

INVOLUÇÃO DOS FOLÍCULOS PÓS-OVULATÓRIOS EM *Pseudoplatystoma fasciatum* (PISCES, TELEOSTEI)

Elizabeth ROMAGOSA^{1,5}; Sérgio Ricardo BATLOUNI²;
Maria Inês BORELLA³; Antônio Fernando Gervásio LEONARDO⁴

RESUMO

A importância da criação dos bagres é hoje uma realidade, devido aos conhecimentos gerados pela pesquisa e aos empreendimentos por parte da iniciativa privada. Este estudo pretendeu investigar a degeneração dos folículos pós-ovulatórios (FPO) remanescentes e a natureza do comportamento reprodutivo de *Pseudoplatystoma fasciatum* em cativeiro. Treze horas após a aplicação da 2ª dose hormonal, 24 fêmeas da espécie, que liberaram seus ovócitos artificialmente, foram sacrificadas em diferentes tempos: 0, 1, 3, 6, 12 e 24 horas, no final de dois períodos reprodutivos: 12 fêmeas em jan./2001 e 12 em jan./2002, respectivamente 1ª e 2ª maturação ovariana. A seguir, fragmentos dos ovários foram retirados para estudos de microscopia de luz. O referido período coincide com a época dos maiores valores médios de temperatura da água ($26,0 \pm 1,0$ °C) e de IGS, portanto, quando as fêmeas estão aptas à indução hormonal. Inicialmente (0 a 3 horas), os FPOs apresentam células da granulosa e da teca hipertrofiadas. Após 6 horas verifica-se redução acentuada dos folículos em relação à fase anterior, a camada granulosa projeta-se irregularmente e ocorre intensa vascularização da teca. As células de ambas as camadas ficam entremeadas e penetram cada vez mais no lume. Pode-se notar a presença de células foliculares cromóforas e picnóticas e prolongamentos citoplasmáticos apicais no interior dos folículos. Após 24 horas, é possível observar que o tecido pós-ovulatório se apresenta vacuolizado, provavelmente contendo lisossomos, indicativo de etapa final do processo de degeneração. Em *P. fasciatum*, a rapidez com que se desenvolve o processo de involução e degeneração dos FPOs pode ser atribuída à alta fecundidade, à desova total e única, ao curto período de desova (dois meses), à ausência de comportamento de proteção da prole e à intensa proliferação de ovócitos primários e ninhos de ovogônias, exibidos pela espécie.

Palavras-chave: peixe; *Pseudoplatystoma fasciatum*; folículo pós-ovulatório; desova

INVOLUTION OF POST-OVULATORY FOLLICLES IN *Pseudoplatystoma fasciatum* (PISCES, TELEOSTEI)

ABSTRACT

Great importance is given nowadays to catfish rearing due to the knowledge generated by research so as by the enterprises created by the private sector. The objective of this study was to investigate the degeneration of the remaining post-ovulatory follicles (POF) and the nature of the reproductive behavior of *Pseudoplatystoma fasciatum* in captivity. Thirteen hours after the injection of the second hormonal dose, 24 females of the species, which had released their oocytes artificially, were sacrificed, at different times - 0, 1, 3, 6, 12 and 24 hours, in the final of the reproductive periods: 12 females in January 2001 (1st ovarian maturation) and 12 in January 2002 (2nd ovarian maturation). After that, fragments of ovaries were processed for light microscopy

Artigo Científico: Recebido em 06/04/2005 – Aprovado em 01/09/2005

¹ Pesquisador Científico - Centro de Pesquisa e Desenvolvimento de Peixes Ornamentais/Instituto de Pesca/APTA/SAA

² Doutor da Universidade de São Paulo

³ Professora Doutora da Universidade de São Paulo

⁴ Pesquisador Científico - Pólo Regional do Desenvolvimento Sustentável do Vale do Ribeira - APTA/SAA

