
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
(ZOOLOGIA)**

**HISTÓRIA NATURAL DE *Macrobrachium amazonicum* (HELLER, 1862)
(DECAPODA: PALAEMONIDAE) E SUA IMPORTÂNCIA EM
RESERVATÓRIOS NEOTROPICAIS DO SUDESTE BRASILEIRO**

LUCAS REZENDE PENIDO PASCHOAL

Tese apresentada ao Instituto de Biociências do Câmpus de Rio Claro, Universidade Estadual Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de doutor em Ciências Biológicas (Zoologia)

Setembro - 2017

LUCAS REZENDE PENIDO PASCHOAL

**HISTÓRIA NATURAL DE *Macrobrachium amazonicum* (HELLER, 1862)
(DECAPODA: PALAEMONIDAE) E SUA IMPORTÂNCIA EM
RESERVATÓRIOS NEOTROPICAIS DO SUDESTE BRASILEIRO**

Tese apresentada ao Instituto de
Biotecnologia do Câmpus de Rio
Claro, Universidade Estadual
Paulista, como parte dos requisitos
para obtenção do título de doutor
em Ciências Biológicas (Zoologia)

Orientador: Prof. Dr. Fernando José Zara

Setembro - 2017

500.9 Paschoal, Lucas Rezende Penido
P279h História natural de *Macrobrachium amazonicum* (Heller, 1862) (Decapoda: Palaemonidae) e sua importância em reservatórios neotropicais do sudeste brasileiro / Lucas Rezende Penido Paschoal. - Rio Claro, 2017
320 f. : il., figs., gráfs., tabs.

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências de Rio Claro
Orientador: Fernando José Zara
1. História natural. 2. Camarão amazônico. 3. Fenótipos. 4. Sistemas reprodutores. 5. Ambientes lênticos. 6. Caridea. I. Título.



CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA TESE: **BIOLOGIA E ECOLOGIA DE *Macrobrachium amazonicum* (Heller, 1862) (DECAPODA: PALAEMONIDAE) E SUA IMPORTÂNCIA EM RESERVATÓRIOS NEOTROPICAIS**

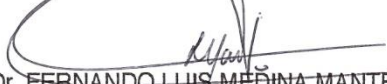
AUTOR: LUCAS REZENDE PENIDO PASCHOAL

ORIENTADOR: FERNANDO JOSÉ ZARA

Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de Doutor em CIÊNCIAS BIOLÓGICAS (ZOOLOGIA), pela Comissão Examinadora:



Prof. Dr. FERNANDO JOSÉ ZARA
Departamento de Biologia Aplicada à Agropecuária / FCAV / UNESP - Jaboticabal



Prof. Dr. FERNANDO LUIS MEDINA MANTELATTO
Departamento de Biologia / Faculdade de Filosofia Ciências e Letras de Ribeirão Preto



Prof. Dr. ROGERIO CAETANO DA COSTA
Departamento de Ciências Biológicas / Faculdade de Ciências de Bauru/ UNESP



Pós Doutorando JOÃO ALBERTO FARINELLI PANTALEÃO
Departamento de Ciências Biológicas / UNESP - CAMPUS DE BAURU



Prof. Dr. ABNER CARVALHO BATISTA
Departamento de Ciências Biológicas / FC/UNESP, Bauru-SP

Rio Claro, 04 de setembro de 2017

Título alterado para: **História natural de *Macrobrachium amazonicum* (Heller, 1862) (Decapoda: Palaemonidae) e sua importância em reservatórios neotropicais do Sudeste Brasileiro.**

Dedico este trabalho ao meu pai (*In memoriam*), minha mãe e minha noiva Michele, por sempre acreditarem em mim.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador Prof. Dr. Fernando José Zara pela amizade, oportunidade, aprendizado e principalmente pela confiança depositada durante o desenvolvimento do presente estudo. Obrigado pela autonomia conferida, pelos inúmeros puxões de orelhas construtivos e pelo enorme conteúdo que obtive com você ao longo desses anos. Muito obrigado, de coração.

A Coordenadoria de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) por ter concedido a bolsa de doutorado. Aos auxílios vinculados que possibilitaram que o presente trabalho pudesse ser realizado com sucesso, CAPES Ciências do Mar (CIMAR) II (Proc. #1989/2014) e a Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) (Proc. #2010/50188-8 e 2016/25344-2).

Ao Ministério do Meio Ambiente, IBAMA (Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis) por conceder as licenças para as coletas (nº 34587-1 e 47653-1).

Ao programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Zoologia), ao Departamento de Zoologia e ao Instituto de Biociências de Rio Claro (IBB – UNESP).

Ao Departamento de Biologia da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Campus de Jaboticabal, pela estrutura fornecida para a realização deste estudo. Aos funcionários desse departamento que me ajudaram de alguma forma, em especial a secretária Márcia e ao Aldo e Dona Lucinda, da zeladoria.

Ao laboratório de microscopia eletrônica da FCAV UNESP/Jaboticabal pelo suporte técnico destinado ao processamento de material para microscopia eletrônica de varredura muito utilizada ao decorrer do estudo e pela disponibilização do microscópio eletrônico de transmissão.

Ao Setor de Carcinicultura do Centro de Aquicultura da UNESP (CAUNESP) pela doação dos animais anfídromos utilizados neste estudo. Ao Prof. Dr. Wagner Valenti por permitir as inúmeras doações e utilização das instalações do CAUNESP. Ao técnico José Roberto Polachini (Robertão) e ao zootecnista Baltasar Garcia Neto (Balta) pela ajuda com a obtenção dos espécimes utilizados ao decorrer do estudo e pelas conversas produtivas envolvendo a espécie estudada.

A Agência Unesp de Inovação (AUIN) pelo auxílio com o processo de patenteabilidade dos equipamentos produzidos ao decorrer da tese. A Me. Fabíola Spiandorello pela enorme paciência e por conduzir tais processos.

Ao Me. Valter M. Azevedo Santos, pela amizade, presteza e por identificar os peixes capturados para análise de conteúdo estomacal.

Ao Me. Thor Andreas Silva Di Sessa, pela amizade e por me ensinar as técnicas de microcultivo e auxiliar as preparações que foram fundamentais para o reconhecimento do microsporídio que infectava o camarão estudado.

Ao Prof. Dr. Carlos Azevedo pelo auxílio na identificação do microsporídio e pelas inúmeras dicas que ajudaram na confecção do capítulo envolvendo o parasitismo desse organismo no camarão amazônico.

Ao Laboratório de Hidrobiologia da Universidade Estadual de Minas Gerais (UEMG), Campus de Passos, por disponibilizar toda estrutura para a realização de análises físico-químicas de água e sedimento. Aos Prof. Dr. Norival França, Profa. Dra. Odila Rigolin-Sá e a técnica Keyla Ribeiro pela amizade e por disponibilizar o uso das instalações laboratoriais e a utilização gratuita de reagentes para todas as análises.

Ao Laboratório de Morfologia de Invertebrados (IML), o qual faço parte. Agradeço toda a família IML, em especial a nossa técnica Márcia Mataqueiro, que além de auxiliar nos inúmeros procedimentos laboratoriais, atuou como mãe em muitos momentos. Obrigado pela paciência e pela ajuda fundamental que me proporcionou. Ao Timóteo Watanabe, pelas inúmeras conversas produtivas, shiatzu e pelo insight da intersexualidade na espécie estudada. As meninas do grupo, Tavani Camargo, Camila Assugeni, Maria Alice Bento e Fernanda Salti por toda ajuda com os processos de microscopia, pela paciência e pelas discussões que me ajudaram ao longo do decorrer do estudo. Aos meus dois irmãos, Guilherme Andreoli e Léo Jaime Oliveira pelos inúmeros finais de semanas perdidos comigo para análise de fecundidade, morfometria e índices reprodutivos. Obrigado pela ajuda dentro e fora do laboratório, sem vocês eu não teria conseguido realizar o que pretendia em tempo.

A todos que me auxiliaram durante as coletas mensais de camarões, em especial meu cunhado Antônio Felipe Cardoso e ao Silas Andre e sua família. Obrigado por me ajudar no início de tudo e por disponibilizar atenção e tempo para ajudar minha pesquisa. Obrigado pela companhia no campo e pelas inúmeras vezes

que atolaram na lama para fazer com que esse estudo fosse possível. Ao Douglas Andrade, Thainá Reis, Ivan Villegas e Leandro Padúa, minha mãe e minha noiva que ao menos uma vez entraram na água para me ajudar ao decorrer das coletas.

Aos meus amigos de Minas Gerais, que sempre apoiaram o “Dr. Camarão” não importando a distância. Gabriel e a Fernanda, Felipe, Leandro, Ronilson, Lucas, Mateus, Luiz, Douglas e Valter. Obrigado pela força, amo vocês!

Ao Wade e a Lumi, por todos os “bons dias” que me animavam levantar da cama e me enchiam de felicidade. Obrigado por existirem!

A minha noiva Michele, por toda ajuda tanto nos momentos difíceis quanto nos bons. Obrigado por sempre me ajudar e animar quando eu estava chateado. Obrigado por compartilhar tua vida com a minha. Obrigado por ter sido minha âncora ao longo do decorrer do doutorado. Sem você, não teria conseguido. Te amo muito, muito, muito, muito...

Ao meu irmão Caio, pela ajuda desde o início do meu doutorado e pelo animo que sempre levantava. Obrigado por tudo. Te amo!

A minha mãe, minha parceira e rainha, que sempre me apoiou e participou de algumas coletas. Obrigado por tudo e por acreditar sempre em mim. Te amo, para sempre! Isso aqui é para você!

Ao meu pai, meu mentor, meu guia e melhor amigo que infelizmente não pode ver em Terra seu filho conquistar mais um sonho. Te amo! Obrigado pelo que fez!

Aos que não estão citados aqui ou passaram rapidamente, mas que de alguma forma fizeram parte desta fase da minha vida, muito obrigado.

Finalmente, a todos os brasileiros que tiveram seus impostos convertidos em aplicações na área da educação.

“Quem não pensa como eu, me ajuda a melhorar aquilo que estou pensando ou a confirmar o que eu tenho.”

Mário Sérgio Cortella

“ ...

Sem trabalho e sem luta, a gente não ganha o pão
Sem preguiça e sem moleza, a gente vira patrão
Pra quem gosta de moleza, eu dou sopa de algodão...”

Uma Coisa Puxa Outra - Tião Carreiro e Pardinho

“ ...

I come in the name of Oy, the brave, he of Mid-World!
I come in the name of Eddie Dean, he of New York!
I come in the name of Susannah Dean, she of New York!
I come in the name of Jake Chambers, he of New York, whom I call my own true son!
I am Roland of Gilead, and I come as myself; you will open to me.”

The Dark Tower VII: The Dark Tower - Stephen King

RESUMO

O camarão amazônico *Macrobrachium amazonicum* apresenta populações com grande plasticidade fenotípica e alta variabilidade morfológica e reprodutiva. Três fenótipos são registrados para a espécie, por meio da avaliação de sua história de vida, características morfológicas e reprodutivas, sendo eles: (a) animais anfídromos de grande porte, e (b) hololimnéticos de grande e (c) pequeno porte. Tais características permitem que estes animais ocupem diversos ambientes aquáticos no Brasil. Nos últimos anos, registros de *M. amazonicum* em ambientes dulciaquícolas interiores em diversas regiões brasileiras aumentaram significativamente, principalmente em reservatórios da Bacia do Paraná. Porém, são escassas as informações sobre aspectos bioecológicos e reprodutivos em tais ambientes, assim como faltam estudos abordando a morfo-histologia dos sistemas reprodutores da espécie. Além disso, a plasticidade fenotípica de populações de *M. amazonicum* ainda não é totalmente compreendida. Na presente tese, os padrões anatomo-histológico dos sistemas reprodutores foram analisados nos três fenótipos da espécie, além biologia e a ecologia das populações com diferentes fenótipos provenientes de reservatórios do sudeste brasileiro. Adicionalmente, descreve-se o primeiro registro da intersexualidade e de infecção por microsporídeos em *M. amazonicum*. Independentemente da história de vida e estratégia sexual adotada, todas as populações de camarão amazônico analisadas apresentam padrões anatômicos, histológicos, histoquímicos e ultraestruturais similares para seus sistemas reprodutores. No entanto, fêmeas e machos das populações de pequeno porte tendem a investir mais energia em quesitos reprodutivos, quando comparados a animais de grande porte anfídromos e hololimnéticos. Fêmeas de pequeno porte deslocam mais energia para formação de ovócitos/ovos maiores e para a produção de reservas lipídicas para larvas, enquanto que machos desse fenótipo investem energia na produção e concentração espermática em detrimento da aquisição de armas sexuais. A intersexualidade na espécie é um fenômeno raro (0,06%), associado à disfunção hormonal e/ou mutação genética. Em reservatórios neotropicais as populações hololimnéticas de *M. amazonicum* apresentam dois fenótipos, definidos pela aquisição de armas sexuais: (a) animais de grande e (b) pequeno porte. Pode-se constatar que a espécie é resiliente e que suas populações não apresentam grandes diferenças em sua estrutura, durante eventos de estresse hídrico. Além disso, os aspectos reprodutivos de *M. amazonicum* (fecundidade, taxas de aborto e frequência de fêmeas ovígeras) não são significativamente alterados pelas flutuações dos níveis de água e da pluviosidade promovidas pelo fenômeno climático “El niño”. Em algumas populações da espécie, microsporídios do gênero *Inodosporus*, se desenvolvem dentro das fibras musculares e promovem a “doença do camarão colorido” modificando a natação e o mecanismo de escape dos animais infectados, tornando os camarões mais susceptíveis à predação. A avaliação dos aspectos histomorfológicos e populacionais analisados nos diferentes fenótipos permitiram a compreensão e comparação de processos bioecológicos e reprodutivos para a espécie. Além disso, as lacunas envolvendo a plasticidade fenotípica de populações de *M. amazonicum* foram preenchidas com o presente estudo.

Palavras-chave: camarão amazônico, fenótipos, sistemas reprodutores, ambientes lânticos, Caridea.

ABSTRACT

The Amazon river shrimp *Macrobrachium amazonicum* exhibits populations with great phenotypic plasticity and high morphological and reproductive variability. Three phenotypes are recorded for the species, through the evaluation of their life history, morphological and reproductive characteristics, being: (a) large amphidromous, and (b) large and (c) small hololimnetic animals. These characteristics allow these animals to occupy diverse aquatic environments in Brazil. In recent years, *M. amazonicum* records have increased significantly in continental freshwater environments in Brazil, mainly in reservoirs inserted at the Paraná Basin. However, information on bioecological and reproductive aspects in such environments is scarce. Also, there were no studies evaluating the histomorphology of the reproductive systems in Amazon shrimp. In addition, the phenotypic plasticity of populations of *M. amazonicum* is not yet fully understood. In the present thesis the histoanatomic patterns of the reproductive systems were analyzed in three phenotypes of the species. As well, the biology and ecology of populations with different phenotypes were investigated in reservoirs of the southeastern Brazil. In addition, the first record of intersexuality and microsporidiosis in the species are presented here. Regardless of the life history and sexual strategy adopted, all populations of *M. amazonicum* analyzed present similar anatomical, histological, histochemical and ultrastructural patterns in their reproductive systems. However, females and males of the small populations tend to invest more energy in reproductive aspects when compared to large amphidromous and hololimnetic animals. Small females displace more energy to produce larger oocytes/eggs and lipid reserves for larvae, while males of this phenotype invest energy in sperm production and concentration in the detriment of the acquisition of sexual weapons. Intersexuality in the species is a rare phenomenon (0.06%) associated with hormonal disruption and/or genetic mutation. In neotropical reservoirs the hololimnetic populations of *M. amazonicum* presents two phenotypes, defined by the acquisition of sexual weapons: (a) large and (b) small animals. It can be verified that the species is resilient and that its populations do not present great differences in its structure during hydric stress events. Furthermore, the reproductive aspects of *M. amazonicum* (fecundity, abortion and frequency of ovigerous females) are not significantly altered by the fluctuations of water levels and rainfall promoted by the climatic phenomenon "El niño". In some populations of this species, spores of the *Inodosporus* genus (Microsporidia) develop within the muscle fibers and promote the "color shrimp disease" by modifying the swimming and escape mechanism of the infected animals, making these shrimps more susceptible to predation. The evaluation of the histomorphological and population aspects analyzed in the different phenotypes allowed the understanding and comparison of bioecological and reproductive processes for the species. In addition, the gaps involving the phenotypic plasticity of populations of *M. amazonicum* were filled with the present study.

Keywords: Amazon river shrimp, phenotypes, reproductive systems, lentic environments, Caridea.

SUMÁRIO

Capítulo 1 - Introdução Geral	1
1. Introdução Geral	2
2. Referências	9
Capítulo 2 - Diferenças alométricas e o tamanho do início da maturidade sexual em populações hololimnéticas de <i>Macrobrachium amazonicum</i> (Heller, 1862) com diferentes fenótipos	13
1. Resumo	14
2. Introdução	15
3. Material e métodos	17
4. Resultados	21
5. Discussão	34
6. Conclusão	38
7. Referências	39
8. Material complementar	43
Capítulo 3 - Dinâmica populacional e aspectos reprodutivos de <i>Macrobrachium amazonicum</i> (Heller, 1862) em reservatórios neotropicais em situação de estresse hídrico	52
1. Resumo	53
2. Introdução	54
3. Material e métodos	55
4. Resultados	59
5. Discussão	73
6. Conclusão	76
7. Referências	77

Capítulo 4 - Biologia reprodutiva de *Macrobrachium amazonicum* (Heller, 1862) em populações com diferentes fenótipos em reservatórios neotropicais durante o evento “El niño” 82

1. Resumo	83
2. Introdução	84
3. Material e métodos	86
4. Resultados	91
5. Discussão	105
6. Referências	110

Capítulo 5 - Seco ou úmido? Qual é a melhor escolha para determinar índices gonadossomáticos e hepatossomáticos em fêmeas de camarões carídeos? 115

1. Resumo	116
2. Introdução	117
3. Material e métodos	118
4. Resultados	121
5. Discussão	126
6. Referências	129

Capítulo 6 - Histoquímica e ultraestrutura do desenvolvimento ovariano e sua interação com o hepatopâncreas em três fenótipos de *Macrobrachium amazonicum* (Heller, 1862) 132

1. Resumo	133
2. Introdução	134
3. Material e métodos	135
4. Resultados	139
5. Discussão	153
6. Conclusão	158
7. Referências	158

Capítulo 7 - How to determine sperm count in caridean shrimps? Description of a simple protocol developed for the Amazon River prawn *Macrobrachium amazonicum* (Heller, 1862) 162

1. Abstract	163
2. Introduction	164
3. Materials and methods	166
4. Results	169
5. Discussion	175
6. Conclusions	178
7. References	178

Capítulo 8 - Existe uma relação de “trade-off” entre o investimento na produção espermática e a aquisição de armas sexuais em *Macrobrachium amazonicum* (Heller, 1862) ? 183

1. Resumo	184
2. Introdução	185
3. Material e métodos	186
4. Resultados	190
5. Discussão	205
6. Conclusão	208
7. Referências	208

Capítulo 9 - Morfologia e ultraestrutura da glândula androgênica em morfótipos de *Macrobrachium amazonicum* (Heller, 1862)..... 211

1. Resumo	212
2. Introdução	213
3. Material e métodos	214
4. Resultados	217
5. Discussão	225
6. Referências	229

Capítulo 10 - Can intersexes occur in natural populations of gonochoric palaemonid shrimps? First record of intersexuality in the Amazon river shrimp *Macrobrachium amazonicum* (Heller, 1862)..... 234

1. Abstract	235
2. Introduction	236
3. Materials and methods	237
4. Results	240
5. Discussion	250
6. References	252

Capítulo 11 - Ultraestrutura e patologia produzida pelo parasita *Inodosporus* (Microsporidia: Thelohaniidae) causador da “doença do camarão colorido” em *Macrobrachium amazonicum* (Caridea: Palaemonidae) 257

1. Resumo	258
2. Introdução	259
3. Material e métodos	260
4. Resultados	263
5. Discussão	271
6. Referências	274
7. Material complementar	277

Capítulo 12 - Considerações finais..... 278

Material complementar

I - Dispositivo de contenção para realização de teste de ecotoxicidade em ambiente aquático 283

II - Estrutura modular para captura e contenção de crustáceos..... 296

Capítulo 1

Introdução Geral

1. Introdução Geral

A família Palaemonidae Rafinesque, 1815 encontra-se na Infraordem Caridea Dana, 1852 com aproximadamente 980 espécies registradas no mundo (DE GRAVE e FRANSEN, 2011), e cerca de 60 espécies registradas no Brasil (FERREIRA et al., 2010). Seus representantes são encontrados em todos os tipos de ambientes aquáticos, i.e., dulciaquícolas a marinhos (HOLTHUIS, 1952a,b; DE GRAVE e FRANSEN, 2015a,b). Além disso, muitos camarões desta família possuem importância econômica como recurso para pescas artesanais e comerciais e para a aquicultura mundial (CALADO et al., 2003; NEW, 2005; NEW et al., 2010).

Muitas espécies de palaemonídeos são derivadas de animais marinhos com alta plasticidade fisiológica. Seus ancestrais marinhos invadiram e colonizaram ambientes dulciaquícolas, promovendo múltiplas especiações (ASHELBY et al., 2012). Dentre estes palaemonídeos, o gênero *Macrobrachium* Spence Bate, 1868 é aquele com maior sucesso na colonização de ambientes estuarinos e dulciaquícolas (PILEGGI e MANTELATTO, 2010; ANGER, 2013; JIMOH et al., 2013). *Macrobrachium* é o terceiro gênero em termos de diversidade dentro de Caridea, atrás somente dos gêneros *Caridina* H. Milne Edwards, 1837 (~ 300 espécies) e *Alpheus* Fabricius, 1798 (~ 290 espécies), compreendendo ao redor de 240 espécies em todo o mundo (DE GRAVE e FRANSEN, 2011). Este gênero apresenta ampla distribuição em regiões tropicais e subtropicais, com a maioria das espécies registrada para a Ásia e Austrália (DE GRAVE e FRANSEN, 2011; ANGER, 2013). Dezenove espécies de *Macrobrachium* são registradas para o Brasil, os quais são popularmente conhecidos como “pítus” (PILEGGI, 2009; VERA-SILVA et al., 2016).

A espécie com origem costeira que melhor demonstra as invasões e a adaptação aos ambientes límnicos no gênero, em relação às demais, é *Macrobrachium amazonicum* (Heller, 1862), como proposto por Anger (2013). Esta espécie pode ser caracterizada taxonomicamente por possuir espinho hepático, sendo o espinho branquiostegal ausente. O rostro é longo e delgado, ultrapassando distintamente o escafocerito, com margem superior apresentando 8 a 13 dentes distribuídos de maneira irregular, formando uma crista basal sobre a órbita, enquanto que a margem inferior apresenta de 5 a 12 dentes. O segundo par de pereopódes, os quelípodos maiores, apresentam forma e comprimento iguais (i.e.

homoquelia), com espinhos nos artículos. Adicionalmente, estes quelípodos (quelas) apresentam carpo alongado, distintamente maior que o mero. O telso possui extremidade aguda sem formar uma margem posterior distinta com espinhos internos muito curtos não alcançando a citada extremidade (MELO, 2003; PILEGGI, 2009).

Algumas populações do camarão amazônico podem apresentar hierarquia social, com quatro morfótipos bem definidos para machos (MORAES-RIODADES e VALENTI, 2004; PANTALEÃO et al., 2014) (Figura 1). Machos dominantes dos morfótipos quela verde 1 (GC1) e 2 (GC2) possuem quelípodos robustos que são utilizados para dominar e/ou proteger as fêmeas e garantir a cópula, assim como são utilizados em interações agonísticas (lutas) para conquista e defesa de territórios. Estes morfótipos dominantes possuem vantagens seletivas em relação aos machos dos morfótipos submissos quela translúcida (TC) e canela (CC), tendo maior facilidade na obtenção de recursos alimentares, territórios, e maior número de cópulas (CORREA e THIEL, 2003; IBRAHIM, 2011; AUGUSTO e VALENTI, 2016).

Macrobrachium amazonicum pode habitar tanto ambientes costeiros como ambientes aquáticos interiores, sem influência marinha. Independente do tipo de ambiente, as populações desta espécie apresentam variações morfológicas e reprodutivas muito divergentes (ODINETZ-COLLART, 1991a; MACIEL e VALENTI, 2009; VERGAMINI et al., 2011; PASCHOAL e ZARA, 2017). Três tipos de fenótipos são registrados em *M. amazonicum*: (a) populações anfídromas de grande porte e (b) populações hololimnéticas de grande e (c) pequeno porte. A presença de morfótipos dominantes não é registrada no último fenótipo e apresenta estratégia reprodutiva (i.e. busca ativa) diferente dos demais fenótipos (i.e. dominância de territórios) (PANTALEÃO et al., 2012, 2014; PASCHOAL, 2017 - Capítulo 2). Esta espécie recebe atenção especial devido a sua grande adaptabilidade ambiental, participação significativa em teias tróficas, importância na aquicultura brasileira, e principalmente por sua alta variabilidade intraespecífica. A plasticidade adaptativa e morfológica da espécie pode ser explicada pela sinergia desta variabilidade e pelas respostas fisiológicas aos ambientes em que ocorrem (MAGALHÃES, 2000; MAGALHÃES et al., 2005; MACIEL e VALENTI, 2009; VERGAMINI et al., 2011; AUGUSTO e VALENTI, 2016).

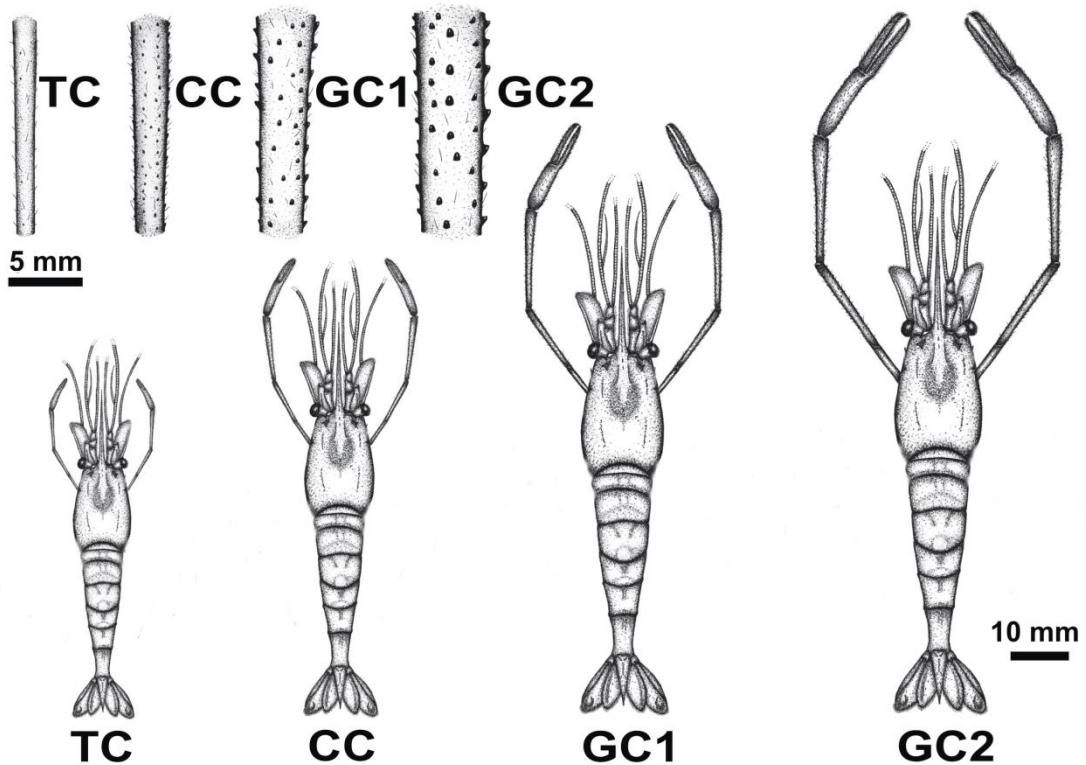


Figura 1. Morfótipos em machos de *Macrobrachium amazonicum* (Heller, 1862). Note as diferenças no comprimento dos segundos quelípodos e nos padrões dos espinhos e setas nos carpos destas estruturas. Modificado de Pantaleão et al. (2014). CC: quela canela; GC1: quela verde 1; GC2: quela verde 2; TC: quela translúcida.

Macrobrachium amazonicum é uma espécie endêmica das Américas, mostrando ampla distribuição geográfica nesta área, ocorrendo desde Costa Rica até a Argentina (PILEGGI, 2009; VERGAMINI et al., 2011). Nas Bacias hidrográficas do Brasil, tem sua ocorrência apontada em ecossistemas aquáticos estuarinos e/ou dulciaquícolos desde Roraima até o Paraná (PILEGGI et al., 2013). Vergamini et al. (2011) estruturaram molecularmente as populações brasileiras em três grupos: (I) populações continentais da Amazônia, (II) populações das Bacias do Paraná e Paraguai e (III) populações de sistemas costeiros do norte e nordeste. De acordo com Magalhães et al. (2005) e Vergamini et al. (2011) a presença da espécie no nordeste e sul, além da Bacia do alto Paraná é resultado da dispersão acidental por atividades antrópicas. Nos últimos anos, características observadas apenas em populações anfídromas, como a presença de morfótipos em machos (MORAES-RIODADES e VALENTI, 2004) foram registradas em animais das populações da

Bacia do Paraná, o que pode indicar uma recente mudança na história de vida da espécie (i.e. hololimnia) (PANTALEÃO et al., 2014; PASCHOAL e ZARA, 2017).

A grande variabilidade morfológica e reprodutiva de *M. amazonicum*, somada a sua grande amplitude de ocorrência e a possível mudança de sua história de vida pode levar a erros na identificação da espécie. *Macrobrachium amazonicum* é morfológicamente similar a *M. jelskii* (Miers, 1877) e *M. acanthurus* (Weigmann, 1836), o que dificulta sua identificação, principalmente de indivíduos juvenis (VERA-SILVA et al., 2017). Isso provavelmente ocorreu nos trabalhos de Guerra et al. (2014), que mostraram *M. amazonicum* e *M. jelskii* agrupados em um mesmo clado por meio de análises moleculares, e de Garrone-Neto et al. (2014) que verificaram interações de limpeza por morfótipos dominantes de *M. amazonicum* em arraiais da família Potamotrygonidae Garman, 1877 mas classificaram os animais como *M. jelskii*, espécie de tamanho reduzido e sem morfótipos. Além disso, a alta variabilidade ecológica e reprodutiva em *M. amazonicum* levanta questionamentos taxonômicos para a espécie, fazendo com que alguns autores considerem que *M. amazonicum* seja um complexo de espécies (ANGER, 2013) e que indivíduos de algumas populações continentais interiores (e.g. Pantanal) sejam uma espécie distinta, o *M. pantanalense* Dos Santos, Hayd & Anger, 2013, apesar da similaridade genética (distância genética: 2,96%) e morfológica das espécies (DOS SANTOS et al., 2013; WEISS et al., 2015).

A grande plasticidade fenotípica de populações de *M. amazonicum* ainda não é totalmente compreendida. Isso se deve ao fato de que o conhecimento da história de vida dessas populações é fragmentado, e que a maioria dos estudos realizados para a espécie esteja focada em populações anfídromas (ANGER et al., 2009). Poucos são os trabalhos que estudaram a espécie em ambientes lênticos, mais precisamente em reservatórios: Odinetz-Collart (1988, 1991b) verificou aspectos ecológicos em populações do reservatório de Tucuruí no Pará (norte do Brasil), Odinetz-Collart e Moreira (1993) investigaram o potencial de pesca de *M. amazonicum* no mesmo reservatório, Rocha et al. (2016) analisaram aspectos morfométricos e o fator de condição para espécie no reservatório de Pedra do Cavalo na Bahia (nordeste do Brasil), e Pantaleão et al. (2012, 2014) que determinaram a maturidade morfológica para populações sem e com a presença de morfótipos no reservatório de Ibitinga em São Paulo (sudeste do Brasil). O último

estudo merece destaque, por apresentar pela primeira vez o registro de morfótipos para a espécie em populações hololimnéticas.

Reservatórios são ambientes artificiais que armazenam e liberam massas de água de acordo a propósitos específicos, como o abastecimento hídrico e produção de energia. Desta forma, possuem características de lagos a montante e de rios a jusante, com seu ciclo hídrico dependente do tempo de detenção hídrica (WANG et al., 2010). A montante dos reservatórios é controlada por eventos climáticos, enquanto que a jusante é modulada pela abertura e fechamento das barragens (MELO et al., 2016). A maioria dos reservatórios brasileiros de grande porte (i.e. mega reservatórios) está situada no estado de Minas Gerais, com uma área inundada de 5.344 km². O reservatório da usina hidrelétrica (UHE) de Furnas, localizado no sul do estado de Minas Gerais é formado pelos rios Grande e Sapucaí (integrantes da Bacia do Alto Paraná) e possui 1.523 km² de área inundada. Entre as UHE's de Furnas (a montante) e de Luiz Carlos Barreto de Carvalho (a jusante, com uma área inundada de 46,7 km²), está o reservatório da UHE de Marechal Mascarenhas de Moraes, com uma área inundada de 250 km² (Figura 2). Estes reservatórios em cascata são importantes para a região sudeste brasileira, pois são responsáveis pelo abastecimento doméstico e industrial, além de gerar energia aos municípios situados ao longo de seu percurso (ANDRADE et al., 2012; PASCHOAL et al., 2012). Na última década, *M. amazonicum* foi introduzido (acidentalmente ou não) nestes reservatórios e rapidamente tornou-se um recurso econômico importante para a pesca artesanal na região e vem sendo cada vez mais utilizado como recurso alimentar pela ictiofauna e pelas populações ribeirinhas (PASCHOAL, dados pessoais). Todavia, não existe nenhum estudo sobre a espécie nestes reservatórios.

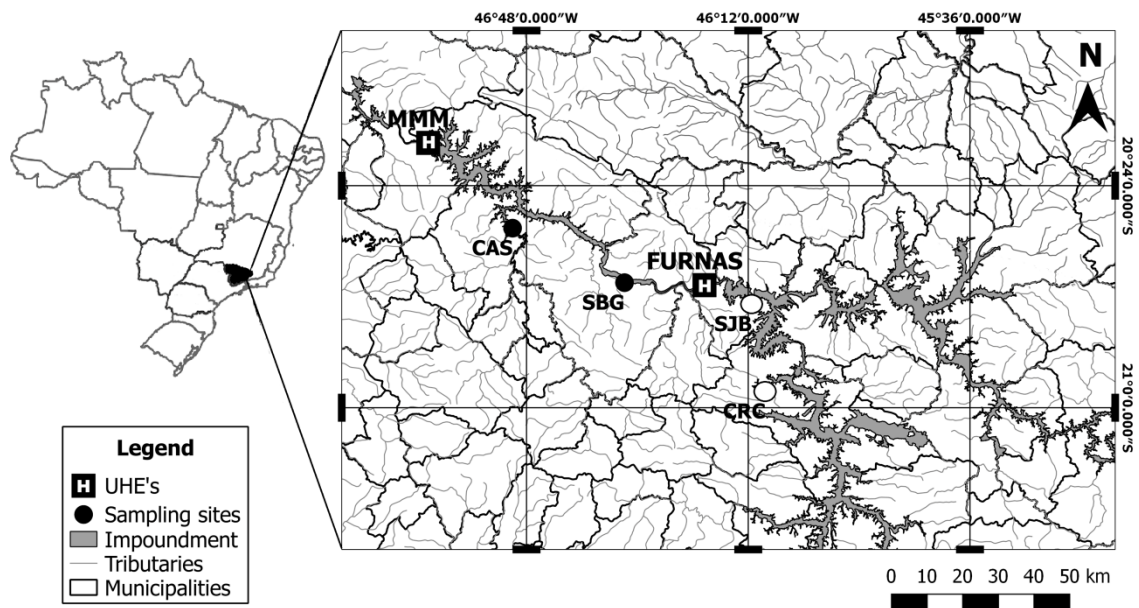


Figura 2. Locais de coletas nos reservatórios das Usinas hidrelétricas (UHE's) de Furnas (círculos brancos) e Marechal Mascarenhas de Moraes (MMM) (círculos pretos) situados no estado de Minas Gerais, sudeste brasileiro. CAS: Cássia; CRC: Carmo do Rio Claro; SBG: São João Batista do Glória; SJB: São José da Barra.

Pelo exposto anteriormente, fica claro que estudos mais aprofundados envolvendo a ecologia e biologia reprodutiva de *M. amazonicum*, que levem em consideração aspectos morfohistológicos reprodutivos, bem como aspectos bioecológicos em ambientes lênticos são necessários para a compreensão da variabilidade fenotípica e plasticidade adaptativa em *M. amazonicum*. Isso permitirá a comparação de processos bioecológicos e evolutivos para a espécie e demais representantes do gênero *Macrobrachium*. Assim, a presente tese foi dividida em diferentes capítulos buscando sanar lacunas referentes aos aspectos bioecológicos, fisiológicos, morfo-reprodutivos e parasitológicos. No **Capítulo 2** são apresentadas as diferenças alométricas e o início da maturidade sexual na espécie por meio de critérios morfométricos, fisiológicos e funcionais em quatro populações hololimnéticas com dois fenótipos distintos em reservatórios do sudeste brasileiro. O **Capítulo 3** aborda a dinâmica populacional e aspectos reprodutivos dessas populações durante eventos de estresse hídrico nesses reservatórios. Os padrões reprodutivos (estágios de desenvolvimento embrionário, taxas de aborto e fecundidade) durante o fenômeno de “El niño” no período 2014-2016 nessas populações foram investigados e comparados no **Capítulo 4**.

O **Capítulo 5** trata de uma análise comparativa dos índices gonadossomáticos e hepatossomáticos com amostras úmidas e secas de fêmeas de *M. amazonicum*, obtidas em diferentes populações, buscando sanar problemas metodológicos devido à ampla variação informacional da literatura. No **Capítulo 6** são analisados os aspectos morfológicos, histoquímicos e ultraestruturais do desenvolvimento ovariano utilizando como modelo populações dos três tipos de fenótipos de *M. amazonicum*. Além disso, verifica-se a interação entre o ovário e o hepatopâncreas ao longo do desenvolvimento do sistema reprodutor feminino.

Um novo método de determinação da contagem espermática desenvolvido para a espécie e que pode ser empregado em outros camarões carídeos é descrito no **Capítulo 7**. Os padrões de produção e concentração espermática entre os morfótipos de machos e populações dos três tipos de fenótipos foram analisados e comparados no **Capítulo 8**. Além disso, neste capítulo é descrito a espermatogênese e a histoquímica dos vasos deferentes para *M. amazonicum*. Adicionalmente, correlacionamos o investimento gonadal e a aquisição de armas sexuais em machos dessas populações. No **Capítulo 9**, os padrões histoquímicos, ultraestruturais e morfométricos da glândula androgênica foram descritos para a espécie, além da comparação desta glândula entre os diferentes morfótipos.

O primeiro registro confirmado de intersexualidade em palemonídeos gonocóricos é apresentado no **Capítulo 10**, em uma população hololimnética de *M. amazonicum*. O **Capítulo 11** apresenta o primeiro registro de infecção por microsporídios no camarão amazônico, além da descrição do mesmo ao microscópio de luz e eletrônico de transmissão. Além disso, os aspectos ecológicos e comportamentais de animais infectados são descritos, para a caracterização da “doença do camarão colorido”. Desta maneira, a presente tese sumariza as principais conclusões no **Capítulo 12**, com as Considerações finais.

Adicionalmente, na seção **Material complementar** apresentamos duas patentes, as quais são produtos relacionados à tese: um equipamento para testes de ecotoxicidade *in situ* e uma armadilha para captura e contenção de crustáceos decápodes.

2. Referências

- ANGER, K. et al. Patterns of larval growth and chemical composition in the Amazon river prawn, *Macrobrachium amazonicum*. **Aquaculture**, vol. 287, p. 341-348. 2009.
- ANGER, K. Neotropical *Macrobrachium* (Caridea: Palaemonidae): on the biology, origin, and radiation of freshwater-invading shrimp. **Journal of Crustacean Biology**, vol. 33, n. 2, p. 151-183. 2013.
- ASHELBY, C.W. et al. Regional scale speciation reveals multiple invasions of freshwater in Palaemoninae (Decapoda). **Zoologica Scripta**, vol. 41, n. 3, p. 293-306. 2012.
- AUGUSTO, A.; VALENTI, W.C. Are there any physiological differences between the male morphotypes of the freshwater shrimp *Macrobrachium amazonicum* (Heller, 1862) (Caridea: Palaemonidae)? **Journal of Crustacean Biology**, vol. 36, n. 5, p. 716-723. 2016.
- CALADO et al. Marine ornamental decapods - popular, pricey, and poorly studied. **Journal of Crustacean Biology**, vol. 23, n. 4, p. 963-973. 2003.
- CORREA, C.; THIEL, M. Mating systems in caridean shrimp (Decapoda: Caridea) and their evolutionary consequences for sexual dimorphism and reproductive biology. **Revista Chilena de Historia Natural**, vol. 76, 187-203. 2003.
- DE GRAVE et al. Dead shrimp blues: a global assessment of extinction risk in freshwater shrimps (Crustacea: Decapoda: Caridea). **PloS one**, vol. 10, p. 1-14. 2015a.
- DE GRAVE et al. Let's be pals again: major systematic changes in Palaemonidae (Crustacea: Decapoda). **PeerJ**, vol. 3, n e1167. 2015b. Disponível em: <10.7717/peerj.1167>. Acesso em: 22 abr. 2017.
- DE GRAVE, S.; FRANSEN, C.H.J.M. Carideorum Catalogus: the recent species of the Dendrobranchiate, Stenopodidean, Procarididean and Caridean shrimps (Crustacea: Decapoda). **Zoologische Mededelingen**, vol. 85: 195-589. 2011.
- DOS SANTOS, A.; HAYD, L.; ANGER, K. A new species of *Macrobrachium* Spence Bate, 1868 (Decapoda: Palaemonidae), *M. pantanalense*, from the Pantanal, Brazil. **Zootaxa**, vol. 3700, p. 534-546. 2013.
- FERREIRA, R.S.; VIEIRA, R.R.R.; D'INCAO, F. The marine and estuarine shrimps of the Palaemoninae (Crustacea: Decapoda: Caridea) from Brazil. **Zootaxa**, vol. 2606, p. 1-24. 2010.
- GARRONE-NETO et al. Cleaning interactions between shrimps (Palaemonidae) and freshwater stingrays (Potamotrygonidae) in the Paraná River, Southeastern Brazil **Ichthyological Exploration of Freshwaters**, vol. 24, n. 4. 2014.

- GUERRA, A.L. et al. Genetic variability and phylogenetic aspects in species of the genus *Macrobrachium*. **Genetics and Molecular Research**, vol. 13, n. 2, p. 3646-3655. 2014.
- HOLTHUIS, L.B. A general revision of the Palaemonidae (Crustacea, Decapoda, Natantia) of the Americas. I. The Subfamily Euryrhynchinae and Pontoniinae. **Occasional Papers of the Allan Hancock Foundation**, vol. 12, p. 1-332. 1952a.
- HOLTHUIS, L.B. A general revision of the Palaemonidae (Crustacea, Decapoda, Natantia) of the Americas. II. The Subfamily Palaemonidae. **Occasional Papers of the Allan Hancock Foundation**, vol. 12, p. 1-396. 1952b.
- IBRAHIM, A.N.A.F. **Controle social do crescimento do camarão-da-amazônia *Macrobrachium amazonicum***. 39 f. Dissertação de mestrado (Mestrado em Aquicultura). Universidade Estadual Paulista – UNESP, Jaboticabal. 2011.
- JIMOH, A.A. et al. Mismatch between molecular (mtDNA) and morphological classification of *Macrobrachium* prawns from Southern Nigeria: Cryptic freshwater species and brackish water morphotypes. **Aquaculture**, vol. 410, p. 25-31. 2013.
- MACIEL, C.R.; VALENTI, W.C. Biology, fisheries, and aquaculture of the amazon river prawn *Macrobrachium amazonicum*: a review. **Nauplius**, vol.17, p. 61-79. 2009.
- MAGALHÃES, C. Diversity and abundance of decapod crustaceans in the Rio Negro Basin, Pantanal, Mato Grosso do Sul, Brasil. In: CHERNOFF, B. et al. (Eds.). **A biological assessment of the aquatic ecosystems of the Pantanal, Mato Grosso do Sul, Brazil**. Washington: Conservation International, 2000. p. 56-62.
- MAGALHÃES, C. et al. Exotic species of freshwater decapod crustaceans in the state of São Paulo, Brazil: records and possible causes of their introduction. **Biodiversity and Conservation**, vol. 14, p. 1929-1945. 2005.
- MELO, D.C.D. et al. Reservoir storage and hydrologic responses to droughts in the Paraná River basin, south-eastern Brazil. **Hydrology and Earth System Sciences**, vol. 20, n. 11, p. 4673. 2016.
- MELO, G.A.S. Famílias Atyidae, Palaemonidae e Sergestidae. In: Melo, G.A.S. (Ed.). **Manual de identificação dos Crustacea Decapoda de água doce do Brasil**. 1 ed. São Paulo: Edições Loyola, 2003, p. 289-415.
- MORAES-RIODADES, P.M.C.; VALENTI, W.C. Morphotypes in male amazon river prawns, *Macrobrachium amazonicum*. **Aquaculture**, vol. 236, p. 297–307. 2004.
- NEW, M.B. Freshwater prawn farming: global status, recent research and a glance at the future. **Aquaculture Research**, vol. 36, p. 210-230. 2005.
- NEW, M.B. et al. **Freshwater prawns: biology and farming**, 1st ed. Oxford: Wiley-Blackwell, 2010, 544 p.
- ODINETZ-COLLART, O. Aspectos ecológicos do camarão *Macrobrachium amazonicum* (Heller, 1862) no baixo Tocantins (PA-Brasil). **Memorias da Sociedad de Ciencias Naturales La Salle**, vol. 48, supl. 1988.1988.

