



RELATÓRIOS CIENTÍFICOS E TÉCNICOS

SÉRIE DIGITAL

ANÁLISE HISTOLÓGICA DE GÓNADAS DE CARPAU
(*Trachurus trachurus*, Linnaeus 1758):
MORFOGÉNESE E ESCALA DE MATURAÇÃO
MICROSCÓPICA

Ana Maria Costa



2004

16



Os **RELATÓRIOS CIENTÍFICOS E TÉCNICOS DO IPIMAR** destinam-se a uma divulgação rápida de resultados preliminares de carácter científico e técnico, resultantes de actividades de investigação e de desenvolvimento e inovação tecnológica. Esta publicação é aberta à comunidade científica e aos utentes do sector, podendo os trabalhos serem escritos em português, em francês ou em inglês.

A **SÉRIE COOPERAÇÃO** destina-se, primordialmente, à divulgação de trabalhos realizados com países terceiros no âmbito de programas de cooperação.

A **SÉRIE DIGITAL** destina-se a promover uma consulta mais diversificada e expedita dos trabalhos na área da investigação das pescas e do mar.

Edição

IPIMAR
Avenida de Brasília
1449-006 LISBOA
Portugal

Corpo Editorial

Francisco Ruano - Coordenador
Fátima Cardador
Irineu Batista
Manuela Falcão
Teresa Monteiro

Edição Digital

Anabela Farinha/Irineu Batista

As instruções para os autores estão disponíveis no “site” do IPIMAR www.wipimar.pt ou podem ser solicitadas aos membros do Corpo Editorial desta publicação.

Capa

Lúís Catalan

ISSN

1645-863X

Todos os direitos reservados.

ANÁLISE HISTOLÓGICA DE GÓNADAS DE CARPAU
(*Trachurus trachurus*, Linnaeus 1758):
MORFOGÉNESE E ESCALA DE MATURAÇÃO MICROSCÓPICA

Ana Maria Costa

INIAP/IPIMAR – Departamento de Ambiente Aquático

Av. Brasília 1449-006 Lisboa, Portugal

Recebido em 2003 - 03 - 20

Aceite em 2004 - 06 - 07

RESUMO

Neste trabalho fez-se a observação microscópica de gónadas de carapau (ovários e testículos) com o objectivo de descrever os processos de gametogénese que ocorrem durante o seu desenvolvimento e que serviram de base para a elaboração de uma escala de maturação microscópica. Neste sentido, foram observadas gónadas provenientes de amostras comerciais adquiridas em Peniche, as quais foram processadas para observação histológica segundo a técnica de Ramos (1986). Verificou-se que nesta espécie não há sincronismo na maturação, em ambos os sexos, o que poderá indicar a ocorrência de várias posturas durante a época de desova. A identificação microscópica revela-se de grande importância na atribuição dos estados de maturação, em particular na distinção dos estados 2 e 6 (Início e Fim da recuperação) e 3 e 5 (Pré e Pós-desova).

Palavras chave: *Trachurus trachurus*; morfogénese; escala de maturação microscópica.

ABSTRACT

Title: Histological analysis of horse mackerel gonads (*Trachurus trachurus*, Linnaeus 1758): Morphogenesis and microscopic maturity scale. In this work we made the analysis of horse mackerel gonads (ovaries and testis) in order to describe the gametogenesis that occur during gonads development, which became the basis to elaborate a microscopic maturity scale. Gonads of specimens from commercial samples from Peniche were processed for histology according to Ramos (1986). For this species was not found synchronism in the maturity development, for both sexes, which may indicate several spawnings along the spawning season. Microscopic identification is of the most importance to define maturity stages, particularly when distinguishing stages 2 and 6 (Beginning and Ending of recovering) and 3 and 5 (Pre and Pos spawning).

Key words: *Trachurus trachurus*; morphogenesis; microscopic maturity scale.

REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

COSTA, A.M., 2004. Análise histológica de gónadas de carapau (*Trachurus trachurus* Linnaeus, 1758): Morfogénese e escala de maturação. *Relat. Cient. Téc. IPIMAR, Série digita I*(<http://ipimar-iniap.ipimar.pt>) nº 16, 17pp.

1 - INTRODUÇÃO

Tal como todos os outros vertebrados, os peixes têm reprodução sexuada e na maioria dos casos a fertilização é externa e tem lugar em meio aquático.

A reprodução nos teleósteos é complexa, o que se reflete na grande variedade de estruturas constituintes da gónada; no entanto, a morfologia das células germinativas e os elementos somáticos constituintes do tecido da gónada são semelhantes nas várias espécies. Todas estas estruturas se desenvolvem no sentido de produzir gâmetas férteis (ovos e esperma) necessários para a reprodução ter sucesso (Nagahama *in* Hoar *et al.*, 1983).

O carapau, à semelhança de outros Teleósteos ovíparos, não possui dimorfismo sexual e os indivíduos dos dois sexos nadam em conjunto, libertando para a água os produtos sexuais. A libertação dos ovos pelas fêmeas tem de ser imediatamente seguida pela emissão de esperma dos machos, pois os ovos em contacto com a água rapidamente se tornam inviáveis (Grassé, 1958). Quando o oócito é libertado transporta consigo a informação genética e as reservas metabólicas necessárias para que o desenvolvimento embrionário permita a sobrevivência da larva até à sua fase de vida livre (Ramos, 1996).

O desenvolvimento das células germinativas femininas e masculinas denomina-se gametogénese e decorre de processos meióticos, que se designam, respectivamente, por oogénese e espermatogénese.

