

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE  
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS:  
FISIOLOGIA**

**ESTUDO DA HISTOFISIOLOGIA DAS GÔNADAS, HIPÓFISE E  
INTERRENAL DE FÊMEAS E MACHOS DE *Rhamdia quelen* (QUOY  
AND GAIMARD, PISCES TELEOSTEI) DURANTE O CICLO  
REPRODUTIVO.**

**Tese apresentada para obtenção  
do título de Doutor em Ciências  
Biológicas: Fisiologia.  
Orientador: Prof. Dr. Guillermo  
F. Wassermann**

**VIVIANE MARA WOEHL**

**Porto Alegre**

**2001**



**SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL**  
**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL**  
**INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE**  
Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: FISILOGIA  
**Mestrado e Doutorado**  
Rua Sarmiento Leite, 500 - 2º andar  
90.050-170 - Porto Alegre - RS  
Fone/FAX: (51) 33316-34-53  
Correio eletrônico: [ppgfisio@vortex.ufrgs.br](mailto:ppgfisio@vortex.ufrgs.br)

**ATA DA SESSÃO DE DEFESA PÚBLICA DA  
TESE DE DOUTORADO**

Aos treze dias do mês de dezembro de dois mil e um, às quatorze horas, no Anfiteatro da Fisiologia, foi realizada a defesa pública da Tese de Doutorado da aluna Viviane Mara Woehl, intitulada "Estudo da Histofisiologia das gônadas, hipófise e interrenal, de fêmeas e machos de *Rhamdia quelen* (Quoy and Gaimard, pisces teleostei), durante o ciclo reprodutivo". Estavam presentes os Professores Aldo Bolten Lucion, Coordenador deste Curso, Guillermo Federico Wassermann, orientador da aluna, Luiz Carlos Rios Kucharski, Chefe do Departamento, vários outros professores e diversos alunos do Curso. A Comissão Examinadora da Tese esteve composta pelos professores Denise Maria Zancan (UFRGS) (relatora) (conceito A), Sílvia Maria Guimarães de Souza (UFRGS) (conceito A) e Marta Helena Krieger (UNICAMP) (conceito A). Nada mais havendo a tratar, a sessão foi encerrada às dezessete horas e dez minutos, da qual para constar eu, Uiraçara Villarinho da Silva, Secretária deste Curso, lavrei a presente ata que vai por mim assinada e pelo Professor Coordenador.

  
Prof. Aldo Bolten Lucion  
Coordenador

  
Uiraçara Villarinho da Silva  
Secretária

Com carinho,  
ao Ricardo meu marido, dedico esta tese.

Que cada lágrima, cada pedra desse caminho que  
trilhamos juntos se transforme em luz e sabedoria em  
nossas vidas!

Aos meus pais, Lígia e Jairo, meus primeiros mestres,  
pelo amor com que me orientam.

À minha família, pelo apoio sempre constante e carinho.

Aos mestres que tanto me ensinaram e  
aos amigos pelo apoio.

## AGRADECIMENTOS

Ao prof. Dr. Guillermo Federico Wassermann pela orientação da tese, e pela oportunidade de realização deste trabalho.

À UFSC e aos colegas do Departamento de Ciências Morfológicas pela oportunidade de afastamento das aulas para realização do curso.

Às professoras e amigas da UFSC, Ivone Martins Cipriano, Fátima R. Silva e Laura Leite, pelo incentivo desde o início do curso.

Ao Sr. Gilberto Amorin Souto, chefe do Departamento de Ciências Morfológicas, cujo apoio e empenho possibilitou o meu afastamento das atividades junto à UFSC.

À UFRGS e ao Departamento de Fisiologia representado pelos professores e funcionários, pela colaboração durante a realização deste trabalho.

Ao Centro de Microscopia Eletrônica da UFRGS pela utilização do microscópio eletrônico de transmissão e varredura.

À Crhistiane de Queiróz Lopes pelo auxílio na realização das técnicas de microscopia eletrônica.

À profa. Dra. Matilde Achaval pelo empréstimo dos seus equipamentos de microtomia.

Ao curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia, na pessoa de seus coordenadores e secretárias, pelo auxílio nas etapas de realização deste trabalho.

À Miriam Sant'Helena secretária do curso de Pós-Graduação – Fisiologia da UFRGS pelo apoio constante.

À amiga Elsa Pires sempre presente em todas as horas.

Aos amigos Leonardo Barcellos e Marcelo Grillo, pela parceria do trabalho e auxílio nas horas difíceis.

Aos colegas do Laboratório de Endocrinologia Experimental, pelo convívio e auxílio durante o trabalho.

À estagiária Diana Ruff, pelo auxílio inestimável na realização das técnicas histológicas.

À todos os amigos que me acolheram em seus lares durante esses anos de trabalho, Marcello Grillo, Karin Tallini, Kátia Barreto, Fátima F. Silva, Esther Ledebur, Elsa Pires, Sr. Idalmir e Sra. Angela Nicollini.

Aos colegas de pós-graduação pelo convívio durante os experimentos.

Ao Snoppy, meu cachorro, pela companhia de horas madrugada adentro na dissertação desta tese.

À CAPES pela bolsa de estudos concedida, CNPq e FAPERGS pelo auxílio financeiro necessários.

A todas as pessoas que colaboraram de alguma forma direta ou indireta, e contribuíram para a realização deste trabalho.

À Deus, pela minha família, pelos amigos ao meu lado, e pela força de vida.

## RESUMO

Dada a importância que a piscicultura vem obtendo nos últimos anos, como modelo econômico alternativo, e os escassos estudos sobre a fisiologia reprodutiva de espécies nativas, elegemos como objeto de estudo o *Rhamdia quelen*, espécie abundante no Sul da América do Sul, bem adaptada ao clima frio da região.

Foi feita a caracterização citológica e histoquímica da glândula hipófise, no estágio maduro do ciclo reprodutivo. Foram utilizados métodos citológicos (Hematoxilina-Eosina, Hematoxilina-Chumbo e Tricrômico de Mallory) e histoquímicos como (Ácido Periódico de Shiff – PAS, Azul de Alcian pH 2,5, com seus respectivos bloqueios. A hipófise apresenta duas porções: a neuro-hipófise e a adeno-hipófise. Nesta, três regiões puderam ser identificadas: a “Rostral Pars Distalis”, com dois tipos celulares, a “Proximal Pars Distalis”, apresentando dois tipos celulares, sendo o tipo basófilo provavelmente gonadotrófico, e a “Pars Intermedia”, com três tipos celulares, totalizando sete tipos celulares adeno-hipofisários.

Com o uso de técnicas histológicas de rotina, verificou-se o desenvolvimento das gônadas de fêmeas e machos. Assim o período reprodutivo foi dividido, com base no desenvolvimento gonadal, em quatro fases principais: repouso, maturação, maduro e regressão. Os tipos de oócitos encontrados (oogônia, oócito cromatina nucleolar, oócito perinucleolar, oócito cortical-alveolar e oócito vitelogênico) seguem o padrão normal para muitas espécies de teleósteos. O ovário de *Rhamdia quelen* é do tipo assincrônico com desovas parceladas. As células foliculares do oócito maduro, apresentam-se hipertrofiadas e com características de células que sintetizam proteína. Foram ainda identificados nos ovários, oócitos atrésicos e folículos pós-ovulatórios. Esses, parecem estar envolvidos em processos de reutilização de material no ovário e surgem nos estádios de pós-desova e regressão. Os

folículos pós-ovulatórios surgem após a desova e apresentam características de células secretoras, podendo sintetizar esteróides.

Podem ocorrer ovotestis em animais da espécie *Rhamdia quelen*.

Os testículos do jundiá, pertencentes ao tipo lobular e espermatogonial irrestrito, apresentam como unidade o lóbulo dentro do qual encontram-se uma série de cistos germinativos, onde desenvolve-se a espermatogênese. Seis tipos celulares germinativos foram identificados: espermatogônias primárias, espermatogônias secundárias, espermatócitos primários, espermatócitos secundários, espermatídes e espermatozóides. As células intersticiais ou de Leydig apresentam atividade delta-5-3-beta-hidroxiesteróide desidrogenase, cuja maior intensidade enzimática esteroidogênica coincide com o período de maduro e regressão.

A glândula interrenal encontra-se entremeada e dispersa pelo tecido do rim anterior e ao redor da veia cardinal posterior e seus ramos. Não se notou hipertrofia ou hiperplasia do tecido interrenal em função do ciclo reprodutivo. A interrenal e as células cromafins encontram-se dissociadas. Estas estão dispersas no tecido que circunda o rim cefálico, externamente.

O período de reprodução do *Rhamdia quelen*, estende-se de outubro a março, durante a primavera e o verão, com desovas repetidas principalmente de novembro a fevereiro. O período de repouso ocorre nos meses mais frios do ano, junho e julho.



## SUMÁRIO

### AGRADECIMENTOS

### RESUMO

### INTRODUÇÃO..... 1

Objetivos..... 19

### MATERIAL E MÉTODOS..... 21

1. Material..... 22

2. Método..... 23

2.1 Procedimento de coleta..... 23

2.2 Obtenção dos dados biométricos..... 23

2.3 Obtenção das gônadas e rins cefálicos..... 24

2.4 Obtenção da hipófise..... 24

2.5 Processamento histológico ..... 25

2.6 Métodos histoquímicos..... 26

2.6.1 Hipófise..... 26

2.6.2 Ovário..... 26

2.6.3 Testículo..... 27

### RESULTADOS..... 29

1. Hipófise..... 30

1.1 Características gerais da hipófise..... 30

1.2 Características citológicas e histoquímicas dos tipos  
celulares adeno-hipofisários..... 31

2. Ovário..... 35

2.1 Características gerais do ovário..... 35

2.2 Fase de desenvolvimento dos oócitos.....	35
2.3 Caracterização dos estádios de maturação da gônada feminina.....	39
2.4 Exemplar ovotestis.....	42
3. Testículo.....	43
3.1 Características gerais do testículo.....	43
3.2 Caracterização macroscópica dos estádios de maturação da gônada masculina.....	43
3.3 Características microscópicas dos testículos.....	46
3.3.1 Organização dos lóbulos germinativos.....	46
3.3.2 Tipos celulares germinativos.....	47
3.3.3 Outros tipos celulares.....	48
3.4 Caracterização microscópica dos estádios de maturação da gônada masculina.....	49
3.5 Tecido endócrino testicular.....	52
4 Tecido interrenal e células cromafins.....	55
5 O ciclo reprodutivo e os fatores climáticos.....	57
<b>FIGURAS E TABELAS.....</b>	<b>61</b>
<b>DISCUSÃO.....</b>	<b>116</b>
1. Hipófise.....	118
2. Ovário.....	124
3. Testículo.....	136
4 Tecido interrenal e células cromafins.....	146
5 O ciclo reprodutivo e os fatores climáticos.....	152

<b>CONCLUSÕES</b> .....	155
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	161
<b>ABSTRACT</b> .....	178
<b>ANEXOS</b> .....	181

## **INTRODUÇÃO**

O Brasil, devido a sua extensão territorial e características geográficas, detêm boa parte dos recursos fluviais e pesqueiros disponíveis no planeta. Há em nosso território uma ictiofauna muito rica em número de espécies, dentre as quais grande parte ainda encontra-se desconhecida, no referente à sua biologia e classificação. Toda essa diversidade representa um valioso banco genético, bem com um favorável recurso econômico, ainda pouco explorado.

A piscicultura desenvolveu-se muito nos últimos anos, constituindo-se atualmente numa importante atividade em crescimento. Em países mais avançados é uma atividade técnica bastante conhecida e explorada, devido aos investimentos em diversos setores da pesquisa básica, o que possibilitou o desenvolvimento e acesso a novas tecnologias nessa área de trabalho.

Os teleósteos, grupo mais abundante e diversificado dentre todos os vertebrados, representam cerca de 96% dos peixes existentes, muitos vivendo em nossos rios e mares (CHESTER JONES & PHILLIPS, 1986).

O fenômeno reprodutivo nos peixes é um processo bem diversificado, sendo a classe representante das maiores variáveis biológicas dentre os vertebrados. A enorme quantidade de gametas produzidos e lançados no meio ambiente para serem fecundados externamente, contrasta com o desenvolvimento de órgãos especializados para a fecundação interna, em algumas espécies. A reprodução é um processo que pode ser executado dos mais variados modos, tais como a liberação de feromônios, a construção ou não de ninhos, a realização de corte, o cuidado ou não com a prole. Também, a migração reprodutiva, seja nas formas apresentadas pela piracema em nossos rios, ou naquelas em que grandes alterações osmóticas do meio se fazem necessárias (migração catadrônica/rio-mar, ou anadrônica/mar-rio), nos fornecem mostras da complexidade etológica que envolve o fenômeno da reprodução nos peixes (HOAR *et al.*, 1983; BORGES, 1987).

Significativas variações no ciclo reprodutivo dos teleósteos que habitam em diferentes condições ecológicas, bem como tendências marcantes em diferentes regimes climáticos determinam o processo de desova em períodos específicos do ano (HOAR *et al.*, 1983).

Como elementos fundamentais da biologia de numerosas espécies, o tipo de desova, a fecundidade, a época e os locais de reprodução, assim como a idade e o tamanho na primeira maturidade alicerçam todo o diagnóstico da situação das populações e de seu possível comportamento ante determinadas condições do meio ambiente (GODINHO, 1972).

O ciclo reprodutivo anual para muitas espécies de teleósteos tem sido descrito em termos de mudanças no índice gonadossomático (IGS – peso da gônada em relação ao peso total do corpo) e/ou mudanças morfológicas em ovários e testículos (PETER & CRIM, 1979). Toda a complexidade da reprodução dos peixes é refletida na vastidão de estruturas gonadais. Entretanto a estrutura fundamental, constituída por células germinativas e por células somáticas constituintes do tecido gonadal, é similar (NAGAHAMA, 1983).

Dois processos podem ser notados no desenvolvimento das gônadas e maturação sexual em peixes. O primeiro refere-se ao desenvolvimento das gônadas de peixes jovens até chegar à maturação sexual, representada pela primeira desova, a partir da qual os peixes são considerados adultos, sendo este processo linear e irreversível. O segundo processo consiste na manifestação dos ciclos sexuais periódicos nos peixes adultos, cujas gônadas apresentam diferentes estágios de maturação em distintas épocas do ano. Este é um processo cíclico e reversível, que se repete de acordo com o padrão rítmico da espécie (CALVO & DADONE, 1972).

Em regiões de clima temperado e subtropical as variações sazonais refletem-se no ciclo de vida dos animais que vivem sob essas condições. O ciclo reprodutivo é

nitidamente afetado por essas variações, sendo que a maioria dos teleósteos apresenta reprodução sazonal, a qual se traduz em alterações no tamanho e aspecto das gônadas ao longo do ano, sendo acompanhada por uma série de mudanças morfológicas e fisiológicas. O fotoperíodo e a temperatura são os principais fatores que influenciam os ciclos sazonais (PETER & CRIM, 1979).

Os hormônios reprodutivos, especialmente, são estudados de forma a esclarecer e melhor compreender os mecanismos da diferenciação sexual, da regulação da gametogênese e da liberação dos gametas (FOSTIER *et al.*, 1983; GOETZ, 1983; FITZPATRICK *et al.*, 1993).

#### GONADOTROFINAS

O processo reprodutivo em peixes é controlado pelas gonadotrofinas (GtH), a maturação dos gametas, que só ocorre na maturidade sexual, é mediado por hormônios esteróides, e a ovulação e a desova podem ser reguladas por fatores não esteroidogênicos (GOSWAMI *et al.*, 1985).

Assim, como nos demais vertebrados, a reprodução em teleósteos é controlada pelo eixo hipotálamo-hipófise-gônada. Diretamente relacionados com a reprodução, núcleos hipotalâmicos secretam dois neuro-hormônios: um liberador de gonadotrofina (GnRH), que agindo sobre a hipófise, promove a liberação do hormônio gonadotrófico (PETER *et al.*, 1986), e o outro, a dopamina atua na grande maioria dos peixes inibindo a liberação de gonadotrofina pela mesma glândula (CHANG *et al.*, 1984).

Nos teleósteos, de maneira geral, foram descritas diferentes formas de GnRH. Sherwood e Lovejoy (1989), reuniram dados sobre os tipos de GnRH até então conhecidos para teleósteos, os quais podem se apresentar em formas semelhantes aos dos mamíferos, das aves, e mesmo outras formas, características de peixe.

A natureza dos hormônios gonadotróficos dos peixes e sua função no controle da reprodução, ainda não está totalmente compreendida. Estudos iniciais em peixes, identificaram apenas um tipo de gonadotrofina, semelhante ao hormônio luteinizante dos mamíferos, particularmente importante durante a gametogênese e a maturação (FONTAINE & DUFOUR, 1987). Um só tipo de hormônio gonadotrófico foi relatado para vários teleósteos, dentre eles a carpa comum *Cyprinus carpio* (Burzawa-Gerard, 1971, 1982) e *Rhamdia hilarii* (VAL-SELLA *et al.*, 1988).

Nos peixes salmonídeos, similarmente a outros vertebrados, há evidências da existência de duas gonadotrofinas. Uma delas, produzida principalmente durante os estágios iniciais de desenvolvimento gonadal, é similar ao hormônio folículo estimulante dos mamíferos, a GtH 1. A outra gonadotrofina, a GtH 2, é sintetizada nas fases finais da maturação sexual, sendo homóloga ao hormônio luteinizante (SUZUKI *et al.*, 1988; KAWAUCHI *et al.*, 1989; NOZAKI *et al.*, 1990; TRUDEAU, 1993). Para várias outras espécies de peixes também foram estudadas e identificadas duas gonadotrofinas: *Seriola dumerilii* do mediterrâneo (GARCIA *et al.*, 1997), *Carassius auratus* (TRUDEAU, 1993), dentre outros, como os peixes da família Cianidaes (COPELAND & THOMAS, 1993).

Os primeiros estudos para identificação dos tipos celulares da glândula hipófise foram feitos por métodos citoquímicos e histoquímicos. Foram assim descritos tipos celulares adeno-hipofisários em peixes, semelhantes àqueles encontrados em mamíferos (SHRIVASTAVA & SWARUP, 1980; CAMBRÉ *et al.*, 1986; TOUBEAU *et al.*, 1991).

Mais recentemente, o uso de técnicas de imunohistoquímica têm proporcionado um grande avanço nas investigações sobre a morfologia funcional dos teleósteos, relacionada a vários sistemas, particularmente o reprodutivo (FANTODJI *et al.*, 1990). A imunohistoquímica têm sido amplamente usada, a fim de detectar a presença e a localização dos vários hormônios hipofisários e até mesmo demonstrar a similaridade



molecular entre os hormônios dos peixes e dos tetrápodos (TOUBEAU *et al.*, 1991; POWER, 1992; SPECKER *et al.*, 1993).

Nos teleósteos estudados, verificou-se que a ação gonadotrófica sobre o desenvolvimento gonadal se faz de modo indireto através da biossíntese de esteróides. Destes, o 17  $\beta$ -estradiol, a testosterona e a 17 $\alpha$ -20 $\beta$ -di-hidroxi-4-pregen-3-one são apontados como hormônios encarregados de mediar as várias etapas da gametogênese, como o crescimento e a maturação dos oócitos nas fêmeas, a espermatogênese e espermição nos machos. Nas fêmeas, os esteróides são sintetizados nas células foliculares dos oócitos (revisado em ANDRADE 1993).

### GÔNADA FEMININA

Nas fêmeas de teleósteos, Wallace e Selman (1981) dividem o processo de desenvolvimento do oócito (oogênese) em quatro fases: fase de crescimento primário que é independente de gonadotrofinas; fase de formação das vesículas de vitelo; fase de vitelogênese e fase de maturação. As três últimas fases são dependentes de gonadotrofinas.

O crescimento primário, inicia-se com a transformação da oogônia em oócito primário, onde os cromossomos começam o processo de divisão meiótica. O folículo primário é estabelecido. Durante a fase de crescimento inicial ocorre um aumento significativo no volume do oócito e muitas organelas membranosas são elaboradas dentro do ooplasma. Muitos estudos indicam que a fase de crescimento primário ocorre independente da influência hipofisária, conseqüentemente, em animais hipofisectomizados os oócitos não crescem além de um tamanho crítico. Esse tamanho crítico é espécie-dependente e é constante dentro de uma mesma espécie. Uma vez alcançado esse tamanho, o oócito está totalmente envolvido pelo folículo completo, que é constituído de uma camada simples de células denominadas foliculares ou granulosas, que são imediatamente rodeadas por uma camada de

células conjuntivas, constituindo-se assim as células da teca (SELMAN & WALLACE, 1983).

O crescimento do oócito ocorre principalmente durante a fase de vitelogênese, que compreende a incorporação de vitelo nos oócitos em desenvolvimento. As proteínas do vitelo são sintetizadas primariamente no fígado, e transportadas pelo sistema vascular até o ovário, onde são depositados nos oócitos como vitelo. O vitelo deposita-se de duas formas: vesículas de vitelo, que são estruturas de tamanho relativamente grande e formato irregular, e grânulos de vitelo, que são estruturas arredondadas e de tamanho variável dependendo da etapa do desenvolvimento. A deposição de vitelo é normalmente seqüencial, ocorrendo primeiro a formação de vesículas de vitelo (WEBSTER & WEBSTER, 1974; HARVEY & HOAR, 1980).

A principal substância extra-ovariana que compõe o vitelo é a vitelogenina, uma glicoproteína derivada predominantemente do fígado. A vitelogenina é seqüestrada pelo oócito via endocitose e subseqüentemente processada. A formação do vitelo protéico deriva da clivagem proteolítica da vitelogenina (SELMAN & WALLACE, 1986; NAGLER & IDLER, 1992).

O início da vitelogênese é marcado pelo aparecimento de esferas de vitelo dispostos na periferia do ooplasma. Ao longo do processo de vitelogênese, essas esferas de vitelo aumentam e se distribuem pelo ooplasma e, freqüentemente, fusionam-se entre si. No final da vitelogênese a parte central do oócito é ocupado por uma massa fluida de vitelo (SELMAN & WALLACE, 1986).

Em teleósteos superiores, o vitelo torna-se segregado dentro do citoplasma e concentra-se no interior do ovo, enquanto o citoplasma é encontrado na superfície formando uma fina capa citoplasmática. Os lipídios podem estar presentes na forma

de grandes ou pequenas gotas de gordura dentro da massa de vitelo, dependendo da família (BALINSKI, 1981).

As células foliculares parecem não contribuir diretamente para a formação do vitelo em teleósteos. No período vitelogênico, os folículos tornam-se capazes de responder aos níveis endógenos de hormônios (SELMAN & WALLACE, 1986).

Em vista da importância desta fase de crescimento no desenvolvimento do oócito, o envolvimento de hormônios no controle do aumento de proteínas no oócito tem sido muito estudado (ANAND & SUNDARARAJ, 1974; CAMPBELL & IDLER, 1976; BRADLEY & GRIZZLE, 1989; TYLER *et al.*, 1992). As gonadotrofinas são os maiores efetores endócrinos no controle de desenvolvimento ovariano em teleósteos. Alguns estudos mostram que as gonadotrofinas estimulam a esteroidogênese ovariana (CRIM *et al.* 1975; CAMPBELL & IDLER, 1976; GOSWAMI *et al.*, 1985; TYLER *et al.*, 1992). Na primeira fase da vitelogênese, a produção de vitelogenina pelo fígado é estimulada por estrógenos (17 $\beta$ -estradiol). Na segunda fase, a incorporação de vitelogenina pelos oócitos é estimulada por gonadotrofinas, ou seja, as gonadotrofinas estimulam o aumento de vitelogenina durante a vitelogênese (TYLER *et al.*, 1992). Sendo assim, as gonadotrofinas têm influência indireta sobre a primeira fase, uma vez que estimulam a síntese de estrógenos, e influência direta sobre a gônada na segunda fase da vitelogênese (CAMPBELL & IDLER, 1976). Sistemas de cultivos de oócitos *in vitro*, mostram que hormônios gonadotróficos estimulam a maturação meiótica em oócitos de folículos intactos, mas não naqueles desfoliculados (GOETZ, 1983). Tal fato sugere que as gonadotrofinas podem promover a maturação estimulando a síntese, feita pelas células foliculares, de um esteróide que age diretamente sobre os oócitos (revisado em NAGAHAMA, 1988). Completada a maturação do oócito, as gonadotrofinas estimulam a produção de progestágenos que irão induzir a ovulação.

Segundo Anand e Sundararaj (1974) a hipofisectomia em peixes teleósteos inibe a vitelogênese, mas o tratamento com preparações de gonadotrofinas de mamíferos ou de peixes é capaz de restaurar o processo.

Em vários animais, a vitelogênese cessa quando o oócito atinge seu desenvolvimento total, ou seja na maturação. Durante a fase de maturação (redução da meiose) ocorrem várias modificações no núcleo e no citoplasma do oócito, tais como: a quebra da vesícula germinal, a condensação cromossômica, a extrusão do primeiro corpúsculo polar e a hidratação do oócito, que promove um crescimento adicional. Estas mudanças ocorrem antes da ovulação, e são pré-requisitos para o sucesso da fertilização (SELMAN & WALLACE, 1983; GOETZ, 1983).

#### GÔNADA MASCULINA

Nos machos, as gonadotrofinas e hormônios esteróides, estão presentes no plasma durante o processo de espermatogênese. A GtH 1 está envolvida na gametogênese e esteroidogênese, enquanto a GtH 2 está envolvida nos estágios de maturação final da gametogênese. As gonadotrofinas são responsáveis por estimular a síntese de esteróides (androgênios, estrogênios e progestinas) que atuam regulando a gametogênese, as características sexuais e o comportamento reprodutivo (SCHULZ *et al.*, 1995; CYR & EALES, 1996; ARCAND-HOY & BENSON, 1998).

Nos teleósteos a organização estrutural dos testículos sofre variações inter-específicas. Na literatura havia uma maneira diversificada de interpretação quanto ao modo de organização do testículo em peixes. Grier *et al.* (1980) após revisão sobre a estrutura testicular em teleósteos, e utilizando como critério a localização das espermatogônias ao longo do túbulo, sugeriram dois modelos: um espermatogonial restrito e outro espermatogonial não restrito (Fig. 1).

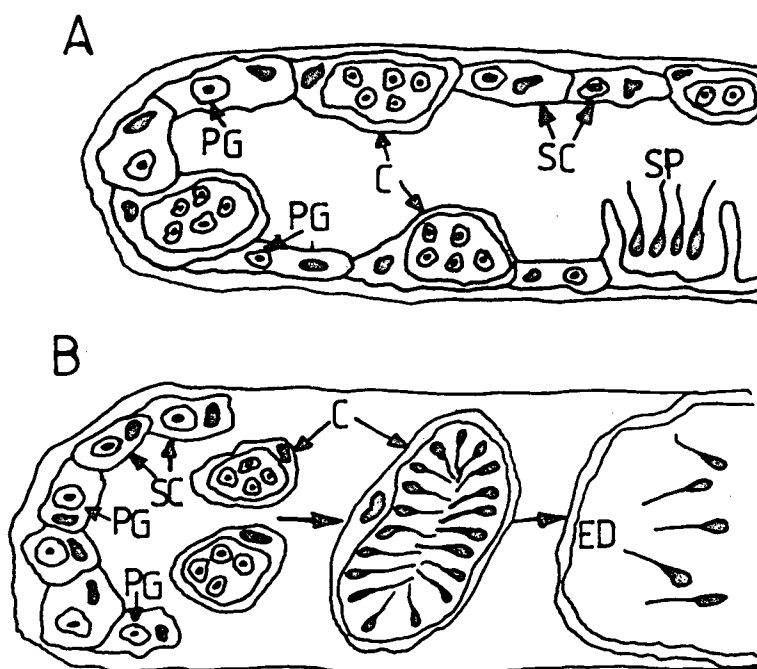


Figura 1: Diagrama esquemático ilustrando a espermatogênese em teleósteos. A: Gônada masculina com organização testicular do tipo não restrito caracterizado pela presença de espermatogônias (PG) ao longo do comprimento do lóbulo; célula de Sertoli (SC); cistos (C); espermatozoides (SP). B: Gônada masculina com organização testicular do tipo restrito onde as espermatogônias (PG) estão confinadas na porção distal do lóbulo; ducto deferente (ED). (Modificado de GRIER, 1993).

Segundo o modelo espermatogonial restrito, as espermatogônias encontraram-se somente na terminação distal dos túbulos, sendo que, durante a espermatogênese e conseqüente espermiogênese, ocorre migração cística em direção ao ducto deferente. Neste modelo não há lume tubular. Este modelo restringe-se ao grupo dos Atheriniformes, sendo um dos exemplos a *Poecilia latipinna* (BILLARD *et al.*, 1982).

Os testículos do tipo irrestrito, encontrados na maioria dos teleósteos, são compostos por numerosos lóbulos, os quais estão separados uns dos outros por uma delgada camada de tecido conjuntivo fibroso (ROOSEN-RUNGE, 1977). Este modelo

apresenta uma distribuição de espermatogônias similar àquela observada nos mamíferos, onde as mesmas ocorrem ao longo do comprimento total do túbulo testicular.

As células germinativas dispõem-se em cistos lobulares, os quais rompem-se no final da espermatogênese, promovendo a liberação das células germinativas no lume tubular, de onde são lançados no ducto espermático e, posteriormente, para o meio ambiente. O modelo aparece em Salmoniformes, Perciformes e Cypriniformes (GRIER *et al.*, 1981).

Funcionalmente, os testículos dos teleósteos, assim como nos outros vertebrados, são responsáveis tanto pela formação de gametas masculinos como pela secreção de esteróides. Destes hormônios dependem, o desenvolvimento das características sexuais secundárias, a primeira maturação (nos imaturos) e a maturação germinativa em cada ciclo gonadal (nos adultos).

Os testículos de muitos teleósteos são estruturalmente compostos por compartimentos lobular e intersticial. No compartimento intersticial, Fostier *et al.* (1983) consideram três tipos celulares diferentes como responsáveis pela esteroidogênese testicular: as células intersticiais ou de Leydig, as células de Sertoli e as células epiteliais dos ductos deferentes testiculares.

No compartimento lobular do testículo são encontrados dois tipos celulares: células de Sertoli e células germinativas. O desenvolvimento das células germinativas ocorre dentro de cistos que revestem internamente os túbulos seminíferos (MOSER, 1967; GRIER, 1975; GRIER *et al.*, 1978; SILVA & GODINHO, 1989).

A célula de Sertoli em teleósteos apresenta uma terminologia variada. Inicialmente foram descritas e denominadas células periféricas lobulares, mas também são chamadas por muitos autores de: células somáticas intralobulares, células do tecido

conjuntivo, células císticas especiais, células foliculares e células císticas intralobulares (revisado em BORGES, 1987).

Em muitos teleósteos as paredes dos cistos são formadas por células de Sertoli, e dentro de cada cisto as células estão na mesma fase da espermatogênese (MOSER, 1967; GRIER, 1975; GRIER *et al.*, 1978, SILVA & GODINHO, 1989; PUDNEY, 1995; PORAWSKI, 1999).

Tipo celular esteroideogênico para muitas espécies de teleósteos, a célula de Sertoli, possui características ultra-estruturais comparáveis às células de mamíferos (BILLARD *et al.*, 1972; GRESIK, 1975; GRIER & LINTON, 1977; NAGAHAMA *et al.*, 1978). Também são atribuídos outros papéis à essas células como, fagocitose dos corpos residuais das espermátides e de espermatozóides residuais (GRIER, 1976; GRIER *et al.*, 1980) e um provável papel nutritivo (GRIER, 1981).

O compartimento intersticial, consiste de células intersticiais especiais, células musculares, fibroblastos, além de vasos sanguíneos e linfáticos. As células responsáveis pela secreção de hormônios sexuais têm sido descritas em ambos os compartimentos. No entanto, há na literatura, diferentes terminologias aplicadas a essas células.

As células intersticiais, presentes no interstício testicular (NICHOLLS & GRAHAM, 1972), são também chamadas por muitos autores de células de Leydig, devido a homologia com as células de mamíferos. Essa correlação foi estabelecida por meio de estudos histoquímicos para detecção de lipídios e colesterol. Entretanto, outros autores afirmam que a lipofilia e a sudanofilia não são critérios suficientes para estabelecer esta homologia, uma vez que a lipofilia não é restrita a este tipo celular (GURAYA, 1976a; GRIER & LINTON, 1977) ou mesmo lipídios podem estar ausentes em alguns teleósteos (NICHOLLS & GRAHAM, 1972). Assim, célula intersticial, seria a terminologia mais aceita

(FOSTIER *et al.*, 1983). Por outro lado, Bara (1969) estudando as células de Leydig de *Fundulus heteroclitus* mostrou por meio da histoquímica, que estas células apresentam reação positiva para a esteróide desidrogenase. Além disso, as células de Leydig de *Oryzas latipes*, embora não tenham demonstrado evidências histoquímicas, mostraram características ultra-estruturais que evidenciam atividade esteroidogênica (GRESIK *et al.*, 1975).

São poucas as informações a respeito da atividade esteroidogênica de cada um dos tipos de células endócrinas testiculares, durante o ciclo reprodutivo dos teleósteos. As pesquisas nestes tópicos propiciam um maior entendimento do controle endócrino da reprodução, podendo auxiliar, de certa forma, o desenvolvimento de técnicas de piscicultura (revisado em BORGES, 1987).

#### INTERRENAL E CÉLULAS CROMAFINS

Além do eixo hipotálamo-hipófise-gônada, foi relatada a presença de um outro eixo de controle hormonal nos teleósteos, o hipófise-interrenal, ativado em resposta a quase todos os tipos de estresse ambiental (DONALDSON, 1981).

O sistema adrenal de peixes consiste em duas glândulas: interrenais e células cromafins, ambas localizadas junto ao tecido renal.

Em teleósteos, a interrenal só pode ser distinguida histologicamente, pois trata-se de um tecido e não de um órgão distinto. Geralmente é encontrada associada à veia cardinal posterior e aos seus ramos, ou intrincada entre o tecido renal geralmente na região do rim anterior ou cefálico. Essas células produzem vários hormônios corticosteróides. Há vários graus de associação entre o sistema adrenal de peixes e componentes homólogos à região medular e cortical da glândula adrenal dos mamíferos (MILANO *et al.*, 1997).

A homologia entre o tecido interrenal dos teleósteos e a glândula adrenal dos mamíferos foi estabelecida por Giacomini em 1902 (revisado em MILANO *et al.*



1997). A glândula interrenal correspondente ao córtex adrenal dos mamíferos, e estrutura-se sob a forma de estratos de células epiteliais, dispostas ao longo da veia cardinal posterior e de seus ramos, no interior do rim cefálico ou pronefro. As células cromafins, características da medula adrenal, também foram observadas ao longo da veia cardinal, próximas ou entre as células do tecido interrenal.

Estudos posteriores realizados por Oguri e Hibiya (1957), Oguri (1960), Nandi (1962,1965) e Hooli e Nadkarni (1975), mostraram que a morfologia do tecido interrenal e das células cromafins era freqüentemente variável, mesmo quando se examinavam espécies filogeneticamente próximas.

Além dessas diferenças interespecíficas na forma, o tecido interrenal e as células cromafins ainda podem sofrer modificações por causa fisiológica, notadamente no decorrer do ciclo reprodutivo de espécies migradoras (ROBERTSON & WEXLER 1960; McBRIDE & VAN OVERBEEKE 1969; DONALDSON 1981; DIXIT & AGRAWALA 1975).

Funções importantes são atribuídas aos corticosteróides durante alguns tipos de estresse como, uma alteração no balanço hidromineral (MATTY, 1985) e ação imunossupressora (SCHRECK *et al.*, 1989). Os corticosteróides também podem ter papel relevante na reprodução e na mobilização energética. Isto porque durante a maturação gonadal, algumas espécies de peixes cessam a alimentação e os níveis de cortisol se elevam, aumentando a utilização das reservas de gordura e a proteólise periférica. Desta maneira, os estoques energéticos tornam-se disponíveis, ocorrendo a liberação de glicose com sua conseqüente utilização (SUNDARAJAJ *et al.*, 1982).

Sundararaj e Goswami (1977) propuseram uma interação hipófise-interrenal-ovário para o bagre indiano. Inicialmente foi sugerido para esta espécie, que a gonadotrofina atuaria sobre a glândula interrenal para que esta, em resposta, produzisse

esteróide maturacional, o qual induziria a maturação final dos oócitos. Em estudos posteriores, SUNDARARAJ *et al.* (1985) verificaram que a maturação final dos oócitos envolve tanto a ação gonadotrófica sobre a interrenal como sobre o ovário. A primeira, proporcionando a secreção de um esteróide indutor da maturação final e a segunda, proporcionando a secreção de um esteróide nos oócitos vitelogênicos. Deste modo gonadotrofina e corticosteróide atuam sinergicamente sobre a maturação final dos oócitos.

O cortisol é o esteróide mais importante dentre os corticosteróides secretados pela glândula interrenal dos teleósteos (CHESTER JONES & PHILLIPS, 1986). Os esteróides sendo formados a partir do colesterol, são estocados no citoplasma das células interrenais (GORBMAN, 1986).

Há relatos, sobre as modificações na secreção de corticosteróides e na morfologia apresentada pelas células interrenais, em função do ciclo reprodutivo de teleósteos. Elevações nos níveis de cortisol por exemplo, durante o período de desova, têm sido reportadas para algumas espécies (COOK *et al.*, 1980; PICKERING & CHRISTIE, 1981; LAMBA *et al.*, 1983; BRY, 1985).

Mudanças celulares da interrenal durante a fase reprodutiva, foram estudadas em salmonídeos. A mortalidade pós-desova do *Oncorhynchus nerka* (salmão do pacífico) tem sido associada à hiperplasia do tecido interrenal. (ROBERTSON & WEXLER, 1960; VAN OVERBEEKE & MCBRIDE, 1971; CHESTER JONES & PHILLIPS, 1986).

As células cromafins, geralmente encontram-se associadas à interrenal nos teleósteos, mas essa associação pode variar conforme a espécie. Coupland (1965, 1972) definiu as células cromafins como tendo origem da neuroectoderme. Estas células são innervadas por fibras simpáticas pré-ganglionares, capazes de sintetizar, secretar e estocar catecolaminas, os hormônios adrenalina e noradrenalina. Essas células têm seu nome derivado da aparência da granulação castanha amarelada, resultante da oxidação intracelular das

catecolaminas quando coradas com sais de cromo ou dicromato (revisado em REID *et al.*, 1998).

Quanto à localização das células cromafins existem algumas divergências entre as diversas classes animais. Nos mamíferos, pássaros e répteis as células cromafins são encontradas na região medular da glândula adrenal. Em anfíbios as células cromafins estão localizadas em associação com o sistema nervoso simpático na superfície ventral do rim e, em anuros formam uma massa distinta na superfície do rim (revisado em REID *et al.*, 1998). Em teleósteos as células cromafins estão localizadas geralmente ao redor da veia cardinal posterior em associação com o tecido linfóide, na região do rim anterior (NANDI, 1962; 1965; MILLANO *et al.*, 1997; REID *et al.*, 1998).

### O JUNDIÁ

É uma espécie de bagre nativo do sul da América do Sul, sendo um dos peixes mais conhecidos e adaptados ao clima frio da região sul. A espécie pertence a família Pimelodidae, dentro da subfamília Heptapterinae. Este grupo passou por uma revisão completa em 1998 quando foi amplamente estudado por Bockmann. A partir daí sugere-se optar pela menção da subfamília em referência a este peixe, pois provavelmente a família seja desmembrada e o gênero *Rhamdia* deva integrar o grupo Heptapteridae. A família Pimelodidae inclui um conjunto muito grande de peixes de interesse comercial, compreendendo formas muito diversificadas, sendo que o tamanho varia de 40 a 120 cm. É uma das maiores famílias de bagres da América do Sul.

Uma revisão sistemática do grupo foi realizada recentemente e a determinação é que a espécie *Rhamdia quelen* possui ampla distribuição (SILFVERGRIP, 1996).

No Rio Grande do Sul o jundiá – *Rhamdia sp.* é um peixe promissor entre as espécies cultivadas, além de ser um dos preferidos nas mesas da região. O nome jundiá é uma designação de muitos peixes da ordem Siluriformes, e talvez para os indígenas significasse o mesmo que bagre. Segundo o Catálogo de Gosline para toda a América de Sul e Central, o gênero *Rhamdia* conta com 66 espécies (MEZZALIRA *et al.*, 1997).

Um dos jundiás mais conhecidos é o *Rhamdia quelen*. Dulcícola, com poucas espécies estuarinas, os adultos são bentônicos e são encontrados livres na natureza nas lagunas e nos poços fundos dos rios, escondidos entre as pedras e troncos, de onde saem à noite a procura de pequenos peixes, insetos, larvas e vermes, que constituem a sua alimentação. Em cativeiro apresenta uma boa conversão alimentar. Desovam em regiões rasas com pouca ou nenhuma correnteza (BOCKMANN, 1998; MEZZALIRA *et al.*, 1997).

Um somatório de fatores como a poluição desenfreada, o desmatamento ciliar, a pesca irracional, e mesmo a demanda insuficiente de pescado de espécies consideradas nobres, nos projeta para outras perspectivas da aquicultura nacional, preocupada não somente com a preservação da fauna íctica, como também na sua exploração racional. A criação de peixes pode se tornar mais uma fonte de proteína, de baixo custo na propriedade rural, de modo a satisfazer o consumo crescente da indústria da aquicultura.

Para que possamos explorar o cultivo de espécies nativas, bem adaptadas ao nosso clima frio, desfavorável ao crescimento e reprodução de muitas espécies de peixes exóticas, é imprescindível o conhecimento da ecologia e fisiologia reprodutiva das nossas espécies. Esse conhecimento pode favorecer a implementação plena e satisfatória do cultivo de espécies nativas de interesse econômico e adaptadas ao clima.

Em nosso trabalho, elegemos o jundiá como objeto de estudo, visando um melhor conhecimento sobre a fisiologia reprodutiva desse representante nativo da nossa

ictiofauna, bem adaptado ao clima frio da região Sul e com promissoras perspectivas de utilização na aquicultura.

## **OBJETIVOS**

Este trabalho propõe-se a atingir os seguintes objetivos, estudando fêmeas e machos adultos de *Rhamdia quelen*:

### **OBJETIVO GERAL**

Dada a importância que a piscicultura vem obtendo nos últimos anos, como modelo econômico alternativo, e os escassos estudos sobre a fisiologia reprodutiva, principalmente de espécies nativas, é nosso objetivo conhecer aspectos relevantes da fisiologia reprodutiva do jundiá, para aprimoramento das técnicas de cultivo.

### **OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

1 – Determinar a organização estrutural e citológica da hipófise utilizando métodos histológicos e histoquímicos.

2 – Estudar a distribuição anatômica e a morfologia da glândula interrenal e células cromafins, utilizando métodos histológicos.

3 – Estabelecer as possíveis mudanças nas células da glândula interrenal, em função do ciclo reprodutivo.

4 - Caracterizar morfológicamente a gônada de fêmeas, em relação aos estádios de maturação gonadal.

5 - Caracterizar morfológicamente a gônada de machos, em relação aos estádios de maturação gonadal.

6 - Identificar as células endócrinas testiculares através de técnicas histoquímicas para esteróide desidrogenase e sua atividade relacionada aos estádios do ciclo reprodutivo.

## **MATERIAL E MÉTODOS**



## 1 - MATERIAL

Foram utilizados 210 jundiás (*Rhamdia quelen*) de ambos os sexos, provenientes da Estação de Piscicultura da Fundação Universidade de Passo Fundo (UPF), RS. O jundiá é um bagre, espécie nativa do sul da América do Sul sendo relativamente abundante em nossos rios. Apesar de bem adaptada e resistente ao frio, a espécie desenvolve-se melhor em épocas mais quentes, quando apresenta boa conversão alimentar. Atinge entre 300 e 400g em seis a sete meses de cultivo. Apresenta carne firme sem espinhos intramusculares, sendo bastante apreciada (SAINT-PAUL, 1986).

Com o intuito de se observar a influência de certos fatores ambientais sobre a fisiologia reprodutiva dos jundiás, foram obtidos dados relativos à temperatura do ar, fotoperíodo e precipitação pluviométrica da região de coleta (Figura 2). O levantamento dessas variáveis foi efetuado pela EMBRAPA - RS (Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária). As curvas anuais dos referidos parâmetros são utilizadas na análise final da curva de maturação gonadal do *Rhamdia quelen*.

Os animais utilizados neste trabalho foram fêmeas e machos adultos (Fig. 5), coletadas no período de julho de 1998 a agosto de 2000, agrupados nas várias fases do ciclo gonadal. Também foram coletados machos e fêmeas imaturos.

Todos os espécimes estudados nasceram na própria UPF. Os reprodutores foram mantidos em sistema de cultivo em viveiros de 100 m<sup>2</sup> (Fig. 6), com profundidade média de 1 m e com renovação de água de 6 litros por minuto. Foram alimentados com ração comercial para reprodutores (42% de Proteína Bruta) na taxa de 1 a 2% da biomassa, duas vezes ao dia, mantidos sob temperatura e fotoperíodo naturais.

Os peixes imaturos foram mantidos em tanques de concreto de 1,5 m<sup>2</sup> com profundidade de 80 cm, alimentados periodicamente durante as 24 horas diárias através

de alimentador automático, sendo a ração a mesma usada para os reprodutores, porém triturada.

As razões para a escolha da estação de piscicultura da Universidade de Passo Fundo foram: a disponibilidade de dados de controle dos animais (idade, sexo e maturidade) a disponibilidade de dados relativos às variações sazonais do ambiente e as condições satisfatórias de coleta. O que permitiu maior controle no desenvolvimento das técnicas de processamento das amostras.

## **2 - MÉTODO**

### **2.1 Procedimento de coleta**

No primeiro ano as coletas foram mensais, no segundo ano ocorreram em meses representativos dos estádios: julho, setembro, novembro, fevereiro, abril, junho e agosto, sendo capturados seis machos e seis fêmeas em cada coleta. A captura dos adultos foi feita com rede de arrasto passada suavemente no tanque sempre às 8:00 da manhã. Os animais jovens (imaturos) foram capturados com auxílio de puçá.

Os peixes foram anestesiados em tricaina (MS222 – Finquel<sup>®</sup>-Sandoz) na dose de 300 mg/l, tamponada com 600 mg/l de NaHCO<sub>3</sub>, e mortos por seção medular.

### **2.2 Obtenção dos dados biométricos**

De cada exemplar, machos e fêmeas, foram aferidos: o comprimento total (distância em cm entre as extremidades anterior e posterior do animal) através de régua,

o peso total e o peso gonadal obtidos utilizando-se balança (Marte) com sensibilidade de 1 mg (Tabela I e II). Esses dados foram utilizados para obtenção do índice gonadossomático (IGS). O IGS é um parâmetro de indicação do estágio de maturação gonadal em diversas espécies animais, sendo calculado a partir da relação entre o peso da gônada e o peso total do animal de acordo com a fórmula:

$$\text{IGS} = \text{peso da gônada} / \text{peso total do animal} \times 100$$

### **2.3 Obtenção das gônadas e rins cefálicos**

As gônadas e rins, de machos e de fêmeas, foram retirados através de uma secção longitudinal na região ventral do animal, desde o poro genital até a abertura do opérculo. Tanto as gônadas como os rins cefálicos de machos e fêmeas, após serem cortados em pedaços de 5 mm de espessura, foram fixados imediatamente em Bouïn e formol a 10% para processamento histológico de rotina, e em nitrogênio líquido para histoquímica.

Os testículos e os ovários foram ainda fixados em glutaraldeído a 3% em tampão fosfato 0,2 M pH 7,4, e processados respectivamente, para Microscopia Eletrônica de Varredura e Microscopia Eletrônica de Transmissão através de técnicas de rotina (Anexo 1).

### **2.4 Obtenção da hipófise**

Com auxílio de um saca-bocado retirou-se a porção superior da caixa craniana, expondo-se o encéfalo, o qual foi removido e dele destacada a hipófise. Esta foi fixada imediatamente para histologia em líquido de Bouïn, durante 24 horas e para

Microscopia Eletrônica de Varredura, em glutaraldeído a 3% em tampão fosfato 0,2 M pH 7,4, durante 48 horas (Anexo 1).

## **2.5 Processamento histológico**

Após a fixação, as estruturas destinadas à inclusão em paraplast (rins cefálicos, ovários, testículos e hipófise), foram conservadas em álcool a 70% para o processamento das amostras pelos métodos histológicos de rotina. As gônadas fixadas em formol a 10%, foram mantidas a 4 °C, imersas em sacarose a 30%, para cortes em criostato.

Das hipófises foram obtidos cortes seqüenciais, sagitais e transversais de 3 a 7 µm de espessura, que foram corados pelos métodos da Hematoxilina-Eosina (H.E.), Tricrômico de Mallory e Hematoxilina-Chumbo (HPb) (Anexo 2).

Os cortes dos rins cefálicos, transversais e seriados, de 3-7 µm de espessura foram corados pelo método de H.E., para localização do tecido da interrenal e reação cromafin para localização das células cromafins (Anexo 2).

Os ovários cortados transversalmente em espessura de 3 a 5 µm, foram corados utilizando-se H.E. e Tricrômico de Mallory.

De cada testículo foram feitos cortes transversais e longitudinais de 3 a 5 µm de espessura, representativos das regiões testiculares anterior, mediana e posterior, que foram corados utilizando-se H.E. e Tricrômico de Mallory.

A análise histológica do material foi feita em microscópio de luz (Zeiss), e a documentação fotográfica das lâminas histológicas foi feita em fotomicroscópio Optiphot-2 Nikon equipado com câmera fotográfica Nikon FX-35 DX.

## 2.6 Métodos histoquímicos

### 2.6.1 Hipófise

Os métodos histoquímicos (Anexo 2) empregados para a caracterização dos diferentes tipos celulares da adeno-hipófise foram: Ácido Periódico de Schiff (PAS) (McMANUS, 1946) e Azul de Alcian pH 2,5 ou “Alcian Blue” (AB) pH 2,5 (STEEDMAN, 1950).

Para controle e maior detalhamento da pesquisa histoquímica de polissacarídeos (Anexo 2), os seguintes métodos foram aplicados: acetilação + PAS (MCMANUS & CASON, 1950); acetilação + saponificação + PAS; PAS após tratamento com amilase salivar (LISON, 1960); metilação + AB pH 2,5 (TURNER & LEV, 1963); metilação + saponificação + AB 2,5 (TURNER & LEV, 1963) e hidrólise ácida seguida de AB pH 2,5 (QUINTARELLI *et al.*, 1961).