⁵ Endereço/Address: Avenida. Francisco Matarazzo, 455 - Água Branca, São Paulo, Brasil - CEP: 05001-900
e-mail: eromagosa@pesca.sp.gov.br

observations. In those periods, the maximum mean values of water temperature (26.0 ± 1.0 °C) and GSI are registered, thus showing that the females are ready for hormonal induction. At first (0 to 3 hours), it is observed hypertrophy of cells of the granulosa and theca. After 6 hours, a sharp reduction of the follicles, in comparison with the previous stage, as well as irregular projection of the granulosa and intense vascularization of the theca are verified. The cells of both layers are intermingled, penetrating more and more into the lumen. For the first time, chromo phobic follicular cells, yellow-brown pigments and apical cytoplasmic projections are detected inside the follicles. It is possible to observe that after 24 hours the post-ovulatory tissue is vacuolated, probably containing lysosomes, indicating the end of the degeneration process. In *P. fasciatum*, the rapidity of the process of POFs involution and degeneration may be attributed to the fact that the species performs total spawning-single, has short spawning period (two months), presents high fecundity, does not protect its offspring, and exhibits an intense proliferation of primary oocytes and countless oogonia.

Key words: fish; *Pseudoplatystoma fasciatum*; post-ovulatory follicle; spawning

INTRODUÇÃO

Pseudoplatystoma fasciatum é uma espécie de bagre pimelodídeo, que possui características zootécnicas e de mercado bastante atrativas, despertando grande interesse de produtores em sua utilização em pisciculturas (ROMAGOSA *et al.*, 2003). Além disso, está entre as espécies consideradas como produto nobre, apresentando potencial de mercado para a aqüicultura brasileira, devido às várias formas de apresentação (sem cabeça e eviscerado, filés ou postas), cor (clara), textura (firme), sabor (pouco acentuado), teor de gordura (baixo) e espinhos intramusculares (ausentes), o que a torna adequada aos mais variados usos e preparos (CAMPOS, 2003; FRASCÁ-SCORVO *et al.*, 2004). A importância da criação dos bagres é hoje uma realidade, devido aos conhecimentos gerados pela pesquisa e aos empreendimentos por parte da iniciativa privada. Sabe-se que a rentabilidade de uma criação de peixes, além de depender de a espécie ser capaz de se reproduzir em cativeiro, está intimamente ligada a qualquer tipo de melhoramento genético que se possa aplicar, bem como à distribuição regular e contínua de alevinos de boa qualidade aos piscicultores (ROMAGOSA, 2004).

Assim, desde o ano 2000, devido à necessidade urgente de incrementar a criação de *Pseudoplatystoma fasciatum* em condições de confinamento, estudos sobre reprodução, nutrição e doenças parasitárias estão sendo realizados pelo Instituto de Pesca/APTA/SAA em parceria com universidades, dentre outras, USP (ICB), UNESP (CAUNESP/Jaboticabal) e UEM (ROMAGOSA, comunicação pessoal). Os estudos permitiram constatar que *P. fasciatum* apresenta padrões e táticas reprodutivas, como

desova total – única, curto período de desova (dois meses), elevada fecundidade e não proteção à prole (RESENDE *et al.*, 1995; LEONARDO *et al.*, 2004; ROMAGOSA, 2004), e que o crescimento das fêmeas é mais rápido que o dos machos (ROMAGOSA *et al.*, 2003).

Como o sucesso da criação de peixes depende basicamente do conhecimento da biologia da espécie e, em especial, do processo reprodutivo, ROMAGOSA *et al.* (2000), estudando o desenvolvimento ovocitário de *P. fasciatum*, demonstraram que as camadas foliculares são envoltas por um envelope, ou envoltório folicular, constituído de quatro camadas distintas, de fora para dentro: teca, membrana basal, epitélio folicular ou granuloso e zona radiata. Por outro lado, a ovulação é um processo que ocorre após os ovócitos terminarem a 1ª divisão meiótica (ROMAGOSA, 1998). A seguir, a meiose continua até a 2ª metáfase mitótica em ovócitos ovulados, os quais se tornam aptos à fertilização (LEONARDO *et al.*, 2004). Estudos baseados em microscopia eletrônica mostram que os prolongamentos das células foliculares e os microvilos dos ovócitos se retraem em relação à zona pelúcida durante a ovulação, levando à formação de um amplo espaço vazio entre o epitélio folicular e a zona pelúcida (ROMAGOSA, 1998). A natureza dos fatores envolvidos na interrupção da comunicação entre folículo e ovócito não é sabida em teleósteos tropicais (GURAYA, 1986).