Neste trabalho observaram-se cortes histológicos de gónadas de carapau com o objectivo de tentar descrever aquele processo e elaborar uma escala de maturação microscópica que ajude a identificação dos estados de maturação desta espécie.

2 - METODOLOGIA

As gónadas de carapau (*Trachurus trachurus* L.) utilizadas no estudo dos processos de morfogénese foram obtidas de amostras comerciais adquiridas em Peniche e foram preparadas para análise histológica segundo a técnica de Ramos (1986).

Esta técnica desenvolve-se, basicamente, em 5 etapas: Fixação, Desidratação, Inclusão (em resina), Elaboração dos blocos e Execução dos cortes:

Cada exemplar é medido e pesado individualmente e as gónadas são retiradas e pesadas. Cada amostra é colocada numa solução de glutaraldeído a 2.5%, em tampão cacodilato de sódio 0.1M, de pH 7.4 (correspondente ao pH das células).

A fase da desidratação consiste na passagem das amostras por álcool a diferentes concentrações, 70%, 85% e 100%. Em seguida faz-se a inclusão das gónadas em resina (preparada em laboratório com glicol-metacrilato, purificado com carvão ativado, a que se adiciona solução de butoxietanol, catalizada com peróxido de benzoil, o endurecedor polietilenoglicol e o corante NN dimetilnilina). As amostras são colocadas neste soluto em moldes de plástico, que se cobrem com uma lamela de vidro.

Os cortes, de 1 μ m de espessura, foram feitos com facas de vidro, utilizando um micrótomo manual. Cada corte foi corado com azul de toluidina e as lâminas foram seladas com Bálsamo do Canadá, identificadas e guardadas ao abrigo da luz.

3 - RESULTADOS

1. Morfogénese

As fêmeas de *Trachurus trachurus* possuem dois ovários, situados na cavidade abdominal ao longo do corpo e em posição ventral em relação à bexiga gasosa. São alongados, largos e redondos na extremidade anterior e estreitos e cónicos na posterior, com comprimentos sensivelmente iguais, podendo o esquerdo ser mais volumoso e apresentam-se unidos na parte posterior, onde se ligam ao poro genital (Figura 1).

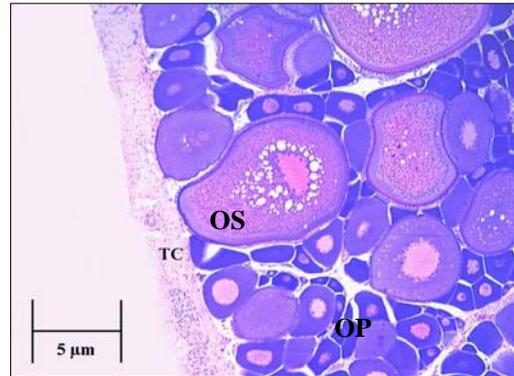


Figura 1. Aspecto macroscópico de um ovário de *Trachurus trachurus* em pós-desova, recolhido em Peniche.

Cada ovário está envolvido numa fina membrana – túnica albugínea (Figura 2) – composta por células fibrosas e tecido conjuntivo, onde se encontra grande número de vasos

sanguíneos. Externamente a esta membrana, e envolvendo todo o ovário existe uma camada de tecido germinativo.

Figura 2. Revestimento exterior do ovário (túnica albugínea), formado por tecido conjuntivo (TC), oócitos primários (OP) e secundários (OS).



Internamente, cada ovário possui uma cavidade central ao longo de todo o comprimento – lúmen – para onde converge um grande número de septos ováricos (Figura 3). Nestes septos encontram-se os oócitos, em diferentes estados de desenvolvimento. Os de menores dimensões aparecem dentro de pequenos cistos, enquanto que os maiores são envolvidos por estruturas a que se dá o nome de folículos.

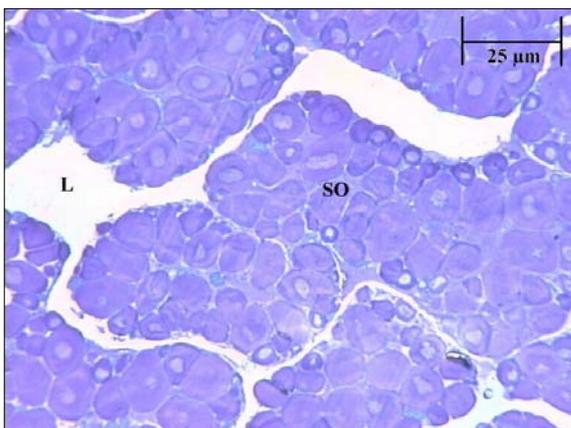


Figura 3. Aspecto da organização geral do ovário, onde se distingue o lúmen (L) e os septos ováricos (SO).

A formação e desenvolvimento destas estruturas decorre durante o processo denominado **oogénese**, que compreende 3 fases, multiplicação, crescimento e maturação, cujas características são as seguintes:

Na fase de multiplicação as células germinativas primordiais, de forma arredondada, com um núcleo redondo central onde mal se distinguem os nucléolos, formam cristas para o interior do lúmen e originam (por divisão mitótica) as oogónias. Estas são células com pouco citoplasma e também com um núcleo central mas onde se distingue um grande nucléolo; nos exemplares colhidos não se observaram oogónias.

A fase de crescimento inicia-se com o desencadear da meiose, quando ocorre o emparelhamento dos cromossomas homólogos, originando os oócitos primários, com núcleo central onde se distingue, na periferia, uma coroa de nucléolos (Figura 4).

