

**Aspectos reprodutivos de *Sphoeroides greeleyi* (Gilbert),
Pisces, Osteichthyes, Tetraodontidae, da gamboa do
Baguaçu, Baía De Paranaguá, Paraná, Brasil**

Yart Damasceno Schultz^{1, 2}

Luís Fernando Favaro²

Henry Louis Spach³

ABSTRACT: Reproductive aspects of *Sphoeroides greeleyi* (Gilbert), Tetraodontidae, from gamboa do Baguaçu, Paranaguá, State of Paraná, Brazil. The present study analyses the reproductive aspects of *Sphoeroides greeleyi* (Gilbert, 1900), such as morphology and histochemistry of carbohydrates in the oogenesis phases, maturity scale, time and type of spawn, sexual rate and first ripened mature size for females. From the monthly captured animals (Nov 1998 to Nov 1999) the morphometric data (entire length and total weight) were extracted and the sex and the gonadal maturity were determined. Some ovaries were prepared for microscopic analysis that characterized six phases for the development of the ovarian follicles. Through the carbohydrates analysis the acid carbohydrates could be related to the oogenesis maintenance and the neutral carbohydrates to the beginning of embryonic development. A maturity scale containing six stages of gonadal development was determined. The reproductive period is between August and January and the spawn time is from October to January. The first ripened mature size for females occurs between 6,5cm and 7.5 cm of total length. The sexual rate shows that there are more females than males during the reproductive period.

KEY WORDS. Fish, reproduction, histology, histochemistry

Estuários são áreas de extrema importância no crescimento e alimentação para juvenis e larvas de inúmeras espécies de peixes e invertebrados (BARBIERI *et al.* 1991).

Canais no manguezal, chamados gamboas, são característicos de planícies litorâneas dos complexos estuarinos da região sudeste-sul do Brasil. São vias importantes para fluxo de matéria orgânica entre continente e estuário, são também importantes para o desenvolvimento de exemplares jovens de peixes e crustáceos, visto tratarem-se de áreas usadas para alimentação e refúgio (LANA *et al.* 1989).

O processo reprodutivo é de fundamental importância para se conhecer a biologia das espécies ícticas e visa um acréscimo de novos indivíduos as populações, mantendo assim as espécies (SILVA & ESPER 1991). Através dos estudos de reprodução é possível se determinar tipo, local, época de desova e tamanho mínimo dos indivíduos envolvidos neste processo (SUZUKI & AGOSTINHO 1997).

1) Bolsista de Iniciação Científica, PIBIC (CNPq).

2) Departamento de Biologia Celular, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná. Caixa Postal 19031, 81531-990 Curitiba, Paraná, Brasil.

3) Centro de Estudos do Mar, Universidade Federal do Paraná. Avenida Beira Mar, 83255-000 Pontal do Paraná, Paraná, Brasil.

O baiacu *Spherooides greeleyi* (Gilbert, 1900) (Tetraodontidae), importante na manutenção da cadeia trófica, se manteve constante em sondagens preliminares, fato que possibilitou a realização de um estudo sobre ciclo reprodutivo. Tal espécie distribuiu-se da Venezuela à Santa Catarina sendo raramente capturada em águas profundas, habitando geralmente substratos lodosos e arenosos.

A família Tetraodontidae compreende indivíduos que possuem os dentes fundidos, formando quatro placas. Tais indivíduos exibem a capacidade de inflar o corpo como forma de defesa através da ingestão de água ou ar. Peixes desta família possuem a tetrodotoxina, uma potente ictiotoxina encontrada na pele, fígado e gônadas, onde atua como ferormônio (MATSUMURA 1995). Por este motivo não são apreciados para o consumo, mas de grande importância no equilíbrio trófico de ecossistemas aquáticos apresentando como hábito alimentar invertebrado sésseis.

O presente estudo tem como objetivos descrever morfologicamente os folículos ovarianos, caracterizando as diferentes fases que constituem a ovogênese, detectar os grandes grupos de carboidratos (neutros e ácidos) na ovogênese, descrever uma escala de maturidade para a espécie em questão, determinar a época da desova, proporção sexual e tamanho de primeira maturação em fêmeas.

MATERIAL E MÉTODOS

Durante o período de novembro de 1998 a novembro de 1999, na gamboa do Baguaçu (Baía de Paranaguá), foram realizadas coletas mensais totalizando 562 indivíduos de *Spherooides greeleyi*, sendo utilizada uma rede fixa do tipo "Fike" (30 m x 1,50 m), com malha de 10 mm e 8 mm.

De cada exemplar coletado, foram retirados os dados morfométricos (comprimento total e peso total), sendo posteriormente seccionados ventralmente para a exposição das gônada para determinação do sexo e do estágio de maturação gonadal, segundo a escala de identificação de estádios para teleósteos (VAZZOLER 1996).

