

# Morfologia da micrópila e da superfície dos ovócitos de piracanjuba, *Brycon orbignyanus* (Osteichthyes, Characidae), sob microscopia eletrônica de varredura

Luciana Nakaghi Ganeco<sup>1</sup> e Laura Satiko Okada Nakaghi\*

<sup>1</sup>Centro de Aquicultura da Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, São Paulo, Brasil. <sup>2</sup>Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Unesp. Via de Acesso Prof. Paulo Donato Castellane, km 5, 14884-900, Jaboticabal, São Paulo, Brasil. \*Autor para correspondência. e-mail: Inganeco@fcav.unesp.br ou laurankg@fcav.unesp.br

**RESUMO.** Este trabalho analisou a morfologia dos ovócitos de *Brycon orbignyanus* (Osteichthyes, Characidae), por meio de análises em microscopia eletrônica de varredura (MEV). Amostras de ovários de piracanjubas adultas foram coletadas. No período reprodutivo, realizou-se a indução hormonal nas fêmeas para coleta dos ovócitos após a extrusão. As amostras foram fixadas e processadas para observação em MEV. Os resultados mostraram que os ovócitos de *B. orbignyanus* apresentaram o epitélio folicular formado por uma única camada de células com formato achatado, recobrimdo toda a zona radiata. Esta mostrou uma superfície lisa e regular com inúmeros poros. A micrópila apresentou forma de funil, com presença de vários sulcos ou pregas. A superfície do ovócito em torno da abertura micropilar mostrou poros mais próximos uns dos outros em relação a outras áreas da superfície da zona radiata.

**Palavras-chave:** morfologia, ovócito, micrópila, teleósteo, *Brycon orbignyanus*.

**ABSTRACT. Morphology of the micropyle and oocyte surface of piracanjuba, *Brycon orbignyanus* (Osteichthyes Characidae), with scanning electron microscopy.** This paper studied the morphology of oocytes of *Brycon orbignyanus*, (Osteichthyes, Characidae), through observation in Scanning Electron Microscopy (SEM). Fragments of the ovaries from adult females were collected. During the reproductive period, a hormonal induction in females was carried out to collect the oocytes after extrusion. The samples were fixed and processed for observation in SEM. Results showed that the oocytes of *B. orbignyanus* had a follicular epithelium formed by a single layer of cells with compressed shape, covering the whole radiata zone that showed a smooth and regular surface with innumerable pores. The micropyle had a funnel-shaped, containing several furrows. The oocyte surface around the micropyle presented pores closer of each other than the other surface areas of radiata zone.

**Key words:** morphology, oocyte, micropyle, teleost, *Brycon orbignyanus*.

## Introdução

A produção de peixes do gênero *Brycon* vem se destacando na piscicultura nacional, já que várias espécies têm apresentado excelentes características para criação. *Brycon orbignyanus*, vulgarmente conhecido como piracanjuba, encontra-se ameaçada de extinção em virtude da construção de um grande número de barragens hidrelétricas que impedem a sua migração reprodutiva e também pelo desmatamento ciliar que reduz a disponibilidade da sua alimentação natural, o que se agrava ainda mais com a deterioração da qualidade da água devido à poluição (Paiva, 1982).

Esta espécie possui hábito alimentar onívoro e realiza piracema nos meses chuvosos (Castagnolli,

1992). Sua produção tem despertado grande interesse não só por sua carne de excelente qualidade, sendo por isso considerado um dos mais saborosos peixes de água doce, mas também por ser muito apreciado em pescas esportivas devido seu comportamento agressivo quando fisgado, além de possuir um rápido crescimento e facilidade de cultivo (Vaz *et al.*, 2000).

Em cativeiro, a piracanjuba tem mostrado dificuldades na reprodução. Sabe-se que na prática da indução artificial geralmente ocorre perda de reprodutores provavelmente pelo estresse de manejo, identificado com grande descamação, seguida de morte.