### 2.6.2 Ovário

Os ovários fixados em formol a 10% e seccionados em criostato numa espessura de 15-20  $\mu\text{m}$ , foram submetidos à técnica de Sudan Negro para detecção de lipídios (LISON, 1960; PEARSE, 1968). Também foram corados com Ácido Periódico de Schiff (PAS) e PAS após tratamento com amilase salivar, para pesquisa de polissacarídeos (Anexo 2).

### 2.6.3 Testículo

Com o intuito de identificar o tecido endócrino gonadal, foram empregadas metodologias para detecção das enzimas delta-5-3-beta-hidroxiesteróide desidrogenase ( $\Delta^5$  3 $\beta$ -HED) e 17-beta hidroxiesteróide desidrogenase (17 $\beta$ -HED), as quais estão diretamente envolvidas na biossíntese dos hormônios esteróides.

A delta-5-3-beta-hidroxiesteróide desidrogenase participa de importante etapa na biossíntese dos hormônios esteróides dos vertebrados, sendo ativa na conversão de pregnenolona para a progesterona e na conversão da dehidroepiandrosterona para a androstenediona (MORSE & HELLER, 1973; HOYER & ANDERSEN, 1977), isto é, conversão  $\Delta^5$  3- $\beta$ -hidroxiesteróides para os  $\Delta^4$  3-cetosteróides.

A 17- $\beta$ -HED é essencial no metabolismo dos 17- $\beta$ -hidroxiesteróides (Ex.: testosterona e 17- $\beta$ -estradiol). Esta enzima realiza a conversão reversível da testosterona para a  $\Delta^4$  androsteono-3-17-diona (STOKA *et al.*, 1971).

Os fragmentos de testículo foram imersos em isopentano e congelados em nitrogênio líquido para cortes em criostato em espessura de 15-20  $\mu$ m, e submetidos à técnica para investigação da atividade das hidroxiesteróide-desidrogenases (Anexo 2).

A técnica consiste na remoção, pela enzima, de íons hidrogênio do substrato e sua transferência ao longo da via oxidativa. O hidrogênio liberado é captado pelas coenzimas NAD (nicotinamida fosfato) ou NADP (nicotinamida difosfato) ou a própria enzima desidrogenase pode atuar como um aceptor, neste caso nenhuma coenzima é requerida. Os íons hidrogênio são transferidos para um sal de tetrazolium, o NBT (nitro blue tetrazolium). A redução do sal de tetrazolium pelo hidrogênio produz um depósito de formazan, o qual pode ser visualizado no sítio de atividade da enzima pela cor azul

(BANCROFT, 1996). O controle da técnica foi feito abolindo-se o substrato do meio de incubação (Anexo 2).

Os testículos também foram submetidos à técnica de Sudan Negro para detecção de lipídios, para auxiliar na investigação das células esteroideogênicas do tecido endócrino testicular (Anexo 2).

## **RESULTADOS**



## 1 – HIPÓFISE

### 1.1 - Características gerais da hipófise

A hipófise de *Rhamdia quelen* está situada na sela túrcica na base do diencéfalo (Fig. 7), sendo ligada a este pelo pedúnculo infundibular.

Com auxílio da microscopia eletrônica de varredura, observa-se que o revestimento da superfície hipofisária é liso, mas na região ventral ou inferior da glândula nota-se um pequeno sulco onde se alojam vasos e nervos de maior calibre (Fig.20 A e B). Parece que é através da região ventral da hipófise, que os vasos de maior calibre penetram no interior da glândula (Fig. 21).

Na região dorsal ou superior da hipófise, na face de inserção no diencéfalo, nota-se um sulco superficial. O sulco está localizado na região da “Rostral Pars Distalis”, onde também está localizado o ponto de inserção com a neuro-hipófise (Fig. 22 A e B). Na porção mediana da glândula, encontra-se a “Proximal Pars Distalis” e na região mais inferior, está localizada a “Pars Intermedia” (Fig. 22 B).

Microscopicamente, podem ser distintas duas porções: neuro-hipófise e adeno-hipófise. A neuro-hipófise corresponde a parte do pedúnculo que se situa no interior da hipófise, sendo constituída de tecido nervoso. Esta, penetra na adeno-hipófise pelo lado dorsal, através da “Rostral Pars Distalis”, e ramifica-se por todas as regiões da glândula (Fig.23 e 21).

Na adeno-hipófise, podem ser diferenciadas três regiões, de acordo com: a localização, a relação com a neuro-hipófise e os tipos celulares encontrados. São elas: “Rostral Pars Distalis” (RPD), “Proximal Pars Distalis” (PPD) e “Pars Intermedia” (PI) (Fig. 23). Todas as regiões da adeno-hipófise possuem ramos nervosos e vasos sanguíneos.

A RPD está situada na região dorsal da glândula, e é por onde penetra o pedúnculo hipofisário (Fig. 23) e nessa região situam-se as ramificações maiores ou principais da neuro-hipófise. É constituída por células dispostas em paliçada ao redor dos vasos sanguíneos e ramos neuro-hipofisários, e por células em arranjo cordonal (Fig. 24 A e B). Vasos sanguíneos são encontrados nessa região geralmente próximos ao tecido nervoso.

A PPD está localizada na porção mediana dorsoventral da hipófise, e compõem-se de cordões celulares envolvendo os delicados ramos neuro-hipofisários e vasos sanguíneos a eles associados (Fig. 23 e 26).

A PI ocupa a posição ventral na glândula, e apresenta numerosas mas pequenas ramificações da neuro-hipófise. Nessa região há muitos vasos sanguíneos por entre os cordões celulares (Fig. 23 e 28).

## **1.2 - Características citológicas e histoquímicas dos tipos celulares adeno-hipofisários**

A descrição dos tipos celulares adeno-hipofisários foi feita utilizando-se hipófises de fêmeas de jundiá no estágio maduro.

Nas três regiões da adeno-hipófise foram avaliados dados celulares quanto à: morfologia, localização topográfica, afinidade tintorial, bem como a resposta aos métodos histoquímicos. Puderam assim, ser identificados sete tipos celulares que são descritos a seguir.

### **“Rostral Pars Distalis” (RPD)**

Diferenciam-se nesta região 2 tipos celulares, caracterizados pela coloração Tricrômica de Mallory e Hematoxilina e Eosina.

### **Tipo I**

Esse tipo celular apresenta citoplasma com grânulos grosseiros basófilos, distribuídos de maneira desigual. As células apresentam-se formando grupos celulares arranjados de maneira peculiar ao redor dos ramos maiores e médios da neuro-hipófise e, eventualmente, ao redor dos vasos sanguíneos. São células poliédricas, volumosas, com núcleo esférico, centralizado, claro e com nucléolo aparente. São células basófilas, quando coradas pelos métodos da Hematoxilina-Eosina (Fig. 24 A) e Tricrômico de Mallory (Fig. 24 B). Reagem positivamente ao método da Hematoxilina-Chumbo (Fig. 25 A e B).

### **Tipo II**

Predominantes na região, os agrupamentos celulares estão dispersos por toda a RPD. Formam cordões celulares que se dispõem em camadas (paliçada) adjacente aos ramos neuro-hipofisários, e vasos sanguíneos principalmente. Estas células são poliédricas ou alongadas, volumosas, com núcleo esférico, claro e central, com nucléolo aparente. O citoplasma é preenchido por uma granulação grosseira, cuja abundância varia de uma célula para outra. São células acidófilas, quando coradas pelos métodos do Tricrômico de Mallory e da Hematoxilina-Eosina (Fig. 24 A e B).

Nenhum desses dois tipos celulares reagiu positivamente aos métodos histoquímicos utilizados para detecção de polissacarídeos e/ou glicoproteínas, portanto admite-se que não há componentes dessa natureza nas granulações citoplasmáticas.

**“Proximal Pars Distalis” (PPD)****Tipo I**

Seus extensos cordões celulares estão dispersos por toda a PPD, sendo as células mais abundantes dessa região da adeno-hipófise. São poliédricas, com núcleo esférico, central, claro e nucléolo evidente. Apresentam granulação abundante e grosseira, sendo células basófilas (Hematoxilina-Eosina e Tricrômico de Mallory) (Fig. 26 A e B).

Com relação à pesquisa histoquímica, estas células são positivas à reação de Ácido Periódico de Schiff (PAS) (Fig. 27 A) indicando a presença de polissacarídeos e glicoproteínas neutras. A reação com Azul de Alcian pH 2,5 (Fig. 27 B) demonstrou que estas células apresentam polissacarídeos e/ou glicoproteínas com grupos ácidos. Entretanto a intensidade de reação pode variar de uma célula para outra no caso do PAS. Na reação com Azul de Alcian pH 2,5 notou-se que as células da região periférica da PPD apresentam-se mais fortemente marcadas. As reações apresentam-se positivas após tratamento com amilase salivar, acetilação + saponificação + PAS e metilação + saponificação + Azul de Alcian pH 2,5.

**Tipo II**

Aparecem individualizadas, distribuídas ao acaso pela região. São células grandes, ovaladas, ou fusiformes. Possuem granulação fina de natureza acidófila principalmente (Fig. 26 A), podendo-se encontrar também grânulos basófilos, dividindo lugar no citoplasma, sendo então células de natureza anfófila evidenciadas pela coloração com Tricrômico de Mallory (Fig. 26 B). O núcleo esférico está na maioria das vezes excêntrico e sendo claro o nucléolo é evidente. Este tipo celular reage com a Hematoxilina-Chumbo (Fig. 25 B).

## **Pars intermedia**

### **Tipo I**

Aparecem em agrupamentos celulares dispersos pela PI. O citoplasma é levemente basófilo quando coradas pelos métodos da Hematoxilina-Eosina e de Tricrômico de Mallory. Possui uma granulação fina, cuja quantidade varia de uma célula para outra. O núcleo esférico é central e o nucléolo é evidente (Fig. 28 A e B).

### **Tipo II**

São células grandes, poliédricas, com grânulos grosseiros de natureza acidófila, podendo apresentar alguns também basófilos sendo de natureza anfófila. Essas células não formam cordões e apresentam-se dispersas por toda a PI, geralmente individualizadas. O núcleo esférico e claro, é deslocado para um dos pólos da célula, o nucléolo é evidente (Fig. 28 A e B). Essas células reagem com a Hematoxilina-Chumbo (Fig. 29).

### **Tipo III**

São cromóforas, menos freqüentes aparecem em pequenos grupos celulares ou isoladas. Poliédricas, o núcleo é esférico, claro e central, o nucléolo é bem evidente. São semelhantes na forma às células tipo I desta região, mas com os limites celulares mais bem definidos (Fig. 28 B).

## **2 – OVÁRIO**

### **2.1 - Características gerais do ovário**

Os ovários de jundiá compõem-se de estruturas pares, localizados caudalmente à vesícula gasosa. Encontram-se ligados à parede dorsal do celoma, através do mesovário.

Os ovários são alongados e sua extremidade posterior continua-se através de um oviduto. Os dois ovidutos unem-se formando um ducto comum, que se abre para o exterior através da papila urogenital. A superfície do órgão apresenta-se lisa. O tamanho, a coloração e a vascularização superficial variam de acordo com o estágio do ciclo de maturação.

Os ovários estão envoltos por um tecido capsular, cuja espessura mais ou menos uniforme em torno da gônada, pode variar conforme o estágio de maturação do ovário. A cápsula é ricamente vascularizada, sendo que sua parede é composta predominantemente por células musculares lisas e tecido conjuntivo.

### **2.2 - Fases de desenvolvimento dos oócitos**

No ovário de jundiá, os oócitos não se desenvolvem sincronicamente, e assim são encontrados simultaneamente, oócitos em vários estágios de maturação. Os tipos de oócitos, foram classificados de acordo com o critério e nomenclatura propostos por Rai (1965), Wallace e Selman (1981) e Wallace (1985):

a) Oogônias (Fig. 30) – São células pequenas com citoplasma pouco corado, núcleo grande com cromatina dispersa, e um ou dois nucléolos aparentes. A partir

destas, originam-se as células correspondentes aos oócitos em início de desenvolvimento. As oogônias geralmente são encontradas em pequenos grupos celulares entremeadas no conjuntivo das lamelas ovarianas, onde pode-se observar estas células em processo de mitose (Fig. 31).

b) Oócito cromatina-nucleolar (Fig. 30) – Representam a fase inicial de crescimento dos oócitos, possuem citoplasma escasso e claro, núcleo grande com um ou mais nucléolos proeminentes associados a feixes de material cromatínico.

c) Oócito perinucleolar (Fig. 32, 35, 39, 43) – No seu estágio inicial, estas células são poliédricas e apresentam citoplasma fortemente basófilo. Com o crescimento do oócito o núcleo também aumenta de tamanho e apresenta múltiplos nucléolos arredondados de diferentes tamanhos. Os nucléolos dispostos caracteristicamente na periferia nuclear conferem o nome a esse tipo celular. Uma fina camada folicular envolvendo o oócito, formada por células pavimentosas já pode ser visualizada. No estágio perinucleolar mais avançado (Fig. 39, 40), os oócitos apresentam-se maiores, arredondados e com citoplasma mais claro. O núcleo grande, contém nucléolos ovalados adjacentes à membrana nuclear, e material cromatínico evidente. Nesta fase, o envelope folicular começa a tornar-se mais evidente e mais alto, e aparecem as células da teca, formando uma única camada. Entre o epitélio folicular e o oócito observa-se uma camada acelular fortemente acidófila e PAS positiva, denominada zona pelúcida. Também chamada membrana vitelina ou corona radiata, esta camada torna-se proeminente nas células em estágio maturacional mais avançado (Fig. 32 e 34 A).

d) Oócito cortical-alveolar (Fig. 32, 40, 41) - Neste estágio a característica predominante que o diferencia dos oócitos anteriores, além do seu maior tamanho, é o aparecimento de estruturas citoplasmáticas esféricas. Inicialmente são pequenas

semelhantes a ou vesículas, com aspecto aparentemente vazio e de formato irregular. Tais estruturas não se coram com corantes utilizados de rotina (H.E. e Mallory), mas são positivas para Sudan Negro, sendo então esse primeiro vitelo de natureza lipídica. A medida que estas vesículas aumentam em número e tamanho, dispõem-se na periferia do citoplasma, conferindo um aspecto alveolar ou reticulado. Essas estruturas são comumente denominadas vesículas de vitelo (grandes de formato irregular). No início desta fase já podem ser visualizados grânulos de vitelo (arredondados de tamanho variável) (Fig. 33 e 34 A). O núcleo apresenta nucléolos dispostos perifericamente, e o material cromatínico é menos evidente que na fase anterior. Neste estágio, a zona pelúcida apresenta-se mais espessa (Fig. 32). O envoltório folicular compõem-se de duas camadas celulares nítidas em arranjo epitelióide: internamente uma camada de células foliculares cúbicas com um núcleo central avantajado, chamadas de células da granulosa e, externamente outra camada formada por células pavimentosas, chamadas de células da teca (Fig. 33, 35).

e) Oócito vitelogênico (Fig. 33) – Estes oócitos são maiores que os anteriores. Os grânulos de vitelo característicos dessa etapa, são bem evidentes. Inicialmente mostram-se como pequenas inclusões esféricas na periferia do citoplasma. Possivelmente através da fusão de grânulos menores, formam grânulos de vitelo maiores, que se dispersam pelo citoplasma em disposição centrípeta. O núcleo (vesícula germinal) apresenta contorno irregular, e posição levemente excêntrica. A zona pelúcida apresenta-se em seu desenvolvimento máximo e mostra acidofilia intensa. As células foliculares granulosas são cúbicas na maturação e mais altas, hipertróficas, num típico epitélio cilíndrico no oócitos maduros.

No citoplasma das células da granulosa no estágio maduro nota-se uma granulação fina, o que dá ao citoplasma um aspecto pouco homogêneo. A ultra-estrutura



dessas células mostra o citoplasma carregado de grânulos de secreção claros, pouco eletrondensos, em nítida fusão. E entre eles a presença de ribossomos livres, sob a forma de polirribossomos. O retículo endoplasmático granular (REG) mostra-se particularmente carregado de ribossomos aderidos à sua membrana (Fig. 34 B).

f) Oócitos atrésicos (Fig. 35, 43) – São estruturas modificadas de oócitos em qualquer fase de desenvolvimento, onde o núcleo aparece em desintegração, o citoplasma perde a característica homogênea, e em estágio avançado aparecem vacúolos de tamanho variado indicando reabsorção. Quando presentes, os grânulos de vitelo estão em fusão evidente, e há um nítido descolamento entre a camada de células foliculares interna (granulosa) e a externa (teca). Entre as camadas surge assim um espaço preenchido por material amorfo de natureza glicoproteica, sendo positivo para a reação de ácido periódico de Schiff (PAS) e negativo para Sudan Negro.

g) Folículo pós-ovulatório (Fig. 36, 42) – Origina-se a partir de folículos vazios (pós-desova), sendo delimitado por um epitélio simples cilíndrico, as células da granulosa e, outra camada de células pavimentosas, a teca. Bem vascularizado, o folículo apresenta-se muitas vezes contorcido e encerra em seu interior material amorfo PAS positivo. As células da granulosa sofrem alterações ao longo do ciclo reprodutivo mas, as células da teca parecem não se alterar. A ausência da zona pelúcida no folículo pós-ovulatório sugere que esta estrutura, ou foi liberada com o oócito como ocorre nos mamíferos, ou desintegrou-se.

A ultra-estrutura das células da granulosa (Fig. 37 e 38), mostra um retículo endoplasmático granular (REG) bem desenvolvido. As mitocôndrias com cristas tubulares, são encontradas em todo o citoplasma celular, embora apareçam em maior número concentradas no polo basal da célula, juntamente com o REG e o núcleo claro. Ribossomos

livres são encontrados distribuídas por todo o citoplasma, sob a forma de polirribossomos. Pôde-se observar também grânulos de secreção, lipídios, e complexo de Golgi desenvolvido, além de vesículas de fagocitose contendo material amorfo no interior. Verificou-se também a presença de desossomos (complexo juncional) entre as células vizinhas. O núcleo claro e central, mostrou cromatina com aparência granular homoganeamente distribuída pelo nucleoplasma.

### 2.3 - Caracterização dos estádios de maturação da gônada feminina

O objetivo deste trabalho foi a determinação dos estágios de desenvolvimento gonadal em peixes adultos (maduros) e jovens (imaturos).

As fêmeas de jundiá coletadas durante o período de julho de 1998 a agosto de 2000, foram agrupadas de acordo com os resultados das análises macroscópicas e microscópicas dos ovários.

Os ovários de animais imaturos são pouco volumosos e estreitos, de cor âmbar, sem vascularização aparente. Os ovários de peixes imaturos, apresentam as mesmas características microscópicas dos ovários de peixes em repouso, que será descrito a seguir. Nestes são encontradas oogônias e oócitos perinucleolares iniciais somente, e o envoltório capsular é delgado.

Utilizando-se a classificação de Lima et al. (1991), os animais adultos foram classificados em 4 grupos, de acordo com o desenvolvimento gonadal: **Repouso (R)**, **Maturação (Ma)**, **Maduro (Md)** e **Regressão (Rg)**.

No **repouso**, período relativo aos meses de junho e julho (inverno), o IGS é baixo (Tabela I; Fig. 3 e 4), os ovários são estreitos, pouco volumosos de coloração âmbar translúcida, e pouco vascularizados (Fig. 11). Os oócitos não são visualizados

macroscopicamente. Microscopicamente são observadas oogônias, oócitos perinucleares iniciais e avançados, estes predominam em tamanho (Fig. 39).

O estágio de **maturação**, ocorre nos meses de agosto e setembro (final de inverno e início de primavera) e pode ser sub-dividido em maturação inicial e final. Na maturação inicial, o IGS sofre um ligeiro aumento em relação ao período de repouso, mas aumenta muito, e rapidamente, até o final do estágio, podendo até chegar à valores equivalentes aos do estágio maduro (Tabela I, Fig.3 e 4). Os ovários são maiores que no estágio anterior, apresentam coloração amarelada e vascularização mais aparente (Fig. 8). Macroscopicamente alguns pequenos oócitos já podem ser visualizados. Microscopicamente podemos observar oogônias em processo de mitose (Fig. 31), alguns oócitos perinucleares iniciais e avançados e, oócitos em cortical-alveolares cujo aparecimento caracteriza o início do período de maturação. Estes predominam no ovário não em número, mas em tamanho (Fig. 40). No final deste estágio, já podem ser visualizados, além dos oócitos em cortical-alveolares, alguns oócitos vitelogênicos.

No estágio **maduro**, período compreendido entre os meses de outubro a março (primavera e verão), quando ocorrem desovas repetidas, o IGS aumenta de forma significativa (Tabela I, Fig.3 e 4). Os ovários estão totalmente desenvolvidos, são bastante volumosos, apresentando coloração amarelo intenso, sendo ricamente vascularizados (Fig. 9). Macroscopicamente podemos observar o ovário totalmente tomado por oócitos. Os tipos celulares observados microscopicamente são: raras oogônias, alguns poucos oócitos perinucleares e cortical-alveolares nos espaços lamelares, sendo que a maior parte do ovário é preenchida por oócitos vitelogênicos (Fig.41) Estes oócitos vitelogênicos são totalmente tomados por grânulos de vitelo, positivos tanto para PAS quanto para Sudan Negro.

No aspecto geral do ovário, outros tipos de oócitos são menos notados devido ao grande número e tamanho dos oócitos vitelogênicos. Estes apresentam células da

granulosas mais altas neste estágio do que no estágio anterior, formando um epitélio característico cilíndrico, com reação positiva para PAS e negativa para Sudan Negro.

Neste estágio a cápsula ovariana encontra-se muito fina e é facilmente rompida, deixando fluir os oócitos maduros. Alguns peixes quando capturados, liberam oócitos maduros após leve pressão abdominal.

Imediatamente após a desova são encontrados, além de oócitos em vários estágios de desenvolvimento e oócitos atrésicos, estruturas que neste trabalho chamamos de folículos pós-ovulatório. Tais estruturas são resultantes do envoltório celular do oócito maduro rompido (Fig. 36, 42), e aparecem na maior parte da vezes contorcidas, com uma cavidade contendo em seu interior material amorfo PAS positivo. São delimitadas por uma camada epitelial cilíndrica (células altas) e outra, mais externa, de células pavimentosas. Próximo ao folículo pós-ovulatório há uma boa irrigação sangüínea e a presença de infiltrados linfocitários. Tal estrutura foi encontrada apenas uma vez, no primeiro ano de coleta, no início do período de desova (novembro/1998), cuja coleta coincidiu com o período imediatamente pós-desova (1 dias após a desova).

No estágio de **regressão** que ocorre nos meses de abril e maio (outono), o IGS tem seus valores bastante diminuídos em relação ao período de desova (Tabela I, Fig. 3 e 4). É caracterizado por ovários com aparência flácida, coloração parda apresentando pontos hemorrágicos e intensa vascularização (Fig. 10). Macroscopicamente ainda são visíveis alguns oócitos. Microscopicamente são visualizadas: oogônias e oócitos perinucleolares predominantemente, e oócitos atrésicos (Fig. 35, 43).

## 2.4 – Exemplar Ovotestis

O fenômeno do hermafroditismo é comum em certas espécies de peixes, mas não é comum nos bagres, não há até o momento, nenhum relato da ocorrência de hermafroditismo para a espécie *Rhamdia quelen*.

No período de desova do primeiro ano de coleta (dezembro/1998), observou-se a presença de um animal com ovotestis. Animal fenotipicamente fêmea, apresentou valor de IGS significativamente menor em relação às fêmeas do mesmo período.

Macroscopicamente as gônadas eram ovários aparentemente normais, com exceção do tamanho reduzido para o período em questão (Fig. 18). Apesar de pouco desenvolvido podia-se notar neste ovário a olho nú, uns poucos e pequenos grupos de oócitos, em contraste com os ovários da fase de desova, que encontravam-se bem desenvolvidos e carregados de oócitos facilmente visíveis.

Microscopicamente o ovário é formado por dois tipos de tecido gonadal: um típico de fêmeas, com alguns poucos oócitos em vários estágios de desenvolvimento, incluso oócitos vitelogênicos, entremeados num segundo tecido típico de machos (Fig. 44). O tecido gonadal masculino ocupa a maior parte da gônada apresentando-se com características do tecido gonadal masculino em fase de repouso, que será melhor descrito no capítulo referente aos machos. A maior parte dos túbulos seminíferos apresenta cistos compostos somente por espermatogônias, sendo encontrados alguns poucos cistos em fase bem inicial de desenvolvimento (Fig. 45).

### **3 – TESTÍCULO**

#### **3.1 – Características gerais do testículo**

Os testículos do jundiá são estruturas pares, situados na região pósterodorsal da cavidade abdominal, em aposição à bexiga natatória e ventralmente aos rins. Esses órgãos são alongados e apresentam fileiras de franjas, em forma de dedos de luva em toda sua superfície, que se tornam proeminentes durante a época de reprodução (Fig. 46 A e B). Totalmente separados ao longo do seu comprimento, os testículos fundem-se apenas na porção caudal formando um ducto espermático comum, que se abre externamente no poro genital. As massas testiculares em ambos os lados são geralmente iguais, podendo em alguns exemplares haver pequena diferença em tamanho.

Uma fina cápsula de tecido conjuntivo, a túnica albugínea, reveste os testículos e os vasos sanguíneos. Estes tornam-se mais evidentes a medida que avança o processo germinativo. Órgãos ou estruturas sexuais acessórias, como vesículas seminais, não foram observadas em nenhuma fase do desenvolvimento gonadal.

#### **3.2 – Caracterização macroscópica dos estádios de maturação da gônada masculina.**

Nesta etapa foi feita a determinação dos estádios de desenvolvimento gonadal em peixes jovens (imaturos) e maduros.

Os machos de jundiá coletados durante o período de julho de 1998 a agosto de 2000, foram agrupados de acordo com os resultados das análises macroscópicas e microscópicas dos testículos.

Com base nas características citadas, o ciclo gonadal dos animais foi dividido em cinco fases principais: **Imaturo (I)**, animais que ainda não iniciaram a reprodução e, **Maturação (Ma)**, **Maduro (Md)**, **Regressão (Rg)** e **Repouso (R)**, para animais que já iniciaram a reprodução. A fase de maturação foi sub-dividida em maturação inicial, avançada e final.

### **Imaturos**

Os machos jovens possuem testículos de coloração salmão, levemente translúcidos, pouco volumosos e apresentam as franjas em forma de dedos de luva, pequenas, pouco desenvolvidas e com pouca vascularização (Fig. 13). Quando premidos não deixam fluir líquido algum.

### **Maturação**

Na maturação inicial o IGS ainda é baixo, mas na maturação avançada aumenta bastante em relação ao período anterior. Na maturação final alguns animais deixam fluir um líquido espesso e leitoso, após suave compressão abdominal.

Os testículos apresentam cor branca, com vascularização aparente, e as franjas em forma de dedos de luva apresentam-se bem evidentes e desenvolvidas (Fig. 14).

### **Maduro**

Período em que a reprodução está no auge, o IGS aumenta de forma significativa em relação aos estádios anteriores (Tabela II; Fig. 3 e 4). Os testículos de coloração

branca, estão totalmente desenvolvidos, grandes e pesados, ocupam grande parte da cavidade abdominal. As projeções das franjas em forma de dedos de luva estão bem desenvolvidas e aparentes, e muitas vezes se fundem na sua porção basal (Fig. 15 e 46 A e B). Deixam fluir um líquido espesso e leitoso quando o animal é submetido à leve pressão abdominal, ou mesmo quando as gônadas são simplesmente manipuladas. A vascularização sangüínea superficial é a mais evidente e calibrosa dentre todos os estádios (Fig. 46 B). Os animais estão em pleno período reprodutivo.

### **Regressão**

O IGS tem seus valores diminuídos em relação ao período de desova (Tabela II; Figura 3 e 4). Os testículos são de cor branca, com vascularização aparente, apresentando as franjas apenas ligeiramente pronunciadas (Fig. 16).

Apesar de estarem menos desenvolvidos, os testículo podem ainda deixar fluir o líquido esbranquiçado. A vascularização superficial ainda encontra-se bem desenvolvida.

### **Repouso**

Período em que o IGS dos animais é o mais baixo do ciclo (Tabela II; Fig. 3 e 4).

É caracterizada por testículos de coloração rosada e transparente na região das projeções em forma de dedos de luva e, esbranquiçados na região mais central onde provavelmente estão os espermatozóides remanescentes que ainda não foram reabsorvidos (Fig. 17).

Neste período ainda podemos encontrar alguns animais deixando fluir um pouco do líquido esbranquiçado quando as gônadas são manuseadas.



### 3.3 – Características microscópicas dos testículos

#### 3.3.1 – Organização dos lóbulos germinativos

Os testículos do *Rhamdia quelen* são revestidos externamente por uma fina cápsula de tecido conjuntivo, a túnica albugínea, que por sua vez é revestida pelo peritônio. Cada testículo é formado por um grande e variável número de lóbulos germinativos, separados entre si pelo tecido intersticial. No jundiá os testículos são do tipo irrestrito. Não foi notada diferença histológica entre as regiões testiculares, anterior, média e posterior.

Os lóbulos são estruturas irregulares, cuja forma e tamanho podem variar de acordo com a fase do ciclo. São preenchidos por células germinativas, as quais podem estar em vários estágios de maturação, e por um número variável de células de disposição lobular periférica, as células de Sertoli. Externamente são revestidos por uma lâmina basal e células mióides.

No interior dos lóbulos testiculares as células germinativas aparecem geralmente, encerradas nos chamados cistos intralobulares (Fig. 1, 47, 55). Esses cistos podem conter células germinativas em diferentes estágios de desenvolvimento, porém cada cisto geralmente apresenta todas as células numa mesma fase (Fig. 47, 55).

O tecido intersticial, quando disposto numa região de contato entre três ou mais lóbulos apresenta-se de forma triangular, encerrando no interior do tecido conjuntivo, pequenos vasos sanguíneos e agrupamentos de células intersticiais (Fig. 48).

Com a maturação, ocorre adelgaçamento do tecido intersticial, e os lóbulos germinativos fundem-se formando anastomoses que dão origem a condutos primários que desembocam em um ducto comum no interior de cada testículo, o ducto espermático, que por sua vez, desemboca na papila genital.

### 3.3.2 – Tipos celulares germinativos

São identificáveis nos testículo desta espécie, seis tipos de células germinativas, sendo classificadas segundo as características básicas:

a) **Espermatogônias primárias** (Fig. 47 , 54, 58) – São as maiores células encontradas e apresentam contorno celular nítido. O citoplasma apresenta-se claro e abundante, contendo em seu interior material ligeiramente basófilo. O núcleo em posição central é facilmente definido pela disposição característica de grumos de cromatina, na periferia da membrana nuclear. É grande, esférico e claro, o que possibilita a visão de um ou dois nucléolos, dispostos no centro da célula ou na periferia. As espermatogônias primárias aparecem freqüentemente junto à parede interna dos lóbulos testiculares, podendo estar ou não organizadas em cistos.

b) **Espermatogônias secundárias** (Fig. 58). – São estruturalmente similares às espermatogônias primárias, no entanto, são bem menores que estas. A membrana celular nem sempre é nítida, o núcleo é menor e a cromatina está mais condensada que na fase anterior. Um ou dois nucléolos apresentam-se bem corados e visíveis, posicionados perifericamente. Estas células também dispõem-se na periferia interna dos túbulos e podem se organizar em cistos

c) **Espermatócitos primários** (Fig. 47, 52, 55) – Se formam a partir das divisões mitóticas das espermatogônias. Estas células são ligeiramente menores que as espermatogônias secundárias, com citoplasma claro apresentando pouca afinidade tintorial. O núcleo basófilo apresenta grumos de cromatina geralmente dispersos, o que muitas vezes impede a visualização do nucléolo. Apresentam-se como grupos celulares dentro dos cistos tubulares.

d) **Espermatócitos secundários** (Fig. 47, 52, 55) – São formados após a primeira divisão meiótica dos espermatócitos primários, sendo células menores que estas, com citoplasma claro. A cromatina nuclear densamente corada, forma uma figura característica de meia-lua que dispõem-se em um dos polos do núcleo. Constituem cistos.

e) **Espermátides** (Fig. 47, 52, 55) – Se originam da segunda divisão meiótica dos espermatócitos secundários. A célula é fortemente basófila, com núcleo esférico e o citoplasma escasso. As espermátides sofrem um processo de diferenciação, a espermiogênese, para originar os espermatozóides. Sendo que nesta etapa ocorrem modificações importantes e gradativas a nível de citoplasma e núcleo. Devido ao seu tamanho e aspecto, muitas vezes podem ser confundidas com os espermatozóides, ao nível de microscopia de luz.

f) **Espermatozóides** (Fig. 47, 48, 54, 55, 56) – São as menores células germinativas encontradas livres no lume tubular. Estas células possuem uma cabeça ovalada, contendo um núcleo com intensa afinidade tintorial que ocupa a maior parte da cabeça do espermatozóide, e uma cauda longa e fina, acidófila.

### 3.3.3 – Outros tipos celulares

No testículo do *Rhamdia quelen* além das células germinativas descritas na região tubular, foram observados outros três tipos celulares característicos, um no compartimento lobular e dois no compartimento intersticial.

a) **Compartimento lobular** – Encontram-se células semelhantes às células de Sertoli dos mamíferos, sendo assim chamadas neste trabalho. São células somáticas distintas das células germinativas e delineiam a periferia interna dos lóbulos germinativos estando próximas às espermatogônias. Possuem um núcleo grande, com forma arredondada ou oval. O

aspecto claro do núcleo, com escassa cromatina condensada em pequenos grumos dispostos perifericamente, deixam aparente o nucléolo. O citoplasma é acidófilo (Fig. 58).

Apresentaram resultado negativo para a técnica de Sudan Negro, não sendo detectada a presença de lipídios no citoplasma.

b) **Compartimento intersticial** – Na região interlobular, além de outros elementos celulares do tecido intersticial, são observados pequenos grupos de um outro tipo celular, mais freqüentemente encontrado na região de perfil triangular, que está delineada por três ou mais lóbulos. Essas células se assemelham às células de Leydig de mamíferos, e são assim chamadas por muitos autores ou também denominadas células intersticiais. Estas células apresentam núcleo oval, basófilo, com cromatina condensada, e citoplasma claro mas sem uma formato regular (Fig. 47, 48).

Apresentam resultado positivo para a técnica de Sudan Negro, confirmando assim a presença de lipídios no citoplasma (Fig. 49).

c) **Células mióides** – Estão localizadas na região extratubular, em íntimo contato com os lóbulos testiculares, delimitando-o. Semelhantes às células mióides de mamíferos, são células pequenas com núcleo fortemente basófilo e fusiforme (Fig. 58).

### **3.4 – Caracterização microscópicas dos estádios de maturação da gônada masculina.**

Cinco fases principais foram bem definidas: **Imaturo, Maturação, Maduro, Regressão e Repouso**. A fase de maturação foi subdividida em maturação inicial, avançada e final, as outras fases foram subdivididas em período inicial e período final.

### **Imaturo**

As únicas células da linhagem germinativa encontradas no testículo são as espermatogônias primárias e secundárias, ao redor da parede dos lóbulos testiculares, que por sua vez, apresentam luz pouco dilatada. O tecido intersticial é delgado (Fig. 50).

### **Maturação**

No início desta fase, cistos lobulares começam a ser formados, e é onde se encontram principalmente espermatócitos primários e secundários. Mas, espermátides e pequena quantidade de espermatozóides já podem ser notados. Ainda são freqüentes as espermatogônias primárias, que aparecem enfileiradas em torno do lóbulo testicular (Fig. 51).

A maturação avançada é marcada por um aumento sensível no tamanho dos lóbulos testiculares. As variações que ocorrem nesta fase, dizem respeito ao aumento no tamanho dos cistos, bem como à variação dos tipos celulares.

Nesta etapa da reprodução, há uma maior quantidade de cistos grandes, contendo células germinativas numa mesma fase. Onde podemos encontrar cistos contendo desde espermatócitos primários e secundários, até espermátides. Mas são menos freqüentes as espermatogônias que aparecem em pequena quantidade, isoladas. Os espermatozóides são mais abundantes (Fig. 52). Ao final da fase de maturação, já é encontrada grande quantidade de espermatozóides no lume tubular.

### **Maduro**

Os lóbulos testiculares são irregulares em sua forma e têm seu tamanho aumentado. Apresentam o lume tubular muito alargado e repleto quase que totalmente de espermatozóides (Fig. 53). Esta característica se mantém durante todo o período reprodutivo.

No auge da reprodução tanto a quantidade quanto o tamanho dos cistos, se reduz muito. Por sua vez, as espermatogônias primárias e secundárias aparecem nesta fase, em maior número em relação à fase anterior, revestindo a parede tubular (Fig. 54).

O tamanho dos testículos é mantido pela enorme quantidade de espermatozóides armazenados no lume tubular.

Ao final desta fase, novamente se repete o aumento do número e da frequência dos cistos germinativos. Por outro lado nota-se um início de declínio na quantidade de espermatozóides armazenados no lume (Fig. 55). O tecido intersticial fica mais delgado, fato que perdura até o final da fase reprodutiva.

### **Regressão**

No início do período nota-se a presença marcante das espermatogônias primárias, na periferia da parede do lóbulo. Nesta fase, estas células voltam a predominar em número, formando extensos agrupamentos em uma ou mais camadas celulares. Nota-se ainda que em alguns animais, há uma pequena quantidade de cistos pequenos, com células em várias fases de desenvolvimento (Fig. 56).

Ao final do período de regressão há uma desorganização da estrutura dos lóbulos e espessamento do tecido intersticial. Desaparecem os cistos, havendo só espermatogônias revestindo a parede do lóbulo, a quantidade de espermatozóides está bastante diminuída (Fig. 57).

### **Repouso**

Os testículos apresentam lóbulos de formato mais regular e tamanho reduzido em relação às outras fases do ciclo. Neste estágio praticamente não existem cistos intralobulares, embora estes comecem a se organizar na etapa final deste estágio.

Apesar da liberação natural de gametas durante o ato reprodutivo, neste estágio ainda encontram-se presentes pequenas quantidades de espermatozóides nos túbulos. São considerados como residuais por não terem sido expelidos pelas gônadas.

A condição típica de repouso é aquela em que não aparecem mais espermatozóides residuais no lume lobular, e a ausência total de espermatócitos indica que a espermatogênese não começou. As células germinativas presentes são somente as espermatogônias. A luz lobular está reduzida, e o tecido intersticial está novamente espessado (Fig. 58).

É um período muito curto, no primeiro momento em que a temperatura ambiental subir e se mantiver estável durante alguns dias, a espermatogênese inicia, e os animais já começam a se preparar para a reprodução.

### **3.5 – Tecido endócrino testicular.**

Nas condições experimentais em que foram submetidas as amostras, foi possível detectar células endócrinas apenas na região intersticial.

A região intersticial ou interlobular, rica em vasos sanguíneos, possui células somáticas especiais denominadas células intersticiais ou de Leydig. Estas células estão dispostas tanto isoladamente como em pequenos grupos (Fig.47, 48), especialmente onde o tecido intersticial exibe uma conformação triangular, ao separar três ou mais lóbulos germinativos.

Das enzimas diretamente envolvidas na biossíntese dos esteróides, foram analisadas histoquimicamente a delta 5-3beta-hidroxiesteróide desidrogenase ( $\Delta^5$  - 3 $\beta$ - HED) e 17 beta-hidroxiesteróide (17 $\beta$ - HED).

A  $\Delta^5$ -3 $\beta$ -HED ocupa uma posição chave nesta biossíntese, e é capaz de converter, irreversivelmente os  $\Delta^5$ -3 $\beta$ -hidroxiesteróides ( $\Delta^5$ -pregnenolona; 17 $\beta$ -hidroxipregnenolona; dehidroepiandrosterona) para os  $\Delta^4$ -3 cetosteróides (progesterona e androstenediona). Por outro lado, a 17 $\beta$ -HED é essencial no metabolismo dos 17 $\beta$ -hidroxiesteróides (testosterona e 17 $\beta$ -estradiol), realizando a conversão reversível da testosterona para a  $\Delta^4$ -androsteno-3-17-diona.

Na avaliação histoquímica-enzimática durante o ciclo germinativo para a presença das enzimas  $\Delta^5$ -3 $\beta$ -HED e 17 $\beta$ -HED, foi detectada reação positiva nas células intersticiais, apenas para a  $\Delta^5$ -3 $\beta$ -HED, em todas as fases do ciclo reprodutivo. Nas condições experimentais utilizadas não foi detectada atividade positiva para a 17 $\beta$ -HED, em nenhuma das fases do ciclo germinativo.

A intensidade das reações enzimáticas para a  $\Delta^5$ -3 $\beta$ -HED, nas células intersticiais, estão registradas nas figuras 59 B, C e D. E foram consideradas como fraca (+), moderada (++) e forte (+++).

**Repouso** – neste estágio os grupamentos de células intersticiais são pequenos e evidenciam fraca reação (+) para a atividade enzimática para a  $\Delta^5$ -3 $\beta$ -HED (Fig. 59 B).

**Maturação** – com o início de um novo ciclo reprodutivo não foi evidenciada alterações na intensidade de reação observada no repouso sendo também considerada fraca (+) (Fig. 59 B).

**Maduro** – nesta fase nota-se um maior número de células intersticiais, com aumento progressivo na intensidade da reação, que passa a ser forte (+++), para a atividade enzimática da  $\Delta^5$ -3 $\beta$ -HED (Fig. 59 C).



**Regressão** – as células intersticiais apresentam neste período um declínio na atividade para a  $\Delta^5$ -3 $\beta$ -HED, em relação à fase anterior, sendo a reação considerada moderada (++) (Fig. 60D).

#### 4 - Tecido interrenal e células cromafins

O rim do *Rhamdia quelen* é formado por dois lobos, o direito e o esquerdo, parcialmente unidos na região posterior, localizados ventrolateralmente à coluna vertebral e póstero-lateral à bexiga natatória (Fig. 19 A e B). A região anterior ou cefálica do órgão, apresenta além do tecido renal, tecido hemocitopoético e tecido interrenal. Externamente a região cefálica do rim, é revestida por um tecido hialino de espessura média. É composto principalmente por tecido adiposo e tecido conjuntivo propriamente dito, onde estão presentes as células cromafins.

A interrenal em peixes, só pode ser distinguida histologicamente, uma vez que não forma um órgão distinto, sendo constituída por agrupamentos de células foliculares, entremeadas no tecido do rim cefálico entre glomérulos e túbulos renais. Esta glândula, se encontra no jundiá formada por cordões celulares, distribuídos tanto em camadas celulares ao redor da veia cardinal posterior e dos seus ramos, como também, dispersos em pequenos grupos celulares por entre o tecido do rim cefálico. Pequenos capilares sanguíneos podem ser encontrados entre os cordões celulares, irrigando o tecido.

As células da interrenal são poliédricas, claras, com citoplasma acidófilo, núcleo arredondado, central com cromatina dispersa em grumos e nucléolo evidente (Fig. 60). O aspecto citoplasmático das células pode variar conforme o estágio do ciclo reprodutivo em questão.

No *Rhamdia quelen* as células cromafins não estão associadas a interrenal, pois localizam-se fora do tecido renal, na superfície externa. Apresentam-se em pequenos grupos celulares na maioria das vezes, associada à parede dos vasos sanguíneos de maior calibre (artérias

e veias) e nervos (Fig. 61 A e B). Aparecem também associadas ao próprio tecido adiposo e ao tecido conjuntivo capsular do rim cefálico.

São células grandes com citoplasma carregado de grânulos grosseiros, positivos para a reação cromafin (Fig. 61 A e B). Nos preparados histológicos rotineiros, o citoplasma é levemente acidófilo e claro. O núcleo é central, arredondado e apresenta cromatina em grumos dispostos ao redor da membrana nuclear, de aspecto claro permite a visualização de um ou dois nucléolos.

Durante o ciclo gonadal, não há diferença quanto ao aspecto de distribuição do tecido interrenal, nem modificações ao nível de morfologia celular, no entanto algumas modificações ao nível citoplasmático podem ser notadas para machos e fêmeas.

**Fêmeas** – Nota-se que durante os estádios de **maturação e maduro**, a interrenal das fêmeas apresenta um citoplasma levemente acidófilo. Durante estes estádios, o citoplasma apresenta aspecto vacuolizado e portanto menos corado. Em contraste, durante o **repouso**, o citoplasma dessas células exibe forte acidofilia, sendo o contorno celular mais bem definido. No estágio de **regressão**, a acidofilia citoplasmática é intermediária em relação às fases de maduro e repouso.

**Machos** – Os machos apresentam durante os estádios de **maturação, maduro e regressão**, o citoplasma das células interrenais levemente acidófilo. A presença de vacúolos citoplasmáticos, assim como nas fêmeas, ocorre no estágio maduro. No período de **repouso**, nota-se o citoplasma levemente basófilo.

## 5 – O ciclo reprodutivo e os fatores climáticos.

Num primeiro processo, irreversível, os animais jovens chegam à maturação sexual ocorrendo a primeira desova. Num segundo processo, reversível, os animais já adultos, apresentam ciclos periódicos de reprodução conforme a época do ano, que pode variar de uma espécie para outra.

Durante o ciclo de maturação do *Rhamdia quelen*, nota-se que as modificações nas gônadas se efetuam de forma gradativa, variando as características tanto macroscópicas quanto microscópicas até atingirem o limiar da reprodução. Essas mudanças são concomitantes com fatores ambientais, principalmente variações nas temperaturas.

Com base nos valores dos percentuais de peso de massa testicular em relação ao peso total do animal (IGS), e nas características macroscópicas e microscópicas das gônadas, foi possível determinar a dinâmica do ciclo gonadal, que é a mesma para machos e fêmeas, e a época da reprodução do *Rhamdia quelen*.

O período de **maturação** se dá a partir de meados do mês de agosto, final do inverno, até setembro no início da primavera, onde as temperaturas ambientais e fotoperíodo, começam a se elevar. É um período onde o crescimento das gônadas acontece muito rapidamente, desde o início da maturação até o final, e ocorre de maneira similar em machos e fêmeas.

No período de maturação do primeiro ciclo (Fig. 3), nota-se que ao fazer a média do IGS, o valor de agosto (muito baixo) faz com que o índice de setembro (muito alto) caia, e temos um valor médio equilibrado. Desta maneira, o IGS médio do estádio fica segundo o esperado, com valores um pouco menores aos encontrados para o período maduro. E, observando-se o gráfico de temperaturas, nota-se que estas se mantêm relativamente estáveis nos

meses de julho e agosto, subindo gradativamente a partir de setembro até atingirem um pico em janeiro, quando então começam a decrescer.

No segundo ciclo, os valores do IGS (Fig. 4) ficaram um pouco truncados por dois motivos. A temperatura muito alta no período de maturação do segundo ciclo, fez com que o período inicial do estágio ocorresse muito rapidamente, e os dados não foram registrados. E coincidentemente, os dados de IGS do estágio maduro foram mais baixos que no ano anterior, uma vez que não foi possível adaptar (em nenhum dos dois ciclos) a data da coleta em relação ao dia da desova. Em decorrência disso os valores do IGS podem variar dentro do mesmo estágio. Sendo assim obtivemos, ao acaso, valores de IGS menores no estágio maduro do segundo ciclo.

No segundo ciclo, as temperaturas foram um pouco diferentes das encontradas no primeiro ciclo (Fig. 2). No estágio de maturação do segundo ciclo, as temperaturas sofreram elevação já a partir do mês de agosto. Portanto estas começaram a se elevar um mês antes do ocorrido para o primeiro ciclo. E continuaram subindo até setembro, onde permaneceram mais ou menos estáveis até outubro. Novo aumento substantivo só aconteceu a partir de novembro.

Em decorrência das temperaturas de agosto já estarem em elevação, o período inicial do estágio de maturação foi muito curto no segundo ciclo. Assim só foram obtidos dados do IGS em fase mais adiantada do estágio. Além das temperaturas de agosto já estarem em elevação, as temperaturas do mês de setembro do segundo ciclo foram mais altas do que as encontradas no mesmo período do ciclo anterior. Tal fato resultou em crescimento gonadal mais rápido e IGS com valores mais altos. Pela ausência dos dados da maturação inicial, os valores do IGS do estágio de maturação do segundo ciclo ficaram muito altos, sendo superiores até mesmo aos valores médios do IGS do estágio maduro.

As temperaturas mais altas no período de maturação do segundo ciclo, foi deveras um fator determinante dos altos valores de IGS, tanto em machos como em fêmeas. O IGS do período de maturação inicial é importante no equilíbrio dos valores médios.

Os dados de IGS de um terceiro ciclo no estágio de maturação inicial, confirmam os índices baixos do IGS para o início do período, e são concordantes com os valores de IGS do primeiro ciclo, apresentando-se baixo para o período.

Mas, apesar do IGS alto no período de maturação do segundo ciclo, os dados histológicos mostraram gônadas em período legítimo de maturação, com características pertinentes ao estágio. A temperatura apesar de ter contribuído para um aumento substancial do IGS, não foi suficiente para alterar o desenvolvimento da espermatogênese no período.

O estágio **maduro** ocorre para a espécie, a partir de outubro até meados de abril, período correspondente a primavera, verão, e início de outono. Sendo que, o auge do desenvolvimento gonadal e portanto da reprodução, é atingido durante a primavera e o verão, onde as temperaturas atmosféricas (Fig. 2) e da água são mais elevadas, esta podendo chegar a valores de 31°C no alto verão (BARCELLOS *et al.*, 2001). O IGS de machos e fêmeas atinge, durante o período, os valores máximos (Fig. 3).

Em meados de abril e maio, no outono, os peixes já apresentam características de gônadas de animais em **regressão**, decrescendo também os valores de IGS. O estágio de **repouso** para as fêmeas ocorre nos meses de junho e julho, meses de inverno. Já para os machos o período de repouso é muito curto, ocorrendo apenas em meados de julho, onde a temperatura ambiente, decresce (Fig. 2), e a temperatura da água varia em torno de 8 °C (BARCELLOS *et al.*, 2001). A temperatura desempenha um papel crucial no desenvolvimento gonadal. Mas parece não haver correlação entre pluviosidade e a época de reprodução do jundiá.