Na seqüência, evidencia-se o corpo lúteo (denominação utilizada em mamíferos), ou folículo pós-ovulatório (denominação utilizada em peixes), formado por células do envelope folicular, após expulsão do ovócito maduro (ROMAGOSA, 1991; 1998). Existem poucas informações a respeito da

relação entre longevidade, e subsequente degeneração dos folículos pós-ovulatórios, e a natureza do comportamento reprodutivo de espécies de peixes tropicais mantidas em cativeiro (ROMAGOSA, 1998).

Com a finalidade de conhecer melhor a estratégia reprodutiva de *Pseudoplatystoma fasciatum*, procurou-se evidenciar e descrever o processo de involução e degeneração dos folículos pós-ovulatórios, após a desova induzida da espécie. Dessa forma, a razão deste estudo é sua aplicabilidade, possibilitando adequar as observações resultantes às práticas de manejo reprodutivo, com vista a diagnosticar possíveis causas do insucesso da desova e fornecer subsídios para o aperfeiçoamento do método de reprodução induzida da espécie.

MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi desenvolvido no Setor de Piscicultura do Pólo Regional de Desenvolvimento Sustentável do Vale do Ribeira - APTA, situado no Município de Pariquera-Açu, São Paulo, Brasil, no mês de janeiro de 2001 e de 2002.

Para a execução deste trabalho foram utilizados animais provenientes de reprodução induzida e criados em cativeiro:

LOTE 1: 14 fêmeas e 14 machos, coletados em janeiro de 2001, com 2 anos e 7 meses de idade e passando pelo 1º ciclo reprodutivo;

LOTE 2: 14 fêmeas e 10 machos, coletados em janeiro de 2002, com 3 anos e 7 meses de idade e passando pelo 2º ciclo reprodutivo.

Os valores médios de comprimento e peso de fêmeas e machos utilizados no experimento, em cada ciclo reprodutivo (Lote 1 e Lote 2), também foram calculados e são apresentados a seguir.

| Variável | Lote 1 | |
|------------------|------------|------------|
| | fêmea | macho |
| Sexo | fêmea | macho |
| Comprimento (cm) | 64,6 ± 5,0 | 59,0 ± 2,0 |
| Peso (kg) | 2,6 ± 0,3 | 1,5 ± 0,1 |
| Lote 2 | | |
| Sexo | fêmea | macho |
| Comprimento (cm) | 64,9 ± 4,3 | 52,9 ± 1,8 |
| Peso (kg) | 2,4 ± 0,3 | 1,3 ± 0,2 |

Os exemplares foram mantidos em quatro viveiros escavados de terra, com área de 200 m², profundidade média de 1,50 m, vazão de água igual a 18 L/min, na densidade de estocagem de 4 peixes/m², sendo

alimentados com ração balanceada (40% proteína bruta) oferecida duas vezes ao dia (às 8h e 18h), durante os sete dias da semana, na proporção de 5% da biomassa total, nos meses quentes (setembro a fevereiro) e de 1%, nos meses frios (março a agosto).

As fêmeas foram selecionadas no próprio viveiro, observando-se aspectos externos, tais como: ventre distendido, ou abaulado, e presença de papila urogenital saliente. O diâmetro dos ovócitos também foi avaliado, de acordo com a metodologia adotada por LEONARDO *et al.* (2004).

A metodologia utilizada na desova induzida foi a preconizada por ROMAGOSA (1998) e LEONARDO *et al.* (2004): injeção intraperitoneal de extrato de hipófise de carpa (HC) diluído em solução salina 0,9%.

Nas fêmeas foram aplicadas duas doses: 1ª dose= 0,5 mg de hipófise de carpa/quilo de peixe e 2ª dose=5,0 mg/quilo de peixe, com intervalo de 10 horas entre elas. Os machos não receberam tratamento hormonal, devido à grande quantidade de sêmen liberada.

Após a aplicação hormonal, as fêmeas foram mantidas isoladas uma da outra, em caixas d'água de 500 L, com aeração e renovação constante de água (24,4 ± 0,6 °C em 2001 e 25,0 ± 1,0 °C em 2002). Quando foi possível visualizar nas caixas d'água a presença de alguns ovócitos, as fêmeas foram retiradas, realizando-se, a seguir, massagem abdominal para que ocorresse a liberação dos ovócitos, processo popularmente denominado "extrusão". Para os machos empregou-se procedimento semelhante. A fertilização foi feita a "seco", segundo metodologia utilizada por von IHERING e AZEVEDO (1936). Em ambos os lotes, o período de latência foi de 13 horas após a 2ª dose hormonal.