As gônadas foram retiradas e pesadas, sendo que 175 destas foram fixadas em Bouin por 18 horas, incluídas em parafina para posterior análise em microscopia de luz. Os cortes histológicos, com 5µm de espessura, foram corados com Hematoxilina-Eosina (HE) para descrição morfológica das diferentes fases de desenvolvimento do folículo ovariano, determinação dos estádios de maturação gonadal, para fêmeas, e, caso necessário, correção da análise macroscópica.

Para os cortes histológicos submetidos a detecção de carboidratos, foram utilizados as seguintes técnicas de coloração: 1) Ácido Periódico-Schiff (PAS), utilizado para detecção de carboidratos neutros. As lâminas foram tratadas com Ácido Periódico a 0,5% por 15 minutos, Reativo de Schiff por 30 minutos e posteriormente tratadas com Água Sulfurosa (três banhos de 15 minutos); 2) Alcian Blue pH 2,5, (AB pH 2,5), utilizado para detecção de carboidratos ácidos sulfatados e carboxilados; 3) Alcian Blue pH 1,0, (AB pH 1,0), para detecção de carboidratos ácidos sulfatados; 4) Controles.

Para a reação do Ácido Periódico-Schiff (PAS) as lâminas controles não foram submetidas ao ácido periódico durante a reação.

A coloração com Alcian Blue pH 2,5 e 1,0 tiveram como controle a reação de metilação.

Foram realizados os cálculos da proporção sexual mensal (utilizando-se o teste do X^2 com 5% de significância) baseado em VAZZOLER (1996).

O comprimento de primeira maturação sexual (Cpm) para fêmeas foi determinado através da curva que relaciona o ponto médio das classes de comprimento total com a frequência relativa de indivíduos adultos. Para o ajuste da referida curva, utilizou-se a equação:

$$Fr = 1 - e^{-aL_s^b}$$

onde: (Fr) frequência relativa de indivíduos adultos, (e) base do logaritmo neperiano, (a e b) coeficientes estimados pela transformação das variáveis e (L_s) ponto médio das classes de comprimento.

A Relação Gônado-Somático (RGS), percentual que as gônadas representam em relação ao peso total, definido pela fórmula: $RGS = (\text{peso das gônadas/peso total}) \times 100$, foi determinado separadamente para machos e fêmeas. Através da variação temporal das médias mensais da RGS, determinou-se a Curva de Maturação.

RESULTADOS

Ovogênese

Através da análise histológica foram caracterizadas 6 fases de desenvolvimento dos folículos ovarianos, utilizando como critérios o tamanho comparativo dos folículos ovarianos, afinidade por corantes, surgimento das células foliculares e da membrana vitelina, vesículas citoplasmáticas e grânulos de vitelo (Fig. 1).

Fase I (ovogônias): células de tamanho reduzido, citoplasma escasso, núcleo grande e sem afinidade por corantes contendo nucléolo único, basófilo e central (Fig. 1A).

Fase II: ovócito mais volumoso, com citoplasma basófilo; núcleo contendo vários nucléolos na sua periferia; células foliculares apresentam-se como uma camada única e pavimentosa envolvendo o ovócito e não sofrem alteração no decorrer do processo (Fig. 1B).

Fase III: ovócitos mostram o seu diâmetro aumentado se comparado a fase anterior; o citoplasma apresenta uma perda na sua basofilia, surgem um grande número de vesículas inicialmente distribuídas na periferia e posteriormente ocupando todo o citoplasma. O núcleo não sofre alterações visíveis; surge a membrana vitelina como uma camada acelular e acidófila entre a camada de células foliculares e o ovócito (Fig. 1C).

Fase IV: esta fase é caracterizada pela presença de dois tipos de inclusões citoplasmáticas no ovócito: as vesículas citoplasmáticas e os grânulos de vitelo; a membrana vitelina sofre um espessamento sendo possível a visualização de duas camadas com afinidade diferente para eosina (interna mais corada e externa menos corada), ambas as camadas apresentam estrias transversais (Fig. 1C).

Fase V: o ovócito sofre um aumento de volume; o citoplasma apresenta-se repleto de grânulos de vitelo acidófilos; o núcleo apresenta o seu contorno irregular contendo diversos nucléolos basófilos na periferia; a membrana vitelina permanece inalterada (Fig. 1D).