O período relativamente longo de reprodução, caracteriza que os peixes desta espécie, não se reproduzem de uma vez só mas apresentam desovas parceladas durante todo o período reprodutivo, que ocorre preferencialmente durante a primavera e o verão, meses mais quentes. E também, há uma certa sincronia no fenômeno da desova, para um mesmo cardume de fêmeas e machos, uma vez que as gônadas dos animais coletados apresentaram sempre pouquíssimas diferenças individuais quanto a análise microscopia dos ovários e dos testículos.

## **FIGURAS E TABELAS**



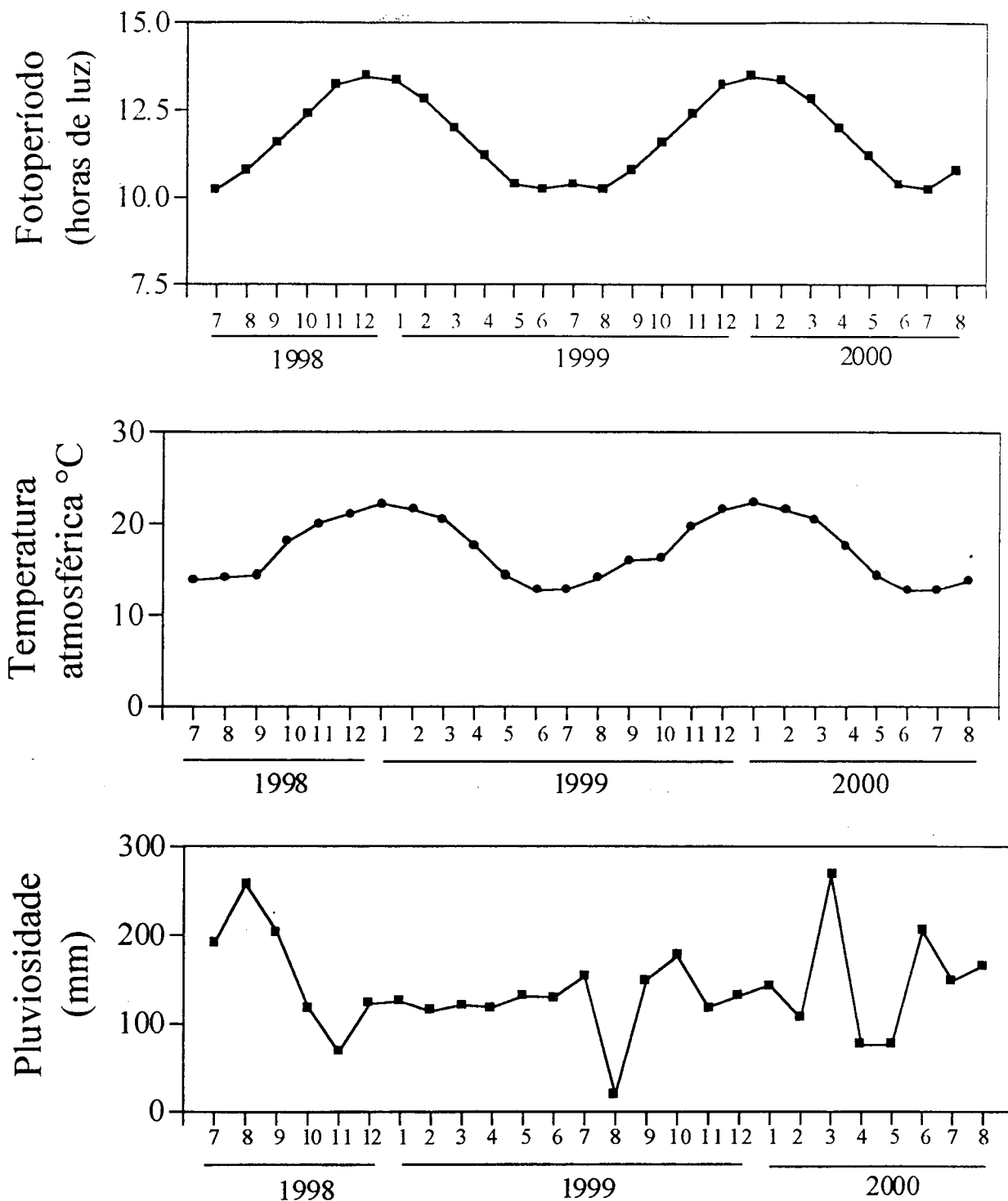
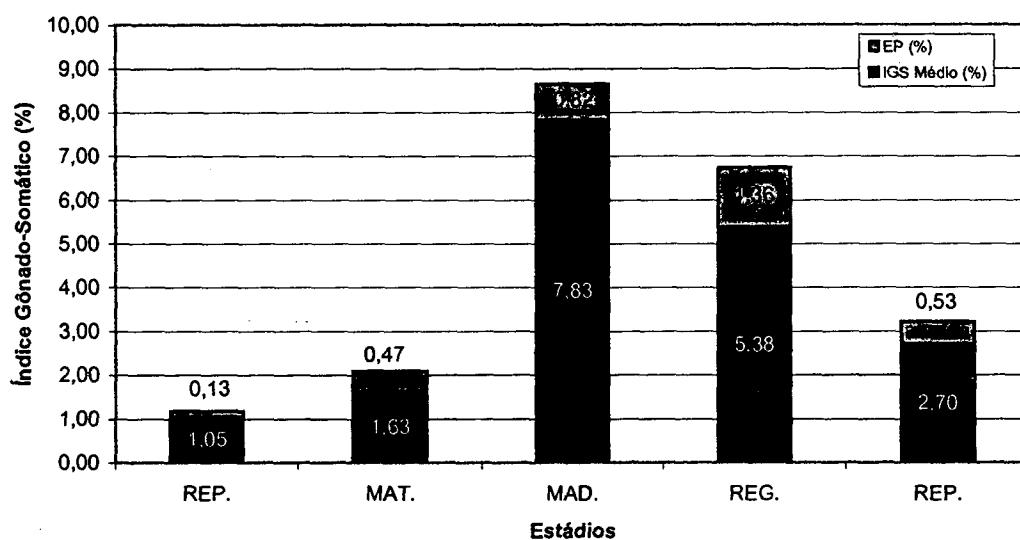


Figura 2. Condições climáticas em Passo Fundo –RS, no período de julho de 1998 a agosto de 2000, durante o período de coleta. Os valores são apresentados como média mensal. A) Fotoperíodo. B) Temperatura atmosférica em °C. C) Pluviosidade em mm. Dados obtidos junto a Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária –RS (EMBRAPA – RS).

### IGS Fêmea 1998-1999



### IGS Macho 1998-1999

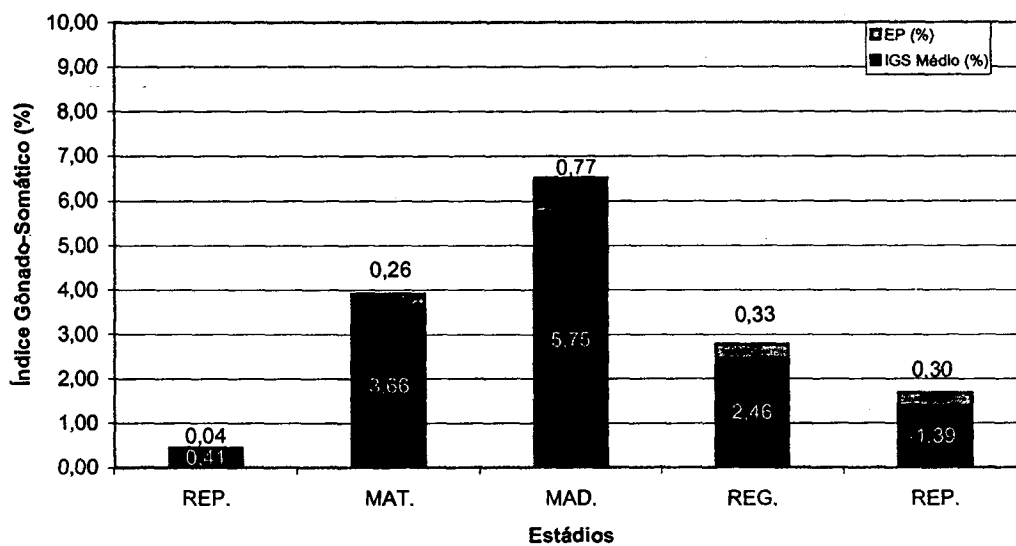
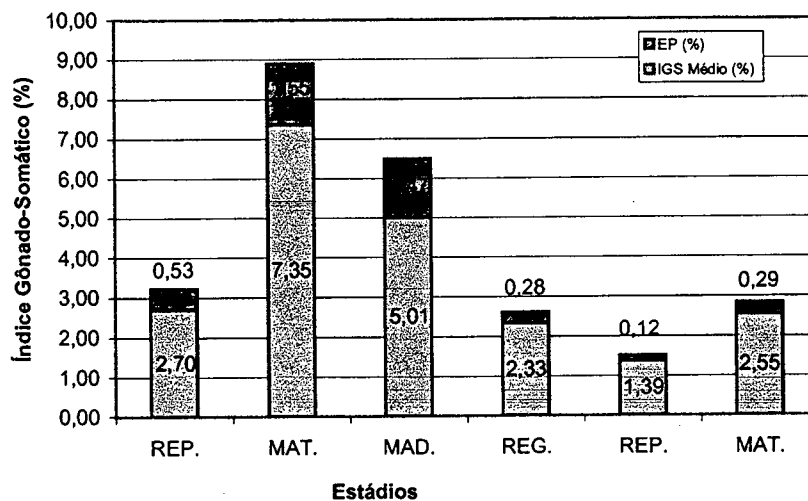


Figura 2: Distribuição do IGS de fêmeas e machos de *Rhandia quelen* durante os estádios do primeiro ciclo reprodutivo (1998-1999). Rep. (Repouso - Jun - Jul); Mat. (Maturação - Ago - Set); Mad. (Maduro - Out - Mar); Reg. (Regressão - Abr - Mai).

## IGS Fêmea 1999-2000



## IGS Macho 1999-2000

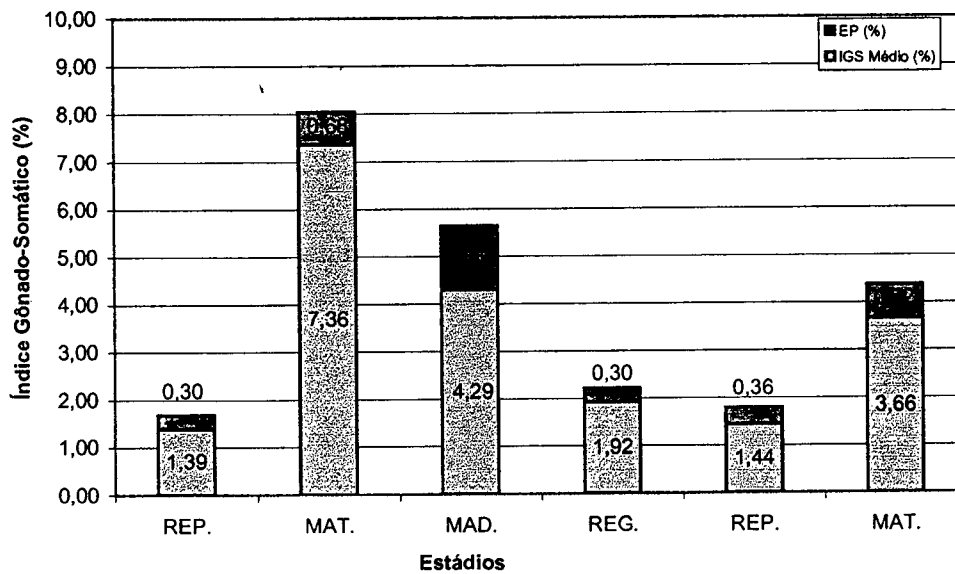


Figura 3 : Distribuição do IGS de fêmeas e machos de *Rhandia quelen* durante os estádios do segundo ciclo reprodutivo (1999-2000).  
 Rep. (Repouso - Jun - Jul); Mat. (Maturação - Ago - Set);  
 Mad. (Maduro - Out - Mar); Reg. (Regressão - Abr - Mai).

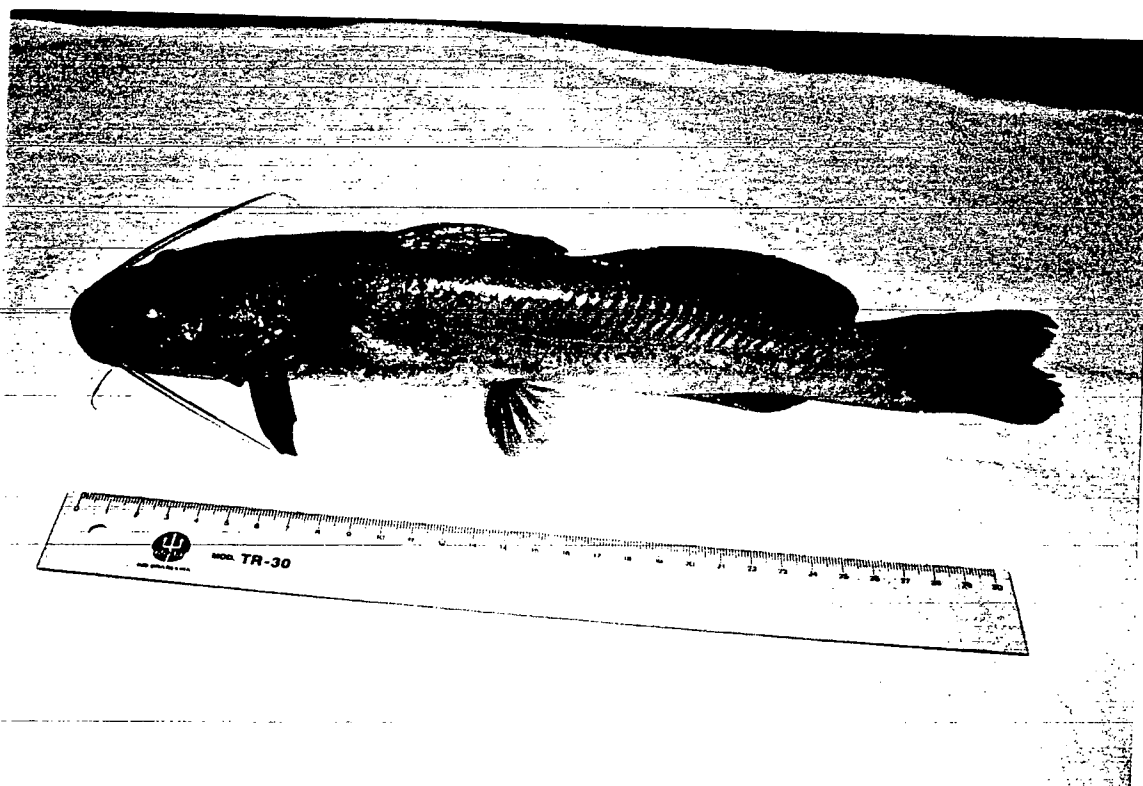


Figura 5. *Rhamdia quelen*. Exemplar adulto.



Figura 6. Estação de Piscicultura da Fundação Universidade de Passo Fundo. Viveiros de 100 m<sup>2</sup> para peixes reprodutores.

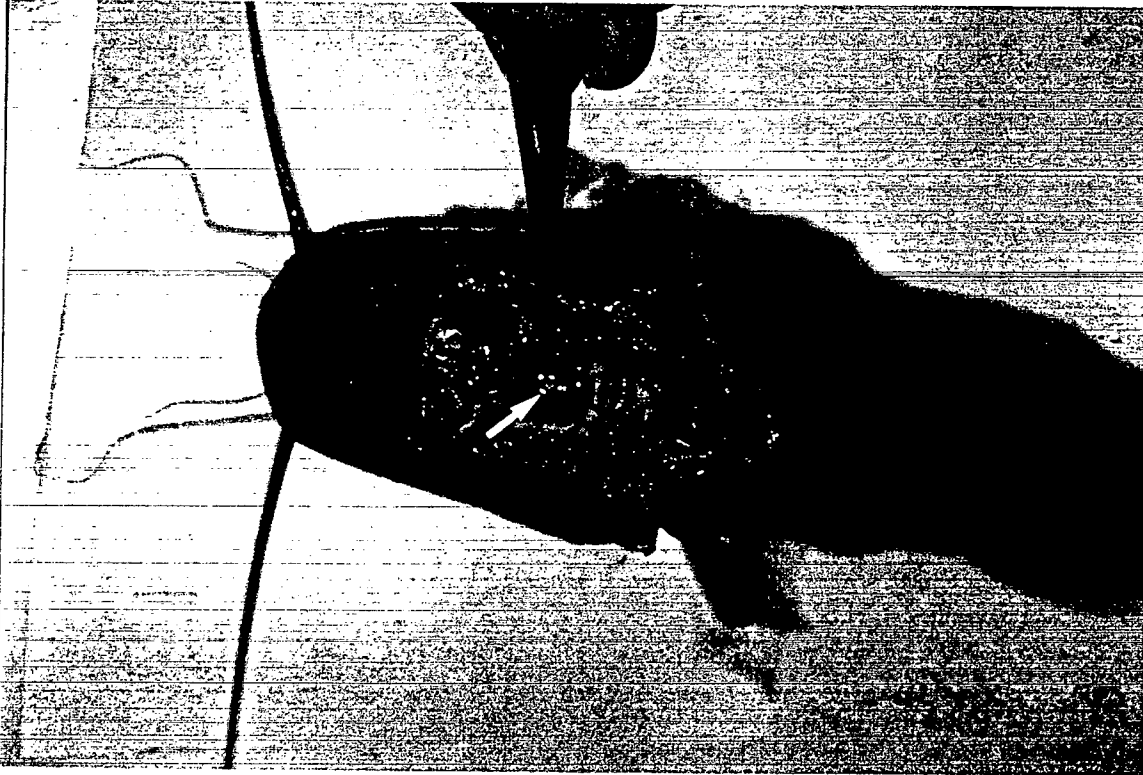


Figura 7. *Rhamdia quelen*. Hipófise localizada na sela túrcica (seta).

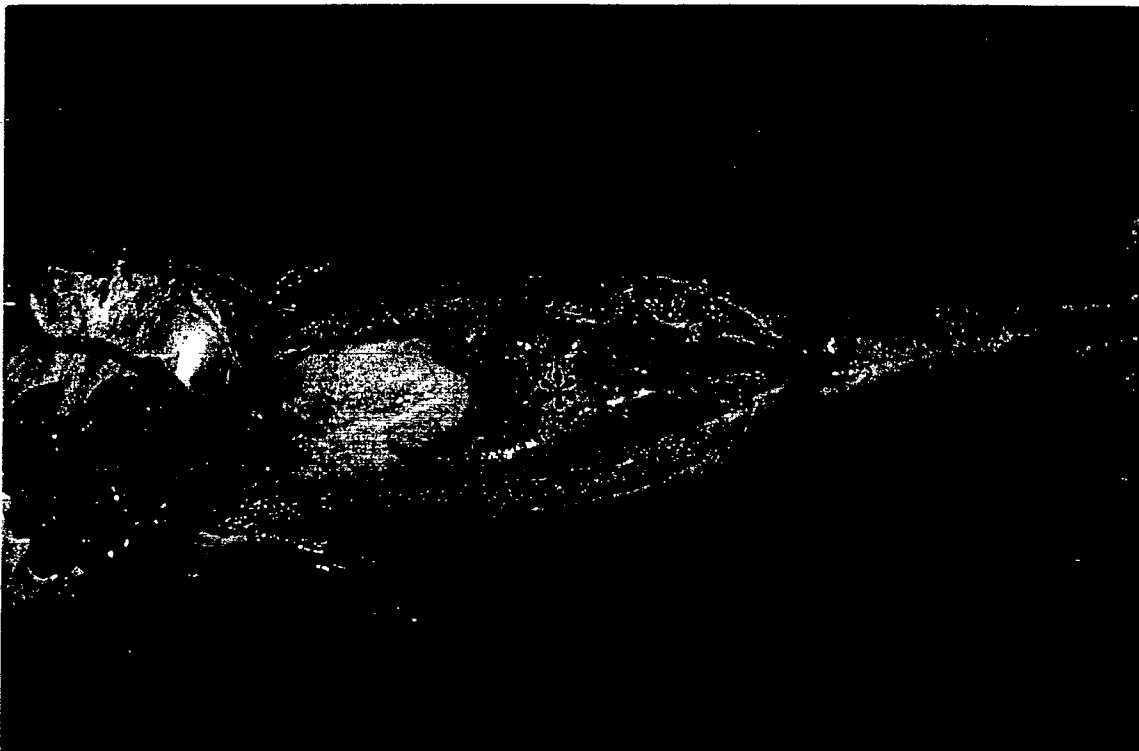


Figura 8. *Rhamdia quelen*. Ovários no estágio de maturação (\*).

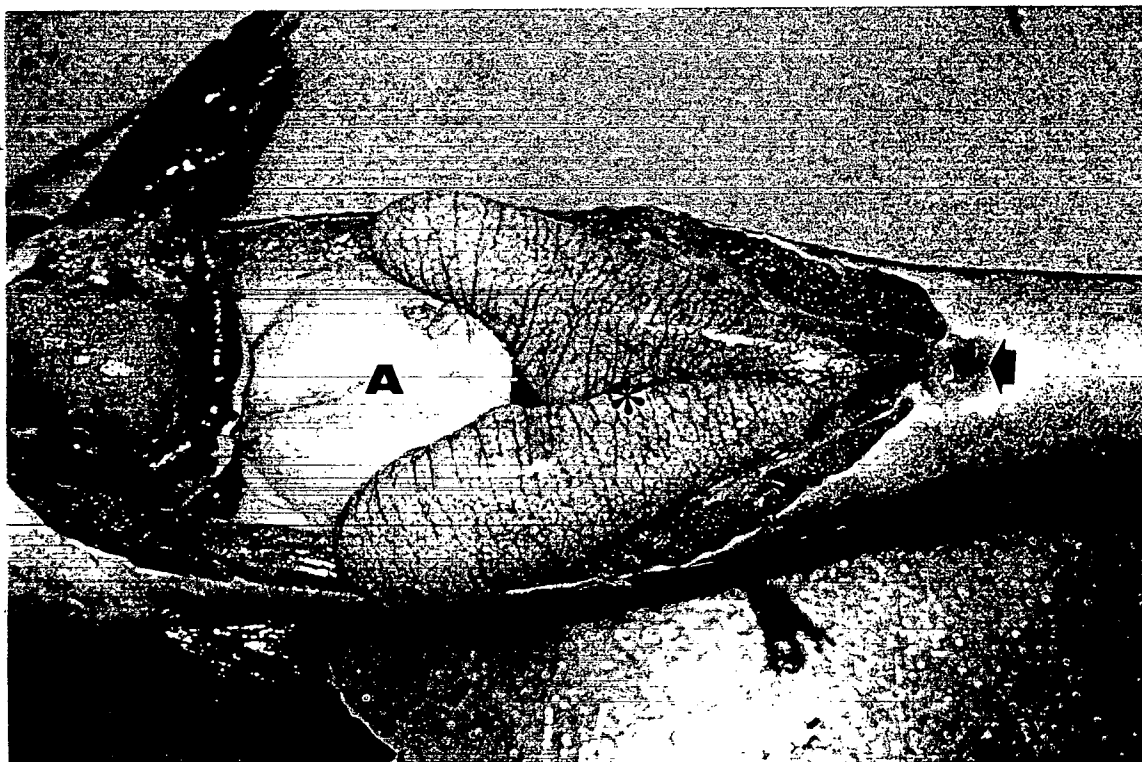


Figura 9. *Rhamdia quelen*. Ovários no estágio maduro(\*), ocupando grande parte da cavidade abdominal e com numerosos vasos sanguíneos aparentes. Bexiga natatória (A) e papila urogenital (seta).



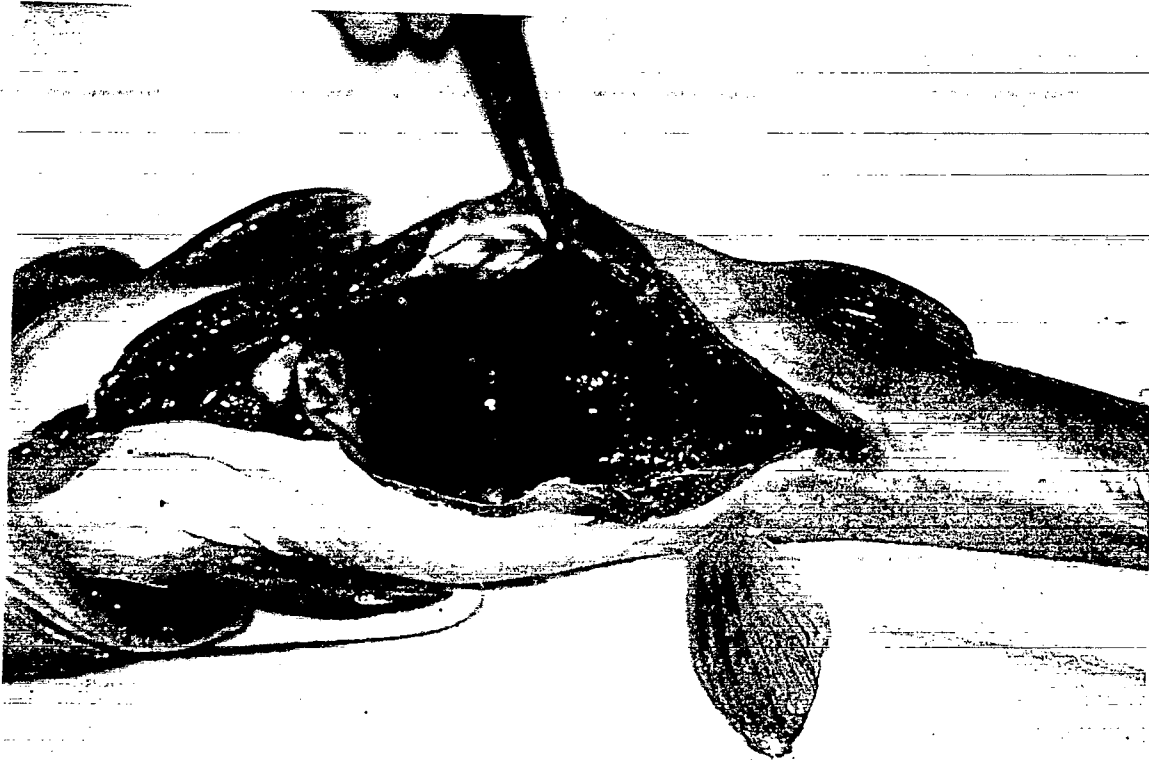


Figura 10. *Rhamdia quelen*. Ovários no estágio de regressão (\*), onde nota-se aspecto sangüinolento e grande redução do volume em relação ao estágio de maduro.

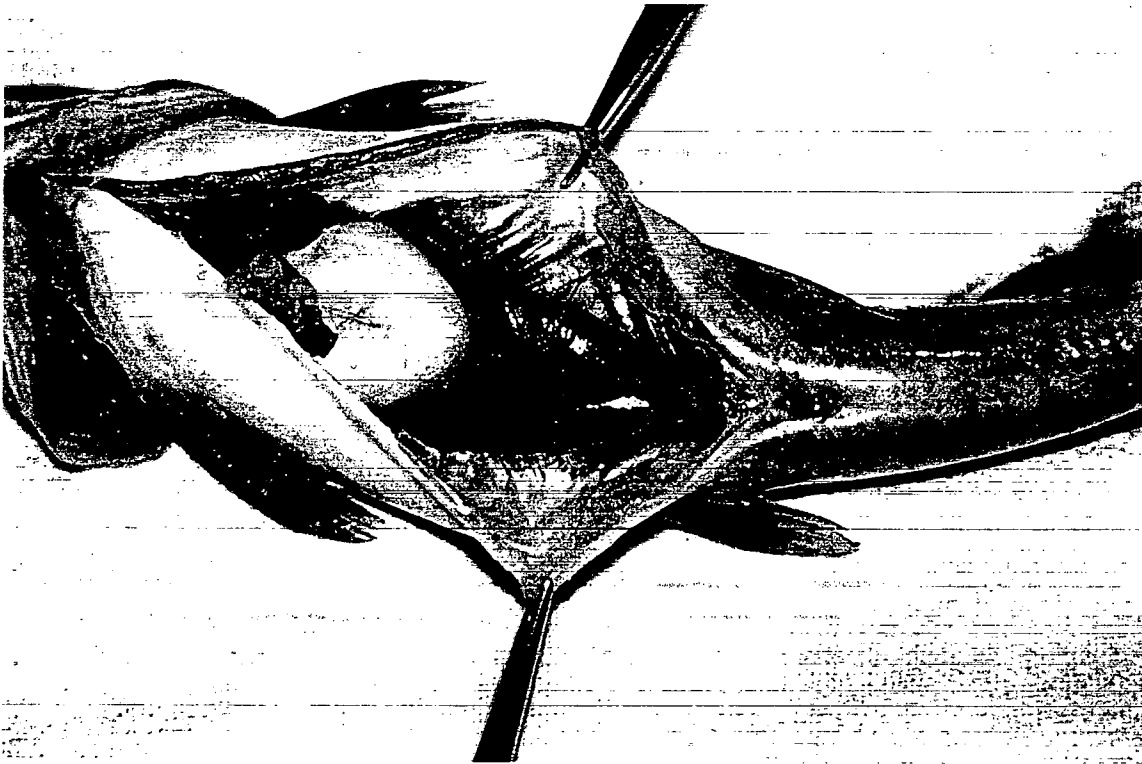


Figura 11. *Rhamdia quelen*. Ovários no estágio de repouso (\*), são estreitos e pouco volumosos, e a vascularização é pouco aparente.

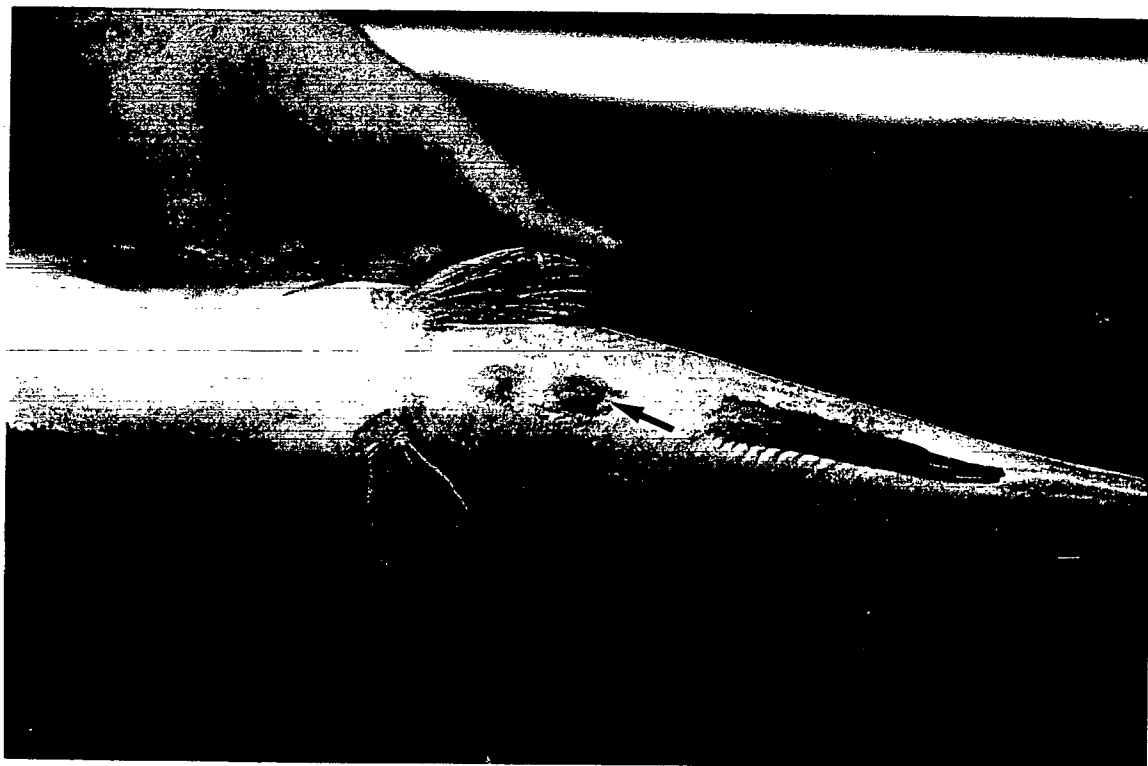


Figura 12. *Rhamdia quelen*. Papila urogenital do macho (seta).

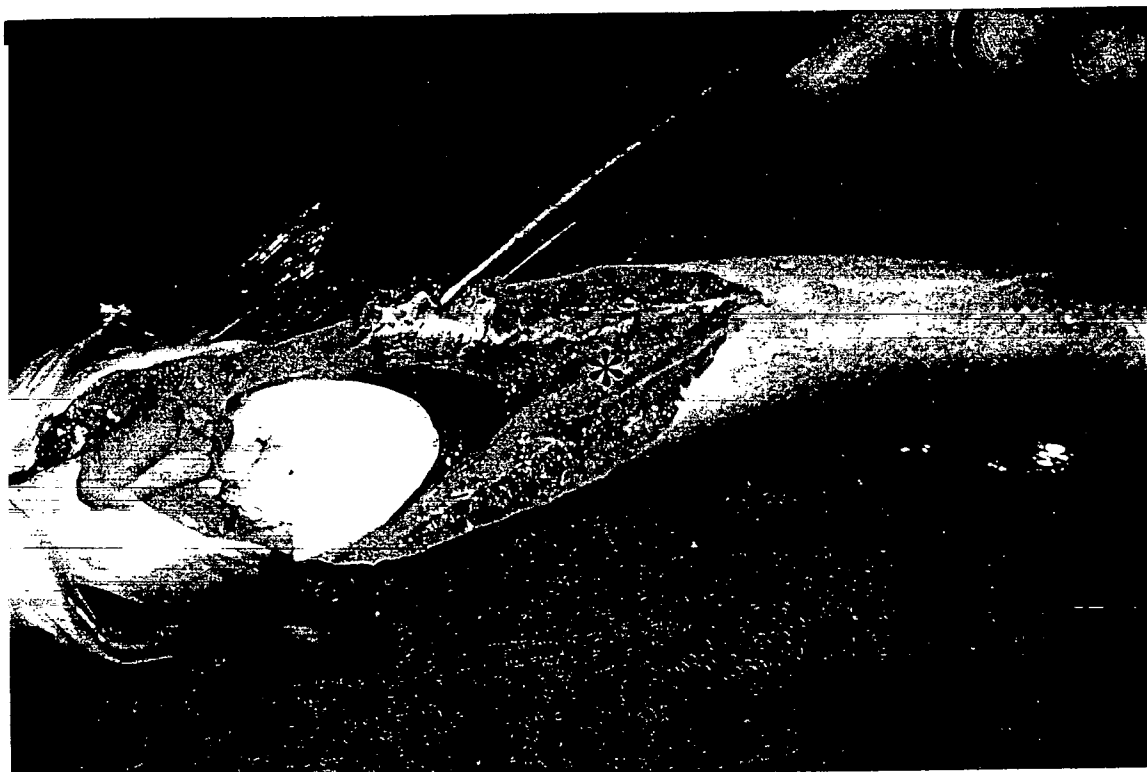


Figura 13. *Rhamdia quelen*. Aspecto dos testículos imaturos, pouco desenvolvidos, sem franjas pronunciadas (\*).

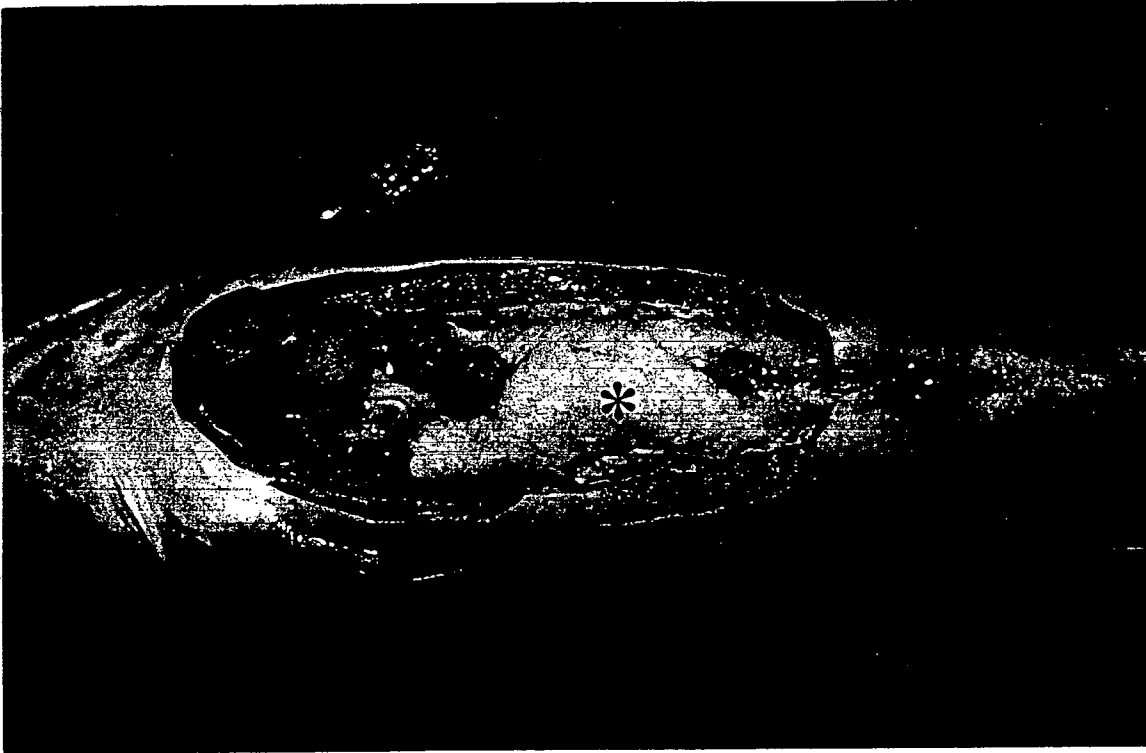


Figura 14. *Rhamdia quelen*. Aspecto dos testículos no estágio de maturação (\*).

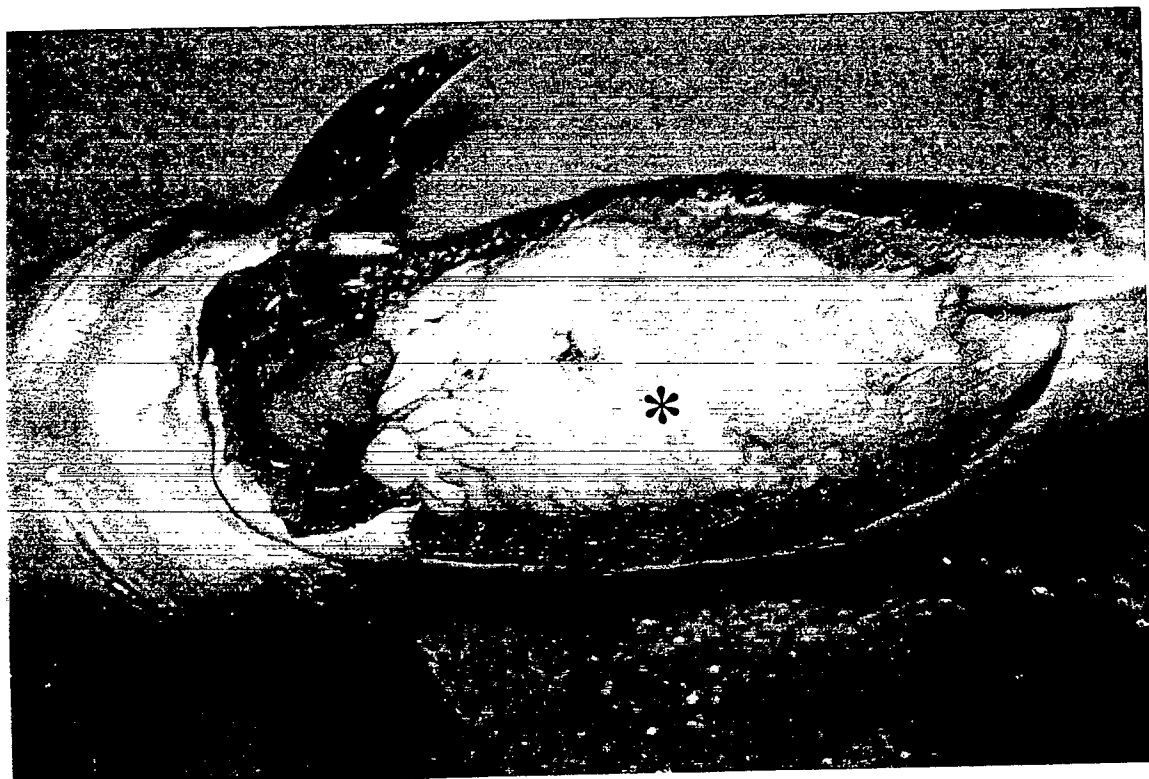


Figura 15. *Rhamdia quelen*. Testículos no estágio maduro, ocupando grande parte da cavidade abdominal (\*).

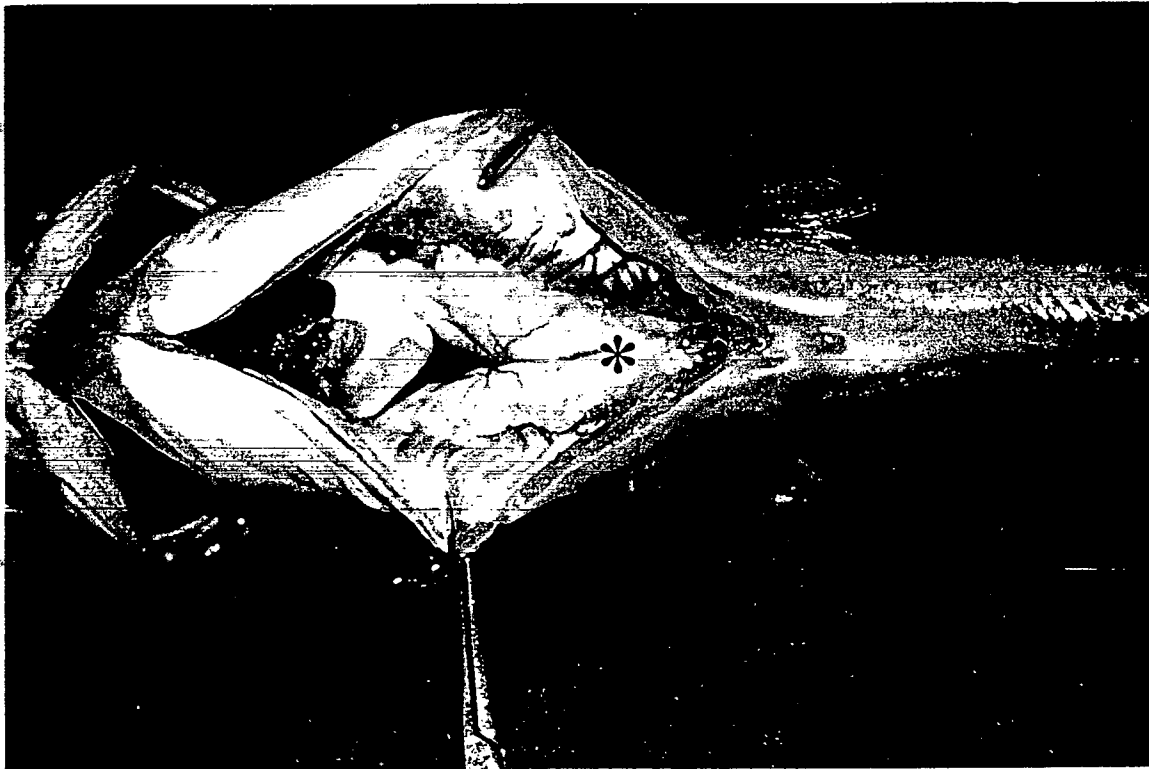


Figura 16. *Rhamdia quelen*. Testículos no estágio esgotado (\*). Nota-se o aspecto reduzido da gônada.



Figura 17. *Rhamdia quelen*. Testículos no estágio de repouso (\*). Nota-se o aspecto reduzido e a coloração hialina na região periférica da gônada (seta).



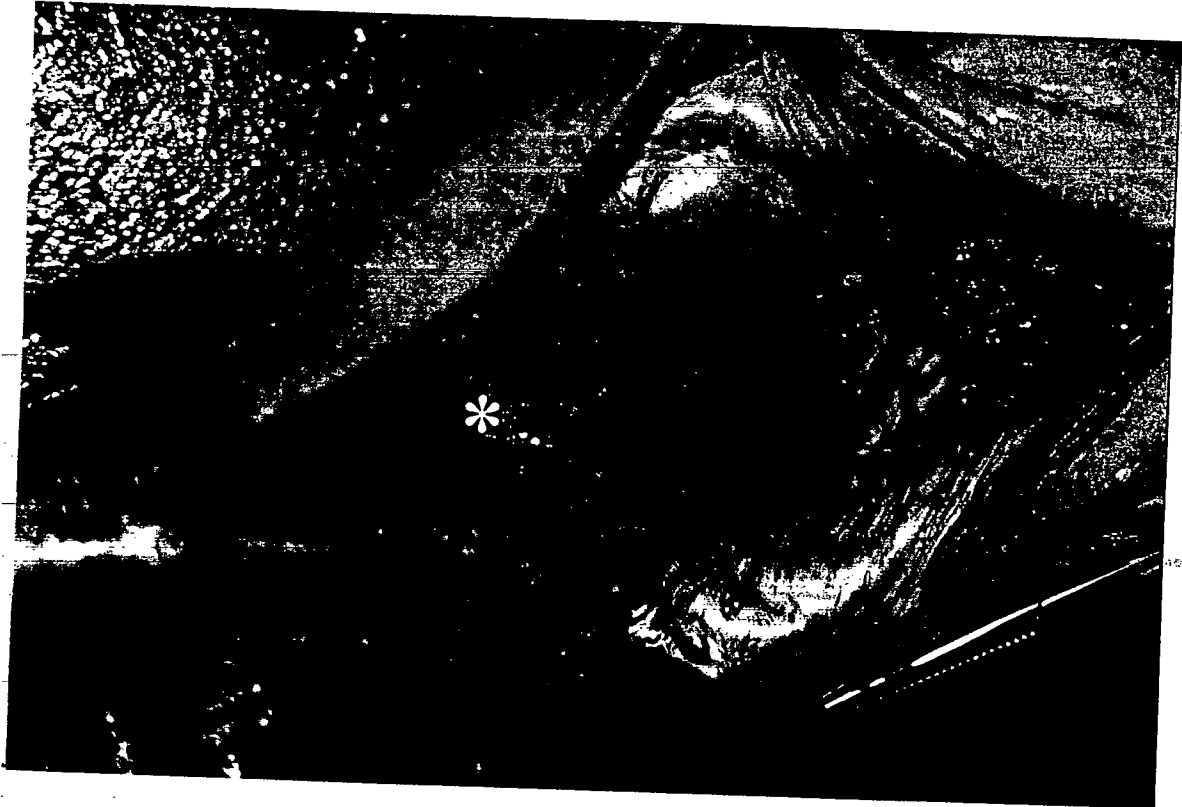


Figura 18. *Rhamdia quelen*. Exemplar ovotestis (\*). Aspecto macroscópico de ovário pouco desenvolvido.



Figura 19. *Rhamdia quelen*. Na figura superior (A), aspecto do rim (\*) em relação à bexiga natatória, na figura inferior (B), aspecto após a remoção desta (seta).

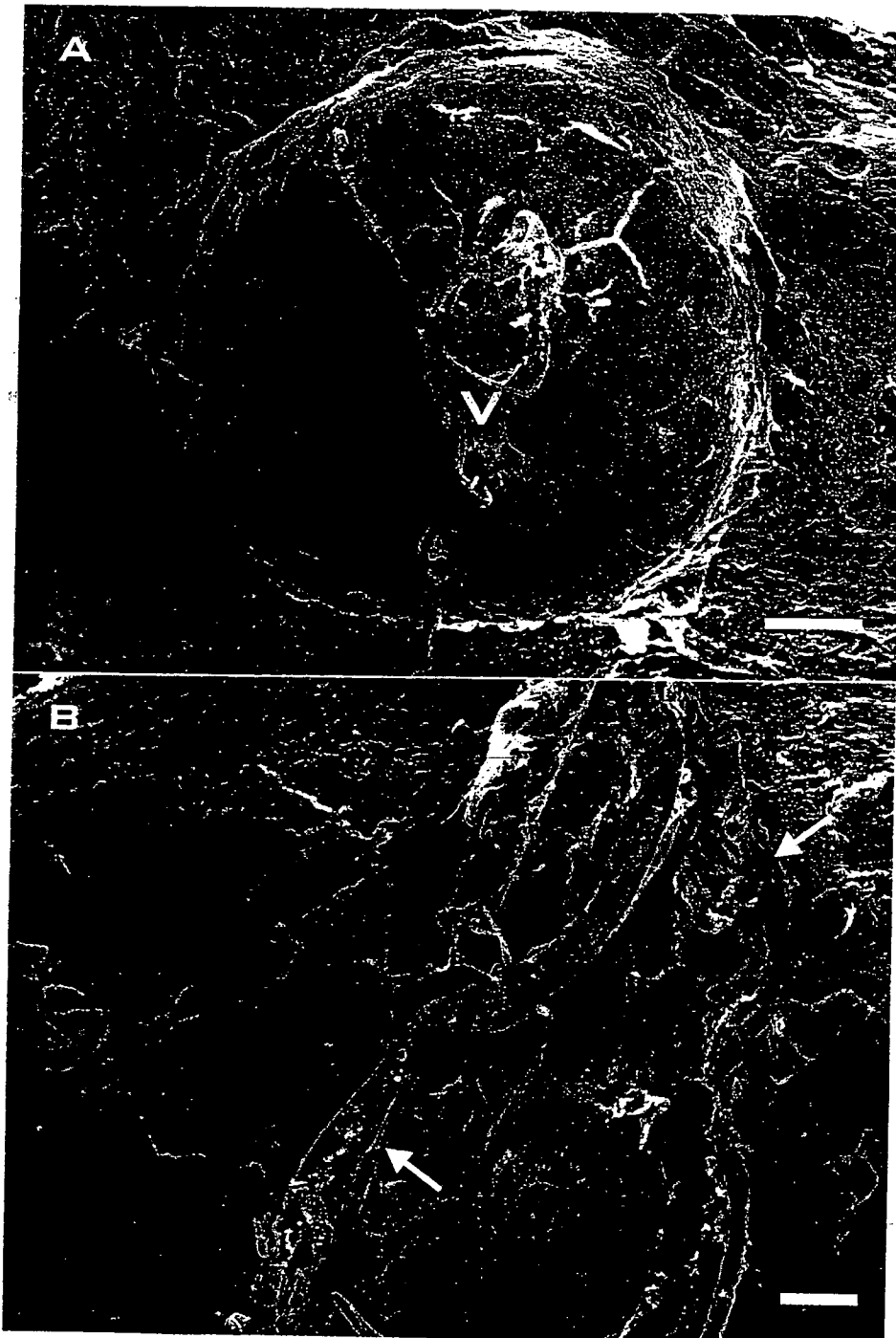


Figura 20. *Rhamdia quelen*. Microscopia Eletrônica de Varredura. A) Hipófise situada na base do diencefalo, em destaque a região hipofisária ventral (V). B) Detalhe em maior aumento dos vasos sanguíneos da região anterior (setas). Escala: A) 20  $\mu\text{m}$  e B) 4  $\mu\text{m}$ .