ODINETZ-COLLART, O. Strategie de reproduction de *Macrobrachium amazonicum* en Amazonie Centrale (Decapoda, Caridea, Palaemonidae). **Crustaceana**, vol. 61, n. 3, p. 253-270. 1991a.

ODINETZ-COLLART, O. Tucuruí dam and the population of the prawn *Macrobrachium amazonicum* in the Lower Tocantins (PA-Brazil): a four year study. **Archiv für Hydrobiologie**, vol. 122, n. 2, p. 213-227. 1991b.

ODINETZ-COLLART, O.; MOREIRA, L.C. Potencial pesqueiro de *Macrobrachium amazonicum* na Amazônia Central (Ilha do Careiro): variação da abundância e do comprimento. **Amazoniana**, vol. 122, n. 2, p. 213-227. 1993.

PANTALEÃO, J.A.F.; HIROSE, G.L.; COSTA, R.C. Relative growth, morphological sexual maturity, and size of *Macrobrachium amazonicum* (Heller 1862) (Crustacea, Decapoda, Palaemonidae) in a population with an entirely freshwater life cycle. **Invertebrate Reproduction & Development**, vol. 56, p. 80-190. 2012.

PANTALEÃO, J.A.F.; HIROSE, G.L.; COSTA, R.C. Occurrence of male morphotypes of *Macrobrachium amazonicum* (Caridea, Palaemonidae) in a population with an entirely freshwater life cycle. **Brazilian Journal of Biology**, vol. 74, n. 3 sup., p. 223-232. 2014.

PASCHOAL, L.R.P.; RIGOLIN-SÁ, O.; FERREIRA, M.N.L. Análise da qualidade da água utilizando o Índice do Estado Trófico (IET) e o Índice da Qualidade da Água (IQA). In: RIGOLIN-SÁ, O (Ed.) **Bacia Hidrográfica: Estudos do Rio Grande no Sudoeste de Minas Gerais – Brasil**. 1 ed. Passos: Edifesp., 2012. p. 95-108.

PASCHOAL, L.R.P.; ZARA, F.J. First record of intersexuality in the Amazon River shrimp *Macrobrachium amazonicum* (Heller, 1862) (Caridea: Palaemonidae). **Journal of Crustacean Biology**, vol. 74, n. 4, p. 1-5. 2017.

PILEGGI, L.G. **Sistemática filogenética dos camarões do gênero *Macrobrachium* Bate, 1868 do Brasil: análises morfológicas e moleculares**. 236 f. Tese de doutorado (Doutorado em Biologia Comparada). Universidade de São Paulo – USP, São Paulo. 2009.

PILEGGI, L.G. et al. New records and extension of the known distribution of some freshwater shrimps in Brazil. **Revista Mexicana de Biodiversidad**, vol. 84, p. 563-574. 2013.

PILEGGI, L.G.; MANTELATTO, F.L. Molecular phylogeny of the freshwater prawn genus *Macrobrachium* (Decapoda, Palaemonidae), with emphasis on the relationships among selected American species. **Invertebrate Systematics**, vol. 24, p. 194-208. 2010.

ROCHA, S.S. et al. Length-weight relationship and condition factor of *Macrobrachium amazonicum* (Heller, 1862) (Decapoda, Palaemonidae) from a reservoir in Bahia, Brazil. **Nauplius**, vol. 23, n. 2, p. 149-161. 2015

VERA-SILVA, A.L.; CARVALHO, F.L.; MANTELATTO, F.L. Distribution and genetic differentiation of *Macrobrachium jelskii* (Miers, 1877) (Natantia: Palaemonidae) in

Brazil reveal evidence of non-natural introduction and cryptic allopatric speciation. **Journal of Crustacean Biology**, vol. 36, p. 373-383. 2016.

VERA-SILVA, A.L.; CARVALHO, F.L.; MANTELATTO, F.L. Redescription of the freshwater shrimp *Macrobrachium jelskii* (Miers, 1877) (Caridea, Palaemonidae). **Zootaxa**, vol. 4269, n.1, p. 44-60. 2017.

VERGAMINI, F.G.; PILEGGI, L.G.; MANTELATTO, F.L. Genetic variability of the Amazon River prawn *Macrobrachium amazonicum* (Decapoda, Caridea, Palaemonidae). **Contributions to Zoology**, vol. 80, p. 67-83. 2011.

WANG, Y. ZIQUIANG, X.; WANG, D. A transitional region concept for assessing the effects of reservoirs on river habitats: a case of Yangtze River, China. **Ecohydrology**, vol. 5, p. 28–35. 2012.

WEISS et al. Interpreting genetic distances for species recognition: the case of *Macrobrachium amazonicum* Heller, 1862 and the recently described *M. pantanalense* Dos Santos, Hayd & Anger, 2013 (Decapoda, Palaemonidae) from Brazilian fresh waters. **Crustaceana**, vol. 88, n. 10-11, p. 1111-1126. 2016.

Capítulo 2

**Diferenças alométricas e o tamanho do início da maturidade sexual
em populações hololimnéticas de *Macrobrachium amazonicum*
(Heller, 1862) com diferentes fenótipos**

Diferenças alométricas e o tamanho do início da maturidade sexual em populações hololimnéticas de *Macrobrachium amazonicum* (Heller, 1862) com diferentes fenótipos

1. Resumo

O tamanho do início da maturidade sexual é uma informação crucial para a manutenção e avaliação de estoques pesqueiros. Em populações do camarão amazônico *Macrobrachium amazonicum* esta é bastante variável entre populações, devido à grande plasticidade fenotípica da espécie. Neste estudo determinamos as diferenças alométricas e o início da maturidade sexual por meio de critérios morfométricos (crescimento relativo), fisiológicos (maturação dos sistemas reprodutores) e funcionais (♂: aptidão para copular, e ♀: portar ovos fertilizados) em quatro populações de *M. amazonicum*. De Outubro de 2014 a Dezembro de 2015, camarões com dois fenótipos distintos foram coletados nos reservatórios das usinas hidrelétricas de Furnas e Marechal Mascarenhas de Moraes (MMM) em Minas Gerais, sudeste do Brasil. De forma geral, as fêmeas foram maiores e mais pesadas que os machos. No entanto, machos das duas populações de MMM possuíam quelípodos hipertrofiados e grandes proporções corporais, mostrando a presença de quatro morfótipos, sendo aqui referidos como animais de grande porte. Estas duas populações apresentaram comprimento de carapaça (CL) de $13,05 \pm 5,08$ e $9,02 \pm 2,56$ mm. O início da maturidade morfológica em machos de grande porte variou entre 7,40 e 8,40 mm CL, enquanto que em fêmeas foi constatada entre 10,30 e 10,50 mm CL. Para as duas populações de Furnas, com machos de pequeno porte (CL = $6,90 \pm 1,05$ e $7,31 \pm 1,14$ mm) e sem a presença de morfótipos, a maturidade morfológica foi registrada com 5,30 e 6,30 mm CL em machos e 7,30 e 8,30 mm CL em fêmeas. O início da maturidade fisiológica em machos de grande porte foi registrado entre 4,60 e 5,70 mm CL e em fêmeas foi registrado com 6,70 mm CL. Em ambas as populações de pequeno porte, o sistema reprodutor de fêmeas estava maduro a partir de 5,00 mm de CL, enquanto que em machos variou entre 3,70 e 4,00 mm CL. Por meio das análises de cópula, comprovou-se que existe sincronia entre a maturidade fisiológica e funcional em machos das populações de pequeno porte. Por outro lado, a maturidade funcional em machos de grande porte iniciou-se entre 14,40 a 15,20 mm CL, acima da fisiológica e morfológica, enquanto que em fêmeas foi registrada em 9,40 mm CL. Em fêmeas de pequeno porte a maturidade funcional teve início entre 7,10 a 7,40 mm CL. O esquema sequencial da maturidade sexual em populações hololimnéticas de *M. amazonicum* é: ♀: fisiológica → funcional \cong morfológica, ♂ grande porte: fisiológica → morfológica → funcional, e ♂ pequeno porte: fisiológica = funcional → morfológica. Em fêmeas de *M. amazonicum*, a maturidade morfológica ainda é um parâmetro seguro para estimação da maturidade sexual. Todavia, em machos, o fenótipo da população deve ser considerado ao avaliar a maturidade sexual para espécie, uma vez que este influencia diretamente a maturidade funcional.

Palavras-chave: camarão amazônico, variação morfométrica, tamanho da maturidade, reprodução.

2. Introdução

Algumas espécies de camarões do gênero *Macrobrachium* Spence Bate, 1868 podem habitar ambientes costeiros e ambientes continentais interiores (sem influência marinha), como é o caso do camarão amazônico *Macrobrachium amazonicum* (Heller, 1862). Esta espécie mostra grande adaptabilidade ambiental e alta variabilidade intraespecífica, com populações apresentando variações morfológicas e reprodutivas bastante significativas (ODINETZ-COLLART e RABELO, 1996; VERGAMINI et al., 2011; ANGER, 2013; HAYD e ANGER, 2013; AUGUSTO e VALENTI, 2016). O camarão amazônico possui ampla distribuição nas Américas, ocorrendo desde Costa Rica até a Argentina. Nas Bacias hidrográficas do Brasil, *M. amazonicum* ocorre em ecossistemas estuarinos e/ou dulciaquícolas do estado de Roraima até o Paraná, sendo que sua presença no nordeste e sul do Brasil, assim como na bacia do Paraná se deve a dispersão antrópica acidental (VERGAMINI et al., 2011; PILEGGI et al., 2013).

Em estuários, *M. amazonicum* apresenta história de vida anfídroma, onde adultos vivem e reproduzem em água doce, enquanto que suas larvas se desenvolvem em regiões estuarinas, retornando aos ambientes dulciaquícolas quando juvenis (BAUER, 2013). Nestes ambientes, os indivíduos desta espécie apresentam tamanhos corporais superiores daqueles registrados para animais de populações continentais. Além disso, fêmeas anfídrômas mostram altos valores de fecundidade (3.000 - 7.000 ovos) quando comparadas a fêmeas de populações continentais (300 - 3.000 ovos) (MACIEL e VALENTI, 2009; HAYD e ANGER, 2013). Adicionalmente, populações anfídrômas apresentam hierarquia social, onde machos com morfótipos dominantes (GC1 e GC2) apresentam vantagens seletivas sobre indivíduos submissos (morfótipos TC e CC) (MORAES-VALENTI e VALENTI, 2010; IBRAHIM, 2011). Por outro lado, algumas populações com tais características foram registradas recentemente em ambientes lênticos da Bacia do Paraná (PANTALEÃO et al., 2014; PASCHOAL e ZARA, 2017), indicando a troca da anfídromia pelo ciclo de vida completo em água doce (i.e. hololimnia), devido à impossibilidade biológica e física de migrações para regiões estuarinas (ANGER, 2013).

O conhecimento da história de vida para diferentes populações de *M. amazonicum* é fragmentado e ainda possui lacunas, pois é focado em estudos com

populações anfídromas (ANGER et al., 2009). Somado a isso, a plasticidade fenotípica das populações de *M. amazonicum* ainda não é totalmente compreendida (ANGER, 2013). Tais diferenças fenotípicas para esta espécie são atribuídas a fatores intrínsecos dos animais (i.e. diferenças fisiológicas e comportamentais) (MORAES-RIODADES e VALENTI, 2004; AUGUSTO e VALENTI, 2016) ou a disponibilidade de recursos nutricionais nas diferentes áreas (PANTALEÃO et al., 2012, 2014).

A grande plasticidade fenotípica e fisiológica de *M. amazonicum* faz com que o tamanho no início da maturidade da espécie seja variável entre populações (PANTALEÃO et al., 2012). Desta forma, se faz necessário a utilização de vários critérios para estimar o início da maturidade sexual, sendo esta informação crucial para a manutenção e melhoria de estoques do camarão amazônico (MORAES-VALENTI e VALENTI, 2010), uma vez que esta espécie é muito importante na pesca artesanal e é amplamente consumida nas regiões norte e nordeste do Brasil (ODINETZ-COLLART e MOREIRA, 1993; MACIEL e VALENTI, 2009). Além disso, *M. amazonicum* é considerada uma espécie com grande potencial para aquicultura mundial (NEW, 2005). Devido a isso, vários estudos vêm sendo conduzidos para melhoria, manutenção e aumento de qualidade de estoques, larvicultura e manejo sustentável (PRETO et al., 2010; HENARES et al., 2013; MACIEL e VALENTI, 2014; DUTRA et al., 2016; HENRY-SILVA et al., 2016; SANTOS et al., 2016).

Apesar de sua importância, as informações sobre maturidade sexual para *M. amazonicum* limitam-se a relações morfométricas (crescimento relativo) e a determinação da maturidade morfológica (ODINETZ-COLLART e RABELO, 1996; MORAES-RIODADES e VALENTI, 2004; MACIEL e VALENTI, 2009; PANTALEÃO et al., 2012, 2014). Assim, existe uma lacuna relacionada à maturidade fisiológica (i.e. maturação dos sistemas reprodutores) para espécie, tampouco existem estudos que envolvam a maturidade funcional (i.e. ♂: capacidade de copular, e ♀: carregar ovos fertilizados). Dentro deste contexto, o presente trabalho verifica as diferenças morfométricas de populações hololimnéticas de *M. amazonicum* apresentando distintos fenótipos, além de determinar o início da maturidade sexual em diferentes populações, correlacionando critérios morfométricos, histológicos e funcionais.

3. Material e métodos

3.1. Amostragem

Foram realizadas coletas mensais durante Outubro de 2014 a Dezembro de 2015, no rio Grande em quatro pontos de coletas com características lóxicas. Dois pontos na usina hidrelétrica (UHE) de Marechal Mascarenhas de Moraes (MMM) - municípios de Cássia (CAS - 20° 30' 53,6" S; 46° 50' 16,4" W) e São João Batista do Glória (SBG - 20° 39' 43,5" S; 46° 32' 5,8" W), e outros dois na UHE de Furnas - municípios de Carmo do Rio Claro (CRC - 20° 57' 20" S; 46° 9' 14" W) e São José da Barra (SJB - 20° 43' 10,6" S; 46° 11' 26,4" W) no estado de Minas Gerais, sudeste do Brasil.

Os camarões foram obtidos por meio de coleta ativa, realizada por amostragens efetuadas com uma peneira (60 cm de diâmetro e malha de 1,25 mm), deslocada diversas vezes ao longo da vegetação marginal e bancos de macrófitas durante 30 minutos por uma pessoa; e passiva, onde seis armadilhas - ver seção Material complementar II da presente tese, para maiores detalhes - (85 cm comprimento X 35 cm largura/ altura) foram colocadas próximas a margem (0,5 – 2 m), as quais foram iscadas com pequenos pedaços de fígado bovino e retiradas após quatro horas. Imediatamente após a captura, os animais foram anestesiados por resfriamento (- 20 °C/5 min.), e posteriormente conservados em etanol 70% (com exceção dos animais utilizados para análises histológicas). Logo após, os mesmos foram acondicionados em frascos devidamente etiquetados e transportados até o laboratório, onde foram identificados segundo Pileggi (2009).

Todos os camarões capturados durante as coletas mensais foram contabilizados e, subamostras foram obtidas seguindo a metodologia de Wenner et al. (1991): se $n \leq 80$ indivíduos foram coletados, todos os animais foram analisados; quando $80 < n < 160$ indivíduos foram coletados, selecionou-se aleatoriamente 80 indivíduos para serem sexados e mensurados. Se $160 < n < 320$ indivíduos foram coletados, 50% dos espécimes foram verificados; e em caso de amostras ≥ 321 indivíduos, selecionou-se 25% dos animais. Em laboratório, a identificação quanto ao sexo dos indivíduos retirados aleatoriamente da subamostra foi realizada por meio da (a) verificação dos caracteres sexuais secundários: ausência (♀) ou

presença (♂) do apêndice sexual masculino nos endopoditos do segundo par de pleópodos, (b) verificação das posições dos gonóporos: aberturas nos coxopoditos do 3° (♀) ou 5° (♂) par de pereiópodos, e (c) dissecação do sistema reprodutor: ovários (♀) e testículos (♂) (BAUER, 2004).

3.2. Análise morfométrica, morfótipos e maturidade morfológica

Os exemplares de *M. amazonicum* tiveram as estruturas corpóreas medidas com paquímetro analógico (0,02 mm), segundo Moraes-Riodades e Valenti (2004) e Pantaleão et al. (2012, 2014), a saber: comprimento de carapaça (CL), comprimento total (TL), largura da segunda pleura abdominal (2° PL), comprimento de abdome (AL), comprimento do quelípodo maior (MCL), comprimento do própodo (PCL) e comprimento do dátilo (DCL) (Figura 1). Para a mensuração do MCL, PCL e DCL, foi utilizado o quelípodo direito dos animais. O peso fresco (W) de cada indivíduo foi registrado em balança analítica (0,0001 g).

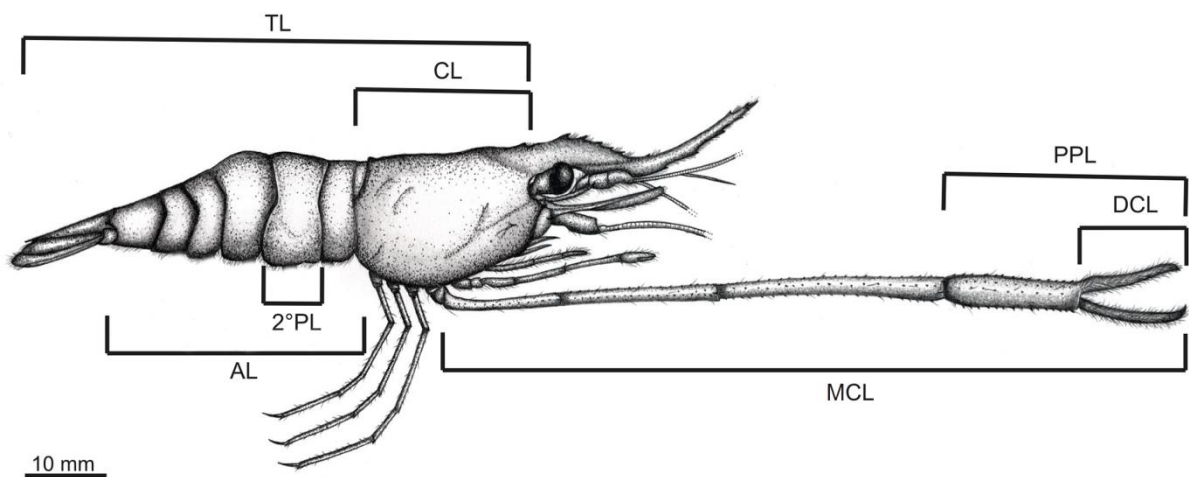


Figura 1. Dimensões utilizadas nas análises morfométricas de *M. amazonicum*. Modificado de Pantaleão et al. (2014). 2° PL: largura da segunda pleura abdominal; AL: comprimento do abdome; CL: comprimento de carapaça; DCL: comprimento do dátilo; MCL: comprimento do quelípodo maior; PPL: comprimento do própodo; TL: comprimento total.

Os camarões machos foram divididos visualmente em quatro morfótipos: queila (quelípodo) translúcida (TC), canela (CC), verde 1 (GC1) e verde 2 (GC2). Estes morfótipos foram classificados segundo Moraes-Riodades e Valenti (2004) e Pantaleão et al. (2014), de acordo com o tamanho e a coloração dos quelípodos, a angulação dos espinhos nos carpos e própodos e a pubescência nos dactilos. Posteriormente, análises de componentes principais (PCA's) foram empregadas para separar distintos grupos morfológicos (morfótipos) em machos para cada população, utilizando todas as dimensões corporais mensuradas (\log_{10}) para estes animais (SAMPEDRO et al., 1999).

A maturidade morfológica foi estimada por meio dos padrões de crescimento relativo da espécie, a qual foi determinada por equações alométricas do tipo $Y = aX^b$ (HUXLEY, 1950). Estas equações foram ajustadas, tendo como variável independente (X) o CL e relacionando-o com as demais dimensões corporais do animal (variável dependente, Y). Os valores da constante alométrica (b) foram testadas pelo teste t , sendo $H_0:1$ (ou 3 no caso do peso), e utilizados para determinar os padrões de crescimento de uma determinada parte do corpo em relação ao CL. Posteriormente, esta equação foi linearizada ($\log_y = \log_a * \log_x - b$). As relações morfométricas que apresentaram diferenças nos padrões de crescimento foram submetidas a uma análise não-hierárquica de agrupamento K-means, minimizando a variabilidade dentro dos grupos e maximizando a variação entre eles. O resultado desta análise foi refinado com a aplicação de uma análise discriminante. O ponto de inflexão entre os grupos identificados pela análise discriminante foi considerado como o início da maturidade morfológica, ou seja, o menor adulto(a) da população (SAMPEDRO et al., 1999; PANTALEÃO et al., 2012). Após a determinação das classes, as diferenças entre as inclinações/desvios (b) e os interceptos (a) das retas, em cada fase de desenvolvimento foram comparadas por meio de análises de covariância (ANCOVA) ($\alpha = 0,05$). Todos os cálculos e análises estatísticas foram realizados no software R versão 3.3.1. (R DEVELOPMENT CORE TEAM, 2016).

3.3. Histologia e maturidade fisiológica

Para a determinação da maturidade fisiológica, todos os machos e fêmeas das subamostras de cada população tiveram seus sistemas reprodutores dissecados. A morfologia macroscópica dos sistemas reprodutores foi analisada sob estereomicroscópio. O início da maturidade fisiológica nas diferentes populações foi estabelecido pelo menor CL registrado para os animais cumprindo os seguintes critérios: (a) machos com espermatozoides nos testículos e nos vasos deferentes (VD) e (b) fêmeas com ovócitos em vitelogênese exógena ou secundária (com grânulos de vitelo) (VIAU et al., 2006; POLJAROEN et al., 2010; ZARA et al., 2012, 2013; SOONKLANG et al., 2012; NASCIMENTO e ZARA, 2013). A verificação de espermatozoides nos testículos e VD, assim como a de grânulos de vitelo nos lóbulos ovarianos foi realizada por meio de esfregaços destas estruturas (obtidas em animais preservados em etanol), sob microscópio de luz (CUZIN-ROUDY e AMSLER, 1992; SANT'ANNA et al., 2012; PASCHOAL e ZARA, 2017). Para a confirmação das análises realizadas pelos esfregaços, dez indivíduos recém-coletados de ambos os sexos de cada população apresentando diferentes estágios de desenvolvimento sexual foram anestesiados por resfriamento (- 20°C / 5 min.) e dissecados. Após a dissecação, os animais tiveram fragmentos de seus sistemas reprodutores fixados em paraformaldeído 4% (24 horas). Posteriormente, foram lavados em tampão fosfato 0,2 M (pH 7,2) por duas vezes, desidratados em uma série crescente de etanol (70 a 95 %), embebidos e incluídos em historesina glicometacrilato Leica®. Os blocos foram cortados com 4-5 µm de espessura em micrótomo rotativo. Após a microtomia, as lâminas foram coradas com hematoxilina e eosina (H&E) para descrição geral (ZARA et al., 2012, 2013).

3.4. Maturidade funcional

Para as fêmeas de *M. amazonicum*, a maturidade funcional foi determinada por meio do CL registrado para a menor fêmea ovígera com ovos apresentando manchas oculares (i.e. ovos fertilizados), capturada em campo para cada população (VIAU et al., 2006). Nos machos, a maturidade funcional foi considerada como a habilidade de copular e transmitir o ejaculado (ELNER e BENINGER, 1995). Para isso, animais das populações de SJB e CRC foram analisados em laboratório por meio de amostragem *ad libitum* para verificação da cópula. Devido ao

comportamento gregário destas populações, 90 camarões foram mantidos durante um mês, em três aquários com fundos escuros (45 cm x 25 cm x 30 cm), com cascalho basáltico como substrato e macrófitas e fragmentos de rochas para formação de refúgios. Cada aquário continha 15 fêmeas e 15 machos, sendo que estes tiveram seu cefalotórax marcado com mistura de cola de secagem rápida (Super Bonder Power Flex Gel®) e purpurina prata. Os camarões foram aclimatados e condicionados ao fotoperíodo de 12 horas e temperatura $25 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$. Para as populações de CAS e SBG, com a presença de machos com morfótipos dominantes (ver abaixo) e hábitos noturnos e crípticos, os animais foram observados em campo durante seis horas (18:00 a 0:00 h) a cada coleta mensal, para observação da cópula e pareamento de casais. Para tais observações noturnas, refletores de LED foram posicionados próximos as margens dos ambientes aquáticos. Quando verificado o sucesso de cópula, os casais eram imediatamente capturados com o uso de um puçá de malha 0,13 mm. Após a avaliação do comportamento de cópula nas populações, o início da maturidade funcional em machos foi estabelecido por meio do CL registrado para o menor indivíduo capturado, apresentando as características necessárias para o sucesso de cópula. Os tipos de sistemas de acasalamento observados em *M. amazonicum* foram analisados e classificados segundo as propostas de Correa e Thiel (2003). Os autores descrevem cinco tipos de sistemas para camarões carídeos, são eles: eussocialidade, monogamia, busca e pareamento, dominância de territórios e busca ativa.

4. Resultados

4.1. Análise morfométrica, determinação de morfótipos e maturidade morfológica

Um total de 14.375 indivíduos foram coletados durante os 15 meses de estudo nos quatro pontos de coletas. Alíquotas contendo 5.335 animais foram analisadas: CAS - 307 ♂ e 1.276 ♀, SBG - 664 ♂ e 559 ♀, SJB - 1.090 ♂ e 553 ♀ e CRC - 441 ♂ e 445 ♀. Os valores médios, mínimos e máximos das variáveis morfométricas mensuradas para todos os indivíduos encontram-se na Tabela I. Todas as populações apresentaram fêmeas maiores e mais pesadas que machos,

além de possuírem todas as estruturas corporais maiores. A única exceção foi para os quelípodos e seus artículos (própodos e dáctilos) em machos das populações de CAS e SBG. A presença de morfótipos em machos nestas populações foi confirmada pelas PCA's, resultando na nítida separação de grupos morfológicos (Figura 2). Os primeiros eixos das PCA's reteram a maior parte da variabilidade dos dados e apresentaram boas explicações (CAS: 98,05%, SBG: 97,92%, SJB: 89,85% e CRC: 87,35%). O comprimento do quelípodo maior (MCL) foi à variável morfométrica com a maior contribuição no Eixo 1 para as populações de CAS e SBG, enquanto que para as populações de SJB e CRC foi o comprimento total (TL) (Tabela II). Regressões lineares foram ajustadas utilizando a variável com a maior contribuição nas PCA's (Figura 3). Isso permitiu verificar a presença de dois fenótipos, aqui referidos como populações de grande porte em CAS ($\overline{CL} = \text{♂: } 13,05 \pm 5,08; \text{♀: } 14,80 \pm 3,41 \text{ mm}$) e SBG ($\overline{CL} = \text{♂: } 9,02 \pm 2,56; \text{♀: } 10,59 \pm 3,08 \text{ mm}$), e pequeno porte para SJB ($\overline{CL} = \text{♂: } 6,90 \pm 1,05; \text{♀: } 8,15 \pm 1,24 \text{ mm}$) e CRC ($\overline{CL} = \text{♂: } 7,31 \pm 1,14; \text{♀: } 8,65 \pm 1,72 \text{ mm}$).

Para machos das populações de grande porte, a relação MCL vs. CL foi a que melhor separou juvenis e adultos, além dos morfótipos. O CL no início da maturidade morfológica em machos foi de 8,40 mm para a população de CAS e 7,40 mm para SBG (Figura 3 e Tabela III). Os resultados das ANCOVA's mostraram que houve diferenças significativas para os interceptos (*a*) em todos os morfótipos das populações de grande porte. Todavia, somente os morfótipos CC vs. GC1 em ambas as populações apresentaram diferença nos desvios (*b*) indicando que os demais morfótipos possuem taxas de crescimento relativo similares quando comparados entre si (Apêndice I). Adicionalmente, foi possível observar que somente o morfótipo GC1 apresentou alometria positiva para a relação analisada, MCL vs. CL (Apêndice II). Ambas as populações apresentaram parâmetros de crescimento relativo e níveis alométricos similares, evidenciando o investimento em armas sexuais (quelípodos e seus artículos) (Apêndices I e II). Por outro lado, para machos de populações de pequeno porte, sem morfótipos, a relação TL vs. CL demonstrou o início da maturidade morfológica em 5,30 mm CL em SJB e 6,30 mm CL em CRC (Figura 3 e Tabela III). Os resultados das ANCOVA's mostram que em SJB, machos imaturos e maduros possuem taxas de crescimento diferentes para quase todas as relações morfométricas, enquanto que em CRC as taxas de

crescimento são mais similares (Apêndice I). Os níveis alométricos destas populações são similares, mostrando que animais adultos tendem a deslocar menos energia para o crescimento corporal que os juvenis (Apêndice II).

Tabela I. Valores médios e desvio padrão (Dp), mínimos (Min) e máximos (Max) para as variáveis morfométricas analisadas para machos e fêmeas de *M. amazonicum* nas populações de grande e pequeno porte. 2° PL: largura da segunda pleura abdominal; AL: comprimento do abdome; CAS: Cássia; CL: comprimento de carapaça; CRC: Carmo do Rio Claro; DCL: comprimento do dactilo; MCL: comprimento do quelípodo maior; PCL: comprimento do própodo; SBG: São João Batista do Glória; SJB: São José da Barra; TL: comprimento total; W: peso fresco.

População	Variáveis	Machos				Fêmeas			
		Média	Dp	Min	Max	Média	Dp	Min	Max
CAS (grande porte)	CL (mm)	13,05	5,08	3,60	24,90	14,80	3,41	5,10	28,70
	TL (mm)	42,10	14,00	12,10	76,40	48,23	10,13	17,20	85,90
	AL (mm)	22,43	7,10	6,70	40,50	25,79	5,23	10,20	43,70
	2° PL (mm)	5,08	1,73	1,30	9,22	7,06	1,75	2,00	12,10
	MCL (mm)	31,63	20,31	10,20	108,90	28,33	8,16	7,00	79,40
	PPL (mm)	8,20	7,24	1,80	39,00	6,24	2,27	1,30	25,20
	DCL (mm)	3,91	3,39	0,80	19,80	2,95	1,06	0,90	11,90
	W (g)	1,685	1,694	0,018	8,668	1,979	1,217	0,072	10,045
SBG (grande porte)	CL (mm)	9,02	2,56	4,20	23,50	10,59	3,08	4,50	19,10
	TL (mm)	32,45	7,56	15,30	68,80	36,96	9,68	11,90	63,00
	AL (mm)	17,72	3,90	8,10	34,70	20,10	5,20	8,80	33,60
	2° PL (mm)	3,83	0,96	1,75	8,10	5,02	1,82	1,50	9,80
	MCL (mm)	18,02	9,56	7,30	87,60	19,64	6,44	6,55	40,40
	PPL (mm)	3,95	3,23	1,20	28,80	4,35	1,72	1,90	10,50
	DCL (mm)	1,86	1,55	0,70	12,90	2,00	0,79	0,80	4,90
	W (g)	0,586	0,629	0,039	6,001	0,967	0,786	0,043	4,581
SJB (pequeno porte)	CL (mm)	6,90	1,05	3,70	11,30	8,15	1,24	4,10	13,40
	TL (mm)	25,33	3,52	11,90	40,70	28,55	4,34	10,09	48,90
	AL (mm)	13,98	1,79	6,30	21,30	15,60	2,27	8,60	21,60
	2° PL (mm)	2,89	0,44	1,30	4,70	3,90	0,88	1,80	7,60
	MCL (mm)	13,32	2,36	5,60	28,20	15,39	2,63	5,10	23,30
	PPL (mm)	2,72	0,44	1,50	5,40	3,33	0,56	1,40	5,10
	DCL (mm)	1,27	0,20	0,70	2,20	1,49	0,25	0,65	2,70
	W (g)	0,222	0,100	0,035	0,967	0,358	0,160	0,051	1,829
CRC (pequeno porte)	CL (mm)	7,31	1,14	4,10	10,50	8,65	1,72	4,10	14,30
	TL (mm)	26,11	3,94	15,10	37,20	30,07	5,73	14,50	43,80
	AL (mm)	14,55	2,43	8,20	26,80	16,43	3,14	8,00	24,00

2° PL (mm)	3,10	0,53	1,70	4,45	4,18	1,13	1,60	7,00
MCL (mm)	13,41	2,60	2,50	20,20	15,79	3,62	7,50	24,40
PPL (mm)	2,83	0,50	1,00	4,60	3,43	0,76	1,50	5,55
DCL (mm)	1,32	0,23	0,70	2,00	1,56	0,37	0,70	3,15
W (g)	0,263	0,117	0,042	0,846	0,446	0,244	0,046	1,345

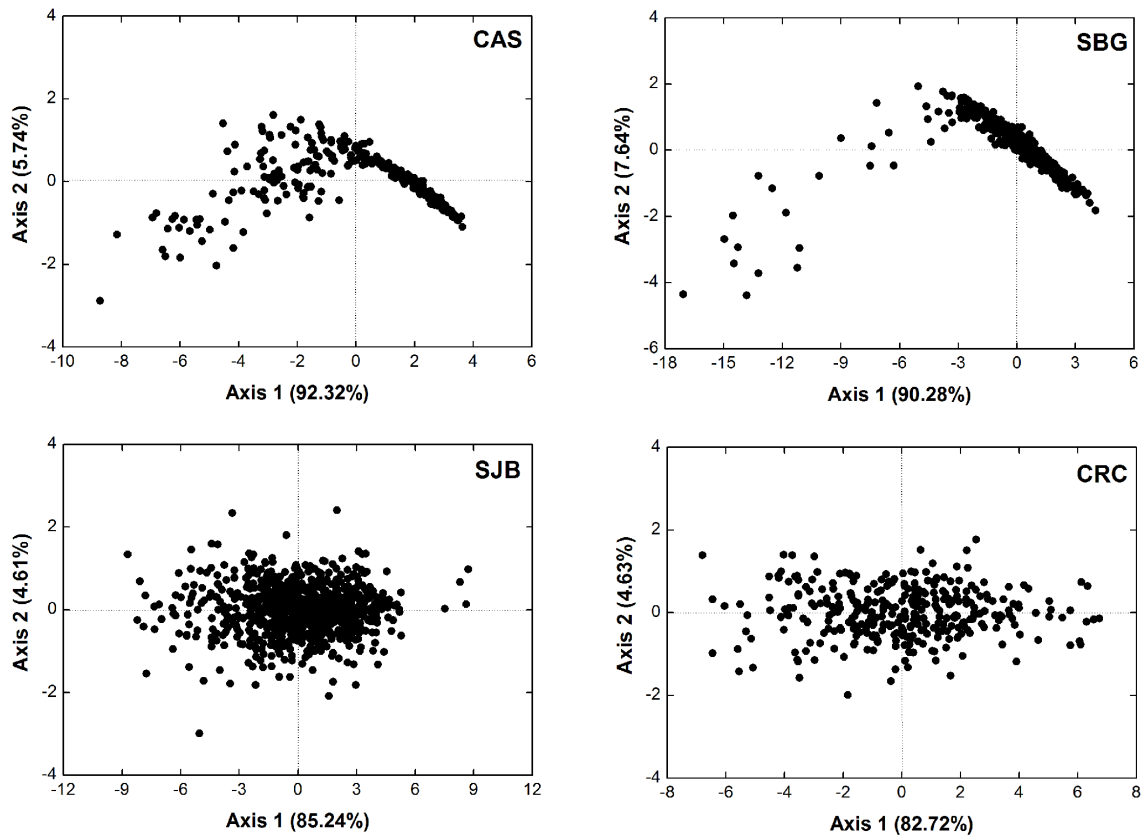


Figura 2. Diagrama de ordenação das variáveis morfométricas para populações de *M. amazonicum* com machos de grande (CAS e SBG) e pequeno (SJB e CRC) porte, por meio dos valores obtidos nos dois primeiros eixos das análises de componentes principais. CAS: Cássia; CRC: Carmo do Rio Claro; SBG: São João Batista do Glória; SJB: São José da Barra.

Tabela II. Valores de correlação (Cor) e contribuição (Cont) das variáveis morfométricas das análises de componentes principais (PCA's) utilizadas na confecção da Figura 2. Para abreviações, ver Tabela I.

Variáveis	CAS				SBG				SJB				CRC			
	PC1		PC2		PC1		PC2		PC1		PC2		PC1		PC2	
	Cor	Cont	Cor	Cont	Cor	Cont	Cor	Cont	Cor	Cont	Cor	Cont	Cor	Cont	Cor	Cont
CL	-0,976	0,129	0,161	0,057	-0,976	0,132	0,149	0,036	-0,952	0,133	-0,112	0,034	-0,949	0,136	0,088	0,021
TL	-0,960	0,125	0,239	0,124	-0,955	0,126	0,268	0,117	-0,969	0,138	-0,105	0,030	-0,972	0,143	0,092	0,023
AL	-0,957	0,124	0,250	0,136	-0,934	0,121	0,325	0,173	-0,942	0,130	-0,145	0,057	-0,916	0,127	0,123	0,041
2° PL	-0,956	0,124	0,252	0,138	-0,929	0,120	0,315	0,162	-0,905	0,120	-0,206	0,115	-0,899	0,122	0,182	0,089
MCL	-0,974	0,128	-0,208	0,094	-0,972	0,131	-0,204	0,068	-0,905	0,120	0,034	0,003	-0,884	0,118	0,044	0,005
PPL	-0,942	0,120	-0,327	0,233	-0,927	0,119	-0,364	0,216	-0,916	0,123	0,179	0,087	-0,882	0,117	0,240	0,156
DCL	-0,944	0,121	-0,309	0,208	-0,934	0,121	-0,343	0,193	-0,844	0,105	0,492	0,656	-0,842	0,107	0,478	0,615
W	-0,978	0,130	-0,066	0,009	-0,973	0,131	-0,146	0,035	-0,948	0,132	-0,083	0,019	-0,925	0,129	0,137	0,050
Explicação (%) /																
Autovalores	92,32 / 7,38		5,74 / 0,45		90,28 / 7,22		7,64 / 0,61		85,24 / 6,81		4,61 / 0,36		82,71 / 6,61		4,63 / 0,37	

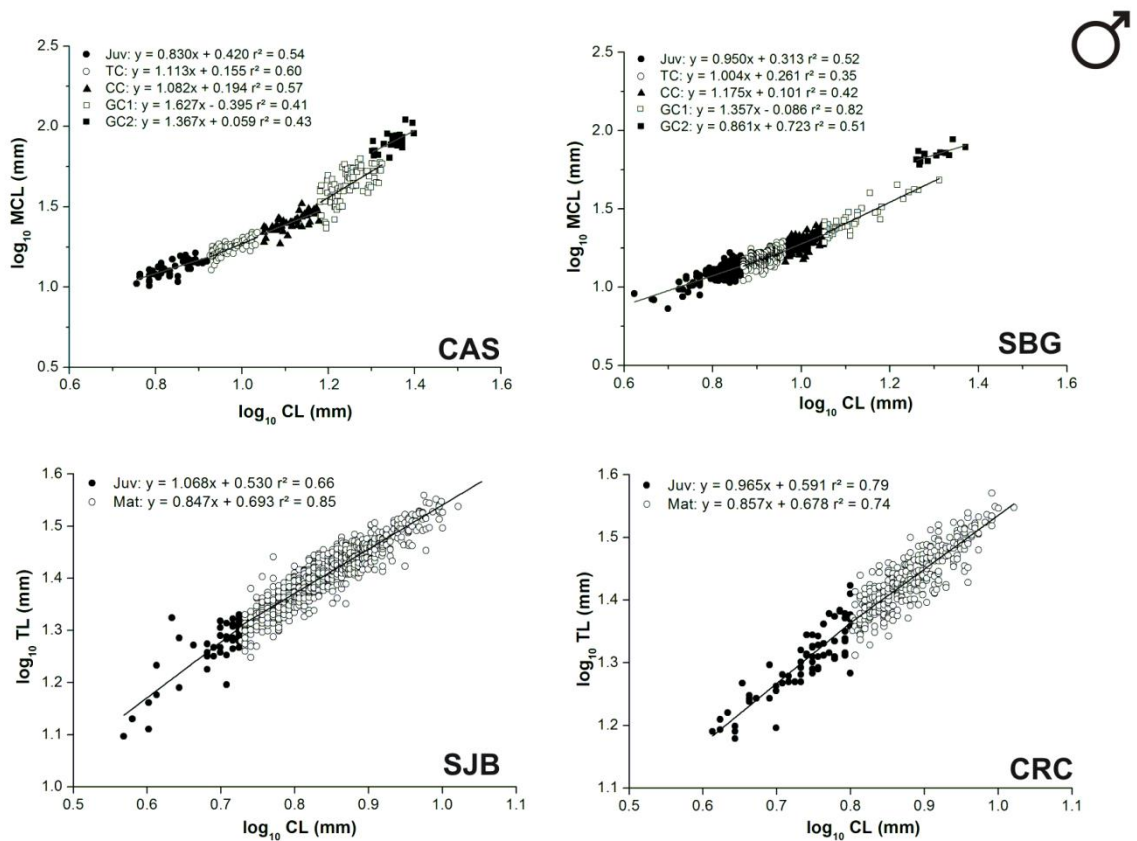


Figura 3. Dispersão dos pontos para a relação morfométrica MCL vs. CL em machos de *M. amazonicum* nas populações de grande porte (CAS e SBG), exibindo a separação dos morfótipos e a estimativa da maturidade morfológica. Para as populações de pequeno porte (SJB e CRC) a relação morfométrica TL vs. CL mostra a maturidade morfológica, sem a presença de morfótipos. CAS: Cássia; CC: quela canela; CL: comprimento de carapaça; CRC: Carmo do Rio Claro; GC1: quela verde 1; GC2: quela verde 2; Juv: Juvenis; Mat: Maduros; MCL: comprimento do quelípodo maior; SBG: São João Batista do Glória; SJB: São José da Barra; TC: quela translúcida.

Assim como machos, fêmeas de populações de grande porte deslocaram energia para o crescimento dos quelípodos, sendo que a relação que melhor demonstrou diferenças entre juvenis e adultas foi MCL vs. CL. O CL de início da maturidade morfológica foi registrado em 10,50 mm em CAS e 10,30 mm em SBG (Figura 4 e Tabela III). Os resultados das ANCOVA's mostraram que para as fêmeas de SBG, as taxas de crescimento para quelípodos e seus artículos são divergentes ao longo da maturação, enquanto que para as fêmeas de CAS as taxas dos coeficientes alométricos são similares (Apêndice III). Fêmeas de ambas as populações de grande porte apresentaram alometria positiva para quelípodos e seus artículos (Apêndice IV). Em fêmeas de populações de pequeno porte, a melhor relação para distinção da maturidade sexual foi 2° PL vs. CL (Figura 4 e Tabela III). O início da maturidade foi registrado em 7,30 mm CL em SJB e 8,30 mm CL em CRC. Em ambas as populações, o crescimento corporal (TL) é similar entre animais imaturos e maduros, porém mostram divergências nas taxas de crescimento da largura da pleura abdominal entre as fases de maturação (Apêndice III). As fêmeas adultas da população de pequeno porte apresentaram alometria positiva para a segunda pleura abdominal, enquanto que nas populações de grande porte, esta condição foi observada apenas em fêmeas da população de SBG. Em CAS, fêmeas apresentaram alometria negativa para esta relação (Apêndice IV).