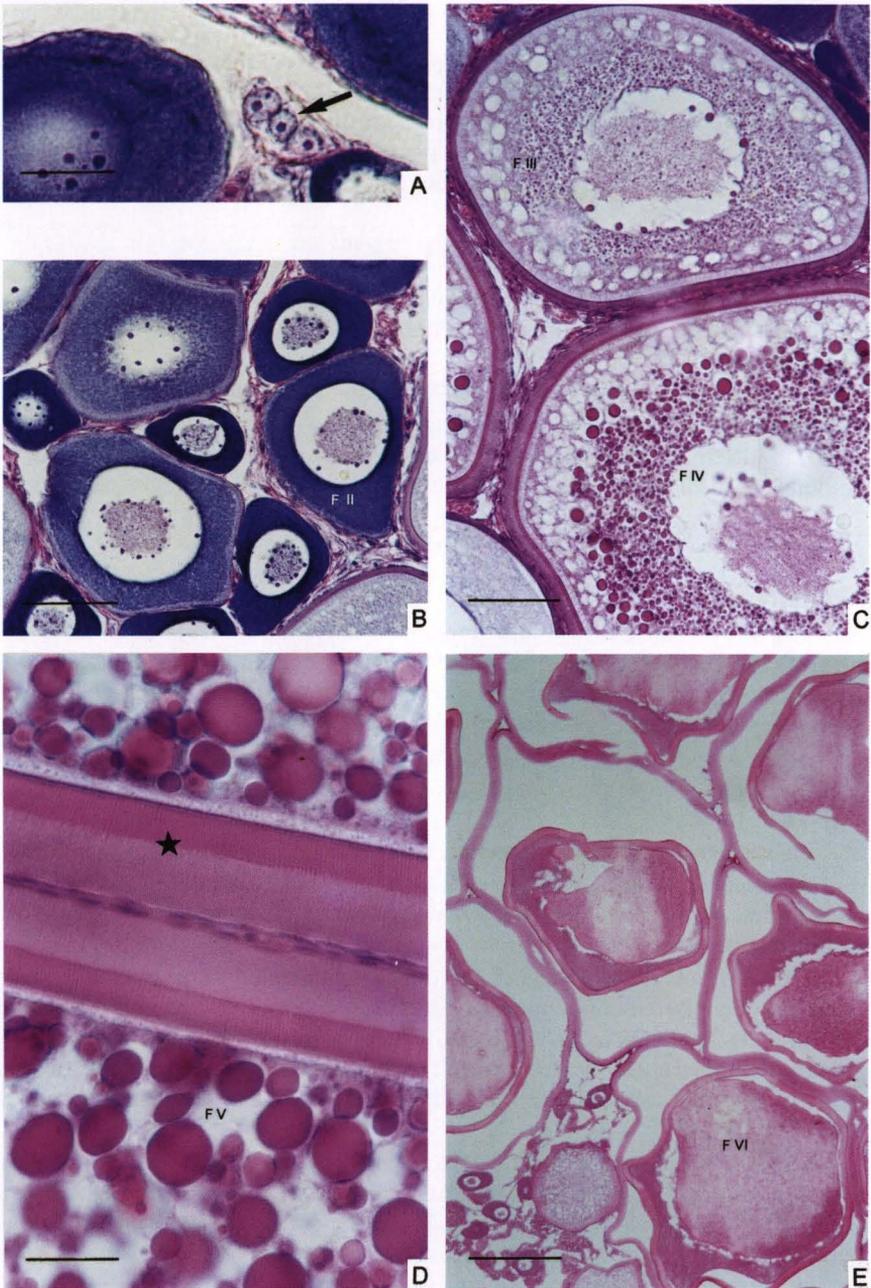


Fig. 1. (A) Oogônia (seta) HE, escala = 20 µm; (B) folículo ovariano fase II (F II) HE, escala = 50 µm; (C) folículo ovariano fase III (F III) e fase IV (F IV) HE, escala = 50 µm; (D) contato entre folículos na fase V (F V), membrana vitelina (*) HE, escala = 20 µm; (E) folículos ovarianos hialinizados (F VI) HE, escala = 200 µm.

Fase VI: (hialinizados) nesta fase ocorre a hidratação do ovócito fazendo com que ocorra a fusão dos grânulos de vitelo no citoplasma, o qual apresenta aspecto manchado róseo; o núcleo é de difícil visualização devido ao grande aumento de volume sofrido pelo ovócito (Fig. 1E).

Folículos atrésicos e vazios não foram considerados como fase de desenvolvimento no processo de ovogênese.

Detecção de carboidratos nos folículos ovarianos

A análise citoquímica demonstrou que os carboidratos neutros foram detectados em todas as fases do folículo ovariano, apresentando reação intensa na membrana vitelina e grânulos de vitelo. Os carboidratos ácidos (carboxilados e sulfatados) surgem na fase II do folículo ovariano, diminuindo no decorrer do processo de ovogênese (Fig. 2).

Os dados das reações para detecção de carboidratos encontram-se resumidos na tabela I.

Tabela I. Detecção de carboidratos na ovogênese. Dados obtidos utilizando as colorações Ácido Periódico-Schiff, Alcian Blue pH 2,5 e pH 1,0. (+) Reação positiva suave, (++) reação positiva forte, (-) reação negativa, (cf) células foliculares, (ct) citoplasma do ovócito, (mv) membrana vitelina, (mvi) camada interna da membrana vitelina, (mve) camada externa da membrana vitelina, (vc) vesículas citoplasmáticas, (gv) grânulos de vitelo.

