

Desenvolvimento e diferenciação dos ovócitos de pacu, *Piaractus mesopotamicus* (Holmberg, 1887) (Osteichthyes, Characidae)

Elizabeth Romagosa* e Massuka Yamane Narahara

Instituto de Pesca, APTA, SAA - CPDPO, Rua Ana Pimentel, s/nº Parque da Água Branca, CEP: 05001-900, São Paulo, São Paulo, Brasil *Autor para correspondência. e-mail: romagosa@scinformatica.com.br

RESUMO. O objetivo deste trabalho foi o de esclarecer dúvidas referentes ao desenvolvimento e à diferenciação dos ovócitos de *Piaractus mesopotamicus* (Osteichthyes, Characidae), ultra-estruturalmente, acompanhando as transformações que ocorreram durante o processo de ovogênese tais como: formação e acúmulo de várias organelas, inclusões nucleares e/ou citoplasmáticas e a camada ou envelope folicular. Na fase de crescimento primário são evidentes os corpúsculos de Balbiani, mas não são claros seus papéis. Estão presentes, também, as peculiares estruturas lamelares. A segunda fase, a de crescimento secundário, caracteriza-se, inicialmente, pela formação de alvéolos corticais. A seguir, os grânulos de vitelo protéico formam-se na região periférica com abundância de mitocôndrias e ribossomos. Mudanças no epitélio folicular (*granulosa*) são descritas concomitantemente com a formação da zona radiata, que constitui o envoltório folicular (envelope).

Palavras-chave: ovogênese, ultra-estrutura, ovócitos, *Piaractus mesopotamicus*.

ABSTRACT. **Oocyte development and differentiation in pacu, *Piaractus mesopotamicus* (Holmberg, 1887) (Osteichthyes, Characidae).** This work aim is to clarify doubts about the *Piaractus mesopotamicus* (Osteichthyes, Characidae) oocyte ultrastructural development and differentiation, following the transformations during the ovogenic processes, such as formation and accumulation of various organelles, nucleolar and/or cytoplasmic inclusions, and follicular wall (envelope). During the primary growth phase, Balbiani corpuscles are evident, but their role is not clear. The peculiar lamellae structures are also present. The second phase (secondary growth) is initially characterized by cortical alveolus formation. After that, protein yolk granules appear in the peripheral regions, where mitochondria and ribosomes are abundant. Changes in the follicle epithelium (*granulosa*) are described together with the radiate zone formation, which constitutes the follicular envelope.

Key words: ovogenesis, ultrastructure, oocytes, *Piaractus mesopotamicus*.

Introdução

O pacu, *Piaractus mesopotamicus* (Characiformes), encontra-se na América do Sul, restrito à grande Bacia do Prata, com principal ocorrência no Pantanal Mato-grossense (bacia do Alto Paraguai).

A necessidade de estudos biológicos de espécies de peixes em seus habitats naturais, antes da construção de barragens, e a definição de condutas para o repovoamento de represas, foram salientadas por Bramley-Baker (1979), uma vez que como as espécies reofílicas não se reproduzem naturalmente em cativeiro, tornam-se necessários os estudos sobre sua biologia reprodutiva. Para a realização de pesquisas com a referida espécie, devido à

dificuldade encontrada em relação ao desenvolvimento das técnicas de reprodução induzida em cativeiro, no final de 1983, foi proposto convênio entre a Companhia Energética do Estado de São Paulo - CESP e o Instituto de Pesca da Secretaria de Agricultura e Abastecimento do Estado de São Paulo.

Na primeira etapa desse convênio, Romagosa (1991) e Romagosa *et al.* (1993) descreveram a organização macro e microscópica (microscopia de luz) dos ovários do pacu, caracterizando as células germinativas e estabelecendo quatro estádios de maturação gonadal para as fêmeas: repouso; maturação; maduro e regressão.

A segunda etapa, que constitui o objetivo deste trabalho, foi analisar ultra-estruturalmente os

aspectos relacionados ao desenvolvimento e ao crescimento dos ovócitos de *P. mesopotamicus*, durante o processo de ovogênese, tais como: formação e acúmulo de várias organelas; inclusões nucleares e/ou citoplasmáticas; e, a camada ou envelope folicular.

Material e métodos

Exemplares de pacu, *Piaractus mesopotamicus*, com 27 meses de idade, com médias de comprimento e peso de 35,0 cm e 700 g, foram estocados em tanques de alvenaria de 1000 m² (20,0 X 50,0 m), com densidade inicial de 1 peixe/m², durante o período compreendido entre março de 1984 a fevereiro de 1986, na Estação de Aquicultura de Jupia - Companhia Energética de São Paulo - CESP, Estado de São Paulo.