O pleno conhecimento dos eventos morfológicos da ovogênese contribui para sua melhor compreensão e desenvolvimento de técnicas de manejo mais eficientes na piscicultura (Nagahama, 1983; Guraya, 1986), as quais devem ser analisadas também em *B. orbignyanus*, para tentar minimizar e tentar solucionar os problemas de propagação e sobrevivência desta espécie, sob condições de reprodução induzida. Além disso, o padrão de superfície do ovócito e a morfologia do aparelho micropilar constituem um importante critério para a identificação de diferentes espécies de teleosteos (Richl, 1980; Guraya, 1986) e o estudo em microscopia eletrônica de varredura permite a observação de imagens tridimensionais, proporcionando uma melhor identificação da superfície das estruturas. Considerando esses fatos, nosso objetivo foi estudar a morfologia dos ovócitos de *B. orbignyanus*, por meio de análises em microscopia eletrônica de varredura.

#### Material e métodos

Piracanjubas adultas (*B. orbignyanus*) ( $1126,62 \pm 409,38$  g e  $46,17 \pm 4,28$ cm) foram mantidas em tanques pertencentes ao Centro de Aquicultura da Unesp (Caunesp) em Jaboticabal, Estado de São Paulo.

As coletas de amostras foram realizadas bimestralmente, durante 1 ano. As piracanjubas foram retiradas dos tanques e anestesiadas com Benzocaína (1g/10 mL de álcool + 15 L de água). Posteriormente, foi realizada uma incisão ventral ampla em cada exemplar para a retirada dos ovários. Porções das regiões cranial, medial e caudal foram coletadas.

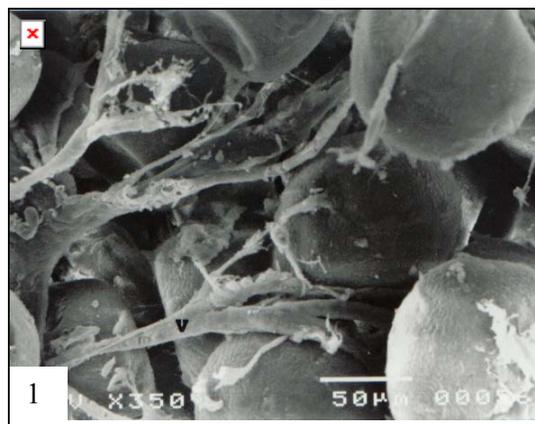
No início do verão, dezembro, foi realizada a indução hormonal nas fêmeas de piracanjuba segundo as técnicas de Woynarovich e Horvath (1983) para que fosse possível a observação da micrópila. Foram aplicadas duas doses de hipófise de carpa (0,5 mg/kg e 5,0 mg/kg) em intervalo de 12 horas. A extrusão dos ovócitos ocorreu 13 horas após a aplicação da segunda dose, quando os ovócitos foram coletados.

As amostras foram fixadas em solução de glutaraldeído a 2,5%, por 24 horas. Em seguida, foram lavadas em solução tampão fosfato 0,1 M, pH 7,2; pós-fixadas em solução de tetróxido de ósmio a 1%, por 2 horas a 5°C e lavadas no mesmo tampão. A desidratação ocorreu em série crescente de etanol. A secagem do material foi realizada ao ponto crítico com líquido CO<sub>2</sub> e as peças montadas em suporte para, em seguida, serem metalizadas com ouro-paládio. O material

foi examinado e eletronicografado em microscópio eletrônico de varredura JEOL (JSM - 5410), da FCAV-Unesp.

#### Resultados e discussão

Verificou-se pela microscopia eletrônica de varredura (MEV) que os ovários de *Brycon orbignyanus* apresentaram uma intensa vascularização disponível aos ovócitos mais desenvolvidos (Figura 1), além da presença de vasos típicos da teca sobre a superfície de ovócitos vitelogênicos (Figura 2). Tais características também foram observadas em *Brycon hilarii* (Zaiden, 2000), que apresentaram ovários com intensa irrigação sanguínea nos ovários em desenvolvimento e discreta vascularização nos ovários menos desenvolvidos.



