as células foliculares que, segundo Grier (2002), serão responsáveis pela formação da zona radiata. Outras células de origem do estroma também passarão a fazer parte do folículo ovariano, formando a teca, que envolve mais externamente o ovócito.

Em estudo *in vitro* utilizando hormônios esteróides sexuais, demonstrou-se que os hormônios  $17\beta$ -estradiol e o  $17\alpha,20\beta$ -DHProgesterona induzem o crescimento das ovogônias nos ovários do peixe japonês *Hucho perryi* ([Salmoniformes: Salmonidae](#)). Esses hormônios têm funções importantes na proliferação das ovogônias e na ovogênese (Higashino et al., 2003), marcando o início da prófase I da meiose, levando à formação do complexo sinaptonêmico (Grier, 2002; Ravaglia & Maggese, 2003), que indica início do desenvolvimento dos ovócitos primordiais.

No ovário do lambari *Astyanax bimaculatus*, foram verificadas células com características que as diferenciaram das ovogônias iniciais (Fig. 21). Estas células são maiores, com citoplasma volumoso, núcleo grande e esférico, e nucléolo evidente. Esta etapa do desenvolvimento ovocitário pode ser considerada uma fase intermediária entre as menores células (ovogônias) (Figs. 18 a 22) e os ovócitos em desenvolvimento primário (Fig. 18). Alguns autores consideram essa etapa como ovogônias; porém, segundo Grier (2002), esta interpretação está incorreta e estas células são, agora, denominadas de ovócitos primordiais. Nessa etapa os ovócitos podem ser encontrados isolados ou em ninhos, envoltos por camada única de células foliculares pavimentosas e membrana basal que os separa do estroma ovariano. Essa organização é denominada folículo ovariano (Wallace & Selman, 1981; Grier, 2000 e 2002; Ravaglia & Maggese, 2003; Yanagimoto & Humphreys, 2005).

De acordo com as características morfológicas observadas ao longo da ovogênese, o desenvolvimento ovocitário de *Astyanax bimaculatus* do presente estudo foi dividido em duas etapas: desenvolvimento primário e secundário.

### 5.2.1. O desenvolvimento primário

O desenvolvimento ovocitário primário em *Astyanax bimaculatus* foi subdividido em dois estádios para facilitar o estudo: desenvolvimento ovocitário primário inicial e avançado.

Nesse estágio, os ovócitos possuem citoplasma fortemente basófilo, núcleo esférico, nucléolos dispersos pelo nucleoplasma, e estão envoltos por células foliculares pavimentosas (Figs. 23, 24 e 25). A presença de vários nucléolos e o aumento dessas estruturas nesse estágio, proporciona aumento no volume do citoplasma, devido à passagem de RNA ribossomal (rRNA) através dos complexos de poros do envoltório nuclear. Em estudo conduzido por Prisco et al. (2004), na espécie *Torpedo marmorata* (Torpediniformes: Torpedinidae), constatou-se a presença de nucléolos nas fases iniciais, organizado na forma de redes de fibrilas e grânulos. Os grânulos de rRNA foram marcados com grãos de prata, o que permitiu evidenciar o mesmo material do nucleoplasma no citoplasma do ovócito, o que está de acordo com Wallace & Selman (1981), ao relatarem que em teleósteos o material nucleolar se espalha no citoplasma para que ocorra uma intensa síntese de RNA e proteínas, resultando em um aumento do citoplasma como relatado por Prisco et al. (2004), e também observado no presente trabalho com *A. bimaculatus*.

No trabalho realizado por Motta et al. (2005), foi notado no envoltório nuclear de ovócitos da espécie *Trematomus lepidorhinus* (Perciformes: Nototheniidae), da Antártida, a presença de uma membrana de contorno uniforme e sem irregularidades, igualmente observado para alguns peixes teleósteos tropicais (Chini et al., 2001; Garcia et al., 2001; Motta et al., 2005). No presente estudo, a membrana que envolve o núcleo do ovócito de *Astyanax bimaculatus* possui contorno uniforme, sem irregularidades, nesse estágio de desenvolvimento (Figs. 23, 24 e 25).

Em muitos teleósteos ocorre o aparecimento do núcleo vitelínico que termina por se dispersar pelo citoplasma (Benjamin, 1996; Tyler & Sumpter, 1996; Garcia et al., 2001; Motta et al., 2005). Esse tipo de estrutura, como relatado em estudos ultra-estruturais (Wallace & Selman, 1981; Drummond, 1996), é formado por agregados de ribonucleoproteínas associadas com organelas citoplasmáticas como mitocôndrias, retículo endoplasmático e elementos de Golgi. Ovócitos primários de *Astyanax bimaculatus lacustris* e de

*A. fasciatus* mostraram a presença do núcleo vitelínico se dispersando pelo citoplasma (Drummond, 1996; Garcia et al., 2001). No estágio de desenvolvimento primário inicial do presente estudo, também foi observada a presença do núcleo vitelínico (Fig. 25). Diferentemente, Pelizaro et al. (1981) não observaram núcleo vitelínico na espécie *Astyanax bimaculatus* por eles estudada.

Em *Astyanax bimaculatus* o volume do citoplasma dos ovócitos aumenta e adquire aspecto granular, e observa-se uma diminuição na relação núcleo/citoplasma (Fig. 26). Essa etapa do desenvolvimento foi classificada como estágio de desenvolvimento ovocitário primário avançado, onde se observa maior diâmetro ovocitário em relação à etapa anterior (Tabela 1).

Em alguns peixes antárticos, Motta et al. (2005), verificaram no início do desenvolvimento ovocitário a presença do núcleo com um único nucléolo grande e esférico. Com o desenvolvimento, o nucléolo se fragmenta e forma vários nucléolos associados ao envoltório do núcleo. Na espécie *Trematomus lepidorhinus*, o nucléolo se fragmenta e se dispersa em todo o nucleoplasma, igualmente observado no peixe neotropical *Astyanax bimaculatus* (Fig. 26). O envoltório nuclear mostra um contorno irregular com vários nucléolos na região central e também periféricamente no nucleoplasma (Fig. 26).

Nesse momento, evidenciou-se a presença de granulações grosseiras dispersas por todo o citoplasma (Fig. 26), que representam a fragmentação do núcleo vitelínico. Esse evento também foi relatado por Garcia et al. (2001), onde se observaram as mesmas características na espécie *Astyanax fasciatus*.

Durante o desenvolvimento primário avançado, a camada de células foliculares é pavimentosa, com o núcleo elíptico (Fig. 26). Entre as células foliculares e o ooplasma, aparece a zona radiata como uma fina camada homogênea PAS+ (Fig. 26). No final do desenvolvimento primário avançado, forma-se o complexo folicular, constituído pelo ovócito envolvido por zona radiata, camada de células foliculares, membrana basal e teca (Grier, 2002).

### **5.2.2. O desenvolvimento secundário**

O desenvolvimento ovocitário secundário em *Astyanax bimaculatus* foi subdividido em três estádios: desenvolvimento ovocitário secundário inicial, intermediário e avançado.

No estágio de desenvolvimento ovocitário secundário inicial, o volume citoplasmático aumenta mais em relação ao núcleo (Figs. 27, 28 e 33), e o ovócito neste estágio possui um diâmetro maior que estágio anterior (Tabela 1). O núcleo é central, ligeiramente acidófilo, com nucléolos pequenos e dispersos pelo nucleoplasma, e o citoplasma é granular e fracamente basófilo (Figs. 27, 28 e 33).

Em seguida, ocorre a formação de vesículas pequenas e claras na periferia do citoplasma ovocitário de *Astyanax bimaculatus* (Figs. 27 e 28 e 33). Essas vesículas são denominadas de vesículas corticais, e também foram observadas em *Astyanax fasciatus* (Garcia et al., 2001), em *Astyanax bimaculatus lacustris* (Miranda, 1996; Drummond, 1996) e em vários outros teleosteos neotropicais de água doce (Bazzoli, 1992; Bazzoli & Godinho, 1994). Observações sobre o local onde as vesículas corticais surgem também foram relatadas na espécie *Tilapia zilli* (Perciformes:Cichlidae) (Coward & Bromage, 1998), onde se observou que as mesmas são inicialmente observadas no ooplasma periférico.

As vesículas corticais aumentam em quantidade e tamanho, se fundem e formam os alvéolos corticais (Figs. 29 a 32). Esses alvéolos corticais não responderam às colorações feitas com hematoxilina-eosina, azul de toluidina pH 4,0 (Figs. 29, 30 e 32), mas coraram com azul de toluidina em pH neutro (Fig. 31) e fracamente em pH 0,5. A morfologia e o conteúdo dos alvéolos corticais de *A. bimaculatus* é similar àquela descrita por Bazzoli & Godinho (1994) e Garcia et al. (2001), que estudaram estas estruturas, detectando glicoconjugados ácidos carboxilados e glicoproteínas neutras, conteúdos relacionados com a fertilização do ovócito e com o bloqueio da polispermia.

Na seqüência, ocorre um aumento no diâmetro do ovócito (Tabela 1) e inicia-se a deposição de vitelo a partir da região periférica (Fig. 29, 34 e 35), o que permitiu classificar esse estágio como desenvolvimento secundário intermediário. O local de surgimento dos glóbulos de vitelo difere entre os peixes. Em *Crinodraco hamatus* (Perciformes:[Channichthyidae](#)), um peixe do continente Antártico, o glóbulos de vitelo surgem próximos ao núcleo (Motta, 2005). Em outro peixe antártico, *Trematomus hansonii* (Perciformes: [Nototheniidae](#)), os glóbulos de vitelo surgem como duas camadas protéicas que foram evidenciadas pela técnica com sais de prata, sendo uma camada

próxima ao núcleo e outra próxima à periferia do citoplasma ovocitário (Motta et al., 2005). O surgimento do vitelo em diferentes regiões do citoplasma do ovócito parece indicar diferentes vias de síntese, ou seja, glóbulos de vitelo que surgem próximos ao núcleo indicam via de síntese endógena (Shackley and King, 1979, citados por Motta et al., 2005).

O vitelo resulta do processamento da vitelogenina, uma proteína que é sintetizada nos hepatócitos de fêmeas sob ação de estrógenos e transportada para o ovário através da corrente sanguínea, sendo incorporada no ovócito por micropinocitose seletiva (Selman & Wallace, 1989; Ribeiro et al., 2006).

A zona radiata é mais desenvolvida nessa etapa, sendo observadas duas camadas que reagem diferentemente ao PAS. A camada interna é fracamente positiva e a externa, mais fortemente positiva (Figs. 34 e 35), o que indica a presença de polissacarídeos neutros. O conteúdo da zona radiata é semelhante a muitos peixes teleósteos estudados (Bazzoli, 1992; Garcia et al., 2001; Chini et al., 2001). Estudando quatro espécies de peixes de interesse comercial, da ordem Characiformes, Sampaio (2006) relatou que a zona radiata externa contém polissacarídeos neutros (PAS+) e carboxilados (ácidos) (Alcian Blue + em pH 2.5), enquanto a zona radiata interna apresentou polissacarídeos neutros (PAS+), característico de ovos não-adesivos. Nesse momento do desenvolvimento secundário inicial, a zona radiata apresenta um contorno irregular, sendo pregueada em algumas regiões da circunferência do ovócito (Fig. 29). A superfície da zona radiata em muitos peixes teleósteos varia em sua estrutura e organização, o que determina se os ovos são adesivos ou não adesivos, conforme a estratégia reprodutiva que pode ser migratória ou não. Em alguns peixes Characiformes e Siluriformes, a zona radiata possui protuberâncias próximas ao pólo animal; em outros peixes, a zona radiata tem rede de fibrilas, vilos que se projetam da zona radiata, filamentos associados à zona radiata e canais-poros que se comunicam com o citoplasma do ovócito (Rizzo et al., 2002). A zona radiata de *Astyanax bimaculatus* já foi estudada em microscópio eletrônico por Rizzo et al. (2002). Os autores verificaram a presença de canais-poros ao longo da zona radiata, e também o caracterizaram como ovócito do tipo fracamente adesivo. No presente estudo, essas estruturas não foram analisadas, mas foram observadas estrias ao longo da zona radiata em microscópio de luz.

Durante o desenvolvimento secundário intermediário, pôde-se evidenciar o início da formação do aparelho micropilar. O canal micropilar se apresenta como uma depressão em forma de funil na zona radiata, e é ocupado pela célula folicular modificada esférica, com núcleo basófilo e citoplasma acidófilo (Figs. 33 a 35), concordando com as observações de Ricardo et al. (1996).

Nos lambaris do presente estudo, a célula micropilar pode ser evidenciada nos ovócitos em desenvolvimento ovocitário secundário inicial (Fig. 33), mas o aparelho micropilar só se apresentará totalmente desenvolvido em ovócitos em desenvolvimento ovocitário secundário avançado (Figs 36 e 37), concordando com as observações feitas por Drummond (1996) e Garcia et al. (2001).

As células foliculares que envolvem o ovócito nesse momento podem apresentar-se cúbicas ou pavimentosas (Fig. 35), discordando da observação feita por Drummond (1996), onde as células foliculares apresentaram-se pavimentosas durante todo o desenvolvimento ovocitário. Dessa forma, a evidência de células foliculares cúbicas poderia facilitar a transformação parcial do nutriente vindo do sangue destinado à nutrição do ovócito (Houillon, 1972, citado por Drummond, 1996). Células foliculares pavimentosas não metabolizam ao mesmo nível das células foliculares cúbicas, cabendo mais esforço para transformar o nutriente oriundo do sangue em vitelo (Chaves e Vazzoler, 1984, citado por Drummond, 1996).

No estágio de desenvolvimento ovocitário secundário avançado, o volume citoplasmático aumenta mais em relação ao núcleo (Figs. 30 a 32), tendo o ovócito neste estágio, um diâmetro maior (Tabela 1) quando comparado aos estádios anteriores.

Nessa etapa do desenvolvimento, o vitelo foi se espalhando por todo citoplasma (Figs. 30 a 32). O mesmo foi notado em *Astyanax fasciatus* (Garcia et al., 2001). Os ovócitos maduros de *Astyanax bimaculatus* passam por modificações morfológicas que fazem com que seu aspecto se altere completamente. O citoplasma torna-se preenchido com vários glóbulos de vitelo, os quais têm forma esférica e não se fundem para formar uma massa homogênea (Figs. 28, 30 a, 32, e 35 a 37), como observado em *Astyanax bimaculatus lacustris* (Drummond, 1996; Miranda; 1996) e também em outros

peixes teleósteos neotropicais de água doce (Bazzoli, 1992; Bazzoli & Godinho, 1994; Chini et al., 2001). Em peixes ovovivíparos da família Poeciliidae (Ordem Cyprinodontiformes), o citoplasma é ocupado por uma massa homogênea, resultante da fusão dos glóbulos de vitelo, como é o caso em *Lebistes reticulatus*, (Droller & Roth, 1966), *Xiphophorus helleri* (Azevedo, 1976) e *Xiphophorus maculatus* (Benjamin, 2004). Esse padrão de organização do vitelo pode estar relacionado com o ambiente ou estratégia reprodutiva, uma vez que o lambari é espécie ovípara e de desova parcelada.

A análise histoquímica dos ovócitos vitelogênicos de *Astyanax bimaculatus* mostra que os glóbulos de vitelo contêm proteínas, corando-se fortemente com hematoxilina-eosina e azul de toluidina em pH 6.5 (Figs. 30, 31, 36 e 37). Na técnica com PAS/metanil-amarelo a reação foi positiva ao metanil-amarelo, o que demonstra a presença de proteínas. Reação positiva ao PAS foi demonstrada por Sampaio (2006) ao estudar quatro espécies da ordem Characiformes. Em *Astyanax fasciatus* (Garcia et al, 2001), as reações citoquímicas para identificação dos glóbulos de vitelo responderam positivamente aos métodos de Coello e ao Fast Green, o que indica a presença de proteínas totais e polissacarídeos no citoplasma, assim como na espécie *Leporinus striatus* (Characiformes: Anostomidae) analisado por Chini et al. (2001). No presente trabalho, a reação histoquímica para os glóbulos de vitelo foi negativa em azul toluidina em pH 0.5, e positiva em azul de toluidina em pH 4.0 demonstrando a detecção de polissacarídeos ácidos.

A zona radiata é mais espessa nesse estágio se comparada aos estádios anteriores, e apresenta um aspecto mais homogêneo ao redor do ovócito (Fig.30). O aumento na espessura da zona radiata em ovócitos de espécies ovíparas indicaria proteção às adversidades do ambiente no qual se encontra (Bazzoli & Godinho, 1994). Por outro lado, zona radiata delgada pode estar relacionada à viviparidade (Azevedo, 1976; Riehl & Greven, 1990; Riehl & Greven, 1993), em que o embrião desenvolve em ambiente protegido (Riehl & Greven, 1993) e também facilitaria uma troca mais efetiva de gases.