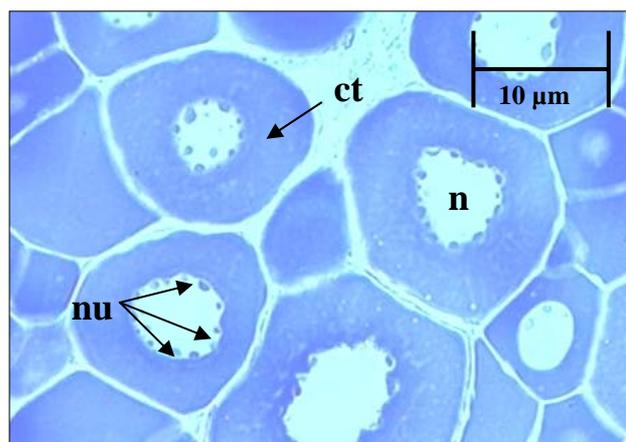


Figura 4. Aspecto geral de um ovário com oócitos no início da fase de crescimento (n – núcleo; nu – nucléolos; ct – citoplasma).

A segunda fase de crescimento caracteriza-se pela evolução dos folículos, externamente aos oócitos, os quais são constituídos por três camadas: a mais exterior, denominada teca, é formada por tecido conjuntivo; a camada intermédia, granulosa (que pode ser simples ou estratificada), é responsável pela deposição de vitelo e produção de hormonas e a mais interior, a radiata ou zona pelúcida, que tem inicialmente a forma de lamela fina mas cuja espessura vai aumentando com o desenvolvimento do oócito e que é atravessada por inúmeros canais perpendiculares à superfície (Figura 5), cuja função é de permitir a passagem

das microvilosidades do oócito e das células foliculares, através das quais se dá a passagem de substâncias de origem exógena (Ramos, 1986).

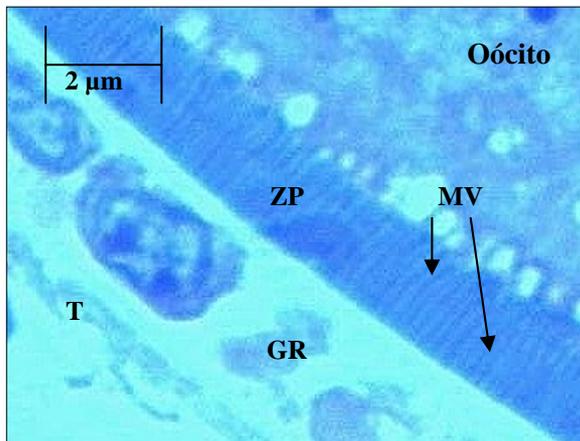


Figura 5. Folículo que reveste o oócito: teca (T), células da granulosa (GR) e zona pelúcida (ZP), onde se distinguem as microvilosidades (MV).

A fase de crescimento completa-se com a vitelogénese, que leva à formação dos oócitos secundários, a qual consiste no armazenamento de grande quantidade de nutrientes (a partir da síntese de componentes celulares exteriores ao oócito), que formam o vitelo, principal fornecedor de energia para o desenvolvimento embrionário (Ramos, 1999). Nesta fase podem observar-se muitas gotas lipídicas de pequenas dimensões rodeando o núcleo (Figura 6).

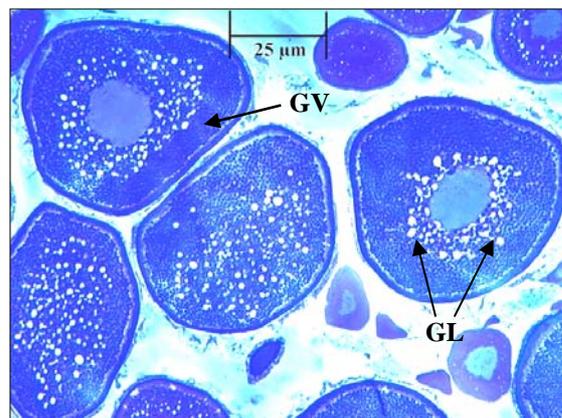


Figura 6. Oócitos com grânulos de vitelo (GV) e gotas lipídicas (GL) acumulados no citoplasma.

Estas gotas lipídicas aumentam em número e tamanho e vão-se fundindo, formando gotas maiores, localizadas geralmente apenas de um dos lados do núcleo, que inicia a sua migração para o polo animal (Figura 7).

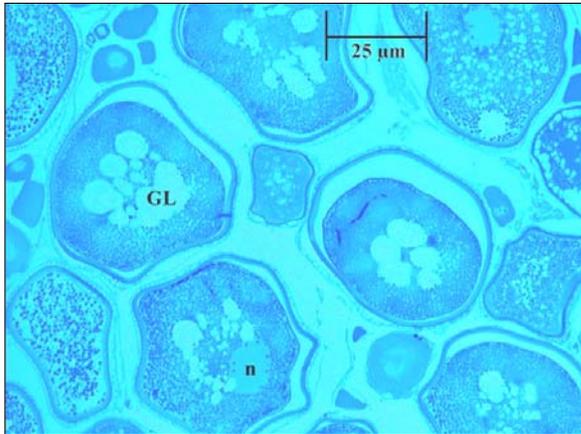


Figura 7. Oócitos com gotas lipídicas (GL) em aglutinação em redor do núcleo (n), que inicia a sua deslocação para o polo animal.