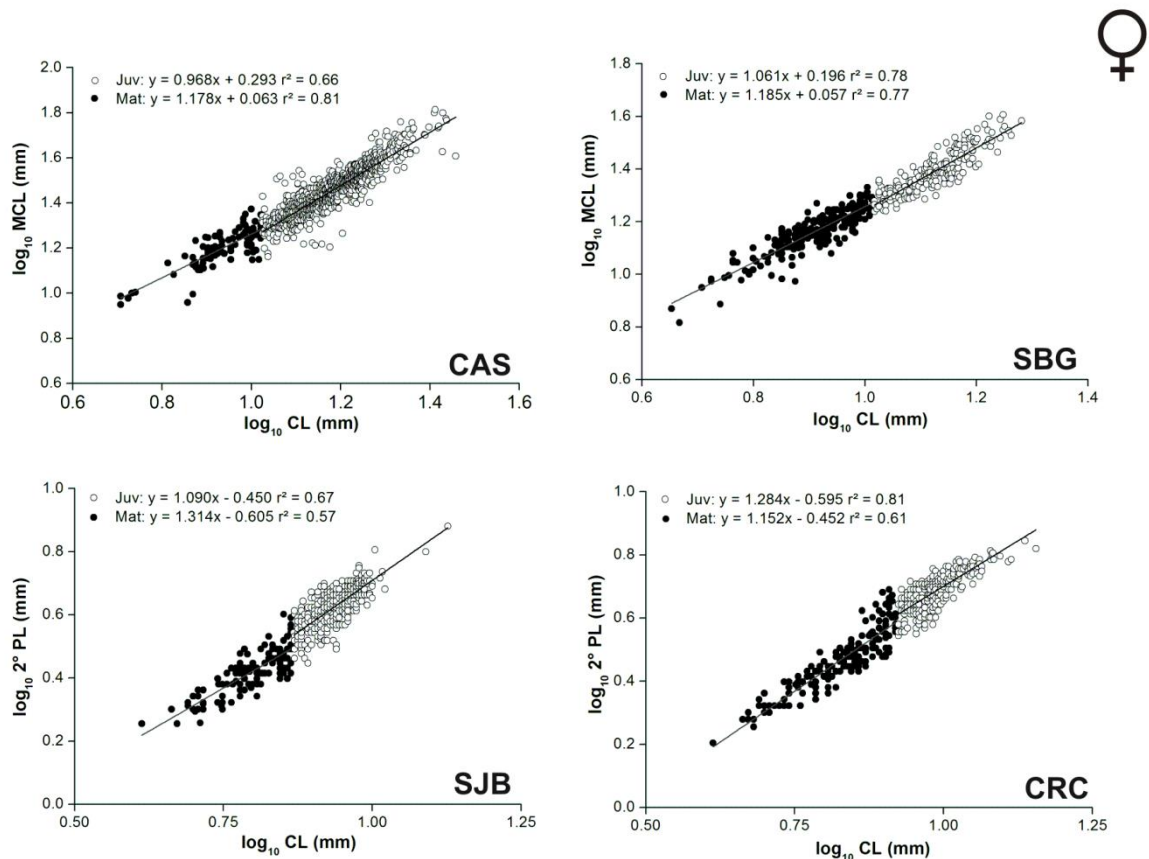


Figura 4. Dispersão dos pontos para a relação morfométrica MCL vs. CL em fêmeas imaturas e maduras de *M. amazonicum* nas populações de grande porte (CAS e SBG), e 2° PL vs. CL para as fêmeas das populações de pequeno porte (SJB e CRC). 2° PL: largura da segunda pleura abdominal; CAS: Cássia; CL: comprimento de carapaça; CRC: Carmo do Rio Claro; Juv: Juvenis; Mat: Maduras; MCL: comprimento do quelípedo maior; SBG: São João Batista do Glória; SJB: São José da Barra.

4.2. Maturidade fisiológica

O tamanho mínimo da maturidade fisiológica (histológica) registrada em machos para as populações de grande porte foi de 5,70 mm CL em CAS e 4,60 mm CL em SBG, enquanto que para as populações de pequeno porte foi de 3,70 mm CL em SJB e 4,00 mm CL em CRC (Tabela III). O sistema reprodutor masculino não apresentou diferenças anatômicas ou histológicas para as populações estudadas ou entre os quatro morfótipos. Em *M. amazonicum*, o sistema reprodutor é formado por um par de testículos e vasos deferentes (VD) conectados aos gonóporos nos coxopoditos do quinto par de pereiópodos (Figura 5A-B). Os testículos apresentam lóbulo ou ramo anterior espesso disposto sobre o hepatopâncreas, enquanto que o

lóbulo posterior é mais delgado, situado abaixo do coração (Figura 5A). Estes órgãos estão conectados aos VD, os quais se encontram dispostos lateralmente no cefalotórax, conectando-se aos gonóporos do quinto par de pereiópodos (Figura 5B). Em animais maduros, os testículos e VD apresentam coloração esbranquiçada e de fácil visualização (Figura 5A-B). Estes órgãos em animais imaturos são delgados, incolores e não podem ser distinguidos macroscopicamente. Esfregaços de testículos em animais imaturos mostraram somente espermatogônias, e os VD não continham espermatozoides. Em machos fisiologicamente maduros, nota-se por meio da histologia, que os testículos são formados por vários túbulos seminíferos agrupados em lóbulos com células em espermatogênese e espermiogênese (Figura 5C-D), e os VD estão preenchidos por secreção e espermatozoides (Figura 5E-F). Tanto nos esfregaços quanto na histologia, os animais maduros apresentam espermatozoides com formato de tacha, com espinho bastante acentuado, preenchendo os túbulos seminíferos, enquanto que somente uma pequena área na periferia dos túbulos apresenta espermatogônias (Figura 5C-D). Os túbulos seminíferos são circundados por células de Sertoli e estão envoltos por tecido conjuntivo (Figura 5D). Os VD estão divididos em três regiões: proximal, média e distal, sendo estas diferenciadas somente pelo aumento do calibre do vaso. Todas as regiões mostram o mesmo aspecto histológico, caracterizadas por epitélio cúbico ou pavimentoso simples com núcleos basais envolto por musculatura (Figura 5E-F). No lúmen dos VD de animais fisiologicamente maduros, observa-se grande quantidade de espermatozoides centralmente compactados envoltos por secreção formando uma só massa espermática revestida por secreção acidófila, mais facilmente notado na porção distal dos VD ou ductos ejaculatórios (ED) (Figura 5E-F). Nesta região dos VD, dilatações em sua porção final formam as ampolas dos ED, que possuem musculatura mais espessa que as demais regiões (Figura 5E-F). Nos ED, podem-se observar as glândulas androgênicas dispostas longitudinalmente aos vasos sobre a camada muscular (Figura 5E). Estas glândulas são bem marcadas em animais maduros, enquanto que em animais imaturos, elas são extremamente reduzidas ou ausentes.

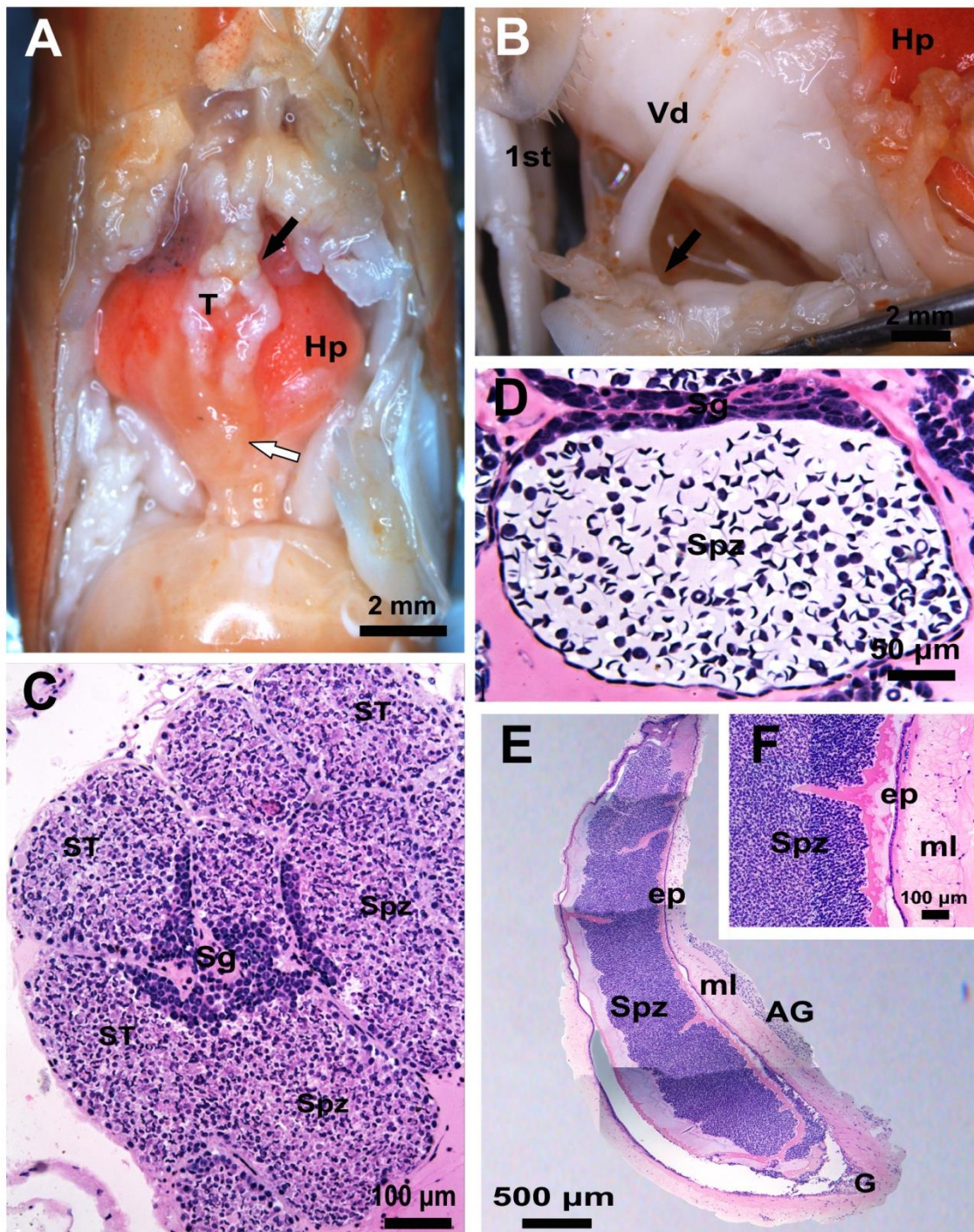


Figura 5. **A.** Vista dorsal do sistema reprodutor de *M. amazonicum*, apresentando os testículos com seus lóbulos anteriores espessos (seta preta) dispostos sobre o hepatopâncreas, enquanto que lóbulos posteriores (seta branca) são menores e ficam abaixo do coração do animal (aqui removido para melhor visualização do testículo). **B.** Vista lateral do cefalotórax de um macho, mostrando o vaso deferente se abrindo no gonópore do coxopodito do quinto par de pereiópodos (seta preta). **C.** Aspecto geral dos túbulos seminíferos do testículo, com uma grande quantidade de espermatozoides preenchendo-os quase que totalmente e uma pequena área contendo espermatogônias. **D.** Túbulo seminífero isolado. Note os espermatozoides com formato de tacha no lúmen do túbulo. **E e F.** Corte longitudinal da região distal do vaso deferente preenchido por espermatozoides envolvidos em secreção. Esta

região possui camada muscular espessa e apresenta grande quantidade de espermatozoides centralmente compactados. 1st: primeiros pléopodos; AG: glândula androgênica; ep: epitélio; G: abertura genital; Hp: hepatopâncreas; ml: camada muscular; Sg: espermatogônias; Spz: espermatozoides; ST: túbulos seminíferos; T: testículos; Vd: vaso deferente.

O tamanho mínimo da maturidade fisiológica registrada para fêmeas das duas populações de grande porte foi de 6,70 mm CL, enquanto que para as duas populações de pequeno porte foi de 5,00 mm CL (Tabela III). A maturidade fisiológica é marcada pela transformação colorimétrica e volumétrica dos ovários ao longo de seu desenvolvimento (Figura 6A, D e G). Os ovários são incolores ou translúcidos antes de atingirem a maturidade fisiológica (Figura 6A). Estes são caracterizados pela presença de muitas ovogônias e ovócitos pré-vitelogênicos (Figura 6B-C). Neste estágio, os ovócitos mostram grande núcleo arredondado com pouca heterocromatina dispersa em blocos e um ou dois nucléolos bem evidentes. O citoplasma é muito basófilo e pode apresentar pequenas vesículas ou dilatações acidófilas que caracterizam o vitelo endógeno (Figura 6B-C). Ao atingir a maturidade histológica, as fêmeas apresentam pela primeira vez a coloração esverdeada característica dos ovários maduros nesta espécie (Figura 6D). Esta tonalidade se deve a presença de ovócitos em vitelogênese exógena, com grânulos de vitelo acumulados no citoplasma ainda basófilo (Figura 6E-F). No início deste estágio, células foliculares altas envolvem os ovócitos em vitelogênese. O núcleo torna-se menor, devido à compactação promovida pelos grânulos de vitelo. Estes grânulos são acidófilos e poucas gotas lipídicas são detectadas nesta fase. A quantidade de ovócitos pré-vitelogênicos é similar ou menor a de ovócitos vitelogênicos (Figura 6E-F). Ao final da maturação, os ovários ocupam uma grande área da cavidade celomática do cefalotórax e apresentam uma coloração verde intensa (Figura 6G). Neste estágio, os ovócitos mostram-se bem desenvolvidos e têm maior diâmetro quando comparados aos estágios anteriores (Figura 6H e I). Sua principal característica é o citoplasma repleto de grânulos de vitelo acidófilos e muitas gotas de lipídeos. Em alguns casos, a visualização do núcleo torna-se difícil, devido ao incremento de vitelo no citoplasma. Neste estágio ovariano, os ovócitos são envoltos células foliculares achatadas e estão bem aderidos uns aos outros, produzindo um aspecto mais compacto (Figura 6H e I).

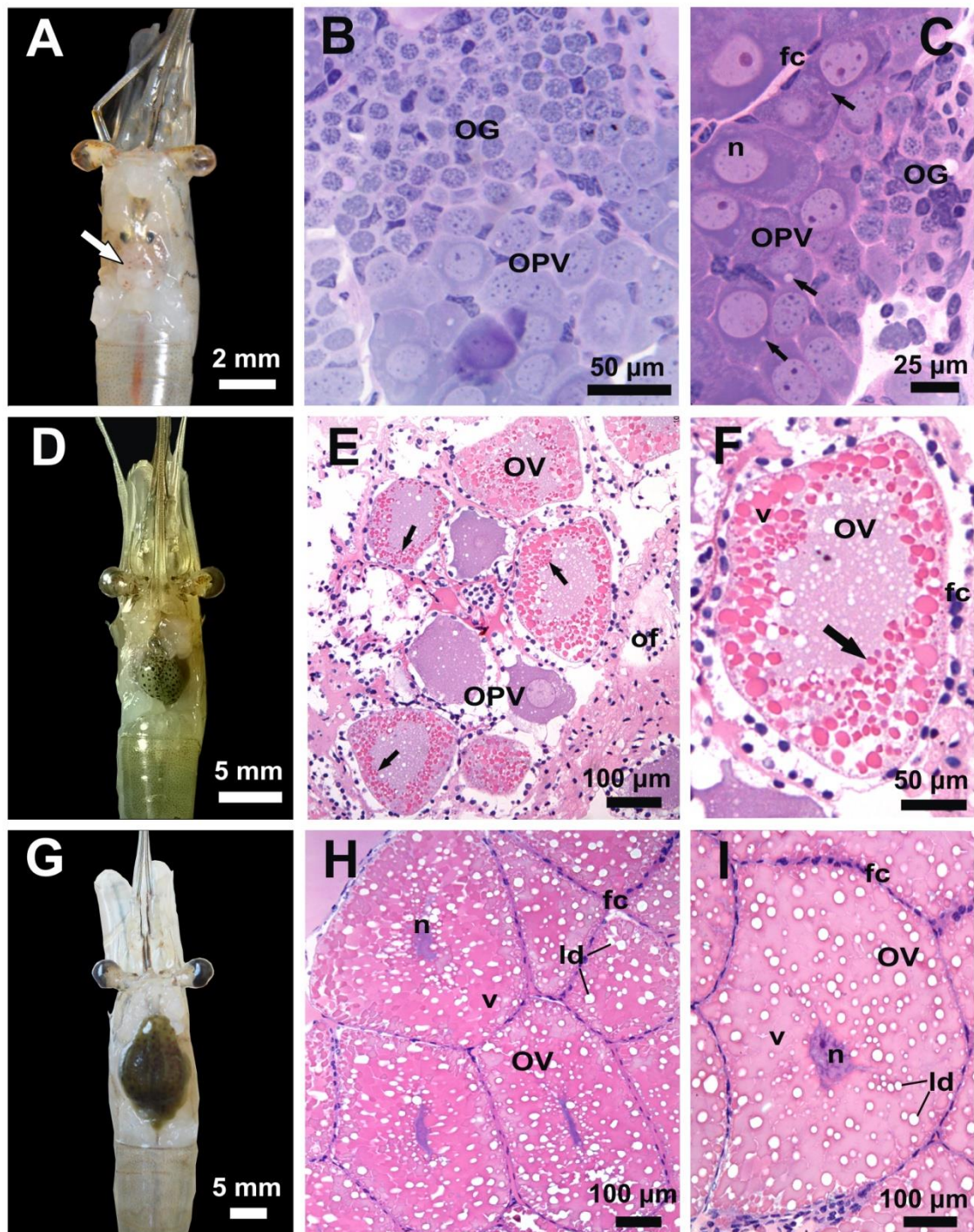


Figura 6. A. Vista dorsal do ovário imaturo, incolor e com tamanho reduzido (seta branca) de *M. amazonicum*. B e C. Ovário imaturo com grande quantidade de ovogônias e ovócitos pré-vitelogênicos apresentando citoplasma fortemente basófilo com pequenas dilatações (setas pretas). D. Vista dorsal do ovário no início da maturidade sexual apresentando coloração esverdeada, ocupando pequena porção do cefalotórax. E e F. Ovócitos em vitelogênese apresentando grânulos de vitelo (setas pretas) em seu citoplasma ainda basófilo. Estes são envoltos por células foliculares altas. G. Vista dorsal do ovário maduro, com coloração esverdeada intensa e ocupando todo cefalotórax. H e I. Ovócitos bem desenvolvidos apresentam seu núcleo na porção central circundado por grânulos de vitelo acidófilos e gotas de lipídeos não coradas. As células foliculares destes ovócitos são achatadas. fc: célula

folicular; ld: gota de lipídeo; n: núcleo; of: folículo ovariano; OG: ovogônia; OPV: ovócito pré-vitelogênico; OV: ovócito em vitelogênese; v: vitelo.

4.3. Maturidade funcional

Nas quatro populações estudadas, fêmeas ovígeras foram capturadas em todos os 15 meses de estudo, indicando um padrão contínuo de atividade reprodutiva. O tamanho mínimo das fêmeas ovígeras registrado para populações de pequeno porte foi de 7,10 mm CL em SJB e 7,40 mm CL em CRC, enquanto que para as populações com fêmeas de grande porte a menor fêmea ovígera registrada possuía 9,40 mm CL em ambas as populações. A maturidade funcional foi próxima a morfológica, com o registro de poucas fêmeas ovígeras capturadas abaixo do valor estimado para a maturidade morfológica (Tabela III). Em populações de pequeno porte, as cópulas em laboratório foram caracterizadas pelo padrão de busca ativa (*sensu* CORREA e THIEL, 2003), com ausência de comportamento agonístico em machos. Os animais concentravam-se em uma área e não havia formação de casais. Os machos deste fenótipo apresentaram a maturidade funcional concomitante a histológica (Tabela III). Além disso, machos de tamanhos reduzidos (CL \geq 3,70 mm) já apresentavam apêndice masculino formado, corroborando a maturidade funcional. Por outro lado, as cópulas em populações de grande porte foram observadas somente após o pareamento de casais. Em campo, foi observado que apenas os machos de morfótipos dominantes (GC1 e GC2) eram capazes de copular. Estes animais eram vistos próximos a margem de ambientes aquáticos com sedimento arenoso (até 2 m) e ficavam dispostos atrás ou ao lado (paralelamente) de fêmeas receptivas. Os machos protegiam e guardavam as fêmeas antes e após a cópula, e era comum observar lutas entre machos com quelípodos hipertrofiados. Durante este comportamento agonístico, o macho elevava seus pereiópodos e a porção anterior do corpo e atacava seu oponente com os dácilios do segundo par de quelípodos. Comumente, este evento era curto variando entre três a vinte segundos (\bar{X} = 12 segundos). Em campo, não foi observada a cópula sorrateira nas populações de grande porte analisadas. O sistema de acasalamento destas populações tem o padrão de dominância de territórios (*sensu* CORREA e THIEL, 2003). O menor tamanho dos machos das populações de grande porte capturados

após a cópula observada foi de 14,40 e 15,20 mm CL para as populações de CAS e SBG, respectivamente (Tabela III).

Tabela III. Valores obtidos para o início da maturidade morfológica (Morp.), fisiológica (Fis.) e funcional (Func.) em ambos os sexos de *M. amazonicum*, assim como o número de fêmeas ovígeras capturadas abaixo da maturidade morfológica estimada (Ovg) para camarões das populações de grande e pequeno porte. CAS: Cássia; CRC: Carmo do Rio Claro; SBG: São João Batista do Glória; SJB: São José da Barra.

Sexo	População	N	Morp.	Fis.	Func.	Ovg
Macho	CAS (grande porte)	307	8,40	5,70	14,40	-
	SBG (grande porte)	664	7,40	4,60	15,20	-
	SJB (pequeno porte)	1.090	5,30	3,70	3,70	-
	CRC (pequeno porte)	441	6,30	4,00	4,00	-
Fêmeas	CAS (grande porte)	1.276	10,50	6,70	9,40	6
	SBG (grande porte)	559	10,30	6,70	9,40	2
	SJB (pequeno porte)	553	7,30	5,00	7,10	1
	CRC (pequeno porte)	445	8,30	5,00	7,40	12

5. Discussão

As populações de *M. amazonicum* analisadas apresentaram características morfológicas e reprodutivas bastante distintas, evidenciando a sua grande adaptabilidade ambiental e plasticidade fenotípica. A variação intraespecífica da estratégia de reprodução e do início da maturidade sexual maximiza o sucesso reprodutivo da espécie em diferentes ambientes aquáticos (ODINETZ-COLLART, 1991). Das quatro populações estudadas, duas delas (populações da UHE de MMM) mostraram que machos e fêmeas adultos apresentam grandes proporções corporais (i.e. grande porte) e que estes desviam energia para o crescimento de quelípodos, uma vez que exibem incremento alométrico significativo para estas estruturas e seus artículos. Além disso, a presença de morfótipos em machos foi constatada nestas populações, por meio da análise desta variável morfométrica. Comumente, machos do gênero *Macrobrachium* possuem maiores proporções corporais que fêmeas, pois tendem a investir mais energia para o crescimento somático e o desenvolvimento de quelípodos robustos (i.e. armas sexuais), garantindo um maior sucesso em competições intra/interespecíficas (CORREA e THIEL, 2003; BAUER, 2004;

MORAES-RIODADES e VALENTI, 2004). O forte dimorfismo sexual em *M. amazonicum* com a presença de hierarquia social confere vantagens adaptativas para machos dominantes (GC1 e GC2), como: maior facilidade na obtenção de recursos alimentares e domínio de territórios (IBRAHIM, 2011; CORREA e THIEL, 2003), e acesso às fêmeas disponíveis para cópula, como observado no presente estudo. Desta forma, animais com maiores tamanhos teriam maior sucesso reprodutivo, explicando a alometria positiva de MCL constatada somente para o morfótipo GC1. Como o desenvolvimento de morfótipos é sequencial, e provável que animais com morfótipo GC1 concentrem mais energia para a aquisição de armas sexuais durante a passagem para o morfótipo GC2, e após a entrada neste morfótipo cessem o crescimento somático, destinando energia apenas para a manutenção de processos metabólicos (MORAES-RIODADES e VALENTI, 2004; AUGUSTO e VALENTI, 2016). Por outro lado, o investimento de energia para o incremento do tamanho de quelípodos em fêmeas destas populações estaria relacionado à maximização de eventos reprodutivos, como escolha de melhores parceiros sexuais, proteção e cuidado maternal para incubação e desova (VIAU et al., 2006).

Até o presente momento, somente o estudo de Pantaleão et al. (2014) apresentava morfótipos em machos de *M. amazonicum* para ambientes dulciaquícolas interiores (Bacia do Rio Tietê, São Paulo – sudeste do Brasil), sendo este o segundo registro dessa condição para a espécie. Além disso, estes autores estimaram que a maturidade morfológica em machos com morfótipos inicia-se em 8,8 mm CL, valor superior daqueles registrados no presente estudo. Contudo, a maturidade funcional aqui analisada em populações com morfótipos foi registrada com valores significativamente superiores, mostrando que nem a maturidade fisiológica ou a morfológica realmente expressam o momento em que os machos são aptos a copular e transferir seus gametas e/ou defender fêmeas e territórios. No tocante as fêmeas, não existem estudos que avaliem a maturidade morfológica em populações com a presença de morfótipos dominantes em ambientes continentais ou que utilizem a mesma metodologia aqui empregada, o que impede a comparação com outras populações. Porém, a maturidade morfológica em fêmeas de grande porte é similar entre as populações estudadas (10,50 e 10,30 mm CL em CAS e SBG, respectivamente).

A ausência de morfótipos, o menor investimento energético para o crescimento somático e, conseqüentemente, os menores tamanhos corporais (i.e. pequeno porte) foram às principais características de machos das outras duas populações (UHE de Furnas) estudadas. Por outro lado, as fêmeas destas populações investem energia para o crescimento da segunda pleura abdominal. Este padrão é típico em carídeos que adotam a estratégia sexual de busca ativa, onde machos que não protegem as fêmeas investem energia para a produção de gametas, deslocando a energia que seria utilizada para o crescimento corporal, enquanto que fêmeas acumulam energia para o crescimento da câmara incubadora (abdome e pleuras) maximizando a fecundidade e a proteção dos embriões (BAUER, 2004; PASCHOAL et al., 2013, 2016).

Somente o estudo de Pantaleão et al. (2012) abordou aspectos morfométricos de *M. amazonicum* de pequeno porte em ambientes lênticos interiores (Bacia do Rio Tietê, São Paulo - sudeste do Brasil). Como aqui constatado, estes autores não registraram morfótipos em machos, apontando que a predação por peixes e o padrão de cópula por busca ativa explicam a ausência de morfótipos nestas populações. Os mesmos autores estimaram o início da maturidade morfológica para esta população em 4,26 mm CL para machos e 5,39 mm CL para fêmeas. Tais valores são menores que aqueles registrados no presente estudo. Pode-se constatar que a maturidade morfológica aqui estimada, quando comparada aos outros parâmetros de maturidade (fisiológica e funcional) mostra valores superiores, superestimando o início da maturidade sexual em *M. amazonicum*. Dessa forma, nota-se que machos de populações de pequeno porte estão maduros e funcionais mesmo com tamanhos reduzidos. Assim, a análise da maturidade sexual em uma população de *M. amazonicum* deve levar em consideração o fenótipo geral da população, sendo aconselhável utilizar a maturidade fisiológica para populações sem morfótipos, por esta ser muito próxima a funcional.

O sistema reprodutor masculino e feminino de *M. amazonicum* apresenta o padrão anatômico semelhante ao comumente descrito para carídeos gonocóricos (SANDIFER e LYNN, 1980; BAUER, 2004). Por meio da histologia, é possível verificar que os sistemas reprodutores do camarão amazônico são bastante similares a outras espécies do gênero *Macrobrachium* (CHOW et al., 1982; SAGI et al., 1988; MOSSOLIN e BUENO, 2002; POLJAROEN et al., 2010; SOONKLANG et

al., 2012). Em ambos os sexos, a maturidade fisiológica em *M. amazonicum* antecede as demais e é alcançada em tamanhos (CL) bastante reduzidos dentro das populações analisadas. Isto mostra que nestes animais as maturidades fisiológicas e morfológicas não são sincronizadas, e que necessitam de seus sistemas reprodutores funcionais antes de realizarem a muda de puberdade. Este padrão é similar ao de outras espécies do gênero *Macrobrachium* (CHOW et al., 1982; SAGI et al., 1988; MOSSOLIN e BUENO, 2002; POLJAROEN et al., 2010; SOONKLANG et al., 2012) e a alguns braquiúros (ZARA et al., 2012, 2013; NASCIMENTO e ZARA, 2013). No entanto, é oposto daquele registrado para alguns aeglídeos (VIAU et al., 2006) e camarões peneídeos (HECKLER et al., 2013), onde a maturidade morfológica antecede a fisiológica. Em *M. amazonicum*, machos se tornam fisiologicamente maduros antes das fêmeas, e isso pode estar associado à menor longevidade de camarões machos. Paschoal et al. (2016) sugeriram que palaemonídeos machos atingem sua condição reprodutiva ideal em tamanhos reduzidos e são capazes de copular com fêmeas maiores, porém desaparecem da população devido à baixa longevidade, enquanto que fêmeas por serem mais longevas, permanecem na população e continuam crescendo.

O sistema de acasalamento que melhor se enquadra as populações de grande porte de *M. amazonicum* seria o de dominância de territórios (*sensu* CORREA e THIEL, 2003), o que explicaria os altos valores registrados para a maturidade funcional em machos destas populações. Machos dominantes destas populações possuem quelípodos hipertrofiados (morfótipos GC1 e GC2) e é possível observar que estes animais protegem e guardam as fêmeas no período de cópula. Além disso, destinam menos energia à produção de espermatozoides, sendo que a maior parcela de energia é destinada ao crescimento somático e a produção e manutenção das armas sexuais visando um maior sucesso em competições intraespecíficas (MORAES-RIODADES e VALENTI, 2004; PASCHOAL, 2017 – Capítulos 7 e 8). Em contrapartida, machos das populações de pequeno porte de *M. amazonicum* não investem muita energia para o crescimento somático, tampouco deslocam energia para a aquisição de armas sexuais. Porém, atingem a maturidade histológica e funcional em tamanhos (CL) muito reduzidos quando comparados a animais de populações de grande porte. Isso indica que a energia que seria destinada ao crescimento corporal é mais bem aproveitada em eventos reprodutivos,

como a produção espermática (PASCHOAL et al., 2013, 2016; PASCHOAL - Capítulo 8). Somado a isto, machos desta população são gregários, não apresentam comportamento agonístico e não defendem e protegem as fêmeas. Desta forma, o sistema de acasalamento das populações de pequeno porte possui o padrão de busca ativa (*sensu* CORREA e THIEL, 2003). Em todas as populações de *M. amazonicum* analisadas, poucas fêmeas ovígeras (i.e. funcionalmente maduras) foram capturadas abaixo do valor estimado para a maturidade morfológica, indicando que existe uma sincronização entre a maturidade morfológica e funcional. Isto indica que o uso do crescimento relativo ou a avaliação da menor classe de CL em fêmeas ovígeras são adequados para estimar o tamanho da maturidade sexual para palemonídeos, como sugerido por Paschoal et al. (2013, 2016).

6. Conclusão

A utilização de dados morfométricos mostraram ser ferramentas úteis para a determinação de distintos fenótipos e estoques populacionais em *M. amazonicum*. Os três critérios de maturidade sexual empregados mostraram que em ambos os sexos a maturidade fisiológica antecede as demais e que machos atingem a maturidade sexual em menores tamanhos que as fêmeas em todos os critérios, exceto pela maturidade funcional em machos de populações de grande porte. O desenvolvimento dos quelípodos (armas sexuais) nos machos, além de ser responsável por mudar as estratégias de acasalamento em *M. amazonicum*, modulou o início da maturidade sexual na espécie, uma vez que animais de grande porte necessitavam de quelípodos robustos para pareamento e sucesso na cópula. De forma geral, o esquema sequencial da maturidade sexual em *M. amazonicum* pode ser resumido em: ♀: fisiológica → funcional ≅ morfológica, ♂ grande porte: fisiológica → morfológica → funcional e ♂ pequeno porte: fisiológica = funcional → morfológica. A maturidade sexual em *M. amazonicum* varia de um critério a outro, assim como entre os dois fenótipos avaliados, dessa forma sugerimos que o melhor critério utilizado para estimar o início da maturidade sexual visando à proteção de estoques da espécie seja aquele registrado com o maior valor de CL. As informações aqui apresentadas poderão também ser utilizadas na manutenção de

espécimes em cultivo, plantéis de reprodutores e avaliação de séries temporais de reprodutores, assim como poderão ser empregadas em estudos envolvendo a biologia populacional da espécie em ambientes limnícicos.

7. Referências

ANGER, K. Neotropical *Macrobrachium* (Caridea: Palaemonidae): on the biology, origin, and radiation of freshwater-invading shrimp. **Journal of Crustacean Biology**, vol. 33, n. 2, p. 151-183.2013.

ANGER, K. et al. Patterns of larval growth and chemical composition in the Amazon river prawn, *Macrobrachium amazonicum*. **Aquaculture**, vol. 287, p. 341-348.2009.

AUGUSTO, A.; VALENTI, W.C. Are there any physiological differences between the male morphotypes of the freshwater shrimp *Macrobrachium amazonicum* (Heller, 1862) (Caridea: Palaemonidae)? **Journal of Crustacean Biology**, vol. 36, n. 5, p. 716-723. 2016.

BAUER, R.T. **Remarkable shrimps. Adaptations and Natural History of the Carideans**.1st ed. Oklahoma: University of Oklahoma Press, 2004, 282 p.

BAUER, R.T. Amphidromy in shrimps: a life cycle between rivers and the sea. **Latin American Journal of Aquatic Research**, vol. 41, n. 4, p. 633-650. 2013.

CHOW, S.; OGASAWARA, Y.; TAKI, Y. Male reproductive system and fertilization of the palaemonid shrimp *Macrobrachium rosenbergii*. **Bulletin of the Japanese Society for the Science of Fish**, vol.48, n. 2, p. 177-183. 1982.

CORREA, C.; THIEL, M. Mating systems in caridean shrimp (Decapoda: Caridea) and their evolutionary consequences for sexual dimorphism and reproductive biology. **Revista Chilena de Historia Natural**, vol. 76, 187-203. 2003.

CUZIN-ROUDY, J.; AMSLER, M.O.L. Ovarian development and sexual maturity staging in Antarctic krill, *Euphausia superba* Dana (Euphausiacea). **Journal of Crustacean Biology**, vol. 11, n. 2, p. 236-249. 1991.

DUTRA, F.M. et al. Acute toxicity of ammonia to various life stages of the Amazon river prawn, *Macrobrachium amazonicum*, Heller, 1862. **Aquaculture**, vol. 453, p. 104-109. 2016.

ELNER, R.W.; BENINGER, P.G. Multiple reproductive strategies in snow crab, *Chionoecetes opilio*: physiological pathways and behavioral plasticity. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**, vol. 193, p. 93-112. 1995.

- HAYD, L.; ANGER, K. Reproductive and morphometric traits of *Macrobrachium amazonicum* (Decapoda: Palaemonidae) from the Pantanal, Brazil, suggests initial speciation. **Revista de Biología Tropical**, vol. 61, p. 39-57. 2013.
- HECKLER, G.S. et al. Biologia populacional e reprodutiva do camarão sete-barbas na Baía de Santos, São Paulo. **Boletim do Instituto de Pesca**, vol. 39, p. 283-297. 2013.
- HENARES, M.N.P. et al. Effects of artificial substrate and night-time aeration on the water quality in *Macrobrachium amazonicum* (Heller 1862) pond culture. **Aquaculture Research**, vol. 46, p. 618-625. 2015.
- HENRY-SILVA, G.G. et al. Integrated multi-trophic culture of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) and Amazon river prawn (*Macrobrachium amazonicum*) in brackish water. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, vol. 67, p. 265-273. 2015.
- HUXLEY, J.S. Relative growth and form transformation. **Proceedings of the Royal of London**, vol. 137, p. 465-469. 1950.
- IBRAHIM, A.N.A.F. **Controle social do crescimento do camarão-da-amazônia *Macrobrachium amazonicum***. 39 f. Dissertação de mestrado (Mestrado em Aquicultura). Universidade Estadual Paulista – UNESP, Jaboticabal. 2011.
- MACIEL, C.R.; VALENTI, W.C. Biology, fisheries, and aquaculture of the Amazon River prawn *Macrobrachium amazonicum*: a review. **Nauplius**, vol.17, p. 61-79. 2009.
- MACIEL, C.R.; VALENTI, W.C. Effect of tank colour on larval performance of the Amazon River prawn *Macrobrachium amazonicum*. **Aquaculture Research**, vol. 45, p. 1041-1050. 2014.
- MORAES-RIODADES, P.M.C.; VALENTI, W.C. Morphotypes in male amazon river prawns, *Macrobrachium amazonicum*. **Aquaculture**, vol. 236, p. 297–307. 2004.
- MORAES-VALENTI, P.M.; VALENTI, W.C. Culture of the Amazon River Prawn *Macrobrachium amazonicum*. In: NEW, M.B. et al. (Eds). **Freshwater prawns: biology and farming**. 1st ed. Oxford: Wiley-Blackwell, 2010. p. 485-501.
- MOSSOLIN, E.C.; BUENO, S.L.S. Reproductive biology of *Macrobrachium olfersi* (Decapoda, Palaemonidae) in São Sebastião, Brazil. **Journal of Crustacean Biology**, vol. 22, n. 2, p. 367-376. 2002.
- NASCIMENTO, F.A.; ZARA, F.J. Development of the male reproductive system in *Callinectes ornatus* Ordway, 1863 (Brachyura: Portunidae). **Nauplius**, vol. 21, n. 2, p. 161-177. 2013.
- NEW, M.B. Freshwater prawn farming: global status, recent research and a glance at the future. **Aquaculture Research**, vol. 36, p. 210-230. 2005.

ODINETZ-COLLART, O. Strategie de reproduction de *Macrobrachium amazonicum* en Amazonie Centrale (Decapoda, Caridea, Palaemonidae). **Crustaceana**, vol. 61, p. 253-270. 1991.

ODINETZ-COLLART, O.; RABELO, H. Variation in egg size of the freshwater prawn *Macrobrachium amazonicum* (Decapoda, Palaemonidae). **Journal of Crustacean Biology**, vol. 16, n. 4, p. 684-688.1996.

PANTALEÃO, J.A.F.; HIROSE, G.L.; COSTA, R.C. Relative growth, morphological sexual maturity, and size of *Macrobrachium amazonicum* (Heller 1862) (Crustacea, Decapoda, Palaemonidae) in a population with an entirely freshwater life cycle. **Invertebrate Reproduction & Development**, vol. 56, p. 80-190. 2012.

PANTALEÃO, J.A.F.; HIROSE, G.L.; COSTA, R.C. Ocurrência de male morphotypes of *Macrobrachium amazonicum* (Caridea, Palaemonidae) in a population with an entirely freshwater life cycle. **Brazilian Journal of Biology**, vol. 74, n. 3 sup., p. 223-232. 2014.

PASCHOAL, L.R.P.; GUIMARÃES, F.J.; COUTO, E.C.G. Relative growth and sexual maturity of the freshwater shrimp *Palaemon pandaliformis* (Crustacea: Palaemonidae) in northeast of Brazil (Canavieiras, Bahia). **Iheringia, Serie Zoológica**, vol. 103, p. 31-36. 2013.

PASCHOAL, L.R.P.; GUIMARÃES, F.J.; COUTO, E.C.G. Growth and reproductive biology of the amphidromous shrimp *Palaemon pandaliformis* (Decapoda, Caridea) in a Neotropical river from northeastern Brazil. **Zoologia (Curitiba)**, vol.33, n. 6, p. 1-14. 2016.

PASCHOAL, L.R.P.; ZARA, F.J. First record of intersexuality in the Amazon River shrimp *Macrobrachium amazonicum* (Heller, 1862) (Caridea: Palaemonidae). **Journal of Crustacean Biology**, vol. 74, n. 4, p. 1-5. 2017.

PILEGGI, L.A.G. **Sistemática filogenética dos camarões do gênero *Macrobrachium* Bate, 1868 do Brasil: análises morfológicas e moleculares**. 236 f. Tese de doutorado (Doutorado em Biologia Comparada). Universidade de São Paulo – USP, São Paulo. 2009.

PILEGGI, L.G. et al. New records and extension of the known distribution of some freshwater shrimps in Brazil. **Revista Mexicana de Biodiversidad**, vol. 84, p. 563-574. 2013.

POLJAROEN, J. et al. Spermatogenesis and distinctive mature sperm in the giant freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii* (De Man, 1879). **Zoologischer Anzeiger**, vol. 249, p. 81-94. 2010.

PRETO, B.L. et al. Population structure of pond-raised *Macrobrachium amazonicum* with different stocking and harvesting strategies. **Aquaculture**, vol. 307, p. 206-211. 2010.

R CORE TEAM. **R (The R Project for Statistical Computing)**. Software version 3.3.1. 2016. Disponível em: <www.r-project.org>. Acesso em: 01dez. 2016.

SAGI, A.; MILNER, Y.; COHEN, D. Spermatogenesis and sperm storage in the testes of the behaviorally distinctive male morphotypes of *Macrobrachium rosenbergii* (Decapoda, Palaemonidae). **The Biological Bulletin**, vol.174, p. 330-336.1988.

SANT'ANNA et al. Relative abundance and population biology of the non-indigenous crab *Charybdis hellerii* (Crustacea: Brachyura: Portunidae) in a southwestern Atlantic estuary-bay complex. **Aquatic Invasions**, vol. 7, n. 3, p. 347–356. 2012.

SAMPEDRO, M.P et al. Morphometry and sexual maturity in the spider crab *Maja squinado* (Decapoda: Majidae) in Galicia, Spain. **Journal of Crustacean Biology**, vol. 19, n. 3, p. 578-592.1999.

SANDIFER, P.A.; LYNN, J.W. Artificial insemination of caridean shrimp. In: CLARK JR., W.H.; ADAMS, H.S. (Eds.). **Recent Advances in Invertebrate Reproduction**. 1 st ed. Amsterdam: Elsevier, 1980. p. 271–288

SANTOS, M.R., RODRIGUES, C.G., VALENTI, W.C. Effect of habitat diversity on population development of the Amazon River Prawn. **Journal of Shellfish Research**, vol. 35, p. 1075-1081. 2016.

SOONKLANG,N. et al. Ultrastructure of differentiating oocyte and vitellogenesis in the giant fresh water prawn, *Macrobrachium rosenbergii* (de Man). **Microscopy Research and Technique**,vol. 75, p. 1402–1415. 2012.

VERGAMINI, F.G.; PILEGGI, L.G.; MANTELATTO, F.L. Genetic variability of the Amazon River prawn *Macrobrachium amazonicum* (Decapoda, Caridea, Palaemonidae). **Contributions to Zoology**, vol. 80, p. 67-83.2011.

VIAU, V.E et al. Size at the onset of sexual maturity in the anomuran crab, *Aegla uruguayana* (Aeglididae). **Acta Zoologica (Stockholm)**, vol. 87, p. 253-264. 2006.

WENNER, E.L. et al. **A comparison of species composition and abundance of decapod crustaceans and fishes from the North and South Edisto rivers in South Carolina**. South Carolina Marine Research Center: Technical Report No. 78, Charleston, 1991, 48 p.

ZARA, F.J. et al. Spermatogenesis, spermatophore and seminal fluid production in the adult blue crab *Callinectes danae* (Portunidae). **Journal of Crustacean Biology**, vol. 32, n. 2, p. 249-262. 2012.

ZARA, F.J. et al. The ovarian cycle histochemistry and its relationship with hepatopancreas weight in the blue crab *Callinectes danae* (Crustacea: Portunidae). **Acta Zoologica (Stockholm)**, vol. 94, p. 134-146. 2013.

8. Material complementar

Apêndice I. Valores das análises de covariância (ANCOVA) para cada grupo e morfótipos de machos das populações de grande e pequeno porte de *M. amazonicum*. 2° PL: largura da segunda pleura abdominal; AL: comprimento do abdome; CAS: Cássia; CC: quela canela; CL: comprimento de carapaça; CRC: Carmo do Rio Claro; DCL: comprimento do dactilo; GC1: quela verde 1; GC2: quela verde 2; Juv: juvenil; Mat: maduro; MCL: comprimento do quelípodo maior; PCL: comprimento do própodo; SBG: São João Batista do Glória; SJB: São José da Barra; TC: quela translúcida; TL: comprimento total; W: peso fresco.

População	Relação	Morfótipos ou grupos	Par (log)	F	p
CAS (grande porte)	TL vs. CL	Juv vs. Mat	a	-	-
			b	43,96	< 0,001
	AL vs. CL	Juv vs. Mat	a	-	-
			b	57,35	< 0,001
	2° PL vs. CL	Juv vs. Mat	a	-	-
			b	51,97	< 0,001
	MCL vs. CL	Juv vs. TC	a	65,41	< 0,001
			b	1,22	0,27
			a	49,5	< 0,001
			b	0,01	0,89
			a	-	-
			b	11,65	< 0,001
	GC1 vs. GC2	Juv vs. Mat	a	9,62	< 0,01
			b	0,31	0,58
	PPL vs. CL	Juv vs. Mat	a	198,29	< 0,001
			b	1,66	0,19
DCL vs. CL	Juv vs. Mat	a	209,65	< 0,001	
		b	1,25	0,26	
W vs. CL	Juv vs. Mat	a	-	-	
		b	34,57	< 0,001	
SBG (grande porte)	TL vs. CL	Juv vs. Mat	a	-	-
			b	44,42	< 0,001
	AL vs. CL	Juv vs. Mat	a	-	-
			b	50,49	< 0,001
	2° PL vs. CL	Juv vs. Mat	a	-	-
			b	40,89	< 0,001
	MCL vs. CL	Juv vs. TC	a	-	-
			b	12,86	< 0,001
			a	280,12	< 0,001
			b	0,02	0,88
			a	-	-
			b	25,24	< 0,001
GC1 vs. GC2	Juv vs. Mat	a	13,05	< 0,001	
		b	0,01	0,91	

	PPL vs. CL	Juv vs. Mat	<i>a</i>	-	-
			<i>b</i>	7,31	< 0,001
	DCL vs. CL	Juv vs. Mat	<i>a</i>	338,45	< 0,001
			<i>b</i>	1,58	0,21
	W vs. CL	Juv vs. Mat	<i>a</i>	-	-
			<i>b</i>	38,09	< 0,001
	TL vs. CL	Juv vs. Mat	<i>a</i>	-	-
			<i>b</i>	38,46	< 0,001
	AL vs. CL	Juv vs. Mat	<i>a</i>	-	-
			<i>b</i>	32,33	< 0,001
	2° PL vs. CL	Juv vs. Mat	<i>a</i>	-	-
			<i>b</i>	9,10	< 0,001
SJB (pequeno porte)	MCL vs. CL	Juv vs. TC	<i>a</i>	-	-
			<i>b</i>	17,59	< 0,001
	PPL vs. CL	Juv vs. Mat	<i>a</i>	62,29	< 0,001
			<i>b</i>	2,29	0,13
	DCL vs. CL	Juv vs. Mat	<i>a</i>	101,49	< 0,001
			<i>b</i>	1,82	0,17
	W vs. CL	Juv vs. Mat	<i>a</i>	57,79	< 0,001
			<i>b</i>	0,35	0,55
	TL vs. CL	Juv vs. Mat	<i>a</i>	56,50	< 0,001
			<i>b</i>	0,63	0,43
	AL vs. CL	Juv vs. Mat	<i>a</i>	47,11	< 0,001
			<i>b</i>	1,34	0,25
	2° PL vs. CL	Juv vs. Mat	<i>a</i>	76,02	< 0,001
			<i>b</i>	0,01	0,99
CRC (pequeno porte)	MCL vs. CL	Juv vs. TC	<i>a</i>	-	-
			<i>b</i>	6,08	0,01
	PPL vs. CL	Juv vs. Mat	<i>a</i>	142,65	< 0,001
			<i>b</i>	2,80	0,08
	DCL vs. CL	Juv vs. Mat	<i>a</i>	162,04	< 0,001
			<i>b</i>	0,42	0,51
	W vs. CL	Juv vs. Mat	<i>a</i>	67,83	< 0,001
			<i>b</i>	1,50	0,22

Apêndice II. Regressões lineares obtidas por meio dos dados morfométricos para os machos das populações de grande e pequeno porte de *M. amazonicum*. CL foi utilizado como variável independente. Para abreviações, ver Apêndice I.