As células foliculares mantêm-se pavimentosas. Nesse estágio, o aparelho micropilar já está completo, e o núcleo migra para o pólo animal, em direção a ele (Figs. 31 e 36). Quando o núcleo do ovócito migra para o pólo animal, ocorre a desintegração do seu envoltório e o espalhamento do seu

conteúdo no citoplasma. No final da maturação ovocitária, os cromossomos remanescentes continuam até a segunda metáfase da meiose, onde estacionam novamente (Grier, 2002).

Em trabalho realizado por Holland et al (1998) com fêmeas da espécie *Morone saxatilis* (Perciformes:Moronidae), conhecido como “Striped Bass”, os peixes foram tratados com hormônios testosterona (T) e combinação de T + GnRHα. Nesse estudo, não foram evidenciadas alterações morfológicas ovarianas e nem nos ovócitos ao longo dos 145 dias de experimento. No presente trabalho não foram observadas diferenças morfológicas nos diferentes estádios de desenvolvimento ovocitário, seja no grupo-controle seja no grupo tratado com hormônio de crescimento, confirmando o padrão de desenvolvimento ovocitário em teleósteos.

### **5.2.3. Morfometria dos ovócitos**

O aumento no diâmetro do ovócito observado no decorrer do desenvolvimento se deve principalmente ao acúmulo de vitelo, e foi acompanhado por meio da mensuração de ovócitos esféricos, íntegros e com corte passando pelo núcleo. No entanto, em estádios finais de desenvolvimento, 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, caso não seja observado o núcleo no ovócito a ser mensurado (Kobayashi & Iwamatsu, 2002; Benjamin, 2004). Os valores médios e desvios-padrão do diâmetro do ovócito estão expressos na tabela 1. Os valores encontrados são semelhantes àqueles encontrados por Miranda (1996) e Drummond (1996) para *A. bimaculatus lacustris*, e Melo et al. (2005) para *Astyanax scabripinnis*.

Os envoltórios dos ovócitos de *A. bimaculatus* também se modificam, acompanhando o desenvolvimento ovocitário. Assim, foi observado que a espessura da zona radiata aumentou com o desenvolvimento do ovócito. Porém, a obtenção de medidas confiáveis de sua espessura utilizando microscopia de luz é difícil, situação válida também para a membrana basal, cuja espessura varia ao longo do desenvolvimento ovocitário, como mostrou Benjamin (2004) utilizando-se de micrografias eletrônicas para a obtenção de tais valores.

### **5.3. Recuperação ovariana**

#### **5.3.1. Dinâmica do desenvolvimento ovocitário nos grupos experimentais**

Os ovócitos primários iniciais foram encontrados em maior número que os demais estádios nos ovários dos animais, seja no grupo-controle seja no grupo tratado (Gráfico 1). A quantidade média de ovócitos primários iniciais encontrados no grupo-controle foi superior ao grupo tratado; porém, não se constatou diferença significativa ( $P>0,05$ ) para as contagens totais (Gráfico 1). No entanto, a contagem desses ovócitos ao longo do período experimental mostrou que os valores para o grupo-controle foram sempre superiores ao grupo tratado. Porém, os maiores foram registrados nos períodos de nove e 12 horas no grupo-controle, enquanto no grupo tratado com hormônio de crescimento os valores foram semelhantes ao longo do período experimental (Gráfico 2).

No estágio de desenvolvimento primário avançado a quantidade de ovócitos foi menor em relação ao estágio anterior (Gráfico 1). A quantidade média de ovócitos primários avançados encontrados no grupo-controle foi superior ao grupo tratado; entretanto, não foi constatada diferença significativa ( $P>0,05$ ) para as contagens totais (Gráfico 1). Entretanto, maiores valores para a contagem dos ovócitos em desenvolvimento primário avançado no grupo tratado em relação ao grupo-controle foram registrados somente às 3, 9, 18 e 24 horas pós-desova (Gráfico 3).

A quantidade de ovócitos em desenvolvimento secundário inicial com vesículas corticais foi inferior aos valores registrados para os demais estádios de desenvolvimento (Gráfico 1). Observou-se, também, que a contagem média desses ovócitos no grupo tratado foi maior que no grupo-controle, mas não se constatou diferença significativa ( $P>0,05$ ) para as contagens totais (Gráfico 1). A contagem dos ovócitos em desenvolvimento secundário inicial com vesículas corticais no grupo tratado permaneceu superior em quase todos os períodos analisados, exceto nos períodos de 18, 72 e 120 horas que mostraram maiores valores para o grupo-controle (Gráfico 4).

O número de ovócitos em desenvolvimento secundário intermediário com início de deposição de vitelo somente não foi inferior ao número de ovócitos secundários iniciais com vesículas corticais (Gráfico 1). Nesse estágio

de desenvolvimento, o valor médio da contagem dos ovócitos foi maior no grupo tratado que no grupo-controle, não se constatando diferença significativa ( $P>0,05$ ) para as contagens totais (Gráfico 1). Porém, observou-se que no grupo tratado a quantidade de ovócitos foi superior ao grupo-controle nos períodos de 3, 6, 18, 24, 72, 96 e 120 horas pós-desova, sendo inferior ao grupo-controle somente nos períodos de 9, 12 e 48 horas pós-desova (Gráfico 5).

Para os ovócitos em desenvolvimento secundário avançado com glóbulos de vitelo em todo o citoplasma, o valor encontrado foi superior àqueles registrados para ovócitos secundários iniciais e intermediários, e foi maior no grupo tratado que no grupo-controle (Gráfico 1), sem contudo se constatar diferença significativa ( $P>0,05$ ) entre os grupos experimentais. Valores superiores do grupo-controle em relação ao tratado somente foram observados às 24, 96 e 120 horas pós-desova (Gráfico 6).

No grupo tratado com hormônio de crescimento observou-se menor quantidade de ovócitos primários iniciais e avançados em relação ao grupo-controle, enquanto nos estádios de desenvolvimento secundário a quantidade de ovócitos foi maior no grupo tratado que no grupo-controle (Gráficos 1 a 6). Segundo Chatterjee et al. (1997), o desenvolvimento dos ovócitos é um fenômeno hormônio-dependente. Em estudo conduzido para se avaliar o impacto do carbofuran sobre maturação dos ovócitos na espécie *Heteropneustes fossilis* (Siluriformes: Heteropneustidae) (catfish), os autores observaram que o número de ovócitos foi afetado pelo carbofuran, sendo registrado maior número de ovócitos iniciais no grupo tratado em relação ao grupo-controle. O carbofuran pode inibir o aumento da taxa de ovócitos em fases avançadas por inibir a síntese de vitelogenina. (Chatterjee et al, 1997). O tratamento com hormônio de crescimento pode estar influenciando a produção das gonadotropinas e o desenvolvimento dos ovócitos, visto que uma maior quantidade de ovócitos em vitelogênese foi encontrada nos ovários de *Astyanax bimaculatus* que receberam a dose de GH. No presente estudo pôde-se verificar que não houve perda na produção de ovócitos no grupo tratado com o hormônio de crescimento ao longo do período experimental se comparado com o grupo-controle (Gráficos 1 a 6). Dessa forma, mais estudos devem ser realizados para confirmação dos níveis hormonais que podem

influenciar diretamente no desenvolvimento ovocitário. Para isso, seria necessário analisar os níveis plasmáticos das diferentes substâncias que são importantes no processo de ovogênese e vitelogênese. Esse tipo de estudo é de grande importância para se avaliar impactos proporcionados por diferentes tratamentos sobre a produção de ovos e que poderiam interferir na reprodução desses animais (Chatterjee et al, 1997) e também na recuperação ovariana.

### **5.3.2. Atresia folicular**

A atresia folicular é um processo frequentemente observado nos ovários dos vertebrados (Saidapur, 1978). Em *A. bimaculatus*, a atresia folicular foi freqüentemente observada. Porém, para o entendimento desse evento, as alterações morfológicas observadas durante a atresia foram comparadas com as características de ovócitos normais.

Durante esse processo, os ovócitos regridem, passando por várias fases de degeneração e reabsorção (Figs. 38 a 45). O processo de atresia é caracterizado por uma série de eventos seqüenciais, que culminam com a reabsorção total e desaparecimento do ovócito. Dependendo da forma que os diferentes autores estudam esse processo, ele pode ser dividido em várias etapas (Lambert, 1970; Bazzoli & Rizzo, 1995; Rizzo & Bazzoli, 1995; Miranda et al., 1999). Os fatores que levam à atresia podem ser ambientais ou fisiológicos. Dessa forma, a atresia folicular pode ser induzida por fatores como estresse, agentes biocidas, temperatura, luz, alimentação inadequada, confinamento e níveis hormonais (Nagahama, 1983; Guraya, 1986)

No lambari *Astyanax bimaculatus* deste estudo, o processo de atresia foi semelhante ao descrito por Miranda et al. (1999), Munoz et al. (2002); Melo et al. (2005) e Santos et al. (2005). A maior freqüência de atresia foi observada em ovócitos vitelogênicos aqui designados como ovócitos em crescimento secundário avançado. Observações semelhantes foram feitas por Drummond (1996) em *A. bimaculatus lacustris*, e Melo et al. (2005) em *A. scabripinnis*.

O processo da atresia que ocorre nos ovócitos secundários é do tipo hipertrófico devido à hipertrofia e hiperplasia das células foliculares (Vizziano & Berois, 1990). Pôde-se observar ocorrência de atresia tanto nos estádios de desenvolvimento secundário inicial quanto, principalmente, no desenvolvimento secundário avançado.

A atresia inicial é caracterizada pela descontinuidade da camada externa da zona da radiata, fendas na camada interna da zona radiata e hipertrofia das células foliculares (Figs. 38-42). Nesse momento da atresia, foram evidenciadas células eosinófilicas entre a membrana basal e células da teca (Figs. 42 e 43). Durante os processos de atresia, a zona radiata, PAS positiva, perde essa positividade, apresentando reatividade ao metanil amarelo em colorações com PAS+metanil amarelo (Figs. 40 e 41), o que poderia indicar modificação do conteúdo dessa estrutura.

Na seqüência do processo de atresia, ocorre o início da fusão e liqüefação dos glóbulos de vitelo, desintegração e fragmentação da zona radiata, hipertrofia das células foliculares que se tornam vacuolizadas e contêm material granular de aspecto similar aos glóbulos de vitelo, e invasão do citoplasma pelas células foliculares (Figs. 44-49). Na atresia avançada, células foliculares engolfam os resíduos finais do ovócito, levando a uma diminuição do tamanho do folículo atrésico (Figs. 50 e 51).

O processo final da atresia não foi documentado no presente experimento. A regressão total dos folículos foi registrada por Miranda (1996), que relata um período de seis meses em *A. bimaculatus lacustris*, e de quatro meses em *Leporinus reinhardti*. Os processos finais ou avançados da atresia mostram uma contínua diminuição do tamanho do folículo atrésico, aparecimento de grânulos castanho-amarelados e permanência no ovário por longos períodos (Bazzoli & Rizzo, 1995; Rizzo & Bazzoli, 1995; Rizzo & Bazzoli, 1997; Miranda et al., 1999). No presente estudo, essas características não foram observadas.

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). A reabsorção do vitelo foi evidenciada por Bazzoli & Rizzo (1995) estudando a espécie *A. bimaculatus lacustris*. Eles verificaram que as células foliculares dos ovócitos vitelogênicos incorporaram o azul de tripan injetado na circulação, através do fenômeno de granulopexia, muito conhecido nos macrófagos. Em folículos atrésicos dos peixes da espécie *Acipenser transmontanus* (Acipenseriformes: Acipenseridae) (white sturgeon), Linares-Casenave et al. (2002) verificaram que as células foliculares hipertrofiam e fagocitam o

envelope vitelínico do ovo permitindo a invasão do citoplasma por essas mesmas células. Nos processos tardios, foram observados linfócitos infiltrando a teca e, segundo esses autores, essas células podem participar da fase final de reabsorção ovocitária. Além disso, notaram a diminuição dos níveis plasmáticos de estradiol, testosterona e vitelogenina que são coincidentes com o início do processo de atresia daqueles ovócitos que não desovaram. Essas observações sugerem que as células eosinofílicas e as células foliculares poderiam participar do processo de atresia logo após a desova do lambari.

No grupo tratado foi registrado maior número de folículos atrésicos em relação ao grupo-controle (Gráficos 7 e 8). Além disso, verificou-se que os eventos de atresia inicial foram registrados em maior número que eventos de atresia intermediária e avançada (Gráfico 8). A atresia foi observada em maior intensidade entre nove e 48 horas após a desova no grupo tratado, e no grupo-controle às 18 e 24 horas (Gráfico 7). Diferenças estatísticas ( $P < 0,05$ ) foram registradas somente entre os períodos experimentais 18 e 120 horas e entre 24 e 120 horas no grupo-controle. No grupo tratado, somente foram registradas diferenças estatísticas ( $P < 0,05$ ) entre os períodos experimentais de 12 e 96 horas. Quando se comparou a ocorrência de atresia entre os grupos experimentais, foram verificadas diferenças ( $P < 0,05$ ) somente às seis e às 48 horas. Não foram registradas diferenças estatísticas ( $P > 0,05$ ) para a contagem total de folículos atrésicos entre os grupos experimentais.

Não se constataram diferenças significativas ( $P > 0,05$ ) para a contagem de eosinófilos entre os diferentes horários propostos para coleta dentro dos grupos controle e tratado. Diferenças entre os grupos experimentais ( $P < 0,05$ ) ocorreram às seis, 48 e 120 horas. A contagem total de eosinófilos foi significativamente superior no grupo tratado em relação ao grupo-controle ( $P < 0,05$ ).

O teste de correlação de Pearson mostrou correlação positiva ( $r = 0,68$ ) quando se considerou o número de eosinófilos associados aos folículos atrésicos entre o grupo-controle e o grupo tratado ao longo do período experimental, apesar de mostrar diferença significativa ( $P < 0,05$ ) quando as médias foram comparadas.

O estresse causado no manejo dos peixes pode ter sido a principal causa da ocorrência da atresia, observado em maior quantidade no grupo

tratado. Em função disso, foi registrada maior quantidade de eosinófilos no grupo tratado que no grupo-controle, coincidindo, então, com a maior quantidade de folículo atrésicos do grupo tratado (Gráficos 9 e 10). Esses resultados podem sugerir que o tratamento com o hormônio de crescimento pode influenciar a ocorrência de atresia folicular e o número de eosinófilos associados a esses folículos atrésicos.

Coward & Bromage (1998) estudando a recuperação ovariana na espécie *Tilapia zilli*, verificaram que entre 18 e 26 dias de experimento houve um aumento na presença de folículos atrésicos no ovário, o que pode reduzir a fecundidade e também influenciar a qualidade do ovo. Portanto, em *Astyanax bimaculatus* esses achados permitem sugerir que maiores quantidades de ovócitos atrésicos nos ovários também podem comprometer o potencial reprodutivo da espécie.

### 5.3.3. Folículos pós-ovulatórios

Os folículos pós-ovulatórios (FPO) em *Astyanax bimaculatus* surgem após a ovulação, e são formados pelas células foliculares, membrana basal e teca, concordando com Grier (2007). Sua presença pôde ser facilmente observada principalmente nas primeiras horas após a desova induzida com extrato de hipófise, tanto no grupo-controle quanto no grupo tratado (Fig. 54). Segundo Drummond *et al.* (2000), após a desova, estas estruturas remanescentes dos folículos ovarianos não têm função endócrina e são rapidamente reabsorvidas, o que envolve morte celular programada ou apoptose das células foliculares.

Em *A. bimaculatus*, os folículos pós-ovulatórios, estruturas remanescentes nos ovários após a desova, são contínuos com o lume do ovário e se caracterizam por apresentar lume amplo e irregular, e parede constituída por camada única de células foliculares, membrana basal e teca (Figs. 52 e 53). Os maiores valores para a contagem dos folículos pós-ovulatórios foram registrados imediatamente após a desova (Gráfico 11). Ao longo do período experimental as maiores quantidades de folículos pós-ovulatórios registradas no grupo-controle em relação ao grupo tratado ocorreram nos horários de 9, 12, 24, 48 e 96 horas. Nos períodos de 96 e 120 horas pós-desova foram registrados os menores valores tanto para o grupo-

controle quanto para o grupo tratado (Gráfico 11). O valor médio total de folículos pós-ovulatórios observado no grupo-controle foi maior que no grupo tratado, não se constatando, apesar disso, diferença significativa ( $P > 0,05$ ) para contagens totais (Gráfico 11). Esses achados são semelhantes àqueles encontrados para a espécie *Tilapia zilli*, onde a partir do terceiro dia após a desova induzida não se observou presença de folículos pós-ovulatórios (Coward & Bromage, 1998), e que poderia indicar um processo de reabsorção rápida desses folículos pós-ovulatórios. Esses autores relatam ainda que os altos níveis de testosterona são significativos para sua função nos ovários da *Tilapia zilli* logo nas primeiras horas após a desova. A função exata da testosterona ainda não está bem entendida, mas sabe-se que esse hormônio é convertido em estradiol nas células da teca (Nagahama et al., 1995, citados por Coward & Bromage, 1998) e também estimula a síntese de GTH (Crim et al., 1981, citados por Coward & Bromage, 1998), importantes para o desenvolvimento dos novos folículos ovarianos. Esses relatos podem contribuir para investigações futuras nos níveis de testosterona e estradiol como fatores importantes para a recuperação ovariana e para o recrutamento de novos ovócitos.