A fase de maturação inicia-se com a fusão das proteínas e das gotas lipídicas, que passam a apresentar a forma de placas (Figura 8). O núcleo termina a migração para o polo animal, perde a sua forma esférica e a membrana nuclear começa a desintegrar-se (Figura 9); a maturação final atinge-se com a hidratação do oócito, que consiste na absorção de fluídos através de microvilosidades da membrana plasmática (Figura 10).

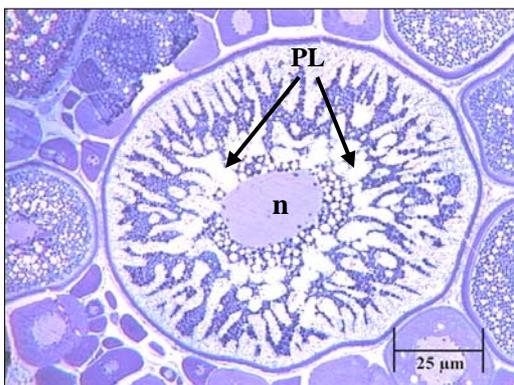


Figura 8. Oócito com o núcleo (n) no final da migração para o polo animal e onde se observam placas lipídicas (PL).

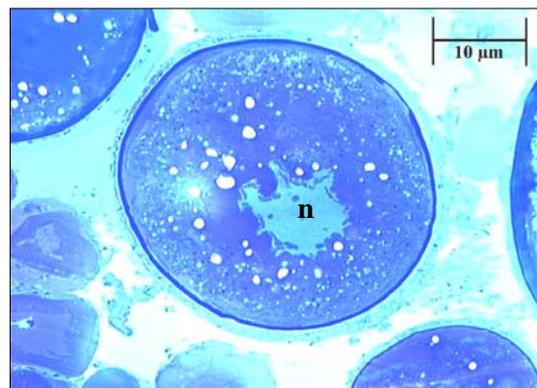


Figura 9. Oócito em que o núcleo (n) perdeu a forma esférica, devido à desintegração da membrana nuclear.



Figura 10. Oócito hidratado (oh).

Terminada a oogénese, o folículo rompe-se e tem lugar a ovulação. Pode ocorrer também a degeneração dos oócitos não emitidos, que permanecem no ovário sob a forma de oócitos atréticos (Figura 11), caracterizados pelo espessamento da parede do oócito (zona pelúcida) e consequente contracção do citoplasma. Estes oócitos serão posteriormente reabsorvidos pelas células foliculares da granulosa (Figura 12), embora se possam por vezes encontrar no ovário oócitos do ano anterior (Figura 13).

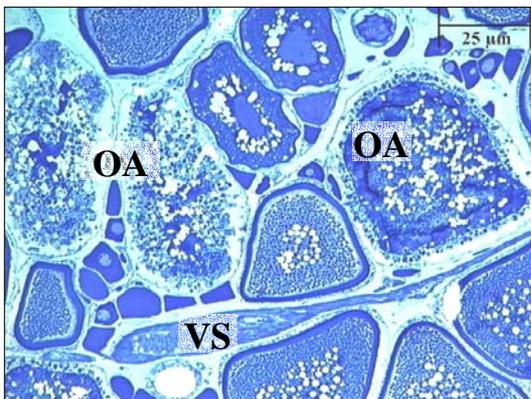


Figura 11. Ovário com oócitos atréticos (OA) e um grande vaso sanguíneo (VS).

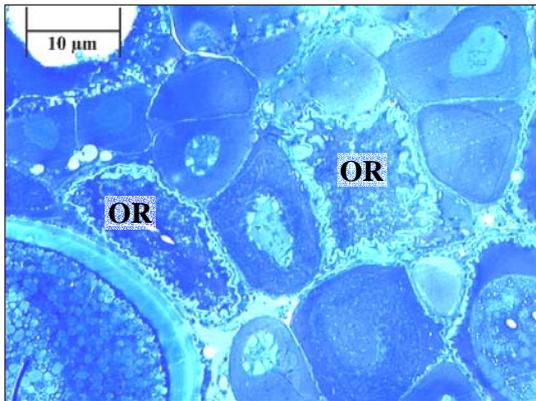


Figura 12. Ovário com oócitos em reabsorção (OR).

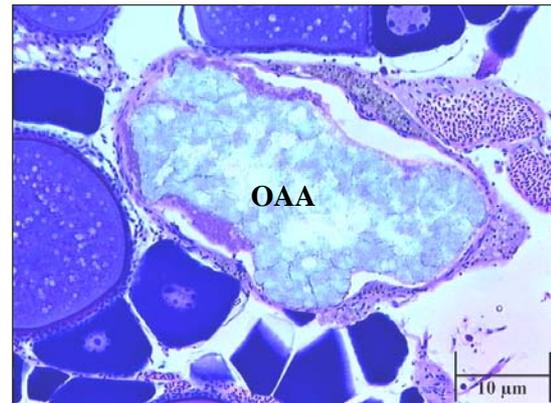


Figura 13. Oócito do ano anterior (OAA).

Os machos possuem dois testículos alongados, mais altos na zona central e afunilando na região posterior, com maior espessura na região dorsal do que na ventral (Figura 14).

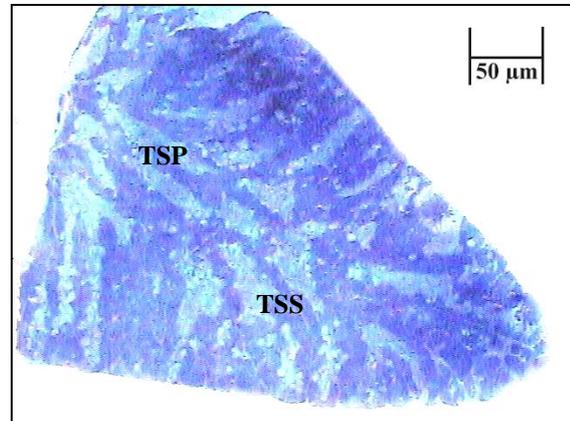


Figura 14. Testículos em estado 5 de um carapau recolhido em Peniche.