Após a desova, duas fêmeas foram sacrificadas por comoção cerebral, nos seguintes intervalos de tempo: 0, 1, 3, 6, 12 e 24 horas, para retirada e pesagem dos ovários.

Fragmentos dos terços anterior, médio e posterior dos ovários foram fixados em solução de Bouin (6 horas), sendo posteriormente desidratados em série crescente de etanol e incluídos em historresina (JB-4, Polysciences, Inc. USA). Os cortes histológicos, com 3,0 µm de espessura, foram submetidos a coloração por hematoxilina/eosina (HE) e examinados e fotomicrografados em fotomicroscópio Zeiss Axioscop 2.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os Folículos Pós-Ovulatórios (FPO) em *P. fasciatum* originam-se após a ovulação (expulsão dos ovócitos na fase de maturação final), formados pela involução do envoltório folicular das células da granulosa (ROMAGOSA *et al.*, 2000), e sua presença pode ser facilmente observada entre 0 e 24 horas após a 2ª aplicação hormonal. Segundo DRUMMOND *et al.* (2000), após a desova, estas estruturas remanescentes, os folículos pós-ovulatórios, não têm função endócrina e são rapidamente reabsorvidas, o que envolve morte celular programada ou apoptose das células foliculares.

Inicialmente (0 a 3 horas após a aplicação hormonal), pode-se visualizar hipertrofia da camada folicular, cujas células se apresentam cúbicas ou colunares, com núcleo elíptico localizado na porção basal. A teca apresenta-se altamente vascularizada. Uma característica marcante dos FPO é a presença de lume, ou cavidade vazia, indicando que a ovulação já havia ocorrido (Figura 1: A, B, C), o mesmo tendo sido relatado por ANDRADE (1990), em *Curimatella lepidura*; DRUMMOND (1996), em *Astyanax bimaculatus*; e OLIVEIRA JÚNIOR (2002), em *Pimelodus maculatus*. Após 6 horas não foram detectadas alterações morfológicas nos folículos em relação ao período anterior.