Figura 21. *Rhamdia quelen*. A seta indica uma veia de maior calibre, penetrando na hipófise através da região inferior da “Pars Intermedia” (I); região da “Proximal Pars Distalis” (P). Neuro hipófise (N). Coloração: Mallory. Escala: 20  $\mu$ m.

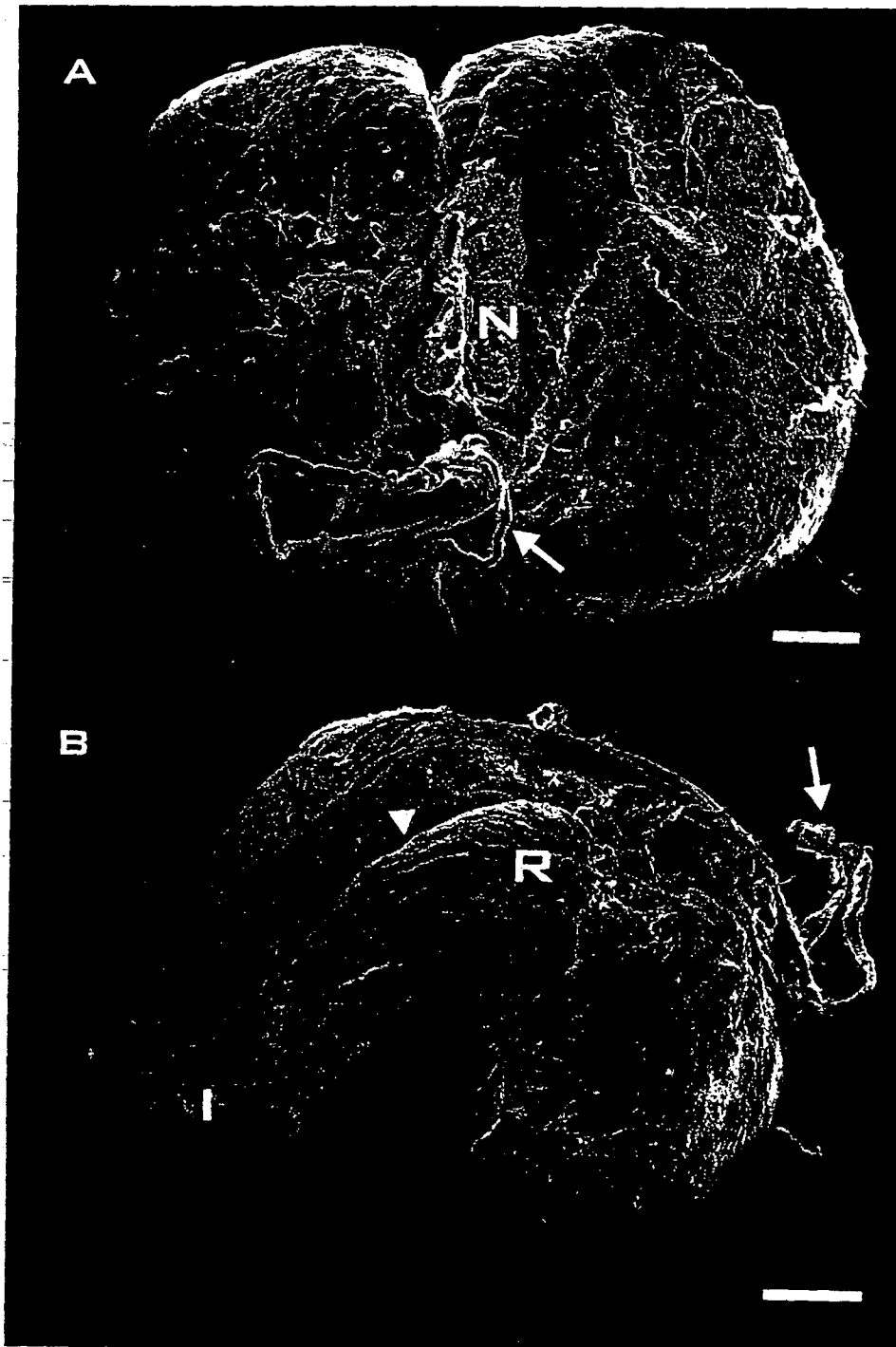


Figura 22. *Rhamdia quelen*. Microscopia Eletrônica de Varredura. A) Região dorsal da hipófise. Área de inserção da neuro-hipófise (N). Vaso sanguíneo (seta). B) Região anterior da hipófise a "Rostral Pars Distalis" (R) onde nota-se um pequeno sulco (cabeça de seta). Na região posterior a "Pars Intermedia" (I). Vaso sanguíneo (seta). Escala: A) 15  $\mu\text{m}$  e B) 20  $\mu\text{m}$ .

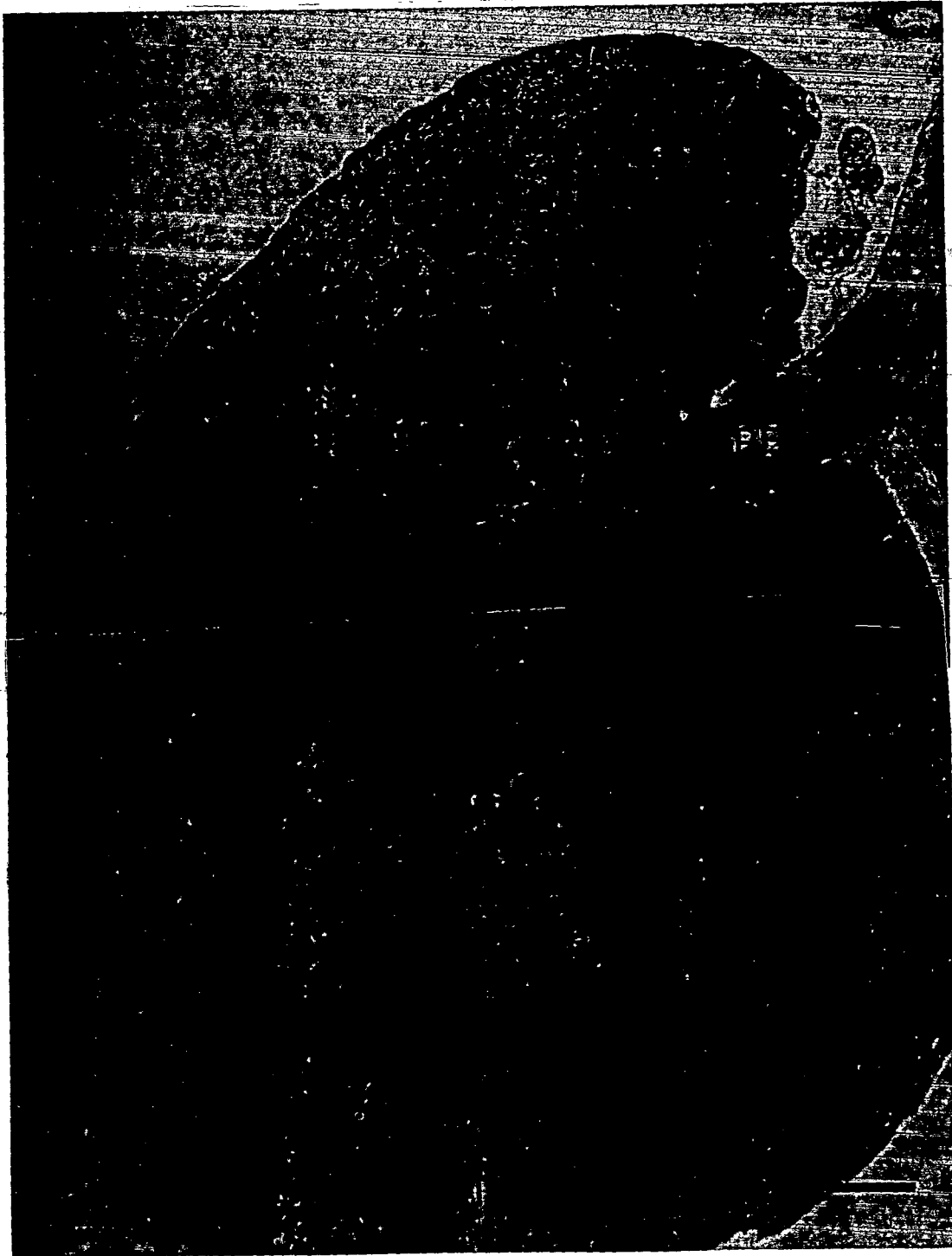


Figura 23. *Rhamdia quelen*. Fêmea. Hipófise. Estádio maduro. Pedúnculo infundibular (PE), "Rostral Pars Distalis" (R), "Proximal Pars Distalis" (P), e "Pars Intermedia" (I). Coloração: H.E. Escala: 50  $\mu$ m.



Figura 24. *Rhamdia quelen*. Fêmea. Hipófise. Estádio maduro. "Rostral Pars Distalis". Células tipo I, basófilo (cabeça de seta), células tipo II, acidófilo (seta). Coloração: A) H.E. e B) Mallory. Escala: 5  $\mu$ m.



Figura 25. *Rhamdia quelen*. Fêmea. Hipófise. Estádio maduro. A) "Rostral Pars Distalis" (R), células tipo I (cabeça de seta), neuro-hipófise (N), "Proximal Pars Distalis" (P) células tipo II (seta). B) "Rostral Pars Distalis" (R), células tipo I (cabeça de seta), "Proximal Pars Distalis" células tipo II (seta). Coloração: Hematoxilina chumbo. Escala: A) 50  $\mu\text{m}$  e b) 10  $\mu\text{m}$ .





Figura 26. *Rhamdia quelen*. Fêmea. Hipófise. Estádio maduro. "Proximal Pars Distalis". Células tipo I, basófilo (cabeça de seta), células tipo II, acidófilo (seta). Coloração: A) H.E. e B) Mallory. Escala: A) 5  $\mu$ m e B) 5  $\mu$ m.

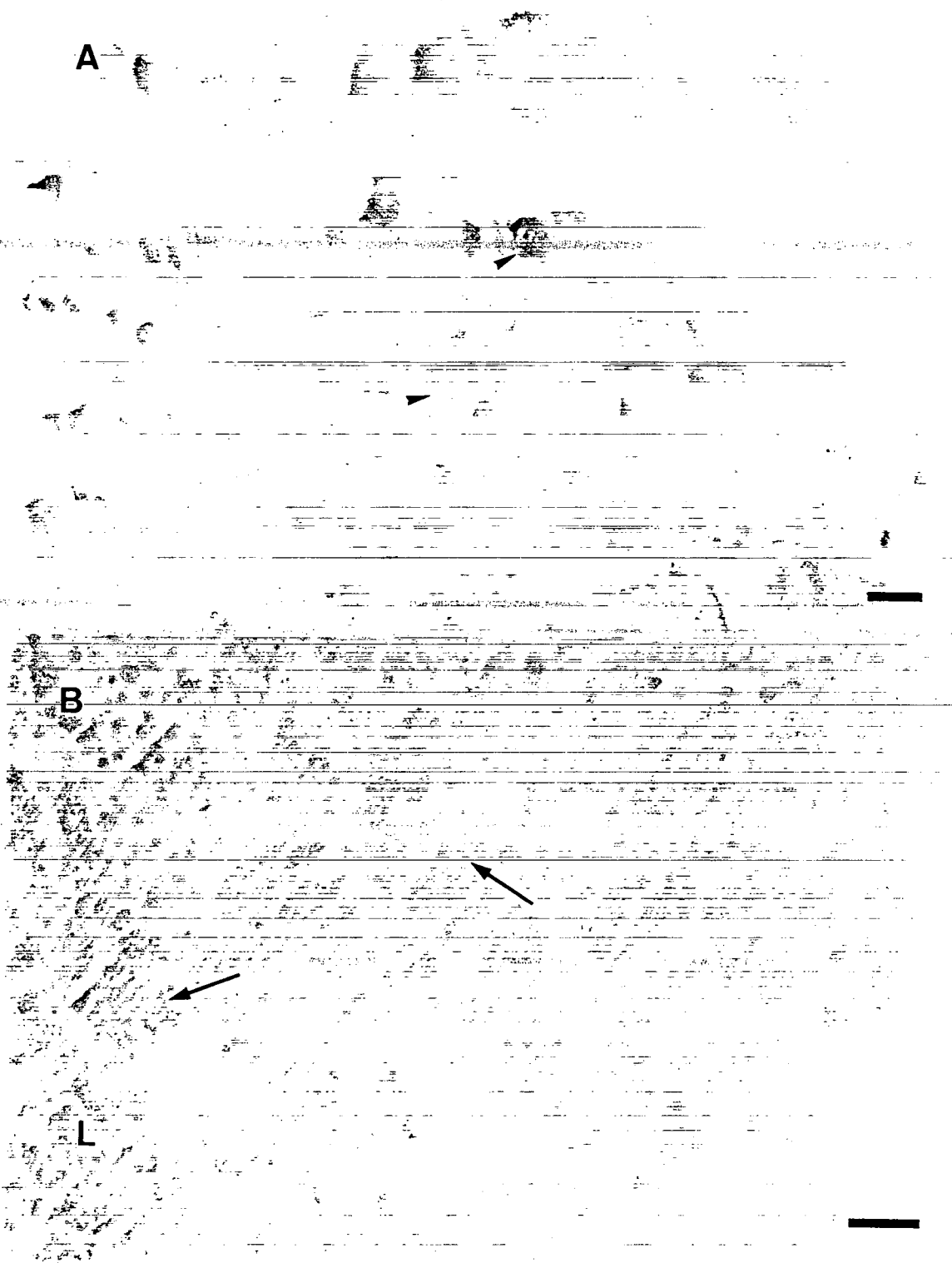


Figura 27. *Rhamdia quelen*. Fêmea. Hipófise. Estádio maduro. "Proximal Pars Distalis". A) Células tipo I (cabeça de seta) PAS positivas. Nota-se a diferença de intensidade da reação de uma célula para outra. B) Células tipo I (seta) AB pH 2,5 positivas. A reação é mais intensa nas células da região lateral (L). Escala: A) 5  $\mu\text{m}$  e B) 10  $\mu\text{m}$ .

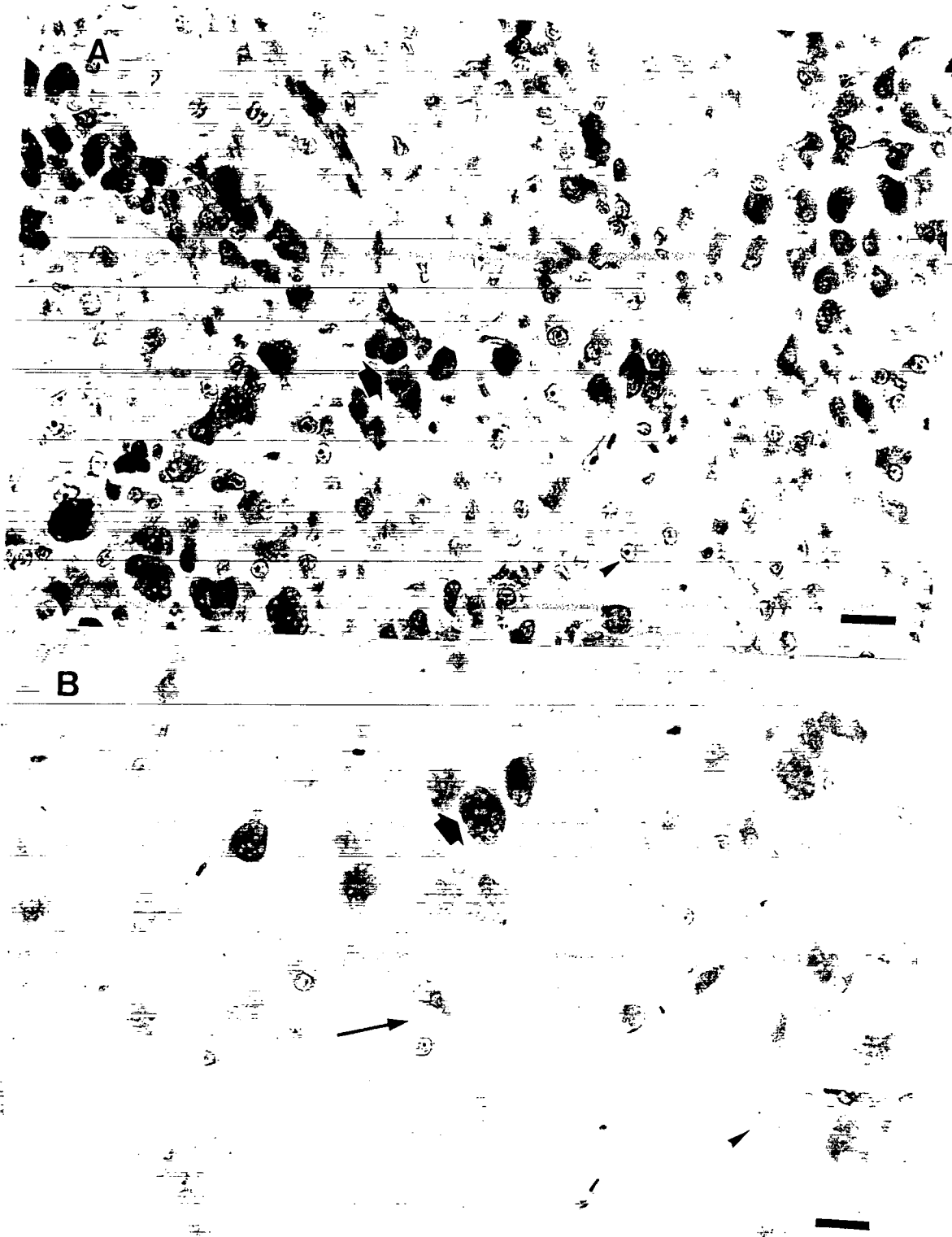


Figura 28. *Rhamdia quelen*. Fêmea. Hipófise. Estádio maduro. "Pars Intermedia". Células tipo I, basófila (cabeça de seta), células tipo II, acidófila (seta), células tipo III, cromófofa (seta fina). Coloração: A) H.E. e B) Mallory. Escala: A) 5  $\mu\text{m}$  e B) 5  $\mu\text{m}$ .

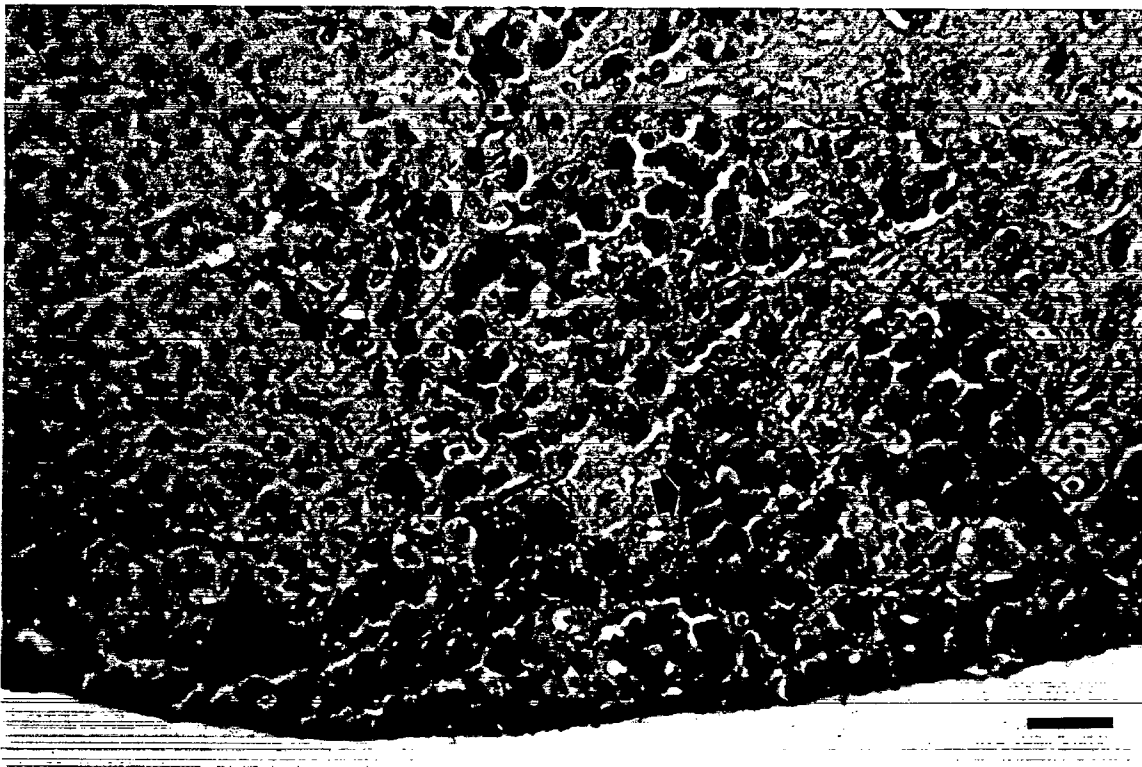


Figura 29. *Rhamdia quelen*. Fêmea. Hipófise. Estádio maduro. "Pars Intermedia". Células tipo II (seta). Coloração: Hematoxilina chumbo. Escala: 10  $\mu$ m.

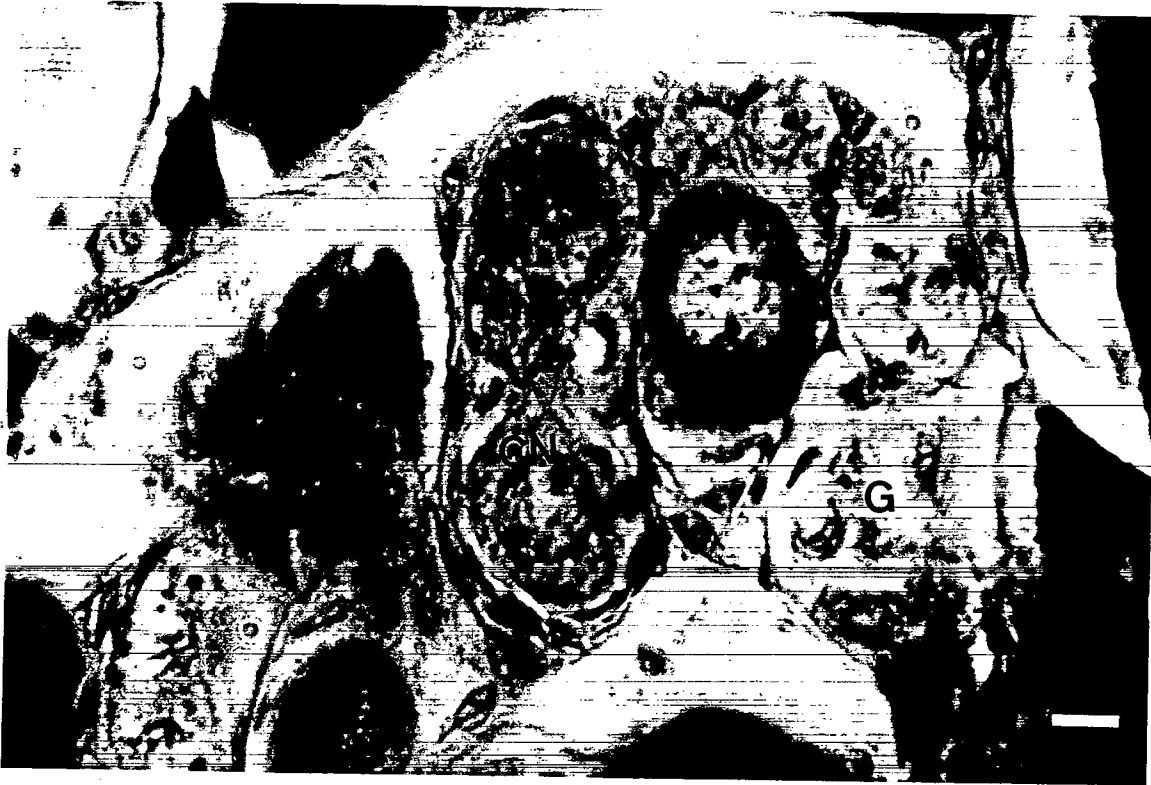


Figura 30. *Rhamdia quelen*. Ovário. Oogônias formando ninhos celulares (G). Oócito :romatina nucleolar (CN)-Coloração: H.E. Escala: 5  $\mu$ m.

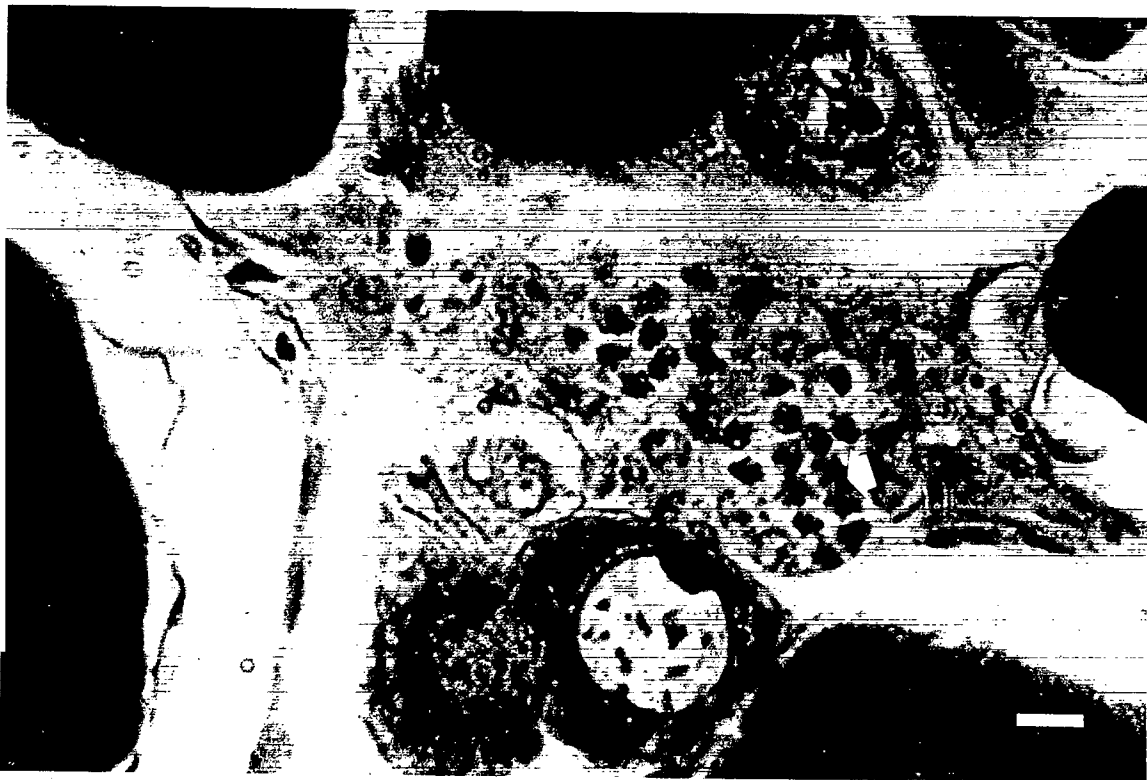


Figura 31. *Rhamdia quelen*. Ovário. Oogônias em processo de mitose (seta). Coloração: H.E. Escala: 5  $\mu$ m.



Figura 32. *Rhamdia quelen*. Ovário. Oócito perinucleolar inicial (PI). Oócito cortical-alveolar (CA). Cápsula conjuntiva (CJ). Zona pelúcida (cabeça de seta). Coloração: H.E. Escala: 20  $\mu$ m.



Figura 33. *Rhamdia quelen*. Ovário. Oócito vitelogênico, com grânulos de vitelo (VT). Células foliculares (seta). Células da teca (cabeça de seta). Coloração: H.E. Escala: 20  $\mu$ m.

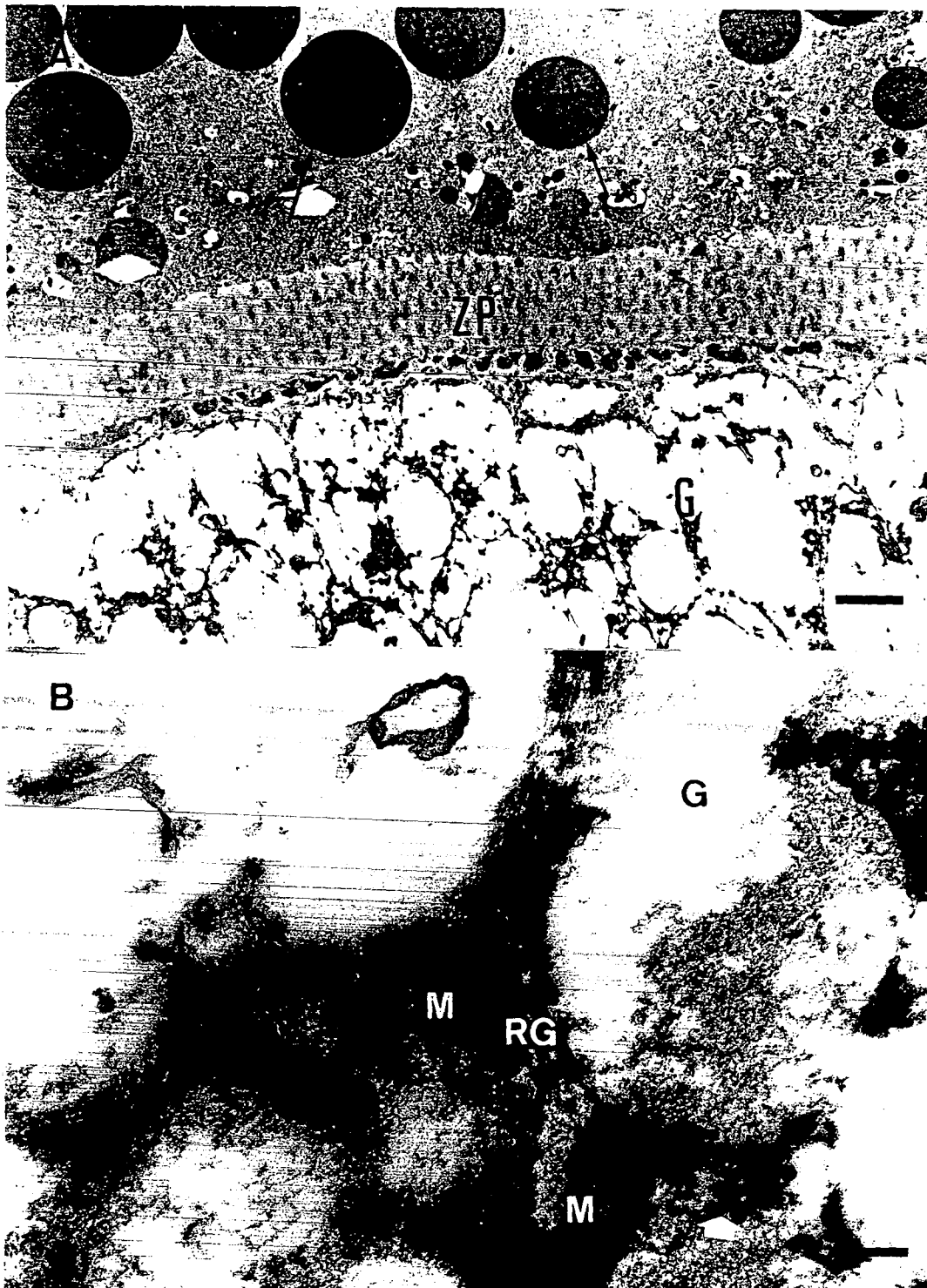


Figura 34. *Rhamdia quelen*. Estádio maduro. Eletromicrografia de células da granulosa do oócito vitelogênico. A) Na parte superior observa-se grânulos de vitelo (setas), no interior do oócito, que é delimitado pela zona pelúcida (ZP). No citoplasma das células da granulosa nota-se a presença de grânulos de secreção pouco eletrondensos (G), em fusão. B) Detalhe em maior aumento do citoplasma das células da granulosa. Grânulos (G), retículo endoplasmático granular (RG), mitocôndrias, polirribossomos (seta). Escala: A) 2 $\mu$ m. B) 500 nm.

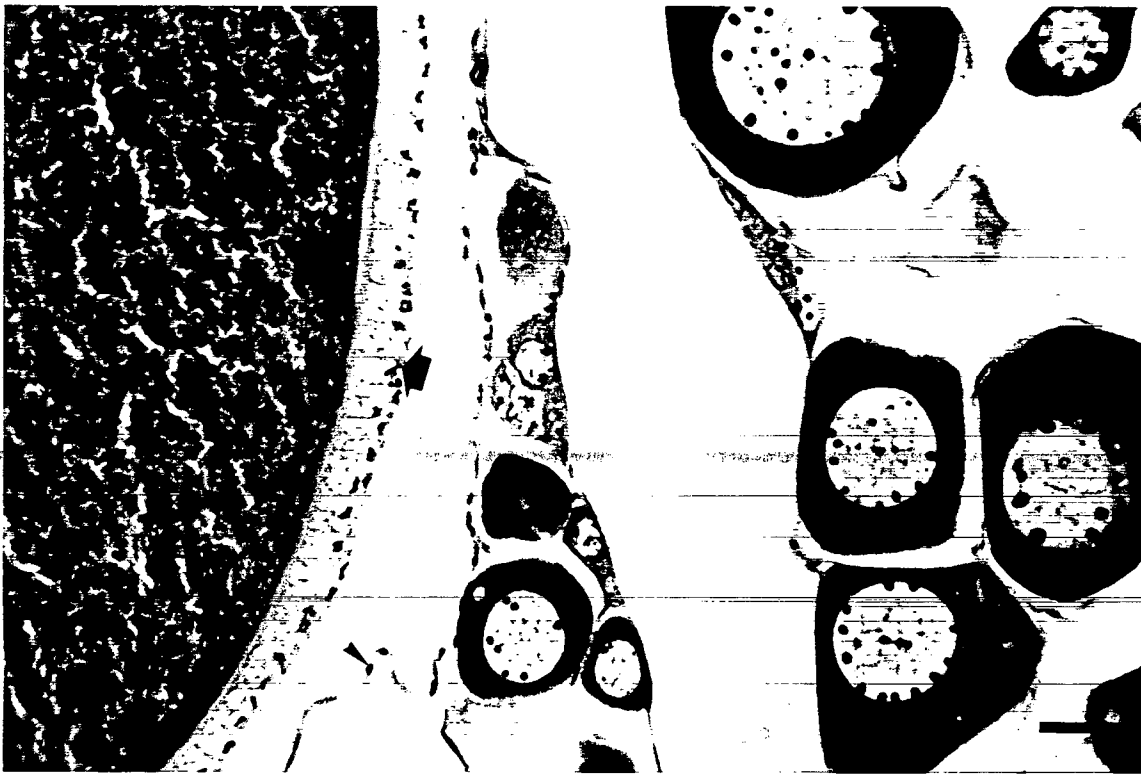


Figura 35. *Rhamdia quelen*. Ovário. Folículo atrésico com descolamento entre as camadas lulas foliculares cúbicas (seta) e pavimentosas (cabeça de seta). Oócito perinuclear inicial (I). Coloração: H.E. Escala: 10  $\mu$ m.



Figura 36. *Rhamdia quelen*. Ovário. Folículo pós-ovulatório com seu aspecto contorcido. Epitélio cilíndrico (E), cavidade (C), e a presença de muitos vasos sanguíneos (seta). Coloração: H.E. Escala: 10  $\mu$ m.





Figura 37. *Rhamdia quelen*. Estádio maduro. Eletromicrografia de células do folículo pós-ovulatório. Núcleo (N); Mitocôndrias (M); Retículo endoplasmático granular (RG); Complexo de Golgi (CG); Lipídios (L); Vesículas (V). Escala: 1  $\mu$ m.

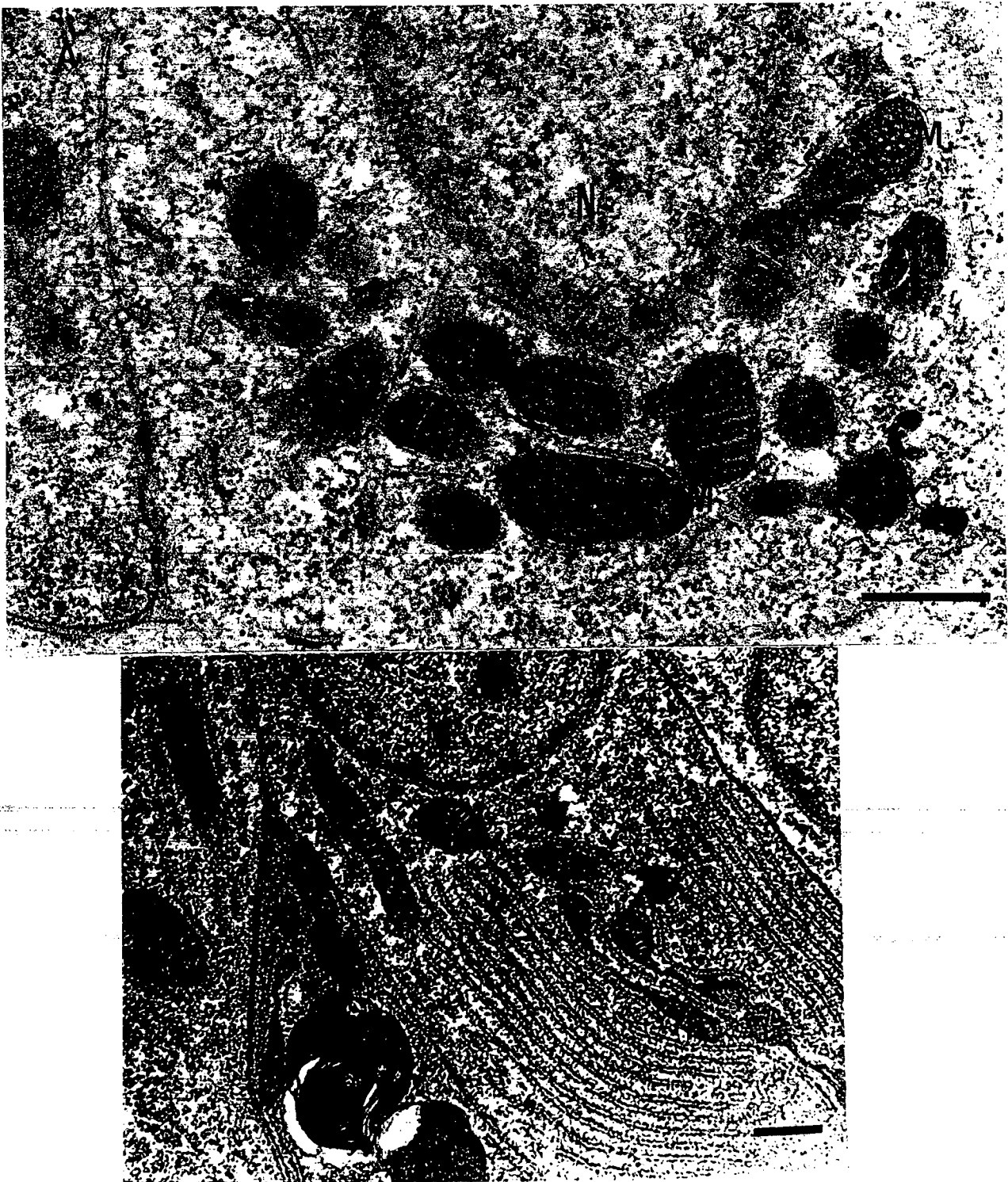


Figura 38. *Rhamdia quelen*. Estádio maduro. Eletromicrografia de células do folículo pós-ovulatório. A) Detalhe das mitocôndrias com cristas tubulares (M); Núcleo (N). B) Retículo endoplasmático granular (RG); Núcleo (N). Escala: A) 500 nm. B) 1  $\mu$ m.

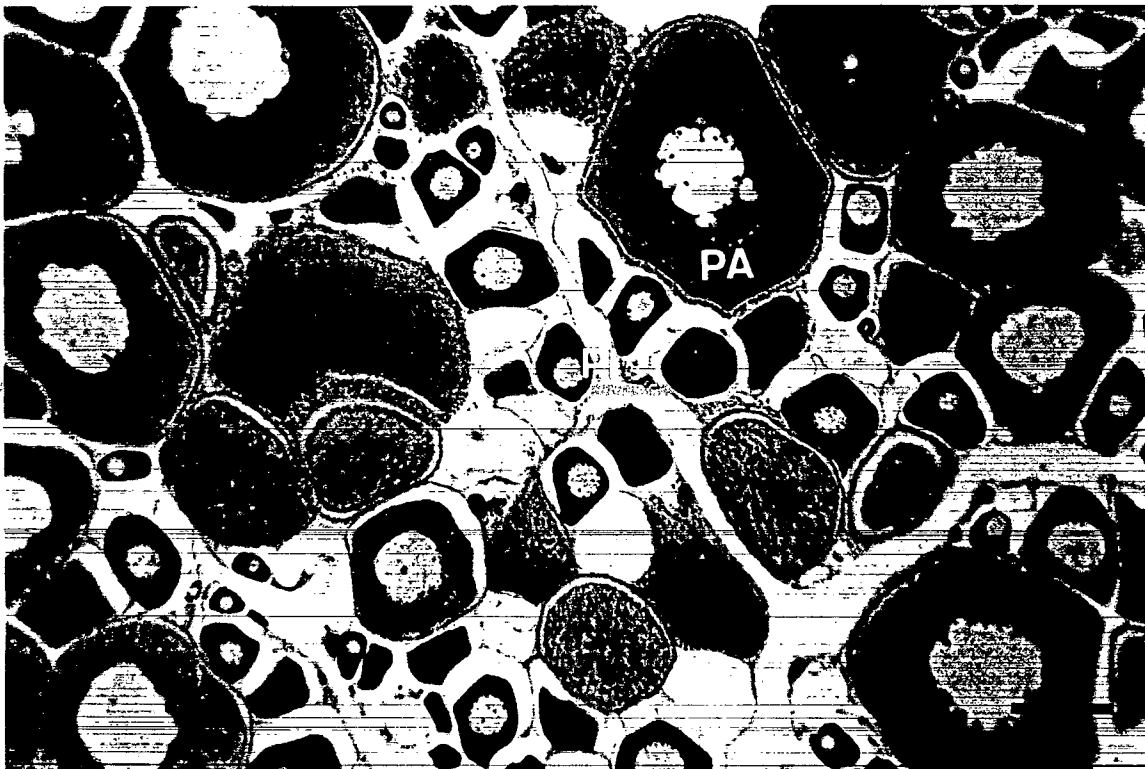


Figura 39. *Rhamdia quelen*. Ovário. Estádio Repouso. Oócito perinucleolar inicial (PI) oócito perinucleolar avançado (PA), predominando. Coloração: H.E. Escala: 50  $\mu$ m.

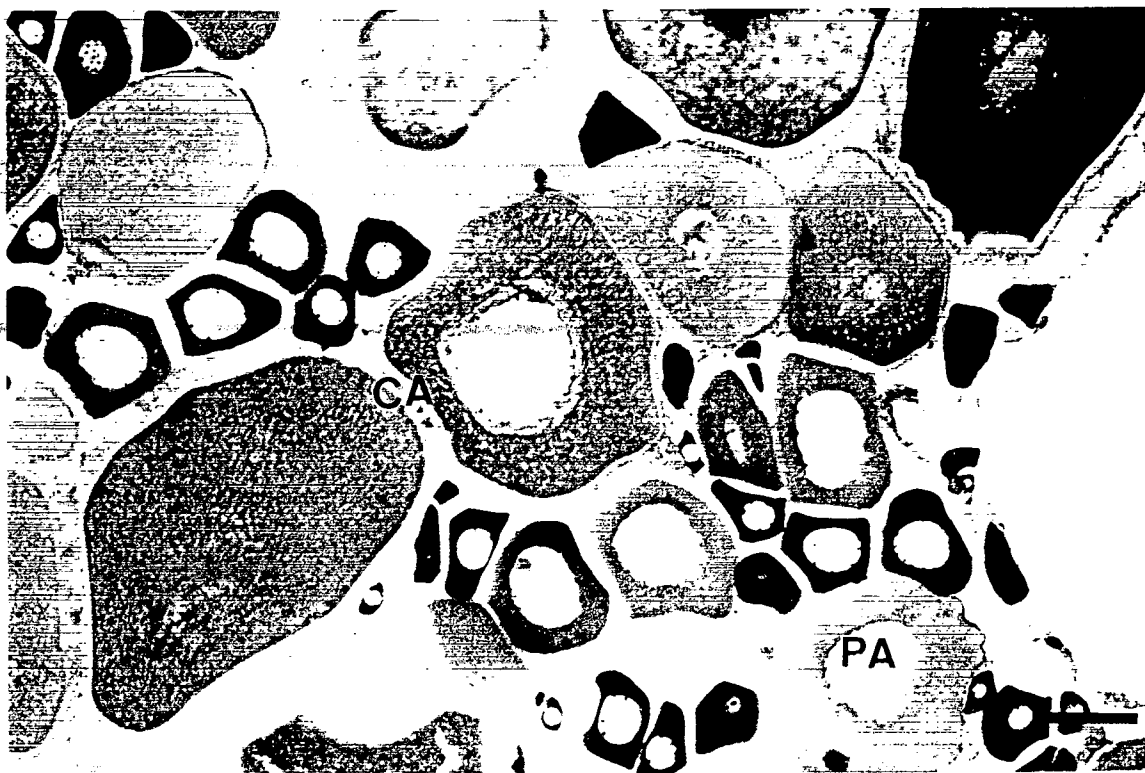


Figura 40. *Rhamdia quelen*. Ovário. Estádio Maturação. Oócito, perinucleolar avançado (PA); oócito cortical-alveolar (CA). Coloração: H.E. Escala: 50  $\mu$ m.

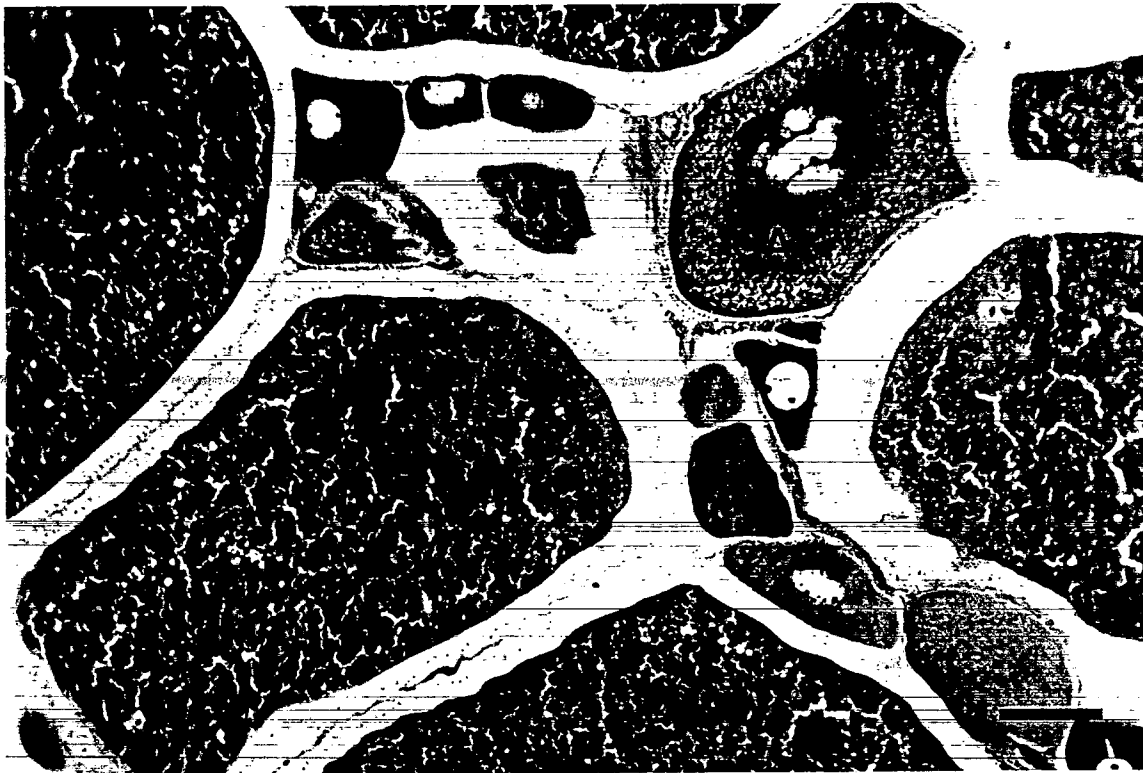


Figura 41. *Rhamdia quelen*. Ovário. Estádio Maduro. Oócito vitelogênico (VT) predominando e oócito cortical-alveolar (CA). Coloração: H.E. Escala: 50  $\mu$ m.