Os testículos são envolvidos por uma membrana muito fina – mesotélio – que cobre o estroma – tecido conjuntivo onde se encontram os tubos seminíferos e as células intersticiais. Os tubos seminíferos são de dois tipos: (a) primários, que se estendem dorso-ventralmente desde o ducto testicular principal ao longo da superfície dorsal do testículo; (b) secundários, que têm origem nos primários e se estendem lateralmente, terminando debaixo da túnica

albugínea (Figura 15). Todos os tubos seminíferos se reúnem num ducto, chamado ducto espermático, que transporta o esperma para o exterior.

Figura 15. Pormenor da extremidade de um testículo, onde se identificam o tubo seminífero principal (TSP) e os tubos seminíferos secundários (TSS).



Durante a **espermatogénese** as células germinais primordiais diferenciam-se, originando as espermatogónias, as quais sofrem transformações que vão dar origem às células reprodutoras masculinas: os espermatozóides. Estas transformações podem ser agrupadas em duas fases: multiplicação celular e meiose.

As células iniciais – células germinais primordiais – são esféricas, com um núcleo onde se distingue um grande nucléolo central e formam normalmente densos grupos. A divisão mitótica destas células dá origem às espermatogónias, semelhantes às anteriores, mas menores e com pouco citoplasma (Figura 16).

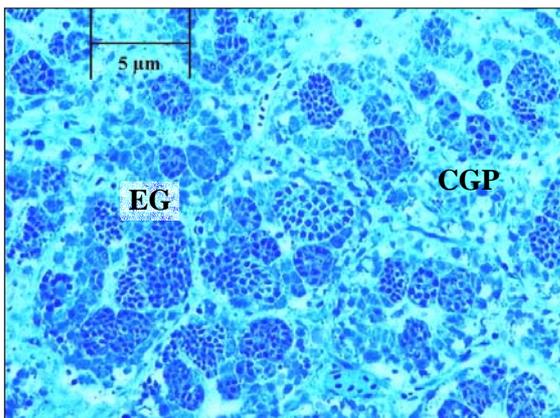


Figura 16. Espermatogónias (EG) disseminadas numa massa de células germinais primordiais (CGP).

Estas células mantêm-se junto à membrana basal e sofrem dois tipos de divisão: mitoticamente originam os espermatócitos primários, caracterizados pelo aspecto dos cromossomas, que se apresentam em novelo; e por meiose formam-se os espermatócitos secundários, células de dimensões inferiores àquelas e com a cromatina nuclear em forma de grânulos (Figura 17).

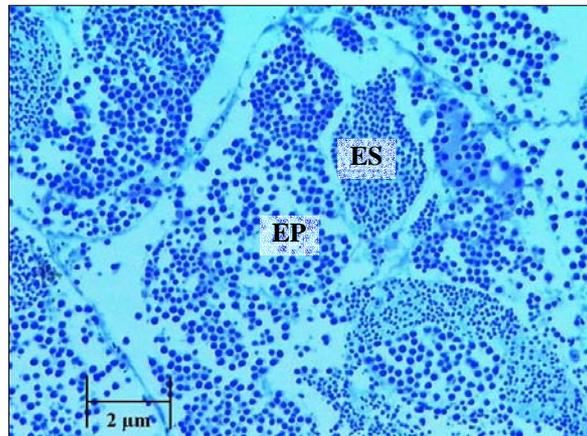


Figura 17. Cistos de espermatócitos primários (EP) e secundários (ES).

A partir dos espermatócitos secundários originam-se os dois estados finais da diferenciação das células sexuais masculinas: espermatídeos e espermatozóides (Figura 18).

A formação dos espermatozóides (Figura 19) engloba a aquisição de uma cauda ou flagelo, a modificação da célula arredondada numa célula alongada e a redução do volume de água, tudo para dar maior mobilidade à nova célula.

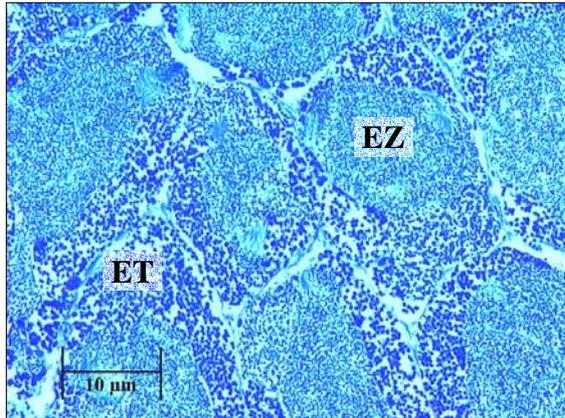


Figura 18. Aspecto de um testículo onde se identificam grupos de espermatídeos (ET) e espermatozóides (EZ).