Durante o experimento, os peixes foram arraoados sistematicamente, com fornecimento de ração peletizada, com teor de proteína bruta de 30%, em uma quantidade diária correspondente a 1,5% do peso do peixe vivo nos meses frios (abril - agosto), e 3,0% naqueles mais quentes (setembro - março), sendo que os ajustes da quantidade de ração ao peso dos peixes foram feitos na ocasião das amostragens. O arraçoamento foi feito em 2 porções diárias (9h e 16h), 6 dias na semana, sendo a ração fornecida a lances.

Os ovários foram dissecados e os fragmentos da porção média (cerca de 1,0 cm) foram seccionados e pré-fixados em aldeído glutárico a 3,0% em tampão fosfatado 0,1 M, pH 7,2 por 24 horas. Após a lavagem em tampão, a pós-fixação foi de 2 horas em tetróxido de ósmio a 2%, 4°C. As amostras foram desidratadas gradativamente em álcool etílico de concentrações crescentes de 30 até 100%. Após esse processo, realizou-se a infiltração com óxido de propileno mais resina em partes iguais, durante 12 horas em temperatura ambiente. Em seqüência, as peças foram emblocadas em resina pura em moldes de silicone e mantidas em estufa a 60°C, durante 5 dias. Os blocos foram aparados, seccionados em ultra-microtomo Porter-Blum MT-2-B Sorwall, para obtenção dos cortes ultra-finos. Estes foram corados com acetato de uranila a 2%, durante 1 hora e com citrato de chumbo por 30 min e examinados em microscópio eletrônico Zeiss-EM9-S2.

Resultados e discussão

No início da fase do crescimento primário, concomitantemente com o crescimento do ovócito, há um aumento do núcleo e da quantidade de nucléolos. Passando da fase de cromatina-nucléolo

para perinucleolar, os nucléolos geralmente organizam-se na periferia do núcleo; embora essas estruturas possam configurar-se, casualmente, durante os estágios subsequentes. A Figura 1 mostra que o núcleo apresenta-se preenchido por nucleoplasma de baixa densidade, contendo alguns grânulos esparsos de cromatina, e os nucléolos, com números e tamanhos variados, localizam-se periféricamente, sendo suas formas, em princípio esféricas, tornando-se irregulares, à medida em que os ovócitos desenvolvem-se. O envoltório nuclear apresenta-se como membrana dupla separada por um espaço. Os poros nucleares são visíveis, de estruturas variáveis, permitindo a passagem de material entre as regiões intra e extranucleares. Nessa fase, há um acúmulo de RNA ribossômico coincidente com a formação de inúmeros nucléolos no núcleo ou vesícula germinativa do ovócito. As mesmas constatações ultra-estruturais foram feitas por Grier (2000).



Figura 1. Ovócito de *P. mesopotamicus*, em fase de crescimento, mostrando o núcleo e o nucléolo (nu). Pode-se observar a presença do envoltório nuclear (en) composto de duas membranas e poros nucleares (setas). À esquerda, o citoplasma com ribossomos (Ri), mitocôndrias (Mi) e inclusões lipídicas (Ip) ($\pm 12.500 \times$)

Ainda nessa fase, no citoplasma dos ovócitos de *P. mesopotamicus* pode-se observar uma grande quantidade de ribossomos livres ou agregados e, além de, uma rápida multiplicação de mitocôndrias, que se espalham por todo o citoplasma. Inicialmente, as mitocôndrias apresentam-se

ovóides, eletrobrancos e com poucas cristas e, posteriormente, tornam-se ovóides-alongadas, eletrodensas e com poucas cristas, sendo mais abundantes na fase madura. Essa associação complexa (ribossomos mais mitocôndrias) forma a estrutura conhecida como “núcleo de vitelo” (corpos = corpúsculos de Balbiani). Recentemente, Grier (2000) evidenciou as mesmas alterações estudando o robalo, *Centropomus undecimalis*.

Pode-se evidenciar ainda, a presença de estruturas lamelares (“annulate lamellae”) com características peculiares (Figuras 2 e 3). Essas estruturas aparecem desde a fase perinucleolar até a madura. Morfologicamente, uma lamela individual é formada por duas membranas paralelas perfuradas por uma série de poros, por onde as extremidades das lamelas sofrem dilatações, que entram em contato com os ribossomos, sugerindo uma continuidade com o retículo endoplasmático granular. Quanto à presença dessas estruturas em espécies de peixes tropicais de água doce, há relatos, como os de Cruz-Landim e Cruz-Höfling (1979), Narahara (1983) e Cruz-Landim (1990).