População	Relação	Morfótipos ou grupos	N	Intercepto (log)	Inclinação (log)	r ²	t (b=1)	p	Alometria	
CAS (grande porte)	TL vs. CL	Juvenil	63	1,043	0,515	0,81	0,67	0,51	0	
		Maduro	240	0,821	0,716	0,95	14,77	< 0,001	-	
	AL vs. CL	Juvenil	63	1,004	0,289	0,72	0,05	0,96	0	
		Maduro	238	0,762	0,509	0,93	17,89	< 0,001	-	
	2° PL vs. CL	Juvenil	63	1,173	-0,512	0,75	1,99	0,05	0	
		Maduro	243	0,850	-0,239	0,92	9,36	< 0,001	-	
	MCL vs. CL	Juvenil	TC	49	0,830	0,420	0,54	1,51	0,13	0
			TC	67	1,113	0,155	0,60	1,00	0,31	0
			CC	54	1,082	0,194	0,57	0,63	0,52	0
			GC1	81	1,627	-0,395	0,41	2,88	< 0,001	+
	PPL vs. CL	Juvenil	GC2	24	1,367	0,059	0,43	1,19	0,28	0
			Maduro	52	1,023	-0,438	0,56	0,18	0,85	0
	DCL vs. CL	Maduro	Juvenil	239	2,078	-1,518	0,86	20,24	< 0,001	+
			Juvenil	49	0,667	-0,444	0,38	2,67	0,01	-
	W vs. CL	Maduro	Juvenil	239	2,095	-1,857	0,87	21,2	< 0,001	+
Juvenil			63	3,290	-3,459	0,82	11,82	< 0,001	+	
		Maduro	240	2,804	-3,052	0,96	51,75	< 0,001	-	
SBG (grande porte)	TL vs. CL	Juvenil	150	0,970	0,600	0,79	0,72	0,47	0	
		Maduro	511	0,832	0,718	0,92	15,37	< 0,001	-	
	AL vs. CL	Juvenil	153	0,865	0,430	0,68	2,76	< 0,01	-	
		Maduro	511	0,784	0,502	0,89	17,55	< 0,001	-	
	2° PL vs. CL	Juvenil	149	1,014	-0,375	0,63	0,22	0,82	0	
		Maduro	509	0,851	-0,225	0,84	8,94	< 0,001	-	
	MCL vs. CL	Juvenil	Juvenil	112	0,950	0,313	0,52	0,57	0,58	0
TC			217	1,004	0,261	0,35	0,04	0,96	0	

		CC	151	1,175	0,101	0,42	1,54	0,12	0
		GC1	47	1,357	-0,086	0,82	3,83	< 0,001	+
		GC2	13	0,861	0,723	0,51	0,53	0,60	0
	PPL vs. CL	Juvenil	122	0,845	-0,280	0,55	2,19	0,02	-
		Maduro	426	1,754	-1,132	0,85	21,18	< 0,001	+
	DCL vs. CL	Juvenil	122	0,962	-0,715	0,51	0,43	0,67	0
		Maduro	424	1,825	-1,529	0,84	21,6	< 0,001	+
	W vs. CL	Juvenil	149	2,928	-3,085	0,74	13,58	< 0,001	-
		Maduro	506	2,750	-2,932	0,93	50,73	< 0,001	-
	TL vs. CL	Juvenil	53	1,068	0,530	0,66	0,64	0,52	0
		Maduro	1.033	0,847	0,693	0,85	13,51	< 0,001	-
	AL vs. CL	Juvenil	38	1,408	0,043	0,85	4,21	< 0,001	+
		Maduro	880	0,781	0,491	0,79	15,97	< 0,001	-
	2° PL vs. CL	Juvenil	38	1,444	-0,680	0,83	4,05	< 0,001	+
		Maduro	878	0,877	-0,273	0,71	6,49	< 0,001	-
SJB (pequeno porte)	MCL vs. CL	Juvenil	50	1,254	0,094	0,54	1,52	0,13	0
		Maduro	885	0,962	0,318	0,67	1,66	0,09	0
	PPL vs. CL	Juvenil	33	0,904	-0,324	0,53	0,63	0,53	0
		Maduro	792	0,934	-0,350	0,70	3,03	< 0,01	-
	DCL vs. CL	Juvenil	35	1,014	-0,712	0,51	0,08	0,93	0
		Maduro	797	0,827	-0,590	0,54	6,38	< 0,001	-
	W vs. CL	Juvenil	54	2,923	-3,084	0,84	11,07	< 0,001	-
		Maduro	974	2,670	-2,914	0,81	40,45	< 0,001	-
	TL vs. CL	Juvenil	70	0,965	0,591	0,79	0,56	0,57	0
		Maduro	367	0,857	0,678	0,74	5,33	< 0,001	-
CRC (pequeno porte)	AL vs. CL	Juvenil	64	0,917	0,366	0,80	1,53	0,13	0
		Maduro	319	0,867	0,412	0,70	4,19	< 0,001	-
	2° PL vs. CL	Juvenil	62	1,008	-0,375	0,71	0,10	0,91	0
		Maduro	318	0,892	-0,280	0,63	2,80	< 0,001	-

MCL vs. CL	Juvenil	51	1,000	0,253	0,43	0,01	0,99	0
	Maduro	289	1,004	0,220	0,61	0,88	0,37	0
PPL vs. CL	Juvenil	47	0,848	-0,280	0,63	1,57	0,12	0
	Maduro	288	0,920	-0,349	0,55	1,60	0,11	0
DCL vs. CL	Juvenil	48	0,776	-0,560	0,42	1,66	0,10	0
	Maduro	290	0,876	-0,642	0,42	2,05	0,04	-
W vs. CL	Juvenil	69	3,144	-3,273	0,82	11,95	< 0,001	+
	Maduro	365	2,651	-2,899	0,75	20,55	< 0,001	-

Apêndice III. Valores das análises de covariância (ANCOVA) para cada grupo de fêmeas das populações de grande e pequeno porte de *M. amazonicum*. 2° PL: largura da segunda pleura abdominal; AL: comprimento do abdome; CAS: Cássia; CC: quela canela; CL: comprimento de carapaça; CRC: Carmo do Rio Claro; DCL: comprimento do dactilo; GC1: quela verde 1; GC2: quela verde 2; Juv: juvenil; Mat: madura; MCL: comprimento do quelípodo maior; PCL: comprimento do própodo; SBG: São João Batista do Glória; SJB: São José da Barra; TC: quela translúcida; TL: comprimento total; W: peso fresco.

População	Relação	Grupos	Par (log)	F	p
CAS (grande porte)	TL vs. CL	Juv vs. Mat	a	-	-
			b	8,41	< 0,01
	AL vs. CL	Juv vs. Mat	a	-	-
			b	4,93	0,02
	2° PL vs. CL	Juv vs. Mat	a	-	-
			b	6,05	0,01
	MCL vs. CL	Juv vs. Mat	a	239,52	< 0,001
			b	0,05	0,82
	PPL vs. CL	Juv vs. Mat	a	-	-
			b	11,64	< 0,001
DCL vs. CL	Juv vs. Mat	a	456,85	< 0,001	
		b	0,63	0,43	
W vs. CL	Juv vs. Mat	a	-	-	
		b	9,11	< 0,01	
SBG (grande porte)	TL vs. CL	Juv vs. Mat	a	-	-
			b	9,32	< 0,001
	AL vs. CL	Juv vs. Mat	a	52,47	< 0,001
			b	2,86	0,09
	2° PL vs. CL	Juv vs. Mat	a	-	-
			b	37,23	< 0,001
	MCL vs. CL	Juv vs. Mat	a	-	-
			b	5,52	0,02
	PPL vs. CL	Juv vs. Mat	a	-	-
			b	62,88	< 0,001
DCL vs. CL	Juv vs. Mat	a	-	-	
		b	16,29	< 0,001	
W vs. CL	Juv vs. Mat	a	43,58	< 0,001	
		b	0,53	0,46	
SJB (pequeno porte)	TL vs. CL	Juv vs. Mat	a	86,15	< 0,001
			b	0,01	0,91
	AL vs. CL	Juv vs. Mat	a	-	-
			b	7,91	< 0,01
	2° PL vs. CL	Juv vs. Mat	a	-	-
			b	23,69	< 0,001
MCL vs. CL	Juv vs. TC	a	-	-	
		b	11,20	< 0,001	
PPL vs. CL	Juv vs. Mat	a	-	-	

			<i>b</i>	26,07	< 0,001
	DCL vs. CL	Juv vs. Mat	<i>a</i>	-	-
			<i>b</i>	14,07	< 0,001
	W vs. CL	Juv vs. Mat	<i>a</i>	-	-
			<i>b</i>	13,62	< 0,001
	TL vs. CL	Juv vs. Mat	<i>a</i>	54,77	< 0,001
			<i>b</i>	0,60	0,44
	AL vs. CL	Juv vs. Mat	<i>a</i>	67,05	< 0,001
			<i>b</i>	1,39	0,24
	2° PL vs. CL	Juv vs. Mat	<i>a</i>	-	-
			<i>b</i>	7,63	< 0,001
CRC (pequeno porte)	MCL vs. CL	Juv vs. TC	<i>a</i>	-	-
			<i>b</i>	86,64	< 0,001
	PPL vs. CL	Juv vs. Mat	<i>a</i>	-	-
			<i>b</i>	4,25	0,04
	DCL vs. CL	Juv vs. Mat	<i>a</i>	-	-
			<i>b</i>	34,29	< 0,001
	W vs. CL	Juv vs. Mat	<i>a</i>	35,62	< 0,001
			<i>b</i>	1,86	0,17

Apêndice IV. Regressões lineares obtidas por meio dos dados morfométricos para as fêmeas das populações de grande e pequeno porte de *M. amazonicum*. CL foi utilizado como variável independente. Para abreviações, ver Apêndice III.

População	Relação	Grupos	N	Intercepto (log)	Inclinação (log)	r ²	t (b=1)	P	Alometria
CAS (grande porte)	TL vs. CL	Juvenil	115	0,965	0,565	0,82	0,83	0,40	0
		Madura	1.159	0,843	0,697	0,83	13,81	< 0,001	-
	AL vs. CL	Juvenil	114	0,884	0,375	0,81	2,84	< 0,001	-
		Madura	1.154	0,806	0,469	0,82	17,56	< 0,001	-
	2° PL vs. CL	Juvenil	115	1,146	-0,495	0,77	2,52	0,01	+
		Madura	1.155	0,963	-0,277	0,75	2,23	0,02	-
	MCL vs. CL	Juvenil	97	0,968	0,293	0,66	0,44	0,65	0
		Madura	1.107	1,178	0,063	0,81	10,60	< 0,001	+
	PPL vs. CL	Juvenil	86	0,972	-0,375	0,73	0,12	0,89	0
		Madura	1.104	1,390	-0,849	0,78	17,85	< 0,001	+
	DCL vs. CL	Juvenil	98	1,045	-0,766	0,62	0,55	0,59	0
		Madura	1.104	1,350	-1,128	0,75	15,04	< 0,001	+
	W vs. CL	Juvenil	114	2,943	-3,168	0,83	15,69	< 0,001	-
		Madura	1.156	2,622	-2,823	0,85	50,07	< 0,001	-
SBG (grande porte)	TL vs. CL	Juvenil	287	0,929	0,621	0,89	3,61	< 0,001	-
		Madura	266	0,836	0,718	0,88	8,67	< 0,001	-
	AL vs. CL	Juvenil	286	0,909	0,376	0,89	4,70	< 0,001	-
		Madura	266	0,827	0,462	0,85	8,23	< 0,001	-
	2° PL vs. CL	Juvenil	285	1,047	-0,400	0,84	1,72	0,08	0
		Madura	262	1,246	-0,582	0,77	5,89	< 0,001	+
	MCL vs. CL	Juvenil	227	1,061	0,196	0,78	1,63	0,10	0
		Madura	207	1,185	0,057	0,77	4,11	< 0,001	+
	PPL vs. CL	Juvenil	224	0,956	-0,383	0,74	1,14	0,25	0
		Madura	209	1,530	-0,976	0,75	8,61	< 0,001	+
	DCL vs. CL	Juvenil	229	0,966	-0,733	0,64	0,68	0,49	0
		Madura	207	1,516	-1,296	0,75	8,54	< 0,001	+

	W vs. CL	Juvenil	288	3,023	-3,203	0,91	35,25	< 0,001	+
		Madura	263	2,845	-3,017	0,87	27,42	< 0,001	-
	TL vs. CL	Juvenil	118	0,953	0,588	0,78	0,98	0,33	0
		Madura	425	0,866	0,668	0,70	4,87	< 0,001	-
	AL vs. CL	Juvenil	118	0,824	0,433	0,72	3,65	< 0,001	-
		Madura	393	0,842	0,429	0,61	4,63	< 0,001	-
	2° PL vs. CL	Juvenil	120	1,090	-0,450	0,67	1,30	0,19	0
SJB (pequeno porte)		Madura	421	1,314	-0,605	0,57	5,64	< 0,001	+
	MCL vs. CL	Juvenil	109	1,164	0,142	0,75	2,55	0,01	+
		Madura	379	0,890	0,381	0,44	2,13	0,03	-
	PPL vs. CL	Juvenil	99	1,053	-0,439	0,75	0,87	0,38	0
		Madura	378	0,806	-0,207	0,36	3,52	< 0,001	-
	DCL vs. CL	Juvenil	105	0,989	-0,719	0,55	0,12	0,90	0
		Madura	380	0,776	-0,531	0,28	3,46	< 0,001	-
	W vs. CL	Juvenil	101	2,810	-3,079	0,80	13,03	< 0,001	-
		Madura	418	2,708	-2,945	0,61	16,16	< 0,001	-
	TL vs. CL	Juvenil	161	1,029	0,522	0,91	1,17	0,24	0
		Madura	278	0,826	0,709	0,76	6,19	< 0,001	-
	AL vs. CL	Juvenil	161	0,970	0,313	0,88	1,02	0,31	0
		Madura	275	0,854	0,419	0,73	4,63	< 0,001	-
	2° PL vs. CL	Juvenil	160	1,284	-0,595	0,81	5,76	< 0,001	+
		Madura	274	1,152	-0,452	0,61	2,75	< 0,001	+
	MCL vs. CL	Juvenil	105	1,028	0,222	0,83	0,63	0,53	0
		Madura	135	1,022	0,236	0,64	0,76	0,45	0
	PPL vs. CL	Juvenil	103	1,056	-0,457	0,79	1,05	0,29	0
		Madura	186	0,889	-0,297	0,56	1,92	0,05	0
	DCL vs. CL	Juvenil	105	0,889	-0,656	0,67	1,80	0,07	0
		Madura	194	0,878	-0,632	0,34	1,38	0,16	0
	W vs. CL	Juvenil	161	2,982	-3,196	0,88	23,11	< 0,001	-
		Madura	277	2,765	-2,979	0,76	18,94	< 0,001	-

Capítulo 3

Dinâmica populacional e aspectos reprodutivos de *Macrobrachium amazonicum* (Heller, 1862) em reservatórios neotropicais em situação de estresse hídrico

Dinâmica populacional e aspectos reprodutivos de *Macrobrachium amazonicum* (Heller, 1862) em reservatórios neotropicais em situação de estresse hídrico

1. Resumo

Reservatórios são ambientes aquáticos artificiais, nos quais secas modificam os padrões pluviométricos e os níveis de água destes ambientes, promovendo o estresse hídrico. Tais modificações são responsáveis por alterar aspectos reprodutivos e biológicos de organismos bentônicos. O camarão amazônico *Macrobrachium amazonicum* é uma espécie com ampla distribuição em reservatórios neotropicais, com populações apresentando dois tipos de fenótipos nestes ambientes: animais de grande e pequeno porte. Este trabalho apresenta a dinâmica populacional e reprodutiva em populações de *M. amazonicum* com diferentes fenótipos em reservatórios durante eventos de estresse hídrico. Além disso, possíveis mudanças fenotípicas na espécie ocasionadas pela predação por peixes foram analisadas nestas populações. Duas populações apresentaram indivíduos com grandes proporções corporais e quatro morfótipos em machos (fenótipo de grande porte), enquanto que outras duas populações possuem animais de tamanhos menores, sem morfótipos (fenótipo de pequeno porte). As quatro populações analisadas apresentaram padrões populacionais e reprodutivos distintos ao longo do tempo. De forma geral, as fêmeas foram maiores que os machos. A proporção destas variou significativamente entre as populações, podendo ou não ser mais abundantes que machos. Todas as populações mostraram padrões bimodais ou polimodais em suas distribuições mensais de frequência de classes de tamanhos. Tais padrões são característicos de organismos que enfrentam a sazonalidade de eventos ambientais e mostram que estas populações possuem grande capacidade de se adaptar a intempéries. Não foram constatadas grandes mudanças nos padrões de distribuição de frequência entre sexos, recrutamento e frequência de morfótipos em machos e dos estágios de desenvolvimento ovariano em fêmeas, ao decorrer dos eventos de estresse hídrico. *Macrobrachium amazonicum* é uma espécie resiliente e mostra reprodução contínua. Fêmeas com ovários imaturos foram predominantes em todas as populações, realizando posturas múltiplas e mostrando rápido ciclo de desenvolvimento ovariano. Em machos, o morfótipo inicial (quela translúcida - TC) predominou nas populações com a presença de hierarquia social, uma vez que machos de morfótipos dominantes (quela verde 1 e 2 - GC1 e GC2, respectivamente) parecem desprender maior quantidade de energia para realização e manutenção de processos metabólicos, o que limita o número de animais com morfótipos GC1 e GC2 nas populações. A predação por peixes não mostra indícios de atuar na regulação de fenótipos em *M. amazonicum*. A plasticidade fenotípica é mais bem relacionada a fatores intrínsecos, genéticos.

Palavras-chave: camarão amazônico, fenótipos, reprodução, seca, Caridea.

2. Introdução

Reservatórios são ambientes artificiais construídos pelo homem destinados a propósitos específicos, como o abastecimento hídrico, recreação e produção de energia. Devido ao armazenamento e liberação de massas de água são considerados ambientes intermediários, pois a montante têm aspecto lêntico, como em lagos, e a jusante se assemelham a rios, com características lóticas. Nestes ambientes, o ciclo hídrico é dependente do tempo de detenção hídrica, das flutuações dos níveis da água e das variações na pluviosidade ao longo do tempo (HENRY, 1999; TUNDISI et al., 2008; WANG et al., 2010). Nos últimos anos, secas severas alteraram drasticamente estes ambientes no Brasil, principalmente na Bacia do Paraná (VITULE et al., 2015; MELO et al., 2016; NOBRE et al., 2016). MELO et al. (2016) constataram que o suprimento de água foi bastante comprometido nos reservatórios da região sudeste do Brasil devido a uma estiagem prolongada, i.e. situação de escassez ou estresse hídrico.

O estresse hídrico em reservatórios é ocasionado principalmente pela redução da quantidade de chuvas no entorno destes ambientes e, conseqüentemente, pelo decréscimo e alteração dos padrões dos níveis da coluna de água. Este processo é responsável por alterar as características físico-químicas dos ambientes aquáticos (e.g. mudanças na composição química do sedimento e água) promovendo grandes mudanças neste ecossistema, como a redução significativa de áreas de recursos e habitats, além de alterar os padrões (a)bióticos das zonas litorais (HENRY, 1999; BOUVY et al., 2003; KEITEL et al., 2015; PASCHOAL et al., 2015). Dessa forma, toda a comunidade bentônica destes ambientes passa a ser afetada por esta instabilidade hídrica. A distribuição espaço-temporal e principalmente os padrões reprodutivos destes organismos são alterados por estas mudanças ambientais, podendo até modificar o ciclo de vida dos animais (PASCHOAL et al., 2015; PASCHOAL e OLIVEIRA, 2017; PASCHOAL, 2017 – Capítulo 4). Dentre os animais afetados por tais alterações estão os camarões do gênero *Macrobrachium* Spence Bate, 1868. A distribuição e os aspectos populacionais e reprodutivos destes animais em reservatórios neotropicais podem ser alterados em uma escala espaço-temporal pelas secas (DE GRAVE e MANTELATTO, 2013; PASCHOAL, 2017 – Capítulo 4).

Macrobrachium amazonicum (Heller, 1862) é a espécie com maior distribuição em reservatórios na Bacia do Paraná, em relação às demais espécies do gênero, devido a sua dispersão acidental. Esta espécie é utilizada no aquarismo e como isca em pescarias, e acredita-se que indivíduos tenham sido introduzidos de forma acidental e/ou proposital nestas áreas (MAGALHÃES et al., 2005; VERGAMINI et al., 2011). Uma característica desta espécie é a grande flexibilidade reprodutiva e a alta variabilidade intraespecífica de suas populações (ODINETZ-COLLART, 1991a; MACIEL e VALENTI, 2009; VERGAMINI et al., 2011), com dois tipos de fenótipos registrados para ambientes dulciaquícolas: animais de grande e pequeno porte (PASCHOAL, 2017 - Capítulo 2). A presença de morfótipos não é registrada no último fenótipo, enquanto que nas populações de grande porte, quatro tipos de morfótipos são verificados para machos: queila translúcida (TC), canela (CC), verde 1 (GC1) e verde 2 (GC2) (PANTALEÃO et al., 2012, 2014).

A grande plasticidade fenotípica de populações de *M. amazonicum* ainda não é totalmente compreendida. Alguns autores apontam que as diferenças fenotípicas da espécie se devem a fatores intrínsecos dos animais (i.e. diferenças fisiológicas e comportamentais) (MORAES-RIOADES e VALENTI, 2004; AUGUSTO e VALENTI, 2016) ou a viabilidade de recursos nutricionais nas áreas de coleta (PANTALEÃO et al., 2012, 2014). Recentemente, foi constatado que a predação por peixes também pode induzir mudanças fenotípicas (i.e. história de vida e/ou morfologia) em camarões carídeos devido a respostas fisiológicas a sinais químicos dos predadores (i.e. kairomones) (OCASIO-TORRES et al., 2014, 2015a,b), porém tal associação não foi avaliada em *M. amazonicum*. Dentro destes contextos, o presente trabalho avaliou a dinâmica populacional e os aspectos reprodutivos em quatro populações de *M. amazonicum* com dois fenótipos distintos em reservatórios neotropicais durante eventos de estresse hídrico. Além disso, a presença de diferentes fenótipos na espécie estar sendo modulada pela predação por peixes foi verificada nestas populações.

3. Material e métodos

3.1. Amostragem

As amostragens foram realizadas entre Outubro de 2014 a Dezembro de 2015, dentro do “El niño” no biênio 2014-2016. Este evento climático foi tão intenso quanto aquele registrado para 1997-1998 e foi responsável por promover secas na região sudeste do Brasil (CPTEC/INPE, 2017; NWS/NOAA, 2017). O período de amostragens foi dividido de acordo com a influência do “El niño”, seguindo o índice Niño 3,4. De Outubro de 2014 a Janeiro de 2015 foram meses considerados de neutralidade climática, Fevereiro e Março de 2015 como alternância da neutralidade para entrada do “El niño”, e de Abril a Dezembro de 2015 como em “El niño” (CPTEC/INPE, 2017; NWS/NOAA, 2017).

Coletas mensais foram realizadas no rio Grande (20° 30' 53" S; 46° 50' 16" W) em quatro pontos de coletas. Dois pontos situados na usina hidrelétrica (UHE) de Furnas - municípios de Carmo do Rio Claro (CRC) e São José da Barra (SJB), e outros dois na UHE de Marechal Mascarenhas de Moraes (MMM) - municípios de Cássia (CAS) e São João Batista do Glória (SBG) no estado de Minas Gerais, sudeste do Brasil. O reservatório da UHE de Furnas é formado pelos rios Grande e Sapucaí e apresenta uma área inundada de 1.440 km². O reservatório da UHE de MMM está localizado entre as usinas de Furnas (à montante) e de Luiz Carlos Barreto de Carvalho (à jusante) e possui uma área inundada de 250 km² (PASCHOAL e RIGOLIN-SÁ, 2011). Os valores mensais de precipitação acumulada e dos níveis da coluna de água nas UHE's foram obtidos pelo banco de dados da Agência Nacional de Águas (ANA, 2017) e Operador Nacional do Sistema Elétrico (ONS, 2017), respectivamente.

Os camarões foram capturados por meio de coleta ativa (uma peneira com 60 cm de diâmetro e malha de 1,25 mm, deslocada ao longo da vegetação marginal e bancos de macrófitas durante 30 minutos por um coletor) e passiva (seis armadilhas com 85 cm comprimento X 35 cm largura/altura, iscadas com fígado bovino e retiradas após quatro horas). Imediatamente após a captura, os animais foram anestesiados por resfriamento (- 20°C / 5 min.) e em seguida conservados em etanol 70%. Posteriormente, os mesmos foram acondicionados em frascos devidamente etiquetados e transportados até o laboratório, onde foram identificados segundo Pileggi (2009).

3.2. Biometria e aspectos reprodutivos

Os camarões obtidos durante as coletas mensais foram contabilizados e subamostras foram retiradas seguindo o critério proposto por Wenner et al. (1991). Todos os animais foram mensurados e sexados em amostras contendo $n \leq 80$ indivíduos. Se as amostras tivessem $80 < n < 160$ indivíduos, 80 indivíduos eram selecionados de forma aleatória para serem analisados. Finalmente, 50% ou 25% dos espécimes foram verificados, se $160 < n < 320$ ou $n \geq 321$ indivíduos foram coletados, respectivamente. A identificação quanto ao sexo em *M. amazonicum* foi realizada por meio de três etapas: (a) verificação dos caracteres sexuais secundários e (b) das posições dos gonóporos, e pela (c) dissecação do sistema reprodutor (PASCHOAL e ZARA, 2017). Animais cujo tais caracteres não puderam ser observados foram considerados indeterminados (ind.) e retirados das análises estatísticas. Posteriormente, todos os camarões tiveram o comprimento de carapaça (CL: distância entre a margem posterior da órbita ocular e o ponto mediano da margem posterior da carapaça) e o comprimento total (TL: distância entre a margem posterior da órbita ocular e a porção distal do espinho do telso) mensurados.

Os estágios ovarianos de fêmeas não ovígeras e ovígeras nas diferentes populações foram determinados pela morfologia macroscópica destes órgãos. As fêmeas foram anestesiadas por resfriamento e tiveram seus sistemas reprodutores cuidadosamente removidos. Os ovários foram classificados em cinco estágios de desenvolvimento segundo Chang e Shih (1995): iniciais (I e II), intermediário (III) e finais (IV e V). Adicionalmente, as massas de ovos das ovígeras foram classificadas de acordo com quantidade de vitelo nos ovos, em três estágios: inicial (1), intermediário (2) ou final (3) (ANGER e MOREIRA, 1998).

Em machos, quando a população apresentou morfótipos, estes foram separados por meio da inspeção do tamanho e a coloração dos quelípodos, a angulação dos espinhos nos carpos e própodos e a pubescência nos dácilios, em: quela translúcida (TC), canela (CC), verde 1 (GC1) e verde 2 (GC2) (MORAES-RIODADES e VALENTI, 2004; PANTALEÃO et al., 2014).

3.3. Predação por peixes

A associação entre a ictiofauna e a ausência/presença de morfótipos no camarão *M. amazonicum* foi investigada nas populações das UHE's de Furnas e MMM. Em Novembro de 2015, peixes foram capturados por meio do uso de redes

de espera com malhas 08/06/04/02 cm entre nós consecutivos (30 m X 1,70 m). Durante sete dias, as redes foram mantidas submersas por 24 horas, próximas a margem nos pontos de CAS e SJB. Os exemplares capturados foram identificados pelo especialista, Me. Valter M. Azevedo Santos, e posteriormente dissecados para a retirada dos estômagos. Os estômagos foram fixados em formaldeído 10% e posteriormente analisados sob estereomicroscópio, buscando a identificação dos itens alimentares.

3.4. Análise de dados

A razão sexual mensal e total foi avaliada nas quatro populações, por meio do teste de qui-quadrado (χ^2 - α : 0,05) com a proporção esperada de 1♀:1♂. Diferenças entre os tamanhos médios de fêmeas e machos nas quatro populações analisadas foram avaliadas por meio de testes t (α : 0,05) (GOTELLI e ELLISON, 2004).

A estrutura populacional de *M. amazonicum* foi analisada por meio da distribuição de frequência absoluta de indivíduos machos e fêmeas em classes de comprimento de carapaça (CL) com intervalos de 1 mm para as populações de pequeno porte e 2 mm para as populações de grande porte. Os intervalos foram determinados de acordo com a equação de Sturges (1926). A normalidade das distribuições de frequência para cada sexo foi avaliada pelo teste de Shapiro-Wilk (α : 0,05) (GOTELLI e ELLISON, 2004). Os indivíduos com CL menor aos valores obtidos para a maturidade fisiológica para as quatro populações (PASCHOAL, 2017 – Capítulo 2) foram considerados animais imaturos (i.e. recrutas) e verificados mensalmente.

As frequências relativas de fêmeas apresentando diferentes estágios de desenvolvimento ovariano foram verificadas mensalmente. O padrão do ciclo reprodutivo (contínuo ou não) em *M. amazonicum* foi determinado por meio da observação de picos de maturação ovariana ao longo do tempo. O coeficiente de correlação de Pearson foi utilizado para avaliar a associação entre a precipitação acumulada e o nível da coluna de água com a frequência de fêmeas com ovários em estágios iniciais, intermediário e finais de maturação. Para fêmeas ovígeras com ovários em diferentes estágios, os dados das coletas mensais foram agrupados e a frequência relativa acumulada para cada população foi analisada, para verificar se as fêmeas de *M. amazonicum* reiniciam seu ciclo ovariano e são capazes de

reproduzir após a postura. Quando a população apresentou morfótipos em machos, suas frequências relativas foram verificadas mensalmente. O coeficiente de correlação de Pearson foi utilizado para avaliar a associação entre a precipitação acumulada, o nível da coluna de água e a abundância de fêmeas com a frequência de morfótipos nas populações ao longo do estudo.

Para a análise da dieta da ictiofauna, os itens alimentares posteriormente identificados foram agrupados em duas categorias: ausentes (0) ou presentes (1) nos estômagos. Isso possibilitou que os dados fossem submetidos a uma análise de correspondência múltipla, a qual permite verificar os padrões de relações entre diversas variáveis categóricas dependentes (ABDI e VALENTIN, 2007). Todos os cálculos e análises estatísticas foram realizados no software R 3.3.1. (R DEVELOPMENT CORE TEAM, 2017).

4. Resultados

Indivíduos das duas populações da UHE de MMM apresentam grandes proporções corporais ($\overline{CL} = \text{♂} - \text{♀}$: 9,02 - 10,59 mm em SGB, $\text{♂} - \text{♀}$: 13,05 - 14,80 mm em CAS) e quatro morfótipos em machos, enquanto que nas populações da UHE de Furnas os animais apresentam tamanhos menores ($\overline{CL} = \text{♂} - \text{♀}$: 6,90 - 8,15 mm em SJB, e $\text{♂} - \text{♀}$: 7,31 - 8,65 mm em CRC), sem morfótipos para machos. Devido à presença de dois tipos de fenótipos, tais populações foram referidas como populações de grande (populações da UHE de MMM) e pequeno porte (populações da UHE de Furnas).

Um total de 13.175 indivíduos foi coletado durante os 15 meses de estudo. Em alíquotas contendo 5.206 animais, obteve-se nas populações de pequeno porte: 528 ♀ (219 ovígeras), 1.027 ♂ e 160 ind. em SJB e 350 ♀ (94 ovígeras), 391 ♂ e 75 ind. em CRC; e para as populações de grande porte: 1.245 ♀ (355 ovígeras), 295 ♂ e 30 ind. em CAS e 497 ♀ (113 ovígeras), 601 ♂ e 7 ind. em SBG. A normalidade nas distribuições de frequência foi observada apenas em fêmeas nas populações de SBJ ($\text{♂} = W: 0,82 - p: 0,02$; $\text{♀} = W: 0,87 - p: 0,08$), CRC ($\text{♂} = W: 0,82 - p: 0,02$; $\text{♀} = W: 0,90 - p: 0,17$) e em SBG ($\text{♂} = W: 0,66 - p < 0,001$; $\text{♀} = W: 0,70 - p: 0,09$), enquanto que na população de CAS, somente machos apresentaram distribuição normal ($\text{♂} = W: 0,94 - p: 0,47$; $\text{♀} = W: 0,80 - p < 0,01$) (Figura 1).

Em todas as populações analisadas, as fêmeas atingiram maiores tamanhos que os machos. Para as populações de pequeno porte, o CL e o TL médio (\pm dp) de fêmeas em SJB foram registrados em $8,15 \pm 1,24$ e $28,55 \pm 4,34$ mm, enquanto que em machos foram em $6,90 \pm 1,05$ e $25,33 \pm 3,52$ mm (t - 21,50; $p < 0,0001$). Em CRC, as fêmeas apresentavam $8,65 \pm 1,72$ e $30,07 \pm 5,73$ mm e machos $7,31 \pm 1,14$ e $26,11 \pm 3,94$ mm de CL e TL, respectivamente (t 13,68; $p < 0,0001$). Nas populações de grande porte, o CL e o TL em CAS foram registrados em $14,80 \pm 3,41$ e $48,23 \pm 10,13$ mm para fêmeas e em $13,05 \pm 5,08$ e $42,10 \pm 14,00$ mm para machos (t - 6,69; $p < 0,0001$), e em $10,59 \pm 3,09$ e $36,96 \pm 9,68$ mm para fêmeas e $9,02 \pm 2,56$ e $32,45 \pm 7,56$ mm para machos da população de SBG (t 9,59; $p < 0,0001$).

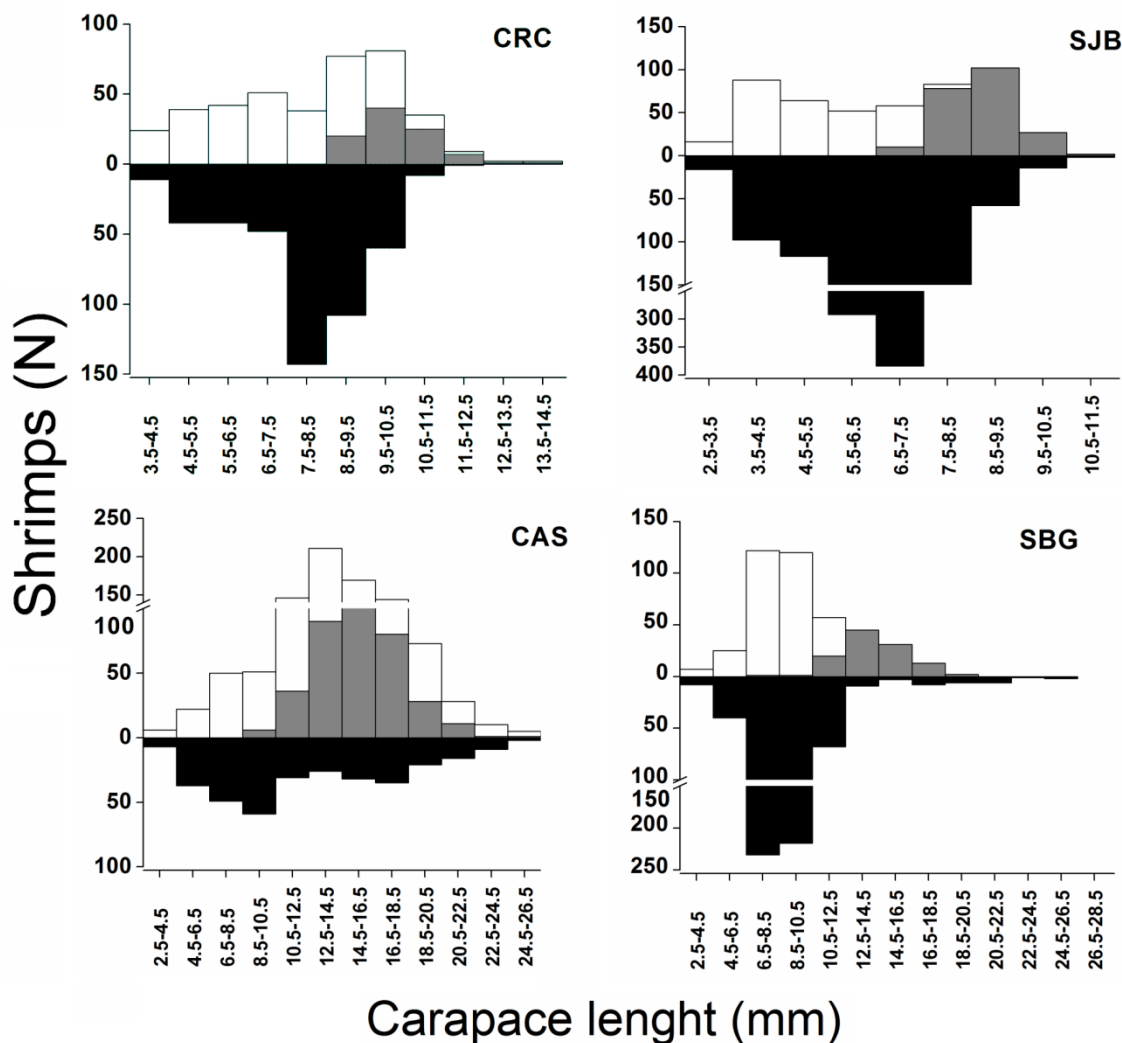


Figura 1. Distribuição de frequência por classes de comprimento de carapaça para fêmeas não ovígeras (branco) e ovígeras (cinza) e machos (preto) de *M. amazonicum* nas populações de pequeno (CRC e SJB) e grande (CAS e SBG)

porte, coletados durante Outubro de 2014 a Dezembro de 2015. CAS: Cássia; CRC: Carmo do Rio Claro; SBG: São João Batista do Glória; SJB: São José da Barra.

Em CRC, a razão sexual total foi próxima de $1♀:1♂$ sem a predominância de um dos sexos ($1♀:1,11♂$ - χ^2 : 1,13; p : 0,05), enquanto que em SJB ($1♀:1,69♂$ - χ^2 : 51,70; p < 0,001) e SBG ($1♀:1,21♂$ - χ^2 : 4,93; p < 0,001) machos predominaram e em CAS houve predominância de fêmeas ($4,22♀:1♂$ - χ^2 : 293,02; p < 0,001). A razão sexual não diferiu ao longo dos meses em CRC, no entanto o número de machos na população de SJB quase sempre foi maior que fêmeas, variando de $1♀:1,08♂$ (Janeiro de 2015 - χ^2 : 0,08; p : 0,05) a $1♀:8,20♂$ (Novembro de 2014 - χ^2 : 14,09; p < 0,001), com exceção do mês de Agosto de 2015 onde as fêmeas predominaram ($1,82♀:1♂$ - χ^2 : 7,10; p < 0,001). Diferenças nas razões sexuais ao longo dos meses foram registradas para a população de CAS, favorecendo o número de fêmeas na população. A razão sexual variou de $1,51♀:1♂$ (χ^2 : 1,54; p : 0,05 - Novembro de 2015) a $19♀:1♂$ (χ^2 : 32,40; p < 0,001 - Setembro de 2015). Na população de SBG, a razão sexual não diferiu ao decorrer do estudo, com exceção do mês de Abril de 2015, onde machos predominaram ($1♀:4♂$ - χ^2 : 10,75; p < 0,001) (Figura 2).

Todas as populações apresentaram padrões bimodais ou polimodais em suas distribuições mensais de frequência de classes de tamanhos (Figuras 3 a 6). A estrutura da população não foi alterada entre o período de neutralidade climática, entrada e em “El niño” (Figuras 3 a 6). Com exceção da população de CAS com maior abundância em Dezembro de 2014 (Figura 4), as outras populações apresentaram as maiores abundância durante o ápice do fenômeno (Figuras 3, 5 e 6). Devido à grande estiagem na região, a população de SBG não foi amostrada nos meses de Novembro e Dezembro de 2014. Após a retomada dos níveis de água na área de coleta houve uma rápida recuperação dos padrões estruturais desta população (Figura 6). Em contrapartida, em Dezembro de 2015 o ponto CAS foi bloqueado por inundação o que não permitiu a amostragem na área (Figura 5).

Para as populações de pequeno porte, aproximadamente 15% (N: 282) em SJB e 11% (N: 92) em CRC dos indivíduos capturados eram imaturos, com os picos de recrutamento nas populações registrados durante a primavera e o verão (Figuras 3 e 4). Nas populações de grande porte, 8% (N: 122) em CAS eram recrutas, sem

um padrão nítido de recrutamento durante o período analisado (Figura 5). A população de SBG, com 18% de imaturo (N: 203), foi a única a apresentar um padrão de recrutamento quase que contínuo durante os meses analisados (Figura 6).

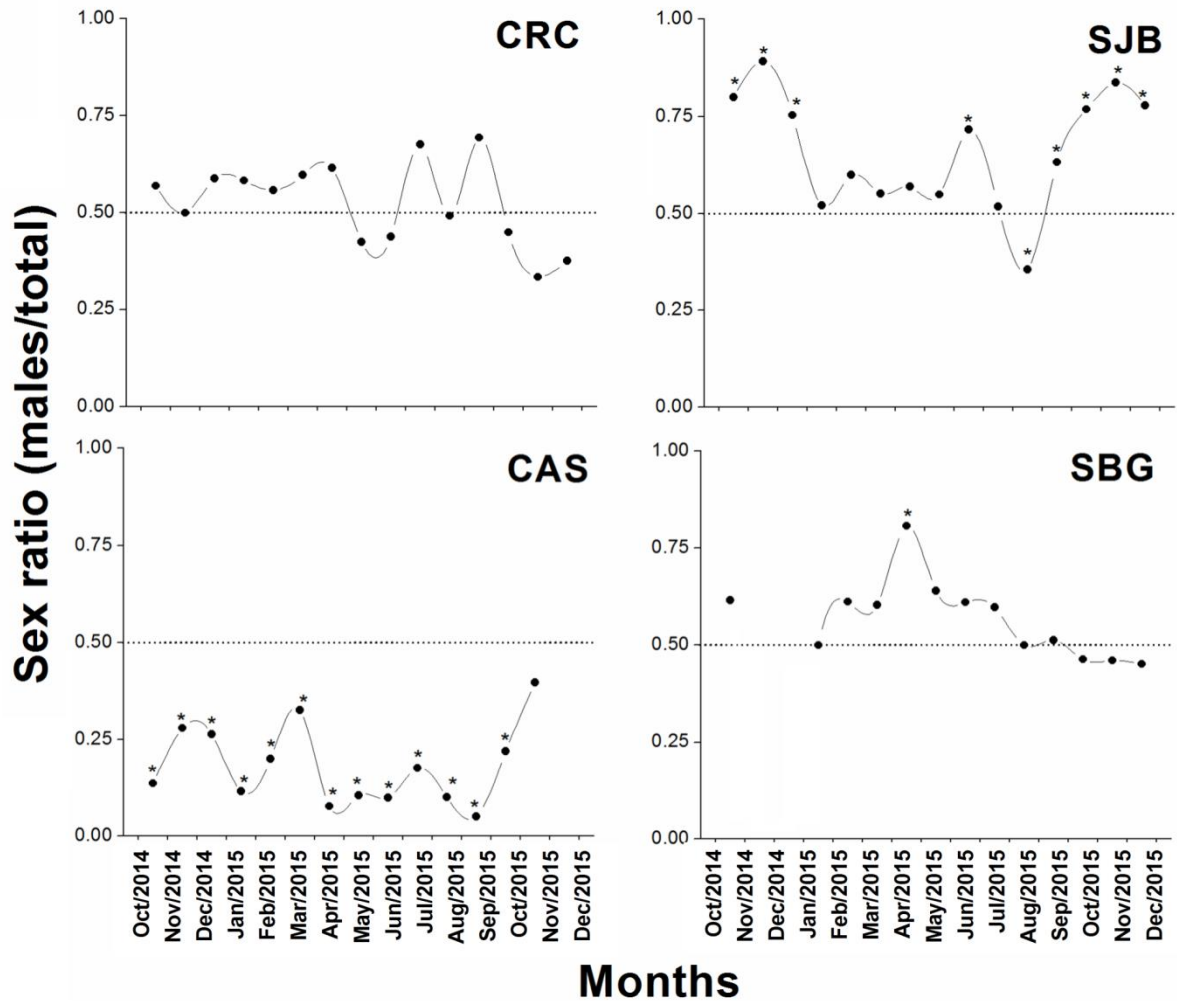


Figura 2. Razão sexual (machos/total) de camarões nas populações de pequeno (CRC e SJB) e grande porte (CAS e SBG) de *M. amazonicum* coletados durante Outubro de 2014 a Dezembro de 2015. CAS: Cássia; CRC: Carmo do Rio Claro; SBG: São João Batista do Glória; SJB: São José da Barra. * Estatisticamente significante a $p < 0,05$.