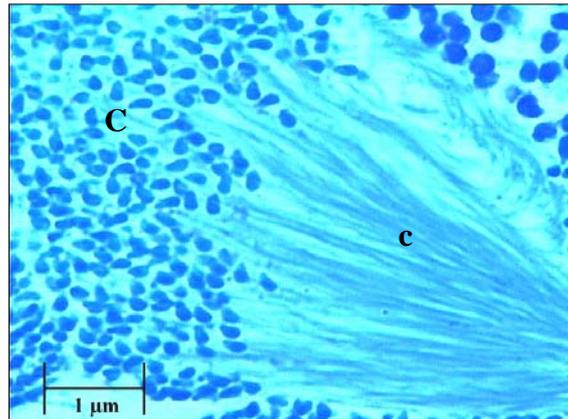


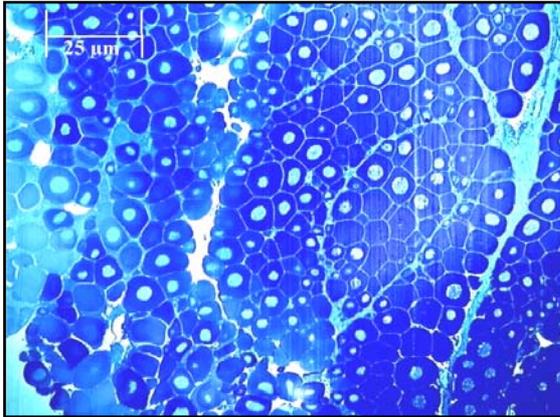
Figura 19. Grupo de espermatozóides, com as características cabeças alongadas (C) e caudas compridas(c).

2. Escala de maturação microscópica

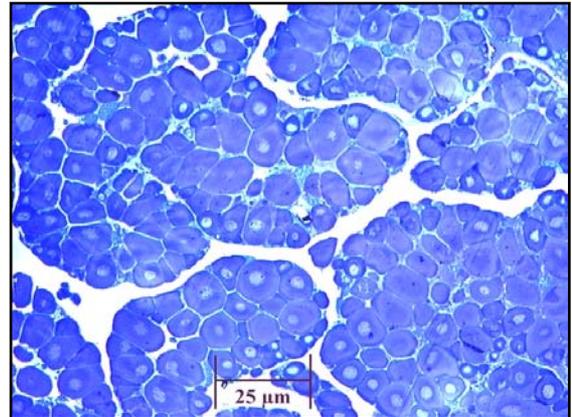
Com base na observação microscópica dos ovários e testículos e na avaliação do desenvolvimento das suas estruturas internas, elaborou-se uma escala de maturação microscópica para ambos os sexos, a qual deverá complementar a identificação do estado de maturação de cada indivíduo, em particular sempre que surjam dúvidas na identificação macroscópica. A descrição de cada estado encontra-se na Tabela I e o respectivo aspecto microscópico está representado nas Figuras 20 e 21.

Tabela I. Escala de maturação microscópica e respectiva descrição de cada estado.

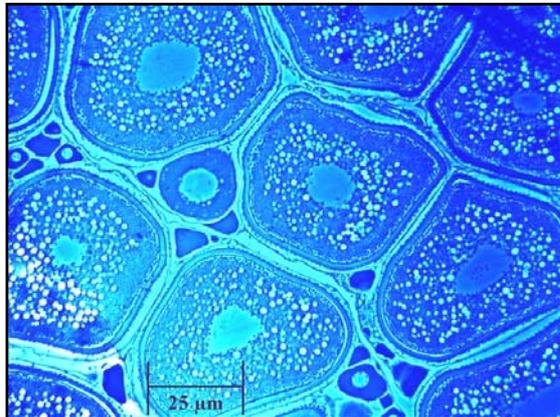
ESTADOS DE MATURAÇÃO	DESCRIÇÃO MICROSCÓPICA
<p>1. Imaturo</p>	<p>Ovários pequenos, com cristas de pequenos oócitos primários formadas na direcção do lúmen; sem FPO's nem estados de atresia.</p> <p>Tubos seminíferos com as paredes forradas por células germinais primordiais e separados por tecido intersticial em camadas finas</p>
<p>2. Início do desenvolvimento / Final da recuperação</p>	<p>Oócitos primários maiores do que os do estado anterior, com um grande núcleo, alguns já em início de vitelogénese, mas com o citoplasma sem gotas lipídicas; quando em recuperação podem ser visíveis restos de FPO's ou oócitos atréticos</p> <p>Tubos seminíferos contendo uma massa de células germinais primordiais, com um núcleo onde se distingue um grande nucléolo; disseminadas nesta massa identificam-se outras células menores e com pouco citoplasma - as espermatogónias</p>
<p>3. Final do desenvolvimento (Pré-desova)</p>	<p>A maior parte dos oócitos encontra-se em vitelogénese, apresentando gotas lipídicas no citoplasma; na fase mais avançada estas gotas encontram-se fundidas em placas situadas de um dos lados do núcleo; sem FPO's nem atresia</p> <p>Tubos seminíferos com espermatócitos primários e secundários, menores que os anteriores, e espermatídeos, todas células esféricas, sendo estas últimas bastante mais pequenas que as restantes</p>
<p>4. Maduro (Desova)</p>	<p>Grande quantidade de oócitos em maturação final, com aspecto hidratado, presentes no ovário, embora misturados com outros oócitos secundários</p> <p>Tubos seminíferos cheios de espermatozóides, podendo, no entanto, identificar-se em pequeno número outros estados de desenvolvimento mais atrasados</p>
<p>5. Esgotado (Pós-Desova)</p>	<p>Poucos oócitos vitelados, deixando grandes espaços vazios; FPO's presentes em número variável; pode ocorrer atresia</p> <p>As paredes dos tubos seminíferos começam a engrossar; ainda se observa uma grande quantidade de espermatozóides</p>
<p>6. Início da recuperação</p>	<p>A maior parte dos oócitos apresenta-se em atresia, observando-se igualmente alguns oócitos em início de vitelogénese, com pequenas gotas lipídicas presentes no citoplasma; muitas células sanguíneas visíveis</p> <p>Tubos seminíferos com paredes fortemente espessadas mas com espaços vazios deixados pela reabsorção dos espermatozóides</p>