Figura 2. Ovócito de *P. mesopotamicus* no qual observa-se no citoplasma a estrutura lamelar (EL), ribossomos (Ri), mitocôndrias (Mi) e diversos grânulos de vitelo (GV) ($\pm 12.500 \times$)

Outras duas organelas estão presentes no citoplasma: a primeira, o retículo endoplasmático granular, freqüente em todas as fases de desenvolvimento dos ovócitos de *P. mesopotamicus*, o que difere das observações realizadas por Bruslé (1980), nas quais a autora relata que essa estrutura é pouco freqüente nos estágios iniciais, porém abundante na vitelogênese; e, a segunda, o complexo de Golgi, pouco freqüente em todas as fases, porém segundo Yamamoto e Onozato (1965), em *Carassius*

auratus, há uma grande quantidade, na fase final de pré-vitelogênese, a qual parece ter papel importante na formação de vesículas de vitelo. O mesmo foi observado por Yamamoto e Oota (1967) para *Brachydanio rerio*.

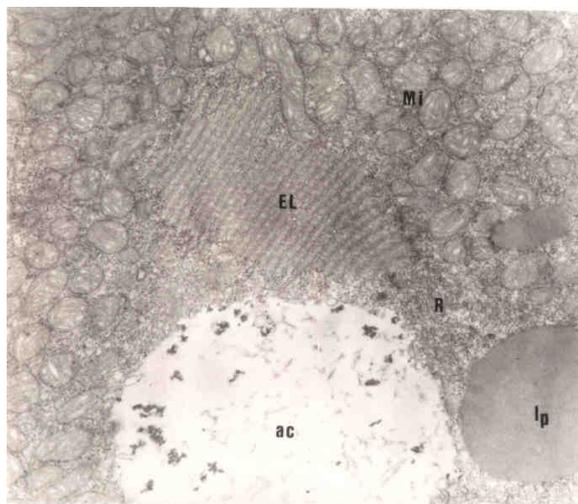


Figura 3. Ovócito de *P. mesopotamicus* mostrando os alvéolos corticais (ac), estrutura lamelar (EL), mitocôndrias (Mi), ribossomos (R) e inclusões lipídicas (lp) ($\pm 12.500 \times$)

O início da 2ª fase de crescimento dos ovócitos de *P. mesopotamicus* caracteriza-se, inicialmente, pela formação dos alvéolos corticais (fase III), como estruturas claras que se mostram com fina granulação (Figura 3). Sabe-se que os alvéolos corticais fundem-se com a zona radiata, liberando seu conteúdo (região cortical) no espaço perivitelinico no momento da fertilização, criando uma barreira à poliespermia em peixes (Ginzburg, 1972).

Nesse estudo, foi observado que os grânulos de vitelo apresentam uma membrana limitante e diferenças quanto à elétrondensidade desses grânulos. Resultados semelhantes foram encontrados por Kjesbu e Kryvi (1989), observando que essas estruturas consistem de três componentes: um ou vários corpos cristalinos; uma camada superficial amorfa e uma membrana limitante (Figura 2). Observações mostram que na espécie estudada não há coalescência dos grânulos de vitelo extra-vesicular em massa contínua. Essa mesma característica foi encontrada por Narahara (1983) para *Rhamdia hilarii*.

Pode-se notar, também, durante essa fase, a presença de um grande número de mitocôndrias, com cristas tubulares proeminentes com dupla membrana. Além dessas estruturas, os ribossomos livres estão presentes.

Quanto à origem do vitelo protéico, Selman e Wallace (1982) relatam que o vitelo atravessa a teca (via capilar) e a membrana basal, via espaço intercelular das células foliculares, e, finalmente, chega ao ooplasma por micropinocitose. É importante notar que o vitelo é transportado entre as células foliculares. Essa modalidade de vitelo tem origem, pelo menos em parte, em pontos fora do ovócito. Na espécie estudada, parece que o transporte é similar.

Os ovócitos de *P. mesopotamicus*, no processo de vitelogênese, podem ser caracterizados quando ocorre a migração da vesícula germinativa ou núcleo da posição central para a excêntrica. Embora haja a migração e a quebra da vesícula germinativa, algumas fêmeas quando induzidas, através de tratamentos hormonais, responderam positivamente e outras não, confirmado por Romagosa *et al.* (1990). De acordo com Wallace e Selman (1981), é de suma importância nessa etapa a ação hormonal.