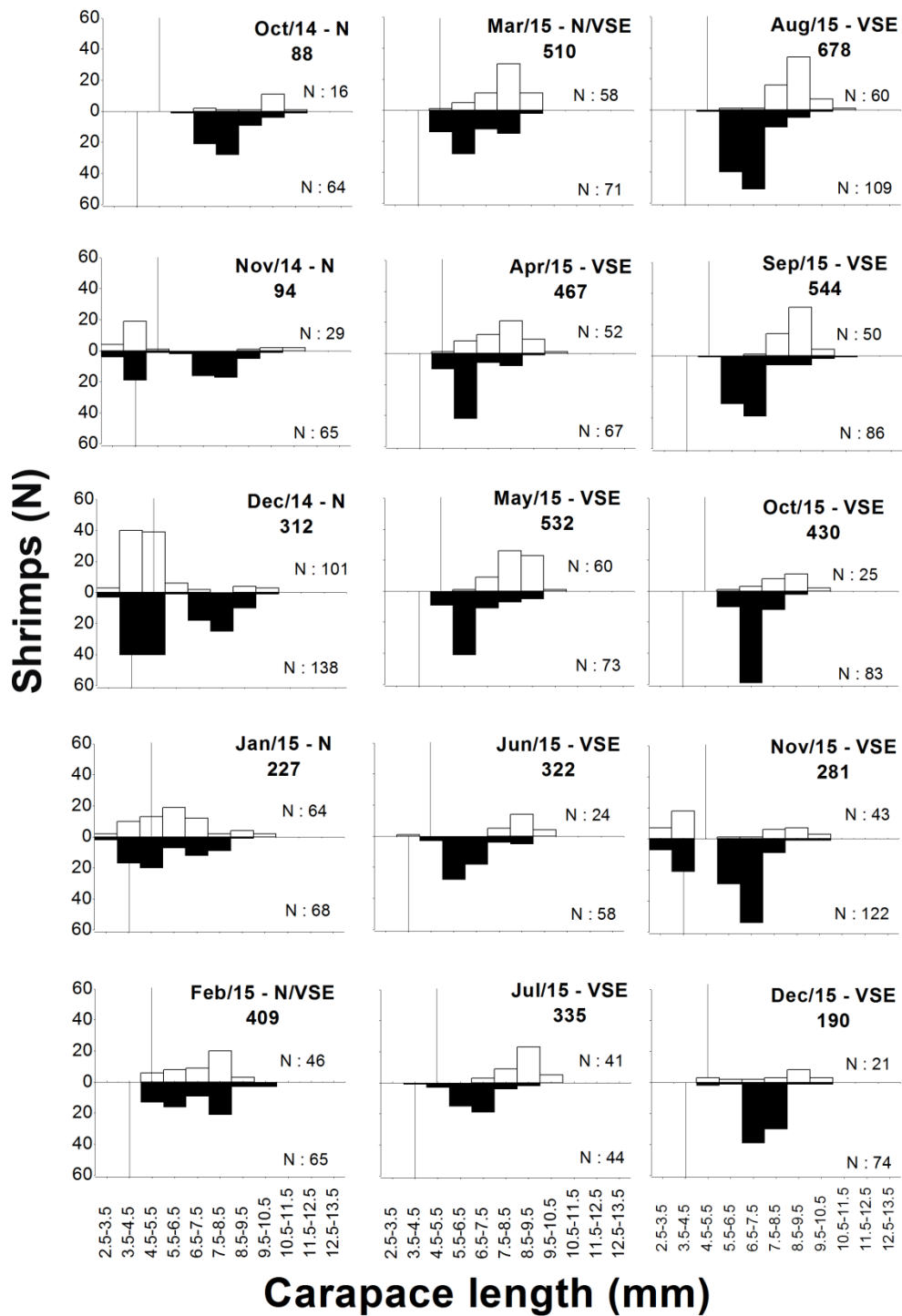


Figura 3. Distribuição de frequências mensais por comprimento de carapaça para fêmeas (branco) e machos (preto) de *M. amazonicum* durante Outubro de 2014 a Janeiro de 2015 para a população de pequeno porte de São José da Barra (Minas Gerais, sudeste do Brasil). Valores em negrito correspondem ao número total de animais capturados. As linhas indicam o recrutamento de juvenis na população. N: neutralidade; N/VSE: entrada de “El niño”; VSE: em “El niño”.

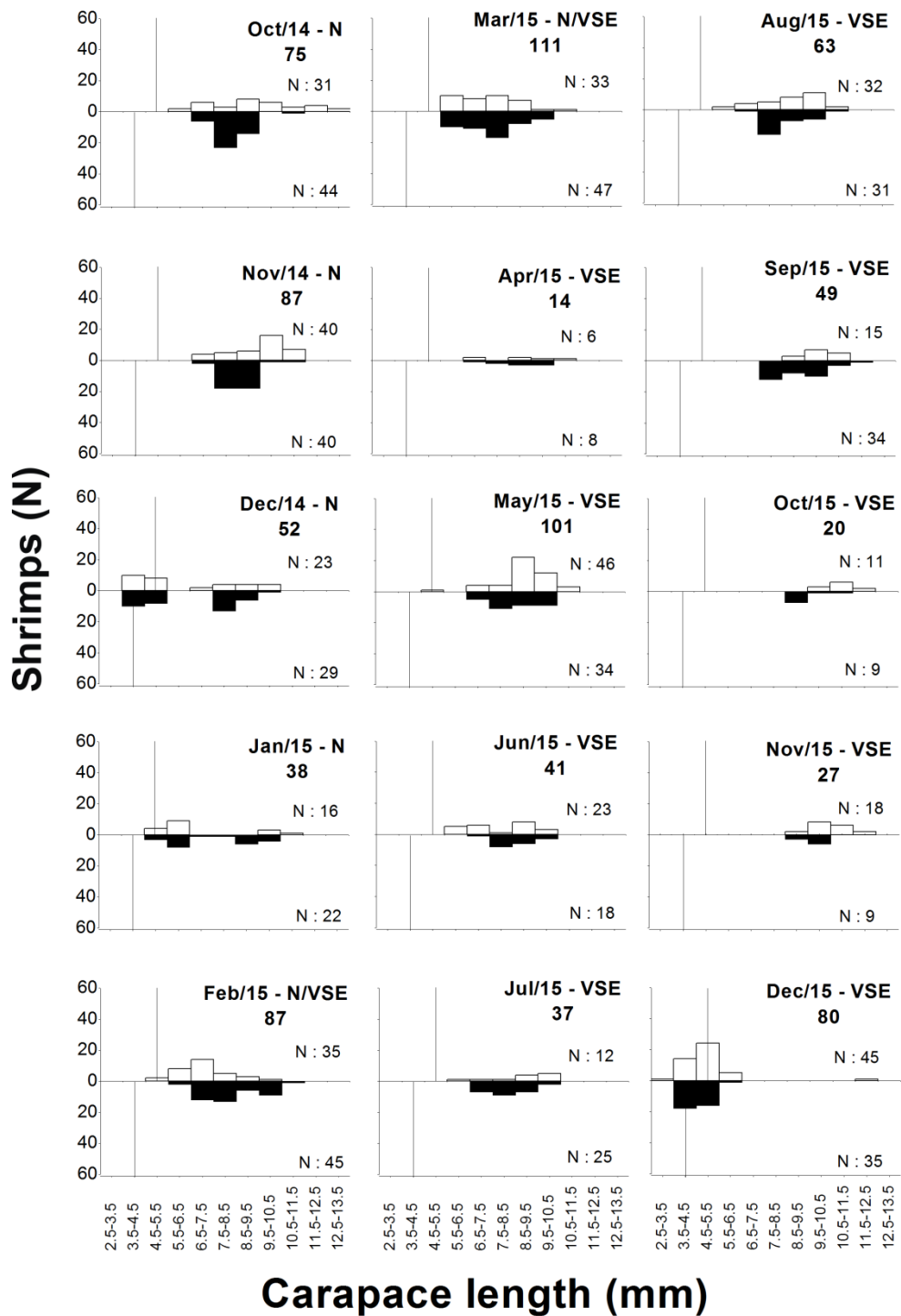


Figura 4. Distribuição de frequências mensais por comprimento de carapaça para fêmeas (branco) e machos (preto) de *M. amazonicum* durante Outubro de 2014 a Janeiro de 2015 para a população de pequeno porte de Carmo do Rio Claro (Minas Gerais, sudeste do Brasil). Valores em negrito correspondem ao número total de animais capturados. As linhas indicam o recrutamento de juvenis na população. N: neutralidade; N/VSE: entrada de “El niño”; VSE: em “El niño”.

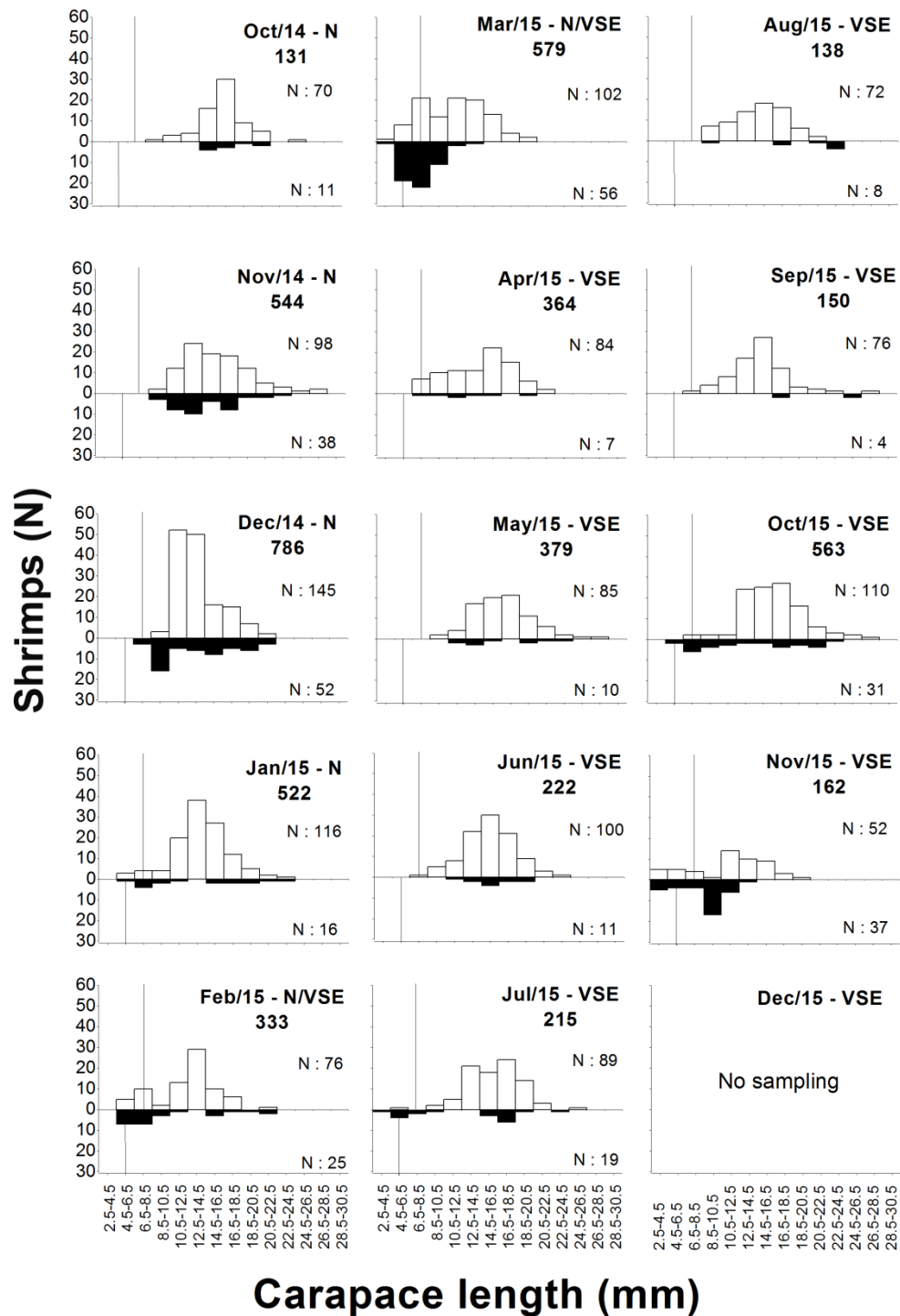


Figura 5. Distribuição de frequências mensais por comprimento de carapaça para fêmeas (branco) e machos (preto) de *M. amazonicum* durante Outubro de 2014 a Janeiro de 2015 para a população de grande porte de Cássia (Minas Gerais, sudeste do Brasil). Valores em negrito correspondem ao número total de animais capturados. As linhas indicam recrutamento de juvenis na população. N: neutralidade; N/VSE: entrada de “El niño”; VSE: em “El niño”.

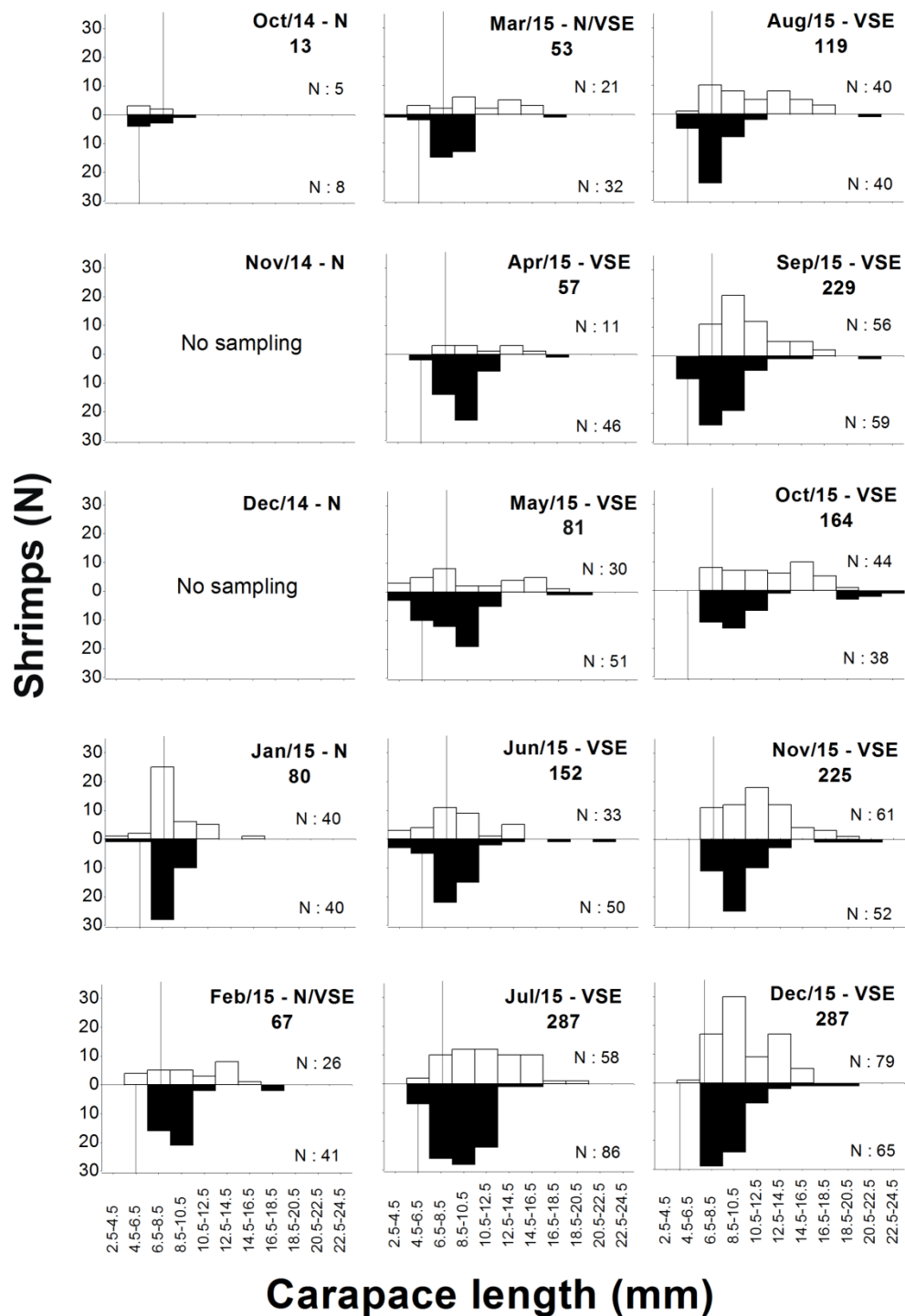


Figura 6. Distribuição de frequências mensais por comprimento de carapaça para fêmeas (branco) e machos (preto) de *M. amazonicum* durante Outubro de 2014 a Janeiro de 2015 para a população de grande porte de São João Batista do Glória (Minas Gerais, sudeste do Brasil). Valores em negrito correspondem ao número total de animais capturados. As linhas indicam o recrutamento de juvenis na população. N: neutralidade; N/VSE: entrada de “El niño”; VSE: em “El niño”.

Fêmeas apresentando diferentes estágios do desenvolvimento ovariano foram observadas mensalmente em todas as populações, mostrando a ausência de picos de maturação ovariana em *M. amazonicum*. Em todas as populações, fêmeas em estágios iniciais (I e II) foram mais abundantes (Figura 7). Nas populações de pequeno porte, o número de fêmeas em estágios iniciais aumenta à medida que os níveis de água no reservatório elevam-se ($r = 0,68$; $p < 0,01$) e tendem a diminuir com o aumento das chuvas ($r = - 0,15$; $p: 0,25$). Nas populações de grande porte, as fêmeas em estágios iniciais seguem um padrão inverso com a tendência de aumentar sua frequência relativa com o aumento das chuvas ($r = 0,44$; $p: 0,09$) e diminuir esta, com o aumento dos níveis do reservatório ($r = - 0,05$; $p: 0,86$). Em todas as populações, a maioria das fêmeas ovígeras portando massas de ovos em estágio 1 possuíam ovários imaturos ou em estágio intermediário, enquanto que a maior parte das fêmeas que carregavam ovos em estágios 2 e 3 mostravam ovários em estágios finais de desenvolvimento (Figura 8).

Em machos das populações de grande porte, os morfótipos dominantes eram menos frequentes que os demais. Comumente, o morfótipo inicial TC foi o mais abundante, principalmente para a população de SBG (Figura 9). Em CAS, 42,67% dos machos eram TC, 27,04% eram CC, 18,57% eram GC1 e 11,73% eram GC2, com uma proporção de 4 TC: 3 CC: 2 GC1: 1 GC2. Para esta população, a presença de morfótipos tende a diminuir com o aumento da chuva ($r = - 0,34$; $p: 0,23$) e não apresenta correlação com o nível da coluna de água ($r = 0,03$; $p: 0,93$). Por outro lado, a presença de morfótipos dominantes está relacionada à abundância de fêmeas na população ($r = 0,61$; $p: 0,02$). Em meses com menor ocorrência de fêmeas como Fevereiro e Novembro de 2015 (67 e 60%, respectivamente) não foi constatada a presença de machos com morfótipos GC1 e GC2. Na população de SBG, 79,22% dos machos eram TC, enquanto que 17,62% eram CC e apenas 1,35 e 1,81% eram GC1 e GC2, respectivamente. A proporção de morfótipos nesta população foi de 7,9 TC: 1,8 CC: 0,1 GC1: 0,2 GC2. Apesar de não significativa, nota-se a tendência no aumento de machos dominantes à medida que as fêmeas tornavam-se mais abundantes ($r = 0,23$; $p: 0,48$). A abundância de morfótipos não está diretamente associada aos níveis da coluna de água ($r = - 0,09$; $p: 0,74$) e a precipitação acumulada ($r = - 0,14$; $p: 0,62$).

Seis espécies de peixes predadores foram registradas em ambas as represas, os peixes caraciformes: *Astyanax faciatatus* (Cuvier, 1819), *A. lacustris*

(Lütken, 1875) e *Hoplias malabaricus* (Bloch, 1794), o siluriforme: *Pimelodus maculatus* (Lacèpède, 1803), e os ciclídeos: *Oreochromis niloticus* (Linnaeus, 1758) e *Cichla kelberi* (Kullander & Ferreira, 2006) (Tabela II). Devido à similaridade da ictiofauna constatada nas represas, os dados foram agrupados e os itens alimentares encontrados nos estômagos foram separados nas seguintes categorias: *M. amazonicum*, peixes, massas de ovos, detritos, insetos, fragmentos vegetais e iscas. Pode-se perceber que *H. malabaricus* e *C. kelberi* tiveram como um dos componentes principais de sua dieta o camarão *M. amazonicum*, enquanto que as demais espécies foram mais generalistas (Figura 10 e Tabela II). A predação foi mais intensa sob fêmeas, e normalmente os exoesqueletos dos camarões estavam intactos, porém sem apêndices.

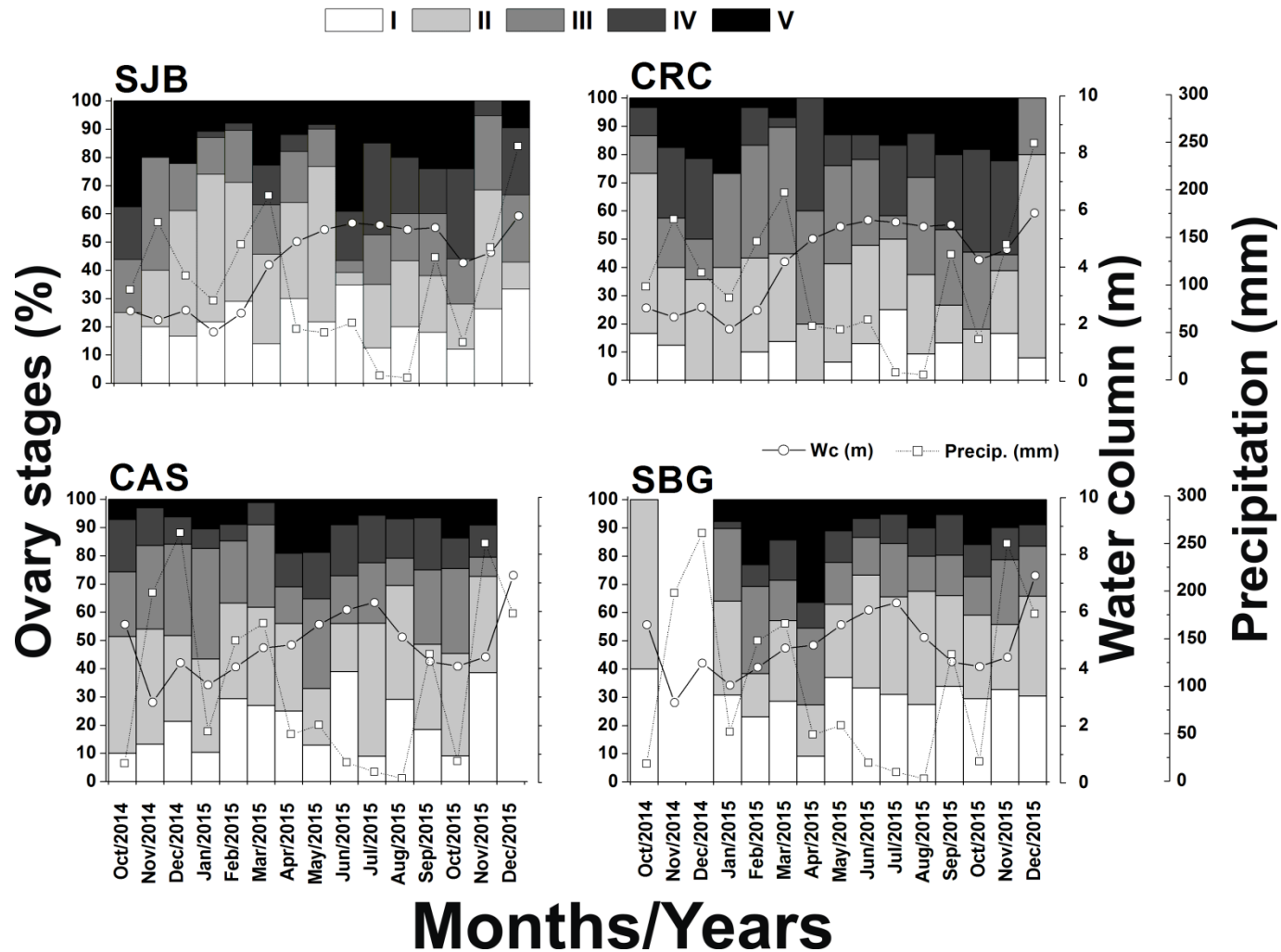


Figura 7. Variações na frequência relativa dos estágios de desenvolvimento ovariano em fêmeas (I a V) de *M. amazonicum* nas populações de pequeno (SJB e CRC) e grande porte (CAS e SBG) e dos valores de precipitação acumulada (Precip.) e nível da coluna de água (Wc) ao longo de Outubro de 2014 a Dezembro de 2015. CAS: Cássia; CRC: Carmo do Rio Claro; SBG: São João Batista do Glória; SJB: São José da Barra.

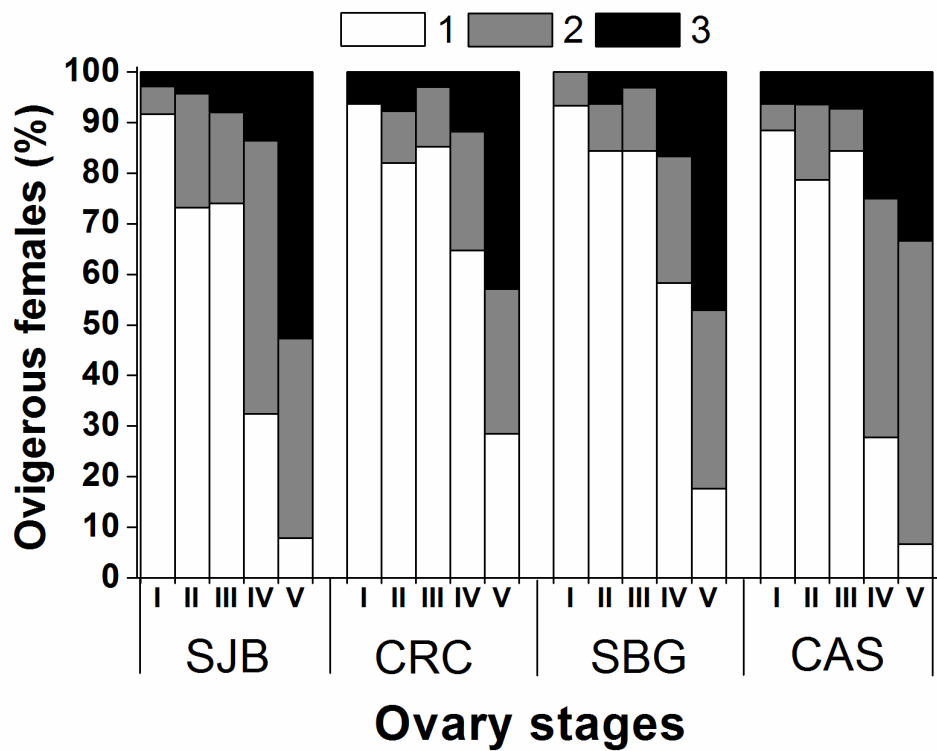


Figura 8. Variações na frequência relativa acumulada dos estágios de desenvolvimento ovariano (I a V) em fêmeas ovígeras de *M. amazonicum* apresentando ovos em diferentes estágios embrionários (1 a 3) nas populações de pequeno (SJB e CRC) e grande porte (CAS e SBG) coletadas durante Outubro de 2014 a Dezembro de 2015. CAS: Cássia; CRC: Carmo do Rio Claro; SBG: São João Batista do Glória; SJB: São José da Barra.

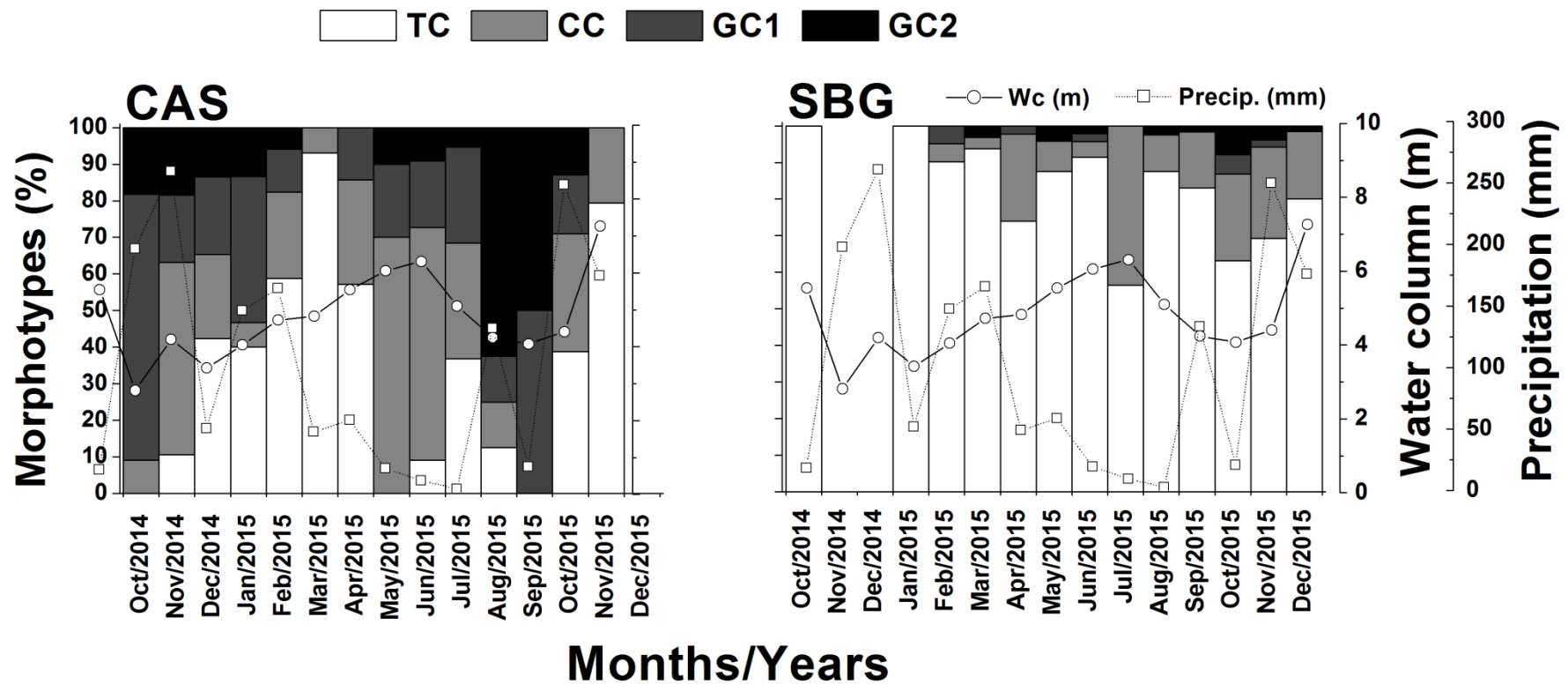


Figura 9. Variações na frequência relativa dos morfótipos em machos de *M. amazonicum* nas populações de grande porte (CAS e SBG) e dos valores de precipitação acumulada (Precip.) e nível da coluna de água (Wc) ao longo de Outubro de 2014 a Dezembro de 2015. CAS: Cássia; CRC: Carmo do Rio Claro; SBG: São João Batista do Glória; SJB: São José da Barra. CC: quela canela; GC1: quela verde 1; GC2: quela verde 2; TC: quela translúcida.

Tabela II. Itens alimentares identificados nos estômagos dos peixes capturados nas UHE's de Furnas e Marechal Mascarenhas de Morais (MMM). Para a realização da análise de correspondência múltipla, os itens foram agrupados em categorias binárias: ausência (0) e presença (1). M.a.: *Macrobrachium amazonicum*.

Espécies	UHE	UHE	Conteúdo estomacal						
	Furnas	MMM	M.a.	Peixes	Ovos	Detritos	Insetos	Plantas	Iscas
<i>Astyanax faciatius</i>	332	500	1	1	1	1	0	1	1
<i>Astyanax lacustris</i>	216	300	1	1	1	1	0	1	1
<i>Pimelodus maculatus</i>	5	15	1	1	1	1	1	0	0
<i>Oreochromis niloticus</i>	3	3	1	1	0	1	0	0	1
<i>Hoplias malabaricus</i>	2	4	1	1	0	0	0	0	0
<i>Cichla kelberi</i>	2	4	1	1	0	0	0	0	0

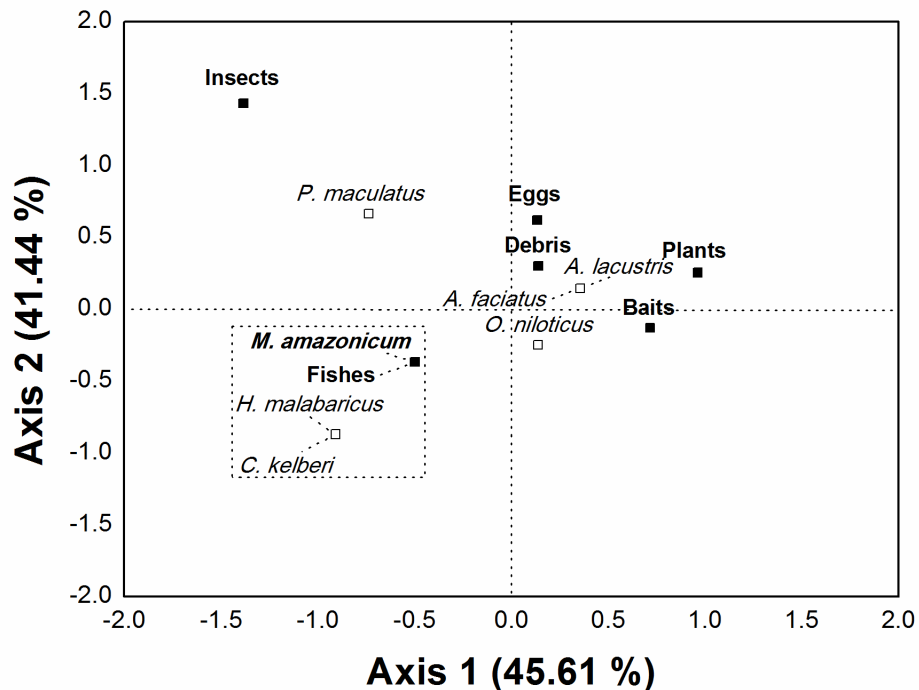


Figura 10. Ordenação dos recursos alimentares (quadrados pretos) utilizados pela ictiofauna (quadrados brancos) das UHE's de Furnas e Marechal Mascarenhas de Morais por meio da análise de correspondência múltipla.

5. Discussão

As populações de *M. amazonicum* dos reservatórios analisados apresentaram diferentes padrões populacionais e reprodutivos, apesar de estarem dentro de um mesmo sistema hídrico. Além disso, estes ambientes aquáticos são estruturalmente homogêneos e possuem características físico-químicas similares (PASCHOAL, 2017 - Capítulo 4). Dessa forma, as diferenças constatadas entre as populações podem estar mais bem relacionadas a características intrínsecas (i.e. caracteres genéticos e diferenças fisiológicas) do que a variações ambientais. Este padrão difere daquele constatado por Freire et al. (2017) em populações de *M. amazonicum* no reservatório de Tucuruí (estado do Pará, norte do Brasil). Estes autores também verificaram grupos morfológicos distintos em populações de uma mesma bacia. No entanto, associaram as mudanças fenotípicas a variações na salinidade e fluxo hídrico, ou seja, as pressões ambientais as quais os animais estão expostos.

Em todas as populações, as fêmeas foram maiores do que os machos e, além disso, predominaram na população de CAS. Por outro lado, machos predominaram na população de SJB e nas demais populações não houve predominância de um determinado sexo. As diferenças nos tamanhos entre os sexos de *M. amazonicum* podem ser explicadas pela precocidade da maturidade sexual observada em machos e pelo investimento em quelípodos robustos (i.e. armas sexuais) ou na produção espermática destes indivíduos, reduzindo o crescimento corporal destes animais (PASCHOAL, 2017 - Capítulos 2 e 8). O maior tamanho em fêmeas estaria diretamente relacionado à otimização do sucesso reprodutivo, uma vez que as maiores posturas são associadas aos maiores tamanhos corporais (BAUER, 2004). De acordo com Fisher (1930), a seleção natural favorece a produção da prole na proporção de 1♀:1♂, com custos iguais para a produção de cada sexo. Entretanto, Wilson e Pianka (1963) apontam que a razão sexual pode ser enviesada por diversos fatores (e.g. nutrientes disponíveis, tipo de habitats, mortalidade e taxas de crescimento diferenciadas), ocasionando a predominância de um determinado sexo na população. Comumente, as populações de *M. amazonicum* são dominadas por fêmeas com maiores proporções corporais e este padrão está associado a diferenças nas taxas de mortalidade, recrutamento diferencial de sexos, migração e predação específica (ODINETZ-COLLART, 1991b; HAYD e ANGER, 2013; LIMA et

al., 2014; ROCHA et al., 2015; COSTA et al., 2016). Odinetz-Collart (1991b) sugeriu que este padrão é típico para populações de ambientes lênticos, embora somente a população de CAS se encaixe neste padrão. Paschoal et al. (2013) sugeriram que carídeos executam migrações circadianas para procura de alimentos, cópula e regulação de processos fisiológicos, e que machos e fêmeas podem utilizar nichos diferentes, o que explicaria a predominância de um determinado sexo em um local ao longo do tempo. Estas características foram observadas nas populações analisadas de *M. amazonicum*, uma vez que machos dominantes (morfótipos GC1 e GC2) apresentaram hábitos noturnos e crípticos, e fêmeas ovígeras procuravam refúgios em macrófitas ou áreas rasas próximas a margem (PASCHOAL, 2017 – Capítulos 2 e 4).

A estrutura populacional de *M. amazonicum* nos reservatórios neotropicais analisados não foi afetada de maneira significativa por eventos de estresse hídrico. Em crustáceos a distribuição de frequências de tamanho varia ao longo do ano, devido ao recrutamento, mortalidade, padrões comportamentais e capacidade de adaptação ao ambiente (TSUCHIDA e WATANABE, 1997). A unimodalidade na distribuição é comum em crustáceos tropicais e é relacionada a eventos reprodutivos e ao recrutamento contínuo ao longo do tempo (GOODBODY, 1965; DIÁZ e CONDE, 1989). Por outro lado, a bimodalidade ou polimodalidade indicaria principalmente a sazonalidade de eventos e/ou altos picos de recrutamento e mortalidade em uma determinada população (RAGONESE e BIANCHINI, 1996). O último padrão de distribuição foi observado em todas as populações de *M. amazonicum* dos reservatórios analisados. Estes reservatórios são ambientes alterados por impactos antrópicos e caracterizados pela intensa flutuação do nível da coluna de água, que causam a instabilidade em algumas comunidades bentônicas e alteram aspectos da biologia populacional e reprodutiva de algumas espécies (ANDRADE et al., 2012; PASCHOAL et al., 2015). No entanto, *M. amazonicum* mostra uma alta capacidade adaptativa a variações ambientais e resiliência a intempéries, com a presença contínua de animais viavelmente reprodutivos e recrutamento de juvenis ao longo do tempo, mesmo durante eventos de estresse hídrico. De forma similar ao presente estudo, Odinetz-Collart (1991b) verificou a rápida resposta as modificações ambientais apresentada pelo camarão amazônico após a construção da UHE de Tucuruí. A autora analisou os impactos negativos da obra em populações de *M. amazonicum* e observou uma queda

bastante significativa na produção pesqueira e mudanças na estrutura populacional da espécie nos períodos iniciais da construção do reservatório, que se estabilizaram pouco tempo depois e rapidamente recuperaram seus padrões normais.

As fêmeas de *M. amazonicum* apresentaram reprodução contínua, sem a presença de picos de maturação ovariana ao longo do tempo e com uma maior frequência de fêmeas com ovários imaturos nas populações. Muitas fêmeas ovígeras com ovários imaturos carregavam ovos em estágio inicial, assim como fêmeas com ovários maduros portavam ovos em estágio final, indicando que imediatamente após a desova, as fêmeas de *M. amazonicum* podem reiniciar seu ciclo reprodutivo e se reproduzir novamente. Estes padrões também foram observados em populações da espécie em ambientes lóticos (SAMPAIO et al., 2007; BENTES et al., 2011), assim como em outras espécies do gênero *Macrobrachium* (VALENTI et al., 1986; MOSSOLIN e BUENO, 2002). Nas populações de pequeno porte, fêmeas com ovários imaturos foram mais frequentes em meses com maiores níveis de coluna de água, enquanto que nas populações de grande porte apresentaram maior abundância em meses chuvosos. Odinetz-Collart (1991a,b) apontou que fêmeas de *M. amazonicum* apresentam múltiplas posturas e que a maturação gonadal pode estar associada ao aumento do volume ou da corrente dos rios. A autora aponta que essa estratégia tem um duplo valor adaptativo, uma vez que pode facilitar a dispersão larval pelas chuvas ou pode aumentar a disponibilidade de alimento para as larvas durante o aumento do volume do rio.

O morfótipo inicial TC predominou nas populações com a presença de hierarquia social, seguidos pelo morfótipo intermediário CC, enquanto que os morfótipos dominantes GC1 e GC2 eram muito menos frequentes. Este padrão de decréscimo sequencial de morfótipos também foi registrado por Pantaleão et al. (2014) em machos de *M. amazonicum* (2 TC: 1 CC: 1 GC1: 1 GC2) e por Cohen et al. (1981) em *M. rosenbergii* (De Man, 1879) (5 macho pequeno - SM: 4 quela laranja - OC: 1 quela azul - BC). No entanto, difere dos resultados obtidos por Santos et al. (2006) (3 TC: 6 CC: 1 GC em *M. amazonicum*) e Iketani et al. (2016) (2 SM: 5 OC: 3 BC em *M. rosenbergii*), onde os autores observaram maior número de animais com morfótipo intermediário. Recentemente, Augusto e Valenti (2016) analisaram as diferenças fisiológicas entre os morfótipos de machos em *M. amazonicum* e verificaram que morfótipos dominantes requerem altas taxas de ingestão diária e têm maior consumo de oxigênio que animais submissos.

Adicionalmente, os autores observaram que estes animais são sedentários e tem a capacidade de natação reduzida devido às armas sexuais robustas. Dessa forma, é possível atribuir à menor quantidade de morfótipos dominantes nas populações analisadas ao alto custo energético para a manutenção de processos metabólicos e a dificuldade de obtenção de recursos necessários para a realização de tais processos.

Não foram encontrados indícios de indução dos morfótipos em *M. amazonicum* pela predação da ictiofauna nas populações aqui analisadas, uma vez que os dois tipos de fenótipos (com ou sem a presença de morfótipos) foram registrados em ambas as UHE's apesar de coexistirem junto a peixes predadores. No carídeo *Xiphocaris elongata* (Guérin-Méneville, 1855), a exposição a peixes predadores foi responsável por acarretar mudanças corporais na espécie, levando a presença de dois fenótipos: rostro longo (LR) e curto (SR). Além de possuir um rostro maior, camarões de LR possuíam abdomens maiores e mais pesados quando comparados a SR (OCASIO-TORRES et al., 2014, 2015a,b). Estes autores atribuíram às mudanças fenotípicas nestes camarões a respostas fisiológicas a sinais químicos dos predadores, i.e. kairomones. Todavia, tal associação não é consistente para as populações de *M. amazonicum* estudadas, uma vez que a ictiofauna capturada foi idêntica em ambas as represas e que a predação foi maior em fêmeas. Além disso, os reservatórios analisados são ambientes bastante modificados com a presença de diversos organismos invasores (inclusive *M. amazonicum*) devido à dispersão acidental (ANDRADE et al., 2012; PASCHOAL et al., 2015). Assim, a ausência ou presença de morfótipos nestas populações de *M. amazonicum* parece estar associada a caracteres genéticos, e a abundância de machos com morfótipos dominantes está correlacionada ao número de fêmeas nas populações.

6. Conclusão

Macrobrachium amazonicum mostrou ser uma espécie resiliente, uma vez que a dinâmica populacional e reprodutiva das populações nos reservatórios neotropicais analisados não foram significativamente alteradas por eventos de estresse hídrico. Nesta espécie, as fêmeas são maiores que os machos, pois tendem a deslocar mais energia ao aumento corporal que é correlacionado

diretamente ao tamanho da postura. Enquanto que machos, tendem a investir energia para a aquisição de armas sexuais ou para produção espermática, reduzindo seu tamanho corporal. Em *M. amazonicum*, as fêmeas podem ou não ser mais abundantes que machos nas populações analisadas, sendo que estas diferenças podem ser explicadas pela grande flexibilidade reprodutiva da espécie. O camarão amazônico apresenta reprodução contínua, com fêmeas apresentando rápido ciclo de maturação ovariana e a capacidade de realizar posturas múltiplas. Populações com morfótipos em machos exibem maior quantidade de animais com morfótipos submissos (TC e CC), uma vez que morfótipos dominantes desprendem grande quantidade de energia para a realização e manutenção de processos metabólicos, o que pode limitar sua proporção nas populações. A predação por peixes parece não influenciar a presença de morfótipos nas populações de *M. amazonicum*, sendo esta característica provavelmente modulada por fatores intrínsecos.