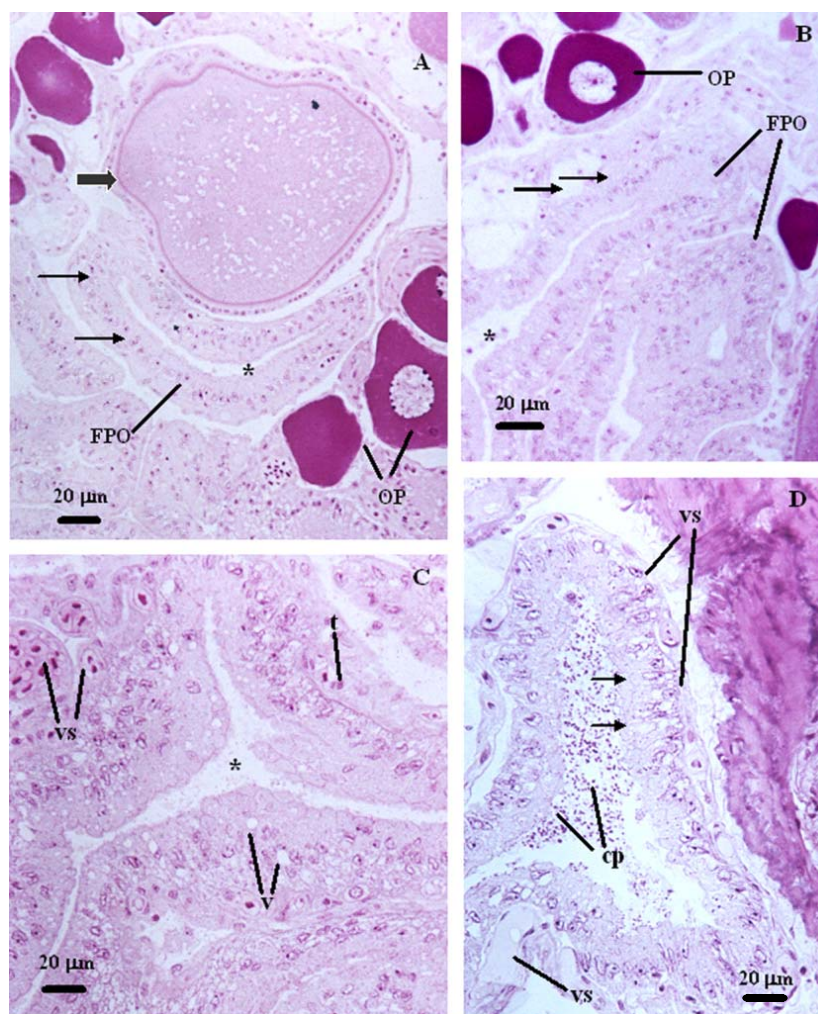


Figura 1. Micrografias de ovários de *Pseudoplatystoma fasciatum* pós-desova (0 a 12 horas) **A)** 0 hora - Ovócitos em início de atresia (seta grossa), ovócitos perinucleolares (OP) e folículos pós-ovulatórios (FOPs *); **B)** 1 hora - FPOs mostrando células foliculares hipertrofiadas (setas). Observam-se folículos com lume irregular, amplo e vazio (*) e ovócitos na fase perinucleolar (OP); **C)** 3 horas - FPO com lume irregular (*) e paredes pregueadas. As células da camada folicular apresentam vacúolos internos (v) e na teca (t) surgem vasos sanguíneos (vs). É possível observar que o tecido que forma o folículo está, em geral, mais desorganizado em relação às fases iniciais (0 e 1 hora) e que no lume folicular surge material amorfo; **D)** 12 horas - Vasos sanguíneos (vs) presentes na teca, desorganização da camada folicular (seta) e surgimento de células com núcleos picnóticos (cp) no interior do folículo.

Após 12 horas, é evidente o processo de hipertrofia e intensa vascularização do folículo. As células da teca e da camada folicular apresentam-se entremeadas e penetram cada vez mais no lume. Verifica-se também, pela primeira vez, a presença de células foliculares cromóforas, células com núcleos picnóticos e prolongamentos citoplasmáticos apicais no interior dos folículos (Figura 1D).

Após 24 horas observa-se degeneração quase total dos folículos (Figura 2). As células da granulosa diminuem, formando uma massa de células amorfas. Não foi possível constatar a presença de pigmentos

amarelos nesta espécie. Observação similar foi feita por ROMAGOSA (1991) em *P. mesopotamicus*.

Nos peixes, o sucesso de estratégias e táticas reprodutivas depende de modificações dos processos básicos do desenvolvimento dos ovócitos. Sabe-se que a maturação dessas células envolve uma série de mudanças bioquímicas e morfológicas. De acordo com SMITH e HALEY (1987), é provável que os folículos pós-ovulatórios de *Oreochromis mossambicus* sintetizem os hormônios esteroidais no 25º dia pós-desova, com intensa atividade enzimática, e que, a partir do 7º dia, esta produção pós-desova se desloque