Fases	Estruturas	Técnicas empregadas		
		PAS	AB pH 2,5	AB pH 1,0
I		-	-	-
II	Cf	+	+	+
	ct	+	+	+
III	cf	+	+	+
	ct	+	+	+
	mv	+	-	-
	vc	-	-	-
IV	Cf	+	+	+
	Ct	+	-	+
	Mvi	+	-	-
	Mve	+	-	-
	Vc	-	-	-
	Gv	+	-	-
V	cf	+	+	+
	mvi	+	-	-
	mve	+	-	-
	gv	+	-	-
VI	cf	+	+	+
	Ct	+	-	+
	mvi	+	-	-
	mve	+	-	-

Escala de Maturidade – desenvolvimento ovariano

O desenvolvimento ovariano foi descrito tendo como critérios a quantidade de folículos e as diferentes fases de desenvolvimento presentes no ovário. Foram caracterizados seis diferentes estádios de maturação ovariana (Fig. 3).

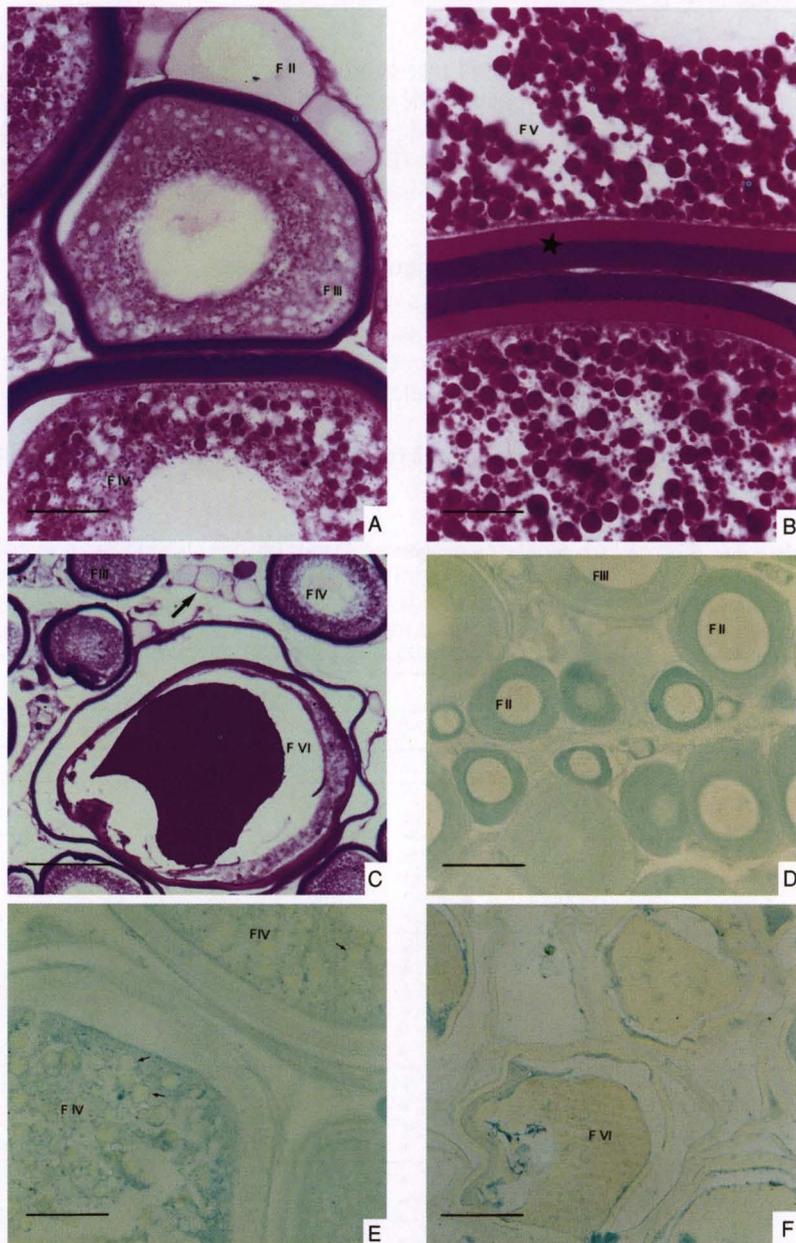


Fig. 2. (A) Folículos ovarianos nas fases II, III, IV (F II, F III, F IV) PAS, escala = 50 μ m; (B) contato entre folículos na fase V (F V), membrana vitelina (*) PAS, escala = 50 μ m; (C) folículos nas fases II (seta), III (F III), fase IV (F IV) PAS, escala = 200 μ m; (D) folículos nas fases II (F II) e III (F III) AB pH 2,5, escala = 50 μ m; (E) folículos na fase IV (F IV), grânulos de vitelo (seta) AB pH 2,5, escala = 50 μ m; (F) folículos ovarianos na fase VI (F VI) AB pH 2,5, escala = 200 μ m.

