

AULA PRÁTICA: OBSERVAÇÃO DE GLÂNDULAS ENDÓCRINAS

Para a confecção das lâminas que serão analisadas na aula prática foram adotados os procedimentos abaixo descritos.

Os animais foram anestesiados com benzocaína e em seguida foi realizada uma incisão antero-posterior na região abdominal para a retirada das gônadas. Para a retirada da hipófise, a parte superior da cabeça do animal foi aberta, o encéfalo foi rebatido e na seqüência, a hipófise, que é uma estrutura ventral ao hipotálamo foi retirada. Os tecidos foram imersos em solução de Bouin acético (ácido pícrico, formol e ácido acético glacial) onde foram mantidos por cerca de 20-24 horas. Em seguida, as peças foram transferidas para álcool etílico (70%) onde permaneceram até o processamento histológico.

1 – Protocolo de análises de histológica de gônadas (ovários e testículos) e hipófise.

1.1 – Inclusão do material biológico.

Para a inclusão do material biológico, os tecidos fixados passaram por imersão em uma bateria de álcool e xilol para a desidratação desse material e em seguida, todos os tecidos foram infiltrados e incluídos em *paraplast* (*Erv-Plast* – Erviegas Instrumental Cirúrgico Ltda), para posterior secção no micrótomo.

Este procedimento foi realizado para a hipófise, ovários e testículos.

1.2 – Secção do material biológico.

A secção do material biológico foi realizada em micrótomo (Leica – RM/2155), equipado com lâminas descartáveis. As secções foram obtidas com 5µm de espessura. Os cortes obtidos foram montados em lâminas com poli-lisina (*Poly-Lysine Solution Sigma Diagnostics INS, St. Louis M.O. USA*) diluída em 1:5 (em água destilada). Esta solução auxilia a fixação dos cortes nas lâminas. Em seguida, iniciou-se o procedimento de coloração do tecido.

1.3 – Técnicas rotineiras de colorações segundo Behmer *et al.*, (1976).

1.3.1 – Hematoxilina e Eosina/Metanil-Yellow

As lâminas montadas com os tecidos passam por imersão em xilol e hidratação em concentrações decrescentes de álcool até chegar em água corrente. O material foi corado com hematoxilina-eosina ou metanil-yellow, desidratado e diafanizado e montado em lâmina com goma Damar.

2 – Protocolo de análises de imuno-histoquímica de hipófise.

2.1 – Inclusão e Secção do material biológico.

Este procedimento foi o mesmo descrito acima.

2.2 – Técnicas de Imuno-histoquímica.

Para as reações de imuno-histoquímicas, as secções histológicas seriadas obtidas da hipófise foram processadas de acordo com o método SABC (*Streptavidin-Biotin-peroxidase Complex*), que compreende a aplicação de um anticorpo secundário marcado com biotina, seguido da adição do complexo avidina-biotina-peroxidase. A revelação é feita com 3,3 – diaminobenzidina (DAB). Em seguida, os cortes foram desidratados e as lâminas montadas também com goma Damar.

Referência para consulta:

Behmer, O. A.; Tolosa, E. M. C. & Neto, A. G. F. 1976. *Manual de técnicas para histologia normal e patológica*. EDART. São Paulo. Livraria Editora Ltda. 239p.

Roteiro 1

Corte histológico de ovário de teleósteo. Observe as oogônias.

Resposta: Qual seria a função destas células?

Roteiro 2

Corte histológico de ovário de teleósteo. Observe o estágio de maturação e **desenhe** os tipos celulares.

Resposta: Com base nos tipos celulares presentes, você diria que este animal está no início, meio ou final da maturação gonadal? Como chegou a esta conclusão?

Roteiro 3

Corte histológico de ovário de teleósteo. Observe o estágio de maturação e **desenhe** os tipos celulares.

Resposta: Qual seria este estágio de maturação? Quais são os principais hormônios envolvidos com a reprodução, secretados nesta fase?

Roteiro 4

Corte histológico de testículo de teleósteo. Observe a distribuição dos cistos de células germinativas masculinas.

Resposta: Com base na organização do testículo você diria que este animal está no início ou no final do período reprodutivo? Como chegou a esta conclusão?

Roteiro 5

Corte histológico de testículo de teleósteo. Observe a distribuição dos cistos de células germinativas masculinas.

Resposta: Com base na organização do testículo você diria que este animal está no início ou no final do período reprodutivo? Como chegou a esta conclusão?

Roteiro 6

Corte histológico de gônada de teleósteo hermafrodita. Observe que as células germinativas presentes nas lâminas são tanto do sexo feminino quanto masculino, o que chamamos de intersexo.

Resposta: Em que situações é possível que um animal apresente gônadas com estas características? Como as influências antrópicas podem também gerar animais com esta formação gonadal?

Roteiro 7

Corte histológico de ovário de teleósteo. Observe a estrutura indicada.

Resposta: Qual seria a fase de maturação desta célula? Qual é a estrutura indicada e sua função?

Roteiro 8

Corte histológico de ovário de teleósteo.

Resposta: Qual é a estrutura apontada? Qual é a sua função? Como você destacaria o papel desta estrutura em uma das principais diferenças entre a fertilização de gametas de peixes e de mamíferos?

Roteiro 9

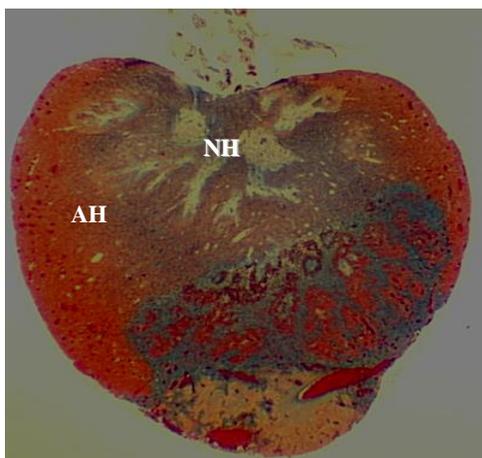
Corte de cérebro de teleósteo. Observe a lâmina atentamente, e considere que as células marcadas em marrom (imunohistoquímica) são produtoras de Hormônio Liberador de Gonadotropinas (GnRH).

Responda: Qual seria este tipo celular? Qual região do cérebro você está observando? E a função deste hormônio?

Roteiro 10

Observe o esquema geral da hipófise de teleósteo (desenho abaixo) e com base nas duas regiões identificadas, neurohipófise (NH) e adenohipófise (AH), desenhe a imagem que você vê na lâmina, identificando estas regiões.

Quais são os diferentes hormônios sintetizados nestas regiões?



Roteiro 11

Corte de hipófise de teleósteo processado pelo método de imunohistoquímica utilizando-se anticorpo da subunidade β da molécula de hormônio luteinizante (LH).

Responda: Qual é função do LH? Quais são os hormônios/fatores que modulam a sua produção?

Roteiro 12

Corte de hipófise de teleósteo processado pelo método de imunohistoquímica utilizando-se anticorpo da subunidade β da molécula de hormônio folículo-estimulante (FSH).

Responda: Qual é função do FSH? Quais são os hormônios/fatores que modulam a sua produção?

Roteiro 13

Corte de hipófise de teleósteo processado pelo método de imunohistoquímica utilizando-se anticorpo da subunidade α da molécula de hormônio luteinizante (LH).

Responda: Como você relacionaria o resultado observado na lâmina com o anticorpo utilizado? E com as lâminas observadas nos roteiros 11 e 12?