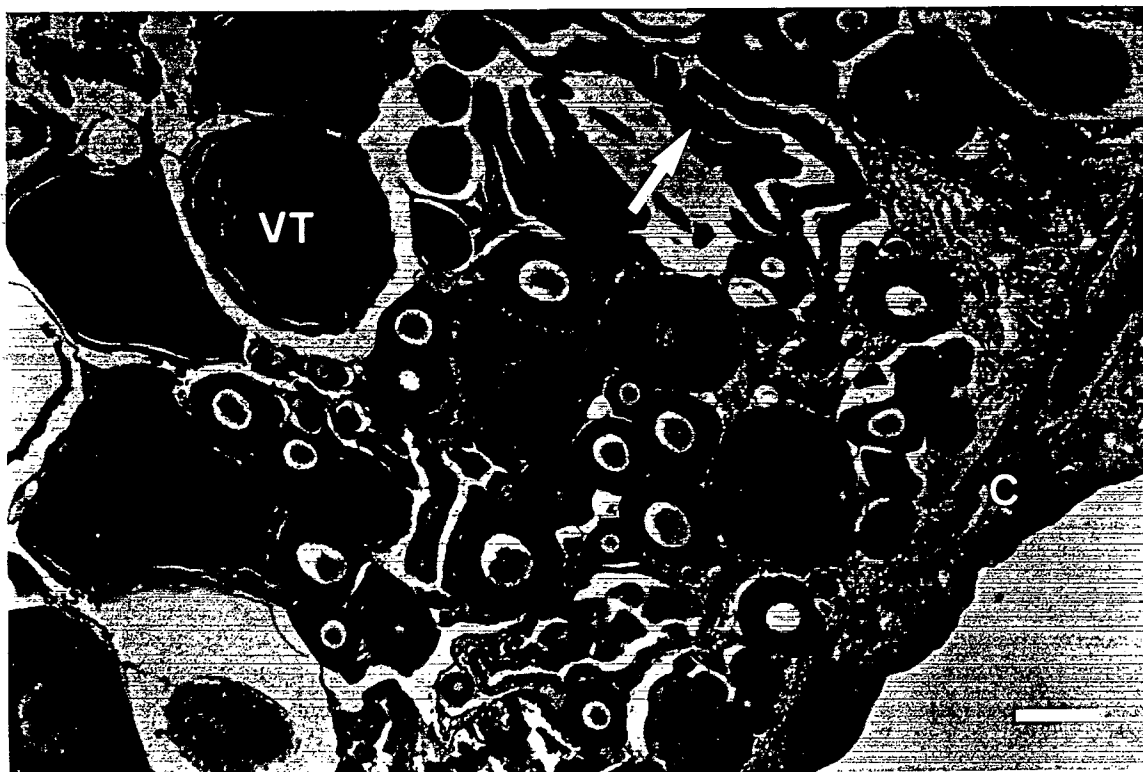


Figura 42. *Rhamdia quelen*. Aspecto do ovário pós-desova. Estádio Maduro. Oócito vitelogênico (VT); folículo pós-ovulatório (seta); cápsula conjuntiva (C). Coloração: H.E. Escala: 100  $\mu$ m.

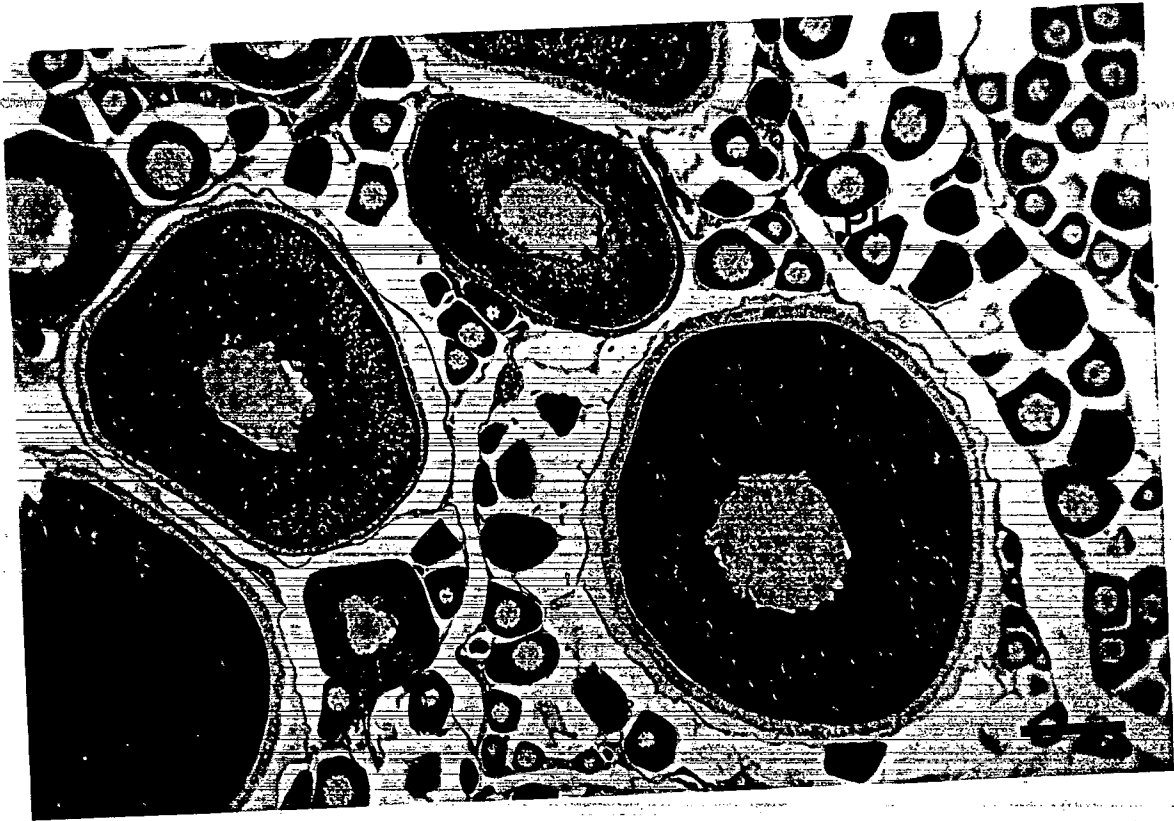


Figura 43. *Rhamdia quelen*. Ovário. Estádio Regressão. Oócito atrésicos (AT) predominando; oócito perinucleolar inicial (PI). Coloração: H.E. Escala: 50  $\mu$ m.

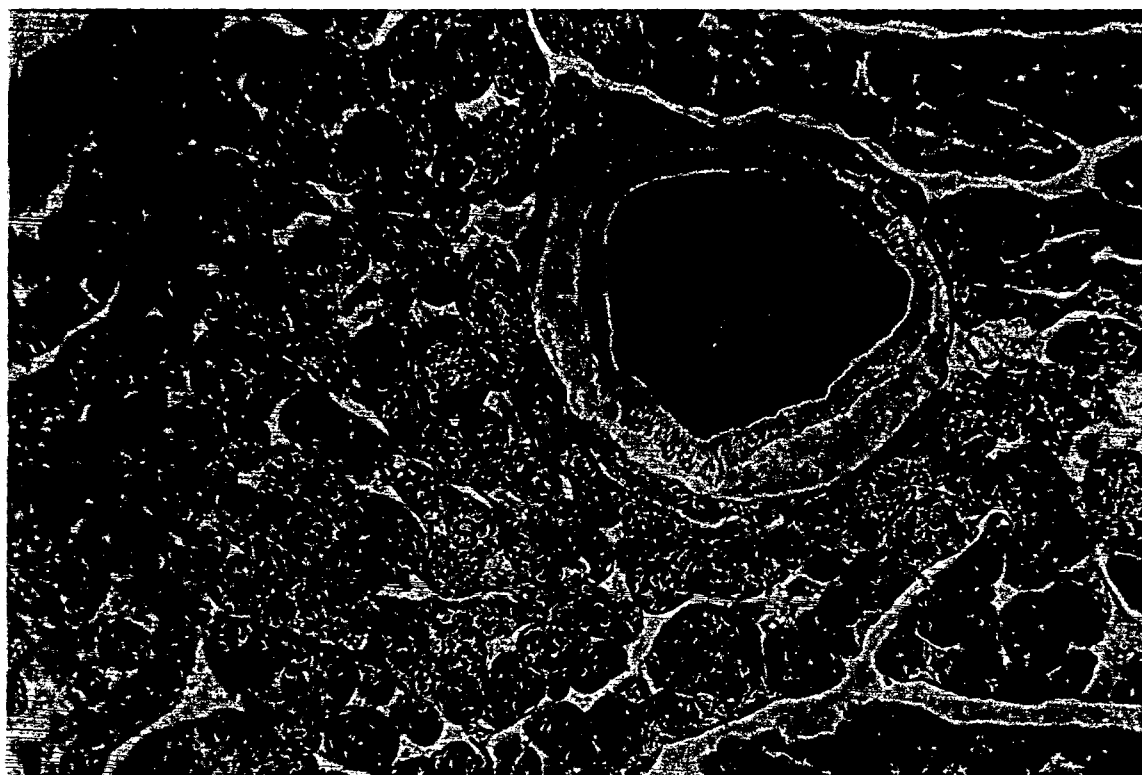


Figura 44. *Rhamdia quelen*. Gônada ovotestis. Oócito vitelogênico (VT); oócito perinucleolar inicial (setas); lóbulos seminíferos.(LS). Coloração: H.E. Escala: 50  $\mu$ m.



Figura 45. *Rhamdia quelen*. Gônada ovotestis. Lóbulos seminíferos (LS), onde predominam espermatogônias. Cistos em início de espermatogênese (setas) Coloração: H.E. Escala: 10  $\mu$ m.

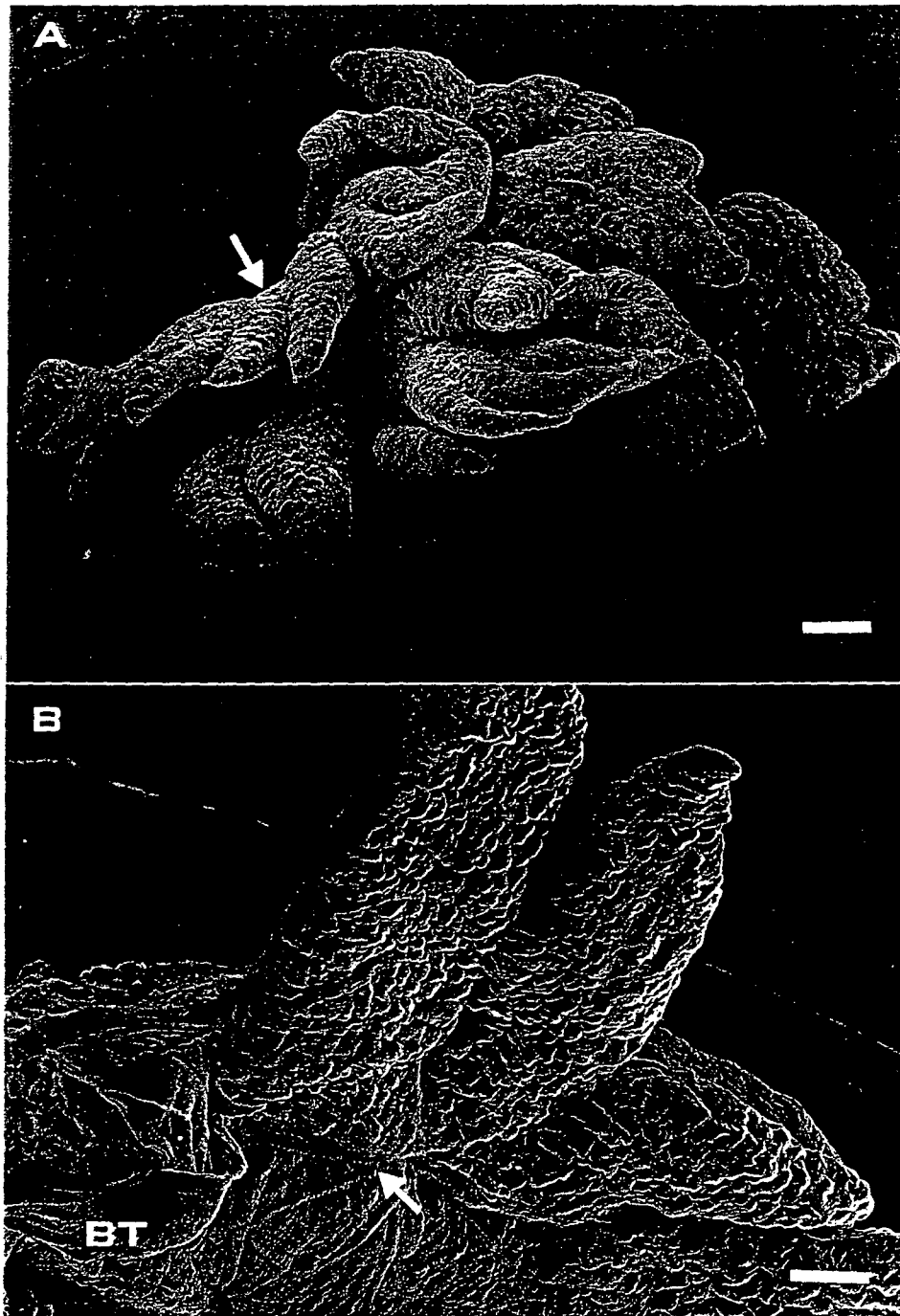


Figura 46. *Rhamdia quelen*. Microscopia Elettronica de Varredura. Testículo. Estádio maduro. A) Franjas testiculares em forma de “dedos de luva”, proeminentes (seta). B) Detalhe da franja testicular, onde nota-se a fusão destas na base do testículo (BT); vascularização superficial (seta). Escala: A) 40  $\mu$ m e B) 35  $\mu$ m.

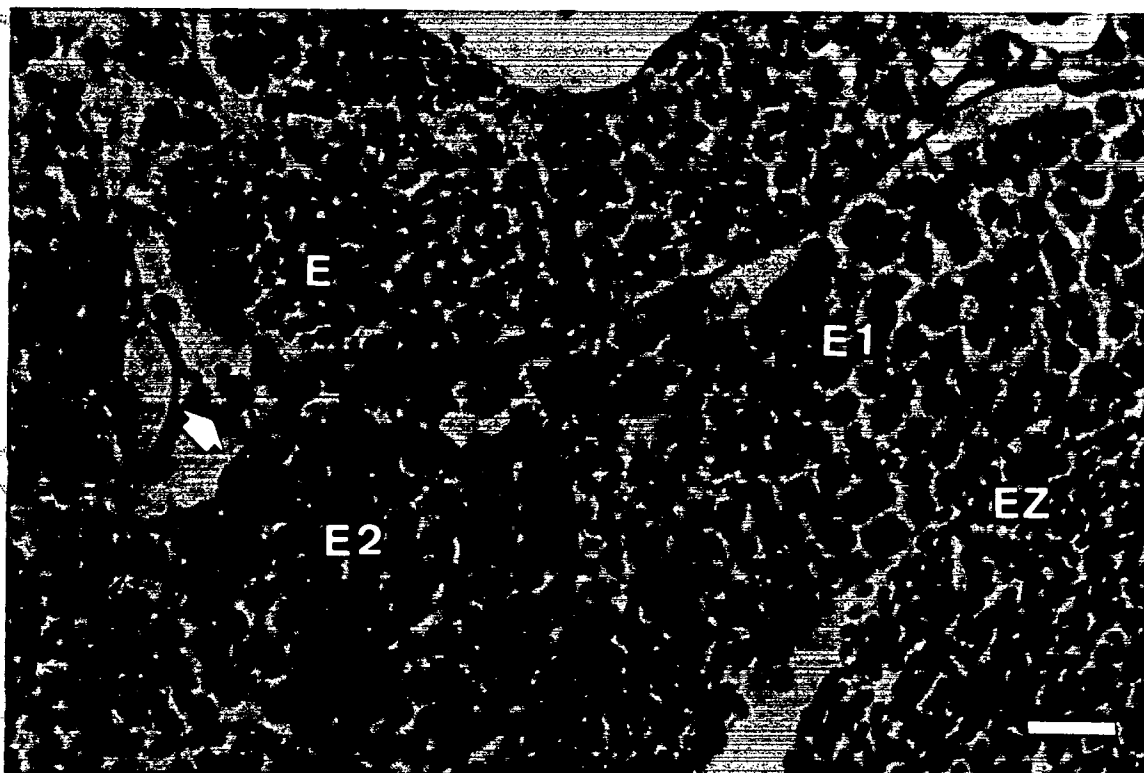


Figura 47. *Rhamdia quelen*. Testículo. Estádio maduro. A) Detalhe dos cistos germinativos, contendo em seu interior as células espermatogênicas. Espermatogônias primárias (cabeça de seta); espermatócito primário (E1); espermatócito secundário (E2); espermatídes (E); espermatozóides (EZ); células intersticiais (seta). Coloração: H.E. Escala: 10  $\mu$ m.



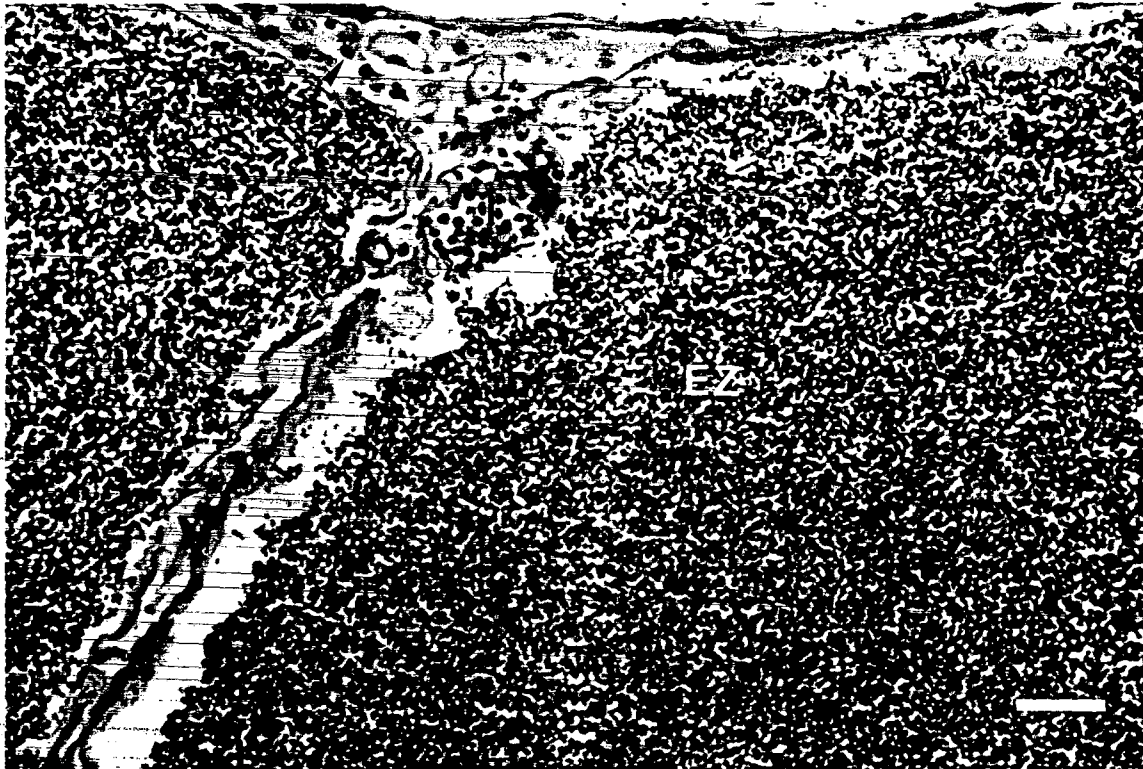


Figura 48. *Rhamdia quelen*. Testículo. Estádio maduro. Nesse estágio nota-se a presença de lume lobular repleto de espermatozoides (EZ), e tecido conjuntivo interlobular delgado (I), onde estão presentes as células intersticiais (cabeça-de-seta). Coloração: H.E. Escala: 10  $\mu$ m.

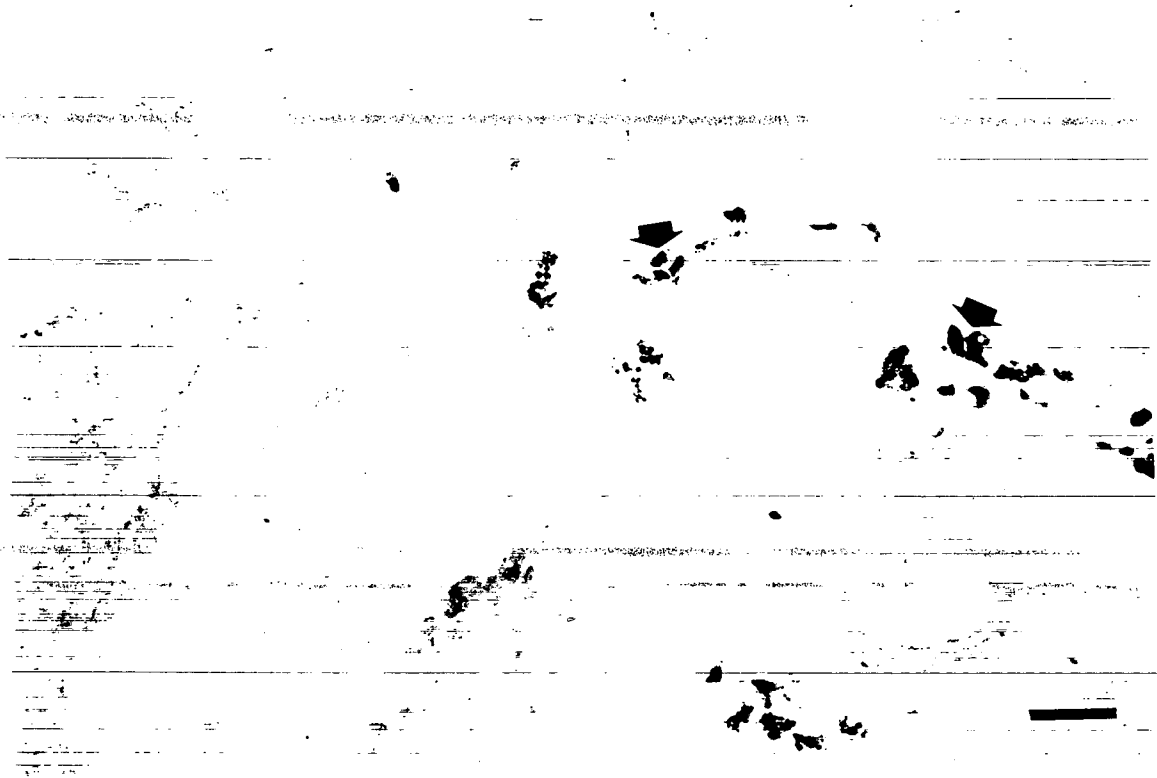


Figura 49. *Rhamdia quelen*. Testículo. Estádio maduro. Células intersticiais ou de Leydig, formando pequenos grupos (seta), evidenciadas pela técnica de Sudan Negro. Escala: 20  $\mu$ m.

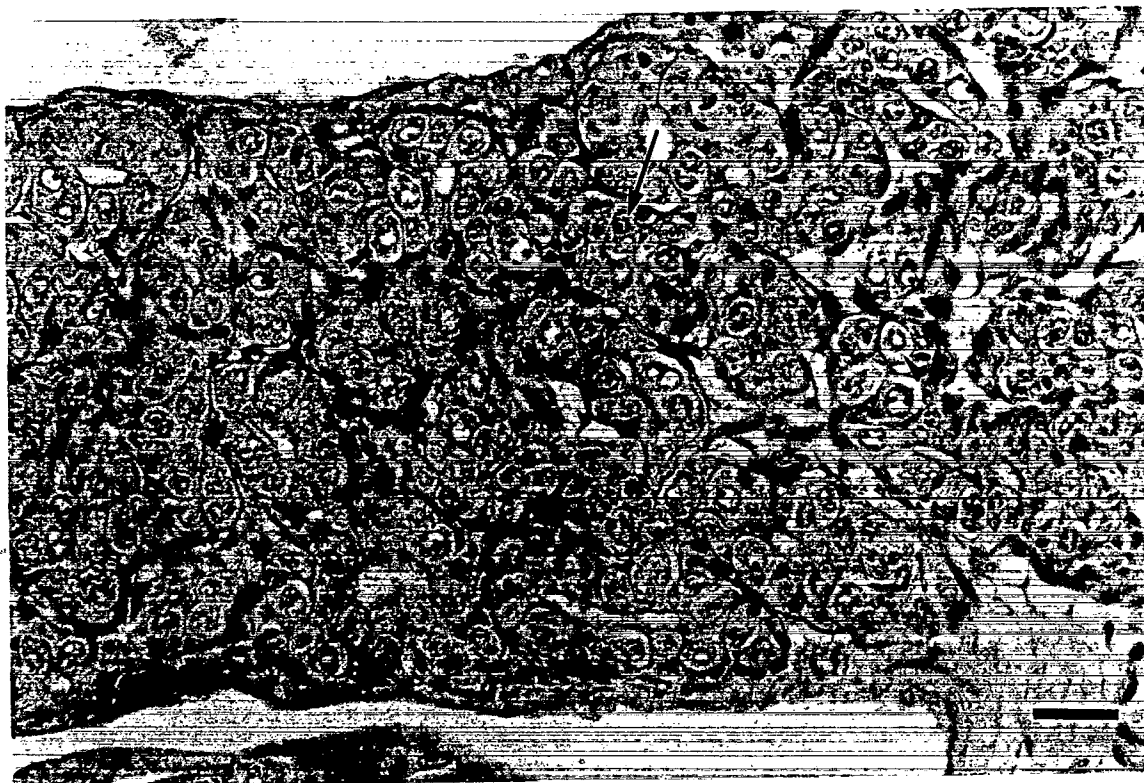


Figura 50. *Rhamdia quelen*. Testículo Imaturo. Nos lóbulos são encontradas somente espermatogônias primárias (cabeça de seta) e espermatogônias secundárias (seta). Coloração: H.E. Escala: 10  $\mu$ m.



Figura 51. *Rhamdia quelen*. Testículo. Estádio Maturação inicial. Notar dentro dos cistos: espermatócitos primários (E1), espermatócitos secundários (E2); e a presença de espermatogônias (G). Na luz do lóbulo alguns poucos espermatozóides (cabeça de seta). Coloração: H.E. Escala: 20  $\mu$ m.

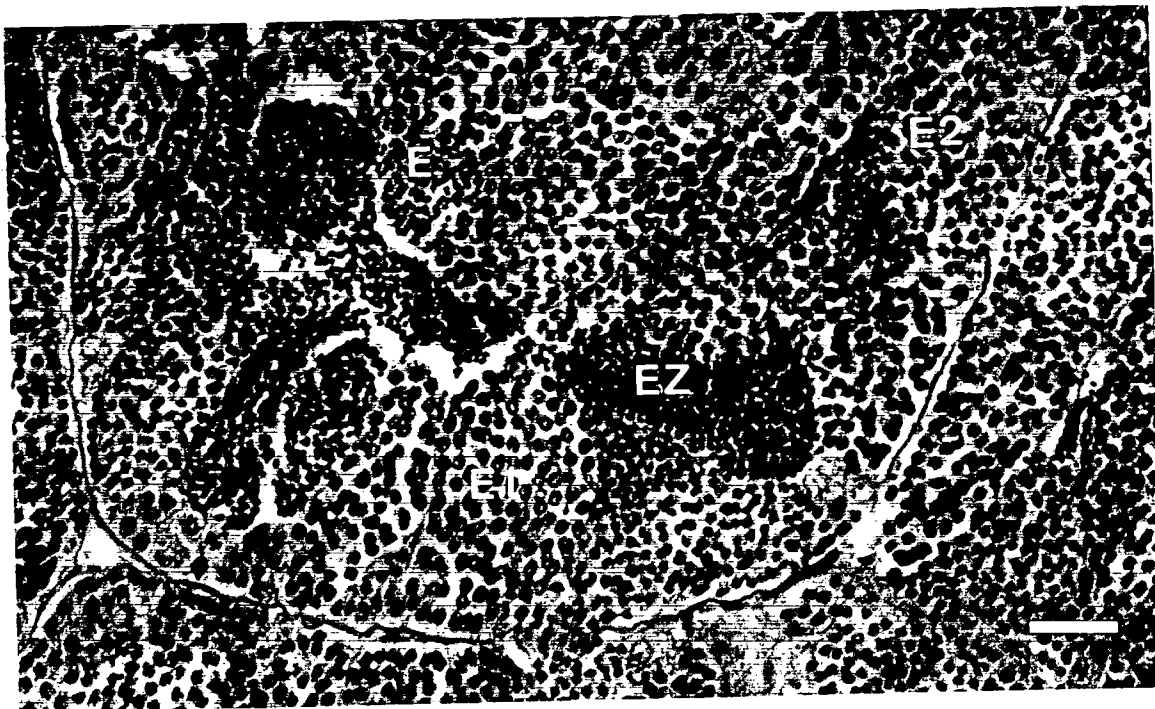


Figura 52. *Rhamdia quelen*. Testículo. Estádio Maturação avançada. Notar dentro dos cistos: espermatócitos primários (E1), espermatócitos secundários (E2); espermátides (E) e algumas poucas espermatogônias (cabeça de seta); na luz do lóbulo espermatozóides (EZ). Coloração: H.E. Escala: 20  $\mu$ m.

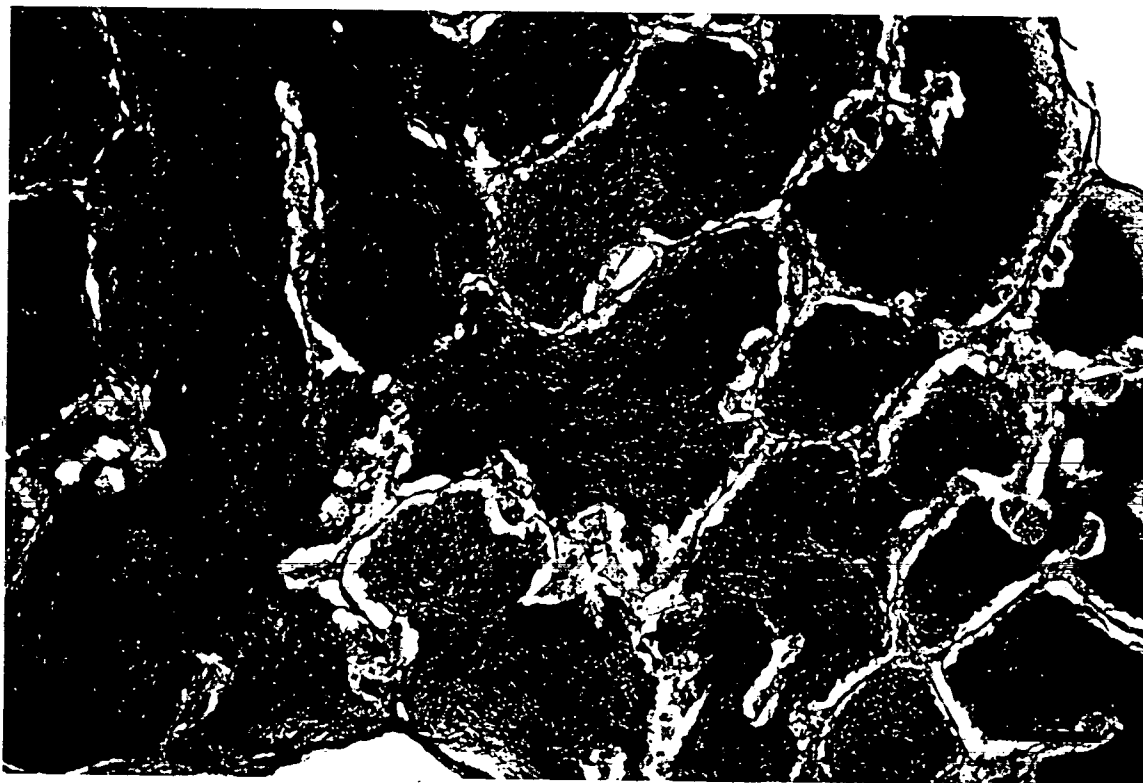


Figura 53. *Rhamdia quelen*. Testículo. Estádio Maduro. Notar aspecto irregular dos lóbulos testiculares repletos de espermatozóides (EZ) e anastomose lobular (seta). Tecido Intersticial (I). Coloração: H.E. Escala: 100  $\mu$ m.

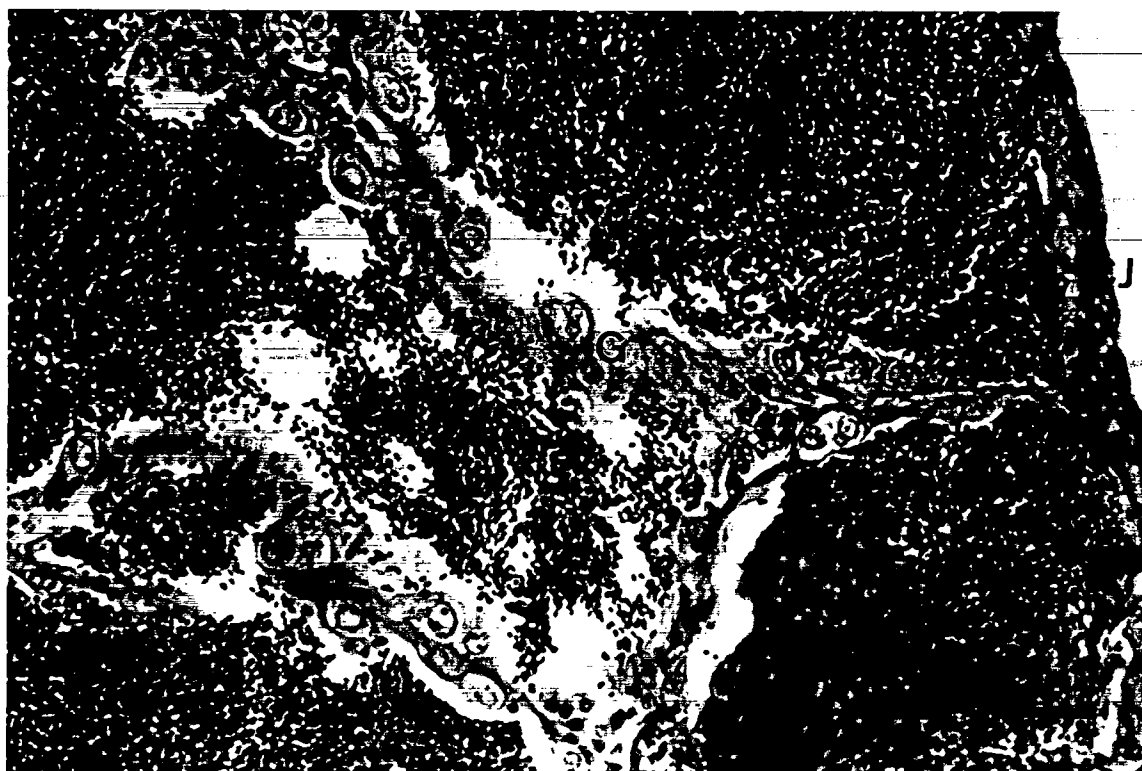


Figura 54. *Rhamdia quelen*. Testículo. Estádio Maduro. Auge do período reprodutivo, nota-se a presença marcante de espermatogônias (G) na parede do lóbulo testicular, cujo lume está totalmente repleto de espermatozóides (EZ); cápsula conjuntiva (CJ). Coloração: H.E. Escala: 10  $\mu$ m.



Figura 55. *Rhamdia quelen*. Testículo. Estádio Maduro (final da estação reprodutiva). Notar a presença dos cistos germinativos grandes, e o número diminuído de espermatogônias (cabeça de seta) e de espermatozóides (EZ). Espermatócitos primários (E1); espermatócitos secundários (E2); espermátides (E). Coloração: H.E. Escala: 20  $\mu$ m.

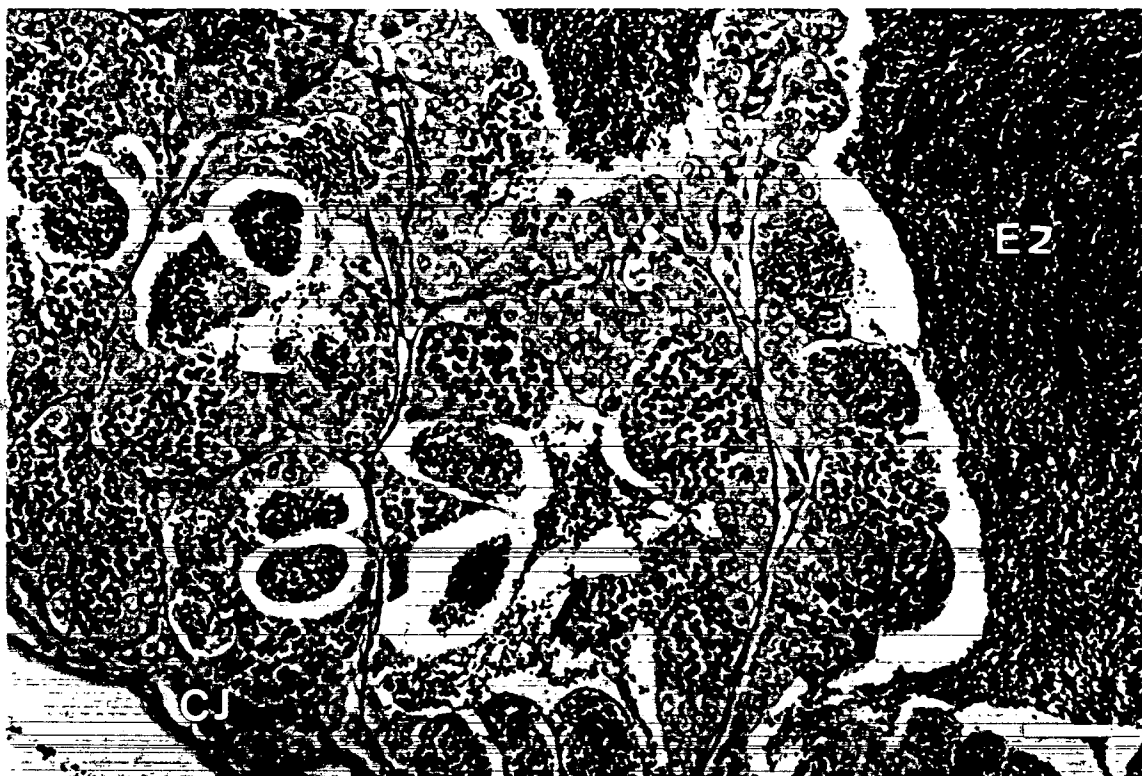


Figura 56. *Rhamdia quelen*. Testículo. Estádio Regressão (início). Nota-se muitas espermatogônias (G) e diminuição dos lóbulos e tamanho dos cistos. Espermatozóides (EZ); cápsula conjuntiva (CJ). Coloração: H.E. Escala: 20  $\mu$ m.

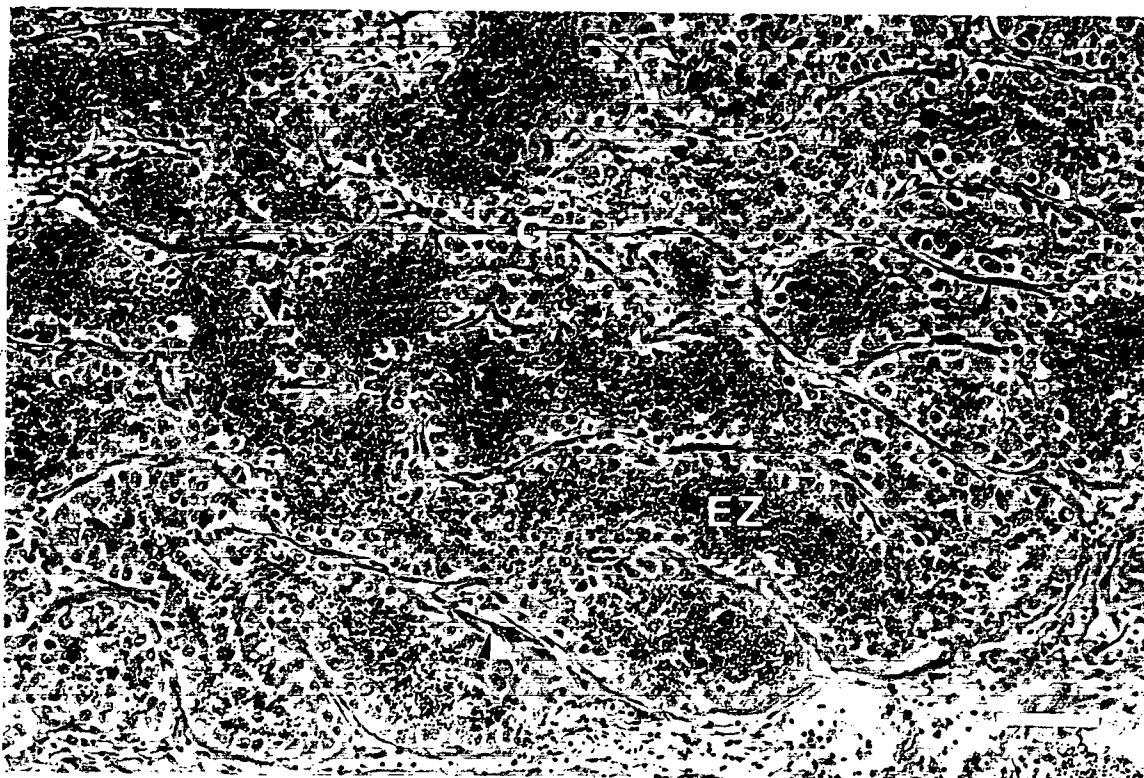


Figura 57. *Rhamdia quelen*. Testículo. Estádio Regressão (final). Nota-se o aspecto de desorganização dos lóbulos, com espessamento do tecido intersticial (cabeça de seta), o aumento do número de espermatogônias (G) e ausência de cistos, e declínio na quantidade de espermatozóides (EZ). Coloração: H.E. Escala: 50  $\mu$ m.

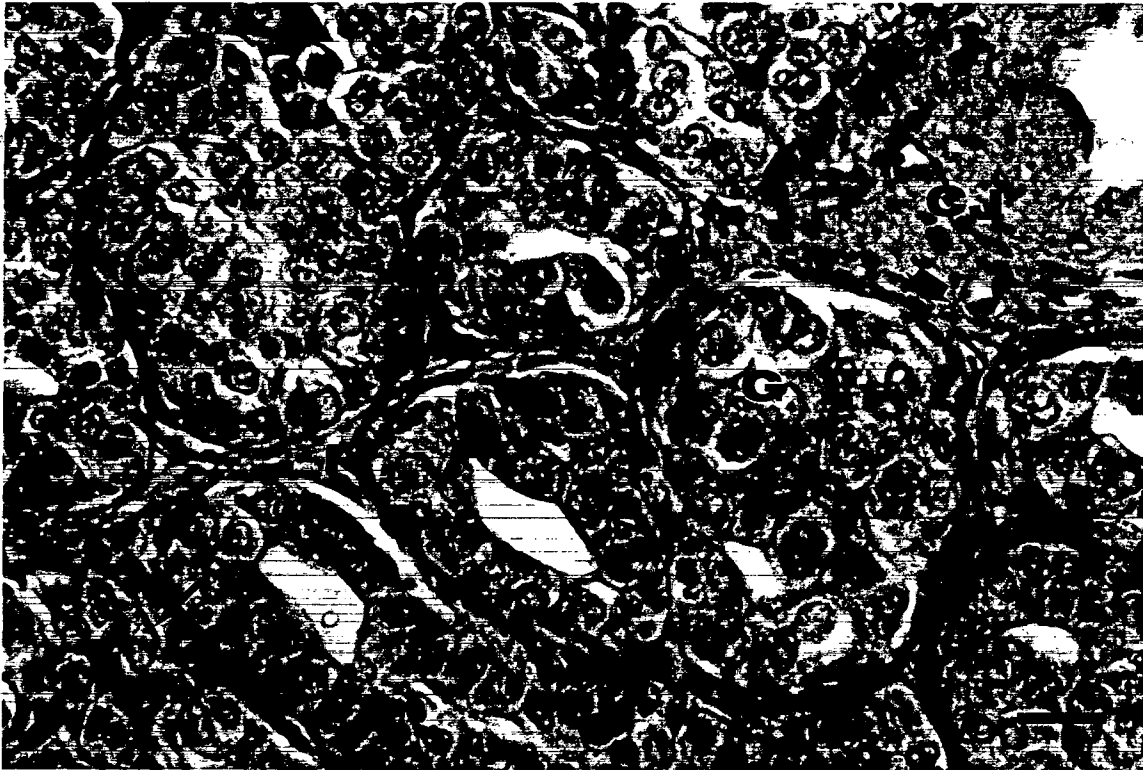
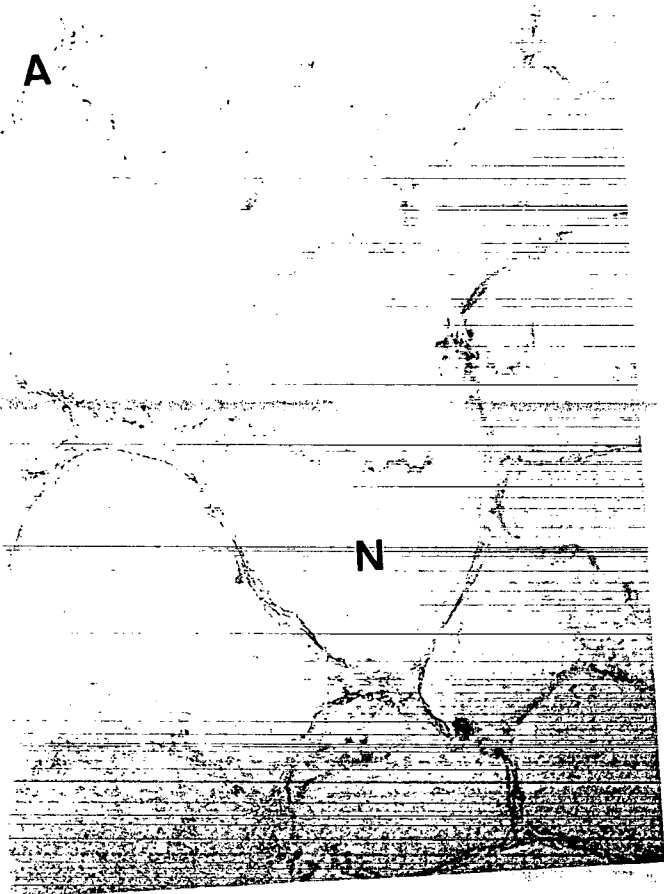


Figura 58. *Rhamdia quelen*. Testículo. Estádio Repouso. Nota-se na parede dos lóbulos apenas, espermatogônias primárias (G) e secundárias (cabeça de seta); tecido intersticial espesso (I) e ausência de espermatozoides; cápsula conjuntiva (CJ); célula de Sertoli (seta fina); células mióides (seta grossa). Coloração: H.E. Escala: 10  $\mu$ m.

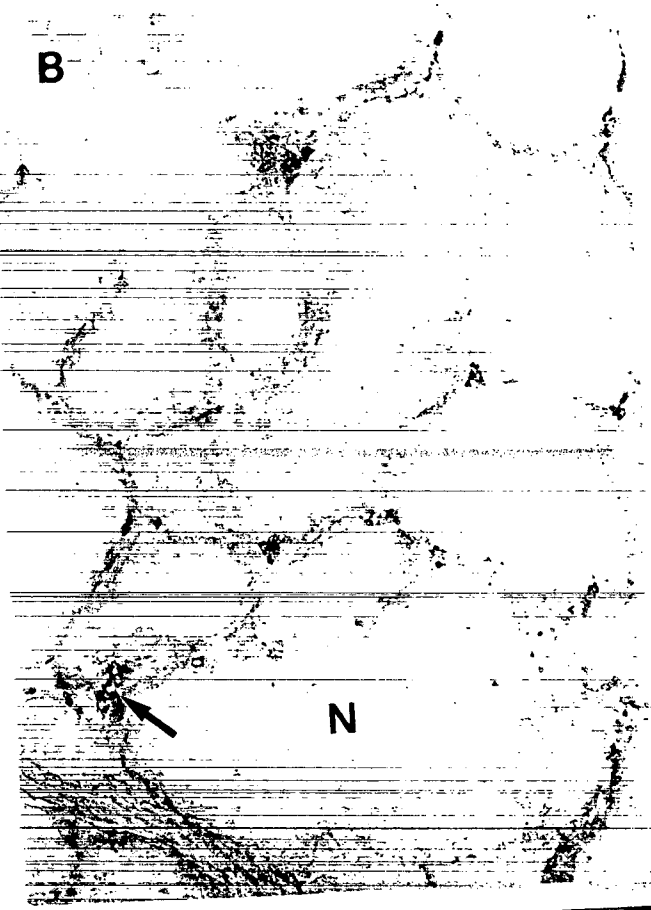


Figura 59. *Rhamdia quelen*. Corte transversal de testículo nos diversos estádios de maturação gonadal, indicando as células intersticiais (setas) evidenciadas pela atividade da delta 5-3-beta-hidroxiesteróide desidrogenase. Observar modulação enzimática em: (A) Controle, sem reação; (B) Repouso e Maturação (reação fraca); (C) Maduro (reação forte) e (D) Regressão (reação moderada). Na região dos cistos germinativos (N) não há reação. Escala: A), B), C), D) 20  $\mu$ m.