Estádio A (imaturo): lamelas ovíferas com um grande número de ovócitos em fase II e ovogônias (fase I) agrupadas em ninhos (Fig. 3A).

Estádio B (maturação): neste estágio foram abundantes os ovócitos nas fases III e IV, ocorrendo também ovócitos em fase II em menor quantidade (Fig. 3B).

Estádio C (maduro): caracterizado pela presença de muitos ovócitos nas fases V e VI (hialinizados), e poucos em fase IV. Ovócitos em fase II ainda estão presentes formando o estoque de reserva (Fig. 3C e D).

Estádio D (semi-desovado): folículos vazios e ovócitos nas fases III e IV em grande quantidade. Folículos na fase II, observados em menor quantidade (Fig. 3E).

Estádio E (desovado): gônada desorganizada, sendo observados espaços entre as lamelas nas quais encontram-se folículos vazios em grande quantidade, alguns folículos atrésicos e ovócitos em fase II e poucos ninhos de ovogônias (Fig. 3F).

Estádio F (recuperação): gônada contendo lamelas espaçadas entre si com ovogônias e ovócitos na fase II, ausência de folículos vazios.

Ciclo reprodutivo, tipo de desova e proporção sexual

Através da análise da curva de maturação e da frequência relativa dos estádios de desenvolvimento ovariano, determinou-se que o período reprodutivo estende-se de agosto a janeiro (Fig. 4). A maior percentagem de indivíduos maduros foi encontrada entre os meses de setembro a dezembro. No período de janeiro a agosto, indivíduos em maturação e desovados foram encontrados em maior número (Fig. 5).

A espécie apresenta desova do tipo parcelada, a qual foi caracterizada através da análise histológica, onde foram observados ovários semi-desovados.

Foi observado que o tamanho no qual 50% das fêmeas iniciam o processo reprodutivo corresponde a 7,02cm de comprimento total (Fig. 6). A curva do tamanho de primeira maturação foi estimada a partir da transformação linear, dada pela equação: $Y=6,1572X-12,369$ ($R^2 = 0,96130$) e ajustada pela equação: $fr = 1 - e^{-4,2482 \times 10^{-6} Lt 6,1572}$.

A espécie estudada apresentou proporção sexual de 1:1 apenas nos meses de janeiro, fevereiro e março. No período reprodutivo o número de fêmeas foi superior ao de machos (Tab. II).

Tabela II. Proporção sexual por mês de indivíduos de *Spherooides greeleyi*.

Mês	Machos		Fêmeas		χ^2
	Absoluto	Porcentagem	Absoluto	Porcentagem	
Novembro/1998	6	12,25	44	87,75	57,00
Dezembro/1998	4	12,90	27	87,10	55,06
Janeiro/1999	21	43,75	28	56,25	1,56 *
Fevereiro/1999	14	43,75	18	56,25	1,56 *
Março/1999	20	50,00	20	50,00	0,00 *
Abril/1999	2	11,11	15	88,89	60,50
Maió/1999	14	28,00	37	72,00	19,36
Junho/1999	8	19,05	39	80,95	38,31
Julho/1999	4	23,53	14	76,47	28,03
Agosto/1999	16	32,65	34	67,35	12,04
Setembro/1999	9	18,00	41	82,00	40,96
Outubro/1999	9	15,00	51	85,00	49,00
Novembro/1999	5	10,00	45	90,00	64,00

*) Não significativo.