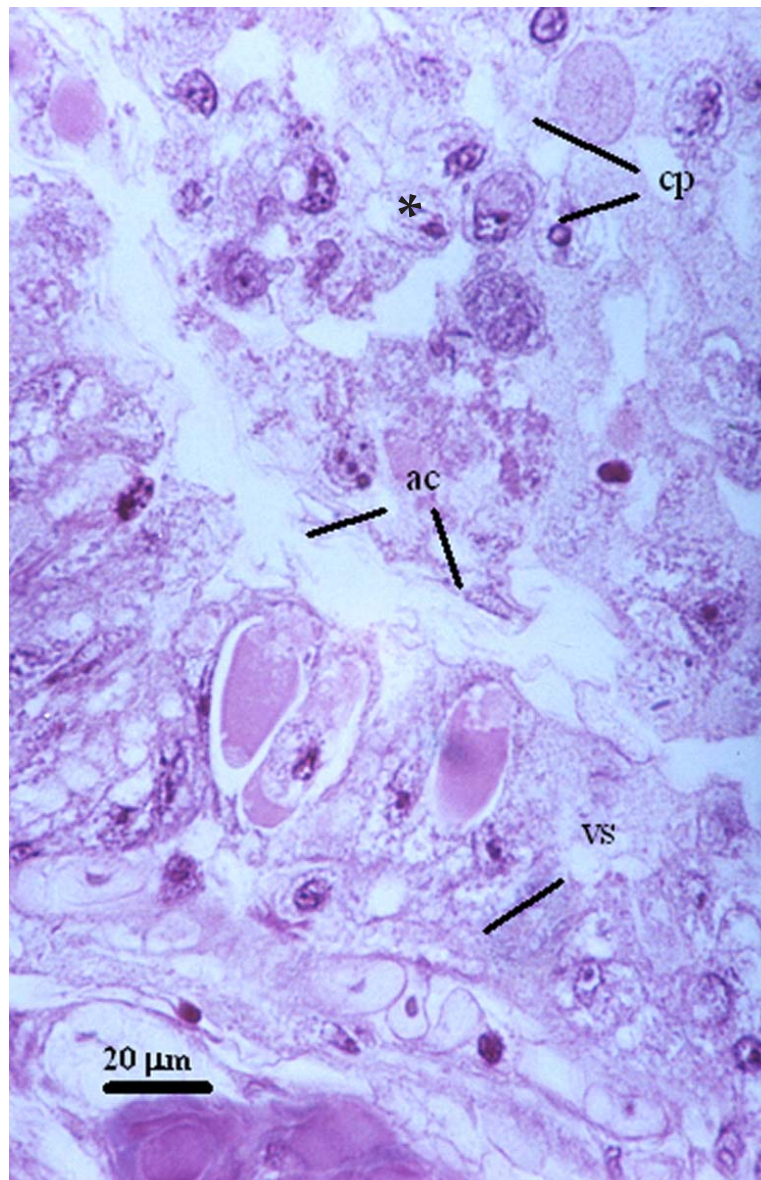


Figura 2. Micrografia de ovário de *Pseudoplatystoma fasciatum* pós-desova (24 horas). Pode-se visualizar: folículos pós-ovulatórios (FPOs) como uma estrutura bem desorganizada; célula folicular (em detalhe) contendo grande quantidade de material acidófilo no citoplasma (ac); vasos sanguíneos (vs) na teca; e grande quantidade de células com núcleos picnóticos (cp) no lume (*) do folículo.

para outras estruturas dos ovários, particularmente para células especiais da teca. Em *P. fasciatum*, por tratar-se de uma espécie tropical, migradora, a reprodução ocorre uma vez por ano, com tendência unimodal – desova total, e, quando essa espécie é mantida em cativeiro, não se reproduz naturalmente, não constrói ninhos e não protege a prole (LEONARDO *et al.*, 2004; ROMAGOSA, 2004). É provável que esse comportamento reprodutivo influa na rapidez com que ocorre a involução e degeneração dos FPOs de *P. fasciatum*, no qual observam-se intensa proliferação de ovócitos primários e presença de inúmeros ninhos de ovogônias. É possível também observar que o tecido pós-ovulatório, após 24 horas, é vacuolizado, provavelmente contendo lisossomos, indicativo do processo de degeneração.

Evidentemente, são necessários estudos mais complexos (ultra-estruturais, histoquímicos, imunológicos) para elucidar o papel dos FPOs e sua aplicação.