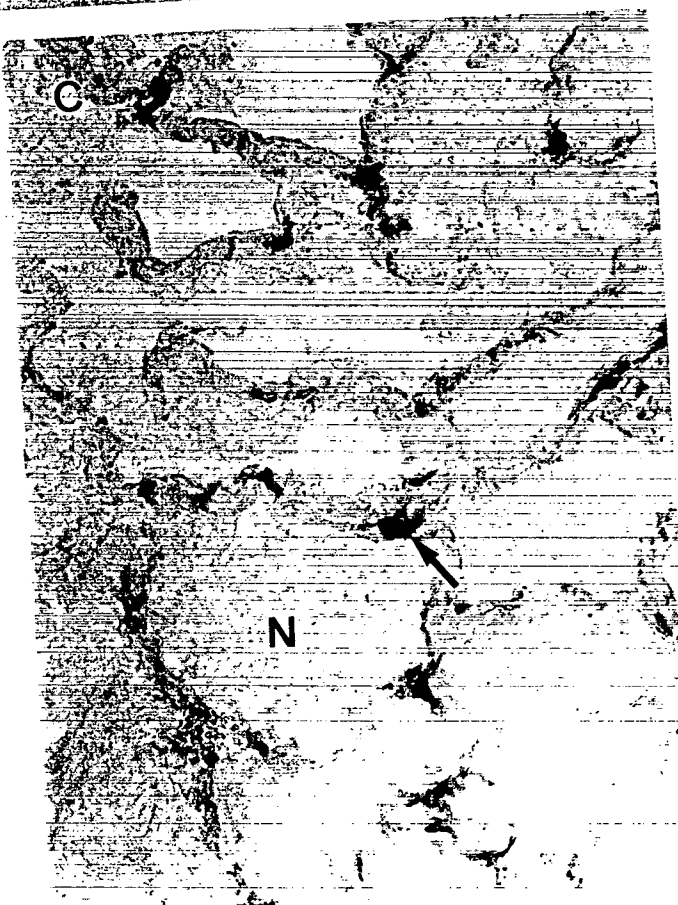
A



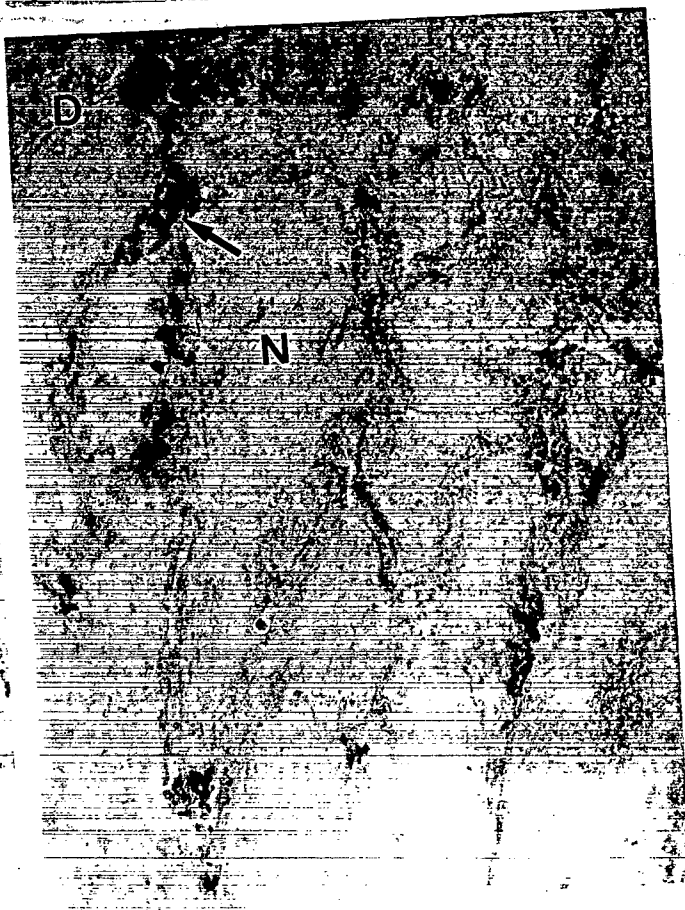
B



C



D



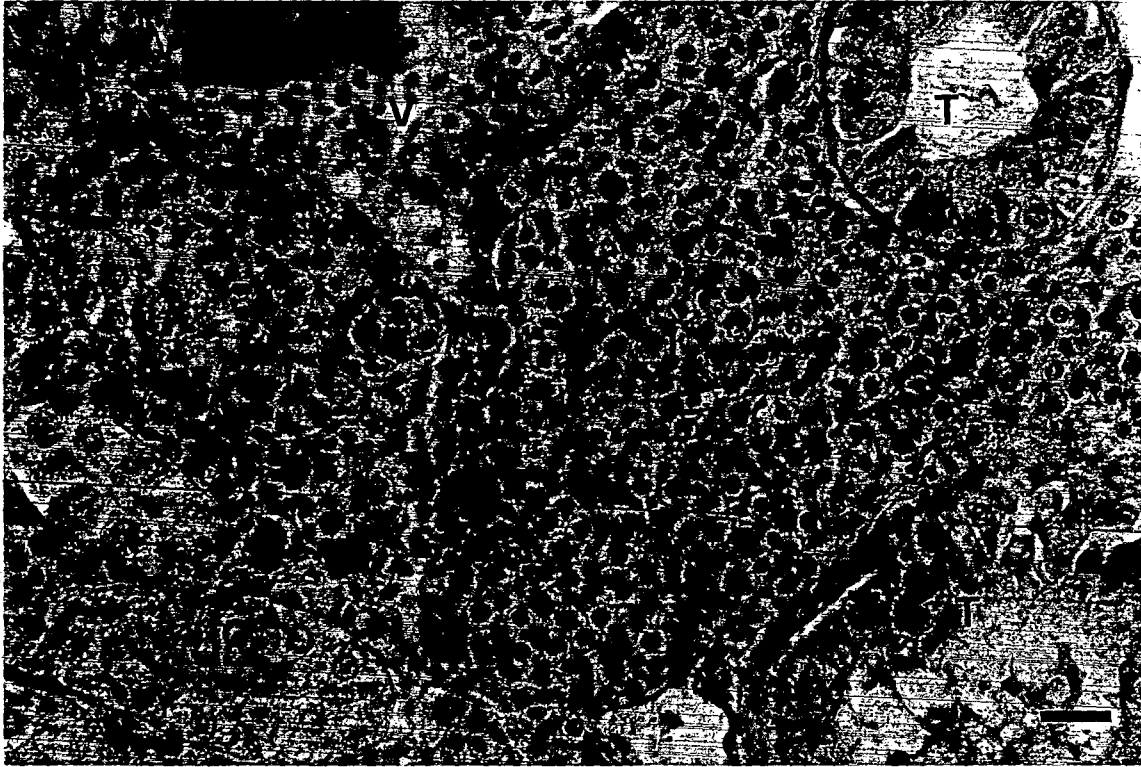


Figura 60. *Rhamdia quelen*. Macho. Rim cefálico. Estádio Maduro (final da estação reprodutiva). Tecido interrenal (I); túbulo renal (T); veia (V). Coloração: H.E. Escala: 5  $\mu$ m.



Figura 61. *Rhamdia quelen*. Macho. Estádio Maduro (final da estação reprodutiva).  
 A) Células cromafins (cabeça de seta) no tecido conjuntivo e ao redor de artéria (A). B)  
 Células cromafins (cabeça de seta) adjacentes à túnica adventícia da artéria (A) e ao redor do  
 nervo (N). Reação cromafin (em castanho) contra-corada com H.E. Escala: A) 5  $\mu$ m e B) 10  
 $\mu$ m.

Tabela I – IGS, peso médio e comprimento médio de fêmeas de *Rhamdia quelen* ao longo de dois ciclos reprodutivos (julho de 1998 a julho de 2000). Os dados são representados como média  $\pm$  EP.

Mês	IGS médio (%)	Peso médio (g)	Comprimento médio (cm)
1º ciclo 1998-2000			
Julho	1,05 $\pm$ 0,13	239,11 $\pm$ 40,76	30,86 $\pm$ 1,06
Agosto	1,14 $\pm$ 0,24	236,18 $\pm$ 8,37	31,64 $\pm$ 0,63
Setembro	2,11 $\pm$ 0,7	184,66 $\pm$ 5,98	27,12 $\pm$ 1,01
Outubro	12,28 $\pm$ 0,76	287,92 $\pm$ 14,64	31,62 $\pm$ 1,32
Novembro	4,03 $\pm$ 0,48	255,80 $\pm$ 28,25	31,60 $\pm$ 1,21
Dezembro	9,10 $\pm$ 1,22	362,22 $\pm$ 48,96	34,70 $\pm$ 1,36
Janeiro	7,48 $\pm$ 0,61	350,08 $\pm$ 27,68	33,67 $\pm$ 0,71
Fevereiro	6,82 $\pm$ 1,1	388,24 $\pm$ 37,45	34,97 $\pm$ 1,39
Março	7,27 $\pm$ 0,77	383,85 $\pm$ 29,34	34,97 $\pm$ 1,39
Abril	8,63 $\pm$ 2,175	674,55 $\pm$ 107,4	36,58 $\pm$ 0,95
Maiο	2,13 $\pm$ 0,55	267,63 $\pm$ 39,91	43,13 $\pm$ 3,27
Junho	2,27 $\pm$ 0,3	453,36 $\pm$ 97,11	31,83 $\pm$ 1,64
2º ciclo 1999-2000			
Julho	3,127 $\pm$ 0,75	290,55 $\pm$ 34,23	32,6 $\pm$ 1,09
Setembro	7,34 $\pm$ 1,55	298,8 $\pm$ 18,6	32,25 $\pm$ 0,7
Outubro	5,99 $\pm$ 0,89	240,50 $\pm$ 19,93	29,67 $\pm$ 0,66
Novembro	4,93 $\pm$ 1,07	245,90 $\pm$ 20,39	30,8 $\pm$ 0,6
Fevereiro	4,12 $\pm$ 0,98	202,75 $\pm$ 33,25	30,5 $\pm$ 1,05
Abril	2,33 $\pm$ 0,28	175,89 $\pm$ 18,18	29,5 $\pm$ 0,75
Junho	1,39 $\pm$ 0,12	203,61 $\pm$ 22,81	30,5 $\pm$ 0,95
Agosto	2,55 $\pm$ 0,29	162,31 $\pm$ 18,21	28,50 $\pm$ 0,65

Tabela II – IGS, peso médio e comprimento médio de machos de *Rhamdia quelen* ao longo de dois ciclos reprodutivos (julho de 1998 a agosto de 2000). Os dados são representados como média  $\pm$  erro padrão.

Mês	IGS médio (%)	Peso médio (g)	Comprimento médio (cm)
1º ciclo 1998-2000			
Julho	0,41 $\pm$ 0,04	239,11 $\pm$ 40,76	31,25 $\pm$ 1,18
Agosto	0,85 $\pm$ 0,24	265,49 $\pm$ 24,37	31,42 $\pm$ 0,88
Setembro	6,47 $\pm$ 0,28	213,78 $\pm$ 32,56	29,05 $\pm$ 1,59
Outubro	8,03 $\pm$ 0,64	318,32 $\pm$ 13,87	32,27 $\pm$ 0,76
Novembro	4,50 $\pm$ 0,67	378,49 $\pm$ 65,17	35,2 $\pm$ 2,06
Dezembro	5,95 $\pm$ 1,08	340,06 $\pm$ 48,09	35,1 $\pm$ 1,53
2º ciclo 1999-2000			
Julho	1,6 $\pm$ 0,25	265,71 $\pm$ 17,99	31,83 $\pm$ 0,91
Setembro	7,36 $\pm$ 0,68	198,8 $\pm$ 11,03	29,13 $\pm$ 0,83
Outubro	5,64 $\pm$ 1,24	555,20 $\pm$ 28,90	36,67 $\pm$ 0,73
Novembro	4,42 $\pm$ 0,93	381,57 $\pm$ 40,17	31,3 $\pm$ 0,88
Fevereiro	2,82 $\pm$ 0,55	202,75 $\pm$ 33,25	31,5 $\pm$ 1,5
Abril	1,92 $\pm$ 0,3	197,03 $\pm$ 8,75	30,5 $\pm$ 0,9
Junho	1,44 $\pm$ 0,36	145,49 $\pm$ 13,38	27 $\pm$ 0,82
Agosto	3,66 $\pm$ 0,72	153,29 $\pm$ 7,25	28,5 $\pm$ 0,7

Estádios:

Repouso – junho e julho

Maturação – agosto e setembro

Maduro – outubro a março

Regressão – abril e maio

## **DISCUSSÃO**

As proteínas são indispensáveis para a sobrevivência de todo ser vivo. A carne de peixe é de alto valor biológico, face ao equilíbrio de seus aminoácidos, sua riqueza em minerais (sobretudo cálcio e fósforo), vitaminas do complexo B, elevada digestibilidade e disponibilidade de seus componentes. Isso faz com que ela seja altamente recomendada para os projetos de combate à fome.

Observa-se que, em todo o mundo, a pesca extrativista vem apresentando tendência de estabilização da produção, devido à exploração máxima dos estoques naturais, ao elevado custo de produção e à contaminação dos ambientes aquáticos. No Brasil, onde sempre se acreditou que o país dispunha de recursos pesqueiros inesgotáveis, a produção real vêm decrescendo.

Ao contrário, porém do que vem ocorrendo com a produção extrativa, a aquicultura vem se desenvolvendo progressivamente em todos os seus segmentos. As demonstrações de tendência à estabilização das produções de pescado obtidas por extrativismo, levaram diversos grupos a considerar a aquicultura como opção realmente viável para aumentos significativos na geração de recursos pesqueiros (VALENTI *et al.*, 2000).

O presente trabalho vem contribuir à pesquisa de espécies de peixes nativos de interesse para cultivo, principalmente às adaptadas ao clima frio. Foram analisadas: a morfologia da glândula hipófise de jundiá no estágio maduro do ciclo gonadal, a distribuição e a morfologia da glândula interrenal e das células cromafins, bem como o desenvolvimento das gônadas de machos e fêmeas, durante as várias fases do ciclo reprodutivo.



## 1 – HIPÓFISE

A hipófise dos teleósteos está situada na base do diencéfalo, atrás do quiasma óptico, podendo apresentar-se, anatomicamente, ligada a essa região encefálica por um pedúnculo neurohipofisário característico da maioria dos teleósteos, ou unida diretamente ao assoalho do diencéfalo, sendo esta última posição, encontrada em espécies mais primitivas (PRASADA RAO, 1969) como ocorre em *Bathygobius soporator* (ZAGHA & VAL-SELLA, 1985).

A hipófise do *Rhamdia quelen* mostra morfologia compatível à dos teleósteos filogeneticamente mais evoluídos, com a presença de pedúnculo hipofisário partindo da base do diencéfalo e penetrando na glândula através da “Rostral Pars Distalis”.

Com base na morfologia da hipófise de outros teleósteos já estudados por vários autores (CHARIPPER, 1937; SCRUGGS, 1939; PRASADA RAO, 1969; 1972) e na classificação de Bretschneider e Duyvené de Wit (1947), a hipófise do *Rhamdia quelen* pode ser incluída no tipo “cranium-leptobasic”, assim como o *Rhamdia hilarii* (VAL-SELLA, 1977) ou seja, as regiões hipofisárias estão alinhadas. Sendo assim, o pedúnculo hipofisário penetra na hipófise através da “Rostral pars distalis”, que representa a região anterior da glândula, seguida da “Proximal pars distalis” e “Pars intermedia” na região posterior da glândula.

Microscopicamente podem ser distinguidas na hipófise, duas porções intimamente associadas, a adeno-hipófise e a neuro-hipófise. Esta penetra por toda a adeno-hipófise através de ramificações que se tornam cada vez mais finas a partir do pedúnculo hipofisário. Com base em características morfológicas e afinidades tintoriais das células pode-se perceber três regiões distintas na adeno-hipófise: a “Rostral Pars Distalis”(RPD), mais anterior, a “Proximal Pars Distalis”(PPD), mediana, e a “Pars Intermedia” (PI), na região

posterior da glândula (VAL-SELLA *et al.*, 1977; ZAGHA & VAL-SELLA, 1985; BORELLA, 1987; ARANA, 1992). Esse mesmo arranjo hipofisário foi encontrado para o *Rhamdia quelen*.

Através da análise histológica, utilizando métodos histológicos rotineiros, e do emprego de técnicas histoquímicas, a caracterização dos tipos celulares presentes na adeno-hipófise de peixes tem sido realizada, inclusive para espécies sulamericanas (VAL-SELLA *et al.*, 1986; BORELLA, 1987). Esses métodos embora essenciais para o estudo da fisiologia hipofisária limitam-se à caracterização celular, não sendo possível a identificação funcional precisa das células. Para tanto o método imunohistoquímico tem sido empregado, com relativo sucesso para os teleósteos, utilizando-se anti-hormônios de mamíferos (CAMBRÉ *et al.*, 1986; TOUBEAU *et al.*, 1991) e de peixes (YAN & THOMAS, 1991; POWER, 1992). Um relativo sucesso é obtido com o uso de anti-hormônios heterólogos, empregados para reações ocorridas ao nível de tecido (ANDRADE, 1993).

Métodos imunohistoquímicos deverão ser utilizados para complementar o presente estudo, e permitir a identificação dos tipos de hormônios presentes nas células da adeno-hipófise. As técnicas utilizadas neste trabalho permitiram a identificação de sete tipos celulares hipofisários.

Na “**Rostral Pars Distalis**” do *Rhamdia quelen* estão presentes dois tipos celulares, sendo um tipo **basófilo (Tipo I)** e outro **acidófilo (Tipo II)**.

O tipo basófilo tem seus cordões celulares dispostos ao redor dos ramos maiores e médios da neuro-hipófise. O tipo acidófilo está disperso por toda a região, onde seus cordões celulares dispõem-se em paliçada ao redor dos vasos sanguíneos. Várias pesquisas em teleósteos tem atribuído a função de síntese de corticotropina às células basófilas, e de prolactina às células acidófilas, uma vez que estas reagem com os anti-

hormônios adrenocorticotrófico humano e prolactina de peixe (CAMBRÉ *et al.*, 1986; YAN & THOMAS, 1991).

As células basófilas (Tipo I) do *Rhamdia quelen* reagiram positivamente à Hematoxilina-chumbo. Este tipo celular, também basófilo em *Piaractus mesopotamicus* (pacu), corou com Hematoxilina-chumbo e foi considerado como corticotrófico uma vez que reagiu ao anti-ACTH humano (ANDRADE, 1993). Também foi descrito como cromóforo para algumas espécies de peixes como o curimatá (BORELLA, 1987) e pacus jovens (VAL-SELLA *et al.*, 1986). Para outras espécies foi ainda considerado com sendo acidófilo, ou também anfófilo (OLIVEREAU & BALL, 1964; ARANA, 1992). Contudo, a extensão na qual uma célula secretora exhibe acidofilia, basofilia, ou cromofobia, depende de seu conteúdo granular, o qual pode variar com frequência com a atividade do ciclo celular (HADLEY, 1984). Para o *Rhamdia hilarii*, as células basófilas desta região mostraram forte reação positiva para ácido periódico de Schiff (PAS) e Alcian Blue pH 2,5 (AB pH 2,5) (VAL-SELLA *et al.*, 1977).

As células acidófilas da “Rostral Pars Distalis”, devido a sua localização bastante característica em todos os teleósteos estudados, aos aspectos morfológicos e à afinidade tintorial observada, acredita-se que sejam células secretoras de prolactina, hormônio relacionado com o processo da osmorregulação em peixes teleósteos (BERN, 1975; DE FLAMING, 1979; ZAGHA & VAL-SELLA, 1985).

Na “**Proximal Pars Distalis**” do jundiá são encontrados dois tipos celulares, sendo eles um **basófilo (Tipo I)**, e outro **acidófilo (Tipo II)**.

O tipo basófilo, poliédrico, é o mais abundante e encontra-se distribuído por toda a região, em forma de cordões celulares contínuos sendo células positivas à reação de PAS e AB pH 2,5. Essas duas reações positivas evidenciam a presença de polissacarídeos neutros e ácidos, e material glicoprotéico no citoplasma dessas células. Mas a intensidade de

reação pode variar de uma célula para outra no caso do PAS, e de uma região para outra, no caso do AB pH 2,5 onde as células mais periféricas apresentam reação mais intensa. Essas observações são em geral reportadas para outros teleósteos e sugerem função gonadotrófica (VAN den HURK, 1974; YOSHIE & HONMA, 1978; SUNDARARAJ, 1981; VAL-SELLA *et al.*, 1988).

Val-Sella *et al.* (1988) encontraram para *Rhamdia hilarii* um único tipo celular, poliédrico e basófilo, localizado na região lateral da “Proximal Pars Distalis”, com reação positiva para anti-gonadotrofina de salmão, e também positiva para PAS e AB pH 2,5.

Andrade (1993) estudando hipófise de *Piaractus mesopotamicus* (pacu) obteve nas células basófilas da “Proximal Pars Distalis”, reação positiva para PAS e AB pH 2,5, e estas reagiram com anti-LH e anti-FSH humanos, sendo considerado um tipo gonadotrófico.

Para o *Rhamdia quelen*, levando-se em conta a morfologia, localização e afinidade tintorial das células basófilas (Tipo I) da “Proximal Pars Distalis”, estas podem ser as células gonadotróficas. Estudos imunohistoquímicos que serão feitos posteriormente, podem confirmar o dado.

As células periféricas da “Proximal Pars Distalis” em *Piaractus mesopotamicus* também são basófilas, mas fusiformes, reagiram fortemente ao anticorpo anti-TSH humano indicando serem tireotróficas (ANDRADE, 1993).

Olivereau (1976) identificou, primeiramente, a presença de tipos celulares distintos secretores de gonadotrofinas em salmão do Atlântico. Estudos biológicos, bioquímicos e imunohistoquímicos, foram realizados posteriormente por Kawauchi *et al.*, (1989) identificando duas gonadotrofinas em células distintas da “Proximal Pars Distalis” de salmão. Para outros teleósteos, porém, parece existir apenas um tipo de célula produtora de gonadotrofina, como em *Cyprinus carpio*, em *Rhamdia hilarii* (VAL-SELLA & FAVA-DE-

MORAES, 1979; VAL-SELLA & SESSO, 1980a; VAL-SELLA *et al.*, 1988) e em *Piaractus mesopotamicus* (BORELLA, 1993).

As células acidófilas da “Proximal Pars Distalis” têm sido descritas na literatura, como somatotróficas (JAFRI & ENSOR, 1980; ARANA, 1992). Segundo Batten (1986) e Cambré *et al.*, (1986) a identificação imunohistoquímica deste tipo celular é possível somente com o uso de anti-hormônios de peixes. Andrade (1993) não detectou tais células em *Piaractus mesopotamicus* com o uso de anti-STH humano.

As células acidófilas (Tipo II) da PPD no *Rhamdia quelen*, possuem natureza fortemente acidófila quando coradas pelo H.E., mas por outro lado, mostram características anfófilas quando coradas pelo Mallory. São encontradas dispersas por toda a região, isoladamente ou em pequenos grupos.

Na “**Pars Intermedia**” da adeno-hipófise do *Rhamdia quelen*, são encontrados três tipos celulares, sendo eles um **basófilo (Tipo I)**, outro **acidófilo (Tipo II)** e **cromóforo (Tipo III)**. O último tipo aparece em pequeno número, e é semelhante na forma às células basófilas (Tipo I), podendo estar representando apenas um estágio do ciclo celular dessas células.

As células basófilas (Tipo I) arrançadas em cordões celulares dispersos pela região, representam o tipo celular mais abundante da região. A este tipo celular, que pode apresentar natureza levemente acidófila para algumas espécies, têm sido atribuído funções diversas como hipercalcemiante (WENDELAAR-BONGA *et al.*, 1984), gonadotrófica (BATTEN, 1986) e/ou secretor de somatolactina, hormônio este com possível função na reprodução (PLANAS *et al.*, 1992).

As células tipo II de natureza fortemente acidófila na coloração com H.E., apresentam natureza anfófila quando coradas com Mallory e reagem também à Hematoxilina-Chumbo. Estas células da “Pars Intermedia” têm sido descritas como

melanotróficas para vários teleósteos (CAMBRÉ *et al.*, 1986; QUESADA *et al.*, 1988; ARANA, 1992). Em *Piaractus mesopotamicus* (ANDRADE, 1993) apresentou reação positiva ao anti-ACTH humano. Em *Rhamdia hilarii*, as células acidófilas, apresentaram morfologia semelhante à encontrada para o *Rhamdia quelen*, mas ao contrário destas, apresentaram reação positiva para PAS.

## 2 – OVÁRIO

Os peixes constituem um dos mais antigos e diversificados grupos de vertebrados. Eles ocupam uma importante posição na filogenia desse grupo e superam todos os outros grupos de vertebrados em seus processos reprodutivos. Isto pode em parte, ser atribuído à sua antiguidade filogenética, com uma história evolucionária três vezes mais longa que das aves e dos mamíferos (HOAR, 1955).

Devido a este aspecto evolutivo, a análise do desenvolvimento nos peixes apresenta importantes implicações para o entendimento dos processos embriológicos e dos mecanismos de desenvolvimento operantes nos vertebrados (WHITT & WOURMS, 1981).

Os ovários de peixes consistem de oogônias, oócitos e células foliculares ao redor destes, estroma ovariano formando um tecido de sustentação, tecido vascular e tecido nervoso (NAGAHAMA, 1983).

A arquitetura dos ovários do *Rhamdia quelen* segue o esquema geral das espécies de teleósteos ovíparas. A aparência do ovário, bem como o seu tamanho e a população de oócitos variam grandemente em função da fase do ciclo reprodutivo.

**Três tipos de ovários** foram classificados por Marza (1938) (citado por WALLACE & SELMAN, 1981) de acordo com o padrão de desenvolvimento dos ovários. No **ovário sincrônico**, todos os oócitos estão no mesmo estágio de desenvolvimento e são desovados na mesma época, este tipo é encontrado em teleósteos que têm uma única desova do tipo total (*Oncorhynchus* e enguias). Nos **ovários grupo-sincrônicos**, há pelo menos duas populações de oócitos em diferentes estágios de desenvolvimento, como no linguado *Liopsetta obscura*, truta arco-íris, e *Salmo gairdneri*, que geralmente desovam uma vez a cada ano. No tipo **assincrônico** o ovário contém oócitos em vários estágios de desenvolvimento.

Este tipo ocorre em algumas espécies como *Goldfish*, *Carassius auratus* (NAGAHAMA, 1983), *Piaractus mesopotamicus* (ANDRADE, 1993), *Fundulus heteroclitus* (WALLACE & SELMAN, 1981) com muitas desovas ao longo de uma estação reprodutiva longa, ou seja, desova do tipo parcelada.

O jundiá possui ovário do tipo assincrônico e durante o período reprodutivo que acontece nos meses mais quentes do ano na região sul, que vai de outubro a março, ocorrem desovas repetidas e sincrônicas dentro de um mesmo grupo.

Ao longo do período reprodutivo, pudemos encontrar nos ovários de *Rhamdia quelen*, cinco tipos de oócitos na linhagem germinativa: oogônias, oócitos cromatina-nucleolar, oócitos perinucleolar, oócitos cortical-alveolar e oócitos vitelogênicos. Além destes foram encontrados oócitos atrésicos e folículo pós-ovulatório. A presença de um tipo de oócito em maior ou menor número, e suas características particulares, podem auxiliar tanto na caracterização dos estádios reprodutivos, como na melhor compreensão da dinâmica que é o fenômeno reprodutivo nos peixes, onde cada espécie pode apresentar uma particularidade. Particularidade que, muitas vezes pode se revelar em mais uma peça do “quebra cabeça” auxiliando na pesquisa que envolve um grupo tão diversificado como o dos peixes teleósteos.

**Oogônias** - Braekevelt & Mcmillan (1968) notaram que a quantidade de citoplasma aumenta nas oogônias e estas se transformam em oócitos. Figuras de mitose foram observadas em oogônias de *Eucalia inconstans*, porém os autores admitiram não se tratar de um fato comum que ocorre mais frequentemente no verão.

No entanto, oogônias e seu desenvolvimento, não foram observadas em ovário adultos de *Fundulus heteroclitus* durante a estação reprodutiva (SELMAN & WALLACE, 1986).



As células mais jovens de *Pimelodus maculatus* não foram chamadas de gônias, pois não foram observadas em mitose (GODINHO, 1972).

Em *Rhamdia quelen*, as oogônias e **oócitos cromatina nucleolar**, foram encontradas em animais imaturos, e em adultos em todos os estádios do ciclo reprodutivo, embora tenham sido mais facilmente observados no período de repouso e início de maturação. Oogônias foram encontradas formando ninhos de três a sete células, mas seu número é relativamente pequeno em relação às demais células da linhagem germinativa. Isso leva a crer que estas células devem sofrer processo de mitose, e embora apareçam com pouca frequência, figuras de mitose foram observadas, em ovários de *Rhamdia quelen* no estágio de maturação (Fig. 31).

As características morfológicas das oogônias diferem bastante dos oócitos cromatina nucleolar (oócitos em crescimento inicial), uma vez que estes são maiores, também pouco frequentes, e se agrupam em ninhos de 2 a 3 células, pode-se observar início da formação do envoltório folicular.

**Oócitos perinucleolares** - Foram encontrados durante todo o ciclo reprodutivo do jundiá. Predominantes nos animais imaturos, e nos adultos, aparecem em todos os estádios, com exceção do estágio maduro, onde aparecem em menor número em relação aos demais oócitos. Aliás no estágio maduro, todos os oócitos aparecem em menor número uma vez que o ovário está quase totalmente preenchido por oócitos vitelogênicos, que sendo grandes ocupam muito espaço.

Os oócitos perinucleolares têm como característica marcante a intensa basofilia citoplasmática, e a formação do envoltório folicular através da deposição de uma única camada de células foliculares pavimentosas ao seu redor, denominadas células da granulosa.

Estas células foram denominadas como oócitos de reserva, pois deles originam-se as populações celulares que vão iniciar a vitelogênese. O crescimento apresentado por essas células é independente da influência hipofisária, uma vez que nas fases iniciais da oogênese foram detectados baixos níveis de gonadotrofinas no plasma de vários teleósteos (CRIM *et al.*, 1975; SELMAN & WALLACE, 1986).

A intensa basofilia indica um retículo endoplasmático rico em RNA e reflete um período de intensa síntese protéica (BRAEKEVELT & McMILLAN, 1968; SELMAN & WALLACE, 1986).

Em *M. ancylodon* os oócitos desta fase de crescimento, estão rodeados por uma escassa capa de células da granulosa, cúbicas, de citoplasma homogêneo e núcleo basófilo intenso. Esta capa apresenta continuidade com o epitélio germinal e apresenta um só tipo celular (VIZZIANO & BEROIS, 1990a). Em outros casos, as células foliculares estão presentes mas não circundam completamente o oócito perinucleolar (SELMAN & WALLACE, 1986).

No jundiá as células foliculares circundam completamente o oócito perinucleolar, formando uma camada fina (pavimentosa) e regular em íntimo contato com o oócito, sem apresentar relação com o epitélio germinal.

**Oócitos cortical-alveolares** - O aparecimento dos oócitos cortical-alveolar no final do inverno e início da primavera (meados de agosto e setembro) marca o início do estágio de maturação do *Rhamdia quelen*. E, uma vez que se trata de um oócito em fase pré-vitelogênica, não ocorre nos peixes imaturos.

Este oócito é muito maior que os anteriormente citados, e como aparece com muita frequência no estágio de maturação, sugere uma fase de crescimento rápido. O que reflete em aumento também rápido dos valores de IGS para o período.

Esse rápido crescimento deve-se principalmente ao seqüestro de substâncias exógenas da circulação sangüínea, como a vitelogenina proveniente do fígado, substâncias essas que irão depositar-se no ooplasma formando o vitelo (NAGLER & IDLER, 1992). A vitelogenina é uma glicoproteína encontrada exclusivamente no plasma de fêmeas de teleósteos durante a estação reprodutiva ou como resposta à administração de estrógenos (WALLACE & SELMAN, 1981; SELMAN & WALLACE, 1983; WALLACE, 1985).

Os oócitos cortical-alveolares são caracterizados pelo aparecimento, na periferia do citoplasma, de pequenas esferas de vitelo, as quais se dispõem inicialmente na periferia do ooplasma, fusionando-se entre si centripetamente (SELMAN & WALLACE, 1986; NAGLER & IDLER, 1992).

Para o *Rhamdia quelen* as vesículas de vitelo do oócito cortical-alveolar, também apresentaram-se como esferas irregulares, dispostas inicialmente centripetamente, próximas à membrana celular. Esse primeiro vitelo formado, cujas vesículas não coraram com corantes rotineiros como Hematoxilina-Eosina e Mallory, apresentam reação negativa também para PAS. No entanto são positivos para Sudan Negro, o que sugere composição lipídica para este primeiro vitelo formado. As células da granulosa, neste oócito apresentam reação negativa para Sudan Negro e ácido periódico de Schiff (PAS). O segundo envoltório folicular, as células da teca, já pode ser notado, nestes oócitos.

**Oócitos vitelogênicos** - São grandes e sua principal característica é a presença de citoplasma de aparência homogênea e núcleo periférico. A aparência homogênea do citoplasma deve-se à coalescência dos grânulos de vitelo que, apresentam-se nesta fase como uma massa única. Isto seria o resultado da hidratação sofrida pelo citoplasma do oócito nesta etapa (VIZZIANO & BEROIS, 1990a).

No jundiá a presença de muitos oócitos vitelogênicos marca o estágio maduro, onde os valores de IGS são altos, retratando o auge da estação reprodutiva. Os

grânulos de vitelo aparecem individualizados perifericamente, só notando-se coalescência destes na região mais central do oócito.

Os grânulos de vitelo deste estágio, apresentam reação positiva para Sudan Negro (lipídicos), assim como para PAS (polissacarídeos e glicoproteínas neutras), e encontram-se distribuídos por todo o citoplasma celular.

Nos oócitos vitelogênicos o núcleo adquire uma posição periférica definitiva, e devido às grandes proporções conferidas ao citoplasma pela presença de vitelo, este ocupa uma pequena porção do total do oócito, sendo que muitas vezes não é visualizado em alguns cortes histológicos.

Porawski (1994) encontrou para peixe-rei, vitelo lipídico em grânulos localizados ao redor do núcleo, e o vitelo não lipídico mais na periferia do oócito.

Hoar (1969) descreve para este oócito, a presença de células foliculares aplanadas devido, provavelmente, ao crescimento do oócito por hidratação, o que provoca a distensão das suas camadas envoltórias. No jundiá as células foliculares passam de cúbicas, no início da vitelogênese, a cilíndricas no oócito maduro.

Em muitos casos ocorre o rompimento, em vários pontos, da camada de substância acidófila (zona pelúcida), e seu afastamento do oócito leva consigo a camada de células foliculares. Estas mantêm suas características de reação positiva para Sudan Negro. O que poderia indicar que as células granulosas sejam as responsáveis pela produção de esteróides gonadais, já que o processo ovulatório é dependente principalmente dos esteróides gonadais nos peixes (HOAR, 1969).

Atividade esteroideogênica tem sido localizada no tecido intersticial, nas células da teca e da granulosa de acordo com a espécie e estágio da oogênese. Tal atividade têm sido verificada também no ooplasma. Para *Clarias lazera* (Siluriforme), atividade da 3 $\beta$ -hidroxi-esteróide desidrogenase foi marcada nas células intersticiais, células da teca (maior

atividade), células da granulosa e folículo pós-ovulatório (revisado em FOSTIER *et al.*, 1983).

Cada esteróide ovariano desempenha um papel nos diferentes estágios do desenvolvimento dos oócitos durante o ciclo reprodutivo. O mais bem conhecido é o 17  $\beta$ -estradiol, produzido pela camada folicular, que induz a síntese hepática e secreção de vitelogenina (WALLACE, 1985).

Para o *Rhamdia quelen*, as concentrações de 17  $\beta$ -estradiol aumentaram progressivamente com o desenvolvimento dos oócitos e simultaneamente ao aparecimento de vesículas de vitelo (BARCELLOS *et al.*, 2001).

As células granulosas do oócito vitelogênico de jundiá ao contrário dos estudos de Hoar (1969), apresentam-se mais altas do que no oócito cortical-alveolar, tipicamente cilíndricas, com citoplasma levemente basófilo onde nota-se uma granulação fina. Apresentaram reação negativa para Sudan Negro, mas positiva para PAS, sugerindo presença de material glicoproteico no citoplasma.

Na ultra-estrutura não se nota a presença de lipídios, mas as células da granulosa apresentaram-se carregadas de grânulos claros, não eletrondensos e, na sua grande maioria em nítido processo de fusão. Ao redor dos grânulos encontra-se um retículo endoplasmático granular (REG) particularmente carregado de ribossomos aderidos, e ribossomos livres, o que pode indicar atividade de síntese intensa de material de natureza proteica.

Wallace e Selman (1981) observaram em células da granulosa do oócito vitelogênico de *Fundulus heteroclitus*, numa primeira fase de desenvolvimento, a presença de retículo endoplasmático granular (REG) e complexo de Golgi com acúmulo de vesículas de secreção. Numa segunda fase ocorreu aumento do número de cisternas do retículo endoplasmático liso e diminuição das cisternas do REG e ribossomos livres. Tais variações

podem ocorrer também para o jundiá uma vez que, as células da granulosa dos diferentes oócitos, apresentam modificações no aspecto citoplasmático, dependendo do estágio, que podem ser observadas mesmo ao nível de microscopia óptica.

**Atresia folicular** - é um fenômeno normal nos ovários de peixes (VIZZIANO & BEROIS, 1990a). O significado da atresia de oócitos em vias de maturação, e maduros remanescentes à pós-desova parece claro. A função da atresia de oócitos residuais é remover o material não utilizado e recuperar parte do material energético durante o processo vitelogênico. Porém, também são encontrados oócitos atrésicos em outras etapas que não a pós-desova e o significado desta atresia não está bem determinado (VIZZIANO & BEROIS, 1990a). Função secretora também foi descrita para corpos atrésicos de peixes por Guraya (1973; 1976a).

Wallace & Selman (1981) sugeriram que a maior causa de atresia em animais experimentais pode ser o estresse ambiental. A involução de oócitos jovens pode também ser atribuída a uma deficiência nutricional ou a algum fator que poderia reduzir os níveis de gonadotrofinas.

Em jundiá, os oócitos atrésicos aparecem após a desova, em pequena quantidade em relação a outros oócitos, mas são típicos do estágio de regressão, que acontece a partir do outono (abril e maio). O desaparecimento de oócitos vitelogênicos do ovário, promove uma diminuição do volume ovariano e conseqüente diminuição drástica do IGS em relação ao período de reprodução.

Os oócitos atrésicos têm como característica mais marcante o distanciamento entre as células da granulosa e da teca, surgindo entre estas duas camadas, um espaço preenchido por material amorfo PAS positivo, sugerindo presença de material de natureza glicoproteica. Não foram detectados lipídios em oócitos atrésicos, o que poderia descartar alguma função esteroideogênica.

Hoar (1969) define folículos atrésicos como estruturas em reabsorção, que não apresentam nenhuma evidência histoquímica da síntese de esteróides. Fato que contrasta com os folículos pós-ovulatórios, que apresentam características sudanófilas sugerindo provável função esteroideogênica.

**Folículo pós-ovulatório** - Em teleósteos o folículo pós-ovulatório é originado a partir das células do epitélio folicular que se tornam hipertrofiadas dando origem às células glandulares intersticiais (GURAYA, 1976a).

Estes folículos corresponderiam ao corpo lúteo em mamíferos, uma vez que se formam após a liberação dos oócitos do ovário. São formados pelas células que envolvem o oócito e permanecem no ovário após a desova. No jundiá essas camadas envoltórias, constituem-se das células da granulosa, hipertrofiadas, e das células da teca.

Em espécies ovíparas não é comum a presença desses folículos que, em geral, quando presentes degeneram em um curto espaço de tempo. Ao contrário do que acontece em peixes vivíparos, onde esses folículos transformam-se em estruturas esteroideogênicas, denominadas corpos lúteos pós-ovulatórios. Sua função é manter os níveis hormonais auxiliando no comportamento sexual da espécie (VIZZIANO & BEROIS, 1990a).

A presença de grânulos de lipídios e lipoproteínas conferem a essa estrutura características de células secretoras de esteróides (GURAYA, 1976a). Por outro lado, em folículos pós-ovulatório de *M. ancylodon*, não foi detectada a presença de lipídio sugerindo ausência de uma função secretora de esteróides (VIZZANO & BEROIS, 1990a). Em peixe-rei também há evidências de atividade esteroideogênica para essa estrutura (PORAWSKI, 1994).

Em teleósteos os folículos ovarianos têm a capacidade de sintetizar estrógenos, progestógenos, andrógenos e também em algumas espécies restritas, corticosteróides (LANCE & CALLARD, 1978)

Em *goldfish* a atividade esteroidogênica no folículo pós-ovulatório começa imediatamente após a ovulação (KHOO, 1975). Experimentos *in vitro*, para esta mesma espécie, mostraram que este folículo produz testosterona mas não estradiol (KOBAYASHI *et.al.*, 1989).

Em algumas espécies, o folículo pós-ovulatório mostra potencialidade para esteroidogênese, mais freqüentemente confirmada para as células da granulosa (BARA, 1965, 1974; KAGAWA *et al.*, 1981).

Em certas espécies, particularmente as células da teca tem mostrado ultra-estrutura claramente esteroidogênica, mas as diferenças entre as espécies tem que ser consideradas com reserva uma vez que há variações não conclusivas em relação ao ciclo reprodutivo (revisado em FOSTIER, 1983).

No jundiá os folículos pós-ovulatórios aparecem no ovário entre outros oócitos, como estruturas contorcidas, apresentando uma cavidade com conteúdo PAS positivo em seu interior. Tal estrutura é delimitada por um epitélio simples cilíndrico, acidófilo e hipertrófico (granulosa), e outro epitélio pavimentoso, localizado mais externamente (teca).

A ultra-estrutura das células da granulosa (Fig. 37 e 38) mostra o retículo endoplasmático granular e as mitocôndrias (com cristas mitocondriais tubulares) bem desenvolvidos. Estão localizados na base celular, juntamente com um núcleo claro, tornando evidente a polaridade celular. Nota-se ainda as cisternas do complexo de Golgi bem desenvolvidas, porém pouco dilatadas, com muitos grânulos de secreção pequenos ao seu redor. Estão presentes também, algumas gotas de lipídios dispersas pelo citoplasma e vesículas de fagocitose. Ribossomos livres na forma de polirribossomos são abundantemente distribuídos por todo o citoplasma celular.

Núcleo claro, retículo endoplasmático granular e polirribossomos bem desenvolvidos, mitocôndrias com cristas tubulares, grânulos de secreção, complexo de Golgi



evidente, e a presença de grânulos de lipídios, sugerem atividade de síntese de esteróides nas células da granulosa do folículo pós-ovulatório do jundiá.

A presença de organelas típicas de células secretoras de proteína (retículo endoplasmático granular, complexo de Golgi e ribossomos), juntas com mitocôndrias contendo cristas tubulares e pequena quantidade de retículo endoplasmático liso (REL), são características específicas, que podem variar durante o ciclo reprodutivo. Onde pode ocorrer por exemplo, aumento do REL (NICHOLLS & MAPLE, 1972) e aparecimento das mitocôndrias com cristas tubulares conforme a fase em questão (KAGAWA & TAKANO, 1979).

Não se explicaria a presença de folículo pós-ovulatório esteroidogênico em uma espécie de peixe ovípara como é o *Rhamdia quelen*, e que aparentemente não têm cuidado com a prole. Porém, em peixes com desova parcelada, a estação reprodutiva é mais longa e o animal desova várias vezes durante uma mesma estação. Nesse caso portanto, há necessidade da manutenção do comportamento reprodutivo durante todo esse período (VIZZIANO & BEROIS, 1990a), o que concorre para a hipótese da necessidade de um “corpo lúteo” secretor nesta espécie.

Durante o período de desenvolvimento do presente trabalho, o folículo pós-ovulatório foi observado em fêmeas de uma única coleta que coincidiu com o período imediatamente pós-desova (um dias após). As coletas foram feitas aleatoriamente, não tendo sido possível levar em conta o dia da desova. Tal fato pode ter influenciado a menor ocorrência do folículo pós-ovulatório durante o estudo.

Maiores estudos seriam necessários para determinar exatamente o tempo de ocorrência do folículo pós-ovulatório, que provavelmente é de apenas alguns dias, como ocorre para outras espécies. Em *Oncorhynchus rhodurus*, uma espécie de salmão, a

atividade esteroidogênica do folículo pós-ovulatório permanece de 1 a 3 dias após a desova (YOUNG *et. al.*, 1983).

Quanto ao papel de secreção da estrutura, Barcellos *et al.* (2001) encontraram, um dia após a primeira desova de jundiás, altas concentrações de  $17 \beta$ -estradiol, que passou de  $2,6 \pm 0,6$  ng/l antes da desova, para valores de  $9,1 \pm 1,2$  ng/l. Esse fato poderia justificar a presença do folículo pós-ovulatório, uma vez que altos níveis de esteróides depois da primeira desova, podem ser responsáveis pela iniciação da vitelogênese para uma próxima desova.

### 3 - TESTÍCULO

Os testículos de *Rhamdia quelen* são órgãos pares e alongados, dispostos livremente um do lado do outro em seu maior comprimento, fundindo-se apenas na porção terminal, onde ocorre confluência dos ductos espermáticos para a formação do poro genital. Essa característica é observada na maioria dos teleósteos, como por exemplo em *Salvelinus fontinalis* (HENDERSON, 1962), *Clarias batrachus* (LEHRI, 1967), *Channa gachua* (SANWAL & KRANNA, 1972), *Leporinus silvestre* (ANDRADE, 1980), *Geophagus brasiliensis* (BARBIERI *et al.*, 1981), *Rhandia hilarii* (NARAHARA, 1983), entre outros.

Alguns peixes porém, apresentam diversidade na organização anatômica do testículo. Nos *Ciprinodontes viviparos* (família Poeciliidae), os testículos são fusionados, formando uma estrutura sacular ímpar (HOAR, 1969), também sendo ímpar em *Notopterus notopterus* (SHRIVASTAVA, 1967).

Os testículos podem apresentar variações na sua forma e aparência, mais evidentes geralmente no período reprodutivo. Em *Gillichthys* são observadas projeções cecais com aspecto de dedos de luva na porção testicular distal (WEISEL, 1949). Projeções testiculares também são observadas em *Mystus seeghala*, (SATHYANESAN, 1959), *Schizothorax richardsonii* (BISHT, 1974) e em *Rita rita* (NAIR, 1966). Em *Rhamdia hilarii* são descritas fileiras de franjas laterais que se tornam proeminentes durante a época da reprodução (NARAHARA, 1983).

No *Rhamdia quelen* também observam-se franjas testiculares. Só que nesta espécie estão distribuídas por todo o testículo, e também apresentam-se mais pronunciadas durante a época da reprodução.

A organização estrutural e funcional do testículo, também mostra algumas variações entre os teleósteos. Para alguns a região posterior dos testículos é de

natureza estéril, servindo apenas como região de estoque e condução de fluido espermático. Para *Barbus tor* a região testicular posterior é considerada como vesícula seminal (RAI, 1965). Em *Clarias batrachus* e *Mystus vittatus*, a região testicular posterior também não apresenta tecido germinativo, que está presente apenas na região anterior do testículo (NAIR, 1966). Mas Lehri (1967), descreve que em *Clarias batrachus*, as regiões gonadais anterior e posterior são similares, tanto histologicamente quanto funcionalmente. Em alguns bagres ictalurídeos (bagres de água doce) foi observado que, uma pequena porção da região posterior é glandular e o restante está ligado à atividade espermatogênica (SNEED & CLEMENS, 1963).

Em *Rhamdia quelen* as preparações histológicas mostraram que as diferentes regiões testiculares (anterior, média e posterior) são estrutural e funcionalmente semelhantes, notando-se o mesmo arranjo do tecido germinativo. A distribuição deste tecido é feita em forma de lóbulos, ao longo de todo o comprimento do testículo e permite classificar o testículo da espécie como do tipo espermatogonial irrestrito, de acordo com a classificação proposta por Grier (1981).

A espermatogênese nos vertebrados é um processo no qual as espermatogônias transformam-se em espermatócitos, que por sua vez, sofrem meiose para produzir as espermátides. A partir destas células desenvolve-se o processo de espermiogênese, onde após uma série de modificações morfológicas irão se formar os espermatozóides. Há dois padrões distintos de espermatogênese nos vertebrados, um padrão que ocorre nos anamniotas (peixes e anfíbios) e outro que ocorre nos amniotas (répteis aves e mamíferos). Nos anamniotas a espermatogênese ocorre nos espermatocistos (cistos), os quais se desenvolvem dentro dos lóbulos testiculares. Os cistos são formados quando a célula de Sertoli associa-se com a espermatogônia primária. Divisões mitóticas das espermatogônias primárias produzem uma população de espermatogônias secundárias que são envolvidas

completamente pelo citoplasma das células de Sertoli, que formam a parede do cisto. Com o progresso da espermatogênese, um clone de espermatozóides isogênicos são produzidos e liberados, por ruptura na parede do cisto, dentro do lúmen do lóbulo testicular. Após a espermição, a célula de Sertoli degenera. Dessa forma, em anamniotas, não há um epitélio germinativo permanente, uma vez que os espermatocistos precisam ser reconstruídos durante as sucessivas estações reprodutivas (PUDNEY, 1995).

Em contraste, nos amniotas a espermatogênese não ocorre em cistos. Mas ocorrem nos túbulos seminíferos que possuem uma população permanente de células de Sertoli e espermatogônias, as quais atuam como uma reserva de célula germinativas para a manutenção da atividade espermatogênica (PUDNEY, 1995).

Os testículos de jundiá apresentam-se compostos por numerosos lóbulos, contendo vários cistos intralobulares, no interior dos quais a espermatogênese ocorre sincronicamente. Esses lóbulos podem apresentar anastomose entre si, quando ocorre proliferação de espermatozóides durante o período reprodutivo.

O modo como se dá a renovação das espermatogônias nos testículos após a desova, gera opiniões divergentes entre os pesquisadores. Alguns autores sugerem a migração das células de um estoque externo permanente para o interior do testículo ((FOLEY, 1926; MARSHALL & LOFTS, 1956), enquanto outros sugerem uma origem intersticial das espermatogônias (RASTOGI, 1968; RUBY & MACMILLAN, 1970; VAN DEN HURK *et al.*, 1978b).

Porém a maioria das investigações a respeito, sugerem a origem das espermatogônias a partir de células germinativas dormentes, localizadas em regiões específicas, como a porção periférica testicular. Desse modo, essas células germinativas indiferenciadas dariam origem às novas espermatogônias (HANN, 1972; BULLOUGH, 1939; LEHRI, 1967 e GRIER, 1981).

Em *Rhamdia quelen*, a presença de espermatogônias primárias durante todas as fases do ciclo reprodutivo, poderia indicar espermatogônias dormentes, localizadas no interior dos lóbulos, como precursoras do próximo estoque celular.

O ciclo da maturação gonadal nos teleósteos obedece uma ordem progressiva natural, que pode ser subdividida em várias fases, de acordo como o desenvolvimento do tecido germinativo.

As gônadas, durante o ciclo reprodutivo dos teleósteos, apresentam uma série de modificações, principalmente estruturais, as quais são normalmente definidas em estádios de maturação. Não há critérios rígidos para definição das fases de maturação nos machos, e nenhuma regra define ou estabelece o número de estádios, nem a denominação dos mesmos. Muitas vezes a falta de padronização dificulta as análises comparativas dos trabalhos.

Alguns autores não descrevem **repouso** como fase do ciclo gonadal apenas. Narahara (1983) considera nessa etapa, também indivíduos que nunca reproduziram, havendo então sobreposição da fase de **repouso** e fase jovem, animais **imaturos**.

Para o jundiá adotou-se a determinação dos estádios de desenvolvimento gonadal em dois grupos, o dos jovens, imaturos, que nunca reproduziram, e o grupo dos adultos, animais que já iniciaram a reprodução.