O folículo pós-ovulatório nas primeiras horas após a desova apresentava parede constituída por camada única de células foliculares envolvendo uma cavidade ou lume (Figs. 52-54), no qual se identificou a célula micropilar. Essa célula possui um aspecto globoso, citoplasma abundante, núcleo descompactado e nucléolo evidente (Fig. 55) e permanece no ovário após a ovulação. Em *A. bimaculatus*, o lume do folículo é obstruído por uma secreção de natureza acidófila e pela proliferação e hipertrofia de células foliculares. Segundo Lang (1981b), a secreção observada no interior dos folículos pós-ovulatórios 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.

Com o avanço do processo de involução dos folículos pós-ovulatórios, a parede folicular apresentou camada única de células hipertróficas e membrana basal intacta (Fig. 56). Em estudo ultra-estrutural da involução dos folículos pós-ovulatórios, Drummond et al. (2000) observaram membrana basal delgada, tecido conjuntivo espesso, com várias células da teca envolvendo as células

foliculares. Nesse mesmo estudo, a célula da teca demonstra possuir característica de célula secretora com retículo endoplasmático desenvolvido, complexo de Golgi e várias mitocôndrias.

Ao longo da involução dos folículos pós-ovulatórios, ocorre perda de contato entre as membranas das células foliculares adjacentes, evento observado por Santos et al. (2005) entre 48 e 72 horas pós-desova em *Leporinus taeniatus* (Characiformes: Anostomidae). Esse evento é fator importante na involução dos folículos pós-ovulatórios, e foi constatado no presente trabalho utilizando-se a técnica histoquímica de PAS/metanil-amarelo (Fig. 57). Na seqüência, as células foliculares hipertróficas apresentam citoplasma claro, núcleo grande e com nucléolo evidente. No decorrer da involução dos folículos pós-ovulatórios são observados células foliculares ocupando o lúmen. Essas células possuem cromatina condensada. Drummond et al. (2000) mostraram por meio da análise ultra-estrutural, figuras típicas de apoptose, com formação de protusões citoplasmáticas e núcleo contendo agregados de cromatina condensada adjacente ao envoltório nuclear em um padrão crescente pós-desova. Em *Leporinus taeniatus*, Santos et al. (2005) relataram outros aspectos apoptóticos na involução dos folículos pós-ovulatórios, como fragmentação do núcleo, perda de adesão celular e bolhas citoplasmáticas, com as organelas mantendo-se intactas. Projeções citoplasmáticas das células foliculares em direção ao lume como relatadas por esses autores também foram observados no presente estudo (Fig. 57).

As células foliculares quando entram em apoptose são fagocitadas pelas células foliculares normais ou por células granulares macrofágicas próximas à região do lume. Dessa forma, acredita-se que a absorção dos folículos pós-ovulatórios seja realizada por esses mecanismos (Drummond et al., 2000). Em alguns trabalhos foram encontradas células do tipo eosinófilos circundando os folículos pós-ovulatórios ou no lume desses. Em *Xiphophorus maculatus*, Benjamin (2004) relata que nas fases iniciais de involução dos folículos vazios os eosinófilos são observados no tecido conjuntivo que circunda esses folículos, e atingem o lume dos folículos somente nas fases avançadas de involução. Essa situação não foi verificada em *Astyanax bimaculatus*, mas foram evidenciados vasos sanguíneos e hemácias entre os folículos pós-ovulatórios (Figs. 58 e 59).

Durante a involução dos folículos pós-ovulatórios, o lume é obstruído por células foliculares hipertrofiadas (Figs. 58 e 59) e a estrutura ovariana se reorganiza. A partir de 96 horas após a desova, tanto no grupo-controle quanto o grupo tratado, o número de folículos pós-ovulatórios diminuiu e sua detecção tornou-se mais difícil.

#### **5.3.4. Análise quantitativa da recuperação ovariana**

A análise quantitativa da recuperação ovariana em *A. bimaculatus* foi conduzida tomando-se por base os índices IGS, IHS e  $K_2$ .

O cálculo dos valores médios para esses índices utilizou, para o grupo-controle, 59 fêmeas distribuídas nos diferentes períodos de coleta estabelecidos. Para o grupo tratado com hormônio de crescimento, o cálculo utilizou 52 fêmeas.

Nos períodos considerados, compararam-se os valores de IGS, IHS e  $K_2$  entre os grupos controle e tratado. Os resultados encontram-se nas tabelas 2 e 3. O comportamento do IGS e do IHS nos dois grupos ao longo do período experimental é mostrado no gráfico 12.

A análise estatística não mostrou diferenças significativas nos valores dos índices avaliados para cada período experimental nem para os valores médios totais, seja no grupo-controle seja no grupo tratado (Tabelas 2 e 3). A análise estatística dos mesmos índices entre os grupos experimentais, no mesmo período de tempo, apontou diferenças significativas somente para os valores de IHS as nove e às 96 horas pós-desova (Tabelas 2 e 3).

Apesar do IGS ser um bom indicador do estado biológico do peixe para determinar os estádios do ciclo reprodutivo em peixes e de ser considerado o melhor indicador da época da reprodução (Vazzoler, 1996) pelo fato da maturação das células germinativas ser concomitante com o aumento de peso da gônada, a não-detecção de diferenças significativas para IGS nos diferentes períodos analisados pode ser atribuída ao fato de ser espécie de desova parcelada e que pode não apresentar variação brusca da gônada em períodos de tempo curtos (Gráfico 12).

As diferenças encontradas para os valores de IHS, com valores mais altos registrados no grupo que recebeu a dose de hormônio de crescimento, pode ser devido ao fato desse órgão ser o principal alvo do hormônio, o que

coincidiu com maiores quantidades de ovócitos em desenvolvimento secundário avançado em início de deposição de glóbulos de vitelo (vitelogênese) do que no grupo-controle (Gráfico 5). O IHS pode variar entre as espécies de teleósteos devido às diferenças na capacidade de armazenamento de energia, condição fisiológica, hábitos alimentares e disponibilidade de alimento (Svedang & Wickstrom, 1997, citados por Ribeiro et al., 2006). Estudando a reprodução da espécie *Steindachnerina insculpta* (Characiformes: Curimatidae), Ribeiro et al. (2006) constataram diferenças no índice hepatossomático, que diminui da fase de repouso para fase de maturação, concordando com Selman & Wallace (1989). 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 IHS de fêmeas em maturação avançada, que comprova a transferência de substâncias hepáticas para o ovário (Selman & Wallace, 1989; Ribeiro et al., 2006). A análise ultra-estrutural de hepatócitos de fêmeas de *Steindachnerina insculpta* conduzida por Ribeiro et al. (2006) mostrou que, quando os valores de IHS eram mais elevados, as quantidades de retículo endoplasmático rugoso e liso eram maiores, possuíam pouco glicogênio no citoplasma e quantidade abundante de mitocôndrias eletron-densas. O aumento do índice hepatossomático e da quantidade de organelas citoplasmáticas é devido ao aumento da síntese de vitelogenina para formação dos ovócitos em vitelogênese (Ribeiro et al., 2006).

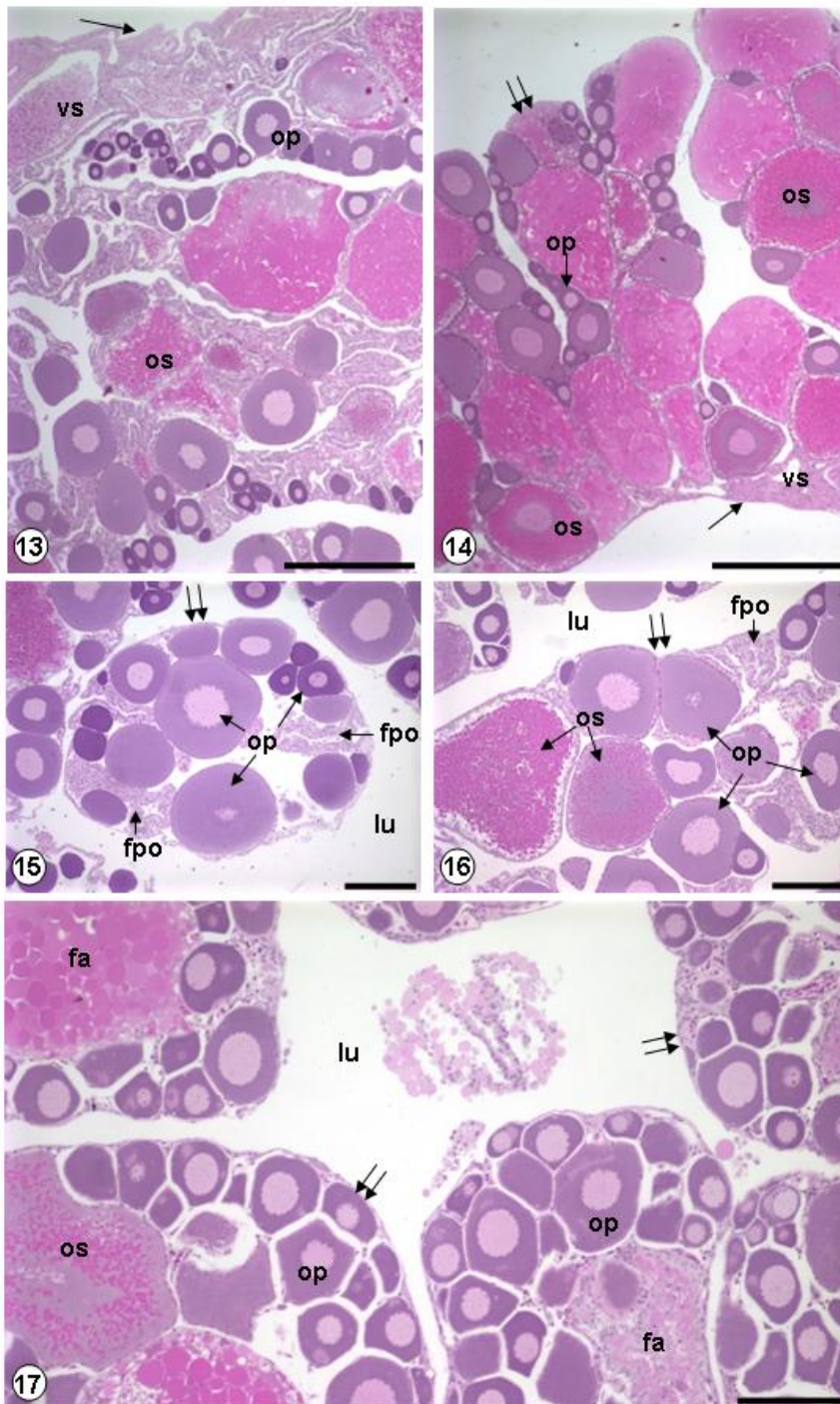
Segundo Hull & Harvey (2001), a vitelogênese é controlada pelo estradiol e fica severamente prejudicada na ausência de hormônio de crescimento em peixes hipofisectomizados, sendo estabelecida pela administração do hormônio exógeno. Peyon et al. (1996) avaliaram o efeito do hormônio de crescimento sobre a síntese de vitelogenina induzida pelo 17 $\beta$ -estradiol (E2) em cultura primária de hepatócitos de fêmeas de enguia *Anguilla anguilla* L. (Anguilliformes: Anguillidae). O hormônio de crescimento sozinho não foi capaz de aumentar os níveis de vitelogenina, mas quando se utilizou hormônio de crescimento (20 ng/ml) + E2, o hormônio de crescimento agiu diretamente sobre as células do fígado e potencializou a ação do E2 para aumentar a síntese de vitelogenina. O efeito potencializador do hormônio de crescimento parece ser momento e dose-dependentes para modular a função

do status hormonal para agir em sinergismo com o E2 (Peyon et al., 1996). Em trabalho conduzido por Coward & Bromage (1998) com a espécie *Tilapia zilli*, de reprodução assincrônica, o aumento do índice hepatossomático coincidiu com o aumento dos níveis de 17 $\beta$ -estradiol e testosterona logo após a desova, que coincidiu também com o recrutamento de novos ovócitos para o início da vitelogênese. Klausen et al. (2001) estudando o efeito dos hormônios liberadores de gonadotrofinas (GnRH I e GnRH II) sobre as células hipofisárias do peixe goldfish (*Carassius auratus*) (Cypriniformes: Cyprinidae), tratadas “in vitro”, por 12 horas, verificaram a expressão do gene do hormônio de crescimento, e constatou que os níveis desse hormônio ficaram mais altos quando essas células foram tratadas com GnRH II do que com GnRH I. Tudo isso leva a concluir que diversos hormônios em várias espécies de teleósteos atuam no aumento do índice hepatossomático para contribuir na síntese e transferência de vitelogenina para os ovários.

BENJAMIN (2004) estudando os efeitos do hormônio de crescimento sobre o ovário de *Xiphophorus maculatus* não encontrou diferenças entre esses índices (IGS, IHS e K<sub>2</sub>) dentro de cada grupo experimental, mas diferenças foram encontradas para IHS e K<sub>2</sub> em diferentes períodos analisados quando se compararam o grupo-controle com o tratado.

## **5.5. Figuras**

**Fig. 13-** Ovário envolvido externamente por uma serosa peritoneal (seta única).  
**Fig. 14-** Túnica albugínea de natureza conjuntiva (seta única), apresentando fibrócitos e vasos sangüíneos (vs). Seta dupla: lamela ovulígera.  
**Figs. 15, 16 e 17-** Lamelas ovulíferas (setas duplas) onde se encontram ovogônias e ovócitos em diferentes estádios de desenvolvimento.  
**op-** ovócito primário; **os-** ovócito secundário; **lu-** lume ovariano; **fpo-** folículo pós-ovulatório; **fa-** folículo atrésico.  
**Coloração-** Hematoxilina-eosina.  
**Barra-** 13 e 14 (500µm); 15 e 16 (200µm); 17 (150µm).



**Figs. 18 e 19-** Ovogônia (asterisco) submergindo no tecido ovariano a partir do epitélio do lume (ep) constituído por células pavimentosas (p) ou cúbicas (c). Na seqüência, ovogônias (asterisco) no tecido subjacente envoltas por células pré-foliculares (seta dupla).

**Fig. 20-** Ninho de ovogônias (asterisco) envolto por células pré-foliculares (seta dupla).

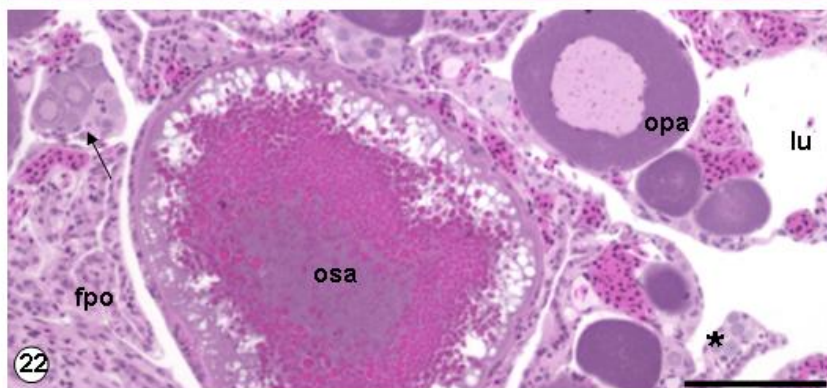
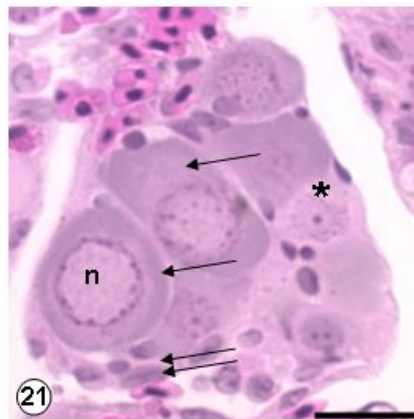
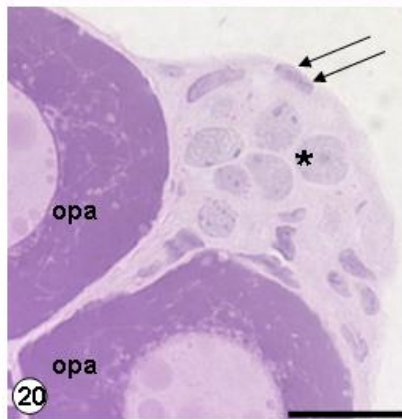
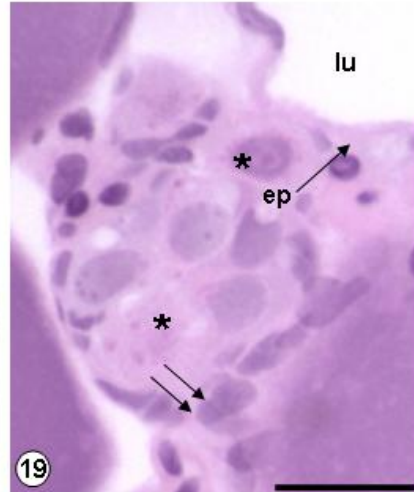
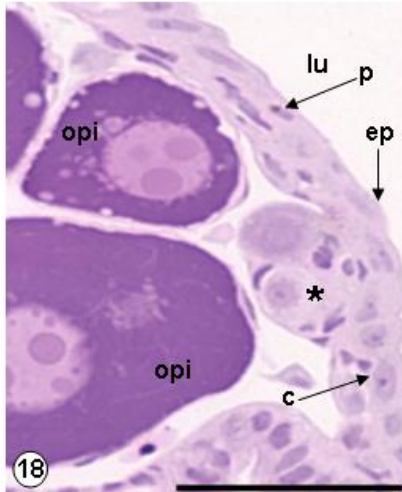
**Fig. 21-** Ninho com ovogônias (asterisco) e ovócitos primordiais (seta única) envolto por células pré-foliculares (seta dupla).