AGRADECIMENTOS

Os autores são gratos aos técnicos de apoio à pesquisa, Benedito Martins de Aguiar, Edilberto Rufino de Almeida e Célio Martins de Aguiar, do Pólo Regional de Pariquera-Açu/APTA, SP, e ao técnico, Cruz Alberto Mendonza Rigonati, do ICB-USP, SP.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANDRADE, D.R. 1990 *Biologia reprodutiva da manjuba, Curimatella lepidura Eigenmann e Eigenmann, 1889 (Pisces, Curimatidae) da represa de Três Marias, Rio São Francisco, MG.* Belo Horizonte. 217p. (Tese de Doutorado. Universidade Federal de Minas Gerais).
- CAMPOS, J.L. 2003 *The culture of pintado, Pseudoplatystoma spp. (Pimelodidae).* In: WORLD AQUACULTURE SOCIETY -WAS, Salvador, 9-13/maio/2003. *Anais...* Salvador: WAS. p.150.
- DRUMMOND, C.D. 1996 *Folículo pós-ovulatório de lambari Astyanax bimaculatus lacustris (Pisces, Characidae) submetido à desova induzida: Estudo Histológico e Ultra-estrutural.* Belo Horizonte. 123p. (Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Minas Gerais).
- DRUMMOND, C.D.; BAZZOLI, N. RIZZO, E.; SATO, Y. 2000 *Postovulatory follicle: a model for experimental studies of programmed cell death or apoptosis in teleosts.* *J. Exp. Zool.*, 287: 176-182.
- FRASCÁ-SCORVO, C.M.D.; BACCARIN LEONARDO, A.; VIDOTTI, R.; ROMAGOSA, E.; SCORVO FILHO, J.D.; AYROZA, L.M.S. 2004 *Influência do sistema de criação no rendimento de carcaça, sabor, odor e na composição centesimal do pintado, Pseudoplatystoma corruscans.* In: AQUIMERCO, Espírito Santo, 8-12/maio/2004. *Anais...* Espírito Santo: AQUABIO. p.81.
- GURAYA, S.S. 1986 *The cell and Molecular Biology of Fish Oogenesis.* Monographs in Development Biology. Karger: SAUER, H.W. 223p.
- LEONARDO, A.F.G.; ROMAGOSA, E.; BATLOUNI, S.R.; BORELLA, M.I. 2004 *Characterization and hormonal efficiency in female cachara, Pseudoplatystoma fasciatum (Linnaeus, 1766), kept in captivity.* *Aquaculture*, 42: 451-461.
- OLIVEIRA JÚNIOR, R.L. 2002 *Análise comparativa da reprodução do mandi-amarelo, Pimelodus maculatus Lacépède, 1803 (Pisces, Pimelodidae), em dois trechos do Rio São Francisco, MG.* Belo Horizonte. 43p. (Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Minas Gerais).
- RESENDE, E.K. de; CATELLA, A.C.; NASCIMENTO, F.L.; PALMEIRA, S. da. S.; ALMEIDA, V.L.L. de. 1995 *Biologia do curimatá (Prochilodus lineatus), pintado (Pseudoplatystoma corruscans) e cachara (Pseudoplatystoma fasciatum) na bacia hidrográfica do rio Miranda, Pantanal do Mato Grosso do Sul, Brasil, Corumbá.* *Boletim de Pesquisa, Mato Grosso do Sul*, 2: 1-75. (EMBRAPA - CPAP).
- ROMAGOSA, E. 1991 *Mudanças morfológicas (microscopia de luz e eletrônica) das gônadas do pacu, Piaractus mesopotamicus (Holmberg, 1887), durante o ciclo reprodutivo, em condições de confinamento.* Rio Claro. 177p. (Dissertação de Mestrado. Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho").
- ROMAGOSA, E. 1998 *Desenvolvimento gonadal (morfologia; ultra-estrutura) e indução da reprodução do matrinxã, Brycon cephalus (Günther, 1869) em cativeiro.* Vale do Ribeira, São Paulo. São Carlos. 211p. (Tese de Doutorado. Universidade Federal de São Carlos).

- ROMAGOSA, E.; ANDRADE-TALMELLI, E.F.; PAIVA, P. de; GODINHO, H.M.; BATLOUNI, S.R. 2000 Observações preliminares sobre o comportamento reprodutivo das fêmeas de cachara, *Pseudoplatystoma fasciatum* (Teleostei, Siluriformes, Pimelodidae) na região do Vale do Ribeira, SP, em condições de confinamento. *Braz. J. morphol. Sci.*, 17: 1-224 (Suplemento).
- ROMAGOSA, E.; PAIVA, P. de; GODINHO, H.M.; ANDRADE-TALMELLI, E.F. 2003 Características morfométricas e crescimento do cachara *Pseudoplatystoma fasciatum* (Linnaeus, 1766), em cativeiro. *Acta Scientiarum. Animal Sciences*, Maringá, 25(2): 277-283.
- ROMAGOSA, E. 2004 Biologia e fisiologia reprodutiva do cachara, *Pseudoplatystoma fasciatum* em cativeiro: aspectos fundamentais e aplicados. In: AQUIMERCO, Espírito Santo, 8-12/maio/2004. *Anais...* Espírito Santo: AQUABIO. p.14.
- SMITH, C. e HALEY, S.R. 1987 Evidence of steroidogenesis in postovulatory follicles of the tilapia, *Oreochromis mossambicus*. *Cell Tissue Res.*, 247: 675-687.
- von IHERING, R. e AZEVEDO, P. 1936 A desova e a hipofiseação dos peixes. Evolução de dois Nematognathas. *Arch. Inst. Biol.*, 7: 107-118.