Os testículos dos animais imaturos são muito pequenos, translúcidos e com as franjas pouco pronunciadas. Já os peixes adultos apresentam os testículos mesmo em repouso, muito maiores, com uma coloração rosada e com franjas mais pronunciadas quando comparadas aos peixes imaturos.

O ciclo gonadal dos peixes adultos foi dividido em quatro estádios principais, de acordo com as características macroscópicas e microscópicas. São elas **repouso, maturação, maduro e regressão**.

A fase imatura ocorre uma única vez, já que as características dos peixes jovens são irreversíveis, uma vez iniciado o fenômeno reprodutivo. Isso pode ser notado até mesmo nos valores de IGS, que não voltam mais aos mesmos índices encontrados na primeira maturação. No primeiro ano de coleta, onde os animais eram de primeira maturação, no **repouso** o valor do IGS foi o mais baixo dos dois ciclos  $0,41 \pm 0,04$ . No segundo ciclo, animais de segunda maturação, o IGS do estágio de repouso ficou em  $1,44 \pm 0,36$ .

Neste trabalho, a condição característica para o estágio **repouso** é aquela em que não há mais presença de espermatozóides residuais no lume lobular, embora esses sejam frequentes nas etapas iniciais desse estágio, como espermatozóides residuais. É um período relativamente curto, quando comparado ao mesmo período das fêmeas da espécie.

No repouso é grande a presença de espermatogônias primárias, e no final do estágio pode-se notar a presença de cistos intralobulares. Essas observações concordam em parte, com aquelas que descrevem como característica da fase, a presença de células mãe de espermatozóides e espermatogônias em proliferação (LEHRI, 1967; BISHT, 1974; GRIER, 1981). Em *Clarias batrachus*, na etapa final do repouso, os cistos intralobulares também são observados. Em salmonídeos, o início de um novo ciclo espermatogênético parece ser possível somente quando os espermatozóides tiverem sido totalmente eliminados do testículo, tanto pelo processo normal de espermição, como pela reabsorção intratesticular (BILLARD *et al.*, 1982).

O estágio de **maturação** nos testículos de jundiá, foi considerado a partir do momento em que se deu início o processo espermatogênético, marcado pela presença de espermátócitos.

Nessa etapa, as gônadas apresentam coloração branca, a vascularização superficial é bem aparente e as franjas apresentam-se bem pronunciadas. No final do inverno e início da primavera, o peso e o volume dos testículos aumentam muito em relação ao estágio

anterior, uma vez que ocorre aumento significativo do tecido germinativo, com a formação e crescimento dos cistos.

Nesse estágio, inicialmente observam-se a presença de espermatogônias primárias, mas em número decrescente. Por outro lado, nota-se um aumento na quantidade de espermatogônias secundárias, espermatócitos primários e secundários. Na fase mais adiantada do estágio, as espermatogônias ficam reduzidas a algumas poucas células e os cistos aumentam muito de tamanho, contendo todas as outras variedades de células germinativas. A quantidade de espermatozóides, já encontra-se em ampla expansão.

No estágio **maduro**, os testículos aumentam marcadamente o peso e o volume, tornando-se túrgidos. Apresentam coloração branca e franjas muito desenvolvidas tanto em comprimento quanto em espessura, sendo atingido o maior índice de IGS. As variações nos valores de IGS dentro de um mesmo período reprodutivo, assim como nas fêmeas, pode ser decorrente da data da coleta não poder ter sido feita levando-se em conta o dia da desova.

No período reprodutivo os lóbulos atingem seu diâmetro máximo, decorrente das fusões lobulares. Essa fase é caracterizada pela proliferação de espermatozóides que ocupam praticamente todo o lóbulo, apesar de que outros tipos celulares germinativos também estão presentes, mas em menor número. Além dos espermatozóides como células mais abundantes, espermatogônias ocorrem com bastante frequência e são abundantes durante todo o período de reprodução. Para o *Prochilodus scrofa* estas células foram mais abundantes apenas no final do período reprodutivo (BORGES, 1987).

Como o processo da espermatogênese é muito dinâmico e rápido, é bem provável que a predominância, de um ou de outro tipo de população celular altere-se com mais frequência do que conseguimos registrar.



A liberação de espermatozóides na luz do lóbulo, especialmente observada no estágio maduro, ocorre devido à ruptura dos cistos intralobulares, que apresentam-se como estruturas temporárias. Segundo alguns pesquisadores, este rompimento cístico ocorre apenas quando as células germinativas em seu interior, atingem a fase de espermatídes (CRAIG-BENNET, 1931; HENDERSON, 1962; HYDER, 1969; RUBY & MACMILLAN, 1970; SWARUP & SHRIVASTAVA, 1979 e SHRIVASTAVA, 1984). Em outros teleósteos, entretanto, o rompimento cístico é caracterizado no final da espermiogênese, liberando somente espermatozóides no lume tubular como ocorre em *Eucalia incostans* (RUBY & MACMILLAN, 1970) e *Leporinus silvestre* (ANDRADE, 1980). Por outro lado, rompimentos císticos com liberação de espermatócitos secundários foram observados em *Notopterus notopheteros* (SHRIVASTAVA, 1967). No jundiá as espermatídes sempre foram encontradas no interior dos cistos, sendo encontrados apenas espermatozóides no lume .

A membrana cística, segundo alguns pesquisadores, é constituída de tecido conjuntivo (DADZIE, 1969; RUBY & MACMILLAN, 1970). Outros admitem que o envoltório cístico seja constituído pela união de células de Sertoli (GRIER, 1981; PUDNEY, 1995; PORAWSKI, 1999).

No jundiá as células de Sertoli, são mais facilmente visualizadas no estágio de repouso e regressão, onde delineiam o compartimento lobular e são encontradas sempre próximas às espermatogônias.

Após o estágio maduro, ocorre redução natural do tamanho dos lóbulos, o que provoca uma redução brusca no tamanho e no peso das gônadas, diminuindo os índices de IGS a valores parecidos com os do repouso. Nesta etapa, estágio de **regressão**, ocorre uma desorganização do tecido intersticial, o que se reflete em desorganização da estrutura lobular. Nota-se a presença de poucos cistos contendo células germinativas em várias fases de

desenvolvimento, e também o volume menor de espermatozóides. Mas, aparecem em número crescente as espermatogônias primárias, sem formar cistos.

Em relação à produção de hormônios sexuais em teleósteos, Nagahama (1982) apresenta uma revisão do assunto, indicando a existência de pelo menos quatro diferentes sítios celulares implicados na esteroidogênese testicular, dependendo da espécie estudada: as células intersticiais ou de Leydig, células de Sertoli, células germinativas e as células lobulares periféricas.

A interferência de que os grupos celulares funcionem como tecido endócrino produtor de esteróides nos testículos dos teleósteos, deve ter como base algumas análises. Dentre elas quais poderiam ser destacadas: a presença de enzimas hidroxisteróide-desidrogenases participantes da biossíntese hormonal, características ultra-estruturais típicas de células esteroidogênicas, além de alterações citológicas concomitantes em cada fase do ciclo reprodutivo do animal.

Em *Rhamdia quelen* foi possível detectar nos testículos, através de metodologia para verificação de atividade das esteróides desidrogenases, durante todo o ciclo de maturação gonadal, apenas um tipo celular localizado no compartimento intersticial. São as células intersticiais ou de Leydig, que possivelmente têm função endócrina esteroidogênica. Foi também o único tipo celular com reação positiva para Sudan Negro, na detecção de lipídios.

As células intersticiais localizadas como o nome diz, no compartimento intersticial testicular, isoladas ou em pequenos grupos, muitas vezes em íntima associação com capilares sangüíneos, ocorrem em diversas espécies de teleósteos (BARA, 1969, 1972; FUNK & DONALDSON, 1972, NAGAHAMA *et al.*, 1978, 1982), e apresentam características citológicas típicas das células intersticiais de vertebrados (GRIER, 1981).

A intensidade da reação para hidroxisteróide-desidrogenases é relacionada à natureza do substrato usado (BARA, 1969, 1972, 1974; WIEBE, 1969; TAKAHASHI & IWASAKI, 1973), ao cofator utilizado (BARA, 1969, 1972, 1974) e ao aceptor final de elétron (BARA, 1965, 1969).

A utilização de um mesmo substrato, mesmo cofator e aceptor final de elétrons durante todas as análises, permitem estabelecer comparações na intensidade da reação nas diferentes fases do ciclo reprodutivo.

A atividade enzimática para a  $\Delta^5$ -3 $\beta$ -hidroxisteróide desidrogenase, foi detectada através de métodos histoquímicos específicos nas células intersticiais. Houve variação de intensidade de reação durante o ciclo gonadal do jundiá. No estágio de **repouso e maturação** (início do período reprodutivo), a atividade enzimática é fraca. Mas, evolui com a espermatogênese passando a forte e atinge o pico máximo no estágio **maduro**. No estágio de **regressão**, diminui a intensidade de reação para moderada. No estágio de repouso a reação é considerada fraca. Assim em *Rhamdia quelen*, a atividade das células intersticiais, parece estar mais ligada ao período da reprodução propriamente.

Diversas enzimas envolvidas na biossíntese dos esteróides gonadais, principalmente as hidroxisteróide desidrogenases, têm sido testadas nos testículos de várias espécies de teleósteos. Essas enzimas nos diferentes peixes, ou próximos sistematicamente, ou ainda pertencentes a uma mesma região geográfica, podem apresentar modulações em sua atividade, em paralelo com as alterações germinativas durante os eventos da maturação testicular, sugerindo assim atividade funcional em uma ou mais fases do ciclo gonadal (BORGES, 1987).

A principal atividade da  $\Delta^5$ . 3 $\beta$ -hidroxisteróide desidrogenase nas células intersticiais foi observada no final do ciclo de maturação em *Gobius paganellus* (STANLEY *et al.*, 1965), *Cymatogaster aggregata* (WIEBE, 1969), *Fundulus heteroclitus*

(BARA, 1969), *Salmo gairdneri* (VAN den HURK *et al.*, 1978b) e em *Oncorhynchus nerka* e *O.mason* (SUFI *et al.*, 1980).

Em *Glossogobius olivaceus* as células intersticiais também apresentam intensa atividade da  $\Delta^5$ . 3 $\beta$ -hidroxiesteróide desidrogenase na época da reprodução, permanecendo contudo, com forte atividade também nos outros estádios do ciclo gonadal (ASAHIMA *et al.*, 1984).

As células intersticiais são reconhecidamente, o principal sítio de esteroidogênese testicular (NAGAHAMA, 1983), em uma série de teleósteos, como: *Fundulus heteroclitus* (BARA, 1969), *Carassius auratus* (YAMAZAKI & DONALDSON, 1969), *Brachidanio rerio* e *Poecilia latipinna* (VAN den HURK, 1973), *Oncorhynchus nerka* e *O.mason* (SUFI *et al.*, 1980) e em *Xyphophorus maculatus* (SCHREIBMAN *et al.*, 1982).

#### 4 - TECIDO INTERRENAL E CÉLULAS CROMAFINS

Com relação à glândula interrenal, pode-se dizer que, em peixes, inexistem glândulas adrenais típicas, tal como é conhecida nos tetrápodos. Homologamente a elas são encontrados dois tecidos: o tecido correspondente ao córtex adrenal dos mamíferos é chamado de glândula interrenal, enquanto o que refere-se à região medular é denominado tecido cromafim. Este cora-se pelas soluções de bicromato ou cloreto férrico, tornando-se marrom ou verde, respectivamente (MATTY, 1985).

Anatomicamente distintos, os dois tecidos têm origem embriológica diversa e secretam diferentes hormônios. O tecido cromafim tem origem na neuroectoderme e produz principalmente adrenalina e noradrenalina, embora peptídeos e outras aminas possam ser produzidas em teleósteos (REID *et al.*, 1995). O tecido interrenal origina-se a partir da mesoderme e produz adrecorticosteróides.

O tecido correspondente à região cortical e à região medular dos tetrápodos, estão localizadas na porção anterior do rim denominada rim cefálico, na maioria dos teleósteos. O rim cefálico corresponde à parte cefálica do mesonéfron, sendo composto na sua maior parte, de tecido hemocitopoiético e linfóide, podendo também ocorrer folículos tireoideanos (MATTY, 1985; CHESTER JONES & PHILLIPS, 1986).

A interrenal de mais de 100 espécies representantes de várias famílias de telósteos foram estudados por Nandi (1962; 1965). Os teleósteos compreendem um grupo grande e muito diversificado. E várias descrições têm mostrado uma variabilidade na morfologia da glândula interrenal e na sua relação de associação com outros tecidos (MILANO *et al.*, 1997).

Padrões comuns de distribuição da interrenal foram encontrados por Nandi (1962), os quais foram agrupados em quatro tipos. No tipo I, a interrenal está presente

ao redor da veia cardinal posterior ou em seus ramos maiores. No tipo II, a glândula interrenal é encontrada nas bordas dos ramos pequenos e médios das veias cardinais ou, ainda dispersa pelo rim cefálico ou anterior. No tipo III, a interrenal está associada ao seio venoso e aos tecidos linfóide e hemocitopoiético do rim cefálico. No tipo IV, o tecido interrenal forma uma massa sólida de células em determinada área do rim cefálico.

No rim cefálico de jundiá, de maneira semelhante a outros teleósteos, está presente o tecido interrenal associado ao tecido hemocitopoiético, entremeado entre túbulos e glomérulos renais. Os cordões de células poliédricas da interrenal, são encontrados ao redor dos ramos da veia cardinal posterior e dispersos pelo rim cefálico, sendo então do tipo II de acordo com a classificação de Nandi (1962).

A histologia da glândula interrenal dos peixes assemelha-se à glândula interrenal dos tetrápodos (MATTY, 1985; CHESTER JONES & PHILLIPS, 1986). A presença de colesterol, vesículas de lipídeos, ácido ascórbico e enzimas, como a glicose-6-fosfato de-hidrogenase e a delta 5-3 beta-hidroxi-esteróide de-hidrogenase, necessárias à corticosteroidogênese, foi constatada no tecido interrenal de várias espécies de teleósteos (CHESTER JONES & PHILLIPS, 1986).

A ultra-estrutura das células interrenais dos teleósteos segue o padrão das células da zona fasciculada do córtex da adrenal dos mamíferos, chamando a atenção a presença marcante retículo endoplasmático liso, do aparelho de Golgi desenvolvido, das grandes mitocôndrias com cristas tubulares e das freqüentes vesículas de lipídeos, características essas comuns às células secretoras de esteróides (CHESTER JONES & PHILLIPS, 1986).

A quantidade de tecido interrenal presente no rim cefálico dos peixes varia entre as espécies. Em *Puntius phutunio*, por exemplo, o tecido é escasso, ocorrendo como uma camada celular única ao redor dos ramos maiores das veias cardinais posteriores

(NANDI, 1965). Já em *Heteropneutes fossilis*, o tecido é muito desenvolvido, ocupando três quartos do rim cefálico, sendo praticamente, uma glândula circundada pelo tecido hemocitopoiético (BANERJI, 1971).

No jundiá a interrenal também é muito desenvolvida, ocupando grande parte do rim cefálico, dispersa entre túbulos e glomérulos renais, e tecido hemocitopoiético.

O tecido interrenal dos peixes pode apresentar variações em resposta à administração de hormônios, drogas e ao estresse de várias naturezas (MATTY, 1985).

O estresse a que o animal fica submetido na estação reprodutiva, por ocasião da migração e desova, tem como consequência mudanças degenerativas em vários órgãos, inclusive na interrenal, como ocorre em salmonídeos (McBRIDE & VAN OVERBEEKE, 1969; CHESTER JONES & PHILLIPS, 1986; McBRIDE *et al.*, 1986). Em espécies do gênero *Oncorhynchus*, o salmão do Pacífico, por exemplo, durante a migração para a desova ocorrem acentuadas e crescentes modificações na glândula interrenal. Estas incluem a hipertrofia do tecido, a hiperplasia celular e também a presença de áreas hemorrágicas e necróticas indicando exaustão tecidual (McHBRIDE & VAN OVERBEEKE, 1969; McBRIDE *et al.*, 1986). Para o *Piaractus mesopotamicus* (pacu) criados em cativeiro, onde o fenômeno da migração não ocorre, não observou-se hipertrofia ou hiperplasia em nenhuma fase do ciclo gonadal, apenas uma acentuada basofilia do tecido interrenal, durante o estágio de maturação e maduro (ANDRADE, 1993).

Através de estudos comparativos entre espécies migradoras e não migradoras, Robertson e Wexler (1960), concluíram que existem graus decrescentes de severidade das alterações do tecido interrenal, onde a menor intensidade foi observada nas espécies não migradoras.

Para o jundiá as modificações que ocorreram na interrenal foram em menor grau do que as descritas para salmonídeos, uma vez que não se trata de um peixe que

realiza migração propriamente dita. As variações ocorreram ao nível de grau de acidofilia do citoplasma, e presença de vacúolos em relação à fase do ciclo reprodutivo. Tanto em machos como em fêmeas o citoplasma vacuolizado ocorreu no período de reprodução, estágio maduro. Sendo que para fêmeas a maior acidofilia celular ocorreu no período do estágio de repouso.

O formato celular pode variar conforme a espécie em questão (NANDI, 1962), sendo que para o jundiá a definição dos limites das células poliédricas são mais bem definidos no repouso, e pouco definidos no período de reprodução.

A distribuição das células cromafins nos teleósteos varia com a espécie, podendo aparecer em grupos ou isoladas, sendo geralmente encontradas próximas às paredes da veia cardinal posterior, podendo estar ou não em íntima associação com a interrenal. (NANDI 1962; MATTY, 1985; MILANO *et al.*, 1997). São células poliédricas, maiores que as células da interrenal, com citoplasma claro, que algumas vezes pode se apresentar levemente basófilo. Estas células quando em contato com agentes oxidantes, como sais de cromo, adquirem uma cor característica, marrom-parda chamada reação cromafim.

Em algumas investigações de células cromafins em teleósteos, estas não foram identificadas nem mesmo por métodos histoquímicos, ou simplesmente não foram mencionadas. Milano *et al.* (1997) atribuem os poucos relatos a respeito, como decorrência do uso de técnicas pouco sensíveis ou pelo número de espécies estudadas ser pequeno, quando comparado ao número de espécies de teleósteos conhecidos

Mas, nos teleósteos já estudados as células cromafins quando localizadas, estavam presentes junto ao tecido renal, associadas ou não à interrenal e foram classificadas por Nandi (1962) em cinco tipos. A distribuição das células cromafins no *Rhamdia quelen* não se encaixa em nenhum dos tipos já classificados, uma vez que não estão associadas ao tecido renal propriamente. Encontram-se localizadas numa massa de tecido



adiposo que circunda parcialmente a região periférica do rim cefálico. Estão aí associadas a adipócitos, nervos, veias e artérias principalmente, e ao próprio tecido capsular renal.

Em cobras (*Xenodon merremii*) o tecido cromafim é claramente separado em duas porções: uma tomando a forma de cinta ou cordão, disposta longitudinalmente sobre a superfície da glândula adrenal, e a outra aparece entremeada no tecido adrenocortical. A primeira porção produz e secreta noradrenalina. A segunda contém e secreta adrenalina. Esta localização peculiar tem um fundamento bioquímico, onde a enzima responsável pela síntese de adrenalina, é dependente de altas concentrações de glicocorticóides adrenais (WASSERMANN & TRAMEZZANI, 1963; TRAMEZZANI & WASSERMANN, 1965).

Esta peculiar distribuição do tecido cromafim encontrada nos répteis (cobras, iguanas, lagartos, etc.) parece estar também presente no jundiá. Estudos sobre o conteúdo de adrenalina e noradrenalina nas células cromafins poderá esclarecer esta conformação anatômica.

Em *Rhamdia quelen* as células cromafins não estão associadas ao tecido interrenal. Tecido interrenal no interior do rim cefálico e tecido cromafim no exterior, ou seja dissociados, reduz a relação fisiológica entre esses tecidos. Atividades esteroidogênicas e aminérgicas são de fato ligadas por uma série de relações parácrinas (HANKE & KLOAS, 1995; REID *et al.*, 1995), que são também significativas em vertebrados inferiores (HANKE & KLOAS, 1995). Isso pode indicar primitivismo da glândula adrenal de teleósteos (MILANO *et al.*, 1997).

A estrutura da interrenal e sua relação com o sistema renal e vascular é visto como sendo dependente da evolução do peixe, porque esses órgãos mostram o mesmo arranjo em diversas ordens. A ocorrência de células cromafins tem sido observada em ordens de teleósteos filogeneticamente distantes, respectivamente, nas mais antigas como os

Salmonideos e nas mais recentes como os Perciformes (NELSON, 1994). O número de espécies investigadas é contudo pequeno para se levar em conta as características diversas entre os peixes teleósteos ou, algumas são tão raras que envolvem poucas ordens desses vertebrados (MILANO *et al.* 1997).

## 5 - O CICLO REPRODUTIVO E OS FATORES CLIMÁTICOS.

Baker (1938), em um dos trabalhos pioneiros relacionando o processo reprodutivo dos peixes e eventos sazonais, sugere que a época e o local da reprodução estão relacionados a dois grupos de fatores. Em linhas gerais, estes fatores são classificados como, diretos (próximos) os quais influem no desenvolvimento dos órgãos reprodutivos induzindo a reprodução nos adultos. E os fatores indiretos, como a abundância de alimento e condições favoráveis de crescimento, garantem a sobrevivência dos jovens.

Com relação aos animais adultos, são vários fatores ambientes apontados que influenciam as diferentes etapas do desenvolvimento gonadal (LAM, 1983). Dentre esses destacam-se, a temperatura e o fotoperíodo no desenvolvimento das gônadas, e a temperatura e enchentes/chuvas, na reprodução.

Nos salmonídeos a gametogênese ocorre, usualmente, no verão e a desova no inverno, sob baixas temperaturas. Por outro lado, nos ciprinídeos como a carpa e *Tinca tinca*, é necessária uma temperatura relativamente elevada para que ocorra a reprodução (BILLARD & BRETON, 1978). O ciclo reprodutivo de *Tinca tinca* em cativeiro é fortemente influenciado pela elevação da temperatura, que antecipa a reprodução (BRETON *et al.*, 1980a).

Em geral a elevação de temperatura e o fotoperíodo longo são fatores estimuladores da gametogênese nas espécies que desovam na primavera e no verão (GOTTFRIED & VAN MULLEN, 1967), mas influenciam inversamente aquelas que desovam no outono e no inverno.

Godinho (1972) observou que para *Pimelodus maculatus*, o início do ato reprodutivo parece estar condicionado, de uma maneira geral, a uma temperatura crítica.

Para Godoy (1975), a temperatura ideal para a reprodução natural do *P. Scrofa*, no Rio Mogi Guassú, em Cachoeira das Emas, está situada entre 22-28 °C.

Algumas espécies de teleósteos tropicais como *Clarias gariepinus* são incapazes de desovar em ausência de chuvas ou enchentes. Porém sua desova pode ser induzida pela simulação de enchentes, ou pelo aumento no nível da água dos tanques (BRUTON, 1979).

O desencadeamento da reprodução em *Tilapia leucostica* é influenciada pelo início das chuvas (HYDER, 1970a), assim como para o *Heteropneustes fossilis* (SUNDARARAJ & VASAL, 1976). Entretanto, em *Galaxias vulgaris*, a reprodução e índices pluviométricos não se correlacionam (CADAWALADER, 1976).

O aumento nos índices pluviométricos promove algumas alterações na dinâmica fluvial, sendo uma delas a elevação do nível d'água. Essa variável nível do rio, é também considerada de muita importância no processo reprodutivo dos teleósteos (AZEVEDO, 1972). Não são bem conhecidos, contudo, o mecanismo neuro-endócrino, e exatamente qual evento reprodutivo final, disparados ou potencializados pela chuva e pelas enchentes. Assim como não é estabelecido que fator específico ou fatores associados às chuvas estão envolvidos na estimulação da desova (LAM, 1983).

Nos peixes de piracema as migrações reprodutivas e desovas naturais, estão na dependência de estações do ano (principalmente primavera e verão), quando ocorrem as maiores elevações da temperatura do ar e da água, assim como, os maiores índices pluviométricos anuais.

Para o *Rhamdia quelen*, o início dos períodos reprodutivos durante os dois anos de coleta (1998/2000) não mostrou nenhuma correlação com os índices pluviométricos. Mas dentre os fatores ambientais analisados, a temperatura parece ter sido o

fator determinante tanto no desenvolvimento das gônadas como na reprodução, juntamente com o fotoperíodo.

O período reprodutivo coincide com os meses mais quentes do ano, correspondendo as mais altas temperaturas da água do tanque, que pode chegar a 31 °C no alto verão, em contraste com 8 °C no inverno. Concomitante, também é observado o maior fotoperíodo, que é de 13 horas e 45 minutos no verão, contra 10 horas e 14 minutos no inverno (BARCELLOS, *et al.*, 2001).

Esses dois fatores climáticos afetaram no jundiá, as concentrações de testosterona e 17  $\beta$ -estradiol, que aumentaram sincronicamente com a elevação da temperatura e fotoperíodo (BARCELLOS, *et al.*, 2001).

Muitas espécies de teleósteos, quando criadas em cativeiro, apresentam bloqueio no seu desenvolvimento gonadal, o que impede a maturação final e a liberação dos gametas (LIMA *et al.*, 1991). Em jundiás (*Rhamdia quelen*) criados em cativeiro isso não ocorre, mesmo em ambiente confinado, a reprodução ocorre de uma maneira normal, desde que os valores médios de temperatura da água, sejam mantidos acima de 18 °C. Na Estação de Piscicultura da Universidade de Passo Fundo obtêm-se facilmente, nos meses mais quentes do ano, desova nas fêmeas e espermição nos machos, através do método da indução hormonal (MEZZALIRA *et al.*, 1997).

## **CONCLUSÃO**

### **Hipófise**

1 – A hipófise do *Rhamdia quelen* pertence ao tipo “cranium-leptobasic”, da classificação de Bretschneider e Duyvené de Wit (1947).

2 - A hipófise de jundiá (*Rhamdia quelen*) é composta por duas regiões distintas microscopicamente, a neuro-hipófise (nervosa) que penetra e se ramifica por toda a adeno-hipófise (glandular).

3 – Com base nas características morfológicas e afinidade tintorial de suas células, a adeno-hipófise possui as seguintes regiões: “Rostral Pars Distalis”(RPD), anterior, “Proximal Pars Distalis” (PPD), mediana, e “Pars Intermedia” (PI), na região posterior da glândula.

4 – Com base nos métodos citológicos e histoquímicos foi possível identificar sete tipos celulares na adeno-hipófise.

5 - A “Rostral Pars Distalis” possui dois tipos celulares, um basófilo (Tipo I) e outro acidófilo (Tipo II). A “Proximal Pars Distalis”, também apresenta dois tipos celulares distintos, um tipo basófilo (Tipo I) e outro acidófilo (Tipo II). A “Pars Intermedia” possui três tipos celulares: basófilo (Tipo I), acidófilo (Tipo II) e cromófobo (Tipo III).

6 – As células basófilas (Tipo I) da “Proximal Pars Distalis” provavelmente são as células gonadotróficas, pois foi o único tipo celular a apresentar material de natureza glicoprotéica no citoplasma.

### **Ovário**

1 – O desenvolvimento dos oócitos de *Rhamdia quelen* seguem o padrão normal encontrado para muitas espécies de teleósteos e apresentam ovário do tipo assincrônico, com desovas parceladas.

2 – Os valores de IGS sugerem correlação com os estádios da oogênese e maturação sexual das fêmeas, isto é, os valores aumentam ou diminuem de acordo com o estágio da reprodução.

3 – Durante o período reprodutivo, podem ser caracterizadas nas fêmeas adultas, com base no desenvolvimento gonadal, quatro fases principais: repouso, maturação, maduro e regressão.

4 – Nos animais imaturos os ovários se assemelham microscopicamente aos ovários dos adultos em fase de repouso, sendo no entanto, menores.

5 - Ao longo do período reprodutivo, podem ser encontrados cinco tipos de oócitos na linhagem germinativa: oogônia, oócito cromatina nucleolar, oócito perinucleolar, oócito cortical-alveolar e oócito vitelogênico.

6 – Para a espécie *Rhamdia quelen* as células foliculares do oócito maduro apresentam-se hipertrofiadas com relação às células foliculares dos outros oócitos e com características de células sintetizadoras de proteína.

7 – Para a espécie foram identificadas a presença de oócitos atrésicos e folículos pós-ovulatórios. Os oócitos atrésicos aparecem nos estádios de pós-desova e regressão. Os folículos pós-ovulatórios surgem logo após a desova e apresentam características de células secretoras, podendo ser sintetizadores de esteróides.

8 – O primeiro vitelo depositado no oócito cortical-alveolar é de natureza lipídica. No oócito maduro há presença de vitelo de duas naturezas: lipídica e glicoproteica.

9 - Podem ocorrer ovotestis em animais desta espécie.



### Testículo

1 – Os testículos do *Rhamdia quelen* pertencem ao tipo lobular e espermatogonial irrestrito, de acordo com a classificação proposta por Grier (1981).

2 - Os valores de IGS sugerem correlação com os estádios da espermatogênese e maturação sexual dos machos, isto é, os valores aumentam ou diminuem de acordo com o estágio da reprodução.

3 – Nos machos imaturos os testículos se assemelham microscopicamente aos dos adultos em fase de repouso, mas são menores.

4 – Distinguem-se nos testículos do *Rhamdia quelen* seis tipos de células germinativas: espermatogônia primária, espermatogônia secundária, espermatócito primário, espermatócito secundário, espermatíde e espermatozóide.

5 – O testículo do jundiá apresenta como unidade o lóbulo, dentro do qual encontra-se uma série de cistos germinativos onde desenvolve-se a espermatogênese. As células presentes em um cisto estão todas na mesma fase de desenvolvimento. O único tipo celular que não é encontrado formando cistos são os espermatozoides, e esta mesma conformação nas espermatogônias é menos freqüente.

6 – O período reprodutivo nos machos pode ser caracterizado, com base no desenvolvimento gonadal em quatro fases principais: repouso, maturação, maduro e regressão, dentro das quais cabem subdivisões.

7 – Os machos apresentam um período de repouso curto quando comparado às fêmeas da mesma espécie. Este período só ocorre em meados do mês de julho, quando as temperaturas são muito baixas.

8 – As células intersticiais ou de Leydig, encontradas na região intersticial dos lóbulos testiculares, possuem atividade delta-5-3-beta-hidroxiesteróide

desidrogenase. E a maior intensidade enzimática esteroidogênica coincide com os estádios de maduro e regressão. Há presença de lipídios no citoplasma dessas células.

9 – Foram identificadas células de Sertoli na região lobular dos testículos, delineando internamente a periferia dos lóbulos germinativos.

10 – Foram encontradas células mióides ao redor dos lóbulos germinativos, porém nem sempre foram observadas envolvendo totalmente os lóbulos.

### **Interrenal e células cromafins**

1 - A glândula interrenal encontra-se no rim cefálico em meio ao tecido renal e hemocitopoiético. É do tipo II da classificação de Nandi (1962), uma vez que é encontrada ao redor de ramos da veia cardinal posterior e dispersa pelo tecido do rim cefálico.

2 – Não foram observadas, em machos e fêmeas, hipertrofia ou hiperplasia do tecido interrenal em função do ciclo gonadal.

3 - As células do tecido interrenal de ambos os sexos, apresentaram no estágio maduro citoplasma com maior vacuolização e menor acidofilia, comparativamente aos animais no estágio de repouso.

4 - Interrenal e células cromafins foram encontradas dissociadas.

5 - As células cromafins encontram-se na região externa, no tecido que circunda o rim cefálico, associadas ao tecido adiposo, vasos (principalmente artérias), nervos e conjuntivo capsular.

6 – O tecido cromafim não se encaixa em nenhuma das classificações sugeridas para teleósteos.

### **Ciclo reprodutivo e fatores ambientais**

1 – O período de reprodução do *Rhamdia quelen* estende-se de outubro a março, primavera e verão, ocorrendo desovas repetidas principalmente de novembro a fevereiro.

2 – A espécie apresenta um período de repouso, restrito aos meses mais frios do ano, junho e julho para as fêmeas, e nos machos, um período mais curto, que ocorre em meados de julho.

3 – Principalmente a temperatura e o fotoperíodo são fatores determinantes no ciclo reprodutivo da espécie *Rhamdia quelen*.

## **REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

- ANAND, T.C.; SUNDARARAJ, B.I. Ovarian maintenance in the hypophysectomised catfish, *Heteropneustes fossilis* (Bloch) with mammalian hypophyseal and placental and gonadal steroids. **Gen. Comp. Endocrinol.**, New York, v.22, p.154-168, 1974.
- ANDRADE, D.R. Variação cíclica anual da espermatogênese em *Leporinus silvestrii* (Boulenger, 1902) peixe, Teleosteo. Belo Horizonte, Universidade Federal de Minas Gerais, 1980.
- ANDRADE, R.G.F. **Histofisiologia das glândulas hipófise e interrenal. Dosagens plasmáticas de esteróides em fêmeas adultas de *Piaractus mesopotamicus* (Holmberg, 1887), Pisces, Teleostei.** São Paulo, 1993. 125p.. Tese (Doutorado em Ciências) – Universidade de São Paulo.
- ARANA, S. **Caracterização citoquímica e identificação imunocitoquímica dos tipos celulares da adeno-hipófise da manjuba, *Anchoviella lepidentostole*, (FORLER, 1911) (OSTEICHTHYES, EUGRAULIDAE).** São Paulo, 1992. 69p. Dissertação (Mestrado). Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo.
- ARCAND-HOY, M.I.; BENSON, W.H. Fish Reproduction: An ecologically relevant indicator of endocrine disruption. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v.17, p.49-57, 1998.
- ASAHIMA, K.; et al. Relationship between the structures and steroidogenic functions of the testis of the Urohaze-gobi (*Glossogobius olivaceus*). **Gen. Comp. Endocrinol.** New York, v. 57, p. 281-292, 1984.
- AZEVEDO, P. Principais peixes das águas interiores de São Paulo, hábitos de vida. In: Comissão Inter-Estadual da Bacia Paraná-Uruguai. **Poluição e Piscicultura.** São Paulo, Fac. de Saúde Pública da USP e Instituto de Pesca. P. 109-112, 1972.
- BAKER, J.R. The evolution of breeding seasons. In: BEER, G.R., ed. **Evolution.** London. Oxford Univ. Press. p. 161-177, 1938.
- BALINSKI, B.I. **An Introduction to Embriology.** 4 ed., London, Saunders, 1981.
- BANCROFT, J.D. Enzyme Histochemistry. In: **Theory and Practice of Histological Techniques.** Eds. BANCROFT, J.D.; STEVENS, A, 4<sup>a</sup> ed. Ed. Churchill Livingstone, New York, 1996, p. 391-410.
- BANERJI, T.K. A comparative histological investigation on the interrenal gland of some Indian teleosts. **Ant. Anz.**, v. 133, p.20-32, 1971.
- BARA, G. Histochemical localization of  $\Delta^5$ -3 $\beta$ -hydroxy-steroid dehydrogenase in the ovaries of a teleost fish *Scomber scomber* L. **Gen. Comp. Endocrinol.**, New York, v. 5, p. 284-296, 1965.
- BARA, G. Histochemical demonstration of 3 $\beta$  -, 3  $\alpha$ , 11, and 17 – hidroxysteroid dehydrogenases in the testis of *Fundulus heteroclitus*. **Gen. Comp. Endocrinol.**, New York, v. 13, p.189-200, 1969.

- BARA, G. Location of steroid hormone production in ovary of *Trachurus mediterraneus*. **Acta Histochem.**, v. 51, p. 90-101, 1974.
- BARA, G. Histochemistry of hidroxysteroid dehydrogenases in testis, adrenocortical tissues, and corpuscles of Stannius of *Pseudopleuronectes americanus*. **Acta Histochem.** Jena, v. 44 p. 333-347, 1972.
- BARBIERI, M.C.; BARBIERI, G.; MARINS, M.A. Anatomy and histology of the testicle of *Geophagus brasiliensis* at the Lobo Dam. **Revta Bras. Biol.**, Rio de Janeiro, v. 41 (1), p. 164-174, 1981.
- BARCELLOS, L.G.; et al. Steroid profiles in culture female jundiá, the Siluridae *Rhamdia quelen* (Quoy and Gaimard, Pisces Teleostei), during the first reproductive cycle. **Gen. Comp. Endocrinol.** New York, v. 121, p. 325-332, 2001.
- BATTEN, T.F.C. Immunocytochemical demonstration of pituitary cell types *Poecilia latipinna*, by light and electron microscopy. **Gen. Comp. Endocrinol.** New York, v. 63, p. 139-154, 1986.
- BERN, H.A. Prolactin and osmoregulation. **Am. Zool.**, v. 15, p. 937-949, 1975.
- BILLARD, R.; BRETON, B. Rhythms of reproduction in teleost fish. In: THORPE, J.E., ed. Thorpe, ed. New York, Academic Press. p. 33-53, 1978.
- BILLARD, R.; et al. The endocrine control of spermatogenesis in teleost fish. **Can. J. Fish. Aquat. Sci.**, v. 29, p. 65-79, 1982.
- BILLARD, R.; JALABERT, B.; BRETON, B. Les cellules de Sertoli des Poissons téléostéens. I – Étude ultras-structurale. **Annls anim. Biochim. Biophys.**, Paris, v.12 (1), p.19-32, 1972.
- BISHT, J.S. Seasonal histological changes in the testes of a hill-stream teleost, *Schizotorax richardsonii* (Gray/Hard). **Acta Anat.**, Basel, v. 88, p. 398-410, 1974.
- BOCKAMANN, F. **Análise filogenética da família heptapteridae (Teleostei, Ostariophysi, Siluriformes) e redefinição de seus gêneros.** São Paulo, 1998, 110p. Tese (Doutorado em Ciências). Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo.
- BORELLA, M.I. **Observações morfológicas e citoquímicas sobre a adeno-hipófise de curimatá, *Prochilodus scrofa* Steindachner, 1881. Estudo morfométrico das células gonadotrópicas.** São Paulo, 1987. 78p. Dissertação (Mestrado). Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo.
- BORELLA, M.I. **Caracterização bioquímica parcial e imunocitoquímica do hormônio liberador de gonadotropina (GnRH) no encéfalo e imunocitoquímica dos hormônios gonadotróficos e do GnRH na hipófise do pacu (*Piaractus mesopotamicus*, Pisces, Teleostei).** São Paulo, 1993. 63p. Tese (Doutorado). Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São paulo.

- BORGES, O. F. **Caracterização dos estádios de maturação e correlação com avaliações histoquímico-enzimáticas e ultra-estruturais das células endócrinas testiculares, durante o ciclo reprodutivo do *Prochilodus scrofa* – Steindachner.** São Paulo, 1987. 234p. Tese (Doutorado em Ciências) – Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo.
- BRADLEY, J.T.; GRIZZLE, J.M. Vitellogenin induction by estradiol in channel catfish, *Ictalurus punctatus*. **Gen. Comp. Endocrinol.**, New York, v.73, p.28-39, 1989.
- BRAEKEVELT, C.R.; McMILLAN, D.B. Cyclic changes in the ovary of the Brook Stickleback *Eucalia inconstans* (Kirtland). **J. Morph.**, v. 123, p. 373-396, 1968.
- BRETON, B.; et al. Temperature and reproduction in tench: Effect of a rise in the annual temperature regime on gonadotropin level, gametogenesis and spawning. I. The male. **Reprod. Nutr. Dev.**, v. 20, p. 105-118, 1980a.
- BRETSCHNEIDER, L.H.; DUYVENÉ DE WIT, J.J. Sexual endocrinology of nonmammalian vertebrates. **Monog. Prog. Res. Holland During War**, Amsterdam, v. 11, p. 146-148, 1947.
- BRUTON, M.N. The breeding biology and early development of *Clarias gariepinus* (Pisces: Clariidae) in the Keibaya, South Africa, with a review of breeding in species of the subgenus (*Clarias*). **Trans. Zool. Soc.**, London, v. 35, p. 1-45, 1979.
- BRY, C. Plasma cortisol levels of female rainbow trout (*Salmo gairdneri*) at the end of the reproductive cycle. Relation with oocyte stages. **Gen. Comp. Endocrinol.**, New York, v.57, p.47-52, 1985.
- BULLOUGH, W.S. A study of reproductive cycle of minnow in relation to environment. **Proc. Zool. Soc. Lond.** London, v. 109, p. 79-102, 1939.
- BURZAWA-GERARD, E. Chemical data on pituitary gonadotropins and their implications to evolution. **Canad. J. Fish. Aquatic. Sci.**, 39. P.80-91, 1982.
- BURZAWA-GERARD, E. Purification d'une hormone gonadotrope hypophysaire de poisson téléostéen, la carpe (*Cyprinus carpio* L.). **Biochimie**, v.53. p.545-52, 1971.
- CADAWALADER, P.L. Breeding biology of a nondiadromous Galaxiid, *Galaxias vulgaris* Stokell, in a New Zealand river. **J. Fish Biol.**, Huntingdon, v. 8, p. 157-177, 1976.
- CALVO, J.; DADONE, L. Fenómenos reproductivos en el Pejerrey (*Basilichthys bonariensis*). I – Escala y tabla de madurez. **Rev. Mus. La Plata**, v. 12 (102), p.153-165, 1972.
- CAMBRÉ, M. L.; et al. Immunocytochemical identification and localization of the different cell types in the pituitary of the seabass (*Dicentrarchus labrax*). **Gen. Comp. Endocrinol.**, New York, v.61, p.368-75, 1986.

- CAMPBELL, C.M.; IDLER, D.R. Hormonal control of vitellogenesis in hypophysectomized winter flounder (*Pseudopleuronectes americanus*. Walbaum). **Gen. Comp. Endocrinol.**, New York, v.28, p. 145-150, 1976.
- CHANG, J. P.; et al. Effects of catecholaminergic agonists and antagonists on serum gonadotropin concentrations and ovulation in goldfish: evidence for specificity of dopamine inhibition of gonadotropin secretion. **Gen. Comp. Endocrinol.**, New York, v.55. p.351-60, 1984.
- CHARIPPER, H.A. The morphology of the hypophysis in lower vertebrates particularly fish and amphibia, with some notes on the cytology of the pituitary of *Carassius auratus* (the goldfish) and *Necturus maculosus* (the mudpuppy) – **Symp. Quant. Biol.**, v. 5, p. 151-164, 1937.
- CHESTER JONES, I.; PHILLIPS, J. G. The adrenal and interrenal gland. In: PANG, P. K. T.; SCHREIBMAN, M. P. eds. **Vertebrate endocrinology: fundamentals and biomedical implications**. New York, Academic Press. 1986. v.1, p.319-350, 1986.
- COOK, A. F., STACEY, N. E.; PETER, R. E. Perioviulatory changes in serum cortisol levels in the goldfish, *Carassius auratus*. **Gen. Comp. Endocrinol.**, New York, v.40, p.507-10, 1980.
- COPELAND, P. A.; THOMAS, P. Isolation of gonadotropin subunits and evidence for two distinct gonadotropins in Atlantic croaker (*Micropogonias undulatus*). **Gen. Comp. Endocrinol.**, New York, v.91, p.115-25, 1993.
- COUPLAND, R.E. The chromaffin system. In: BLASCO, H.; MUSCHOLL, E. Eds. **Handbook of Experimental Pharmacology**, v.33. Catecholamines. Berlin: Springer, p. 16-45, 1972.
- COUPLAND, R.E. **The natural history of the chromaffin cell**. London: Longman, 1965.
- CRAIG-BENNET, A. The reproductive cycle of three spined stickle back *Gasterosteus aculeatus*. **Phil. Trans. R. Soc.** London, v. 219, p. 197-279, 1931.
- CRIM, L.W.; WATTS, E.G.; EVANS, D.M. The plasma gonadotropin profile during sexual maturation in a variety of salmonid fishes. **Gen. Comp. Endocrinol.**, New York, v.27, p.62-70, 1975.
- CYR, D.G.; EALES, J.G. Interrelationship between thyroidal and reproductive endocrine systems in fish. **Reviews in Fish Biology and Fisheries.**, v.6, p. 165-200, 1996.
- DADZIE, S. Spermatogenesis and the stages of maturation in the male cichlid fish. *Tilapia mossambica*. **J. Zool.** London, v. 159, p. 399-403, 1969.
- DE VLAMING, V.L. Actions of prolactin among the vertebrates In: BARRINGTON, E.J.W. Ed. **Hormones e Evolution**. London Acadimec Press, v. 2, p.561-642, 1979.
- DIXIT, R.K.; AGRAWALA, N. Seasonal studies on the adrenal homologue of female *Puntius sophore* (Ham). **Acta anat.**, v.93, p.344-350, 1975.



- DONALDSON, E.M. The pituitary-interrenal axis as an indicator of stress in fish. In: PICKERING, A.D., ed. **Stress and fish**. London, Prentice-Hall, p. 11-47, 1981.
- FANTODJI, A.; FOLLENIUS, E.; NDIAYE, S. Immunocytochemical of gonadotropic cells in the pituitary of *Pomadasys jubelini* (Teleost fish). **Gen. Comp. Endocrinol.**, New York, v.79, p.439-45, 1990.
- FITZPATRICK, M. S.; PEREIRA, C.B.; SCHRECK, C.B. In vitro steroid secretion during early development of mono-sex rainbow trout: sex differences, onset of pituitary control, and effects of dietary steroid treatment. **Gen. Comp. Endocrinol.**, New York, v.91, p.199-215, 1993.
- FOLEY, J.O. The spermatogenesis of *Umbria limi* with special reference to the behavior of the spermatogonial chromosomes in first maturation division. **Biol. Bull. Mar. Biol. Lab.**, Woods Hole, v. 50, p. 117-140, 1926.
- FONTAINE, Y. A.; DUFOUR, S. Currents status of LH-FSH like gonadotropin in fish. In: **Proceedings of the third international symposium on reproductive physiology of fish**. St. Johns, 1987, Resumos. p.48-56.
- FOSTIER, A.; JALABERT, B.; BILLARD, R.; BRETON, B. & ZOHAR, Y. The Gonadal Steroids. In: HOAR, W.S., RANDALL, D.J., DONALDSON, E.M. Eds. **Fish Physiology**. New York, Academic Press. v. 9A, p. 277-372, 1983.
- FUNK, J.D.; DONALDSON, E.M. Introduction of precocious sexual maturity in male pink salmon *Oncorhynchus gorbuscha*. **Can. J. Zool.** Ottawa, v. 50, p. 1413-1419, 1972.
- GARCIA-HERNÁNDEZ, M.P.; et al. Isolation and characterization of two distinct gonadotropins from the pituitary gland of mediterranean yellowtail, *Seriola dumerilii* (Risso, 1810). **Gen. Comp. Endocrinol.** New York, v. 106, p. 389-399, 1997.
- GIACOMINI, E. Sulla esistenza della sostanza midollari nelle capsule surrenale del Teleostei. **Monit Zool. Ital.** v.13, p.183-189, 1902.
- GODINHO, H. M. **Contribuição ao estudo do ciclo reprodutivo de *Pimelodus maculatus* Lacépède, 1803. (Pisces, Siluroidei) associado a variações morfológicas de ovário e a fatores abióticos.** São Paulo, 1972. 94p. Tese (Doutorado em Ciências) – Departamento de Histologia e Embriologia do Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo.
- GODOY, M.P. **Peixes do Brasil.** Subordem Charocoidei. Bacia do Rio Mogi-Guaçu. Piracicaba, Franciscana, v. 1-4, 1975.
- GOETZ, F. Hormonal control of final maturation and ovulation in fishes. In: HOAR, W. S. ; RANDALL, D. J. ; DONALDSON, E. M. Eds. **Fish Physiology**. New York, Academic Press, v. 9B, p.117-70, 1983.
- GORBMAN, A. Evolutionary morphology of endocrine glands. In: PANG, P. K. T.; SCREIBMAN, M. P. eds. **Vertebrate endocrinology: fundamentals and biomedical implications**. New York, Academic Press, v.1, p.465-77, 1986.

- GOSWAMI, S.V.; LAMBA, V.I.; SUNDARARAJ, B.I. Gonadotropin induced oocyte maturation in the catfish, *Heteropneustes fossilis* (Bloch) requires steroidogenesis in both interrenal and ovarian. **Gen. Comp. Endocrinol.**, New York, v.57, p.53-63, 1985.
- GOTTFRIED, H.; VAN MULLEM, P.J. On the histology of the interstium and the occurrence of steroids in the stickleback *Gasterosteus aculeatus* L. Testis. **Acta Endocr.** Copenhagen, v. 56, p. 1-15, 1967.
- GRESIK, E.W. Homologs of Leydig and Sertoli cells in the testis of the teleosts *Oryzias latipes*. **Gen. Comp. Endocrinol.**, New York, v. 21, p.210-213, 1975.
- GRESIK, E.W.; QUIRK, J.G.; HAMILTON, J.B. A fine structural and histochemical study of the Leydig cell in the testis of the teleost. *Oryzias latipes* (Cyprinodontiformes). **Gen. Comp. Endocrinol.**, New York, v. 13, p.189-200, 1975.
- GRIER, H.J. Aspects of germinal cyst and sperm development in *Poecilia latipinna* (Teleostei – Poeciliidae). **J. Morph.**, v. 146, p.229-250, 1975.
- GRIER, H.J. Cellular organization of the testis and spermatogenesis in fishes. **Amer. Zool.**, Utica, v. 21, p.345-357, 1981.
- GRIER, H.J. Sperm development in the teleosts *Oryzias latipes*. **Cell. Tissue Res.**, Berlin, v. 168, p.419-31, 1976.
- GRIER, H.J. **The Sertoli Cell.** L.D. Russel & M.D. Griswold, eds. Cache River Press, Clearwater, Florida, 1993.
- GRIER, H.J.; FITZSIMONS, J.M.; LINTON, J.R. Structure and ultrastructure of the testis and sperm formation in Goodeid teleost. **J. Morph.**, v. 156, p.419-438, 1978.
- GRIER, H.J.; LINTON, J.R. Ultrastructural identification of the Sertoli cell in the testis of the Northern pike, *Esox lucius*. **Am. J. Anat.**, Baltimore, v.149, p.283-288, 1977.
- GRIER, H.J.; LINTON, J.R.; LEATHERLAND, J.F.; VLAMING, L. Structural evidence for two different testicular types in teleosts fishes. **Am. J. Anat.**, Baltimore, v. 159, p.331-345, 1980.
- GURAYA, S.S. Follicular atresia. Proc. Gold. Jubil. Symp. Perfect. Reprod. Physiol. Female. **Dehli Uni. Proc. Indian Natl. Sci. Acad.**, v. 39B, p. 311-332, 1973.
- GURAYA, S.S. Recent advances in the morphology, histochemistry, and biochemistry of steroid-synthesizing cellular sites in the testes of nonmammalian vertebrates. **Int. Rev. Cytol.**, v. 44, p.365-409, 1976a.
- HADLEY, MAC E. **Pituitary hormone.** In: **Endocrinology.** New Jersey, Prentice Hall. p. 85-112, 1984.
- HANKE, W.; KLOAS, W. Comparative aspects of regulations and function of the adrenal complex in different groups of vertebrates. **Horm. Metab. Res.**, v.27, p. 389-397, 1995.