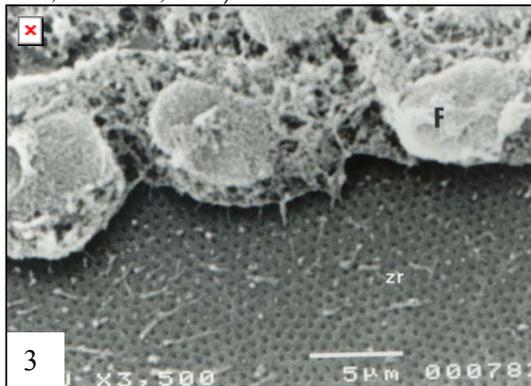
**Figura 1.** Eletronmicrografia de varredura destacando a presença de intensa vascularização (v) no ovário em maturação de piracanjuba, *Brycon orbignyanus*



**Figura 2.** Ovócito vitelogênico com destaque para a intensa vascularização (seta)

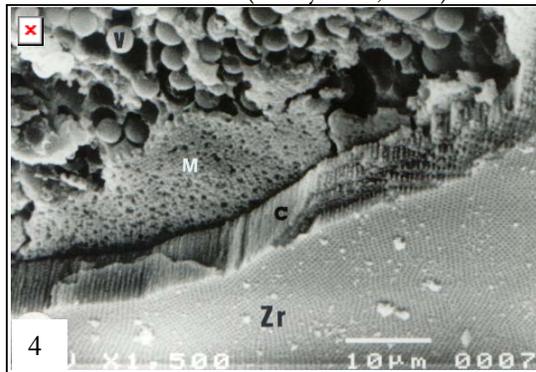
Segundo Guraya (1994), durante o desenvolvimento ovocitário, ocorre a formação do

envelope folicular em torno do ovócito, sendo constituído por teca, membrana basal, epitélio folicular e zona radiata. Nos ovócitos de *B. orbignyanus* observados em MEV, epitélio folicular ou camada granulosa mostrou-se formado por uma única camada de células com formato achatado, dispostas lado a lado, recobrendo toda a zona radiata (Figura 3). Cruz-Landim e Cruz-Höfling (1989) constataram que as células foliculares apresentam-se altas, com superfície apical muito irregular. A parede folicular que contorna os ovócitos de teleósteos é composta por um espaço acelular (o envelope vitelino) e as células da camada folicular (Guraya, 1986; York *et al.*, 1993).



**Figura 3.** Zona radiata (Zr) abaixo da camada de células foliculares (F), observada em ovócito vitelogênico

Abaixo da camada folicular observou-se a membrana do ovócito sobre os grânulos de vitelo (Figura 4). A zona radiata apresentou uma superfície lisa e regular com inúmeros poros ou canais (Figuras 3 e 4) mostrando um aspecto de “peneira”. Os inúmeros microvilos presentes, tanto na membrana da superfície do ovócito quanto no epitélio folicular, atravessam esses canais (Guraya *et al.*, 1975).

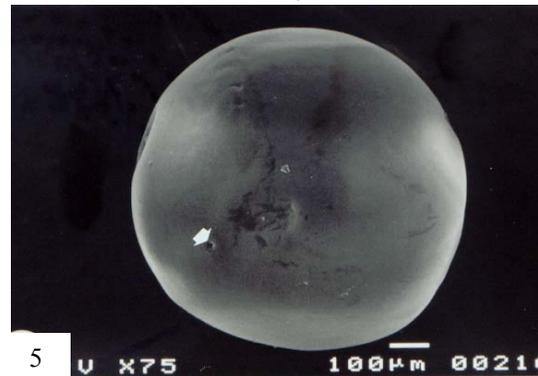


**Figura 4.** Detalhes do interior do ovócito vitelogênico, com seus grânulos de vitelo (v), parte da membrana do ovócito (M) e zona radiata (Zr), com destaque para os canais que a atravessam (c)

A superfície do ovócito em torno da abertura micropilar mostrou poros mais próximos uns dos outros em relação a outras áreas da superfície da zona radiata. (Figura 6). De acordo com Riehl (1993), a disposição dos poros ou canais da zona radiata e a morfologia da micrópila são características espécie-específicas que podem ser observadas na superfície de ovos recém-desovados. Rizzo *et al.* (2002) constataram que vários Characiformes, entre eles o *B. orbignyanus*, apresentaram os poros-canais da zona radiata regularmente espaçados no pólo vegetativo, com maior diâmetro e densidade no pólo animal e em direção à micrópila. Esse aumento de poros na região micropilar pode auxiliar na melhor aeração do embrião (Braum, 1978, citado por Rizzo, 2001). Rizzo *et al.* (2002) relataram que variações são observadas no padrão de arranjo dos poros, que podem apresentar formato hexagonal ou serem distribuídos irregularmente. O *B. orbignyanus* é uma espécie migradora, sendo assim, possui ovos livres ou não adesivos que apresentam zona radiata lisa com poros-canais, como constatado pelos autores acima citados.