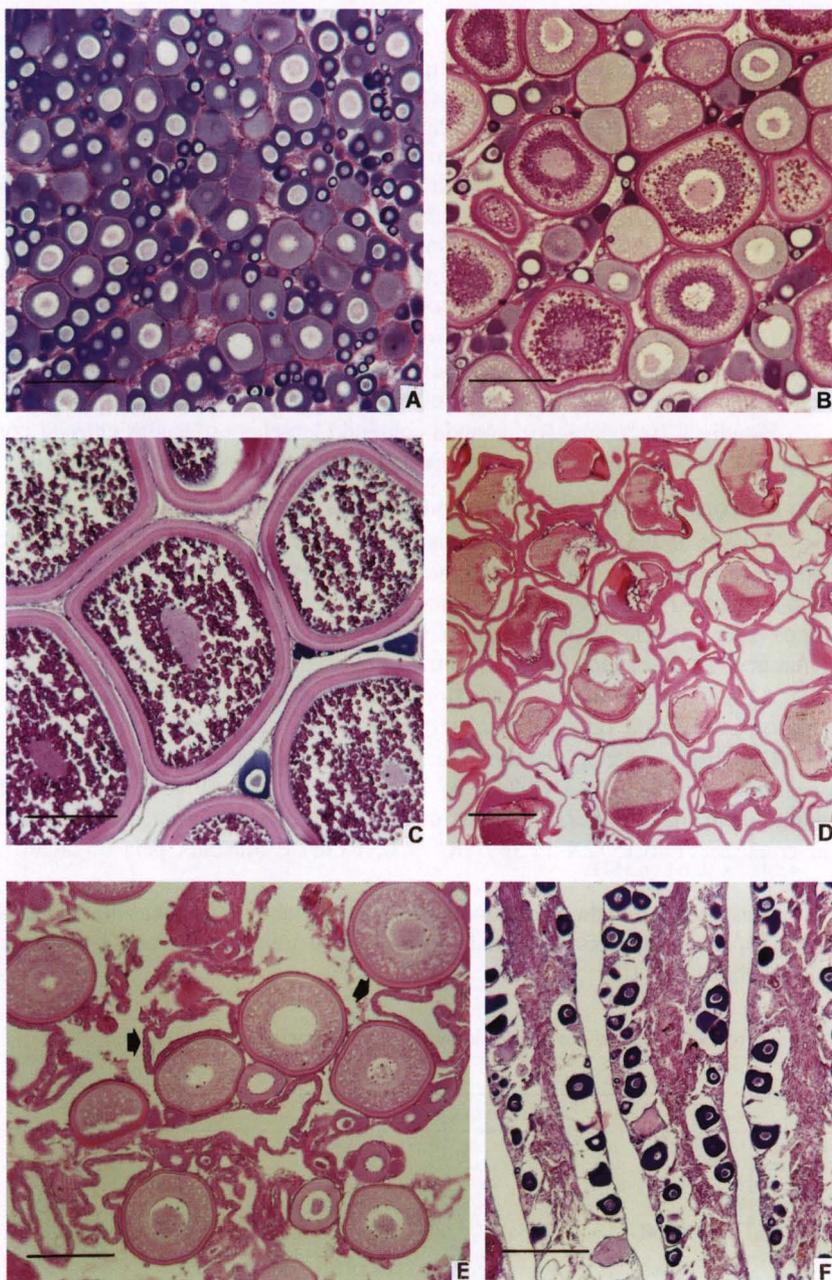


Fig. 3. Cortes histológicas de ovários de *Spherooides greeleyi* corados com HE. (A) Imaturo, escala = 200 μ m; (B) maturação, escala = 200 μ m; (C) maduro, escala = 200 μ m; (D) maduro, escala = 400 μ m; (E) semi-desovada, folículos vazios (seta), escala = 200 μ m; (F) desovada, escala = 200 μ m.

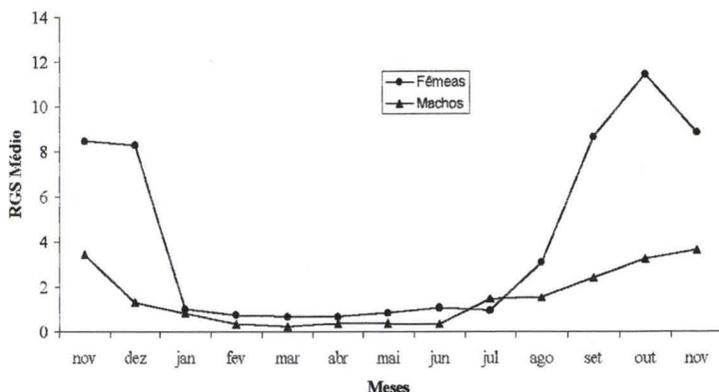


Fig. 4. Curva de maturação para machos e fêmeas de *Spherooides greeleyi*.

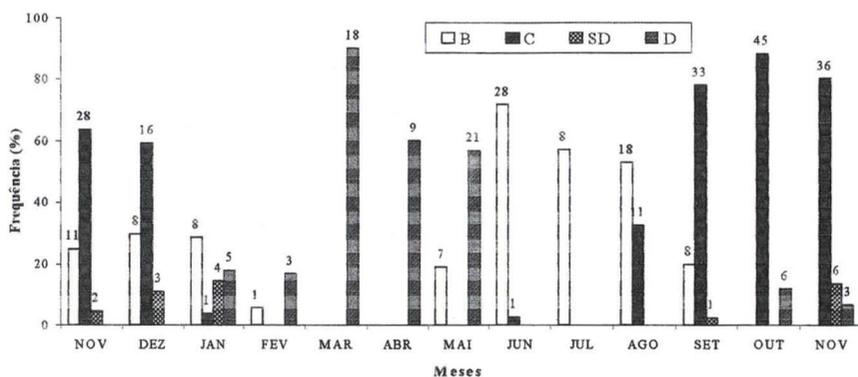


Fig. 5. Percentagem de estádios de maturação gonadal por estações do ano (novembro 1998 a novembro 1999). (B) Maturação, (C) maduro, (D) desovado, (SD) semi-desovado. Os números localizados em cima das barras, correspondem ao número de indivíduos.