Durante o desenvolvimento dos ovócitos na espécie estudada, as camadas foliculares sofrem modificações e estão organizadas em um envoltório ou envelope folicular, constituído de 4 camadas distintas, de fora para dentro: a teca; a membrana basal (lâmina basal); o epitélio folicular (granulosa) e a zona radiata (Figuras 4 e 5).



Figura 4. Envoltório folicular do ovócito de *Piaractus mesopotamicus* constituído de: teca externa (Te); teca interna (Ti); núcleo de célula da teca (Nt); membrana basal (mb); epitélio folicular (Fol.) e zona radiata (ZR) ($\pm 6.500 X$)

Em *P. mesopotamicus*, pode-se notar somente uma camada até a fase III, como descrita na maioria dos teleosteos. Constatou-se que a espécie estudada apresenta duas camadas: a teca externa, que é composta por uma camada de fibroblastos achatados e longos; e, a teca interna, na qual se encontram células grandes que apresentam várias organelas, tais como: mitocôndrias com cristas tubulares, retículo endoplasmático liso e complexo de Golgi (Figuras 4 e 5). Essas células são denominadas como especiais da teca, segundo Nagahama (1983), e localizam-se próximas aos capilares sanguíneos. O mesmo autor cita que a presença de mitocôndrias com cristas tubulares e retículo endoplasmático liso bem desenvolvido é característica das células produtoras de esteróides. Da mesma maneira, Guraya (1978) atribui às células tecais a produção de estrogênio que estimula a produção de vitelogenina pelo fígado, durante o processo vitelogênico. As células da teca de *P. mesopotamicus* são separadas da camada folicular ou granulosa por membrana basal (acelular), coincidindo com o observado por Narahara (1983). Segundo Bennet (1963), essa membrana age como filtro seletivo de material nutritivo e captador de íons.

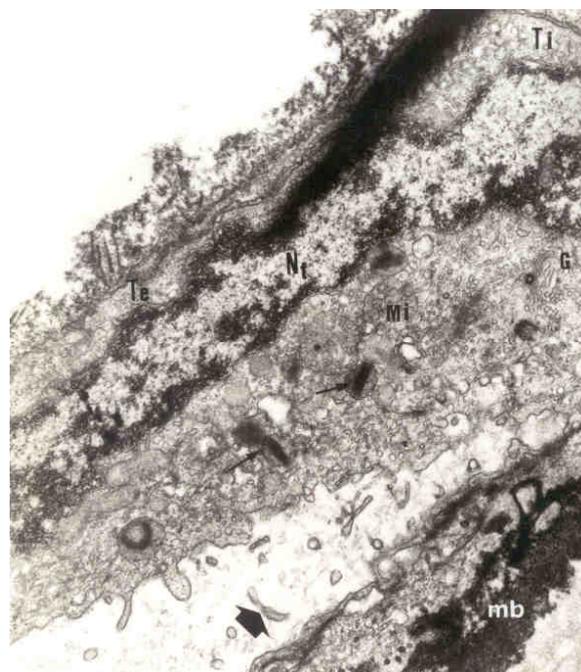


Figura 5. Detalhe do envoltório folicular mostrando as tecas externa (Te) e interna (Ti). Pode-se observar: núcleo de célula da teca interna (Nt) e citoplasma, constituído de aparelho de Golgi (G); mitocôndrias alongadas (Mi); espaço intersticial (seta grossa) e estruturas elípticas com membranas paralelas no eixo maior da estrutura (setas finas), membrana basal (mb) e folicular (*) ($\pm 12.500 X$)

As células do epitélio folicular ou camada granulosa do pacu mantêm-se planas, paralelamente à superfície do ovócito, durante sua maturação. Apresentam uma grande quantidade de ribossomos, retículo endoplasmático, complexo de Golgi, com características sugestivas de síntese protéica. Embora Nagahama (1983) acredite que essas organelas citadas não estejam associadas à esteroidogênese. Pode-se observar, em ovócitos de pacu, que à medida em que as células foliculares tornam-se mais altas, há formação de micróvilos que se projetam no interior da zona radiata em direção ao ovócito.

A membrana basal separa a camada tecal do epitélio folicular ou granulosa e possui matriz moderadamente densa (Figuras 4 e 5).