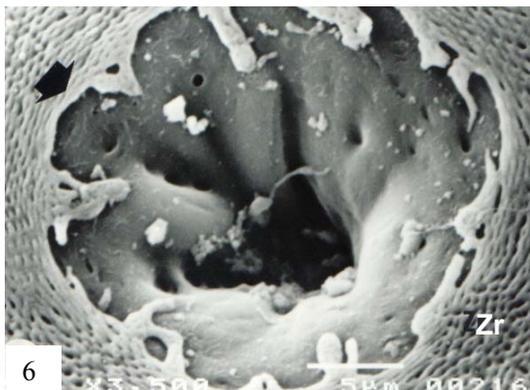
A micrópila nos ovócitos de *B. orbignyanus* foi observada em MEV apenas após a desova, pois existe uma célula altamente especializada na camada folicular, a célula micropilar, que atua como um tampão deste orifício, como constatado por Ganeco *et al.* (2001) em microscopia de luz, nesta mesma espécie. A posição e a estrutura da micrópila podem ser determinadas por essa célula micropilar (Iwamatsu, 2000). Segundo Guraya (1986), durante a desova, a camada de células foliculares se rompe e o ovócito é expelido para a cavidade ovariana, permitindo a visualização da micrópila.

Caracterizou-se a micrópila no ovócito de *B. orbignyanus* como uma depressão na zona radiata (Figura 5). O vestíbulo micropilar apresentou forma de funil, com presença de vários sulcos ou pregas com disposição retilínea (Figura 6).



**Figura 5.** Ovócito após desova, com presença de micrópila (seta)

A micrópila caracteriza-se como uma pequena abertura localizada no polo animal da célula (Laale, 1980), através do qual o espermatozóide penetra no ovócito (Riehl, 1993). A forma afunilada da micrópila revela que a abertura interna do canal permite a entrada de um único espermatozóide de acordo com estudos realizados por Kobayashi e Yamamoto (1981); Hart e Donovan (1983); Rizzo e Bazzoli (1993). Sua morfologia varia em diferentes espécies de peixes (Laale, 1980; Guraya, 1986), entretanto, na maioria dos teleósteos apresenta forma de funil (Guraya, 1986; Hart, 1990; Iwamatsu, 2000).



**Figura 6.** Detalhes da micrópila (seta) e poros da zona radiata (Zr)

Segundo Riehl (1993), a superfície da região micropilar pode apresentar espécie-especificidade. Entretanto a micrópila de *B. orbignyanus* mostrou-se semelhante ao relatado por Rizzo (2001), em espécies do gênero *Brycon* e *Salminus*, com vestíbulo em forma de cone e presença de pregas. Embora a literatura relate a espécie-especificidade do aparelho micropilar em diferentes espécies, pode existir semelhança entre elas, mostrando possíveis relações entre grupos sistemáticos (Rizzo, 2001). A relação mais estreita entre espécies do gêneros *Brycon* e *Salminus* também pode ser comprovada pelo fato dos espermatozóides destes também apresentarem semelhanças, contribuindo para reforçar a proposta de origem monofilética para essas subfamílias (Veríssimo-Silveira, 2003).

Considerando que um importante critério para a identificação de diferentes espécies de teleósteos é o padrão de superfície do ovócito e a morfologia da micrópila (Riehl, 1980; Guraya, 1986), este estudo poderá auxiliar no reconhecimento de ovos de *Brycon orbignyanus* e fornecer dados para a análise filogenética.