DISCUSSÃO

Os trabalhos envolvendo o gênero *Spherooides* [Lacepède], 1798, estão em sua maioria relacionados com taxonomia e alimentação, sendo poucos os que relatam características da biologia reprodutiva das espécies.

A determinação do número de fases de desenvolvimento do folículo ovariano depende dos critérios utilizados pelos diversos autores. Para *Spherooides greeleyi* foram determinadas seis fases desenvolvimento, utilizando-se como critérios o tamanho dos folículos, surgimento da membrana vitelina e células foliculares, afinidade por corantes e surgimento de inclusões citoplasmáticas (vesículas e grânulos).

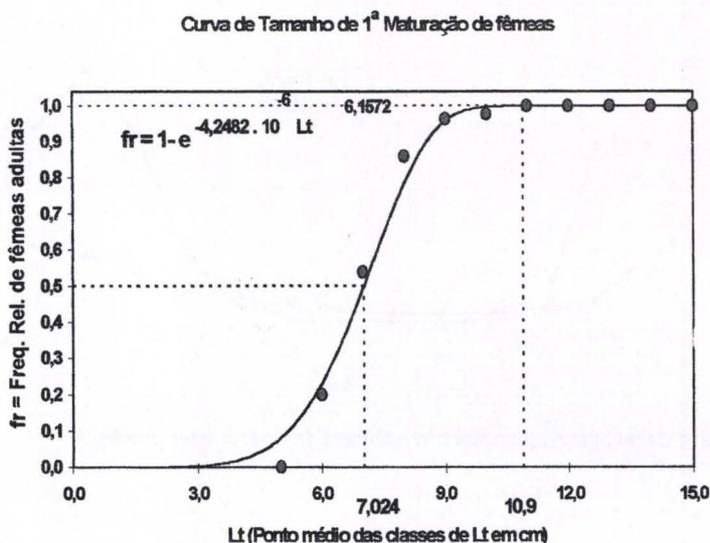


Fig. 6. Tamanho médio de primeira maturação para fêmeas de *Spherooides greeleyi*.

A descrição das diferentes fases da ovogênese é importante na determinação microscópica da escala de maturidade para a espécie em questão, auxiliando na determinação do tipo e época de desova.

A utilização de técnicas de microscopia para corrigir as possíveis falhas da análise macroscópica é tratada por DIAS *et al.* (1998), visto que somente a análise macroscópica das gônadas permite inferir uma maior quantidade de erros.

CHAVES (1989) demonstra uma relação direta de ovócitos hialinizados (hidratação pré-ovulatória) com espécies marinhas, podendo tal processo ocorrer nos peixes dulcícolas após a desova. Em *Spherooides greeleyi*, cortes histológicos destes ovócitos foram de difícil obtenção, que segundo SILVA & ESPER (1991), está relacionado aos fixadores provocarem exsmose nos cortes contendo ovócitos hialinizados, causando redução do volume e deformando as células.

Poucos indivíduos em *Spherooides greeleyi* foram encontrados contendo nas gônadas ovócitos hialinizados, sugerindo que a hidratação pré-ovulatória, ocorra de maneira muito rápida antes da liberação do ovócito.

A detecção de açúcares demonstrou que carboidratos ácidos estão presentes em grande quantidade nas fases iniciais de desenvolvimento do folículo ovariano, diminuindo nas fases finais (V e VI), estando relacionados com a manutenção do processo de ovogênese.

Através de análise morfológica foi possível a detecção de duas camadas na membrana vitelina, tal característica foi também observada por BARA (1960), POLLARD (1972) e NARAHARA (1983) *apud* AGOSTINHO *et al.* (1987) e MAYER (1988).

Na análise citoquímica, a membrana vitelina manteve o caráter duplo, sendo que a camada externa reagiu de maneira muito intensa ao PAS e a interna apresentou uma reação suave. O mesmo não ocorreu no trabalho de MAYER (1988), com

Dicentrarchus labrax (Linnaeus, 1758), que detectou reação forte a PAS na camada externa e reação negativa na interna. Comparando estas espécies, pode-se demonstrar a distribuição diferenciada de carboidratos neutros na mesma estrutura.

A detecção de carboidratos neutros em grande quantidade na membrana vitelina e grânulos de vitelo nas fases finais da ovogênese, sugerem estes estarem associados ao reconhecimento do espermatozóide específico e manutenção do processo de desenvolvimento embrionário respectivamente.

Através da análise dos dados da curva de maturação e da frequência relativa dos estádios de desenvolvimento gonadal, foi definido o período reprodutivo como sendo a época em que ocorre o aumento na frequência de indivíduos maduros e semi-desovados que, para *Spherooides greeleyi*, corresponde aos meses de agosto a janeiro. Este período compreende as estações de primavera e verão, onde são encontradas as maiores médias de temperatura.