7. Referências

- ABDI, H.; VALENTIN, D. Multiple Correspondence Analysis. In: SALKIND, N. (Ed.): **Encyclopedia of Measurement and Statistics**. California: Thousand Oaks, 2007. p. 1-13.
- AGÊNCIA NACIONAL DE ÁGUAS - ANA. **Sistema Nacional de Informações sobre Recursos Hídricos**. 2017. Disponível em: <<http://portalsnirh.ana.gov.br>>. Acesso em: 01 fev. 2017.
- ANDRADE, D.P. et al. Assessment of Hydroelectric Power Station Marechal Mascarenhas de Morais fifth-order tributaries water quality at the Rio Grande watershed (Minas Gerais State, Brazil). **Acta Limnologica Brasiliensia**, vol. 24, n. 3, p. 326-337. 2012.
- ANGER, K.; MOREIRA, G.S. Morphometric and reproductive traits of tropical caridean shrimps. **Journal of Crustacean Biology**, vol.18, n. 4, 823-838. 1998.
- AUGUSTO, A.; VALENTI, W.C. Are there any physiological differences between the male morphotypes of the freshwater shrimp *Macrobrachium amazonicum* (Heller, 1862) (Caridea: Palaemonidae)? **Journal of Crustacean Biology**, vol. 36, n. 5, p. 716-723. 2016.
- BENTES, BS et al. Spatial distribution of the amazon river prawn *Macrobrachium amazonicum* (Heller, 1862) (Decapoda, Caridea, Palaemonidae) in two perennial creeks of an estuary on the northern coast of Brazil (Guajará Bay, Belém, Pará). 2011. **Brazilian Journal of Biology**, vol. 71, n. 4, p. 925-935. 2011.

BOUVY, M. et al. Limnological features in Tapacurá reservoir (northeast Brazil) during a severe drought. **Hydrobiologia**, vol. 493, p. 115-130. 2003.

CENTRO DE PREVISÃO DE TEMPO E ESTUDOS CLIMÁTICOS/INSTITUTO NACIONAL DE PESQUISAS ESPACIAIS - CPTEC/INPE. **El niño e La niña**. 2017. Disponível em: <<http://enos.cptec.inpe.br>>. Acesso em: 01 fev 2017.

CHANG, C-F.; SHIH, T-W. Reproductive cycle of ovarian development and vitellogenin profiles in the freshwater prawns, *Macrobrachium rosenbergii*. **Invertebrate Reproduction & Development**, vol. 27, n.1, p. 11-20. 1995.

COSTA, T. V.; MATTOS, L.A.; MACHADO, N.D.J.B. Estrutura populacional de *Macrobrachium amazonicum* em dois lagos de várzea da Amazônia. **Boletim do Instituto de Pesca**, vol. 42, n. 2, p. 281-293. 2016.

COHEN, D.; RAANAN, Z.; BRODY, T. Population profile development and morphotypic differentiation in the giant freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii* (de Man). **Journal of the World Mariculture Society**, vol. 12, p. 231–243.1981.

DE GRAVE, S.; MANTELATTO, F. 2013. ***Macrobrachium denticulatum***. Disponível em: <www.iucnredlist.org>. Acesso em: 01 fev. 2017.

DÍAZ, H.; CONDE, J. E. Population dynamics and life history of the mangrove crab *Aratus pisonii* (Brachyura, Grapsidae) in a marine environment. **Bulletin of Marine Science**, vol. 45, n. 1, p. 14-163. 1989.

FISHER, R.A. **The genetical theory of natural selection**. 1st ed. New York: Claredon Press, 1930. 317p.

FREIRE, J.L. et al. Morphometric discrimination among three stocks of *Macrobrachium amazonicum* in the Brazilian Amazon. **Limnologica**, vol. 64, p. 1–10. 2017.

GOODBODY, H. Continuous breeding in populations of two tropical crustaceans, *Mysidium columbiae* (Zimmer) and *Emerita portoricensis* Schmidt. **Ecology**, vol. 46: p. 195-197. 1965.

GOTELLI, N.J.; ELLISON, A.M. **A Primer of Ecological Statistics**.1st ed. Massachusetts: Sinauer Associates, Inc. Sunderland, 2004. 510 p.

HAYD, L.; ANGER, K. Reproductive and morphometric traits of *Macrobrachium amazonicum* (Decapoda: Palaemonidae) from the Pantanal, Brazil, suggests initial speciation. **Revista de Biología Tropical**, vol. 61, p. 39-57. 2013.

HENRY, R. **Ecologia de reservatórios: estrutura, função e aspectos sociais**. 1st ed. Botucatu: Fapesp/ FundibioBrazil, 1999, 800p.

IKETANI, G. et al. Successful invasion of the Amazon Coast by the giant river prawn, *Macrobrachium rosenbergii*: evidence of a reproductively viable population. **Aquatic Invasions**, vol. 11, n. 3, p. 277-286. 2016.

- KEITEL, J.; ZAK, D.; HUPFER, M. Water level fluctuations in a tropical reservoir: the impact of sediment drying, aquatic macrophyte dieback, and oxygen availability on phosphorus mobilization. **Environmental Science and Pollution Research**. 2016. Disponível em: doi: <10.1007/s11356-015-5915-3>. Acesso em: 05 fev. 2017.
- LIMA, J.D.F. et al. Reproductive aspects of *Macrobrachium amazonicum* (Decapoda: Palaemonidae) in the State of Amapá, Amazon River mouth. **Acta Amazonica**, vol. 44, n.2, p. 245-254. 2014.
- MACIEL, C.R.; VALENTI, W.C. Biology, fisheries, and aquaculture of the amazon river prawn *Macrobrachium amazonicum*: a review. **Nauplius**, vol.17, p. 61-79. 2009.
- MAGALHÃES, C. et al. Exotic species of freshwater decapod crustaceans in the state of São Paulo, Brazil: records and possible causes of their introduction. **Biodiversity and Conservation**, vol. 14, p. 1929-1945. 2005.
- MELO, D.C.D. et al. Reservoir storage and hydrologic responses to droughts in the Paraná River basin, south-eastern Brazil. **Hydrology and Earth System Sciences**, vol. 20, n. 11, p. 4673. 2016.
- MORAES-RIODADES, P.M.C.; VALENTI, W.C. Morphotypes in male amazon river prawns, *Macrobrachium amazonicum*. **Aquaculture**, vol. 236, p. 297–307. 2004.
- MOSSOLIN, E.C.; BUENO, S.L.S. Reproductive biology of *Macrobrachium olfersi* (Decapoda, Palaemonidae) in São Sebastião, Brazil. **Journal of Crustacean Biology**, vol. 22, n. 2, p. 367-376. 2002.
- National Weather Service/National Oceanic and Atmospheric Administration - NWS/NOAA. **El Niño/La Niña Home - Climate Prediction Center**. 2017. Disponível em: <http://www.cpc.ncep.noaa.gov/products/analysis_monitoring/ensostuff/ensoyears.shtml>. Acesso em: 01 fev. 2017.
- NOBRE, C.A. et al. Some characteristics and impacts of the drought and water crisis in southeastern Brazil during 2014 and 2015. **Journal of Water Resource and Protection**, vol. 8, n. 2, p. 252. 2016.
- OCASIO-TORRES, M.E. et al. 2015b. Antipredator defence mechanism in the amphidromous shrimp *Xiphocaris elongata* (Decapoda: Xiphocarididae): rostrum length. **Journal of Natural History**, 2016. Disponível em: doi: 10.1080/00222933.2015.1005716. Acesso em: 06 Jan. 2017.
- OCASIO-TORRES, M.E.; CROWL, T.A.; SABAT, A.M. Allometric differences between two phenotypes of the amphidromous shrimp *Xiphocaris elongata*. **Journal of Crustacean Biology**, vol. 35, n. 6, p. 747-752. 2015a.
- OCASIO-TORRES, M.E.; CROWL, T.A.; SABAT, A.M. Long rostrum in an amphidromous shrimp induced by chemical signals from a predatory fish. **Freshwater Science**, vol. 33, n. 2, p. 451-458. 2014.
- ODINETZ-COLLART, O. Strategie de reproduction de *Macrobrachium amazonicum* en Amazonie Centrale (Decapoda, Caridea, Palaemonidae). **Crustaceana**, vol. 61, n. 3, p. 253-270. 1991a.

ODINETZ-COLLART, O. Tucuruí dam and the population of the prawn *Macrobrachium amazonicum* in the Lower Tocantins (PA-Brazil): a four year study. **Archiv für Hydrobiologie**, vol. 122, n. 2, p. 213-227. 1991b.

OPERADOR NACIONAL DO SISTEMA ELÉTRICO – ONS. **Histórico da Operação**. 2017. Disponível em: <<http://www.ons.org.br>>. Acesso em: 01 fev. 2017.

PANTALEÃO, J.A.F.; HIROSE, G.L.; COSTA, R.C. Occurrence of male morphotypes of *Macrobrachium amazonicum* (Caridea, Palaemonidae) in a population with an entirely freshwater life cycle. **Brazilian Journal of Biology**, vol. 74, n. 3 sup., p. 223-232. 2014.

PANTALEÃO, J.A.F.; HIROSE, G.L.; COSTA, R.C. Relative growth, morphological sexual maturity, and size of *Macrobrachium amazonicum* (Heller 1862) (Crustacea, Decapoda, Palaemonidae) in a population with an entirely freshwater life cycle. **Invertebrate Reproduction & Development**, vol. 56, p. 80-190. 2012.

PASCHOAL, L.R.P. et al. Phytophilous caridean shrimps (Atyidae and Palaemonidae) in Salsa river (Canavieiras, Bahia, Brazil). **Nauplius**, vol. 21, n. 1, 123-126. 2013.

PASCHOAL, L.R.P.; ANDRADE, D.P.; DARRIGRAN, G. How the fluctuations of water levels affect populations of invasive bivalve *Corbicula fluminea* (Müller, 1774) in a Neotropical reservoir? **Brazilian Journal of Biology**, vol. 75, n. 1, p.135-143. 2015.

PASCHOAL, L.R.P.; OLIVEIRA, L.J.F. Histology and histochemistry of the testes in two Amazonian apple snails. In: SANT'ANNA, B.S.; HATTORI, G.Y. (Eds). **Amazonian Apple Snails**. 1st ed. New York: Nova Science Publishers, 2017. p. 127-144.

PASCHOAL, L.R.P.; RIGOLIN-SÁ, O. Análise da qualidade da água das UHE Marechal Mascarenhas de Moraes e Luiz Carlos Barreto de Carvalho da Bacia hidrográfica do médio rio Grande (MG) utilizando o índice do estado trófico (IET) e o índice da qualidade da água (IQA). **Ciência et Praxis**, vol. 7, p. 13-20. 2011.

PASCHOAL, L.R.P.; ZARA, F.J. First record of intersexuality in the Amazon River shrimp *Macrobrachium amazonicum* (Heller, 1862) (Caridea: Palaemonidae). **Journal of Crustacean Biology**, vol. 74, n. 4, p. 1-5. 2017.

PILEGGI, L.A.G. **Sistemática filogenética dos camarões do gênero *Macrobrachium* Bate, 1868 do Brasil: análises morfológicas e moleculares**. 236 f. Tese de doutorado (Doutorado em Biologia Comparada). Universidade de São Paulo – USP, São Paulo. 2009.

R CORE TEAM. **R (The R Project for Statistical Computing)**. Software version 3.3.1. 2017. Disponível em: <www.r-project.org>. Acesso em: 10 fev. 2017.

RAGONESE, S.; BIANCHINI, M. L. Growth, mortality and yield-per-recruit of the deep-water shrimp *Aristeus antennatus* (Crustacea-Aristeidae) of the Strait of Sicily (Mediterranean Sea). **Fisheries Research**, vol. 26, n. 1, 125-137. 1996.

- ROCHA, S.S. et al. Length-weight relationship and condition factor of *Macrobrachium amazonicum* (Heller, 1862) (Decapoda, Palaemonidae) from a reservoir in Bahia, Brazil. **Nauplius**, vol. 23, n. 2, p. 149-161. 2015
- SAMPAIO, C.M.S. et al. Reproductive cycle of *Macrobrachium amazonicum* females (Crustacea, Palaemonidae). **Brazilian Journal of Biology**, vol. 67, n. 3, p. 551-559. 2007.
- SANTOS, J.A.; SAMPAIO, C.M.S; SOARES-FILHO, A.A. Male population structure of the Amazon river prawn (*Macrobrachium amazonicum*) in a natural environment. **Nauplius**, vol. 14, n. 2, p. 55-63. 2006.
- SHIMIZU, C. et al. Hemolymph analysis and evaluation of newly formulated media for culture of shrimp cells (*Penaeus stylirostris*). **In Vitro Cellular & Developmental Biology-Animal**, vol. 37, n. 6, p. 322-329. 2001.
- STURGES, H.A. The choice of a class interval. **Journal of the American Statistical Association**, vol. 21, p. 65-66. 1926.
- TSUCHIDA, S.; WATANABE, S. Growth and reproduction of the grapsid crab *Plagusia dentipes* (Decapoda: Brachyura). **Journal of Crustacean Biology**, vol. 17, n. 1, p. 90-97. 1997.
- TUNDISI, J.G.; MATSUMURA-TUNDISI, T.; ABE, D.S. The ecological dynamics of Barra Bonita (Tietê River, SP, Brazil) reservoir: implications for its biodiversity. **Brazilian Journal of Biology**, vol. 68, supl. 4, p. 1079-1098. 2008.
- VALENTI, W.C.; MELLO, J.T.C.; LOBÃO, V.L. Dinâmica da reprodução de *Macrobrachium acanthurus* (Wiegmann, 1836) e *Macrobrachium carcinus* (Linnaeus, 1758) do Rio Ribeira de Iguape (Crustacea, Decapoda, Palaemonidae). **Ciência e Cultura**, vol. 38, n. 7, p. 1256-1262. 1986.
- VERGAMINI, F.G.; PILEGGI, L.G.; MANTELATTO, F.L. Genetic variability of the Amazon River prawn *Macrobrachium amazonicum* (Decapoda, Caridea, Palaemonidae). **Contributions to Zoology**, vol. 80, p. 67-83. 2011.
- VITULE, J.R.S. et al. Brazil's drought: Protect biodiversity. **Science**, vol. 347, n. 6229, p. 1427-1428. 2015.
- WANG, Y. ZIQIANG, X.; WANG, D. A transitional region concept for assessing the effects of reservoirs on river habitats: a case of Yangtze River, China. **Ecohydrology**, vol. 5, p. 28-35. 2012.
- WENNER, E.L. et al. **A comparison of species composition and abundance of decapod crustaceans and fishes from the North and South Edisto rivers in South Carolina**. South Carolina Marine Research Center: Technical Report No. 78, Charleston, 1991, 48 p.
- WILSON, M.F.; PIANKA, E.R. Sexual selection, sex ratio and mating system. **American Naturalist**, vol. 97, n. 897, p. 405-407. 1963.

Capítulo 4

**Biologia reprodutiva de *Macrobrachium amazonicum* (Heller, 1862)
em populações com diferentes fenótipos em reservatórios
neotropicais durante o evento “El niño”**

Biologia reprodutiva de *Macrobrachium amazonicum* (Heller, 1862) em populações com diferentes fenótipos em reservatórios neotropicais durante o evento “El niño”

1. Resumo

Populações de *Macrobrachium amazonicum* apresentam alta variabilidade intraespecífica, com dois fenótipos registrados para a espécie em reservatórios neotropicais: populações hololimnéticas de grande e pequeno porte. Nestes ambientes artificiais, eventos climáticos como o “El niño” podem alterar significativamente a estrutura populacional e a biologia reprodutiva de animais aquáticos. Neste trabalho estudamos os padrões reprodutivos de fêmeas em quatro populações de *M. amazonicum* com fenótipos distintos, a fim de verificar se estes são influenciados pelo fenômeno climático “El niño”. Amostras de água e sedimento, e camarões foram obtidos mensalmente durante Outubro de 2014 a Dezembro 2015 e de forma isolada em Outubro 2016 nas usinas hidrelétricas de Furnas e Marechal Mascarenhas de Moraes (MMM) (Minas Gerais, sudeste do Brasil). Dois fenótipos foram identificados nas populações por meio da inspeção de suas características morfológicas e reprodutivas. As fêmeas das populações de Furnas apresentaram pequeno porte ($\overline{CL} = 9,05$ e $10,06$ mm) e carregavam poucos ovos ($\overline{X} = 141$ e 219) com volumes maiores ($\overline{X} = 0,188$ e $0,212$ mm³), enquanto que as fêmeas de grande porte ($\overline{CL} = 15,89$ e $14,51$ mm) das populações de MMM, portavam muitos ovos ($\overline{X} = 814$ e 846) de menor volume ($\overline{X} = 0,130$ e $0,143$ mm³). As diferenças verificadas na biologia reprodutiva dos fenótipos de *M. amazonicum* não podem ser atribuídas aos aspectos hidrogeográficos das UHE's devido à similaridade ambiental e físico-química dos reservatórios. Ambos os tipos de fenótipos têm reprodução contínua e apresentaram investimento reprodutivo (RO) semelhante. Fêmeas de pequeno porte investem mais recursos em ovos maiores e, seus embriões têm maior crescimento somático ao final do desenvolvimento do que as populações de grande porte. Ambos os fenótipos não foram afetados diretamente pelo “El niño”, o que é um reflexo da plasticidade reprodutiva observada na estrutura das diferentes populações estudadas. Nossos resultados mostraram que o “El niño” atuou como um fator estressante para as diferentes populações analisadas, modificando os padrões reprodutivos da espécie em uma escala espaço-temporal. As populações selvagens de *M. amazonicum* mostram especificidade no uso de habitats entre os diferentes fenótipos, sendo que as fêmeas ovígeras de pequeno porte estão associadas à macrófitas em ambientes mais profundos, áreas utilizadas como refúgios. Por outro lado, as ovígeras de grande porte são mais abundantes em áreas rasas com sedimento arenoso que são utilizadas como abrigo e berçário.

Palavras-chave: camarão amazônico, fenótipos, níveis da coluna de água, ENSO.

2. Introdução

Muitas espécies de camarões Palaemonidae Rafinesque, 1815 são derivadas de animais marinhos com alta plasticidade fenotípica. Seus ancestrais marinhos invadiram e colonizaram ambientes dulciaquícolas, promovendo múltiplas especiações (ASHELBY et al., 2012). Dentro desta família, o gênero *Macrobrachium* Spence Bate, 1868 é aquele com maior sucesso na colonização de ambientes estuarinos e dulciaquícolas, apresentando ampla distribuição em regiões tropicais e subtropicais (PILEGGI e MANTELLATO, 2010; ANGER, 2013). O último autor afirma que a espécie com origem costeira que melhor demonstra as invasões e a adaptação a ambientes límnicos no gênero, em relação às demais, é *Macrobrachium amazonicum* (Heller, 1862). Esta espécie tem ampla distribuição geográfica nas Américas, ocorrendo desde Costa Rica até a Argentina. No Brasil, populações de *M. amazonicum* foram separadas em três grupos por meio de análises moleculares: populações (I) continentais da Amazônia, (II) das Bacias do Paraná e Paraguai e (III) de sistemas costeiros do norte e nordeste. A presença desta espécie no nordeste e sul do Brasil, assim como na Bacia do Paraná é considerada resultado da dispersão acidental por atividades antrópicas (VERGAMINI et al., 2011).

Macrobrachium amazonicum mostra grande flexibilidade reprodutiva e rápida resposta fisiológica aos ambientes em que ocorre, o que confere alta variabilidade intraespecífica para suas populações (MACIEL e VALENTI, 2009; VERGAMINI et al., 2011; AUGUSTO e VALENTI, 2016). Por meio da avaliação de sua história de vida, características morfológicas e reprodutivas podem-se estabelecer três tipos de populações com fenótipos distintos para a espécie, sendo elas: (a) populações anfídromas de grande porte: camarões de ambos os sexos com grandes proporções corporais, machos com quatro morfótipos bem definidos e fêmeas ovígeras com fecundidade elevada portando ovos com volume reduzido; (b) populações hololimnéticas de grande porte: morfologicamente similar a anterior, porém suas fêmeas ovígeras possuem ovos de volumes intermediários; e (c) populações hololimnéticas de pequeno porte: camarões de ambos os sexos com tamanho reduzido, sem morfótipos em machos e com fêmeas ovígeras apresentando fecundidade reduzida e ovos de maiores volumes que os outros fenótipos (ODINETZ-COLLART, 1991; ODINETZ-COLLART e RABELO, 1996; MORAES-RIODADES e VALENTI, 2004; MACIEL e VALENTI, 2009; PANTALEÃO et al., 2012,

2014; HAYD e ANGER, 2013; MEIRELES et al., 2013; AUGUSTO e VALENTI, 2016; PASCHOAL e ZARA, 2017; PASCHOAL, 2017 – Capítulo 2).

Recentemente, características observadas apenas em populações anfídomas, como a presença de morfótipos em machos e a hierarquia social, foram registradas em populações da Bacia do Paraná (sudeste do Brasil), o que pode indicar uma recente mudança na história de vida da espécie, i.e. hololimnia (PANTALEÃO et al., 2014; PASCHOAL, 2017 - Capítulo 2). Todas as populações de *M. amazonicum* estudadas na Bacia do Paraná foram registradas em reservatórios. Estes ambientes artificiais são considerados corpos d'água do tipo intermediário, pois dependem do tempo de detenção hídrica, assim como do armazenamento e liberação das massas de água represadas que servirão a múltiplos propósitos (e.g. abastecimento hídrico e produção de energia) (HENRY, 1999). Dessa forma, as flutuações dos níveis da água devido a fatores antropogênicos (e.g. abertura de comportas para abastecimento) ou naturais (e.g. eventos climáticos), somados as variações na pluviosidade ao longo do tempo, seriam um dos principais fatores responsáveis por alterar significativamente a dinâmica populacional de organismos bentônicos nestes ambientes (AGOSTINHO et al., 1992; PASCHOAL et al., 2015).

Dentre os fatores naturais que podem alterar drasticamente ambientes lênticos destacam-se o “El niño” e seu oposto “La Niña”. Estes fenômenos atmosférico-ocênicos fazem parte da mudança climática global natural conhecida como Oscilação Sul - El Niño (ENSO). Comumente mensurados pelo índice Niño 3,4 são responsáveis por alterar padrões de precipitação devido ao aumento (“El niño”) ou diminuição (“La Niña”) da temperatura da superfície do Oceano Pacífico (TRENBERTH, 1997; GRIMM, 2003). Estas anomalias promovem mudanças físico-químicas na água e sedimento de reservatórios neotropicais e, conseqüentemente, alteram diversos aspectos da biota nestes ambientes, como o aumento na densidade de organismos mais tolerantes, redução de recursos e habitats e modificações na biologia reprodutiva dos animais (BOUVY et al., 2000, 2003; PASCHOAL et al., 2015). Neste contexto, o presente trabalho verificou as diferenças nos padrões reprodutivos em populações com diferentes fenótipos da espécie *M. amazonicum* em reservatórios neotropicais do sudeste brasileiro durante o fenômeno de “El niño”.

3. Material e métodos

3.1. Área de estudo e amostragem

Coletas mensais de água, sedimento e camarões foram realizadas consecutivamente durante Outubro de 2014 a Dezembro de 2015 e de forma isolada em Outubro de 2016, no rio Grande (20° 30' 53" S; 46° 50' 16" W) em quatro pontos de coletas. Dois pontos situados na usina hidrelétrica (UHE) de Furnas - municípios de Carmo do Rio Claro (CRC - 20° 57' 20" S; 46° 9' 14" W) e São José da Barra (SJB - 20° 43' 10,6" S; 46° 11' 26,4" W), e outros dois na UHE de Marechal Mascarenhas de Moraes (MMM) - municípios de Cássia (CAS - 20° 30' 53,6" S; 46° 50' 16,4" W) e São João Batista do Glória (SBG - 20° 39' 43,5" S; 46° 32' 5,8" W) no estado de Minas Gerais (sudeste do Brasil). Estes reservatórios em cascata são importantes para a região sudeste brasileira, pois são responsáveis pelo abastecimento doméstico e industrial, além de gerar energia aos municípios situados ao longo de seu percurso (PASCHOAL et al., 2012).

Amostras de água foram obtidas abaixo da lâmina d'água com garrafas de polietileno de 1.000 ml para variáveis físicas e químicas, com exceção do oxigênio dissolvido, sendo este coletado com frasco âmbar de 250 ml. O acondicionamento e conservação das amostras foram realizados conforme os métodos especificados em "Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater" (APHA, 1999). As amostras de sedimento foram obtidas com peneira granulométrica (500 µm) e acondicionadas e processadas segundo Raij et al. (2001).

Os camarões foram capturados por meio de coleta ativa - amostragens efetuadas por um coletor portando uma peneira de 60 cm de diâmetro e malha de 1,25 mm, a qual foi deslocada por diversas vezes ao longo da vegetação marginal e bancos de macrófitas durante 30 minutos -, e passiva - seis armadilhas (85 cm comprimento X 35 cm largura/altura) iscadas com fígado bovino foram colocadas próximas (0,5 - 2 m) a margem, e retiradas após quatro horas. Imediatamente após a captura, os animais foram anestesiados por resfriamento (- 20°C / 5 min.), conservados em etanol 70%, acondicionados em frascos devidamente etiquetados e transportados até o laboratório.

Adicionalmente, 15 larvas de *M. amazonicum* foram obtidas após a eclosão de cinco ovos de três diferentes fêmeas ovígeras da população de CRC. Estas larvas foram transferidas para pequenos recipientes de acrílico com capacidade de 150 ml (temperatura $25 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$) e mantidas sem alimentação (ANGER e HAYD, 2009, 2010). Após a morte por inanição, estas larvas foram conservadas em etanol 70% para a verificação e comparação dos estágios larvais neste fenótipo, por meio das características descritas por Anger e Hayd (2009, 2010) em larvas de *M. amazonicum* de populações anfídromas e hololimnéticas.

Os valores mensais de precipitação acumulada em ambas às represas foram obtidos pelo banco de dados da Agência Nacional de Águas (ANA, 2017), enquanto que os dados dos níveis da coluna de água nas UHE's foram disponibilizados pelo Operador Nacional do Sistema Elétrico (ONS, 2017). Para a classificação dos eventos de "El niño", os valores mensais do índice Niño 3,4 foram obtidos pelo banco de dados do Centro de Previsão de Tempo e Estudos Climáticos/Instituto Nacional de Pesquisas Espaciais (CPTEC/INPE, 2017) e National Weather Service/National Oceanic and Atmospheric Administration (NWS/NOAA, 2017). Após alguns anos de neutralidade, de 2012 até o primeiro semestre de 2014, o fenômeno "El niño" teve seu início no segundo semestre de 2014 (Outubro/14 - Niño 3,4 = 0,6), aumentando sua intensidade ao decorrer dos meses até atingir seu ápice em 2015 (Outubro /15 - Niño 3,4 = 2,2) e cessando seu ciclo em 2016 para entrada da "La niña" (Outubro/16 - Niño 3,4 = - 0,8) (*sensu* CPTEC/INPE, 2017; NWS/NOAA, 2017).

3.2. Análise de água e sedimento

Os parâmetros físicos e químicos de água analisados em campo foram: pH - determinado pela leitura do potenciômetro digital, temperatura - mensurado com termômetro, condutividade - determinado pela leitura do condutivímetro digital, e oxigênio dissolvido - obtido pelo método de Winkler, modificado com azida sódica segundo Golterman et al. (1978). Em laboratório foram registrados o teor de matéria orgânica, alcalinidade e dureza da água (GOLTERMAN et al., 1978), coliformes totais (APHA, 1999), clorofila- α (NUSCH, 1980), fósforo total (P) (STRICKLAND e PARSONS, 1960) e nitrogênio total (N) (VALDERRAMA, 1981). As análises de cádmio (Cd), cálcio (Ca), cobre (Cu), cromo (Cr), ferro (Fe), magnésio (Mg),

manganês (Mn), potássio (K), níquel (Ni), sódio (Na) e zinco (Zn) na água foram realizadas por meio de espectrofotometria de absorção atômica (APHA, 1999). Teores de alumínio (Al), boro (B), cálcio (Ca), cobre (Cu), enxofre (S), ferro (Fe), fósforo (P), magnésio (Mg), manganês (Mn), potássio (K) e zinco (Zn) no sedimento foram realizadas por meio de espectrofotometria de absorção atômica, seguindo protocolos estabelecidos por Raij et al. (2001).

A homo/heterogeneidade ambiental das UHE's de Furnas e de MMM foi avaliada por meio do teste T^2 Hotelling, utilizando as médias de cada parâmetro limnológico mensurado nas amostras de água e sedimento dos pontos de coleta.

3.3. Biometria e aspectos reprodutivos

A identificação quanto ao sexo dos camarões foi realizada por meio de três etapas: (a) verificação da ausência (♀) ou presença (♂) do apêndice sexual masculino no endopodito do segundo par de pleópodos, (b) verificação das aberturas nos coxopoditos dos 3° (♀) ou 5° (♂) pereiópodos, e (c) dissecação do sistema reprodutor: ovários (♀) ou testículos (♂) (BAUER, 2004). Após a sexagem, fêmeas ovígeras e não ovígeras foram separadas das alíquotas, contabilizadas e individualizadas em frascos. As fêmeas ovígeras tiveram o comprimento da carapaça (CL), o comprimento total (TL), a largura das três primeiras pleuras abdominais (PW), a altura da segunda pleura abdominal (PH) e a distância entre a segunda pleura direita e esquerda (PD) mensurados por meio de paquímetro analógico (0,02 mm) segundo Paschoal et al. (2016). O volume da câmara incubadora (BPV) das fêmeas foi estimado por meio destas variáveis morfométricas, empregando a fórmula $BPV = 1/6(PW*PH*PD)$ (NAZARI et al., 2003). O peso fresco (W) de cada ovígera foi registrado em balança analítica (0,0001 g).

Fêmeas ovígeras foram classificadas em três estágios de desenvolvimento embrionário: (a) inicial - ovos ocupados quase ou totalmente por vitelo, sem a presença de manchas oculares e de processos de diferenciação embrionária; (b) intermediário - ovos com vitelo ocupando até 1/3 de seu volume, com a presença de manchas oculares e diferenciação embrionária; e (c) final - ovos com vitelo ocupando menos de 1/3 de seu volume, com manchas oculares bem definidas e apêndices já diferenciados (ANGER e MOREIRA, 1998). Neste estudo, a taxa de aborto nas populações foi determinada pela quantificação de fêmeas ovígeras com

ovários imaturos apresentando uma perda significativa da massa de ovos em estágio I. Fêmeas apresentando indícios de aborto espontâneo ou induzido foram analisadas e quantificadas mensalmente.

A frequência relativa de fêmeas ovígeras considerando os três estágios de desenvolvimento embrionário foi analisada mensalmente, e posteriormente agrupada trimestralmente considerando-se as estações do ano, onde a primavera foi à primeira estação amostrada. Adicionalmente, a frequência relativa de fêmeas ovígeras registrada durante os meses de Outubro nos anos de 2014 (início do “El niño”), 2015 (ápice do “El niño”) e 2016 (alternância para La niña) foram averiguadas para uma comparação entre as distintas fases do fenômeno “El Niño”. O coeficiente de correlação de Pearson foi utilizado para avaliar a associação entre a precipitação acumulada e o nível da coluna de água com a frequência de fêmeas ovígeras por estações e ao longo dos anos. A taxa de aborto também foi correlacionada a estas variáveis ambientais e aos valores médios de temperatura da água durante as estações e ao longo dos anos. Uma análise de variância (ANOVA) trifatorial avaliou as diferenças na frequência de fêmeas ovígeras ao longo do desenvolvimento embrionário e das estações do ano nos quatro pontos de coletas. A mesma análise foi utilizada para testar o efeito do “El niño” na frequência de fêmeas ovígeras de *M. amazonicum* por meio das variáveis categóricas independentes: anos do fenômeno, pontos de coletas e estágios de desenvolvimento embrionário. Todos os testes foram associados ao teste post-hoc de comparação múltipla de Tukey.

A fecundidade em *M. amazonicum* foi avaliada nas populações por meio da contagem direta de ovos de 15 fêmeas (ou todas se $N < 15$) portando massas de ovos em estágio I, obtidas de forma aleatória nas amostras mensais seguindo as propostas de Paschoal et al. (2016). Posteriormente, os valores registrados foram agrupados trimestralmente, considerando-se as estações do ano. ANOVA's bifatoriais associadas ao teste de comparação múltipla de Tukey foram empregadas para determinar possíveis diferenças entre os valores médios de fecundidade no decorrer das estações do ano e durante o fenômeno do “El niño” (2014 - 2016) para as quatro populações. Regressões lineares foram ajustadas relacionando a fecundidade (variável dependente, Y) com o CL, TL, BPV e W (variáveis independentes, X). O coeficiente de determinação (r^2) e o grau de alometria (b - verificado pelo teste t de Student, sendo $H_0 = 1$ para CL e TL, ou 3 no caso do BPV

e W) das retas foram calculados, afim de verificar o padrão de fecundidade na espécie e entre os tipos de fenótipos.

A perda de ovos durante o desenvolvimento embrionário foi analisada por meio da inspeção e quantificação direta dos ovos de 20 fêmeas em cada estágio embrionário para cada população e, posteriormente, comparadas pelo teste de Kruskal-Wallis (KW) (normalidade não satisfeita - W-Statistic = SJB: 0,97; CRC: 0,95; CAS: 0,88 e SBG: 0,89 - $p < 0,01$), seguidos pelo teste de comparações post-hoc de Tukey. Para a determinação do investimento reprodutivo úmido (ROw), as massas de ovos foram retiradas das câmaras incubadoras das fêmeas e posteriormente as massas (EM) e corpos (BW) foram pesados em balança analítica (0,0001 g). Em uma segunda etapa, o investimento reprodutivo seco (ROd) foi obtido por meio da secagem das mesmas massas de ovos e dos corpos das fêmeas em uma estufa a 70°C por 48 horas e novamente pesados (PASCHOAL et al, 2016). Ambos os tipos de investimentos reprodutivos foram determinados pela equação: $RO = (EM / BW) \times 100$. Os RO's de cada estágio de desenvolvimento embrionário foram comparados por meio de ANOVA's bifatoriais de medidas repetidas, associadas ao teste de comparação múltipla de Tukey para determinar as diferenças entre os valores de RO úmidos e secos entre os diferentes estágios de desenvolvimento nas populações analisadas.

Nas quatro populações estudadas, cinco fêmeas ovígeras em cada estágio de desenvolvimento embrionário (I a III) (N: 60) foram selecionadas aleatoriamente de amostras mensais distintas e tiveram suas massas de ovos retiradas de suas câmaras incubadoras. Estas massas foram utilizadas para o cálculo do tamanho e volume dos ovos para cada população. Para isso, utilizou-se uma subamostra de 90 ovos (18 ovos analisados em cada massa) nos três estágios de desenvolvimento embrionário (N: 270 ovos por população). Os eixos maiores (L) e os menores (S) dos ovos foram mensurados sob estereomicroscópio (Leica® - 4X) e tratados como elipsóides, posteriormente o volume (VO) foi calculado pela equação: $VO = (\pi * L * S^2) / 6$ (ODINETZ-COLLART e RABELO, 1996). Como o pressuposto da normalidade não foi satisfeito (W-Statistic = SJB: 0,91; CRC: 0,88; CAS: 0,96 e SBG: 0,97 - $p < 0,001$), o teste de Kruskal-Wallis (KW) foi utilizado para comparar o volume dos ovos entre os estágios de desenvolvimento embrionário para cada população, seguido pelo teste de comparações post-hoc de Tukey.

A relação entre as fêmeas ovígeras das populações e as variáveis limnológicas analisadas ao longo do período de amostragem nos reservatórios foi avaliada por meio de uma análise de correspondência canônica (CCA). A significância das variáveis limnológicas ($\alpha = 0,05$) foram testadas pela função ENVFIT, que obtém a medida dos coeficientes de determinação (r^2) para cada variável, e por meio de um procedimento de aleatorização (999 permutações) define a significância (ou não) para cada variável testada. A CCA foi executada no software R 3.3.1., com a função disponível no pacote Vegan (OKSANEN et al., 2006). Todos os cálculos e as demais análises estatísticas foram realizados no software R 3.3.1. (R DEVELOPMENT CORE TEAM, 2017).

4. Resultados

4.1. Parâmetros ambientais

Os ambientes aquáticos dos reservatórios possuem características mesoeutróficas, sendo levemente ácidos, com boa oxigenação, baixa produtividade primária (clorofila- α), sem a presença quantificável de metais pesados e com uma alta concentração de fósforo e coliformes fecais. O sedimento apresentou em sua composição, principalmente, frações finas na UHE de Furnas e frações grossas na UHE de MMM. Além disso, não foi constatada concentração elevada de nenhum dos elementos químicos analisados no sedimento em ambos os reservatórios (Tabela I). Não existem diferenças significativas para as variáveis limnológicas analisadas nos pontos amostrados (Hotelling's $T^2 = F: 1,95; p: 0,45$), evidenciando uma homogeneidade ambiental entre os reservatórios.

Tabela I. Valores médios (\pm desvio padrão) das variáveis limnológicas (N: 15 por ponto) dos pontos de coletas amostrados nas UHE's Furnas (SJB e CRC) e Marechal Mascarenhas de Morais (CAS e SBG) (Minas Gerais, sudeste do Brasil) durante os meses de Outubro de 2014 a Dezembro de 2015. Clorofila- α , cobre, manganês, zinco, cádmio, cromo e níquel não foram representados devido aos seus valores insignificantes. (a): água; (s): sedimento; Al: alumínio; B: boro; Ca: cálcio; Cond.: condutividade; Cu: cobre; Fe: ferro; K: potássio; Mg: magnésio; Mn: manganês; MO: matéria orgânica; N: nitrogênio total; Na: sódio; OD: oxigênio dissolvido; P: fósforo total; Precip.: precipitação acumulada; S: enxofre; Tcol: coliformes totais; Zn: zinco.

Variáveis	SJB	CRC	CAS	SBG
-----------	-----	-----	-----	-----

Alcalinidade (mg/L)	13,63 (± 7,67)	55,27 (± 28,30)	31,07 (± 13,52)	22,88 (± 7,44)
Dureza (mg/L)	6,06 (± 6,97)	36,73 (± 12,61)	24,71 (± 6,74)	18,38 (± 9,52)
pH (a)	6,21 (± 0,72)	6,43 (± 0,58)	6,68 (± 0,53)	6,68 (± 0,77)
OD (mg/L)	10,12 (± 2,54)	7,51 (± 2,80)	10,29 (± 2,74)	9,95 (± 2,75)
Cond. (mS/L)	21,01 (± 4,06)	82,94 (± 13,69)	73,44 (± 17,59)	50,55 (± 8,42)
MO(a) (mg/L)	5,50 (± 1,51)	6,89 (± 2,00)	6,36 (± 2,67)	4,63 (± 2,32)
Temperatura (°C)	25,20 (± 2,83)	23,20 (± 2,91)	24,64 (± 2,24)	24,77 (± 2,09)
N (a) (mg/L)	2,05 (± 1,50)	1,75 (± 1,88)	2,21 (± 2,26)	1,86 (± 1,34)
P (a) (µ P/L)	32,46 (± 14,45)	43,13 (± 24,32)	130,06 (± 175,28)	27,75 (± 20,10)
Profundidade (cm)	170,67 (± 26,04)	118,33 (± 28,20)	97,86 (± 22,93)	73,85 (± 31,30)
Ca (a) (mg/L)	1,13 (± 0,57)	9,80 (± 3,10)	4,69 (± 1,05)	2,84 (± 0,82)
Mg (a) (mg/L)	0,48 (± 0,20)	1,57 (± 0,34)	1,92 (± 0,48)	1,14 (± 0,33)
Fe (a) (mg/L)	1,21 (± 0,60)	1,44 (± 0,70)	1,64 (± 1,78)	0,29 (± 0,27)
K (a) (mg/L)	2,18 (± 0,38)	2,92 (± 1,33)	3,03 (± 0,66)	2,10 (± 0,25)
Na (a) (mg/L)	2,06 (± 1,28)	4,20 (± 1,41)	5,56 (± 2,14)	4,13 (± 1,54)
Tcol (NMP)	871,00 (± 734,67)	521,54 (± 645,70)	659,67 (± 737,15)	723,64 (± 734,86)
MO (s) (g/kg)	29,67 (± 12,64)	64,20 (± 58,45)	26,79 (± 8,54)	9,23 (± 9,02)
pH (s)	4,55 (± 0,21)	5,11 (± 0,21)	5,89 (± 0,50)	5,83 (± 0,50)
P (s) (mg/kg)	17,47 (± 14,59)	42,87 (± 19,79)	20,64 (± 11,39)	13,23 (± 6,39)
K (s) (mg/kg)	72,99 (± 12,60)	58,65 (± 19,77)	51,11 (± 14,10)	21,66 (± 11,69)
Ca (s) (g/kg)	0,25 (± 0,13)	0,94 (± 0,55)	0,93 (± 0,22)	0,37 (± 0,23)
Mg (s) (mg/kg)	38,09 (± 12,04)	91,58 (± 75,34)	107,67 (± 43,66)	50,49 (± 34,33)
Al (s) (mg/kg)	52,17 (± 21,01)	17,39 (± 11,51)	10,92 (± 7,21)	10,38 (± 4,99)
S (s) (mg/kg)	4,53 (± 4,69)	10,00 (± 7,01)	7,71 (± 4,48)	5,77 (± 3,11)
B (s) (mg/kg)	0,34 (± 0,19)	0,50 (± 0,50)	0,30 (± 0,23)	0,25 (± 0,13)
Cu (s) (mg/kg)	4,83 (± 1,47)	2,27 (± 1,10)	2,63 (± 1,19)	0,91 (± 0,73)
Fe (s) (g/kg)	28,11 (± 91,02)	58,31 (± 146,88)	6,58 (± 23,44)	24,55 (± 69,03)
Mn (s) (mg/kg)	7,49 (± 3,32)	29,09 (± 12,36)	60,01 (± 17,69)	37,80 (± 25,57)
Zn (s) (mg/kg)	2,04 (± 1,79)	2,31 (± 1,50)	1,70 (± 0,88)	1,18 (± 0,50)
Argila (g/kg)	398,33 (± 49,72)	369,47 (± 69,12)	197,36 (± 162,57)	78,62 (± 63,89)
Silte(g/kg)	287,60 (± 52,28)	375,53 (± 220,46)	111,00 (± 98,81)	112,62 (± 184,50)
Areia fina (g/kg)	134,40 (± 26,45)	91,33 (± 63,06)	156,14 (± 66,39)	262,69 (± 250,42)

Areia grossa (g/kg)	180,07 (\pm 47,77)	164,20 (\pm 120,91)	517,64 (\pm 263,82)	546,15 (\pm 341,92)
------------------------	--------------------------	---------------------------	---------------------------	---------------------------

4.2. Variação temporal dos aspectos reprodutivos

Dois fenótipos de *M. amazonicum* foram constatados nos reservatórios das UHE's, por meio da avaliação das características morfológicas e reprodutivas das populações. As populações da UHE de Furnas (SJB e CRC) não apresentam morfótipos para machos e possuem animais de tamanho reduzido ($\overline{CL} = \text{♂: } 7,02 \pm 4,10$; $\text{♀: } 8,37 \pm 3,84$ mm). As populações da UHE de MMM (CAS e SBG) possuem quatro morfótipos de machos e seus representantes apresentam maiores proporções corpóreas ($\overline{CL} = \text{♂: } 10,34 \pm 1,09$; $\text{♀: } 13,52 \pm 1,49$ mm) quando comparados aos camarões do reservatório de Furnas. No presente trabalho, as populações da UHE de Furnas e MMM foram referidas como populações de pequeno e grande porte, respectivamente. Ao longo dos 15 meses de coletas foram capturadas nas populações de pequeno porte: 586 fêmeas, sendo 289 (49,32%) ovígeras em SJB, e 325 fêmeas, sendo 95 (29,23%) ovígeras em CRC; e para as populações de grande porte: 1.306 fêmeas, sendo 707 ovígeras (54,13%) em CAS, e 418 fêmeas, sendo 102 (24,40%) ovígeras em SBG. Os valores médios, mínimos e máximos das variáveis morfométricas mensuradas para as fêmeas ovígeras de todas as populações estão sumarizados na Tabela II.

As larvas não alimentadas da população de pequeno porte de *M. amazonicum* desenvolveram-se desde a eclosão da zoea I até o terceiro estágio de zoea (zoea III), momento em que todas as larvas analisadas morreram de inanição. Larvas em zoea I têm como principal característica a grande densidade de gotas lipídicas nos hepatopâncreas, as quais são consumidas ao longo de seu desenvolvimento (Figura 1).

Tabela II. Valores médios (\pm desvio padrão), mínimos (Min.) e máximos (Max.) para as variáveis morfométricas analisadas em fêmeas ovígeras de *M. amazonicum* nas populações de pequeno e grande porte, e a presença/ausência de morfótipos de machos nestas populações (Morf.). BPV: volume da câmara incubadora; CAS: Cássia; CL: comprimento de carapaça; CRC: Carmo do Rio Claro; SBG: São João Batista do Glória; SJB: São José da Barra; TL: comprimento total; W: peso fresco.