**Fig. 22-** Ninhos de ovogônias (asterisco) e de ovócitos primordiais (seta única).

**opi-** ovócito primário inicial; **opa-** ovócito primário avançado; **osa-** ovócito secundário avançado; **lu-** lume ovariano; **fpo-** folículo pós-ovulatório; **n-** núcleo.

**Coloração-** Hematoxilina-eosina.

**Barra-** 18 (50µm); 19 e 20 (20µm); 21 (30µm); 22 (150µm).



**Figs. 23 e 24-** Ovócitos em estágio de desenvolvimento primário inicial (opi). Núcleo esférico (n) e nucléolos dispersos no nucleoplasma (seta única). Envoltório do núcleo uniforme (seta dupla).

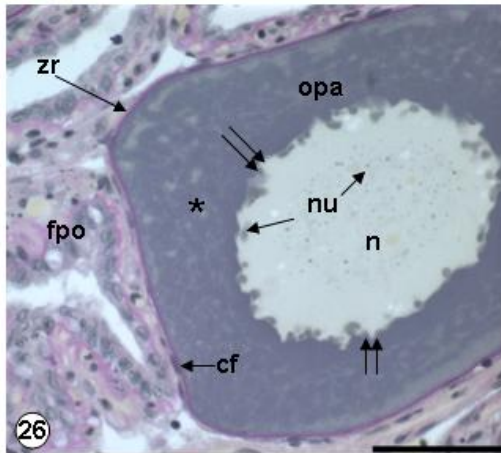
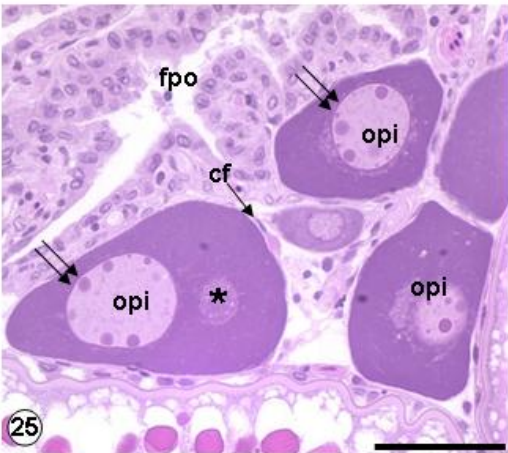
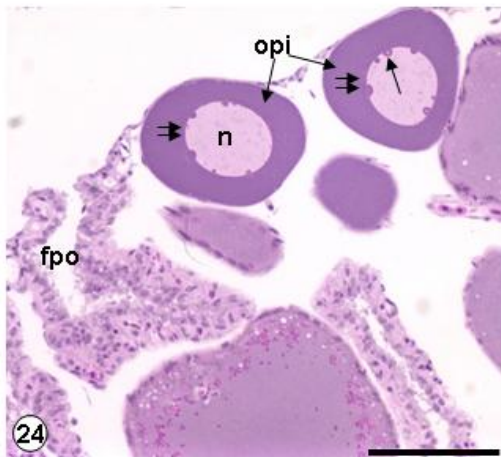
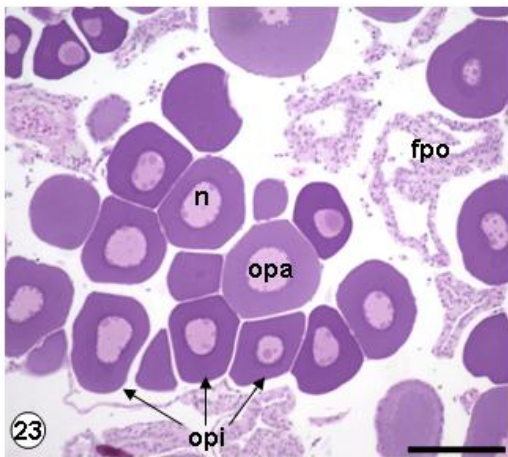
**Fig. 25-** Ovócitos em estágio de desenvolvimento primário inicial (opi). Célula folicular pavimentosa envolvendo o ovócito primário (cf) e núcleo vitelínico se dispersando no citoplasma (asterisco). Envoltório do núcleo uniforme (seta dupla).

**Fig. 26-** Ovócito em estágio de desenvolvimento primário avançado (opa). Nucléolos (nu) dispersos no nucleoplasma do ovócito primário avançado (opa). Células foliculares pavimentosas (cf) envolvendo o ovócito, e início da formação da zona radiata (zr) PAS +. Citoplasma com granulações evidentes (asterisco). Envoltório nuclear irregular (seta dupla); e nucléolos (nu) espalhados pelo nucleoplasma (n).

**fpo-** folículo pós-ovulatório.

**Coloração-** 23, 24 e 25 (Hematoxilina-eosina); 26 (PAS+metanil-amarelo).

**Barra-** 23 (150µm); 24 (100µm); 25 e 26 (50µm).



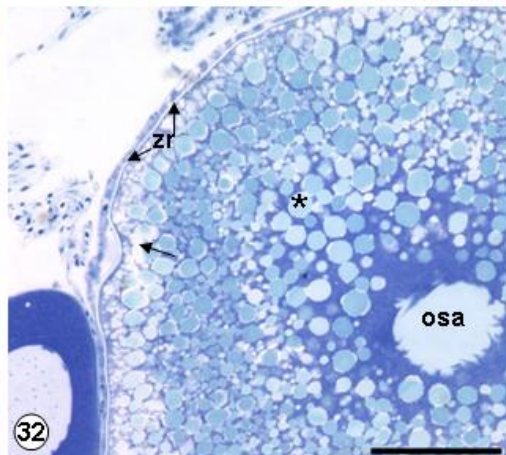
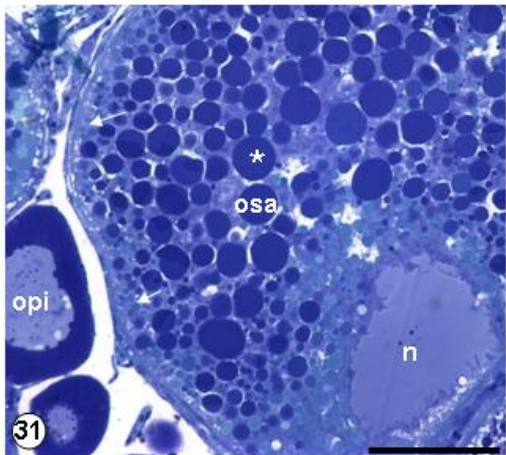
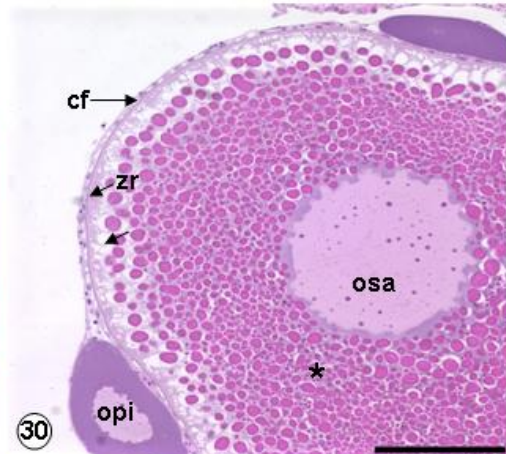
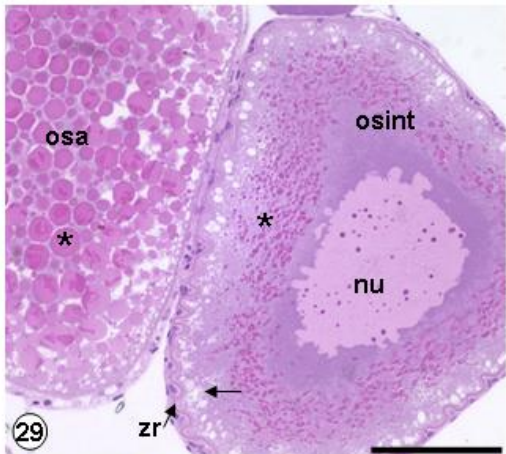
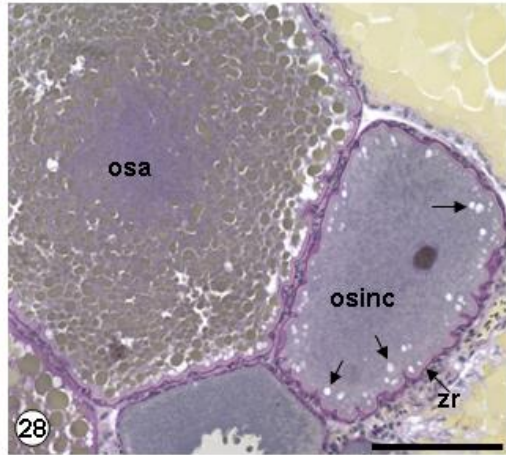
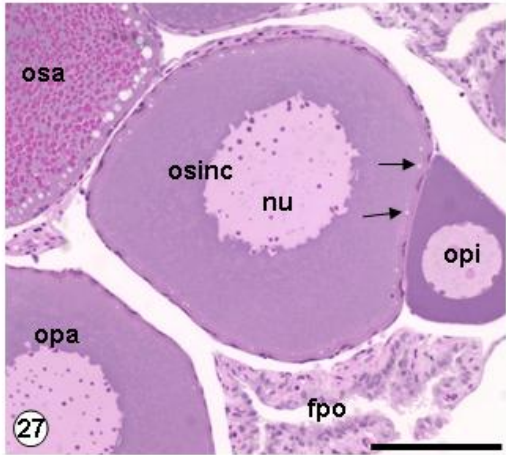
**Figs. 27, 28 e 29** - Ovócitos em desenvolvimento secundário inicial (osinc) e secundário avançado com início de deposição de vitelo (osint). Núcleo central (n) e pouco acidófilo, nucléolos pequenos (nu) e dispersos pelo nucleoplasma. Aparecimento das vesículas corticais na periferia do citoplasma (seta única). Zona radiata apresentando um contorno irregular ou pregueado (zr).

**Figs. 30, 31 e 32**- Ovócito secundário avançado com início de deposição de vitelo e ovócito secundário avançado (osa). Alvéolos corticais (seta única) em diferentes respostas de colorações utilizadas. zr- zona radiata linear; n- núcleo deslocando em direção ao pólo animal.

**opi**- ovócito primário inicial; **opa**- ovócito primário avançado; **osa**- ovócito secundário avançado; **fpo**- folículo pós-ovulatório; **asterisco**- vitelo.

**Coloração**- 27, 29 e 30 (Hematoxilina-eosina); 28 (PAS+metanil-amarelo); 31 (Azul de toluidina, pH 6.5); 32 (Azul de toluidina, pH 4.0).

**Barra**- 27-32 (100µm).

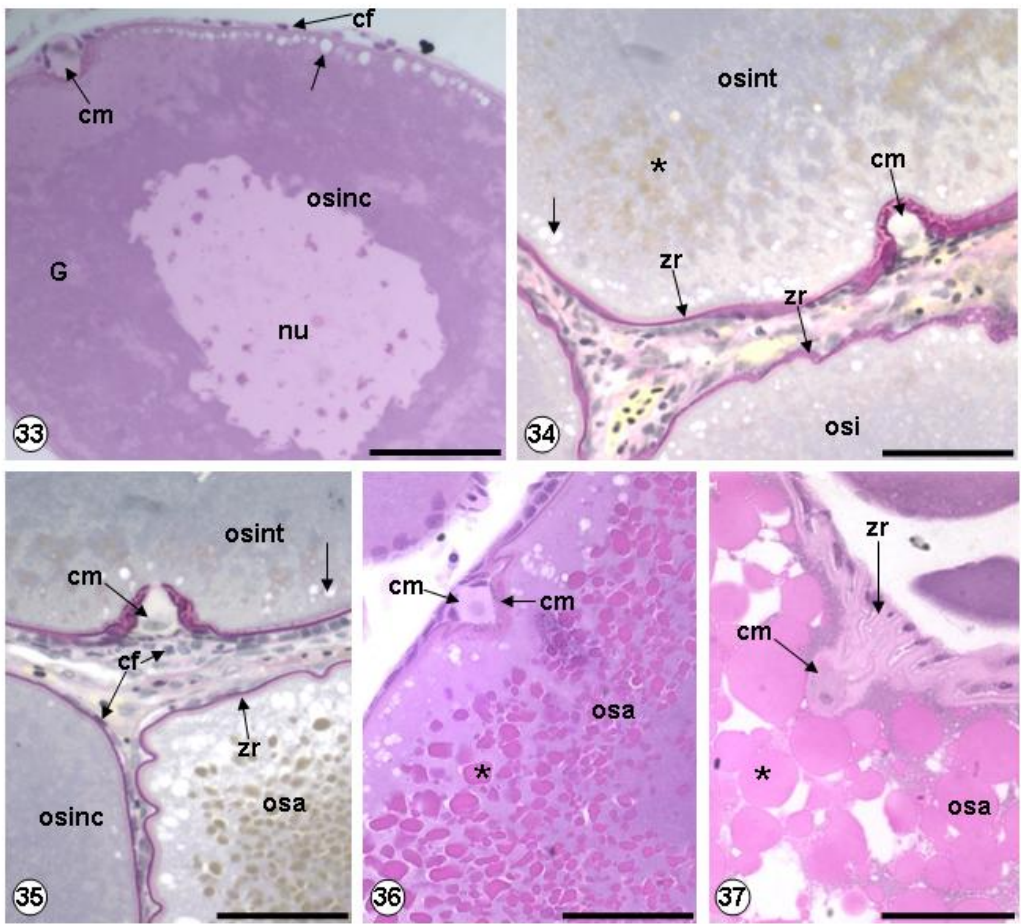


**Figs. 33, 34 e 35-** Células foliculares (cf) pavimentosas em ovócitos em desenvolvimento secundário inicial (osinc) e cúbicas em ovócitos secundários em início de deposição de vitelo (osint). Zona radiata (zr) constituída por duas camadas PAS+. Vesículas corticais (seta). Célula micropilar (cm) obstruindo o canal da micrópila. Granulações no citoplasma de ovócito primário avançado (G).

**Figs. 36 e 37-** Aparelho micropilar desenvolvido no ovócito secundário avançado (osa). cm- célula micropilar; zr- zona radiata; asterisco- vitelo.