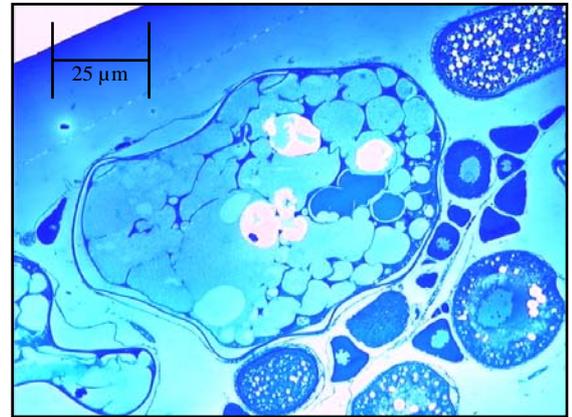
F 1



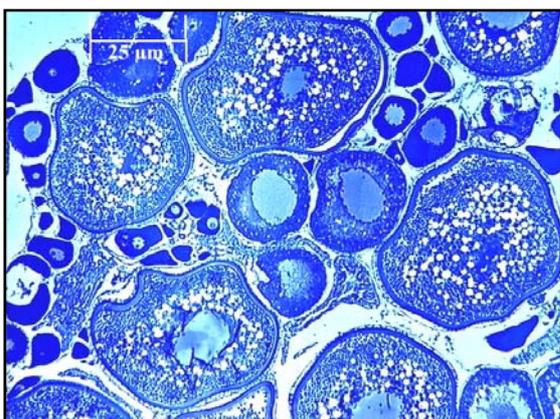
F 2



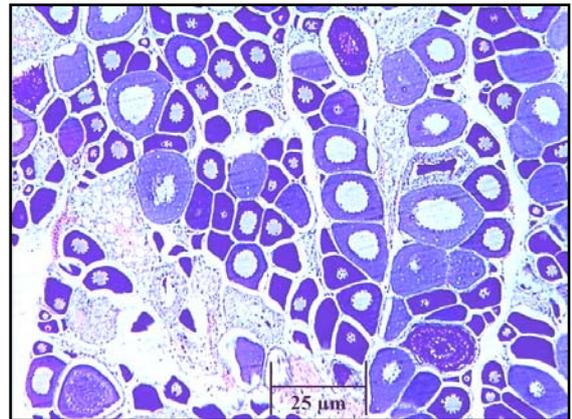
F 3



F 4

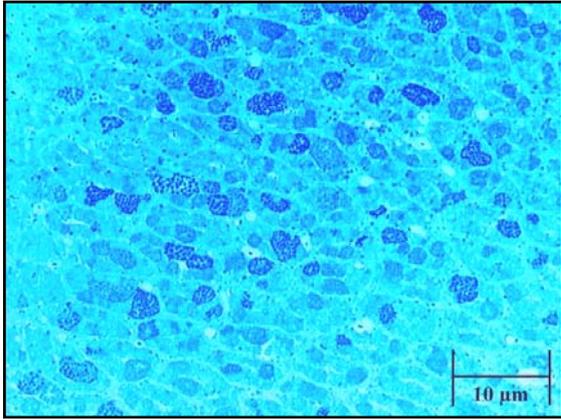


F 5

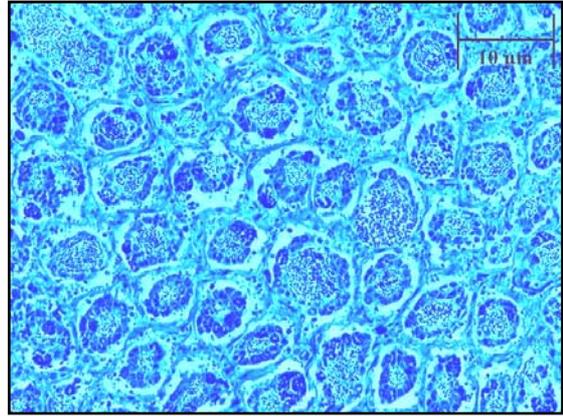


F 6

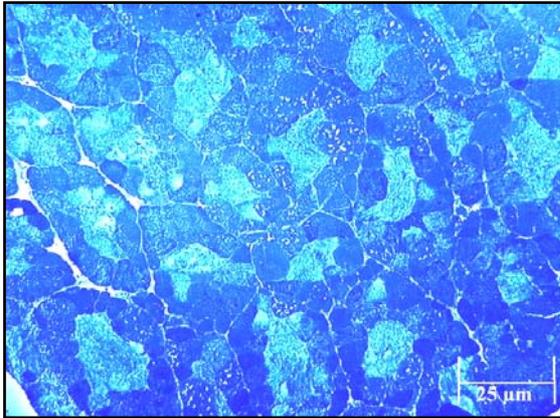
Figura 20. Aspecto microscópico dos estados de maturação das fêmeas