População	Variáveis	Médias (\pm Dp)	Min.	Max.	Morf.
SJB	CL (mm)	9,05 (\pm 0,89)	7,10	12,50	Ausente

(pequeno porte)	TL (mm)	31,04 (\pm 1,99)	24,10	34,90	
	BPV (mm ³)	49,08 (\pm 13,55)	14,28	90,66	
	W (g)	0,48 (\pm 0,10)	0,26	0,81	
CRC (pequeno porte)	CL (mm)	10,06 (\pm 0,94)	7,90	12,50	
	TL (mm)	34,38 (\pm 3,09)	27,20	41,50	Ausente
	BPV (mm ³)	69,98 (\pm 21,81)	32,02	165,45	
W (g)	0,69 (\pm 0,20)	0,38	1,24		
CAS (grande porte)	CL (mm)	15,89 (\pm 2,59)	9,60	25,60	
	TL (mm)	51,25 (\pm 7,15)	32,10	67,80	Presente (4 tipos)
	BPV (mm ³)	251,54 (\pm 107,73)	54,60	604,96	
W (g)	2,33 (\pm 0,95)	0,56	5,39		
SBG (grande porte)	CL (mm)	14,51 (\pm 1,85)	10,70	19,60	
	TL (mm)	48,36 (\pm 5,70)	32,20	62,30	Presente (4 tipos)
	BPV (mm ³)	235,24 (\pm 92,33)	81,03	517,85	
W (g)	2,06 (\pm 0,76)	0,81	4,48		

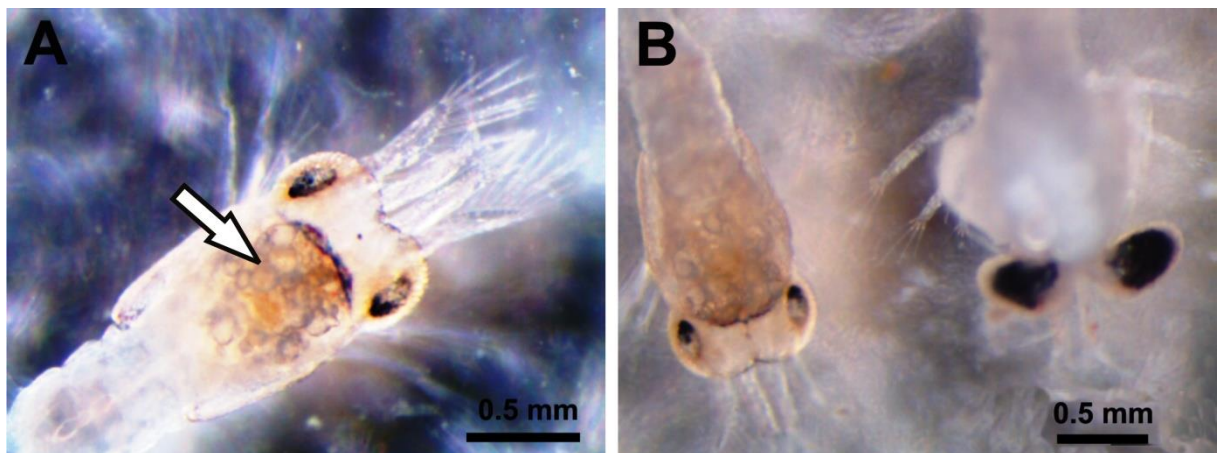


Figura 1. A. Larva de *M. amazonicum* de uma população hololimnética de pequeno porte em estágio de zoea I. Note a presença de várias gotas lipídicas (seta branca) em seu cefalotórax. **B.** Zoea I (esquerda) e II (direita) nas populações hololimnéticas de pequeno porte.

As frequências de fêmeas ovíferas entre os fenótipos de pequeno e grande porte e entre as populações não mostraram um padrão de similaridade no decorrer do estudo (Figura 2). As fêmeas ovíferas apresentaram diferenças na frequência de ocorrência entre as populações ($F = 5,12$; $p: 0,01$) e as estações ($F = 0,89$; $p: 0,02$), assim como entre as fases de desenvolvimento embrionário ao longo do tempo ($F = 28,70$; $p < 0,001$). Fêmeas com ovos em estágio inicial predominaram ao longo das estações (exceto no verão em SJB), com os maiores picos de reprodução na segunda primavera (Figura 2). Apesar de não significativo, notou-se a tendência no

aumento da frequência de fêmeas ovígeras nas estações onde os níveis pluviométricos eram menores e os tamanhos da coluna d'água estavam maiores (SJB = $r: -0,17$ e $0,59$ - $p: 0,78$ e $0,29$; CAS = $r: -0,52$ e $0,67$ - $p: 0,37$ e $0,22$; SBG = $r: -0,23$ e $0,48$ - $p: 0,70$ e $0,40$), exceto para a população de CRC ($r: 0,62$ e $-0,24$ - $p: 0,26$ e $0,69$) onde esta tendência foi inversa. A frequência relativa acumulada para a taxa de aborto foi de 1% (N: 3) para SJB, 14% em CAS (N: 98), e 5% para as populações de SBG (N: 5) e CRC (N: 5). Somente na população de CAS notou-se uma tendência no aumento da taxa de aborto com a elevação da temperatura e pluviosidade ($r: 0,40$ e $0,37$ - $p: 0,51$ e $0,54$), sendo o decréscimo desta taxa observado com o aumento da coluna de água ($r: -0,54$ - $p: 0,35$) (Figura 2).

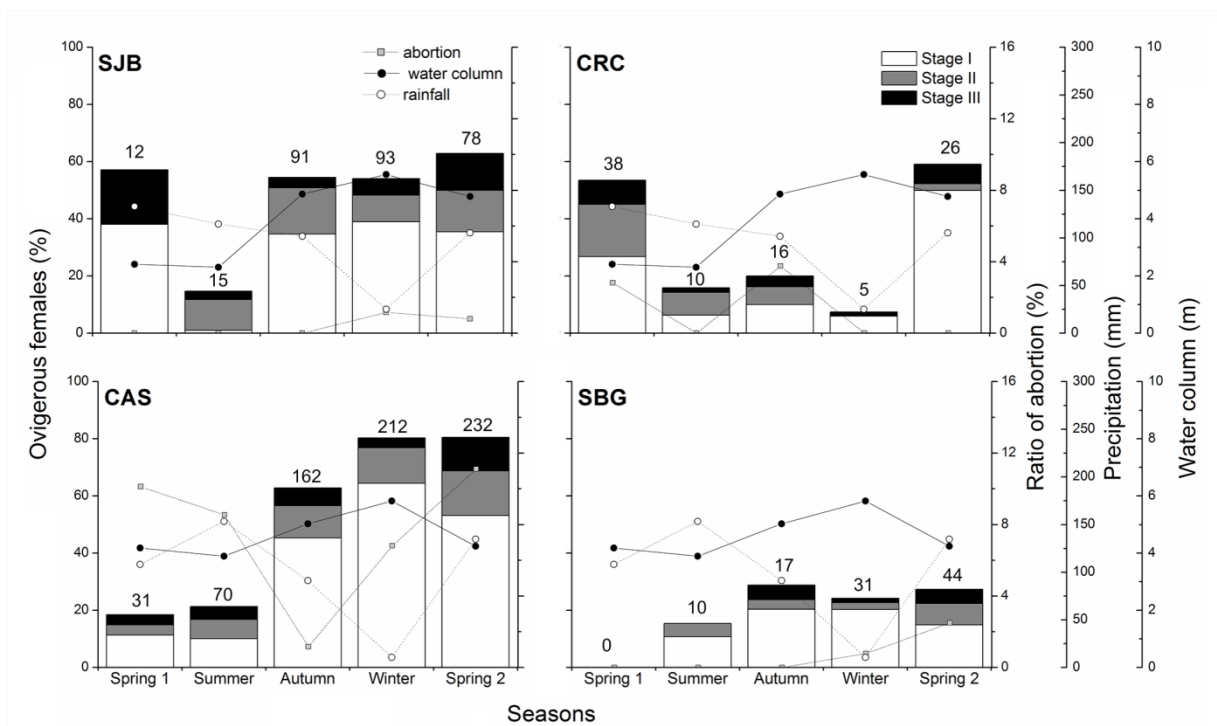


Figura 2. Variações na frequência relativa de fêmeas ovígeras em diferentes estágios de desenvolvimento embrionário para populações de pequeno (SJB e CRC) e grande porte (CAS e SBG) de *M. amazonicum*, ao longo das estações durante Outubro de 2014 a Dezembro de 2015. As linhas representam os valores de aborto, precipitação acumulada e nível da coluna de água para cada estação. Valores em negrito correspondem ao número total de fêmeas ovígeras capturadas. CAS: Cássia; CRC: Carmo do Rio Claro; SBG: São João Batista do Glória; SJB: São José da Barra.

Quando analisadas por reservatórios, as populações de *M. amazonicum* com diferentes fenótipos não apresentaram diferenças significativas na proporção de

fêmeas ovígeras em sua composição ($F = 0,008$; $p: 0,93$). Fêmeas com ovos em estágios iniciais predominaram em todas as estações, com picos reprodutivos na segunda primavera para populações de pequeno porte, e no inverno e na segunda primavera para as fêmeas de grande porte (Figura 3). Em ambos os reservatórios houve uma tendência no aumento da frequência de fêmeas ovígeras com o decréscimo da pluviosidade (Furnas = $r: -0,14$ - $p: 0,81$; MMM = $r: -0,52$ - $p: 0,36$) e a elevação nos níveis da coluna água (Furnas: $r = 0,10$ - $p: 0,87$; MMM: $r = 0,69$ - $p: 0,20$) (Figura 3).

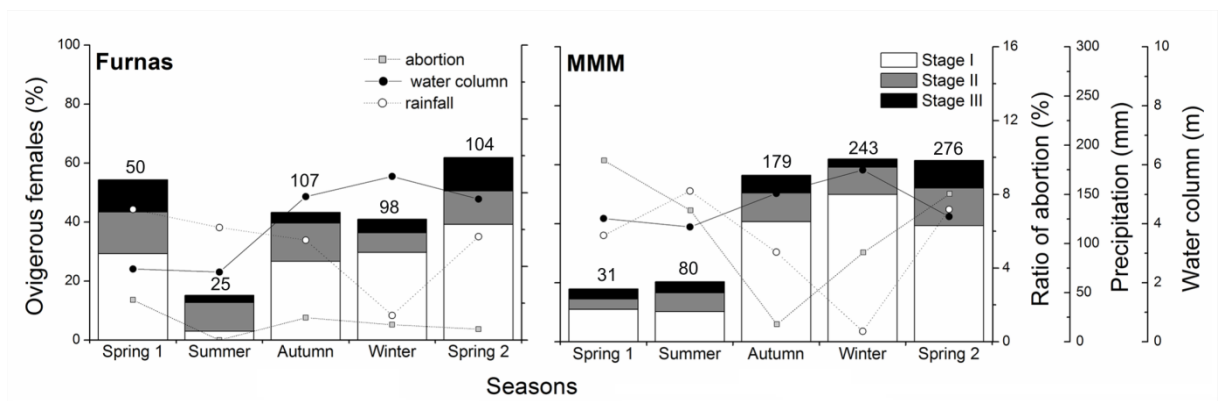


Figura 3. Variações na frequência relativa de fêmeas ovígeras de *M. amazonicum* em diferentes estágios de desenvolvimento embrionário para as populações agrupadas das UHE's de Furnas e Marechal Mascarenhas de Moraes (MMM), ao longo das estações durante Outubro de 2014 a Dezembro de 2015. As linhas representam os valores de aborto, precipitação acumulada e nível da coluna de água para cada estação. Valores em negrito correspondem ao número total de fêmeas ovígeras capturadas.

A fecundidade média das populações de pequeno porte foi de 141 ± 63 ovos em SJB e de 219 ± 87 ovos em CRC, enquanto que para as populações de grande porte foi de 814 ± 432 ovos em CAS e de 846 ± 390 ovos para SBG. A postura em fêmeas de pequeno porte é reduzida quando comparada a animais de grande porte, apresentando diferenças significativas nos números absolutos de ovos entre as populações ($F = 10,20$ - $p: 0,001$). A fecundidade nas populações de *M. amazonicum* não apresentou diferenças ao longo das estações do ano ($F = 1,55$ - $p: 0,25$) (Figura 4). Em populações de pequeno porte a fecundidade tende a diminuir com o aumento do nível da coluna de água (SJB = $r: -0,81$ - $p: 0,09$; e CRC = $r: -0,11$ - $p: 0,86$) e aumentar com o acréscimo dos níveis de pluviosidade (SJB = $r: 0,71$ - $p: 0,17$; e CRC = $r: 0,61$ - $p: 0,26$). As populações de grande porte apresentaram padrão

inverso, aumentando a fecundidade quando os níveis de água eram maiores (CAS = $r: 0,75 - p: 0,14$; e SBG = $r: 0,26 - p: 0,67$) e diminuindo com o acréscimo dos níveis de pluviosidade (CAS: $r = - 0,57 - p: 0,31$; e SBG: $r = - 0,03 - p: 0,95$) (Figura 4).

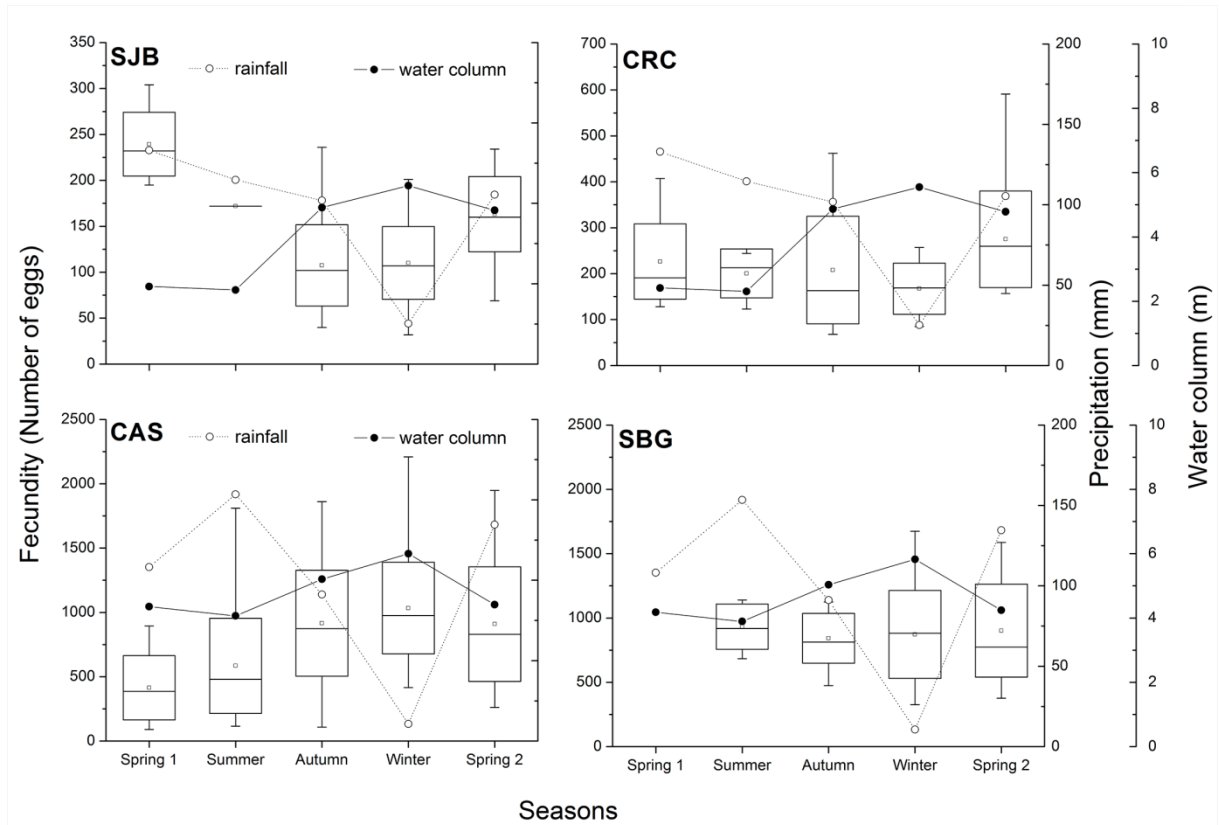


Figura 4. Valores mínimos, máximos (suíças), médias (quadrados) e desvio padrão (caixas) da fecundidade nas populações de pequeno (SJB e CRC) e grande porte (CAS e SBG) de *M. amazonicum*, ao longo das estações durante Outubro de 2014 a Dezembro de 2015. Os valores de precipitação acumulada e nível da coluna de água para cada estação estão representados pelas linhas. CAS: Cássia; CRC: Carmo do Rio Claro; SBG: São João Batista do Glória; SJB: São José da Barra.

4.3. “El niño” e a reprodução

As fêmeas ovígeras das populações não apresentaram um padrão constante de frequência de ocorrência entre as distintas fases do fenômeno “El niño” (Figura 5). Não foram estabelecidas diferenças significativas para a frequência de ovígeras para os pontos de coletas ($F = 3,54 - p: 0,06$) e ao longo dos anos ($F = 3,70 - p: 0,06$) do evento climático. Pode-se observar que ovígeras de pequeno porte foram

mais abundantes no início da “La niña, enquanto que ovígeras de grande porte foram mais frequentes durante o ápice do “El niño” (Figura 5).

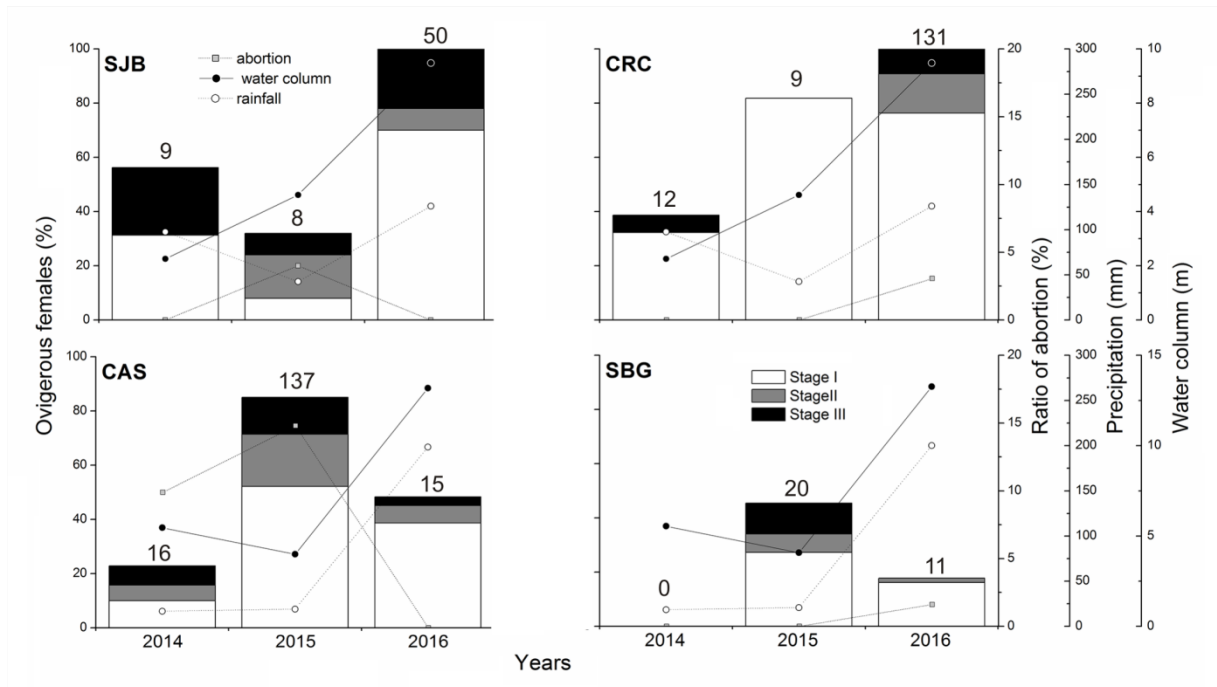


Figura 5. Variações na frequência relativa de fêmeas ovígeras em diferentes estágios de desenvolvimento embrionário nas populações de pequeno (SJB e CRC) e grande porte (CAS e SBG) de *M. amazonicum*, para o mês de Outubro nos anos de 2014 a 2016. As linhas representam os valores de aborto, precipitação acumulada e nível da coluna de água. Valores em negrito correspondem ao número total de fêmeas ovígeras capturadas. CAS: Cássia; CRC: Carmo do Rio Claro; SBG: São João Batista do Glória; SJB: São José da Barra.

A amplitude e os valores médios de fecundidade das populações também não apresentaram um padrão constante nos pontos de coletas (Figura 6). Não foram constatadas diferenças significativas para as médias entre os pontos ($F = 2,31 - p: 0,18$), assim como entre os anos de coletas ($F = 1,25 - p: 0,35$). Em populações de grande porte, a fecundidade média e sua amplitude foram maiores durante o ápice do “El niño”, decrescendo no início da “La niña”. Por outro lado, populações de pequeno porte não possuíram um padrão comum, com fêmeas de SJB mostrando menores valores de fecundidade no ápice do “El niño”, enquanto que em CRC a fecundidade apresentou um padrão de decréscimo linear ao longo do fenômeno (Figura 6).

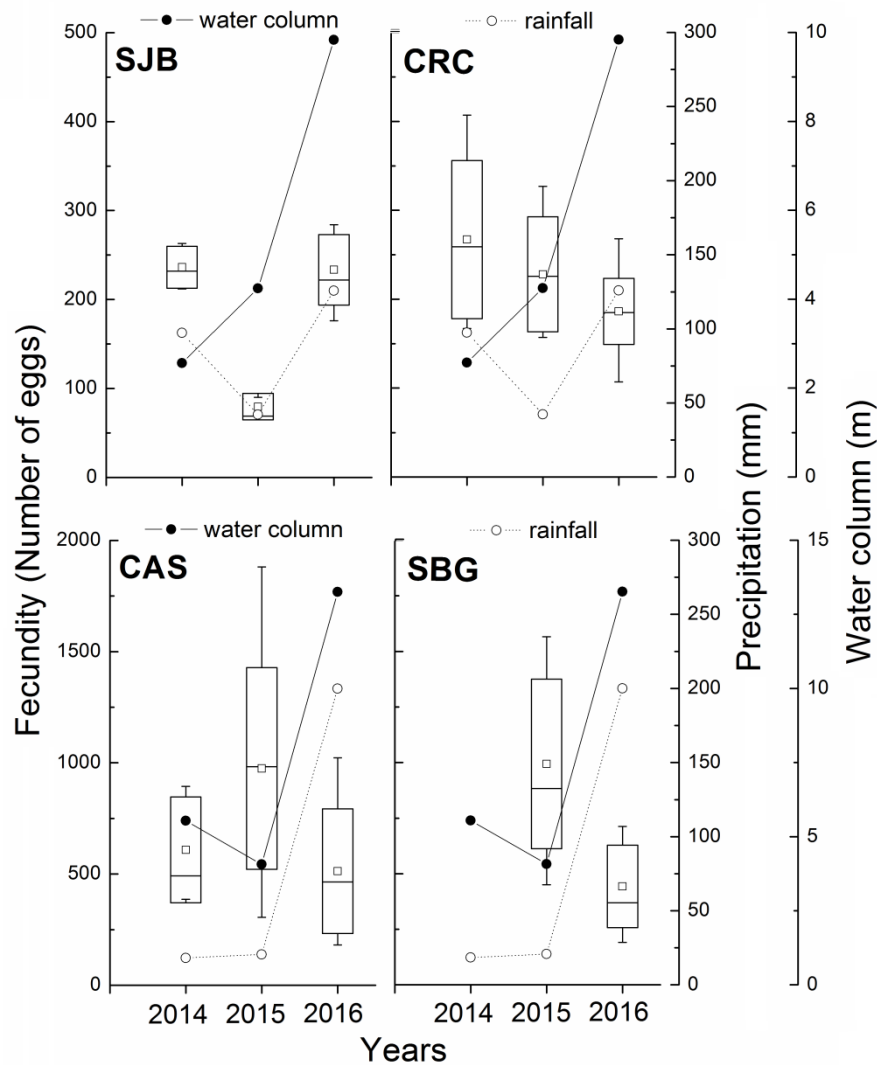


Figura 6. Valores mínimos, máximos (suíças), médias (quadrados) e desvio padrão (caixas) da fecundidade nas populações de pequeno (SJB e CRC) e grande porte (CAS e SBG) de *M. amazonicum*, para o mês de Outubro nos anos de 2014 a 2016. As linhas representam os valores de precipitação acumulada e nível da coluna de água. CAS: Cássia; CRC: Carmo do Rio Claro; SBG: São João Batista do Glória; SJB: São José da Barra.

4.4. Fatores intrínsecos e extrínsecos que influenciam a reprodução

Em fêmeas de pequeno porte, a massa de ovos comumente ultrapassava o limite das pleuras abdominais, enquanto que para fêmeas de grande porte este padrão foi pouco observado. As relações entre a fecundidade e os dados morfométricos mensurados em fêmeas ovígeras mostraram que a fecundidade aumenta à medida que as fêmeas crescem, apresentando alometria positiva para

todas as porções corporais mensuradas (Tabela III). A relação com a melhor explicação para os padrões de fecundidade em *M. amazonicum* foi fecundidade vs. volume da câmara incubadora, mostrando que na população de pequeno porte de SJB o número de ovos variou de 32 a 304, enquanto que em CRC foi de 68 a 591 ovos. Em CAS, as fêmeas de grande porte apresentaram entre 90 a 2.209 ovos e em SBG possuíam entre 191 a 2.406 ovos (Figura 7).

Tabela III. Relações entre a fecundidade (Fec) e dados morfométricos em fêmeas ovígeras de *M. amazonicum* das populações de pequeno e grande porte. A: alometria; BPV: volume da câmara incubadora; CAS: Cássia; CL: comprimento de carapaça; CRC: Carmo do Rio Claro; r^2 : coeficiente de correlação; SBG: São João Batista do Glória; SJB: São José da Barra; TL: comprimento total; W: peso fresco. * Estatisticamente significativa a $p < 0,05$.

População	Variáveis	Regressão linear	r^2	t (b = 1 ou 3)	A
SJB (pequeno porte) (N: 129)	CL (mm)	CL: 40,51*Fec - 220,40	0,27	10,05*	+
	TL (mm)	TL: 16,43*Fec - 365,20	0,27	4,01*	+
	BPV (mm ³)	BPV: 3,523*Fec - 24,58	0,52	0,67*	+
	W (g)	W: 392,4*Fec - 42,47	0,43	87,78*	+
CRC (pequeno porte) (N: 73)	CL (mm)	CL: 49,28*Fec - 291,60	0,22	9,87*	+
	TL (mm)	TL: 14,02*Fec - 275,50	0,24	2,69*	+
	BPV (mm ³)	BPV: 3,29*Fec - 29,32	0,49	0,41*	+
	W (g)	W: 224,00*Fec + 50,00	0,26	42,69*	+
CAS (grande porte) (N: 199)	CL (mm)	CL: 116,1*Fec - 1036	0,47	32,63*	+
	TL (mm)	TL: 40,96*Fec - 1282	0,48	11,35*	+
	BPV (mm ³)	BPV: 3,056*Fec + 38,10	0,63	0,71*	+
	W (g)	W: 319,4*Fec + 67,06	0,52	89,55*	+
SBG (grande porte) (N: 87)	CL (mm)	CL: 136,2*Fec - 1143	0,44	25,08*	+
	TL (mm)	TL: 41,36*Fec - 1151	0,35	7,86*	+
	BPV (mm ³)	BPV: 3,15*Fec + 111,6	0,50	0,49*	+
	W (g)	W: 327,5*Fec + 176,3	0,38	61,60*	+

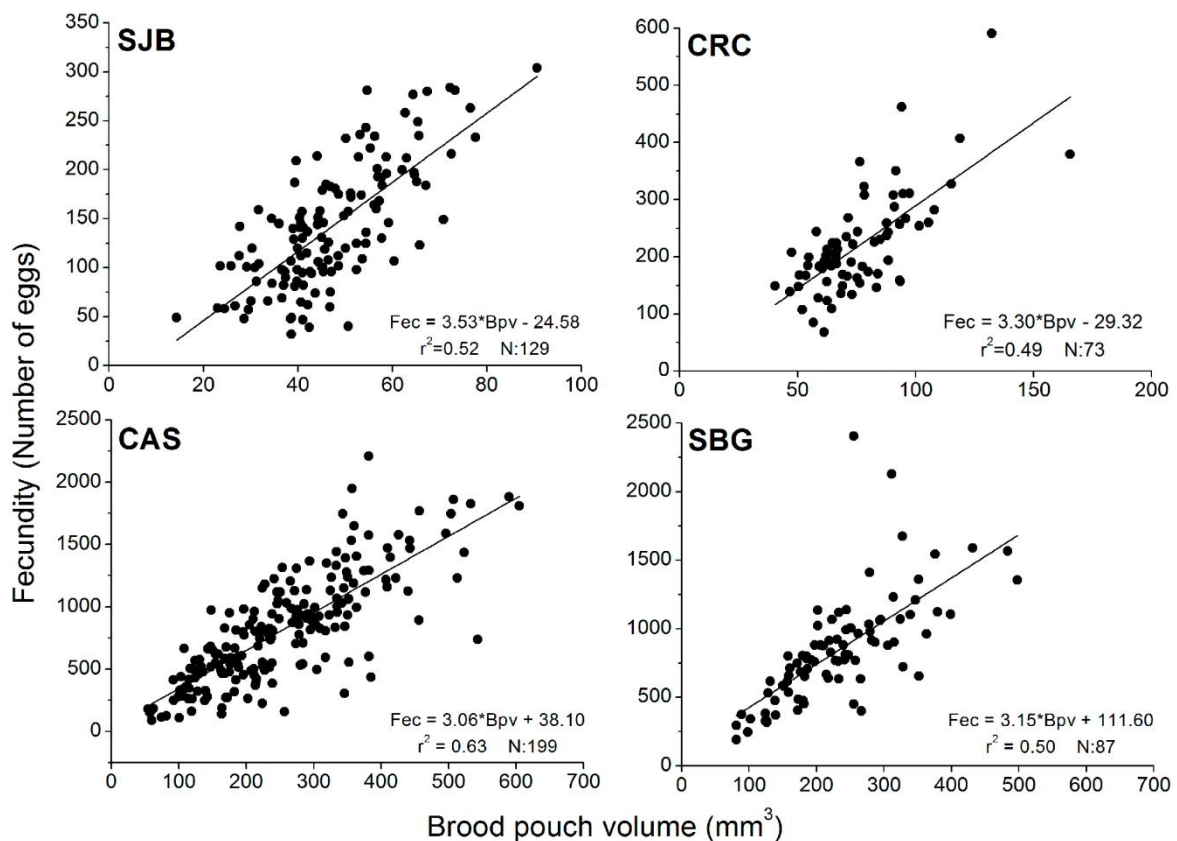


Figura 7. Dispersão dos pontos para a relação fecundidade vs. volume da câmara incubadora em fêmeas ovígeras nas populações de pequeno (SJB e CRC) e grande porte (CAS e SBG) de *M. amazonicum*. CAS: Cássia; CRC: Carmo do Rio Claro; SBG: São João Batista do Glória; SJB: São José da Barra.

Houve perda de ovos entre os estágios embrionários, independente do porte da população (Tabela IV). As populações de SJB e SBG mostraram valores discretos de perda de ovos entre os três estágios embrionários (KW = 2,02 - p : 0,36; KW = 1,62 - p : 0,49; respectivamente), enquanto que as perdas entre os estágios I e II foram significativamente maiores nas populações CRC e CAS (KW = 16,57 - p < 0,001; KW = 19,01 - p < 0,001; respectivamente).

O investimento reprodutivo em peso seco (ROd) e úmido (ROw) não variaram entre as diferentes populações ou em relação ao porte destas (Tabela IV). O ROd's para as populações de pequeno porte foram 11 e 15% (CRC e SJB, respectivamente) e de grande porte foram 13 e 15% (CAS e SBG, respectivamente). Tais valores de ROd decresceram ao longo do desenvolvimento embrionário em todas as populações (F = 25,08 - p : 0,001). Foram constatados diferenças entre o

ROd e ROw para as populações ($F = 22,97 - p: 0,02$) e ao longo do desenvolvimento embrionário ($F = 17,13 - p: 0,003$).

Os tamanhos dos eixos e o volume dos ovos aumentaram significativamente ao longo do desenvolvimento embrionário em todas as populações (Tabela IV). Os embriões das populações de pequeno porte CRC e SJB apresentaram um crescimento de 26 e 36% em volume, respectivamente, do estágio II para o III, enquanto que os embriões das populações de grande porte cresceram 11 e 21% (CAS e SBG, respectivamente). Assim, ovos ao final do desenvolvimento apresentam maiores dimensões quando comparados aos demais estágios (CRC: $KW = 86,56 - p < 0,001$; SJB: $KW = 177,75 - p < 0,001$; CAS: $KW = 135,45 - p < 0,001$; SBG: $KW = 175,92 - p < 0,001$; respectivamente).

A CCA mostrou a importância das frações granulométricas, alguns elementos químicos no sedimento (Cu, Fe, Zn, K e Mn), pH, precipitação acumulada e o nível da coluna de água para a ordenação de padrões de distribuição de fêmeas ovígeras nas populações de *M. amazonicum* (Tabela V). Em termos de uso específico de habitats, as populações de pequeno porte (SJB e CRC) estavam associadas a áreas mais profundas com menor pH e sedimento fino (argila e silte) com maiores teores de alguns elementos químicos (Cu, Fe, Zn e K). Tais áreas sofrem menor influência da precipitação e variação da coluna de água. Enquanto que as populações de grande porte (CAS e SBG) foram associadas a ambientes rasos de sedimento arenoso com grande influência de precipitação e variação da coluna d'água (Figura 8). Tal resultado é coincidente com as diferenças observadas entre as coletas ativas e passivas. Em populações de pequeno porte a coleta ativa foi mais efetiva (captura ativa e passiva: 90 e 10 % em CRC, e 85 e 15 % em SJB), uma vez que as fêmeas ovígeras estavam associadas à macrófitas e vegetação marginal em áreas mais profundas (> 1,15 m). Por outro lado, a coleta passiva mostrou melhores resultados para obtenção de fêmeas ovígeras de grande porte que utilizavam áreas rasas (< 1 m) próximas a margem (captura ativa e passiva: 5 e 95 % em CAS, e 60 e 40 % em SBG).

Tabela IV. Valores médios (\pm desvio padrão) para o número de ovos por estágio (O/E), investimento reprodutivo úmido (ROw) e seco (ROd), eixos maiores e menores e volume de ovos para fêmeas ovígeras de *M. amazonicum* em diferentes estágios de desenvolvimento embrionário (I a III) (N: 20) nas populações de pequeno e grande porte. CAS: Cássia; CRC: Carmo do Rio Claro; SBG: São João Batista do Glória; SJB: São José da Barra. Letras diferentes indicam diferenças significativas em comparação por pares dentro de cada população.

População	Estágios	O/E	ROw (%)	ROd (%)	Eixo maior (mm)	Eixo menor (mm)	Volume (mm ³)
SJB (pequeno porte)	I	176 (\pm 68) ^a	9,06 (\pm 2,41) ^a	15,51 (\pm 5,19) ^a	0,774 (\pm 0,051) ^a	0,594 (\pm 0,052) ^a	0,188 (\pm 0,035) ^a
	II	150 (\pm 47) ^a	9,14 (\pm 2,68) ^a	11,34 (\pm 2,64) ^a	0,857 (\pm 0,053) ^b	0,633 (\pm 0,069) ^b	0,246 (\pm 0,052) ^b
	III	141 (\pm 51) ^a	9,91 (\pm 3,55) ^a	7,13 (\pm 2,43) ^b	1,029 (\pm 0,082) ^c	0,680 (\pm 0,078) ^c	0,383 (\pm 0,092) ^c
CRC (pequeno porte)	I	214 (\pm 67) ^a	7,71 (\pm 2,59) ^a	11,34 (\pm 4,38) ^a	0,792 (\pm 0,053) ^a	0,638 (\pm 0,066) ^a	0,212 (\pm 0,041) ^a
	II	157 (\pm 79) ^b	8,29 (\pm 3,79) ^a	8,34 (\pm 3,20) ^b	0,829 (\pm 0,049) ^b	0,606 (\pm 0,049) ^b	0,219 (\pm 0,032) ^a
	III	117 (\pm 57) ^b	7,43 (\pm 2,94) ^a	6,54 (\pm 2,12) ^b	0,958 (\pm 0,093) ^c	0,602 (\pm 0,053) ^b	0,294 (\pm 0,078) ^b
CAS (grande porte)	I	1.063 (\pm 501) ^a	9,87 (\pm 3,28) ^a	12,79 (\pm 4,02) ^a	0,697 (\pm 0,043) ^a	0,558 (\pm 0,047) ^a	0,143 (\pm 0,023) ^a
	II	575 (\pm 148) ^b	7,63 (\pm 2,96) ^b	9,71 (\pm 4,81) ^b	0,760 (\pm 0,065) ^b	0,556 (\pm 0,046) ^a	0,170 (\pm 0,033) ^b
	III	442 (\pm 158) ^b	6,45 (\pm 2,72) ^b	7,00 (\pm 3,39) ^c	0,833 (\pm 0,062) ^c	0,588 (\pm 0,049) ^b	0,215 (\pm 0,039) ^c
SBG (grande porte)	I	884 (\pm 451) ^a	10,06 (\pm 2,34) ^a	14,90 (\pm 4,27) ^a	0,677 (\pm 0,044) ^a	0,537 (\pm 0,038) ^a	0,130 (\pm 0,021) ^a
	II	787 (\pm 416) ^a	11,38 (\pm 3,47) ^a	12,53 (\pm 3,65) ^a	0,824 (\pm 0,055) ^b	0,590 (\pm 0,068) ^b	0,212 (\pm 0,048) ^b
	III	675 (\pm 220) ^a	11,56 (\pm 3,21) ^a	8,50 (\pm 2,76) ^b	0,859 (\pm 0,052) ^c	0,613 (\pm 0,054) ^b	0,238 (\pm 0,040) ^c

Tabela V. Valores obtidos para a análise de correspondência canônica (CCA) e o coeficiente de correlação (r^2) para as variáveis limnológicas (descritores) dos pontos de coleta amostrados nas UHE's Marechal Mascarenhas de Moraes e Furnas (Minas Gerais, sudeste do Brasil), e a significância das correlações obtidas por meio da função ENVFIT (999 permutações). Variáveis em negrito (estatisticamente significantes a $p < 0,05$) foram utilizadas para gerar a Figura 8. (a): água; (s): sedimento; Al: alumínio; B: boro; Ca: cálcio; Cond.: condutividade; Cu: cobre; Fe: ferro; K: potássio; Mg: magnésio; Mn: manganês; MO: matéria orgânica; N: nitrogênio total; Na: sódio; OD: oxigênio dissolvido; P: fósforo total; Precip.: precipitação acumulada; S: enxofre; Tcol: coliformes totais; Zn: zinco.

Variáveis limnológicas	Eixo 1	Eixo 2	r^2	(Pr)
Alcalinidade	-0,54	-0,84	0,52	0,09
Dureza	-0,38	-0,92	0,42	0,09
pH (a)	0,96	0,29	1,00	0,01
OD	0,62	0,79	0,59	0,09
Cond.	-0,27	-0,96	0,37	0,10
MO (a)	-0,75	-0,66	0,75	0,08
Temperatura(a)	0,54	0,84	0,52	0,09
N (a)	-0,07	1,00	0,29	0,10
P (a)	-0,73	-0,68	0,72	0,08
Profundidade	-0,97	-0,24	0,98	0,02
Ca (a)	-0,56	-0,83	0,53	0,09
Mg (a)	-0,01	-1,00	0,30	0,10
Fe (a)	-0,84	-0,54	0,89	0,04
K (a)	-0,67	-0,74	0,65	0,08
Na (a)	0,89	-0,46	0,40	0,10
Tcol	0,35	0,93	0,41	0,09
MO (s)	-0,75	-0,66	0,75	0,08
pH (s)	0,95	0,31	1,00	0,01
P (s)	-0,69	-0,73	0,66	0,08
K (s)	-0,92	-0,39	0,99	0,02
Ca (s)	-0,57	-0,82	0,54	0,09
Mg (s)	-0,53	-0,85	0,52	0,09
Al (s)	-1,00	0,10	0,68	0,06
S (s)	-0,54	-0,84	0,52	0,09
B (s)	-0,75	-0,66	0,74	0,08
Cu (s)	-0,99	-0,13	0,91	0,04
Fe (s)	-0,68	-0,74	0,65	0,08
Mn (s)	1,00	0,07	0,84	0,04
Zn (s)	-0,84	-0,55	0,88	0,04
Argila	-0,89	-0,46	0,95	0,03
Silte	-0,82	-0,58	0,85	0,04
Areia fina	0,83	0,55	0,87	0,04
Areia grossa	0,87	0,50	0,93	0,04

Precip.	0,77	-0,64	0,99	0,03
Coluna de água	0,77	-0,64	0,99	0,03
Explicação acumulada	64,10 %	29,09%		

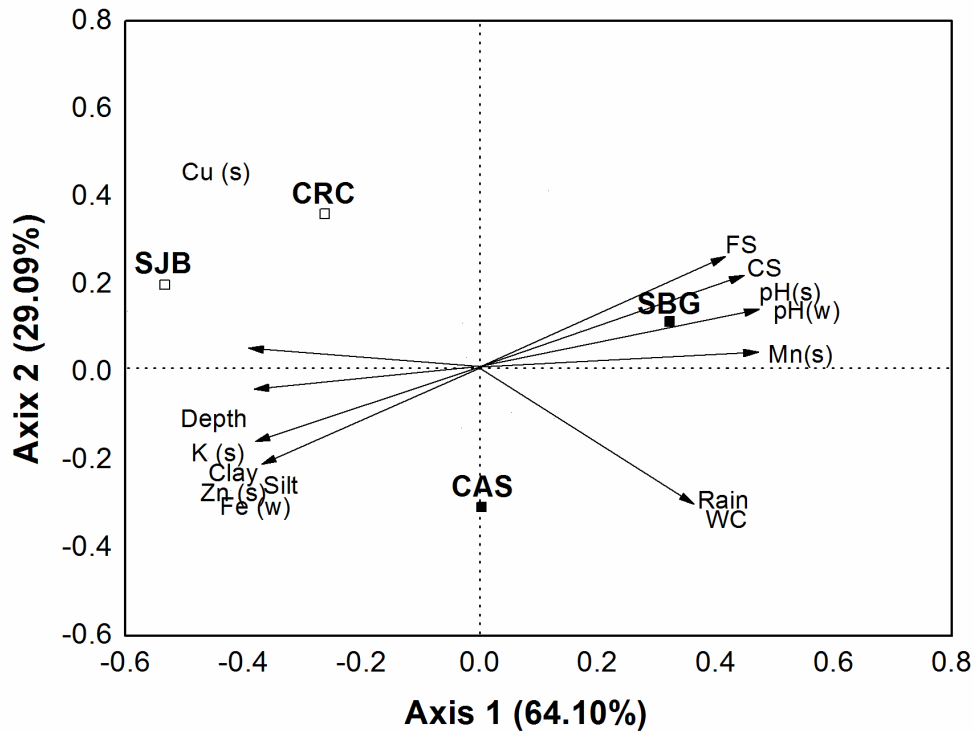


Figura 8. Diagrama de ordenação canônica baseada nos dados de fêmeas ovígeras de *M. amazonicum* entre as populações de pequeno (quadrados brancos) e grande porte (quadrados pretos) e as variáveis limnológicas (setas) ao longo de Outubro de 2014 a Dezembro de 2015 nos reservatórios das UHE's de Furnas e Marechal Mascarenhas de Moraes. (a): água; (s): sedimento; CAS: Cássia; CRC: Carmo do Rio Claro; CS: areia grossa; Cu: cobre; Fe: Ferro; FS: areia fina; K: potássio; Mn: manganês; Rain: precipitação acumulada; SBG: São João Batista do Glória; SJB: São José da Barra; WC: nível de coluna água; Zn: zinco.

5. Discussão

As populações de *M. amazonicum* nos reservatórios neotropicais analisados apresentaram reprodução contínua. A postura em fêmeas de grande porte é muito maior quando comparada a animais de pequeno porte, e tais diferenças não são moduladas por aspectos hidrogeográficos e parâmetros limnológicos das áreas de coletas. A variabilidade nos padrões da biologia reprodutiva das populações pode ser explicada pelas estratégias de acasalamento e reprodução observadas nos

fenótipos. Pela classificação de Correa e Thiel (2003) para carídeos, as populações de grande porte apresentam o padrão de dominância de territórios, enquanto que em populações de pequeno porte é de busca ativa. Em populações de grande porte, machos com morfótipos dominantes possuem quelípodos hipertrofiados, com a função de proteger e guardar as fêmeas no período de cópula. O desenvolvimento de quelípodos robustos nestes animais modula o início da maturidade funcional neste fenótipo (entre 14,40 a 15,20 mm de CL) que é tardia quando comparada a machos de populações de pequeno porte sem morfótipos (entre 3,70 a 4,00 mm de CL) (PASCHOAL, 2017 – Capítulo 2). Geralmente, fêmeas de camarões carídeos produzem gametas de forma diretamente proporcional ao seu tamanho corporal, assim é esperado que fêmeas de maior porte possuam maior fecundidade e que sua maturidade seja alcançada próxima a dos machos (BAUER, 2004), o que poderia explicar a maior fecundidade em fêmeas de grande porte de *M. amazonicum*. Somado a isso, a homogeneidade ambiental entre as UHE's mostra que a viabilidade de recursos nutricionais nas áreas de coletas é similar entre os reservatórios, assim os fatores intrínsecos (i.e. caracteres genéticos) explicariam melhor a variabilidade dos quesitos reprodutivos analisados na espécie.