**Coloração-** 33, 36 e 37 (Hematoxilina-eosina); 34 e 35 (PAS+metanil-amarelo).

**Barra-** 35 (100 $\mu$ m); 33, 34, 36 e 37 (50 $\mu$ m).

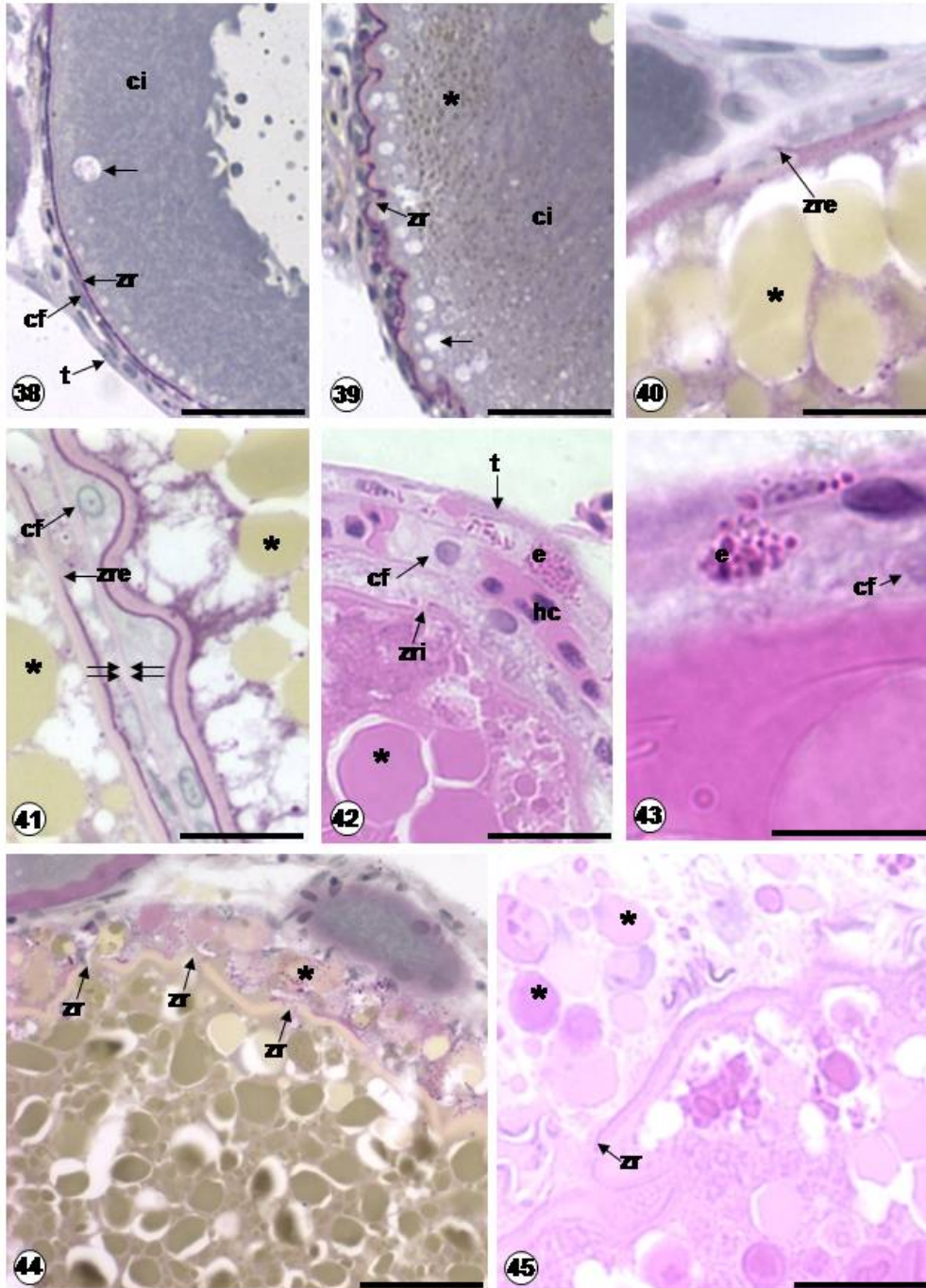


**Figs. 38, 39, 40, 41, 42 e 43-** Folículos atrésicos em atresia inicial. Observa-se descontinuidade da camada da zona da radiata externa (zre) evidente com PAS+metanil-amarelo, seguida de fendas na camada interna da zona radiata (zri). Em 42 e 43, observa-se hipertrofia das células foliculares (cf), além de células do tipo eosinófilos (e) associadas ao folículo atrésico. Asterisco- vitelo; t- células da teca pavimentosas; seta dupla- membrana basal; hc- hemácias.

**Figs. 44 e 45-** Folículo atrésico em atresia intermediária mostrando a fragmentação da zona radiata (zr) e perda do conteúdo citoplasmático (asterisco).

**Coloração-** 42, 43 e 45 (Hematoxilina-eosina); 38-41 e 44 (PAS+metanil-amarelo).

**Barra-** 38, 39 (40µm); 40-42 e 45 (20µm); 43 (10µm); 44 (50µm).



**Figs. 46 e 47-** Folículo atrésico em atresia intermediária onde se observa liquefação do do vitelo (asterisco) e incorporação do mesmo por células foliculares, além de fragmentação da zona radiata (zr).

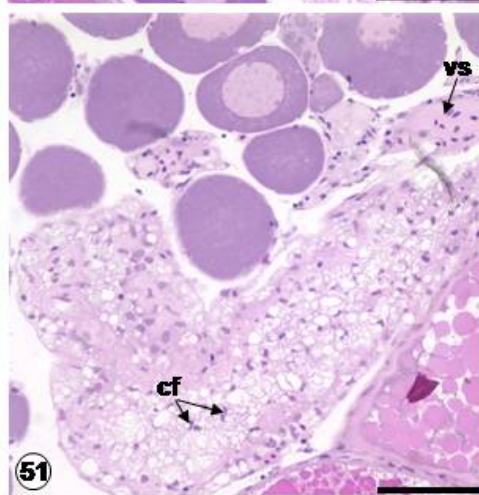
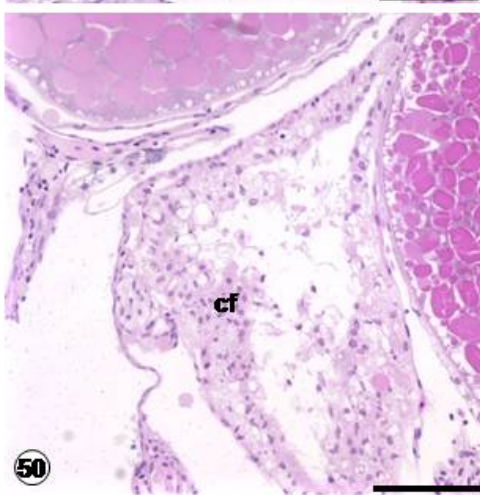
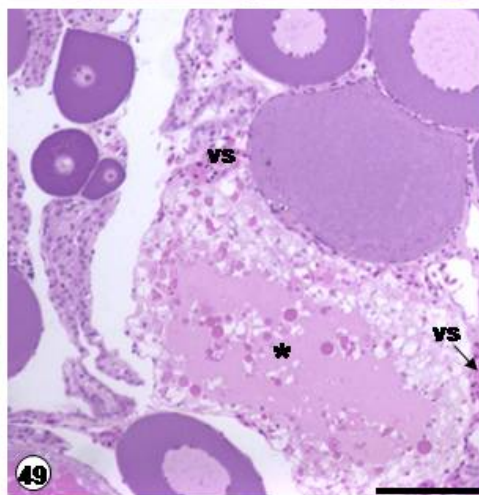
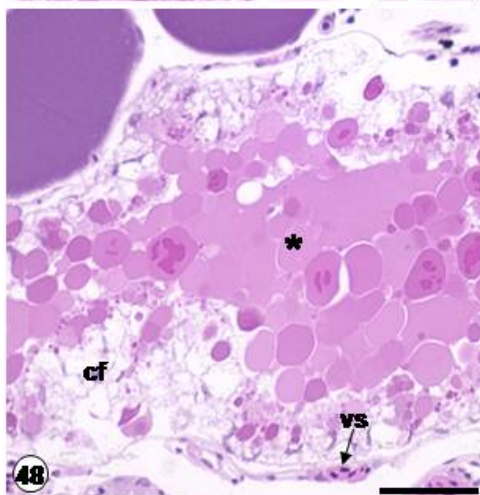
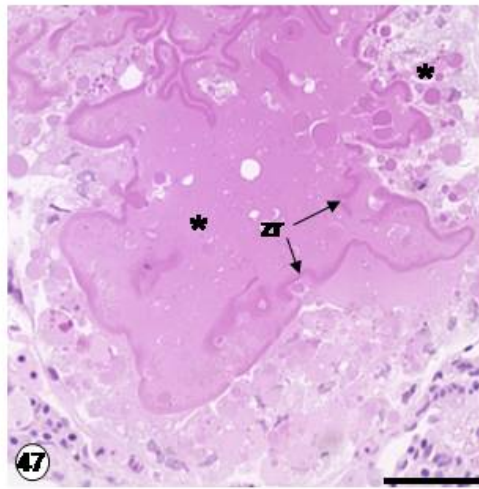
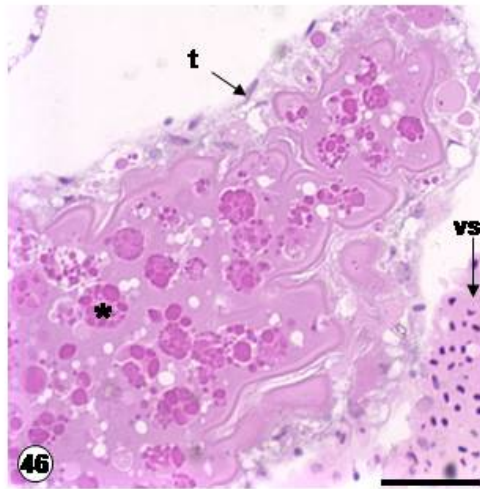
**Figs. 48 e 49-** Invasão das células foliculares no folículo atrésico (cf) para reabsorção do citoplasma em liquefação (asterisco); vs- vaso sanguíneo.

**Figs. 50 e 51-** Atresia avançada, onde se nota que todo conteúdo citoplasmático foi fagocitado pelas células foliculares (cf) que ocupam o citoplasma ovocitário.

**t-** teca; **vs-** vaso sanguíneo; **cf-** célula folicular.

**Coloração-** 46-51(Hematoxilina-eosina).

**Barra-** 46, 47 e 48 (50 $\mu$ m); 49 (100 $\mu$ m); 50 e 51 (80 $\mu$ m).



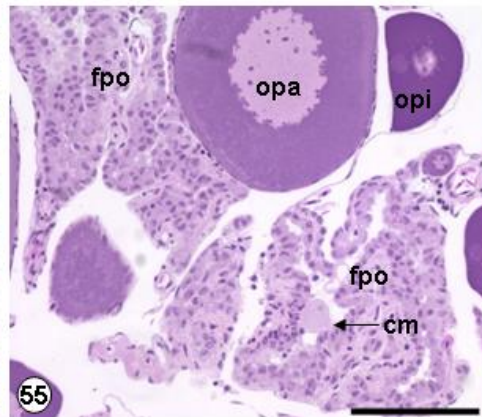
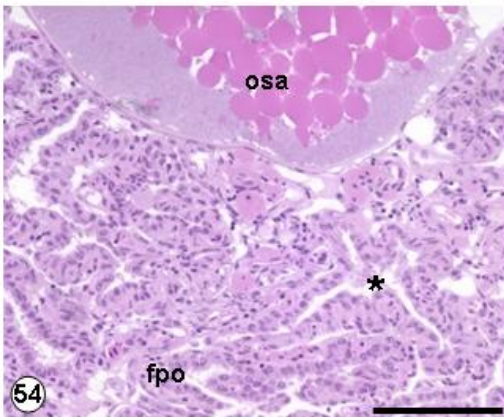
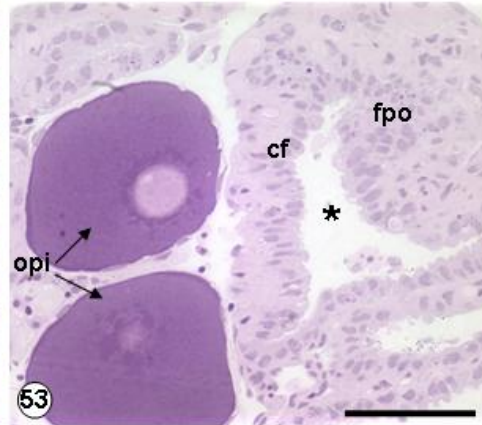
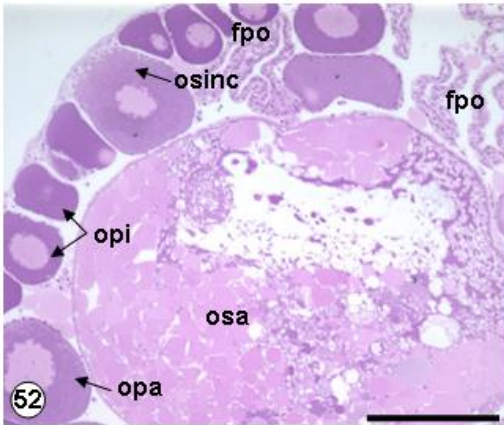
**Figs. 52, 53 e 54-** Folículos pós-ovulatórios (fpo) apresentando parede constituída por camada única de células foliculares (cf) e pela membrana basal que delimitam um lume amplo e irregular (asterisco).

**Fig. 55-** Folículo pós-ovulatório (fpo) com célula micropilar (cm) de aspecto globoso, citoplasma abundante, núcleo descompactado e nucléolo evidente.

**opi-** ovócito primário inicial; **opa-** ovócito primário avançado; **osinc-** ovócito secundário inicial com vesículas corticais; **osa-** ovócito secundário avançado; **cf-** celular folicular.

**Coloração-** 52-55 (Hematoxilina-eosina).

**Barra-** 52, 54 e 55 (100 $\mu$ m); 53 (50 $\mu$ m).



**Fig. 56-** Folículo pós-ovulatório (fpo) apresentando lume amplo e irregular (asterisco) ocupado por secreção de natureza acidófila (se).

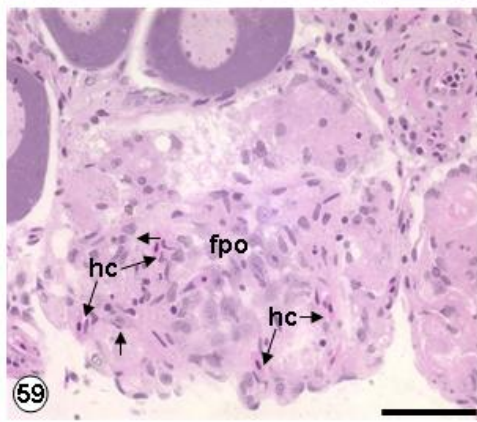
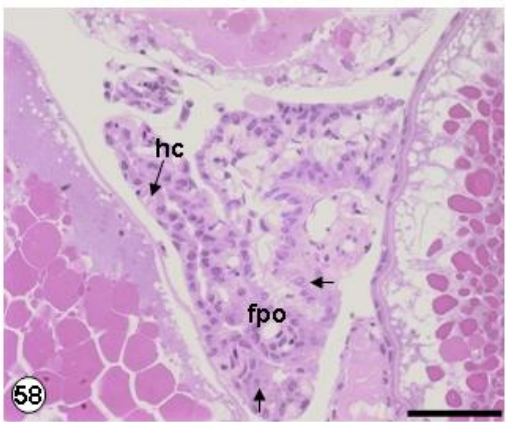
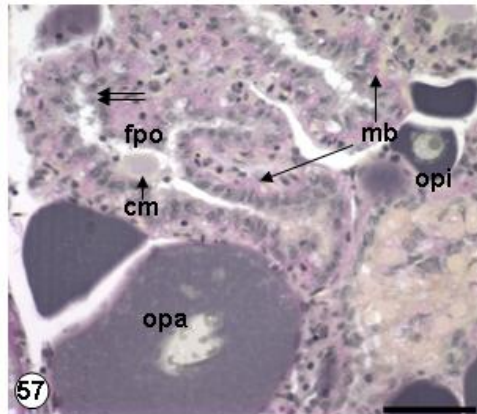
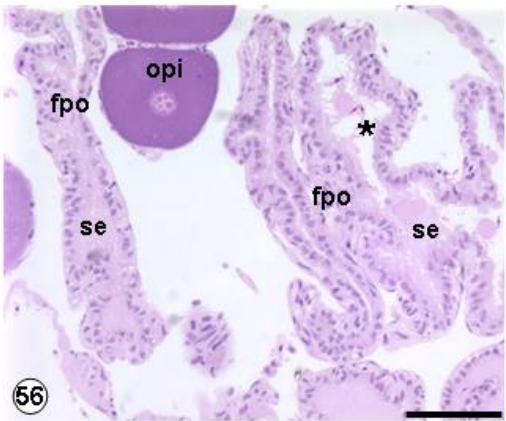
**Fig. 57-** Folículo pós-ovulatório (fpo) mostrando membrana basal (mb) PAS+ externamente à camada de células foliculares (cf). Da superfície apical dessas células, notam-se projeções citoplasmáticas (seta dupla) em direção ao lume. .

**Figs. 58 e 59-** Folículos pós-ovulatórios (fpo) em processo avançado de involução, onde ocorre invasão por células foliculares (seta) que ocluem seu lume.

**opi-** ovócito primário avançado; **opa-** ovócito primário avançado; **cm-** célula micrópilar; **hc-** hemácias.

**Coloração-** 56, 58 e 59 (Hematoxilina-eosina); 57 (PAS+metanil-amarelo).

**Barra-** 56 (150 $\mu$ m); 57, 58 e 59 (50 $\mu$ m).



## **5.6. Tabelas**

**Tabela 1.** Valores médios, desvios-padrão e amplitude de diâmetro (em  $\mu\text{m}$ ) dos ovócitos de *Astyanax bimaculatus* nos diferentes estádios de desenvolvimento.

<b>EDO</b>	<b>n</b>	<b>Diâmetro (M<math>\pm</math>DP)</b>	<b>Amplitude</b>
opi	50	77,17 $\pm$ 18,24	46,62-119,14
opa	50	150,0 $\pm$ 47,41	94,53-285,32
osinc	50	233,87 $\pm$ 41,14	156,76-348,00
osint	50	305,55 $\pm$ 39,93	213,99-392,31
osa	50	443,81 $\pm$ 78,03	326,08-682,73

EDO: estágio de desenvolvimento ovocitário; n: número de medidas; opi: ovócito primário inicial; opa: ovócito primário avançado; osinc: ovócito secundário inicial, com vesículas corticais; osint: ovócito secundário avançado, com início de deposição dos glóbulos de vitelo; osa: ovócito secundário avançado, com glóbulos de vitelo em todo citoplasma; M: média; DP: desvio-padrão.