- HANN, H.W. The histology of a germ cells of *Cottus baiardii* Girard. **J. Morphol.** Philadelphia, v. 43, p. 427-497, 1972.
- HART, D.M. Hydroxysteroid dehydrogenase activity in normal human placenta from six weeks to forty-two weeks of gestation. **J. Endocrinol.**, v. 35, p. 255-262, 1966.
- HARVEY, B.J.; HOAR, W.S. **La reproduction provoquée chez les poissons: Théorie et pratique.** Centre de Recherches pour le Développement International. Ottawa, Canada. 1980. 48 p.
- HENDERSON, N.E. The annual cycle in the testis of the eastern brook trout *Salvelinus fontinalis* (MITCHILL). **Can J. Zool.**, Ottawa, v. 40 p. 631-641, 1962.
- HOAR, W.S. Reproduction in teleost fish. In: Comparative Physiology of Reproduction. **Mem. Soc. Endocrin.**, v. 4, p. 5-24, 1955.
- HOAR, W.S. Reproduction. In: In: HOAR, W.S.; RANDALL, D. **J. Fish physiology.** New York, Academic Press, v.3, p. 117-158, 1969.
- HOAR, W.S. Reproduction and growth bioluminescence, pigments and poisons. In: In: HOAR, W.S.; RANDALL, D. **J. Fish physiology.** New York, Academic Press, v.3, p.1-59, 1969.
- HOAR, W.S.; RANDALL, D.J.; DONALDSON, E.M. Reproduction In: HOAR, W.S.; RANDALL, D.J. **Fish physiology.** London: Academic Press, v. 9 A, 1983.
- HOOLI, M.A.; NADKARNI, V.B. Functional morphology of the interrenal and chromaffin cells in the teleosts *Rasbora daniconius* (Hamilton); *Barbus stigma* (Cuv. Et Val.) and *Channa gachua* (Hamilton). **Acta Anat.**, v. 93, p.367-375, 1975.
- HOYER, P.E.; ANDERSEN, H. Histochemistry of 3 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase in rat ovary. **Histochemistry.** Berlin, v. 51, p. 167-193, 1977.
- HURK, R.V.D.; PEUTE, J.; VERMEIJ, J.A.J Morphological and enzyme cytochemical aspects of the testis and vas deferents of the rainbow trout, *Salmo gairdneri*. **Cell. Tissue Res.**, v. 186, p. 309-325, 1978.
- HYDER, M. Histological studies on the testis of *Tilapia leucosticta* and other species of the genus *Tilapia* (Pisces Teleostei). **Trans. Am. Microsc. Soc.** Lancaster, v. 88, p. 221-231, 1969.
- HYDER, M. Histological studies on the testis of pond specimens of *Tilapia nigra* (Gunther) (Pisces: Cichlidae) and their implications of the pituitary-testis relationship. **Gen. Comp. Endocrinol.** New York, v. 14, p. 179-184, 1970a.
- JAFRI, S.I.H.; ENSOR, D.M. Cell types in the pituitary of the roach, *Rutilus rutilus* (L.), (Teleostei). **J. Anat.**, v. 130J, p. 667-672, 1980.

- KAGAWA, H.; TAKANO, K.; Ultrastructure and histochemistry of granulosa cells of pre and pos-ovulatory follicles in the ovary of the medaka *Oryzias latipes*. **Bull. Fac. Fish.**, Hokkaido Univ., v. 30, p. 191-204, 1979.
- KAGAWA, H.; TAKANO, K.; NAGAHAMA, Y. Correlation of plasma estradiol-17 $\beta$  and progesterone levels with ultrastructure and histochemistry of ovarian follicles in the white-spotted char, *Salvelinus leucomaenis*. **Cell. Tissue Res.**, v. 218, p. 315-329, 1981.
- KAWAUCHI, H.; et al. The duality of teleost gonadotropins. **Fish Physiol. Biochem.**, v.7, p.29-38, 1989.
- KHOO, K.H. The corpus luteum of goldfish (*Carassius auratus* L) and its functions. **Can. J. Zool.**, v. 53, p. 1306-1323, 1975.
- KOBAYASHI, M.; AIDA, K; HANYU, I. Involvement os steroid hormones in the preovulatory gonadotropin surge in female goldfish.. **Fish Physiology Biochemistry.**, v. 7, p. 141-146, 1989.
- LAM, T.J. Environmental influences on gonadal activity in fish. In: HOAR, W.S.; RANDALL, D.J. **Fish physiology**. New York, Academic Press, v. 9B, p.65-116, 1983.
- LAMBA, V. J., GOSWAMI, S. V.; SUNDARARAJ, B. I. Circannual and circadian variations in plasma levels of steroids (cortisol, estradiol-17beta, estrone, and testosterone) correlated with the annual gonadal cycle in the catfish, *Heteropneustes fossilis* (Bloch). **Gen. Comp. Endocrinol.**, New York, v.50, p.205-25., 1983.
- LANCE, V.J.; CALLARD, I.P. Hormonal control of ovarian steroidogenesis in nomammalian vertebrates. In: JONES, R.E., Ed. **The vertebrate ovary.**, Plenum, New York, p. 361-407, 1978.
- LEHRI, G.K. The annual cycle in the testes of the catfish *Clarias batachus* (Limm.). **Acta. Anat.**, Basel, v. 69, p. 105-124, 1967.
- LIMA, R.V.S.; et al. Tecido germinativo ovariano e ciclo reprodutivo de pacus (*Piaractus mesopotamicus* Holmberg, 1887) mantido em cativoiro. **Bol.Tec. CEPTA**, v. 4, p. 1-65, 1991.
- LISON, L. **Histochimie animale**: méthodes et problèmes. Paris, 3éme ed., Gauthier-Villars, v.2, p. 398-842, 1960.
- MACMANUS, J.F.A. Histological demostnation of mucin after periodic acid. **Nature**, v.158, p. 202, 1946.
- MACMANUS, J.F.A.; CASON, J.E. Carbohydrate histochemistry studied by acetylation techniques. I. Periodic acid methods. **J. Exp. Med.**, v.91, p. 651-654, 1950.
- MARSHALL, A.J.; LOFTS, B. The Leydig-cell homologue in certain teleost fishes. **Nature**. London, v. 177, p. 704-705, 1956.
- MARZA, V.D. Histophysiologie de L'Ovogenèse. Paris: Hermann. 1938.

- MATTY, A. J. The adrenal and the kidney hormones. In: MATTY, A. J. **Fish Endocrinology**, London. Croom Helm. p.112-137. 1985.
- McBRIDE, J.R.; et al. Changes in structure of tissues and in plasma cortisol during the spawning migration of pink salmon, *Oncorhynchus gorbuscha* (Walbaum). **J. Fish Biol.**, v.29, p. 153-165, 1986.
- McBRIDE, J.R.; VAN OVERBEEKE, A.P. Hypertrophy of the interrenal tissue in sexually maturing sockeye Salmon (*Oncorhynchus nerka*) and the effect of gonadectomy. **J. Fish. Research. Bd. Canada**, v. 26, p. 2975-2985, 1969.
- MEZZALIRA, R.M.; FIORESE, I; ITTZÉS, I. Jundiá: Uma espécie nativa com tecnologia dominada. **Panorama da Aqüicultura**. Rio de Janeiro, v. 11 (63), p. 12-16, 1997.
- MILANO, E.G. BASARI, F. CHIMENTI, C. Adrenocortical and adrenomedullary homologs in eight species of adult and developing teleosts: Morphology, histology, and immunohistochemistry. **Gen. Comp. Endocrinol.** New York, v. 108: (3), p. 483-496, dez 1997.
- MOSER, H.G. Seasonal histological changes in the gonads of *Sebastes paucispinus* Ayres, an ovoviviparous teleosts (Family Scorpaenidae). **J. Morph.**, v. 123, p.329-354, 1967.
- MOSER, H.C.; HELLER, C.G. Improvements in technique for the histochemical demonstration of  $3\beta$  and  $17\beta$  hydroxysteroid dehydrogenase in human testis. **Histochemie**. Berlin, v.35, p. 331-339, 1973.
- NAGAHAMA, Y. Role of steroid hormones in gonadal growth and maturation in teleosts. In: **Proceeding of a Symposium International Fish Physiology, Fish toxicology and Fisheries management**. Guangzhou, 1988. Resumos. p.46-51.
- NAGAHAMA, Y. The functional morphology of teleost gonads. **Fish Physiology**. v. 9A, p. 223-275, 1993.
- NAGAHAMA, Y. The functional morphology of teleost gonads. In: W.S. Hoar; D. J. Randall; E. M. Donaldson. Eds. **Fish Physiology**. New York: Academic Press, v. 9A, p.37-125, 1983.
- NAGAHAMA, Y.; CLARKE, W.C.; HOAR, W.S. Ultrastructure of putative steroid-producing cells in the gonads of coho (*Oncorhynchus kisutch*) and pink salmon (*O. gorbuscha*). **Can. J. Zool.**, Ottawa, v. 56, p.2508-19, 1978.
- NAGAHAMA, Y.; et al. Some endocrines factors affecting the development of seawater tolerance during the parr-smolt transformation of the amago salmon *Oncorhynchus rhodurus*. **Aquaculture**. Amsterdam, v. 28, p. 81-90, 1982.
- NAGLER, J.J.; IDLER, D.R. *In vitro* ovarian estradiol- $17\beta$  and testosterone responses to pituitary extract and corresponding serum levels during the prespawning to vitellogenic phases of the reproductive cycle in winter flounder (*Pseudopleuronectes americanus*). **Comp. Biochem. Physiol.** v. 101, p.65-75, 1992.

- NAIR, P.V. Studies on the male reproductive system of some siluroid fishes *Rita rita* and *Mystus vitattus*. **Indian J. Zoot.**, v. 4, p. 37-62, 1966.
- NANDI, J. The structure of the interrenal gland in teleost fishes. **Univ. Calif. Publ. Zool.**, v. 65, p.129-212, 1962.
- NANDI, J. Interrenal morphology of some Indian cyprinid fishes. **Proc. Zool. Soc.**, Calcutta, v. 181, p.1-9, 1965.
- NARAHARA, M.Y. Estrutura da população e reprodução de *Rhamdia hilarii* (Valenciennes, 1840) (Osteichthyes, Siluriformes, Pimelodidae). São Paulo, 1983. Tese (Doutorado). Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo.
- NELSON, J.S. **Fishes of the World**, 3rd ed. Wiley, New York, 1994.
- NICHOLLS, T.J.; GRAHAM, G.P. The ultrastructure of lobule boundary cells and Leydig cell homologs in the testis of a Cichlid fish . *Cichlasoma nigrofasciatum*. **Gen. Comp. Endocrinol.**, New York, v. 19, p.133-146, 1972.
- NICHOLLS, T.J.; MAPLE, G. Ultrastructural observations on possible sites of steroid biosynthesis in the ovarian follicular epithelium of two species of Cichlid fish *Cichlasoma nigrofasciatum* and *Haplochromis multicolor*. **Z. Zelforsch. Mikrosk. Anat.**, v. 128, p. 317-335, 1972.
- NOZAKI, M.; et. al. Salmonid pituitary gonadotrops. I. Distinct cellular distributions of two gonadotropins, GTH I and GTH II. **Gen. Comp. Endocrinol.**, New York, v.77, p.348-57, 1990.
- OGURI, M. Studies on the adrenal gland of Teleost. IV – Histochemistry of the interrenal cells of fishes. **Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.** v. 26, p. 448-451, 1960.
- OGURI, M.; HIBIYA, A. Studies on the adrenal gland of teleosts. II – On the adrenal tissues in 15 species of fish. **Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.** v. 23, p. 144-149, 1957.
- OLIVEREAU, M. Les cellules gonadotropes hypophysaires du saumon de l'Atlantique: Unicité ou dualité? **Gen. Comp. Endocrinol.** New York, v. 28: (1), p. 82-95, 1976.
- OLIVEREAU, M.; BALL, J.N. Contribution à l'histophysiologie de l'hypophyse des Téléostéens, em particulier de celle de *Poecilia* species. **Gen. Comp. Endocrinol.**, New York, v. 4, p. 523-532, 1964.
- PEARSE, A.G.E. **Histochemistry theoretical and applied.**, v. 1, Edinburgh, Churchill Livingstone, 1968, 1759p.
- PETER, R.E. Vertebrate neurohormonal systems. In: PETER, K.; PANG, T.; SCHERIBMAN, M.P. Eds. **Vertebrate endocrinology fundamentals and biomedical implication**. New York: Academic Press, p. 57-104, 1986.
- PETER, R.E.; CRIM, L.W. Reproductive endocrinology of fishes: Gonadal cycles and gonadotropin in teleosts. **Ann. Rev. Physiol.**, v.41, p.323-335, 1979.

- PICKERING, A. D.; CHRISTIE, P. Changes in the concentrations of plasma cortisol and thyrosine during sexual maturation of the hatchry-reared brow trout, *Salmo trutta*, L. **Gen. Comp. Endocrinol.**, New York, v.44, p.487-96, 1981.
- PLANAS, J.V.; et al. Somatolactin stimulates *in vitro* gonadal steroidogenesis in coho salmon, *Oncorhynchus kisutch*. **Gen. Comp. Endocrinol.**, New York, v.87, p.1-5, 1992.
- PORAWSKI, M. **Níveis de testosterona e características morfo-funcionais do testículo de Peixe-rei, *Odonthestes sp.* do grupo Perugias (Dyer, 1998), durante o ciclo reprodutivo.** Porto Alegre, 1999. Tese (Doutorado em Ciências) Fisiologia – Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul.
- PORAWSKI, M. **Determinação dos estádios de maturação gonadal em peixe-rei, gênero *Odonthestes*.** Porto Alegre, 1994. Tese (Mestrado em Ciências Biológicas) Fisiologia - Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul.
- POWER, D. M. Immunocytochemical identification of growth hormone, prolactin, and gonadotropin cells in the pituitary of male plaice (*Pleuronectes platessa*) during gonadal maturation. **Gen. Comp. Endocrinol.**, New York, v.85, p.358-66, 1992.
- PRASADA RAO, P.D. A comparative study of the pituitary gland of certain freshwater teleosts. **Acta Anat.**, v. 73 (2), p. 281-303, 1969.
- PRASADA RAO, P.D. Histology of the pituitary gland of six species of fishes belonging to the genus *Mystus scopolii* (Teleostomi). **Anat. Anz.**, v. 130 (3/4), p. 347-361, 1972.
- PUDNEY, J. Spermatogenesis in nonmammalian vertebrates. **Microsc. Res. Tech.**, v. 32, p.458-497, 1995.
- QUESADA, J.; et al. Immunocytochemical and ultrastructural characterization of the types in the adenohypophysis of *Sparus aurata* L. (Teleost). **Gen. Comp. Endocrinol.**, v. 72, p. 209-225, 1988.
- QUINTARELLI, J.G.; et al. Studies of sialic acid containing mucins in bovine submaxillary and rat sublingual glands. **J. Histochem. Cytochem.**, v.9, p. 176-183, 1961.
- RAI, B.P. Cyclic changes in the testes of *Barbus tor* (Ham.). **Acta. Anat. Basel**, v. 63, p. 461-475, 1965.
- RASTOGI, R.K. Annual changes in the testicular activity of the teleost *Amphipnous cuchia* (Ham.). **Annotationes Zool. Jap.**, Tokio, v. 41, p. 11-23, 1968.
- REID, S.G.; BERNIER, N.J.; PERRY, S.F. The adrenergic stress response in fish : control of catecholamine storage and release. **Comparative biochemistry and physiology pharmacology toxicology & endocrinology**. v.120: (1), p.1-27, jul 1998.
- REID, S.G.; FRITSCH, R.; JONSON, A.C. immunohistochemical localization of bioactive peptides and amines associated with the chromaffin tissue of five species of fish. **Cell. Tissue Res.**,v. 280, p. 499-512, 1995.

- ROBERTSON, O.H.; WEXLER, B.C. Histological changes in the organs and tissues of migrating and spawning pacific salmon (genus *Oncorhynchus*). **Endocrinology**, v. 60, p.222-239, 1960.
- ROOSEN-RUNGE, C.E. **The process of spermatogenesis in animals**. Cambridge, University Press, 214 p., 1977.
- RUBY, S.M.; MACMILLAN, D.B. Cyclical changes in the brook stickleback *Eucalia inconstans*. **J. Morph.** Philadelphia, v. 131, p. 447-465, 1970.
- RUBY, S.M.; MACMILLAN, D.B. The interstitial origin of germ cells in the testis of the stickleback. **J. Morph.** Philadelphia, v. 145, p. 295-318, 1970.
- SAINT-PAUL, U. Potential for aquaculture of South American freshwater fishes: A review. **Aquaculture**, v. 54, p. 205-240, 1986.
- SANWAL, R; KRANNA, S.S. Seasonal changes in the testes of a freshwater fish *Channa gachua*. **Acta Anat.** Basel, v. 83, p. 139-148, 1972.
- SATHYANESAN, A.G. Seasonal histological changes in the testis of the catfish, *Mystus seenghala*. **J.Zool. Soc. India.**, Calcutta, v. 11, p. 52-59, 1959.
- SCHERECK, C.B.; et al. Regulation of the interrenal of fishes: non-classical control mechanisms. **Fish Physiol. Biochem.**, v. 7, p.259-265, 1989.
- SCHREIBMAN, M.P.; BERLOWITZ, E. J.; VAN den HURK, R. Histology and histochemistry of the testis and ovary of the platyfish, *Xiphophorus maculatus*, from birth to sexual maturity. **Cell. Tissue Res.** Berlin, v. 224, p. 81-87, 1982.
- SCRUGGS. W.M. The epithelial components of the teleost pituitary gland as identified by a standardized method of selective staining. **J. Morph.**, v. 65 (2), p. 187-213, 1939.
- SELMAN, K.; WALLACE, R.A. Gametogenesis in *Fundulus heteroclitus*. **Amer. Zool.**, v.26, p.173-192, 1986.
- SELMAN, K.; WALLACE, R.A. Oogenesis in *Fundulus heteroclitus*. III – Vitelogenesis. **J. Exp. Zool.**, v. 226, p.441-457, 1983.
- SHERWOOD, N.; LOVEJOY, D. A. The origin mammalian form of GnRH in primitive fishes. **Fish Physiol. Biochem** ., v.7, p.85-93, 1989.
- SHRIVASTAVA, S.S. Spermatogenesis in a freshwater large murrel *Channa striatus* (Block). **Bolm. Zool. Iniv. S. Paulo**. São Paulo, v. 8, p. 107-114, 1984.
- SHRIVASTAVA, S.S.; SWARUP, K. Histomorphological identification of the tinctorial cells in the pituitary gland of *Channa marulis* (HAM.). **Cell. Mol. Biol.**, v.26, p.547-53, 1980.



- SHRIVASTAVA, P.N.; RATHI, S.K. Effect of radiation on the reproductive system in the indian catfish *Heteropneustes fossilis* (BLOCH). II. Histological study of the testis. **Archs. Biol.**, Liège, v. 80, p. 327-335, 1969.
- SHRIVASTAVA, S.S. Histomorphology and seasonal cycle of the sperm duct in a teleost. **Acta Anat.**, Basel, v. 66, p. 133-160, 1967.
- SHULTZ, R.W.; et al. Physiological, morphological, and molecular aspects of gonadotropins in fish with special reference to the African Catfish, *Clarias Gariepinus*. In: F.W. Goetz and P. Thomas. Ed. **Reproductive Physiology of Fish**. Austin, Texas, U.S.A., 1995.
- SNEED, K.E.; CLEMENS, H.P. The morphology of the testis and accessory reproductive glands of the catfish (Ictaluridae). **Copeia**. New York, v. 3, p. 606-611, 1963.
- SILFVERGRIP, A.M.C. A systematic review of the neotropical catfish genus *Rhamdia* (Teleostei, Pimelodidae). Stockholm, 1996, 156 p. Tese (Doutorado em Zoologia). Department of Vertebrate Zoology, Swedish Museum of Natural History.
- SILVA, M.; GODINHO, H.P. A célula de Sertoli de *Oreochromis niloticus* (peixe teleosteo). **Rev. Bras. Ciên. Morfol.**, v. 6, p.3-8, 1989.
- SPECKER, J. L.; et al. Immunocytochemical and immunogold localization of two prolactin isoforms in the same pituitary cells and in same granules in the tilapia (*Oreochromis mossambicus*). **Gen. Comp. Endocrinol.**, New York, v.89, p.28-38, 1993.
- STANLEY, H.G.; CHIEFFI, R.; BOTTE, V. Histological and histochemical observation on the testis of *Gobius paganellus*. **Z. Zellforsch. Mikrosk. Anat.** Berlin, v. 65, p. 350-362, 1965.
- STEEDMAN, H.F. Alcian blue 8gs; a new stain for mucin. **Microbiol. Sci.**, v.91, p. 477-499, 1950.
- STOKA, A.; et al. Metabolismo de la testosterona en submaxilares de roedores. Posible explicación de su dimorfismo sexual. **Revta. Soc. Argnt. Biol.** Buenos Aires, v.47, p. 145-155, 1971.
- SUFI, G.B.; MORI, K.; SATO, R. Histochemical changes in activities of dehydrogenases related to steroidogenesis in salmonid fishes (Genus *Oncorhynchus*) during sexual maturation and spawning. **Tohoku J. Agric. Res.** Sendai, v. 31, p. 74-96, 1980.
- SUNDARARAJ, B. I. Reproductive physiology of teleost fishes. A review of present knowledge and need for future research. **Aquaculture Develop. Coord. Programme**. Coord. Programme (FAO). 1981.
- SUNDARARAJ, B. I.; GOSWAMI, S. V. Hormone regulation of *in vivo* and *in vitro* oocyte maturation in the catfish, *Heteropneustes fossilis* (Bloch). **Gen. Comp. Endocrinol.**, New York, v.32, p.17-28, 1977.

- SUNDARARAJ, B. I.; GOSWAMI, S. V.; LAMBA, V.J. Oocyte maturation in teleostes fishes. In: LOFTS, B.; HOLMES, W.N., eds., **Current Trends in Comparative Endocrinology**. Hong Kong, p. 369-372, 1985.
- SUNDARARAJ, B. I.; GOSWAMI, S. V.; LAMBA, V.J. Role of testosterone, estradiol-17-beta, and cortisol during vitellogenin synthesis in the catfish, *Heteropneustes fossilis* (Bloch). **Gen. Comp. Endocrinol.**, New York, v.48, p.390-397, 1982.
- SUNDARARAJ, B.I.; VASAL, S. Photoperiod and temperature control in the regulation of reproduction in the female catfish *Heteropneustes fossilis*. **J. Fish. Res. Bd. Can.**, Ottawa, v. 33p. 959-973, 1976.
- SUZUKI, K.; KAWAUCHI, H.; NAGAHAMA, Y. Isolation and characterization of two distinct gonadotropins from chum salmon pituitary glands. **Gen. Comp. Endocrinol.**, New York, v.71, p.292-301, 1988.
- SWARUP, K.; SHRIVASTAVA, S.J. Cyclic changes in the testicular activity of the freshwater large murrel *Channa marulius* (Ham.). **Nat. Acad. Sci. Letters**. v. 2 (2), p. 83-84, 1979.
- TAKAHASHI, H.; IWASAKI, Y. Occurrence of histochemical activity of  $\Delta^5$ -3 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase activity in the testis of the Medaka *Oryzias latipes*. **Endocr. Jap.** Tokio, v. 20, p. 529-534, 1973.
- TERNER, J.Y.; LEV, R. Lactose formation in histochemical evaluation of acid mucopolysaccharides: mucin. **J. Histochem. Cytochem.**, v. 11, p. 804-811, 1963.
- TOUBEAU, G.; et al. Immunocytochemical study of cell type distribution in the pituitary of *Barbus barbus* (Teleostei, Cyprinidae). **Gen. Comp. Endocrinol.**, New York, v.83, p.35-47, 1991.
- TRAMEZZANI, J.H.; WASSERMANN, G.F. La glandula adrenal de los reptiles, modelo biologico para el estudio del tejido cromafin. **Phisis**, Buenos Aires, v. 25 (70), p. 227-238, 1965.
- TRUDEAU, V.L.; et al. Immunoreactions of gonadal steroids with brain dopamine and gonadotropin-releasing hormone in the control of gonadotropin-II secretion in goldfish. **Gen. Comp. Endocrinol.**, New York, v. 89, p.39-50, 1993.
- TYLER, C.R.; SUMPTER, J.P.; KAWANCHI, H.; SWANSON, P. Involvement of gonadotropin in the uptake of vitellogenic oocyte of the rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. **Gen. Comp. Endocrinol.**, New York, v. 84, p. 291-299, 1992.
- VALENTI, W.C.; et al. **Aqüicultura no Brasil: Bases para um desenvolvimento sustentável**. 2<sup>a</sup> ed. Brasília: CNPq, MCT, 2000. 399p.
- VAL-SELLA, M. V. **Hipófise de bagre – *Rhamdia hilarii* VAL., 1840. Estudo da anatomia e histologia da adenohipófise. Morfometria das células gonadotróficas em relação ao ciclo sexual**. São Paulo, 1977. 155p. Tese (Doutorado em Ciências – Fisiologia). Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo.

- VAL-SELLA, M. V.; et al. Morfologia funcional da adenohipófise e do saccus vasculosos do pacú (*Colossoma mitrei*) imaturo. II. Atividade gonadotrópica em variação ambiental. **Bol. Fisiol. Anim.**, v. 10, p. 465-175, 1986.
- VAL-SELLA, M. V.; FAVA-DE-MORAES, F. Cytology and cytochemistry of the hypophysis of the freshwater teleost *Rhamdia hilarii* (VAL., 1840). **Morph. Jb.**, v. 125, p. 161-173, 1979.
- VAL-SELLA, M. V.; FAVA-DE-MORAES, F.; WAKABAYASHI, K. Comparative histochemistry of the mucoprotein cells of the hypophysis from *Rhamdia hillari*, *Hipostomus punctatus*, *Prochilodus scrofa* and *Cyprinus carpio* (Teleostei). Immunocytochemical identification of the gonadotropic cells. **Biol. Struct. Morphoq.**, v. 1, p.137-41, 1988.
- VAL-SELLA, M. V.; GUIFFRIDA, R.; SAWAYA, P. Morphology of the carp hypophysis (*Cyprinus carpio* L.). **Anat. Anz.**, v.42, p. 403-409, 1977.
- VAL-SELLA, M. V.; SESSO, A. Thin section and freezer fracture studies of the hypophyseal proximal pars distalis in a teleost (*Rhamdia hilarii* Val.) during different stages of the reproductive cycle. **Cell. Tissue Res.**, v. 208, p. 433-444, 1980a.
- VAN den HURK, R. The localization of steroidogenesis in the testis of oviparous and viviparous teleosts. **Proc. K. Ned. Akad. Wet. Amsterdam, Ser.C**, v. 76, p. 270-279, 1973.
- VAN den HURK, R. Steroidogenesis in the testis and gonadotropic activity in the pituitary during postnatal development of the black molly (*Mollienisia latipinna*). **Proc. K. Ned. Akad. Ser. C.**, v. 77, p. 193-200, 1974.
- VAN den HURK, R. et al. Cyclic changes in the rainbow trout, *Salmo gairdneri* with special reference to sites of steroidogenesis. **Annls. Biol. Anim., Biochim., Biophys.** Paris, v. 18, p. 899-904, 1978b.
- VAN OVERBEEKE, A.P.; McBRIDE, J.R. Histological effects of 11-ketotestosterone, 17 $\alpha$ -methyltestosterone, estradiol, estradiol cypionate, and cortisol on the interrenal tissue, thyroid gland, and pituitary gland of gonadectomized sockeye salmon (*Oncorhynchus nerka*). **J. Fish. Res. Board.**, Canada, v. 28, p.477-484, 1971.
- VIZZIANO, D.; BEROIS, N. Ciclo histológico del ovário de *Macrodon ancylodon* (Bloch & Schneider, 1801) (Teleostei: Sciaenidae). **Biologia pesquera**. v. 19, p. 39-47, 1990a.
- WALLACE, R.A. Vitellogenic and oocyte growth in nonmammalian vertebrate. In: BROWDER, L.W. ed., **Developmnet biology**. New York, Academic Press, p. 127-177, 1985.
- WALLACE, R.A.; SELMAN, K. Cellular and dynamic aspects of oocyte growth in teleosts. **Amer. Zool.**, v.21, p. 325-343, 1981.

- WASSERMANN, G.F.; TRAMEZZANI, J.H. Separate distribution of adrenaline and nor-adrenaline-secreting cells in the adrenal gland of anakes. **Gen. Comp. Endocrinol.** New York, v. 3, p. 480-489, 1963.
- WATTENBERG, L.W. Microscopic histochemical demonstration on steroid 3 $\beta$ -dehydrogenase in tissue sections. **J. Histochem. Cytochem.** Baltimore, v. 6, p. 225-232, 1958.
- WEBSTER, D.; WEBSTER, M. **Comparative Vertebrate Morphology.** New York, Academic Press, 517 p., 1974.
- WEISEL, G.E. The seminal vesicles and testes of *Gillichthys*, a marine teleost. **Copeia**, New York, v. 2, p. 101-110, 1949.
- WENDELAAR-BONGA, S.E.; et al. The effect of water acidification on prolactin cells and pars intermedia PAS-positive cells in the teleost fish *Oreochromis* (formely Sarotherodon) *mossambicus* and *Carassius auratus*. **Cell. Tissue Res.**, v. 238, p. 601-609, 1984.
- WHITT, G. S.; WOURMS, J.P. Introduction to the Symposium: Development Biology of Fishes. **Amer. Zool.** v. 21, p. 323-324, 1981.
- WIEBE, J.P. Steroid dehydrogenases and steroids in gonads of the seaperch *Cymatogaster aggregata* (Gibsons). **Gen. Comp. Endocrinol.** New York, v. 12, p. 256-266, 1969.
- YAMAZAKI, F.; DONALDSON, E.M. Involvement of gonadotropin and steroid hormones in the spermiation of the goldfish, *Carassius auratus*. **Gen. Comp. Endocrinol.** New York, v. 12, p. 491-497, 1969.
- YAN, H.Y.; THOMAS, P. Histochemical and immunocytochemical identification of the pituitary cell types in three scianenid fishes: Atlantic croaker, spotted seatrout, and red drum. **Gen. Comp. Endocrinol.**, New York, v. 84, p. 389-400, 1991.
- YOSHIE, S.; HONMA, Y. Experimental demonstration of the cell types in the adenohipophysis of the gobiid fish. *Rhinogobius brunneus*. **Arch. Histol. Jap.**, v. 41, p. 129-140, 1978.
- YOUNG, G.; et al. Plasma 17- $\alpha$ , 20 $\beta$ -dihydroxy-4-pregnen-3-one levels during sexual maturation of amago salmon (*Oncorhynchus rhodurus*): Correlation with plasma gonadotropin and *in vitro* production by ovarian follicles. **Gen. Comp. Endocrinol.**, New York, v. 51, p 96-105, 1983.
- ZAGHA, K.A.; VAL-SELLA, M.V. Análise estrutural da hipófise e alterações na adenohipófise em função da salinidade, em *Bathygobius saporator*. **Bol. Fisiol. Anim.**, São Paulo, v. 9, p. 111-118, 1985.

## **ABSTRACT**

## ABSTRACT

Lately, pisciculture has been a very good economic alternative model considering there are very few studies on the reproductive physiology of native species. It is the aim of this work to study *Rhamdia quelen* a species abundantly found in South America and well adapted to the cold weather of that region.

Cytological and histochemical characterization of the Pituitary gland has been done during the mature stage of the reproductive cycle. Cytological methods (Haematoxylin and Eosin, Lead-Haematoxylin and Mallory Tricomie) and histochemistry such as Periodic Acid-Schiff - PAS, Alcian Blue pH 2,5 with its respective blockers, have been used. The Pituitary gland is composed of two portions. The Posterior Pituitary and the Anterior Pituitary have three different regions: the "Rostral Pars Distalis" and the "Proximal Pars Distalis", both with two cellular types (the basophil probably being gonadotrophic) and "Pars Intermedia", with three cellular types, amounting to a total of seven cellular types characteristic of the Anterior Pituitary.

The development of female and male gonads was verified with the use of routine histological techniques. Thus, the reproductive period was divided, according to the gonadal development, into 4 main phases: resting, maturation, mature and regression phase. The types of oocytes found (yolk vesicles stages, nucleolus chromatin stages, perinucleolus stages, cortical-alveoli stages and vitellogenic stages) follow the normal pattern for many teleost species.

The ovary of *Rhamdia quelen* is the asynchronic type, with parceled spawns. The follicular cells of the mature oocyte appear to be overdeveloped (hypertrophied) characterizing cells which synthesize protein. Degenerated oocytes and post-ovulatory follicles were still identified in the ovaries. They seem to be related to a process involved with utilizing

material over again in the ovary and appear during the stages of post-spawn and regression. The post-ovulatory follicles appear after spawn and consist of secretory cells, being able to synthesize steroids.

In animals of the *Rhamdia quelen* species, it can occur intersex.

Jundiá testes, which belong to the lobular and spermatogonial irrestrict type, show as a unit a lobe inside of which are found a series of germinative cysts, where spermatogenesis develops. Six germ cell types were identified: primary and secondary spermatogonia, primary and secondary spermatocytes, spermatids and spermatozoa. The interstitial cells (or Leydig cells) show delta-5-3 beta hydroxysteroid dehydrogenase activity, which has its biggest enzymatic activity during the mature and regression periods.

The interrenal gland is found intermingled and around the anterior kidney tissue and around the cardinal vein and its branches. There was not hyperplasia and hypertrophy of the inter-renal tissue related to the reproductive cycle. Inter-renal and chromaffin cells are found dissociated. They are scattered externally over the tissue around the cephalic kidney.

The period for reproduction of *Rhamdia quelen* is from October to March, during spring and summer, with repeated spawning mainly from November to February. Resting period occurs during the colder months of the year, June and July.

## **ANEXOS**



## **ANEXO 1**

### **1 - Microscopia Eletrônica de Varredura**

#### **A) – Soluções:**

- 1- Glutaraldeído a 3%
- 2- Tampão fosfato 0,2 M pH 7,4
- 3- Acetona

#### **B) Método:**

- 1 – Fixação: glutaraldeído a 3% em tampão fosfato 0,2 M pH 7,4 durante 48 horas.
- 2 – Lavagem : tampão fosfato 0,1 M pH 7,4 (trocas de 30 minutos) – repete 3 vezes.
- 3 – Desidratação: Acetona a 30%, 50%, 70% (trocas de 10 minutos), 90% I, 90% II, 100% I e 100% II (trocas de 20 minutos).
- 4 – Ponto Crítico: processo de dessecação. Deixar o material sempre imerso em acetona 100% e seguir a técnica conforme as instruções do aparelho.
- 5 – Metalização: O material dessecado é colado em “stabs” com auxílio de fita adesiva e levado ao aparelho de metalização (ouro).
- 6 – O material foi observado em Microscópio Eletrônico de Varredura JEOL – JEM – 1200 EXII.

### **2 - Microscopia Eletrônica de Transmissão**

#### **A) – Soluções:**

- 1 - Glutaraldeído a 3%
- 2 - Tampão fosfato 0,2 M pH 7,4
- 3 - Álcool

- 4 – Solução de Reynolds
- 5 – Uranila saturada
- 6 – Resina (Spurr)
- 7 – Azur II a 1%
- 8 – Azul de metileno a 1%

B) Método:

- 1 – Fixação: glutaraldeído a 3% em tampão fosfato 0,2 M pH 7,4, durante 48 horas.
- 2- Pós-fixação: Ósmio a 2% em tampão fosfato 0,2 M pH 7,4, durante 1 hora.
- 2 – Lavagem : tampão fosfato 0,1 M pH 7,4 (trocas de 10 minutos) – repete 3 vezes.
- 3 – Desidratação: Acetona a 30%, 50%, 70%, 90%, 100% I, 100% II + acetona e acetona pura (trocas de 10 minutos).
- 4 – Inclusão: Acetona + Spurr em partes iguais, durante uma hora.
- 5 – Spurr puro, durante a noite.
- 6 – Emblocagem: Spurr novo, durante uma hora. Deixa na estufa a 70 °C durante 24 horas.
- 7 - Cortes grossos de 1  $\mu$ m foram corados com uma mistura em partes iguais de Azur II a 1% e azul e metileno a 1% em bórax a 1%. Os cortes finos foram corados com uranila saturada durante 15 minutos e solução de Reynolds.
- 8 – O material foi observado em Microscópio Eletrônico de Transmissão JEOL – JSM – 5.800.

## **ANEXO 2**

### **Métodos Histológicos e Histoquímicos**

#### **1 – Hematoxilina – Eosina (H.E.)**

##### **A) Corantes e soluções:**

- 1 – Hematoxilina de Mayer.
- 2 – Eosina de Lison a 1%.

##### **B) Método de coloração:**

- 1 – Desparafinar e hidratar.
- 2 – Corar pela Hematoxilina de Mayer durante 3 minutos.
- 3 – Lavar em água corrente.
- 4 – Azulecer durante 5 minutos.
- 5 – Lavar em água destilada.
- 6 – Corar pela Eosina de Lison durante 2 minutos.
- 7 – Lavar em água corrente rapidamente.
- 8 – Desidratar em série crescente de alcoóis (70%, 90% e 100%).
- 9 – Montar em Bálsamo do Canadá.

#### **2 – Tricrômico de Mallory**

##### **A) Corantes e soluções:**

- 1 – Solução A – 0,5 g de fuccina ácida diluída em 100 ml de água destilada.
- 2 – Solução B – 0,5 g de azul de anilina (solúvel em água);  
2,0 g de orange G  
solução aquosa de ácido túngstico em 100 ml de água destilada.

**B) Método de coloração:**

- 1 – Desparafinar e hidratar os cortes.
- 2 – Corar pela solução A durante 2 minutos.
- 3 – Lavar rapidamente em água destilada.
- 4 – Passar pela solução B durante 8 minutos.
- 5 – Passar em álcool a 80%, durante alguns segundos.
- 6 – Desidratar em série crescente de alcoóis (70%, 90% e 100%).
- 7 – Montar em Bálsamo do Canadá.

**3 – Ácido Periódico de Schiff (PAS)**

(para identificação de polissacarídeos e glicoproteínas neutras)

**A) Corantes e soluções:**

- 1 – Ácido Periódico a 1% - solução aquosa.
- 2 – Reativo de Schiff.
- 3 – Hematoxilina de Mayer.
- 4 – Água sulfurosa.

**B) Método de coloração:**

- 1 - Desparafinar e hidratar os cortes.
- 2 – Passar pelo ácido periódico a 1% durante 7 minutos.
- 3 – Lavar rapidamente em água destilada.
- 4- Tratar pelo reativo de Schiff durante 30 minutos.
- 5 – Lavar em 3 banhos de água sulfurosa, de 3 minutos cada um.
- 6 – Lavar em água corrente durante 5 minutos.
- 7 – Corar pela Hematoxilina de Mayer durante 1 minuto (opcional).

8 – Desidratar em série crescente de alcoóis (70%, 90% e 100%).

9 – Montar em Bálsamo do Canadá.

#### **4 – Azul de Alcian (AB) pH 2,5**

(para identificação de polissacarídeos e/ou glicoproteínas com grupos ácidos)

##### **A) Corantes e soluções:**

1 – Ácido acético a 3%.

2 – Solução aquosa a 1% de Azul de Alcian em ácido acético a 3%.

3 – Hematoxilina de Mayer.

##### **B) Método e coloração:**

1 - Desparafinar e hidratar os cortes.

2 – Corar pelo Azul de Alcian 1% em ácido acético a 3% durante 15 minutos.

3 – Lavar em 3 banhos de ácido acético a 3%, rapidamente.

4 – Lavar em água corrente rapidamente.

5 – Corar pela Hematoxilina de Mayer durante 1 minuto (opcional).

6 – Lavar em água corrente, rapidamente.

7 – Desidratar em série crescente de alcoóis (70%, 90% e 100%).

8 – Montar em Bálsamo do Canadá.

#### **5 – Acetilação + Saponificação + Ácido Periódico de Schiff**

(a etapa de acetilação bloqueia os polissacarídeos e glicoproteínas neutras, enquanto a saponificação restaura a positividade dos referidos grupos).

##### **A) Corantes e soluções:**

1 – Piridina.

- 2 – Anidro acético.
- 3 - Hidróxido de Bário a 4% alcoólico (álcool 100%).
- 4 – Ácido periódico a 1%.
- 5 – Reativo de Schiff.
- 6 - Água sulfurosa

B) Método de coloração:

- 1 – Desparafinar os cortes e imergi-los em álcool absoluto, colodionar (usar colódio comercial diluído em éter 1:1).
- 2 – Após a secagem, colocar os cortes em álcool a 70% durante 5 minutos, e voltar ao álcool absoluto.
- 3 – Passar o material durante 2 minutos em Piridina.
- 4 – Acetilação: passar os cortes numa mistura de 13 ml de Anidro Acético com 20 ml de Piridina, durante 24 horas à temperatura ambiente.
- 5- Passar em álcool absoluto, rapidamente e recolodionar.
- 6 – Passar o material em álcool a 70% durante 5 minutos, em seguida em álcool a 80%.
- 7 – Saponificação: nesta etapa só passam os cortes controles. Deixar os cortes em hidróxido de Bário a 4% alcoólico, de 4 a 5 minutos, à temperatura ambiente.
- 8 – Passar em álcool a 90% e a 70% rapidamente.
- 9 – Lavar em água destilada e aplicar o método do Ácido Periódico de Schiff em todos os cortes.

## 6 – Ácido Periódico de Schiff após Amilase Salivar

(para identificação de glicogênio)

### A) Corantes e soluções:

- 1 – Ácido Periódico a 1%.
- 2 – Reativo de Schiff.
- 3 – Solução de amilase salivar humana (30%) em soro fisiológico.

### B) Método e coloração:

- 1 – Desparafmar e hidratar os cortes.
- 2 – Submeter o corte A a uma solução de amilase salivar durante 24 horas a 37 °C.
- 3 – Submeter o corte B apenas ao soro fisiológico nas mesmas condições.
- 4 – Lavar os cortes em água destilada, durante 10 minutos.
- 5 – Aplicar o método do PAS.

## 7 – Metilação + Saponificação + Azul de Alcian pH 2,5

(a etapa de metilação + AB pH 2,5 bloqueia radicais ácidos, carboxila e éster sulfúrico, enquanto a etapa de saponificação restaura a positividade dos radicais carboxila).

### A) Corantes e soluções:

- 1 – Álcool Metílico.
- 2 – Ácido Clorídrico
- 3 - Hidróxido de Bário a 4% alcoólico
- 4 – Azul de Alcian a 1% em ácido acético a 3%.

### B) Métodos e colorações:

- 1 – Desparafinar 2 cortes e levá-los até o álcool absoluto.
- 2 – Colodionar os cortes, deixar secar e passá-los durante 5 minutos no álcool a 70%.

- 3 – Levar o material até o álcool absoluto.
- 4 – Metilação: colocar os cortes na mistura de 100 ml de álcool metílico e 0,8 ml de ácido clorídrico deixando 3 horas, a 60 °C.
- 5 – Em um dos cortes aplicar o método de saponificação.
- 6 – Aplicar em ambos os cortes, o método de Azul de Alcian pH 2,5.

### **8 - Hidrólise ácida seguida do método de Azul de Alcian pH 2,5.**

(para identificação de ácido siálico)

#### **A) Corantes e soluções:**

- 1 - Azul de Alcian a 1% em ácido acético a 3%.
- 2 - Acetato de sódio 0,02 N.
- 3 - Ácido clorídrico 0,02 N.

#### **B) Método de coloração:**

- 1 - Desparafmar 2 cortes: A e B e levá-los até o álcool absoluto.
- 2 – Colodionar.
- 3 – Hidrolisar o corte A em mistura de partes iguais de acetato de sódio 0,02 N e ácido clorídrico 0,02 N (pH2,5), durante 2 horas, a 60 °C.
- 4 – Acompanhar o procedimento com o corte B coberto com soro fisiológico ou água destilada.
- 5 – Descolodionar os cortes com mistura de álcool absoluto-éter em partes iguais, durante 5 minutos.
- 6 – Corar pelo método de Azul de Alcian pH 2,5.
- 7 – Desidratar em série crescente de alcoóis (70%, 90% e 100%).
- 10 – Montar em Bálsamo do Canadá.



## **9 – Hematoxilina Chumbo de Mac Conaill (HPB).**

### **A) Corantes e soluções:**

- 1 – Hematoxilina
- 2 – Solução de chumbo estabilizada

### **B) Métodos de Coloração:**

#### **Preparo do corante**

- 1 – Dissolver 2,0 g de hematoxilina em 100 ml de álcool a 95%.
- 2 – Adicionar 100 ml de solução de chumbo estabilizada.
- 3 – Adicionar água até completar 200 ml.
- 4 – Filtrar a mistura e utilizá-la após 1 hora.

#### **Preparo da Solução de Chumbo estabilizada**

- 1 – Adicionar o volume de nitrato de chumbo a 5%, em água.
- 2 – Adicionar igual volume de solução saturada de acetato de amônio.
- 3 – Filtrar.
- 4 – Adicionar 2 ml de formaldeído a 4% para cada 100 ml de solução filtrada.

Esta solução pode ser guardada durante vários dias.

#### **Coloração**

- 1 – Desparafmar e hidratar os cortes.
- 2 – Corar durante 2 horas.
- 3 – Lavar em água corrente durante 15 minutos.
- 4 – Desidratar os cortes e montar em Bálsamo do Canadá.

## 10 –Técnica para detecção de lipídios através de Sudan Negro

### A) Corantes e soluções:

- 1 – Solução saturada de Sudan Negro em álcool a 70%.
- 2 – Sacarose a 15% e a 30%.
- 3 – Formol a 10%.

### B) Método de fixação e coloração:

- 1 – Fixar o material em formol a 10%, durante 24 horas.
- 2 – Crioprotéger os espécimes em solução de sacarose a 15% até afundar, transferir para sacarose a 30% e armazenar a 4 °C.
- 3 – Para microtomia em criostato, colocar o material em suporte com “O.C.T. Compound” (Miles), para obtenção de corte transversais de 8-15 µm de espessura.
- 4 – Montar os cortes em lâminas com gelatina cromo-alúmem e deixar secar em temperatura ambiente durante 30 minutos.
- 6 – Submeter o material à técnica de Sudan Negro.

#### Técnica:

- A – Passar os cortes congelados em álcool a 70%, rapidamente.
- B – Colocar as lâminas numa solução de Sudan Negro, previamente filtrada e aquecida a 37 °C. Corar de 2 a 30 minutos.
- C – Passar em álcool a 50% durante um minuto, repete duas vezes.
- D – Lavar em água corrente.
- E – Montar em meio de gelatina-glicerina.

## 11 –Técnica para detecção da esteróide desidrogenase

### A) Soluções:

- 1 – NBT (nitro blue tetrazolium)
- 2 – NADP (nicotinamida difosfato)
- 3 – Tampão fosfato 0,2 M pH 7,4
- 4 – Pregnenolona 1 mg/ml
- 5 – Testosterona 1 mg/ml

### B) Método de fixação e coloração:

- 1 – Congelar o material em isopentano resfriado em nitrogênio líquido (- 156 °C) durante 20 segundos. Transportar em gelo seco.
- 2 - Armazenar o material em freezer a - 70 °C.
- 3 – Cortes: para microtomia em criostato (-20 °C), colocar o material em suporte com “O.C.T. Compound” (Miles) e deixar durante 30 minutos, para obtenção de corte transversais de 15-20 µm de espessura.
- 4 – Montar os cortes em lâminas com gelatina cromo-alúmem e deixar secar em temperatura ambiente durante 30 minutos.
- 5 – Incubação: incubar os cortes durante 4 a 6 horas a 37 °C no meio de incubação para esteróide desidrogenase composto de pregnenolona (comercial) ou testosterona (SIGMA), como substrato de esteróide, NADP (SIGMA) como a coenzima, NBT (SIGMA) como sal de tetrazolium e tampão fosfato 0,2 M pH 7,4 (WATTENBERG, 1958 modificado por HART, 1966). Como controle da técnica, incubar os cortes no mesmo meio, porém sem o substrato.
- 6 – Após a incubação lavar o material 3 vezes com tampão fosfato.
- 7 – Fixar em formol a 1% durante 10 minutos e montar em gelatina-glicerina.

## 12 –Técnica para reação cromafim

(par identificação de células cromafms)

### A) Soluções:

- 1 – Nitrato de prata a 10%
- 2 – Carbonato de sódio a 5%
- 3 - Solução de Rio Hortega
- 4 – Solução de tiosulfato de sódio a 1%
- 5 – Amoníaco
- 6 – Hematoxilina
- 7 – Eosina a 1%

### B) Método de coloração:

Preparo da solução de Rio Hortega (prata amoniacal)

- 1 –Juntar a 30 ml de nitrato de prata a 10%, 90 ml de carbonato de sódio a 5% (dissolvido no momento do uso).
- 2 – Agitar o precipitado formado, com bastão de vidro e ao mesmo tempo gotejar amoníaco, até o precipitado desaparecer e o líquido escurecer.
- 3 – Completar o volume com água destilada até 450 ml..
- 4 – Guardar a solução em vidro escuro.

### Coloração

- 1 – Desparafinar e hidratar os cortes.
- 2 – Tratar com solução de prata amoniacal durante 20 segundos.
- 3 – Lavar em água destilada.
- 4 – Tratar com tiosulfato de sódio a 1%, 2 minutos.
- 5 – Lavar em água destilada.

6 – Corar com hematoxilina 2 minutos e azulecer em água corrente, 5 minutos.

7 – Corar com eosina, 1 minuto.

8 – Desidratar os cortes e montar em Bálamo do Canadá.