Estudos sobre a configuração da camada radiata mostram que o número de camadas varia com a espécie. Nesse trabalho, foi possível verificar que essa é constituída por 3 camadas: (1) externa, formada por material homogêneo; (2) intermediária, acumula-se material finamente granular, de difícil visualização; e, (3) interna, multilamelar, semelhante a degraus, isto é, a lamelas de forma helicoidal. Em *P. mesopotamicus* essa camada, é multilamelar, não sendo possível contar o número de lamelas existentes. Foi possível, entretanto, visualizar poros-canais por onde passam os micróvilos (Figuras 6 e 7). Na parte externa, pode-se constatar a abertura do canal microvilar (Figura 7).

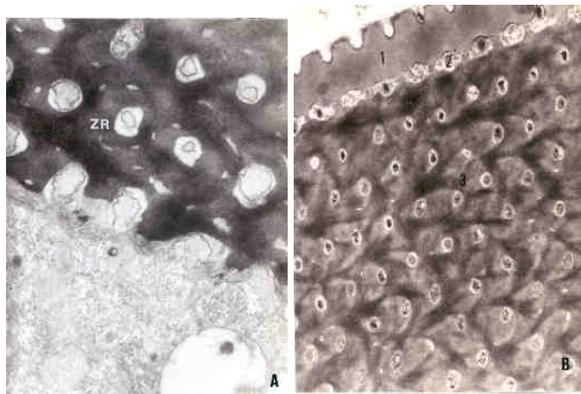


Figura 6. (A) Corte oblíquo da zona radiata (ZR) de *P. mesopotamicus* mostrando os poros dos canais desta zona ($\pm 26.500 X$); (6B) Corte tangencial da zona radiata (ZR) de *P. mesopotamicus*, na qual notamos as três camadas: (1) externa; (2) intermediária; (3) interna. Ovócito retirado com auxílio de sonda uretral (cânula plástica), portanto sem epitélio folicular ($\pm 12.500 X$)

Estudos mais recentes realizados por Rizzo (2001) mostram a adesividade e os padrões de superfície de ovos dentre os Characiformes, revelando que algumas espécies de peixes nativos pertencentes aos gêneros *Astyanax*, *Brycon*, *Collossoma*,

Piaractus, apresentam ovos livres, não adesivos, com a zona radiata lisa mostrando poros-canais abertos e ausência de tampões em sua superfície. A autora considera que os poros-canais apresentam um arranjo menos complexo em peixes teleósteos de água doce, sem especializações ou coberturas.

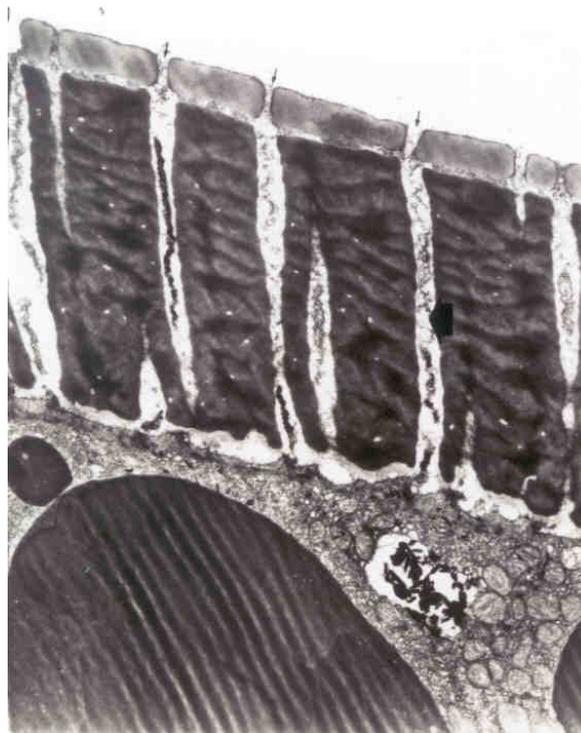


Figura 7. Corte transversal da zona radiata (ZR) de *P. mesopotamicus* mostrando as três camadas. Observa-se o canal microvilar (seta) ($\pm 12.500 X$)