**Tabela 2.** Peso corporal (PC) em gramas no momento do sacrifício, índice gonadossomático (IGS), índice hepatossomático (IHS) e fatores de condição ( $K_1$  e  $K_2$ ), por período de coleta após desova induzida, de fêmeas de *Astyanax bimaculatus* do grupo-controle.

Horas pós-desova	n	PC M±DP	IGS M±DP	IHS M±DP	$K_2$ M±DP
<b>0 (zero)</b>	6	15,60±1,32	4,75±3,98	1,57±0,77	2,55±0,32
<b>3</b>	5	10,06±5,35	9,88±6,85	5,92±5,17	2,62±0,31
<b>6</b>	5	14,92±5,92	6,27±2,54	1,55±0,45	2,43±0,28
<b>9</b>	5	10,73±1,82	3,75±1,64	1,33±0,44*	2,57±0,30
<b>12</b>	5	13,75±4,98	5,67±2,30	1,59±0,45	2,46±0,28
<b>18</b>	5	11,26±1,97	3,39±1,54	2,03±0,40	2,59±0,29
<b>24</b>	5	12,70±3,03	4,79±1,16	1,84±0,41	2,45±0,15
<b>48</b>	5	13,21±5,72	4,52±0,76	1,69±0,23	2,28±0,12
<b>72</b>	5	13,39±3,35	7,91±4,98	1,79±0,76	2,41±0,15
<b>96</b>	5	14,45±3,54	6,36±0,94	1,55±0,26*	2,30±0,28
<b>120</b>	8	17,12±1,63	6,85±2,69	1,41±0,19	2,39±0,15

n: número de exemplares por período de coleta, M: média; DP: desvio-padrão;

\*: valores estatisticamente diferentes em relação ao grupo tratado.

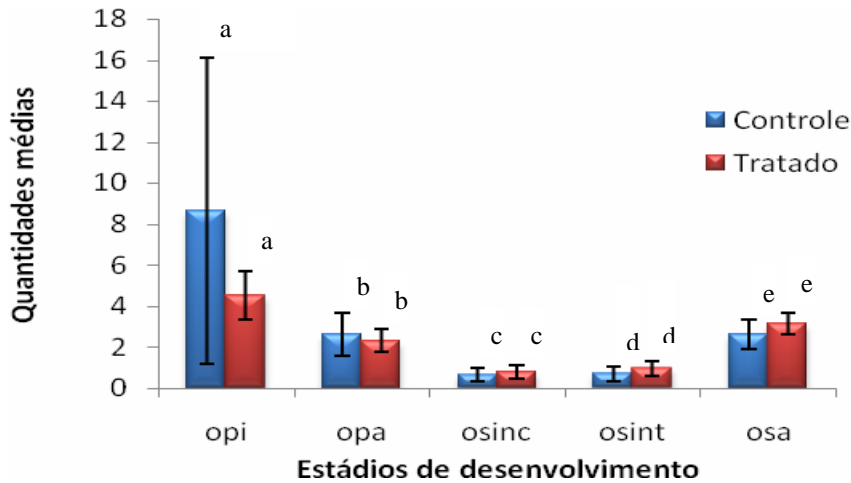
**Tabela 3.** Peso corporal (PC) em gramas no momento do sacrifício, índice gonadossomático (IGS), índice hepatossomático (IHS) e fatores de condição ( $K_1$  e  $K_2$ ), por período de coleta após desova induzida, de fêmeas de *Astyanax bimaculatus* do grupo tratado.

Horas pós-desova	n	PC M±DP	IGS M±DP	IHS M±DP	$K_2$ M±DP
3	5	7,87±2,76	8,28±6,34	7,39±8,85	2,45±0,20
6	5	7,60±1,75	4,46±1,84	6,66±7,45	2,57±0,22
9	5	6,77±1,63	5,80±1,98	4,12±4,65*	2,36±0,20
12	5	6,62±1,63	7,95±2,02	1,73±0,60	2,46±0,26
18	5	5,98±1,44	9,28±6,92	1,72±0,37	2,41±0,14
24	5	7,68±2,27	5,26±3,75	1,84±0,24	2,48±0,10
48	5	6,94±1,78	4,87±1,94	2,10±0,80	2,42±0,29
72	5	6,63±1,94	4,77±1,82	2,20±0,76	2,86±0,92
96	5	5,88±0,90	8,23±2,24	2,25±0,39*	2,47±0,16
120	7	8,53±0,77	5,86±2,58	3,23±3,95	2,27±0,10

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

## **5.7. Gráficos**

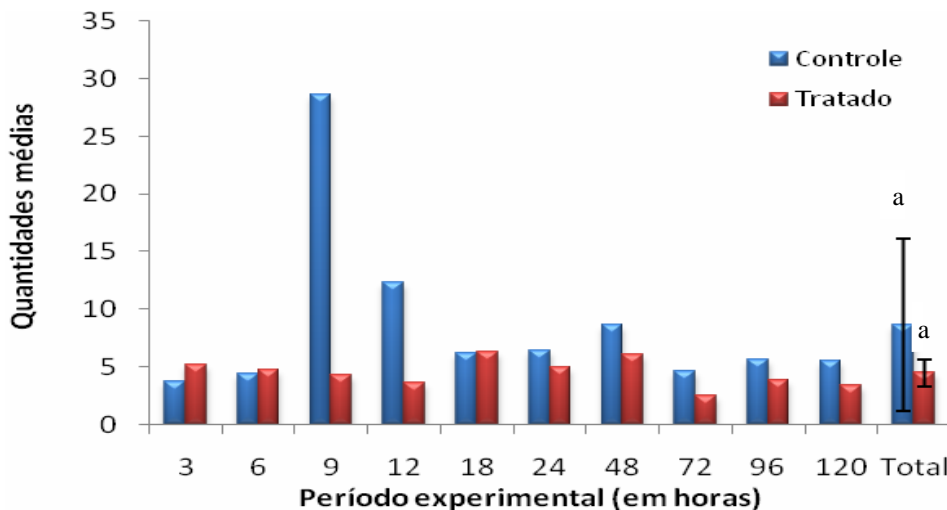
**Gráfico 1:** Quantidades médias de ovócitos nos diferentes estádios de desenvolvimento nos grupos controle e tratado, ao longo do período experimental.



opi: ovócito primário inicial; opa: ovócito primário avançado; osinc: ovócito secundário inicial com vesículas corticais; osint: ovócito secundário avançado com início de deposição de glóbulos de vitelo; osa = ovócito secundário avançado com glóbulos de vitelo em todo citoplasma.

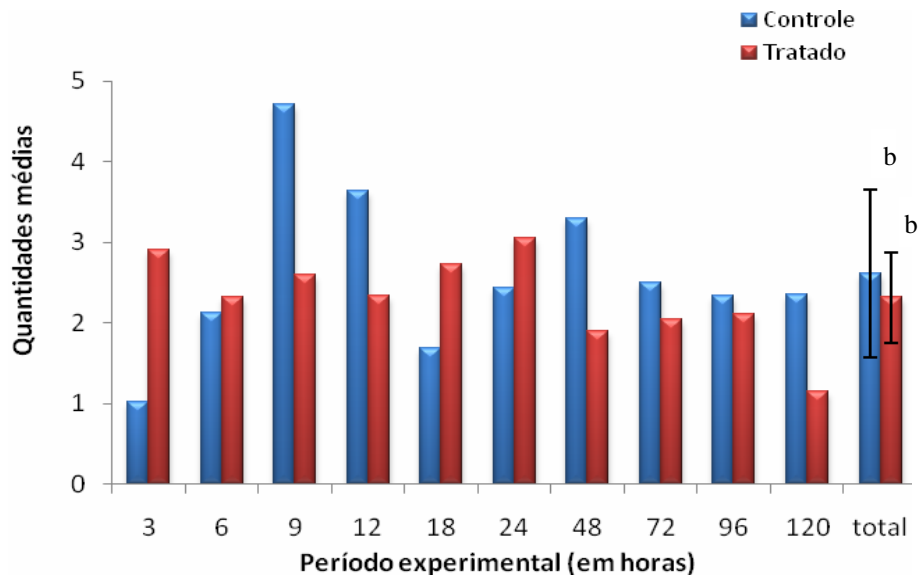
Letras iguais em cada estágio de desenvolvimento ovocitário indicam que não houve diferença estatisticamente significativa ( $P > 0,05$ ).

**Gráfico 2:** Quantidades médias de ovócitos primários iniciais, nos diferentes períodos pós-desova, nos grupos controle e tratado.



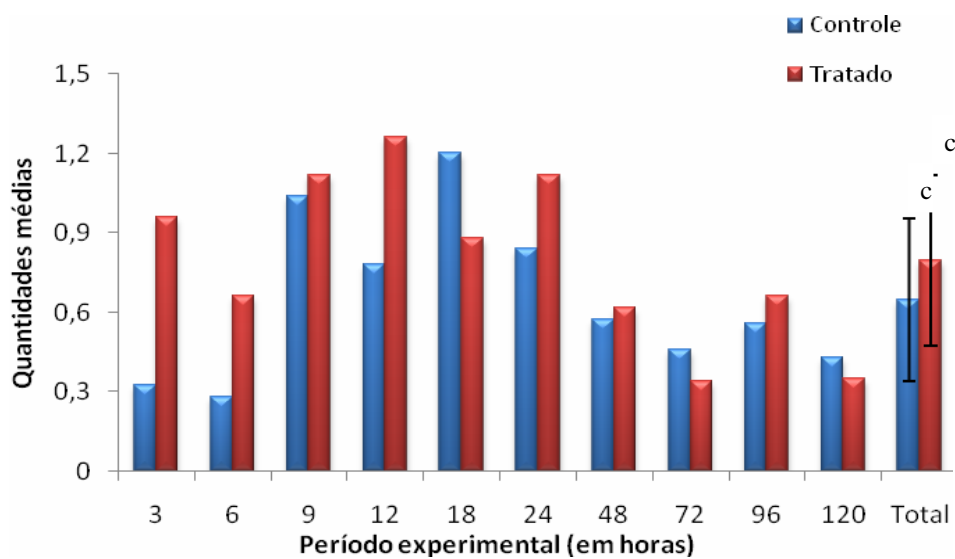
Letras iguais para os grupos indicam que não houve diferença estatisticamente significativa ( $P > 0,05$ ).

**Gráfico 3:** Quantidades médias de ovócitos primários avançados, nos diferentes Períodos pós-desova, nos grupos controle e tratado.



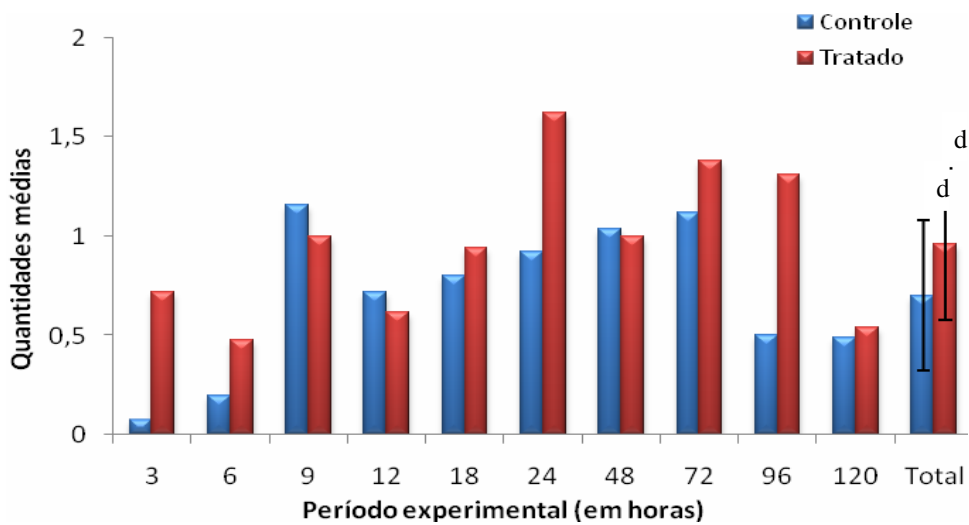
Letras iguais para os grupos indicam que não houve diferença estatisticamente significativa ( $P > 0,05$ ).

**Gráfico 4:** Quantidades médias de ovócitos secundários iniciais, com vesículas corticais, nos diferentes períodos pós-desova, nos grupos controle e tratado.



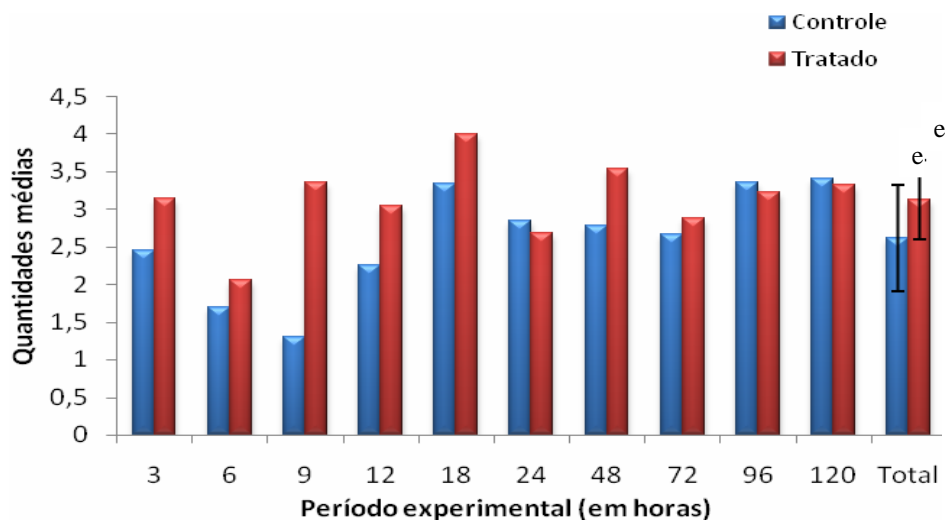
Letras iguais para os grupos indicam que não houve diferença estatisticamente significativa ( $P > 0,05$ ).

**Gráfico 5:** Quantidades médias de ovócitos secundários intermediários, em início de deposição de glóbulos de vitelo, nos diferentes períodos pós-desova, nos grupos controle e tratado.



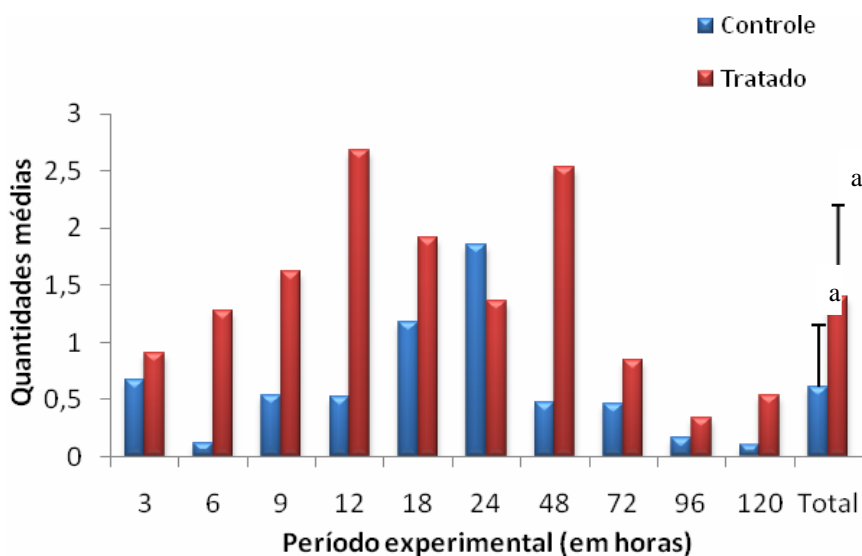
Letras iguais para os grupos indicam que não houve diferença estatisticamente significativa ( $P > 0,05$ ).

**Gráfico 6:** Quantidades médias de ovócitos secundários avançados, com glóbulos de vitelo em todo citoplasma, nos diferentes períodos pós-desova, nos grupos controle e tratado.