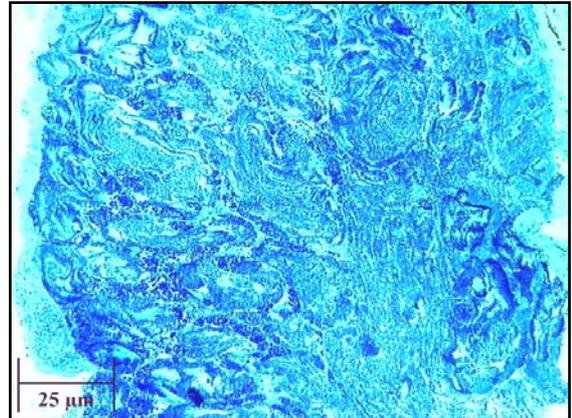
M 1



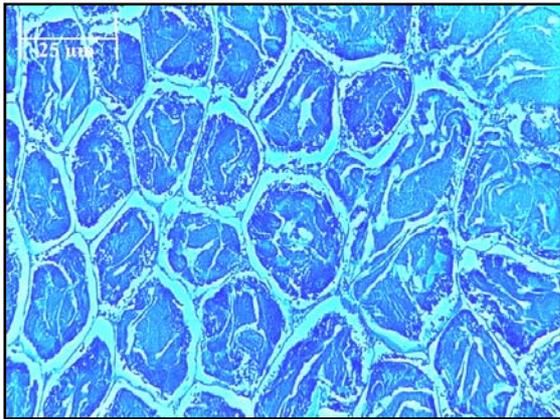
M 2



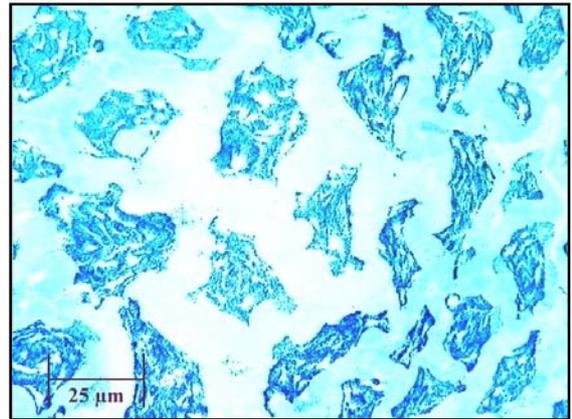
M 3



M 4



M 5



M 6

Figura 21. Aspecto microscópico dos estados de maturação dos machos

DISCUSSÃO

Da observação dos cortes histológicos verificámos que durante a oogénese ocorrem modificações na estrutura do citoplasma, do núcleo do oócito e do folículo. Após o crescimento oocitário, decorre a vitelogénese, que consiste na síntese e acumulação de componentes celulares exteriores ao oócito. Estas substâncias de reserva formam o vitelo e são armazenadas como nutrientes, principal fonte de energia durante o desenvolvimento embrionário (Ramos, 1999). No decorrer da espermatogénese verifica-se o desenvolvimento das células germinativas masculinas dentro de cistos formados pelas células de Sertoli. Mitoses sucessivas produzem células filhas cada vez mais pequenas, as quais vão sofrendo transformações que consistem na reorganização do citoplasma e do núcleo, até se atingir o estado final de diferenciação, com o aspecto de uma célula alongada e com um flagelo.

O carapau é uma espécie em que as células germinativas não amadurecem em simultâneo, sendo visível na mesma gónada, em particular nos ovários, onde este aspecto é mais evidente, células em diferentes graus de desenvolvimento. Este desenvolvimento assíncrono pode ser indicativo de uma espécie com mais do que um período de desova.

Este estudo permitiu verificar que ocorrem por vezes incorrecções na identificação macroscópica, visto a observação histológica mostrar características que não são identificáveis macroscopicamente mas que invalidam esta identificação. Os maiores problemas surgem ao identificar os estados 2 (Início do desenvolvimento ou Final da recuperação) e 6 (Início da recuperação) e ao distinguir os estados 3 (Pré-postura) e 5 (Pós-postura); estes dois casos são aqueles em que a identificação microscópica é mais importante.

Tendo em atenção o que ficou dito sobre o diferente desenvolvimento das células germinativas em cada gónada, a identificação dos estados de maturação deverá sempre ser feita com base no tipo de estruturas que se apresentam em maior percentagem, embora a identificação macroscópica seja um pouco subjectiva; no caso dos machos, a definição do estado de maturação de cada indivíduo é ainda mais difícil, tanto macroscopicamente como microscopicamente.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

GRASSÉ, P.P., 1958. *Traité de Zoologie; Anatomie, Systématique, Biologie*. Tome XIII – Agnathes et Poissons; Anatomie, Éthologie, Systématique. Fascicule II: 1565-1652; 1685-1754; Fascicule III: 2204-2396. Masson et Cie. Ed. – Paris.

HOAR, W.S.; D.J. RANDALL e E.M. DONALDSON (Ed.), 1983. *Fish Physiology*, Vol. IX – Reproduction. Part A – Endocrine Tissues and Hormones. Ed. W.S. Hoar, Academic Press, New York and London: 223-275.

RAMOS, M.A., 1986. Contribuição para o conhecimento da ultraestrutura do oócito e do funcionamento da gónada da dourada (*Sparus aurata* L., Pisces, Perciformes). Dissertação apresentada no INIP para acesso à categoria de Investigador Auxiliar, 123 pp.

RAMOS, M.A., 1996. Base fisiológica da indução da maturação final e da ovulação em *Sparus aurata* L. *Bol. Inst. Port. Marít.*, Lisboa, 2: 85-90.

RAMOS, M.A., 1999. Estado ultrastrutural do oócito de *Sparus aurata* L., durante a vitelogénese. *Relat. Cient. Téc. Inst. Invest. Pescas Mar*, nº 46, 8pp.