A época de desova corresponde aos meses de novembro a janeiro, onde foram encontradas as maiores porcentagens de indivíduos no estágio semi-desovado e a ocorrência de indivíduos desovados. Segundo DIAS *et al.* (1998), apenas a presença de folículos pós-ovulatórios (folículos vazios) e de ovócitos hidratados são indicadores seguros respectivamente de desova recente ou eminente.

Para determinação do estágio semi-desovado utilizou-se como critério a análise microscópica das gônadas sendo consideradas como semi-desovadas apenas as gônada nas quais foram encontrados folículos vazios e ovócitos nas fases III e IV em grandes quantidades.

As variações na curva de maturação para machos e fêmeas mostram-se semelhantes, demonstrando que ambos iniciam o período reprodutivo na mesma época. Através dos dados de proporção sexual pode-se detectar que o número de fêmeas é superior ao de machos durante a maior parte do ano, sendo igual apenas nos meses de janeiro, fevereiro e março que correspondem ao final do período reprodutivo e pós-desova.

Como forma integrante do estudo da biologia reprodutiva da espécie, foi determinado o tamanho de primeira maturação para fêmeas o qual é utilizado para espécies comerciais determinando o menor tamanho em que os indivíduos podem ser capturados. No presente estudo foram considerados jovens aqueles indivíduos cujas gônadas foram encontradas no estágio imaturo (A), e adultos os peixes cujas gônadas já tivessem iniciado a maturação (B), segundo VAZZOLER (1996). Para *S. greeleyi*, cujo valor comercial é baixo, mas que apresenta grande importância na cadeia trófica, este dado pode ser aplicado nos estudos de comunidades demonstrando como a espécie utiliza áreas do estuário.

Agradecimentos: CNPq e FUNPAR

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGOSTINHO, A.A.; M.C. BARBIERI; G. BARBIERI & C.S. AGOSTINHO. 1987. Biologia reprodutiva de *Rhinelepis aspera* (AGASSIZ, 1829) (Teleostei, Loricariidae) no Rio Paranapanema. II. Estrutura dos ovários e estádios de maturação. *Rev. Brasil. Biol.* 47 (3): 319-328.

- BARBIERI, L.R.R.; J.V. ANDREATA; M.A. SANTOS; M.H.C. SILVA; A.S.C. SEBILIA & R. SANTOS. 1991. Distribuição e ciclo de vida das espécies de peixes mais abundantes na laguna de Marapendí, Rio de Janeiro, Brasil. **Revta bras. Zool.** 7 (3): 223-243.
- CHAVES, P.T.C. 1989. Hidratação pré ovulatória em peixes: Um caráter de origem marinha? **Revta bras. Zool.** 6 (3): 463-472.
- DIAS, J.F.; E. PERES-RIO; P.T.C. CHAVES & C.L.D.B. ROSSI-WONGTSCHOWSKI. 1998. Análise macroscópica dos ovários de teleósteos: problemas de classificação e recomendações de procedimentos. **Rev. Brasil. Biol.** 58 (1): 55-69.
- LANA, P.C.; M.V.O. ALMEIDA; C.S. FREITAS; L.M. PODE; A.L. GONZALEZ-PERONTI; A.G. GILES; M.J.S. LOPES; M.H. SILVA; E.C.G. COUTO & L.A. PEDROSO. 1989. Estrutura espacial de associações macrobênticas sublitorais da Gamboa Perequê (Pontal do Sul, Paraná). **Nerítica**, Curitiba, 4 (1): 119-136.
- MATSUMURA, K. 1995. Tetrodotoxin as a Pheromone. **Nature** 378: 563-564.
- MAYER, I.; S.E. SHACKLEY & J.S. RYLAND. 1988. Aspects of the reproductive biology of the bass, *Dicentrarchus labrax* L. I. An histological and histochemical study of oocyte development. **Jour. Fish Biol.**, London, 33: 609-622.
- SILVA, R.M.P.C. & M.L.P. ESPER. 1991. Observações sobre o desenvolvimento citomorfológico dos ovários de Tainha, *Mugil platanus* (Gunther) da Baía de Paranaguá (Brasil). **Acta Biol. Paraná**, Curitiba, 20 (1-4): 15-39.
- SUZUKI, H.I. & A.A. AGOSTINHO. 1997. Reprodução de Peixes do Reservatório de segredo, p. 163-181. In: A.A. AGOSTINHO & L.C. GOMES (Eds). **Reservatório de segredo bases ecológicas para o manejo**. EDUEM, Maringá, 387p.
- VAZZOLER, A.E.A.M. 1996. **Biologia Reprodutiva de Peixes Teleósteos: Teoria e Prática**. Maringá, Ed. Univ. Estadual de Maringá, 196p.

Recebido em 19.XI.2000; aceito em 24.I.2002.