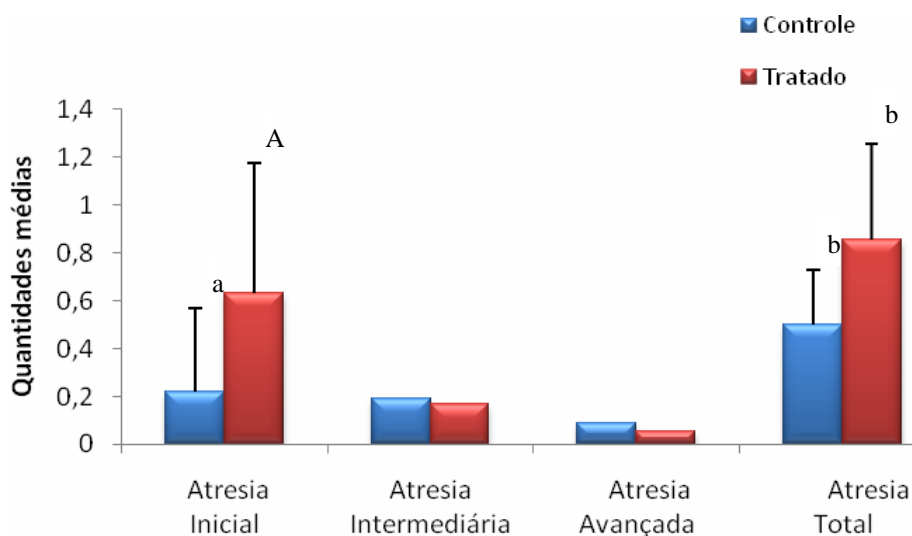
Letras iguais para os grupos indicam que não houve diferença estatisticamente significativa ( $P > 0,05$ ).

**Gráfico 7:** Quantidades médias de folículos atrésicos, nos diferentes períodos pós-desova, nos grupos controle e tratado.



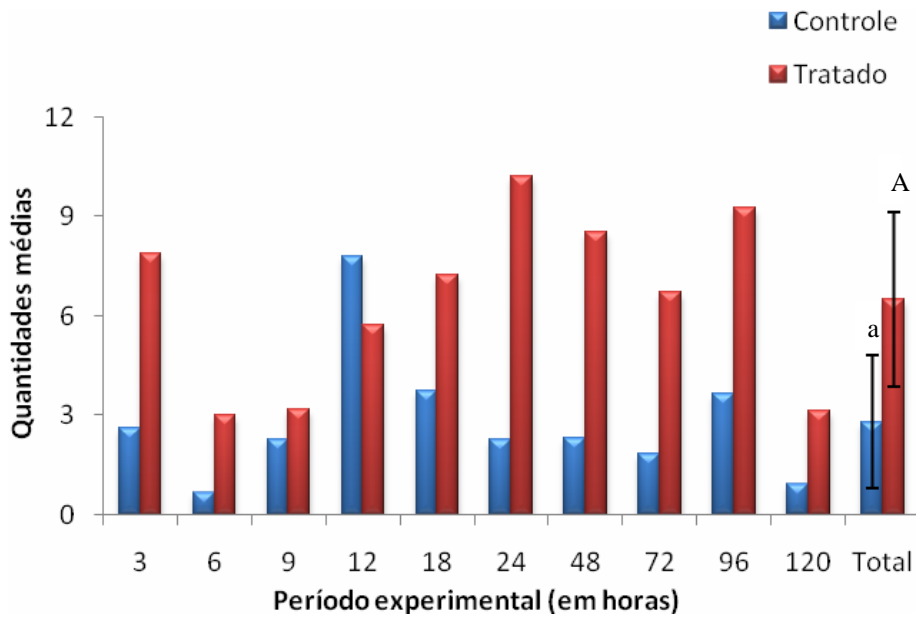
Letras iguais para os grupos indicam que não houve diferença estatisticamente significativa ( $P > 0,05$ ).

**Gráfico 8:** Quantidades médias de folículos atresicos nas diferentes fases do processo de atresia nos grupos controle e tratado, ao longo do período experimental.



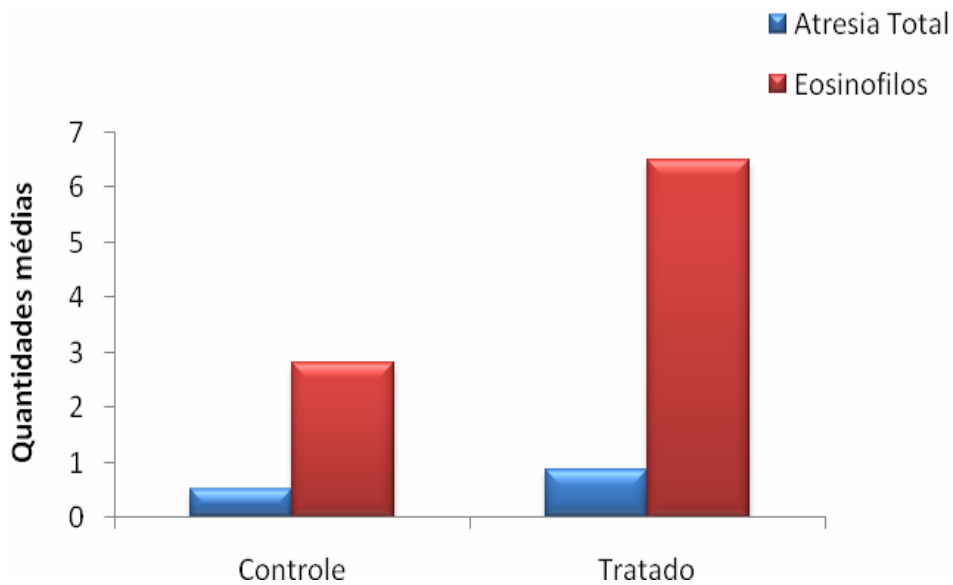
Letras iguais para os grupos indicam que não houve diferença estatisticamente significativa ( $P > 0,05$ ).

**Gráfico 9:** Quantidades médias de eosinófilos, nos diferentes períodos pós-desova, nos grupos controle e tratado.

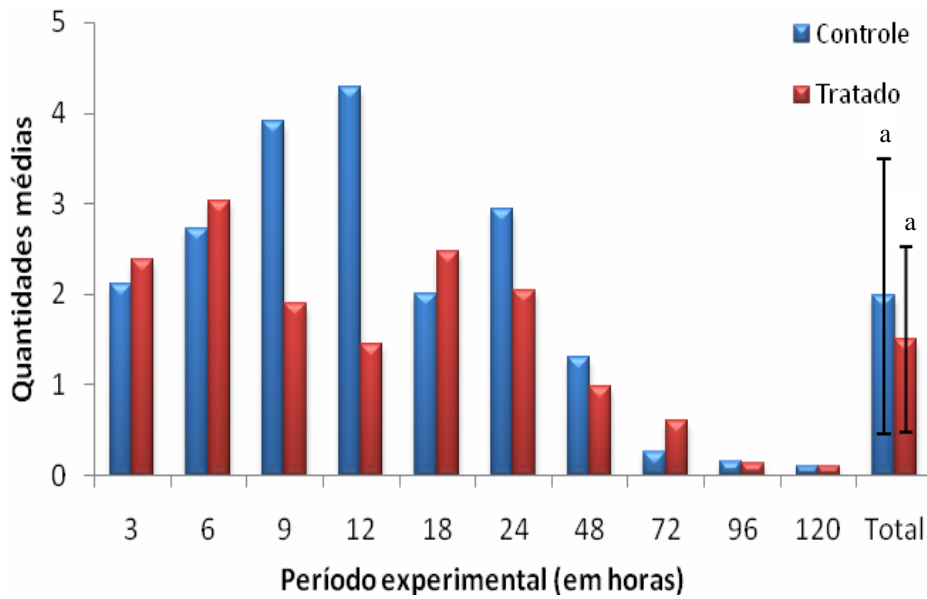


Letras diferentes para os grupos indicam diferença estatisticamente significativa ( $P < 0,05$ ).

**Gráfico 10:** Quantidades médias de eosinófilos associados aos folículos atresícos nos grupos controle e tratado, ao longo do período experimental.

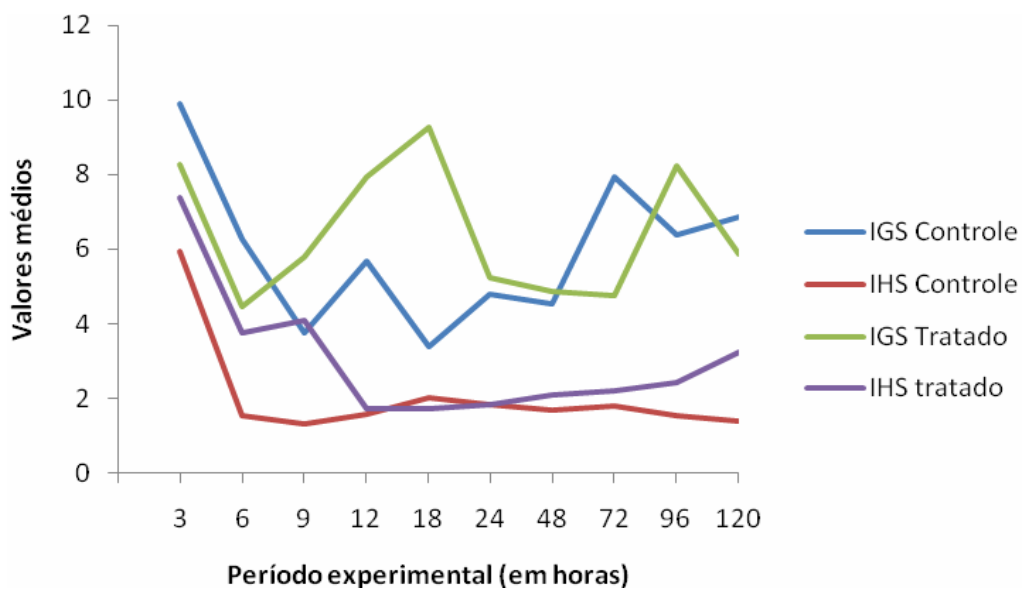


**Gráfico 11:** Quantidades médias de folículos pós-ovulatórios, nos diferentes períodos pós-desova, nos grupos controle e tratado.



Letras iguais para os grupos indicam que não houve diferença estatisticamente significativa ( $P > 0,05$ ).

**Gráfico 12:** Variação dos valores médios dos índices gonadosomático e hepatossomático, nos diferentes períodos pós-desova, nos grupos controle e tratado.



## 6. CONCLUSÕES

1. Com a metodologia de hipofisação adotada, 60% das fêmeas responderam positivamente, com a desova ocorrendo entre 225 e 234 horas-grau.
2. A morfologia dos ovários e a ovogênese de *A. bimaculatus* é similar a outras espécies do gênero *Astyanax*.
3. Eventos de atresia folicular inicial foram registrados em maior número que atresia intermediária e avançada nos dois grupos experimentais, e os valores totais de atresia folicular foram maiores no grupo tratado que no grupo-controle.
4. Maior quantidade de eosinófilos foi registrada no grupo tratado que no grupo-controle, coincidindo com as maiores quantidades de folículos atrésicos do grupo tratado. Além disso, observou-se diferença significativa quando foram associados os valores de atresia e eosinófilos e comparados os mesmos entre os grupos experimentais.
5. Folículos pós-ovulatórios foram observados em maior número no grupo-controle que no grupo tratado, sem diferença significativa entre os grupos. Às 96 e 120 horas pós-desova, observou-se queda brusca da contagem desses folículos nos dois grupos experimentais, o que tornou difícil a sua detecção. Durante sua involução, foram observadas hipertrofia das células foliculares, espessamento da teca e oclusão gradativa do lume.
6. Variações nos valores de IGS não foram observadas dentro dos grupos nem entre eles. Isso pode ser devido ao fato de ser espécie de desova parcelada e que pode não apresentar variação brusca da gônada em períodos de tempo curtos.
7. Valores mais altos de IHS foram registrados no grupo que recebeu a dose de hormônio de crescimento, o que coincidiu com maior quantidade de ovócitos em início de vitelogênese.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AZEVEDO, C. J. C. **Estudo ultra-estrutural do ovário de *Xiphophorus helleri* durante a ovogênese.** Universidade do Porto, Portugal, 1976. 293 p. (Tese: Doutorado).
- BALDISSEROTTO, B. **Fisiologia de peixes aplicada à piscicultura.** Santa Maria : Ed. UFSM, 2002. 212p.
- 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. Cortical alveoli in oocytes of freshwater neotropical teleost fish. **Bollettino di Zoologia**, 61:301-308, 1994.
- BAZZOLI, N.; RIZZO, E. A comparative cytological and cytochemical study of the oogenesis in ten Brazilian teleost fish species. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, 4: 399-410, 1990.
- BAZZOLI, N.; RIZZO, E. Reabsorção de folículos atresicos em *Astyanax bimaculatus lacustris* (Pisces, Teleostei) mantidos em confinamentos. **BIOS, Cadernos de Ciências Biológicas da PUC-MG**, 2:37-41, 1995.
- BAZZOLI, N.; RIZZO, E.; CHIARINI-GARCIA, H.; FERREIRA, R. M. A. Ichthyofauna of the Paranaíba river in the área to be flooded by the Bocaina reservoir, Minas Gerais, Brazil. **Ciência e Cultura**, 43:451-453, 1991.
- BEGOVAČ, P. C.; WALLACE, R. A. Stages of oocyte development in the pipefish, *Syngnathus scovelli*. **Journal of Morphology**, 197: 353-369, 1988.
- 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).
- BENJAMIN, L. A. **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 efeito do hormônio de crescimento.** UNICAMP, Campinas, 2004. 142 p. (Tese: Doutorado).
- BERN, H. A. Functional evolution of prolactin and growth hormone in lower vertebrates. **American Zoologist**, 23:663-671, 1983.

- BRITISKI, H. A.; SATO, Y.; ROSA, A. B. S. **Manual de peixes da região de Três Marias (com chaves de identificação para os peixes da Bacia do São Francisco)**. Brasília, Câmara dos Deputados, Coordenação de Publicações – CODEVASF, Divisão de Piscicultura e Pesca, 1988, 143 p.
- 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 and Tissue Research**, 287:535-540, 1997.
- CEMIG/CETEC - COMPANHIA ENERGETICA DE MINAS GERAIS, FUNDAÇÃO CENTRO TECNOLÓGICO DE MINAS GERAIS. **Guia ilustrativo de peixes do rio Grande**. Belo Horizonte: CEMIG/CETEC, 2000. 144p.: il, mapa.
- CHATTERJEE, A. B.; DUTTA, R.; GHOSH, R. Impact of carbofuran in the oocyte maturation of catfish, *Heteropneustes* (Bloch). **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, 32:426-430, 1997.
- 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. **Revista Brasileira de Zoologia**, 18:1065-1072, 2001.
- CONNAUGHTON, M. A.; AIDA, K. Female reproductive system, in fish. In: KNOBIL, E.; NEILL, J.D. **Encyclopaedia of reproduction**. San Diego: Academic Press. p.193-205, 1998.
- COPELAND, K. C.; NAIR, K. S. Acute growth hormone effects on amino acid and lipid metabolism. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, 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. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, 87:7507-7511, 1990.
- COWARD, K.; BROMAGE, N. R. Histological classification of oocyte growth and the dynamics of ovarian recrudescence in *Tilapia zilli*. **Journal of Fish Biology**, 53:285-302, 1998.
- 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. v.8, p.455-597, 1983.
- DROLLER, M. J.; ROTH, T. F. An electron microscope study of yolk formation during oogenesis in *Lebistes reticulatus guppyi*. **The Journal of Cell Biology**, 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. 123 p. (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. **Journal of Experimental Zoology**, 287:176-182, 2000.
- FENERICH-VERANI, N.; GODINHO, H. M.; NARAHARA, M. Y. The size composition of the eggs of curimbatá, *Prochilodus scrofa* Steindachner 1881, induced to spawn with human chorionic gonadotropin (HCG). **Aquaculture**, 42:37-41, 1984.
- FURTADO, J. F. R. **Piscicultura: uma alternativa rentável.** Guaíba: Agropecuária. 180 p, 1995.
- GARCÍA-ALONSO, J.; VIZZIANO, D. Induction of oocyte maturation in the White croaker *Micropogonias furnieri* (Pisces: Sciaenidae) by human chorionic gonadotropin. **Brazilian Journal of Biology**, 64:73-80, 2004.
- GARCIA, J. A. D.; CHINI, H.; A. S.; MAISTRO, E. L.; QUAGIO-GRASSIOTTO, I. Dynamics and cytochemistry of oogenesis in *Astyanax fasciatus* (Cuvier) (Teleostei, Characiformes, Characidae) from rio Sapucaí, Minas Gerais State, Brazil. **Revista Brasileira de Zoologia**, 18:1057-1064, 2001.
- GODINHO, H. M.; ROMAGOSA, E.; CESTAROLLI, M. A.; NARAHARA, M. Y.; FENERICH-VERANI, N. Reprodução induzida de curimbatá, *Prochilodus scrofa*, Steind. 1881, sob condições de cultivo experimental. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, 8:113-119, 1984.
- GOMES, J. M.; MOUROT, B.; FOSTIER, L.; LE GAC, F. Growth hormone receptors in ovary and liver during gametogenesis in female rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Journal of Reproduction and Fertility**, 11:275-285, 1999.
- GRIER, H. J. Ovarian epithelium and folliculogenesis in the common snook, *Centropomus undecimalis* (Teleostei, Centropomidae). **Journal of Morphology**, 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.
- GRIER, H. J.; URIBE, M. C.; PARENTI, L. R. Germinal epithelium, folliculogenesis, and postovulatory follicles in ovaries of Rainbow Trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum, 1792) (Teleostei, Protacanthopterygii, Salmoniformes). **Journal of Morphology**, 268:293-310, 2007.