## Referências

- CASTAGNOLLI, N. *Criação de peixes de água doce*. Jaboticabal: Funep, 1992.
- CRUZ-LANDIM, C.; CRUZ-HÖFLING, M.A. Estudo ao microscópio eletrônico da deposição do envoltório do ovócito de peixes: I *Plagiocion squamosissimum* (Teleostei-Sciaenidae). *Naturalia*, v. 14, p. 97-105, 1989.
- GANECO, L.N. *et al.* Análise morfológica do desenvolvimento ovocitário de piracanjuba, *Brycon orbignyanus* (VALENCIENNES, 1849), durante o ciclo reprodutivo. *Boletim do Instituto de Pesca*, São Paulo, v. 27, n. 2, p. 131-138, 2001.
- GURAYA, S.S. Gonadal development and production of gametes in fish. *Proc. Indian Natl. Sci. Acad.*, New Delhi, v. B60, n. 1, p. 15-32, 1994.
- GURAYA, S.S. *et al.* Morphology of ovarian changes during the reproductive cycle of the fish, *Mystus tengara* (Ham.). *Acta Anat.*, v. 91, p. 222-260, 1975.
- GURAYA, S.S. *The cell and molecular biology of fish oogenesis*. *Monogr. Dev. Biol.*, New York, Karger, v. 18, 1986.
- HART, N.H.; DONOVAN, M. Fine structure of the chorion and site of sperm entry in the egg of *Brachydanio*. *J. Exp. Zool.*, New York, v. 227, p. 277-296, 1983.
- HART, N.H. Fertilization in teleost fishes: mechanisms of sperm-egg interactions. *Int. Rev. Cytol.*, San Diego, v. 121, p. 1-66, 1990.
- IWAMATSU, T. Fertilization in fishes. In: TARÍN, J.J.; CANO A. (Ed.). *Fertilization in Protozoa and Metazoa Animals*. Heidelberg: Springer-Verlag Berlin, 2000. p. 89-145.
- KOBAYASHI, W.; YAMAMOTO, T.S. Fine structure of the micropylar apparatus of the chum salmon egg, with discussion of the mechanism for blocking polyspermy. *J. Exp. Zool.*, New York, v. 217, p. 265-275, 1981.
- LAALE, H.W. The perivitelline space and egg envelopes of bony fishes: a review. *Copeia*, Lawrence, v. 2, p. 210-226, 1980.
- NAGAHAMA, Y. The functional morphology of teleost gonads. In: HOAR, W.S. *et al.* (Ed.) *Fish Physiology IXa. Reproduction*. New York: Academic Press, 1983. v. 9, p. 223-275.
- PAIVA, M.P. *Grandes represas do Brasil*. Brasília: Editerra, 1982.
- RIEHL, R. Micropyle of some salmonids and coregonids. *Env. Biol. Fishes*, v. 5, p. 59-66, 1980.
- RIEHL, R. Surface morphology and micropyle as a tool for identifying fish eggs by scanning electron microscopy. *Microsc. Analysis*, May, p. 29-31, 1993.
- RIZZO, E. *Biologia de ovos de peixes neotropicais de água doce: estudos comparativo e experimental, com ênfase na análise de superfície e do aparelho micropilar*. 2001. Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Minas Gerais. Belo Horizonte, 2001.
- RIZZO, E., BAZZOLI, N. Oogenesis, oocyte surface and micropylar apparatus of *Prochilodus affinis* Reinhardt, 1874 (Pisces Characiformes). *Eur. Arch. Biol.*, Zutendall, v. 104, p. 1-6, 1993.

- RIZZO, E. *et al.* Adhesiveness and surface patterns of eggs in neotropical freshwater teleosts. *J. Fish Biol.*, London, v. 61, p. 615-632, 2002.
- VAZ, M.M. *et al.* (Org.). *Guia Ilustrado de peixes da bacia do Rio Grande*. Belo Horizonte: Cemig/Cetec, 2000.
- VERÍSSIMO-SILVEIRA, R. *Ciclo reprodutivo e cinética da espermatogênese do dourado (Salminus maxillosus Valenciennes, 1849)*. 2003. Dissertação (Mestrado) - Centro de Aqüicultura, Universidade Estadual Paulista. Jaboticabal, 2003.
- WOYNAROVICH, E.; HORVATH, L. *A propagação artificial de peixes de águas tropicais*. (Manual de Extensão, 5). Brasília, DF: FAO/Codevasf - CNPq, 1983.
- YORK, W.S. *et al.* Ultrastructural changes in follicle cell-oocyte associations during development and maturation of the ovarian follicle in atlantic croaker. *Gen. Compar. End.*, v. 92, p. 402-418, 1993.
- ZAIDEN, S.F. *Morfologia gonadal e metabolismo energético da piraputanga Brycon hilarii (Cuvier e Valenciennes, 1849) (Pisces, Characidae), em cativo, durante o ciclo reprodutivo anual*. 2000. Tese (Doutorado) - Centro de Aqüicultura, Universidade Estadual Paulista. Jaboticabal, 2000.

Received on August 01, 2002.

Accepted on February 12, 2003.