Referências

- BENNET, H. S. Moving membranes as related to cell permeability and active transport. *Sym Soc. Cell Chem.*, London, v. 14, n. 1, p. 529 - 37, 1963.
- BRAMLEY-BAKER, J. M. Necessidade de estudos biológicos prévios a construção de barragens e de definição de metodologia geral para povoamento de represas, a par da possibilidade de desfrute do potencial hídrico em cultivos intensivos. *PNPD. Relatório Técnico*, Brasília, 1979.
- BRUSLÉ, S. Fine structure of early previtellogenic oocytes in *Mugil (Liza) auratus*. Risso, 1810 (Teleostei, Mugilidae). *Cell Tissue Res.*, New York, v. 207, n. 1, p. 123 - 34, 1980.
- CRUZ-LANDIM, C. Caracterização ultra-estrutural do plasma germinativo. IV. Ovócitos de *Collossoma mitrei* (Teleostei). *Revista Brasileira de Ciências Morfológicas*, São Paulo, v. 7 (suplemento), p. 24, 1990.
- CRUZ-LANDIM, C.; CRUZ-HÖFLING, M. A da. Comportamento dos nucléolos e mitocôndrias durante a

- ovogênese de peixes teleósteos de água doce. *Acta Amazonica*, Manaus, v. 9, n. 4, p. 723 - 728, 1979.
- GINZBURG, A. S. *Fertilization in fishes and the problem of polyspermy*. In: Detlaf, T. A. Israel Program for Scientific Translations. Jerusalém. p. 366, 1972.
- GRIER, H. Ovarian germinal epithelium and folliculogenesis in the common snook, *Centropomus undecimalis* (Teleostei: Centropomidae). *Journal of Morphology*, London, v. 243, n. 1, p. 265 - 281, 2000.
- GURAYA, S. S. *Maturation of the follicular wall of nonmammalian vertebrates*. In: Jones, R. E. The vertebrate ovary. Plenum, New York, p. 261 - 329, 1978.
- KJESBU, O.; KRYVI, H. Ooogenesis in cod, *Gadus morhua* L., studied by light and electron microscopy. *J. Fish Biol.*, Huntingdon, v. 34, n.1, p. 735 -746, 1989.
- NAGAHAMA, Y. *The functional morphology of teleost gonads*. In: HOAR, W. S.; RANDALL, D. J. Fish Physiology. New York, Academic Press. v. 9. Pt A, p. 233-75, 1983.
- NARAHARA, M. Y. *Estrutura da população e reprodução de Rhamdia hilarii (Va1enciennes, 1840) (Osteichthyes, Siluriformes, Pimelodidae)*. 1983. Tese (Doutorado) - Universidade de São Paulo, São Paulo, 1983.
- RIZZO, E. *Biologia de ovos de peixes neotropicais de água doce: Estudos comparativo e experimental, com ênfase na análise da superfície e do aparelho micropilar*. 2001. Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2001.
- ROMAGOSA, E. *Mudanças morfológicas (microscopia de luz e eletrônica) das gônadas de pacu, Piaractus mesopotamicus (Holmberg, 1887) durante o ciclo reprodutivo, em condições de confinamento*. 1991 Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual Paulista, 1991.
- ROMAGOSA, E. *et al.* Pattern of oocytes diameter frequency distribution in females of *Piaractus mesopotamicus* (Holmberg, 1887) (= *Colossoma mitrei* Berg, 1895) induced to spawning. *Aquaculture*, The Huttington, v. 86, n. 1, p. 105 - 110, 1990.
- ROMAGOSA, E. *et al.* Mudanças morfológicas dos ovários de pacu, *Piaractus mesopotamicus* (Holmberg, 1887), em condições de confinamento. *Boletim do Instituto de Pesca*, São Paulo, v. 20 (único), p. 67 - 80, 1993.
- SELMAN, K.; WALLACE, R. A Oocyte growth in the sheepshead minnow: uptake of exogenous proteins by vitellogenic oocytes. *Tissue Cell*, Edinburgh, v. 14, n. 1, 555 - 571, 1982.
- WALLACE, R. A.; SELMAN, K. Cellular and dynamic aspects of oocyte growth in teleosts. *Amer. Zool.*, London, v. 21, n. 1, p. 325 - 43, 1981.
- YAMAMOTO, K.; ONOZATO, H. Electron microscope study on the growing oocyte of the goldfish during the first growth phase. *Mem. Fac. Fish. Hokkaido Univ.*, Hakodate, v. 13, n. 1, p. 79 - 106, 1965
- YAMAMOTO, K.; OOTA, I. Fine structure of yolk globules in the oocyte of the zebrafish, *Brachdanio rerio*. *Annot. Zool. Jpn.*, Tokyo, v. 40, n. 1, p. 20 -27, 1967.

Received on August 17, 2001.

Accepted on March 04, 2002.