- GUIMARAES, A. C. D.; QUAGIO-GRASSIOTTO, I. Ultrastructural aspects of oogenesis and oocyte primary growth in *Serralsalmus spilopleura* (Teleostei, Characiformes, Characidae). **Tissue & Cell**, 3:241-248, 2001.
- GURAYA, S. S. **The cell and molecular biology of fish oogenesis**. Basel: Ed. Sauer, H. W. Karger. 223p, 1986.
- HIGASHINO T.; MIURA. T.; MIURA, C.; YAMAUCHI, K. Effects of two sex steroid hormones on early oogenesis in Japanese huchen (*Hucho perryi*). **Fish Physiology and Biochemistry**, 28:343–344, 2003.
- HOLLAND, M. C. H.; HASSIM, S.; ZOHAR, Y. Effects of long-term testosterone, gonadotropin-releasing hormone agonist, and pimozide treatments on gonadotropin II levels and ovarian development in juvenile female striped bass (*Morone saxatilis*). **Biology of Reproduction**, 59: 1153-1162, 1998.
- HULL, K. I.; HARVEY, S. Growth hormone: roles in female reproduction (review). **Journal of Endocrinology**, 168:1-23, 2001.
- KLAUSEN, C.; CHANG, J. P.; HABIBI, H. R. The effect of gonadotropin-releasing hormone on growth hormone and gonadotropin subunit gene expression in the pituitary of goldfish, *Carassius auratus*. **Comparative Biochemistry and Physiology**, 129:511-516, 2001.
- KOBAYASHI, H; IWAMATSU, T. Fine structure of the storage micropocket of spermatozoa in the ovary of the guppy *Poecilia reticulata*. **Zoological Science**, 19: 545-555, 2002.
- KOURIL, J.; LINHART, O.; RELOT, P. Induced spawning of perch by means of a GnRH analogue. **Aquaculture International**, 5:375-377, 1997.
- LAMBERT, J. G. The ovary of the guppy *Poecilia reticulata*, the atretic follicle, a corpus atreticum or a corpus luteum preovulations. **Zeitschrift Zellforschung**, 107: 54-67, 1970.
- LANG, I. Electron microscopic and histochemical investigations of the atretic oocyte of *Perca fluviatilis* L. (Teleostei). **Cell and Tissue Research**, 220: 201-212, 1981a.
- LANG, I. Electron microscopic and histochemical study of the postovulatory follicles of *Perca fluviatilis* L. (Teleostei). **General and Comparative Endocrinology**, 45: 219-233, 1981b.
- LE GAC, F.; BLAISE, O.; FOSTIER, A.; LE BAIL, P. Y.; LOIR, M.; MOUROT, B.; WEIL, C. Growth hormone (GH) and reproduction: a review. **Fish Physiology and Biochemistry**, 11:219-232, 1993.

- LIMA, F. C. T.; MALABARBA, L. R.; BUCKUP, P. A.; PEZZI DA SILVA, J. F.; VARI, R. P.; HAROLD, H.; BENINE, R.; OYAKAWA, O. T.; PAVANELLI, C. S.; MENEZES, A.; LUCENA, C. A. S.; MALABARBA, M. C. S. L.; LUCENA, Z. M. S.; REIS, R. E.; LANGEANI, F.; CASSATI, L.; BERTACO, V. A.; MOREIRA, C.; LUCINDA, P. H. F. Genera Incertae Sedis in Characidae. P. 106-169, 2003. In: REIS, R. E.; KULLANDER, S.O.; FERRARIS, C. J. (Orgs.) **Check list of the freshwater fishes of South and Central America**. Porto Alegre:EDIPUCRS. 729 p., 2003.
- LIMA, R. L. V. A.; BERNARDINO, G.; VAL-SELA, M. V.; FAVA-DE-MORAES, F.; BORELLA, M. I. Tecido germinativo ovariano e ciclo reprodutivo de pacus (*Piaractus mesopotamicus* Holmberg, 1887) mantidos em cativeiro. **Boletim Técnico do CEPTA**, 4:1-46, 1991.
- LINARES-CASENAVE, J.; VAN EENENNAAM, J. P.; DOROSHOV S. I. Ultrastructural and histological observations on temperature-induced follicular ovarian atresia in the white sturgeon. **Journal of Applied Ichthyology**, 18: 382–390, 2002.
- MACLEAN, E.; DONALDSON, E. M.; MAYER, I.; TESKEREDZIC, Z.; PITT, C.; SOUZA, L. M. Evaluation of a sustained-release polymer-encapsulated of coho salmon, *Oncorhynchus kisutch*. **Aquaculture**, 122: 359-368, 1994.
- MACLEAN, E.; DONALDSON, E. M.; MAYER, I.; TESKEREDZIC, Z.; PITT, C.; SOUZA, L. M. Impact of a controlled release formulation of recombinant bovine growth hormone upon growyih and seawater adaptation in coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*) and Chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*). **Aquaculture**, 156:113-128, 1997.
- MAZZONI, R.; MENDONÇA, R. S.; CARAMASCHI, E. P. Reproductive biology of *Astyanax janaeensis* (Osteichthyes, Characidae) from the Ubatiba River, Maricá, RJ, Brazil. **Brazilian Journal of Biology**, 65:643-649, 2005.
- MELO, F. C. S. A.; MALDONADO, I. R. S. C.; BENJAMIN, L. A.; MATTA, S. L. P. Biologia reprodutiva de fêmeas de lambari-prata (*Astyanax scabripinnis*)(Characidadae, Tetragonopterinae) em tanques de piscicultura. **Revista Ceres**, 52:811-829, 2005.
- 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 aqüicultura**. UFMG, Belo Horizonte, 1996. 138 p. (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 Regulation**, 5:164-167, 1995.

- MOTTA, C. M.; CAPRIGLIONE, T.; FREZZA, V.; SIMONIELLO, P.; TAMMARO, S.; FILOSA, S. Oogenesis at subzero temperatures: a comparative study of the oocyte morphology in nine species of Notothenioids. **Tissue and Cell**, 37:233–240, 2005.
- MUNOZ, M.; CASADEVALL, M.; BONET S. The ovarian morphology of *Scorpaena notata* shows a specialized mode of oviparity. **Journal of Fish Biology**, 61:877-887, 2002
- 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.
- NAGAHAMA, Y.; YOSHIKUNI, M.; YAMASHITA, M.; TOKUMOTO, T.; KATSU, Y. Regulation of oocyte growth and maturation in fish. **Current Topics on Developmental Biology**, 30:103-45, 1995.
- NICOLL, C. S.; TARPEY, J. F.; MAYER, G. L.; RUSSELL, S. M. Similarities and differences among prolactins and growth hormones and their receptors. **American Zoologist**, 26:965-983, 1986.
- PELIZARO, M. G.; LEME DOS SANTOS, H. S.; LOPES, R. A.; CASTAGNOLI, N. Rhythm of development in the oocyte of the tambuí *Astyanax bimaculatus* (Reinhardt, 1874) (Pisces:Characidae). A morphometric and histochemical study. **Archives of Biology**, 92:41-431, 1981.
- PEREIRA FILHO, H. P. **Biologia reprodutiva de fêmeas de lambari-prata, *Astyanax scabripinnis*, 1842 (Characidae: Teleostei) em condições de cativeiro.** UFV, Viçosa, 2000. 94p. (Dissertação, Mestrado).
- PEYON, P.; BALOCHE, S.; BURZAWA-GÉRARD, E. Potentiating effect of growth hormone on vitellogenin synthesis induced by 17 $\beta$ -estradiol in primary culture of female silver eel (*Anguilla anguilla* L.) hepatocytes. **General and Comparative Endocrinology**, 102: 263-273, 1996.
- PRISCO, M.; RICCHIARI, L.; MONTELLA, R.; LIGUORO, A.; ANDREUCCETTI, P. The nucleolus and its modifications during oogenesis of *Torpedo marmorata*. **Journal of Fish Biology**, 65:1489-1497, 2004.
- RAVAGLIA, M. A.; MAGGESE, M. C. Ovarian follicle ultrastructure in the teleost *Synbranchus marmoratus* (Bloch, 1795), with special reference to the vitelline envelope development. **Tissue and Cell**, 35:9-17, 2003.
- REDDING, J. M.; PATIÑO, R. Reproductive physiology In: EVANS, D. H. (Ed.). **The physiology of fishes.** Boca Raton (Florida): CRC Press, Marine Sciences Series, p.503-534, 1993.

- RIBEIRO, V. M. A.; BAZZOLI, N.; MARIA, T. A.; SANTOS, G. B. Ultrastructural changes in female hepatocytes during ovarian maturation of *Steindachnerina insculpta* (Pisces: Curimatidae). **Brazilian Journal of Biology**, 66: 957-962, 2006.
- RICARDO, M. C. P.; AGUIAR, C. A.; RIZZO, E.; BAZZOLI, N. Morfologia da micrópila e da célula micropilar em teleósteos neotropicais de água doce. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, 48 (Supl. 1): 17-24, 1996.
- RIEHL, R.; GREVEN, H. Electronmicroscopical studies on oogenesis and development of egg envelopes in two viviparous teleosts, *Heterandria formosa* (Poeciliidae) and *Ameva splendens* (Goodeidae). **Z. Beitr. N.F.**, 33: 247-252, 1990.
- RIEHL, R.; GREVEN, H. Fine structure of egg envelopes in some viviparous goodeid fishes, with comments on the relation of envelope thinness to viviparity. **Canadian Journal of Zoology**, 71: 91-97, 1993.
- RIZZO, E.; BAZZOLI, N. Follicular atresia in curimatá-pioa *Prochilodus affinis* Reinhardt (Pisces, Characiformes). **Revista Brasileira de Biologia**, 55: 697-703, 1995.
- RIZZO, E.; BAZZOLI, N. Atresia folicular em surubins *Pseudoplatystoma coruscans* submetidos à hipofisacão. IN: Miranda, M. O. T. (org.). **Surubim**. Belo Horizonte:IBAMA, 1997. p. 91-100 (Coleção Meio Ambiente, Série Estudos Pesca, 19).
- RIZZO, E.; SATO, Y.; BARRETO, B. P.; GODINHO, H. P. Adhesiveness and surface patterns of eggs in neotropical freshwater teleosts. **Journal of fish Biology**, 61:615-632, 2002.
- RODRIGUES L. P.; QUEROL, E.; BRACCINI, M. C. Descrição morfo-histológica do ovário de *Acestrorhynchus pantaneiro* (Menezes, 1992) (Teleostei, Characidae), em seus diferentes estádios de desenvolvimento, na bacia do rio Uruguai médio, Uruguaiana, RS. **Biodiversidade Pampeana**. PUCRS, Uruguaiana. 3:11-18, 2005.
- SAEG – **Sistema para análises estatísticas**. UFV, Central de Processamento de Dados. Viçosa , MG, 1999.
- SAIDAPUR, S. K. Follicular atresia in the ovaries of non mammalian vertebrates. **International Review of Cytology**, 54: 225-244, 1978.
- SAKAMOTO, T.; MC CORMICK, S. D.; HIRANO, T. Osmoregulatory actions of growth hormone and its mode of action in salmonids: a review. **Fish Physiology and Biochemistry**, 11:155-164, 1993.

- SAMPAIO, K. H. **Superfície ovocitária e desenvolvimento inicial de quatro espécies de peixes de interesse comercial da bacia do rio São Francisco**. UFMG, Belo Horizonte, 2006. 53p. (Dissertação, Mestrado).
- SANGIAO-ALVARELLOS, S.; ARJONA, F. J.; MÍGUEZ, J. M.; MARTIN DEL RIO, M. P.; SOENGAS, J. L.; MANCERA, J. M. Growth hormone and prolactin actions on osmoregulation and energy metabolism of gilthead sea bream (*Sparus auratus*). **Comparative Biochemistry and Physiology**, 144:491–500, 2006.
- SANTIN, M.; DI BENEDETTO, M.; BIALETZKI, A.; NAKATANI, K.; SUIBERTO, M. R. Aspectos da dieta de larvas de *Astyanax janiroensis* (EIGENMANN,1908) (Osteichthyes, Characidae) no reservatório de Guaricana, Rio Arraial, Estado do Paraná. **Boletim do Instituto de Pesca**, São Paulo, 31: 73-80, 2005.
- SANTOS, H. B.; RIZZO, E.; BAZZOLI, N.; SATO, Y.; MORO, L. Ovarian regression and apoptosis in the South American teleost *Leprinus taeniatus* Lutken (Characiformes, Anostomidae) from the São Francisco Basin. **Journal of Fish Biology**, 67:1446-1459, 2005.
- SANTOS, H. B.; RIZZO, E.; SATO, Y.; BAZZOLI, N. Apoptosis in the involution of postovulatory follicles of *Leporinus taeniatus* LÜTKEN, 1874 (Pisces: Anostomidae) submitted to the induced spawning. **XIX Congress of the Brazilian Society of Microscopy and Microanalysis**. Proceedings.. Caxambu, MG, 2003.
- SATO, Y. **Reprodução de peixes da bacia do rio São Francisco: indução e caracterização de padrões**. UFSCar, São Carlos, 1999. 179 p. (Tese, Doutorado).
- SEIDELIN, M.; MADSEN, S. S. Prolactin antagonizes the seawater-adaptive effect of cortisol and growth hormone in anadromous brown trout (*Salmo trutta*). **Zoological Science**, 14:249-256, 1997.
- SEIDELIN, M.; MADSEN, S. S. Endocrine control of Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase and chloride cell development in brown trout (*Salmo trutta*): interaction of insulin-like growth factor-I with prolactin and growth hormone. **Journal of Endocrinology**, 162:127-35, 1999.
- SELMAN, K.; WALLACE, R. A. Gametogenesis in *Fundulus heteroclitus*. **American Zoologist**, 26: 173-192, 1986.
- SELMAN, K.; WALLACE, R. A. Cellular aspects of oocyte growth in teleosts. **Zoological Science**, 6: 211-231, 1989.
- SZABÓ, T. Ovulation induction in northern pike *Esox lucius* L. using different GnRH analogues, ovaprim, dugin and carp pituitary. **Aquaculture Research**, 34:479-486, 2003.

- TALMELLI, E. ; KAVAMOTO, E. T.; NARAHARA M. Y. ; FENERICH-VERANI N. Reprodução Induzida da Piabanha, *Brycon insignis* (Steindachner, 1876), Mantida em Cativeiro. **Revista Brasileira de Zootecnia**, 31, 803-811, 2002.
- TUNDISI, J. Construção de reservatórios e previsão de impactos ambientais no Baixo Tietê: Problemas limnológicos. **Biogeografia**, v. 13, 1-20, 1978.
- TYLER, C. R.; SUMPTER, J. P. Oocyte growth and development in teleosts. **Reviews in Fish Biology and Fisheries**, 6: 287-318, 1996.
- VAN DER KRAAK, G.; ROSENBLUM, P. M.; PETER, R. E. Growth hormone-dependent potentiation of gonadotropin-stimulated steroid production by ovarian follicles of the goldfish. **General Comparative and Endocrinology**, 79:233-239, 1990.
- VAZZOLER, A. E. A. M. **Biologia da reprodução de peixes teleósteos: teoria /prática**. Maringá: EDUEM. 1996.
- VIZZIANO, D.; BEROIS, N. Histología del ovario de *Macrodon ancylodon* (Bloch y Schneider, 1801) (Teleostei: Sciaenidae) ovogénesis. Folículos post-ovulatorios. Atresia. **Revista Brasileira de Biologia**, 50:523-536, 1990.
- WALLACE, R. A.; SELMAN, K. Celular and dynamic aspects of oocyte growth in teleosts. **American Zoologist**, 41:199-222, 1981.
- WILLIOT, P.; GULYAS, T.; CEAPA, C. An analogue of GnRH is effective of ovulation and spermiation in farmed Siberian sturgeon *Acipenser baerii* brandt. **Aquaculture Research**, 33:735-737, 2002.
- WOYNAROVICH, E.; HORVATH, L. The artificial propagation of warm-water finfish – A manual for extension. **FAO Fish Technical Paper**, v. 201, 183p., 1980.
- YAMAGUCHI, K.; KENG, D. S.; SPECKER, J. L.; NISHIOKA, R. S.; HIRANO, T.; BERN, H.A. Amino acid sequence of growth hormone isolated from medium of incubated pituitary glands of tilapia (*Oreochromis mossambicus*). **General Comparative and Endocrinology**, 81:323-331, 1991.
- YANAGIMOTO, T.; HUMPHREYS, R. Maturation and reproductive cycle of female armorhead *Pseudopentaceros wheeleri* from the southern Emperor–northern Hawaiian Ridge Seamounts. **Fisheries Science**, 71: 1059–1068, 2005.
- ZANIBONI FILHO, E.; BARBOSA, N. D. C. Priming hormone administration to induce spawning of some brazilian migratory fish. **Revista Brasileira de Biologia**, 56:655-659, 1996.