Macrobrachium amazonicum apresenta padrão temporal de reprodução similar entre as populações, com picos de reprodução na primavera. Além disso, populações da espécie mostraram que não foram diretamente afetadas pelo fenômeno “El niño”. Comumente, os picos reprodutivos de carídeos tropicais são observados no verão ou inverno, com várias espécies do gênero *Macrobrachium* e *Palaemon* Weber, 1795 apresentando picos nestas estações, como levantado por Paschoal et al. (2016). Como os aspectos reprodutivos de *M. amazonicum* variam em função das flutuações dos níveis de água nos ambientes aquáticos e da quantidade de chuva nestas áreas (ODINETZ-COLLART, 1991), e estas características físicas são fortemente relacionadas às anomalias do “El niño” (GRIMM, 2003), é provável que na segunda primavera, estação onde houve a retomada das chuvas e aumento dos níveis de água, os ambientes aquáticos estivessem mais estáveis e que tenha sido o momento mais favorável para o aparecimento de fêmeas ovígeras nas populações aqui estudadas. O “El niño” no biênio 2014-2016 foi tão intenso quanto aquele registrado para 1997-1998, sendo considerado o mais poderoso registrado na história (CPTEC/INPE, 2017; NWS/NOAA, 2017). Nos reservatórios analisados, o “El niño” atuou como um fator

estressante, pois modificou os padrões de flutuações dos níveis da coluna água e pluviosidade registrados na última década (PASCHOAL et al., 2015; Figura 2 - pg. 137 para revisão). As flutuações dos níveis da coluna de água em ambientes lênticos são responsáveis por modificar o cenário ambiental de comunidades e populações bentônicas em zonas litorâneas, pois produzem gradientes espaciais de recursos, profundidades e de distribuição de espécies. Além disso, promovem mudanças físico-químicas na água e alteram a composição do substrato, o que influencia diretamente o sucesso de colonização e estabilização de populações (KASTER e JACOBI, 1978; PASCHOAL et al., 2015; KEITEL et al., 2016; EVTIMOVA e DONOHUE, 2016; TORRES et al., 2016). Os últimos autores demonstraram que o fenômeno “La niña” foi responsável por criar um estresse adicional em populações de camarões palaemonídeos em ambientes lênticos naturais, uma vez que esse evento foi responsável por afetar o regime hidrológico, alterando as flutuações dos níveis de água e de conectividade de lagos e, conseqüentemente, na dinâmica populacional das espécies afetadas (TORRES et al., 2016).

As populações de *M. amazonicum* estudadas mostraram grande variabilidade nas taxas de fecundidade e de tamanho e volume de ovos. As fêmeas ovígeras de pequeno porte apresentaram valores similares de fecundidade e tamanhos (eixos) de ovos próximos a de outras populações continentais da Bacia do Paraná e Paraguai, enquanto que as ovígeras de grande porte apresentaram valores de fecundidade dentro da margem registrada para populações costeiras ou de origem amazônica (HAYD e ANGER, 2013; Tabela 3 - pg. 48 para revisão). Nossos resultados mostraram que os pressupostos iniciais propostos para a espécie, como a diminuição da fecundidade (MACIEL e VALENTI, 2009; Figura 5 - pg. 68 para revisão) e o aumento do volume de ovos (ODINETZ-COLLART e RABELO, 1996) à medida que se aumenta a distância do oceano Atlântico, não são totalmente válidos e que a espécie é uma exceção ao processo evolutivo de “dulcificação” proposto por Jalihal et al. (1993). Estes autores sugeriram que camarões hololimnéticos que incubam poucos ovos dão origem a larvas com poucos estágios de desenvolvimento (i.e. desenvolvimento abreviado: 1 a 3 estágios), enquanto que fêmeas com grande número de ovos geram larvas com muitos estágios (i.e. desenvolvimento prolongado: > 8 estágios). No entanto, larvas de camarões de *M. amazonicum* do fenótipo de pequeno porte, possuem aspectos anatômicos idênticos a larvas de

animais anfídromos (ANGER e HAYD, 2009; Figura 1 - pg. 22) e de outras populações continentais (ANGER e HAYD, 2010; Figura 1 - pg. 255). Isso indica que apresentam desenvolvimento prolongado e que o número de fases é igual entre estas populações, apesar das diferenças significativas no tamanho da postura e dos ovos das populações e fenótipos da espécie.

Apesar da grande variabilidade reprodutiva, as taxas de investimento reprodutivo úmidos (ROw) e secos (ROd) foram similares entre os fenótipos analisados. Os valores registrados para ROw e ROd nas populações hololimnéticas do presente estudo são superiores daqueles registrados por Meireles et al. (2013) em populações anfídromas da espécie (7,8 e 10,3%, respectivamente). Paschoal et al. (2016, Tabela 4 - pg. 8 para revisão) verificaram que os maiores valores de RO em palemonídeos são registrados em espécies continentais com menor quantidade de ovos com maiores volumes, o que explicaria os maiores valores de RO para os fenótipos hololimnéticos de *M. amazonicum* analisados neste estudo. Pode-se observar que o ROw tende a subestimar valores médios de investimento reprodutivo quando comparados ao ROd, e que valores de ROd decrescem ao longo do desenvolvimento embrionário em todas as populações. Anger e Moreira (1998) sugeriram que o uso do ROd evita problemas em animais que possuem grande quantidade de água em seu corpo e ovos. Além disso, a aplicação deste índice deve ser realizada apenas em ovos em estágio inicial de desenvolvimento embrionário, uma vez que a quantidade de água no ovo aumenta consideravelmente à medida que o embrião cresce e consome seu vitelo (HERRING, 1974).

Fêmeas ovígeras de *M. amazonicum* exibiram diferenças quanto à especificidade de uso de habitats entre os diferentes fenótipos analisados. As fêmeas ovígeras das populações de pequeno porte comumente foram capturadas junto à macrófitas de ambientes mais profundos compostos por sedimento do tipo argilo-siltoso com maiores teores de cobre, ferro e zinco. Isso estaria ligado ao fato de que fêmeas ovígeras de carídeos de pequeno porte utilizam macrófitas como abrigo e berçário (PASCHOAL et al., 2013). Adicionalmente, as cargas de nutrientes e metais são maiores em sedimento com frações finas (i.e. argila e silte) do que em sedimentos arenosos, devido a maior taxa de retenção em sedimento finos (RELYEA et al., 2000), o que facilitaria o acesso e a incorporação destes metais para o funcionamento fisiológico da hemocianina nesses animais (ABDENNOUR, 1997; BOUBONARI et al., 2009). Por outro lado, as fêmeas ovígeras de grande

porte foram mais frequentes em áreas com sedimento arenoso, próximas as margens. As áreas litorâneas eram fortemente alteradas pela variação da precipitação e do nível da coluna de água do reservatório ao longo do tempo, no entanto eram os locais onde ocorriam o pareamento de casais e as cópulas deste fenótipo, nas quais os machos protegiam e guardavam as fêmeas em seus territórios (PASCHOAL, 2017 – Capítulo 2). É possível que a maior ocorrência de fêmeas ovígeras nestas áreas esteja relacionada à evitação da predação e a otimização do cuidado maternal, além da proteção proporcionada pelos machos em seu território.

A variação de aspectos reprodutivos como a grande variabilidade nas taxas de fecundidade, no tamanho da câmara incubadora e massas de ovos, assim como no volume de ovos foram observadas em algumas espécies do gênero *Macrobrachium*. A espécie que melhor representa a variação local destes aspectos seria o *Macrobrachium nipponense* (De Haan, 1849). Populações desta espécie em ambientes marinhos e estuarinos apresentam muitos ovos com pequeno volume, enquanto que em populações de águas continentais seus representantes possuem poucos ovos de grande volume, e em águas salobras apresentam ovos de volumes intermediários. Adicionalmente, o cruzamento de animais marinhos e dulciaquícolas dão origem ao fenótipo intermediário, que é sexualmente viável (MASHIKO, 1990; 1992; MASHIKO e NUMACHI, 1990). Foi possível observar que os aspectos reprodutivos de *M. amazonicum* não variaram devido a aspectos hidrogeográficos, apresentando populações com diferentes estratégias de postura e reprodução dentro do mesmo sistema hídrico. As populações de grande porte aqui analisadas se assemelham ao fenótipo intermediário descrito para *M. nipponense*, com uma postura menor e ovos maiores quando comparados a populações anfídromas de *M. amazonicum*, porém com maior quantidade e menor volume de ovos quando comparados a animais de populações de pequeno porte. Estudos envolvendo o cruzamento de animais de populações anfídromas e hololimnéticas, bem como o desenvolvimento das larvas obtidas nestes experimentos, são necessários para esclarecer esses questionamentos. Visto que, o conhecimento de aspectos reprodutivos de *M. amazonicum* são ferramentas fundamentais para programas de cultivo e preservação de estoques de populações naturais (MORAES-VALENTI e VALENTI, 2010), além de permitir a compreensão e comparação de processos bioecológicos e evolutivos para a espécie e demais representantes do gênero *Macrobrachium* (VERGAMINI et al., 2011).

6. Referências

- ABDENNOUR, C. Copper, zinc and haemocyanin concentrations in four caridean decapods (Crustacea): size relationships. **Hydrobiologia**, vol. 346, p. 1-9. 1997.
- AGÊNCIA NACIONAL DE ÁGUAS - ANA. **Sistema Nacional de Informações sobre Recursos Hídricos**. 2017. Disponível em: <<http://portalsnirh.ana.gov.br>>. Acesso em: 01 fev. 2017.
- AGOSTINHO, A.A.; JÚLIO JR, H.F.; BORGHETTI, J.R. Considerações sobre os impactos dos represamentos na ictiofauna e medidas para sua atenuação. Um estudo de caso: reservatório de Itaipu. **Revista Unimar**, vol. 14, p. 89-107. 1992.
- AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION - APHA. **Standard methods for the examination of water and wastewater**. 20th ed. Washington: APHA, 1999, 1161 p.
- ANGER, K. Neotropical *Macrobrachium* (Caridea: Palaemonidae): on the biology, origin, and radiation of freshwater-invading shrimp. **Journal of Crustacean Biology**, vol. 33, n. 2, p. 151-183. 2013.
- ANGER, K.; HAYD, L. From lecithotrophy to planktotrophy: ontogeny of larval feeding in the Amazon River prawn *Macrobrachium amazonicum*. **Aquatic Biology**, vol. 7, p. 19–30. 2009.
- ANGER, K.; HAYD, L. Feeding and growth in early larval shrimp *Macrobrachium amazonicum* from the Pantanal, southwestern Brazil. **Aquatic Biology**, vol. 9, p. 251–261. 2010.
- ANGER, K.; MOREIRA, G.S. Morphometric and reproductive traits of tropical caridean shrimps. **Journal of Crustacean Biology**, vol.18, n. 4, 823-838. 1998.
- ASHELBY, C.W. et al. Regional scale speciation reveals multiple invasions of freshwater in Palaemoninae (Decapoda). **Zoologica Scripta**, vol. 41, n. 3, p. 293-306. 2012.
- AUGUSTO, A.; VALENTI, W.C. Are there any physiological differences between the male morphotypes of the freshwater shrimp *Macrobrachium amazonicum* (Heller, 1862) (Caridea: Palaemonidae)? **Journal of Crustacean Biology**, vol. 36, n. 5, p. 716-723. 2016.
- BAUER, R.T. **Remarkable shrimps. Adaptations and Natural History of the Carideans**. 1st ed. Oklahoma: University of Oklahoma Press, 2004, 282 p.
- BOUBONARI, T.; KEVREKIDIS, T.; MALEA, P. Metal (Fe, Zn, Cu, Pb and Cd) concentration patterns in components of a macrophyte-based coastal lagoon ecosystem. **Hydrobiologia**, vol. 635, p. 27-36. 2009.

BOUVY, M. et al. Occurrence of *Cylindrospermopsis* (Cyanobacteria) in 39 Brazilian tropical reservoirs during the 1998 drought. **Aquatic Microbial Ecology**, vol. 23, p. 13-27. 2000.

BOUVY, M. et al. Limnological features in Tapacurá reservoir (northeast Brazil) during a severe drought. **Hydrobiologia**, vol. 493, p. 115-130. 2003.

CENTRO DE PREVISÃO DE TEMPO E ESTUDOS CLIMÁTICOS/INSTITUTO NACIONAL DE PESQUISAS ESPACIAIS - CPTEC/INPE. **El niño e La niña**. 2017. Disponível em: <<http://enos.cptec.inpe.br>>. Acesso em: 01 fev. 2017.

CORREA, C.; THIEL, M. Mating systems in caridean shrimp (Decapoda: Caridea) and their evolutionary consequences for sexual dimorphism and reproductive biology. **Revista Chilena de Historia Natural**, vol. 76, 187-203. 2003.

DE GRAVE, S.; FRANSEN, C.H.J.M. Carideorum Catalogus: the recent species of the Dendrobranchiate, Stenopodidean, Procarididean and Caridean shrimps (Crustacea: Decapoda). **Zoologische Mededelingen**, vol. 85: 195-589. 2011.

EVTIMOVA, V.V.; DONOHUE, I. Water-level fluctuations regulate the structure and functioning of natural lakes. **Freshwater Biology**, vol. 61, 251–264. 2016.

GOLTERMAN, H.L.; CLYMO, R.S.; OHNSTAD, M.A.M. **Methods for physical and chemical analysis of freshwaters**. 1st ed. Oxford: Blackwell Scientific Publications, 1978, 213 p.

GRIMM, A.M. The El Niño impact on the summer monsoon in Brazil: regional processes versus remote influences. **Journal of Climate**, vol. 16, p. 263-280. 2003.

HAYD, L.; ANGER, K. Reproductive and morphometric traits of *Macrobrachium amazonicum* (Decapoda: Palaemonidae) from the Pantanal, Brazil, suggests initial speciation. **Revista de Biología Tropical**, vol. 61, p. 39-57. 2013.

HENRY, R. **Ecologia de reservatórios: estrutura, função e aspectos sociais**. 1st ed. Botucatu: Fapesp/ FundibioBrazil, 1999, 800p.

HERRING, P.J. Observations on the embryonic development of some deep-living decapod crustaceans, with particular reference to species of *Acanthephyra*. **Marine Biology**, vol. 25, n. 1, p. 25-33. 1974.

JALIHAN, D.R.; SANKOLLI, K.N.; SHENOY, S. Evolution of larval developmental patterns and the process of freshwaterization in the prawn genus *Macrobrachium* Bate, 1868 (Decapoda, Palaemonidae). **Crustaceana**, vol. 65, p. 365-376. 1993.

KASTER, J.L.; JACOBI, G.Z. Benthic macroinvertebrates of a fluctuating reservoir. **Freshwater Biology**, vol.8, p. 283-290. 1978.

KEITEL, J.; ZAK, D.; HUPFER, M. Water level fluctuations in a tropical reservoir: the impact of sediment drying, aquatic macrophyte dieback, and oxygen availability on phosphorus mobilization. **Environmental Science and Pollution Research**. 2016. Disponível em: doi: <10.1007/s11356-015-5915-3>. Acesso em: 05 fev. 2017.

MACIEL, C.R.; VALENTI, W.C. Biology, fisheries, and aquaculture of the amazon river prawn *Macrobrachium amazonicum*: a review. **Nauplius**, vol.17, p. 61-79. 2009.

MASHIKO, K. Diversified egg and clutch sizes among local populations of the fresh-water prawn *Macrobrachium nipponense* (de Haan). **Journal of Crustacean Biology**, vol.10, n.2, p. 279-292. 1990.

MASHIKO, K. Genetic egg and clutch size variations in freshwater prawn populations. **Oikos**, vol.63, p. 454-458. 1992.

MASHIKO, K.; NUMACHI, K. Derivation of populations with different-sized eggs in the palaemonid prawn *Macrobrachium nipponense*. **Journal of Crustacean Biology**, vol.20, n.1, p. 118-127. 1990.

MEIRELES, A.L.; VALENTI, W.C.; MANTELATTO, F.L. Reproductive variability of the Amazon River prawn, *Macrobrachium amazonicum* (Caridea, Palaemonidae): influence of life cycle on egg production. **Latin American Journal of Aquatic Research**, vol. 41, n.4, p. 718-731. 2013.

MORAES-RIODADES, P.M.C.; VALENTI, W.C. Morphotypes in male amazon river prawns, *Macrobrachium amazonicum*. **Aquaculture**, vol. 236, p. 297-307. 2004.

MORAES-VALENTI, P.M.; VALENTI, W.C. 2010. Culture of the Amazon River Prawn *Macrobrachium amazonicum*. In: NEW, M.B. et al. (Eds). **Freshwater prawns: biology and farming**. 1st ed. Oxford: Wiley-Blackwell, 2010. p. 485-501.

National Weather Service/National Oceanic and Atmospheric Administration - NWS/NOAA. **El Niño/La Niña Home - Climate Prediction Center**. 2017. Disponível em:<http://www.cpc.ncep.noaa.gov/products/analysis_monitoring/ensostuff/ensoyear_s.shtml>. Acesso em: 01 fev. 2017.

NAZARI, E.M. et al. Comparisons of fecundity, egg size and egg mass volume of the freshwater prawns *Macrobrachium potiana* and *Macrobrachium olfersii* (Decapoda, Palaemonidae). **Journal of Crustacean Biology**, vol. 23, n. 4, p. 862-868. 2003.

NUSCH, E.A. Comparison of different methods for chlorophyll and phaeopigments determination. **Archivfür Hydrobiologie-Beiheft Ergebnisse der Limnologie**, vol. 14, p. 14-36. 1980.

ODINETZ-COLLART, O. Strategie de reproduction de *Macrobrachium amazonicum* em Amazonie Centrale (Decapoda, Caridea, Palaemonidae). **Crustaceana**, vol. 61, n. 3, p. 253-270. 1991.

ODINETZ-COLLART, O.; RABELO, H. Variation in egg size of the freshwater prawn *Macrobrachium amazonicum* (Decapoda, Palaemonidae). **Journal of Crustacean Biology**, vol. 16, n. 4, p. 684-688. 1996.

OKSANEN, J. et al. **The vegan Package: Community ecology package**. 2012. Disponível em:<<http://CRAN.R-project.org/package=vegan>>. Acesso em: 01 fev. 2017.

OPERADOR NACIONAL DO SISTEMA ELÉTRICO – ONS. **Histórico da Operação**. 2017. Disponível em: <[http://http://www.ons.org.br](http://www.ons.org.br)>. Acesso em: 01 fev. 2017.

PANTALEÃO, J.A.F.; HIROSE, G.L.; COSTA, R.C. Relative growth, morphological sexual maturity, and size of *Macrobrachium amazonicum* (Heller 1862) (Crustacea, Decapoda, Palaemonidae) in a population with an entirely freshwater life cycle. **Invertebrate Reproduction & Development**, vol. 56, p. 80-190. 2012.

PANTALEÃO, J.A.F.; HIROSE, G.L.; COSTA, R.C. Occurrence of male morphotypes of *Macrobrachium amazonicum* (Caridea, Palaemonidae) in a population with an entirely freshwater life cycle. **Brazilian Journal of Biology**, vol. 74, n. 3 sup., p. 223-232. 2014.

PASCHOAL, L.R.P. et al. Phytophilous caridean shrimps (Atyidae and Palaemonidae) in Salsa river (Canavieiras, Bahia, Brazil). **Nauplius**, vol. 21, n. 1, 123-126. 2013.

PASCHOAL, L.R.P.; ANDRADE, D.P.; DARRIGRAN, G. How the fluctuations of water levels affect populations of invasive bivalve *Corbicula fluminea* (Müller, 1774) in a Neotropical reservoir? **Brazilian Journal of Biology**, vol. 75, n. 1, p.135-143. 2015.

PASCHOAL, L.R.P.; GUIMARÃES, F.J.; COUTO, E.C.G. Growth and reproductive biology of the amphidromous shrimp *Palaemon pandaliformis* (Decapoda, Caridea) in a Neotropical river from northeastern Brazil. **Zoologia (Curitiba)**, vol.33, n. 6, p. 1-14. 2016.

PASCHOAL, L.R.P.; RIGOLIN-SÁ, O.; FERREIRA, M.N.L. Análise da qualidade da água utilizando o Índice do Estado Trófico (IET) e o Índice da Qualidade da Água (IQA). In: RIGOLIN-SÁ, O (Ed.) **Bacia Hidrográfica: Estudos do Rio Grande no Sudoeste de Minas Gerais – Brasil**. 1 ed. Passos: Edifesp., 2012. p. 95-108.

PASCHOAL, L.R.P.; ZARA, F.J. First record of intersexuality in the Amazon River shrimp *Macrobrachium amazonicum* (Heller, 1862) (Caridea: Palaemonidae). **Journal of Crustacean Biology**, vol. 74, n. 4, p. 1-5. 2017.

PILEGGI, L.G.; MANTELATTO, F.L. Molecular phylogeny of the freshwater prawn genus *Macrobrachium* (Decapoda, Palaemonidae), with emphasis on the relationships among selected American species. **Invertebrate Systematics**, vol. 24, p. 194-208. 2010.

R CORE TEAM. **R (The R Project for Statistical Computing)**. Software version 3.3.1. 2017. Disponível em: <www.r-project.org>. Acesso em: 10 fev. 2017.

RAIJ, B. Van; ANDRADE, J.C.; CANTARELLA, H.; QUAGGIO, J.A. **Análise química para avaliação da fertilidade de solos tropicais**. 1 ed. Campinas: Instituto Agrônomo, 2001, 284 p.

RELYEA, C.D.; MINSHALL, G.W.; DANEHY, R.J. Stream insects as bioindicators of fine sediment. In: FLUG, M.; FREVERT, D.; WATKINS JR., D.W. (Eds). **Proceedings of the ASCE Watershed Management 2000 Conference**. Fort Collins: American Society of Civil Engineers, 2000, p. 1-19.

STRICKLAND, J.D.H.; PARSONS, T.R. A manual of seawater analysis. **Bulletin of the Fisheries Research Board of Canada**, vol. 125, p. 1-185. 1960.

TORRES, M.V.; GIRI, F.; COLLINS, P.A. 'La Niña' phenomenon and the relationship between decapod populations and fishes in temporarily isolated shallow lakes. **Marine and Freshwater Research**. 2016. Disponível em: doi: <10.1071/MF16035>. Acesso em: 05 fev. 2017.

TRENBERTH, K.E. The definition of El Niño. **Bulletin of the American Meteorological Society**, vol. 78, p. 2771-2777. 1997.

VALDERRAMA, J.C. The simultaneous analysis of total nitrogen and phosphorus in natural waters. **Marine Chemistry**, vol. 10, p. 109-122. 1981.

VERGAMINI, F.G.; PILEGGI, L.G.; MANTELATTO, F.L. Genetic variability of the Amazon River prawn *Macrobrachium amazonicum* (Decapoda, Caridea, Palaemonidae). **Contributions to Zoology**, vol. 80, p. 67-83. 2011.

Capítulo 5

Seco ou úmido? Qual é a melhor escolha para determinar índices gonadossomáticos e hepatossomáticos em fêmeas de camarões carídeos?

Seco ou úmido? Qual é a melhor escolha para determinar índices gonadossomáticos e hepatossomáticos em fêmeas de camarões carídeos?

1. Resumo

Os índices gonadossomáticos (GSI) e hepatossomáticos (HSI) são amplamente empregados para a avaliação e conhecimento da biologia reprodutiva em crustáceos, principalmente em camarões do gênero *Macrobrachium*. Estes índices reprodutivos expressam os valores do peso do ovário e do hepatopâncreas em relação ao peso corporal das fêmeas. No entanto, o uso do peso de amostras úmidas ou secas para estimação destes índices não está padronizado na literatura científica. Neste trabalho comparamos a análise de GSI e HSI com amostras úmidas e secas, utilizando como modelo fêmeas do camarão amazônico *Macrobrachium amazonicum* provenientes de populações com diferentes fenótipos. Além disso, os padrões de reservas lipídicas nos hepatopâncreas foram analisados ao longo do desenvolvimento ovariano. Nossos resultados mostram que para o GSI, a aplicação do peso úmido superestima os valores registrados em estágios iniciais (I e II) e intermediário (III) de desenvolvimento ovariano e subestima os resultados nos estágios finais (IV e V) quando comparados ao uso do peso seco. Isto se deve à redução das organelas citoplasmáticas e o teor de água do citosol, com o incremento de vitelo e lipídeos nos ovócitos ao longo do desenvolvimento ovariano. Para os HSI, todos os estágios de desenvolvimento foram superestimados e somente os hepatopâncreas de fêmeas em estágio final (V) apresentaram uma queda significativa do conteúdo de água. Assim, as fêmeas mantêm suas reservas hepatopancreáticas constantes ao longo do desenvolvimento ovariano. Todavia, nota-se um aumento de células R com gotas lipídicas no estágio V, ao mesmo tempo em que as células B são menos frequentes, padrão inverso daquele registrado nos estágios III e IV. Desta maneira, o uso do peso seco mostra-se mais adequado para estimar os GSI e HSI.

Palavras-chave: *Macrobrachium amazonicum*, ovário, hepatopâncreas, água intracelular, Caridea.

2. Introdução

O sistema reprodutor feminino em carídeos é constituído por um par de órgãos primários localizados no cefalotórax, os ovários. Estes estão conectados aos ovidutos que se abrem nos gonóporos dos coxopoditos do terceiro par de pereiópodos (BAUER, 2004). Em fêmeas a maturidade fisiológica é marcada pela produção de grânulos de vitelo exógeno, o que leva a transformação colorimétrica e volumétrica do ovário ao longo do desenvolvimento (CHARNIAUX-COTTON, 1985; HAEFNER e SPAARGAREN, 1993; SPAARGAREN e HAEFNER, 1994). Inicialmente, são incolores ou translúcidos e ocupam pequena proporção no cefalotórax em fêmeas imaturas. Posteriormente, os ovários tornam-se muito volumosos com uma coloração intensa comumente esverdeada e de fácil visualização por transparência através da carapaça das fêmeas maduras (CHANG e SHIH, 1995; SOONKLANG et al., 2012; KANGPANICH et al., 2016). Disposto abaixo do ovário está o hepatopâncreas, que além de assentar esse órgão é também responsável por importantes processos metabólicos relacionados à digestão, ciclo de muda, excreção de metabólitos e detoxificação por metais em crustáceos, sendo executados de forma específica por um de seus cinco tipos celulares: células E (embriônicas), F (fibrilares), B (vesiculares), R (reabsortivas) e M (basal). Além de realizar essas funções, o hepatopâncreas é o maior órgão de armazenamento lipídico em crustáceos e desempenha um papel fundamental na maturação do sistema reprodutor e, conseqüentemente, na reprodução desses animais (ADIYODI, 1969; ADIYODI e ADIYODI, 1972; AL-MOHANNA et al., 1985a,b; AL-MOHANNA e NOTT, 1986, 1987, 1989; KANGPANICH et al., 2016).

Recentemente, nos camarões carídeos *Macrobrachium olfersii* (Wiegmann, 1836) em Magalhães et al. (2012) e *M. rosenbergii* (De Man, 1879) em Kamarudinget al. (2016), assim como no braquiúro *Callinectes danae* Smith, 1869 em Zara et al. (2013), os autores verificaram uma correlação inversa entre o peso e o tamanho dos ovários e dos hepatopâncreas ao longo do período de maturação do sistema reprodutor feminino. Flutuações nos padrões de peso e tamanho destes órgãos podem ser utilizados como um indicador simples do estado reprodutivo de animais aquáticos (GRANT e TYLER, 1983). As proporções do peso dos ovários e dos hepatopâncreas em relação ao peso do corpo do animal são amplamente utilizadas em estudos de biologia reprodutiva, sendo definidos como índices

gonadossomáticos (GSI) e hepatossomáticos (HSI) (MAGALHÃES et al., 2012; ZARA et al., 2013). Os últimos autores apontam que tal correlação é importante quando realizadas em animais de interesse econômico e que a maioria dos estudos que empregam os GSI e HSI enfoca variações mensais ou sazonais, enquanto que poucos estudos mostram de forma adequada a relação entre o aumento do GSI e o decréscimo de HSI.

A aplicação destes índices pode ser realizada com o uso de amostras úmidas ou secas do corpo e dos órgãos. Grant e Tyler (1983) ao avaliar índices reprodutivos em equinodermos sugeriram que a utilização de índices reprodutivos com o peso seco evita problemas em animais que possuem grande quantidade de água em seu corpo. No entanto, não existe um consenso na literatura sobre a utilização de índices úmidos ou secos em estudos envolvendo crustáceos, assim como não existem ou são escassos os dados de GSI e HSI para a maioria das espécies de interesse econômico, como é o caso do camarão amazônico *Macrobrachium amazonicum* (Heller, 1862). Esta espécie apresenta ampla distribuição nas Américas (Costa Rica até a Argentina) (VERGAMINI et al., 2011), é muito pescada e consumida nas regiões norte e nordeste do Brasil (MACIEL e VALENTI, 2009) e mostra grande potencial para aquicultura mundial (NEW, 2005). Além disso, a espécie apresenta grande plasticidade fenotípica, com três fenótipos distintos registrados para suas populações: (a) populações anfídromas de grande porte, (b) hololimnéticas de grande e (c) pequeno porte (PASCHOAL, 2017 – Capítulo 2). Somente Ribeiro et al. (2011) avaliaram a correlação de GSI e HSI úmidos em fêmeas anfídromas da espécie, oriundas de populações cultivadas com dieta artificial rica em ácidos graxos. Desta forma, no presente estudo analisamos os GSI e HSI em populações selvagens de *M. amazonicum* apresentando diferentes fenótipos, assim como testamos ambos índices empregando amostras com peso úmido e seco. Adicionalmente, verificamos os padrões de reservas lipídicas nos hepatopâncreas ao longo do desenvolvimento ovariano.

3. Material e métodos

3.1. Amostragem

Coletas mensais foram realizadas entre os meses de Outubro de 2014 a Dezembro de 2015 no rio Grande (20°30'53"S / 46°50'16"W) em quatro pontos de coletas. Dois pontos na usina hidrelétrica (UHE) de Marechal Mascarenhas de Moraes (MMM) - municípios de Cássia e São João Batista do Glória, e outros dois na UHE de Furnas - municípios de Carmo do Rio Claro e São José da Barra, situados no estado de Minas Gerais (sudeste brasileiro). Os camarões foram obtidos por coletas ativas (uma peneira com 60 cm de diâmetro e malha de 1,25 mm foi deslocada por diversas vezes durante 30 minutos por uma pessoa, ao longo da vegetação marginal e bancos de macrófitas) e passivas (seis armadilhas de 85 cm comprimento X 35 cm largura/altura, iscadas com pequenos pedaços de fígado bovino e retiradas após quatro horas, dispostas entre 0,5 e 2 m da margem). Imediatamente após a captura, os camarões foram transportados para o laboratório e mantidos momentaneamente (até 30 minutos) em aquários (temperatura: $25 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$).

3.2. Procedimentos laboratoriais e índices

Após a identificação dos camarões segundo Pileggi (2009), o comprimento da carapaça (CL) das fêmeas foi mensurado com paquímetro analógico (0,02 mm) e o estágio ovariano foi inicialmente verificado pela visualização por transparência através da carapaça (CHANG e SHIH, 1995; KANGPANICH et al., 2016). Imediatamente, após esses procedimentos todos os animais foram dissecados e analisados. Devido à presença de dois fenótipos registrados nas populações estudadas, estas foram aqui referidas como populações de grande (i.e. populações de MMM) e pequeno porte (i.e. populações de Furnas) (PASCHOAL, 2017 – Capítulo 2). Para a verificação dos estágios do desenvolvimento ovariano, fêmeas dos distintos fenótipos foram anestesiadas por resfriamento (-20°C / 5 min) e tiveram seus sistemas reprodutores cuidadosamente removidos. A morfologia macroscópica dos sistemas reprodutores foi analisada sob estereomicroscópio durante a dissecação. Os ovários foram classificados em cinco estágios de desenvolvimento segundo Chang e Shih (1995) e Kangpanichet al. (2016). Posteriormente, os ovários e hepatopâncreas foram removidos do cefalotórax, e o excesso de água dos órgãos e do corpo foi cuidadosamente removido com papel absorvente e logo após foram pesados em balança analítica (0,0001 g) para

verificação de índices úmidos. Na segunda etapa, os mesmos órgãos e corpos foram secos em uma estufa a 70°C por 48 horas e novamente pesados (modificado de HAEFNER e SPAARGAREN, 1993 - 60°C por 16-18 horas) para a obtenção de índices secos. Os índices gonadossomáticos (GSI) e hepatossomáticos (HSI) foram calculados com base na seguinte relação: $GSI / HSI = \text{peso seco ou úmido do órgão} / \text{peso seco ou úmido do indivíduo} \times 100$ (GRANT e TYLER, 1983). O conteúdo de água presente nos ovários, hepatopâncreas e corpos dos animais foram obtidos pela diferença entre os valores registrados para os pesos úmidos e secos destas estruturas (HAEFNER e SPAARGAREN, 1993).

3.3. Análise estatística

Trinta animais em cada estágio de desenvolvimento ovariano foram analisados para cada fenótipo (N: 300). Análises de variâncias (ANOVA's) bifatoriais de medidas repetidas, associadas ao teste de comparação múltipla de Holm-Sidak foram utilizadas para determinar diferenças entre os valores de GSI e HSI úmidos e secos entre os diferentes estágios de desenvolvimento em populações de grande e pequeno porte. Adicionalmente, o conteúdo de água registrado nos ovários, hepatopâncreas e corpos das fêmeas em cada estágio de desenvolvimento para ambos os fenótipos foram avaliados por meio de ANOVA's bifatoriais associadas ao teste de comparação múltipla de Holm-Sidak. Todos os cálculos e as demais análises estatísticas foram realizados no software R 3.3.1. (R DEVELOPMENT CORE TEAM, 2017).

3.4. Histoquímica para lipídeos

Os padrões de reservas lipídicas em *M. amazonicum* foram verificados por meio de análises histológicas da região central do hepatopâncreas de 18 fêmeas recém-coletadas (três animais em estágio intermediário e outros três nos estágios finais de desenvolvimento ovariano para cada fenótipo) em intermuda, evitando possíveis alterações celulares relacionadas ao ciclo de muda (AL-MOHANNA e NOTT, 1989). Após a dissecação, as amostras a fresco foram fixadas em paraformaldeído 4% (24 horas) e lavadas em tampão fosfato 0,2M (pH 7,2) por duas vezes. As amostras para lipídeos não foram desidratadas durante a rotina

histológica seguindo as propostas de Zara et al. (2012), sendo as mesmas diretamente embebidas e incluídas em historesina glico-metacrilato Leica®. Os blocos foram cortados com 3-4,5 µm de espessura em micrótomo rotativo e posteriormente, as lâminas foram coradas com Sudan black B.

4. Resultados

Os valores médios (\pm desvio padrão) dos CL, GSI e HSI úmidos e secos em fêmeas dos dois tipos de fenótipos, assim como o conteúdo (porcentagem) de água nos ovários, hepatopâncreas e corpos dos animais estão sumarizados na Tabela I. Fêmeas de grande e pequeno porte apresentaram diferenças significativas para os valores médios registrados por meio do uso de GSI úmido e seco ao longo do desenvolvimento ovariano (estágios I a V) ($F = 57,03$; $df = 4 - p < 0,001$), assim como foram registradas diferenças significativas entre os valores médios dos GSI entre as populações ($F = 82,57$; $df = 4 - p < 0,001$). Pode-se perceber que em fêmeas de pequeno porte os GSI apresentaram maiores valores quando comparados as fêmeas de grande porte (Tabela I e Figura 1). Para os HSI em ambos os fenótipos, não houve diferenças significativas entre os valores dos índices ao longo do decorrer da maturidade do sistema reprodutor ($F = 3,41$; $df = 4 - p: 0,13$), tampouco foram estabelecidas diferenças significativas entre os valores médios registrados para as fêmeas de grande e pequeno porte para os tipos de métodos utilizados ($F = 1,50$; $df = 4 - p: 0,35$). Em ambos os fenótipos, verificamos que para o GSI a utilização de pesos úmidos superestima os resultados em fêmeas com ovários I, II (estágios iniciais) e III (estágio intermediário) e subestima os valores registrados para fêmeas com ovários IV e V (estágios finais) quando comparados aos resultados obtidos para os índices com o emprego do peso seco (Tabela I e Figura 1). Isto se deve aos menores valores de quantidade de água presentes nos ovários em estágios finais de desenvolvimento, apresentando diferenças significativas entre os valores médios quando comparados a outros estágios ($F = 133,19$; $df = 4 - p < 0,001$). Por outro lado, o HSI foi superestimado em todos os estágios de desenvolvimento do sistema reprodutor (Tabela I e Figura 1). Foi verificado que a quantidade de água no hepatopâncreas e no corpo do camarão ao longo do desenvolvimento do sistema reprodutor é mais homogênea do que nos ovários, apesar da menor quantidade significativa registrada para o hepatopâncreas

de fêmeas em estágio final (V) de desenvolvimento ($F = 14,15$; $df = 4 - p < 0,001$). Foram registradas diferenças significativas para o conteúdo de água apenas nos corpos das fêmeas de pequeno porte em estágios finais ($F = 2,78$; $df = 4 - p: 0,03$) (Tabela I).

Os padrões de distribuição celular nos túbulos hepatopancreáticos diferiram durante os estágios de desenvolvimento ovariano nas fêmeas de *M. amazonicum* (Figura 2), no entanto não apresentaram diferenças para os dois fenótipos analisados. Em fêmeas no estágio intermediário (III) ou no início da fase final (IV) de desenvolvimento ovariano, pode-se observar uma grande quantidade de células B com muito vacúolos (comumente, não corados) dispersas ao longo do comprimento dos túbulos hepatopancreáticos, e em menor quantidade células F e R entre este tipo celular (Figura 2A). Células B possuem núcleos basais arredondados e região apical com borda em escova. Além disso, apresentam várias vesículas e um grande vacúolo subapical que ocupa grande parte de seu citoplasma. Pode-se constatar a presença de células F próximas a célula B, indicando a possível diferenciação gradual desta para célula B (Figura 2B). Por outro lado, túbulos hepatopancreáticos de fêmeas com ovário em estágio final (V) próximas a desova, apresentam grande quantidade de células R com citoplasma e vacúolos corados para lipídeos, apesar de ser possível observar algumas células B e F próximas deste tipo celular (Figura 2C). Nota-se também que os túbulos estão mais compactados e tendem a acumular mais lipídeo neste estágio quando comparados aos estágios anteriores, com gotas de lipídeos características deste tipo celular, bem marcadas para técnica empregada (Figura 2D e E).

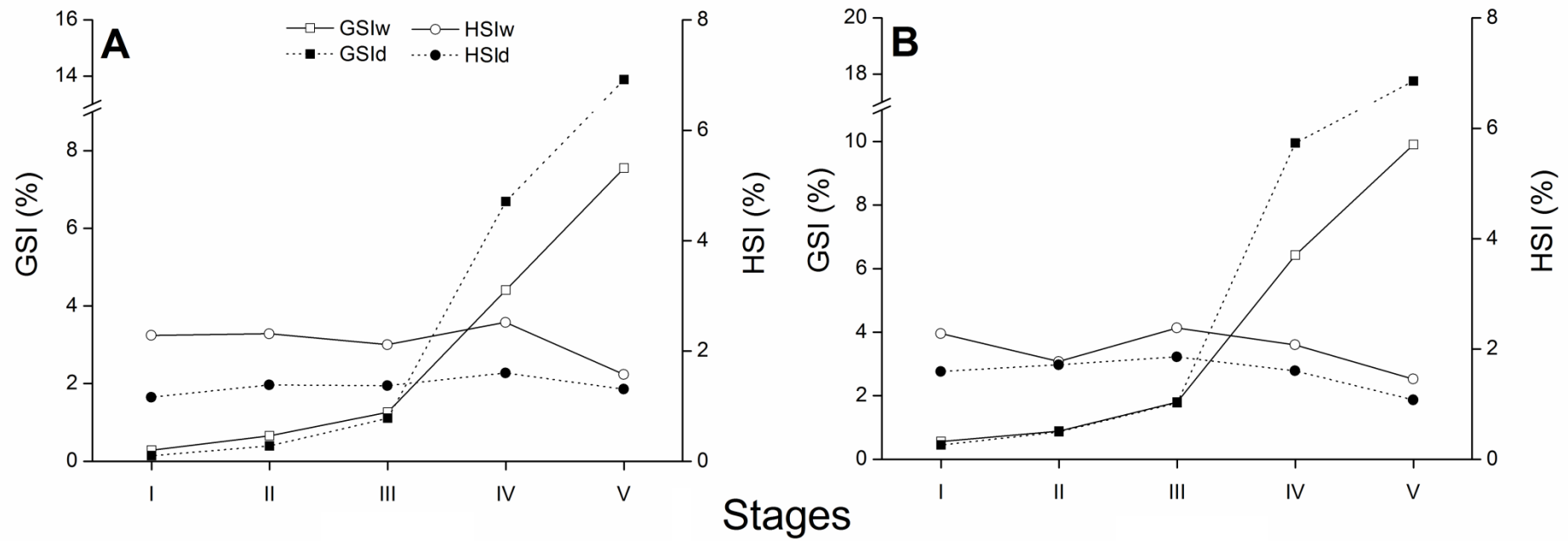


Figura 1. Valores médios dos índices gonadosomáticos (GSIw e GSIId, respectivamente) e hepatossomáticos (HSIw e HSId, respectivamente) secos e úmidos, de acordo com o estágio de desenvolvimento do sistema reprodutor para fêmeas de grande (**A**) e pequeno (**B**) porte de *M. amazonicum*.

Tabela I. Valores médios (\pm desvio padrão) do comprimento de carapaça (CL), índices gonadossomáticos (GSIw e GSId, respectivamente) e hepatossomáticos (HSIw e HSId, respectivamente) úmidos e secos e conteúdo de água no ovário (Wov), hepatopâncreas (Whe) e no corpo (Wbd) de *M. amazonicum* ao longo dos estágios de desenvolvimento do sistema reprodutor para fêmeas de grande e pequeno porte (fenótipos). Letras diferentes indicam diferenças significativas em comparação por pares.

Fenótipos	Estágio	CL (mm)	GSIw	GSId	HSIw	HSId	Wov (%)	Whe (%)	Wbd (%)
Grande porte	I	16,13 (\pm 2,23)	0,28 (\pm 0,19) ^a	0,14 (\pm 0,10) ^a	2,28 (\pm 1,29) ^a	1,16 (\pm 0,76) ^a	85,37 (\pm 11,22) ^a	89,38 (\pm 2,97) ^a	78,70 (\pm 5,05) ^a
	II	16,40 (\pm 2,69)	0,66 (\pm 0,49) ^a	0,40 (\pm 0,24) ^a	2,31 (\pm 1,12) ^a	1,39 (\pm 0,85) ^a	86,84 (\pm 5,72) ^a	87,59 (\pm 4,65) ^a	80,06 (\pm 3,51) ^a
	III	15,43 (\pm 1,93)	1,26 (\pm 0,86) ^a	1,11 (\pm 0,96) ^a	2,12 (\pm 0,98) ^a	1,37 (\pm 0,71) ^a	80,29 (\pm 9,78) ^b	85,25 (\pm 5,25) ^a	78,38 (\pm 4,36) ^a
	IV	15,98 (\pm 2,20)	4,41 (\pm 0,97) ^b	6,69 (\pm 1,81) ^b	2,52 (\pm 0,76) ^a	1,60 (\pm 0,72) ^a	66,53 (\pm 6,29) ^c	86,00 (\pm 5,19) ^a	79,73 (\pm 2,66) ^a
	V	14,40 (\pm 1,83)	7,55 (\pm 1,65) ^b	13,87 (\pm 3,42) ^c	1,58 (\pm 0,77) ^a	1,31 (\pm 0,72) ^a	57,74 (\pm 4,92) ^d	78,74 (\pm 12,04) ^b	80,19 (\pm 3,38) ^a
Pequeno porte	I	8,86 (\pm 0,55)	0,56 (\pm 0,49) ^a	0,45 (\pm 0,33) ^a	2,28 (\pm 0,92) ^a	1,59 (\pm 0,87) ^a	80,95 (\pm 11,97) ^a	84,67 (\pm 7,69) ^a	81,34 (\pm 3,11) ^a
	II	8,92 (\pm 0,70)	0,89 (\pm 0,48) ^a	0,86 (\pm 0,48) ^a	1,77 (\pm 0,75) ^a	1,71 (\pm 0,77) ^a	81,40 (\pm 7,20) ^a	80,62 (\pm 8,66) ^a	81,44 (\pm 3,61) ^a
	III	9,30 (\pm 0,99)	1,80 (\pm 0,85) ^a	1,78 (\pm 1,18) ^a	2,38 (\pm 0,91) ^a	1,86 (\pm 0,90) ^a	81,99 (\pm 7,61) ^a	84,59 (\pm 5,75) ^a	80,95 (\pm 4,74) ^a
	IV	9,23 (\pm 0,79)	6,43 (\pm 1,98) ^b	9,96 (\pm 3,03) ^B	2,08 (\pm 0,82) ^a	1,61 (\pm 0,71) ^a	59,81 (\pm 8,64) ^b	79,05 (\pm 7,65) ^a	77,43 (\pm 3,31) ^b
	V	9,50 (\pm 0,66)	9,91 (\pm 1,30) ^b	17,75 (\pm 3,32) ^C	1,46 (\pm 0,96) ^a	1,08 (\pm 0,63) ^a	57,99 (\pm 6,66) ^b	76,80 (\pm 13,79) ^b	80,60 (\pm 4,50) ^c

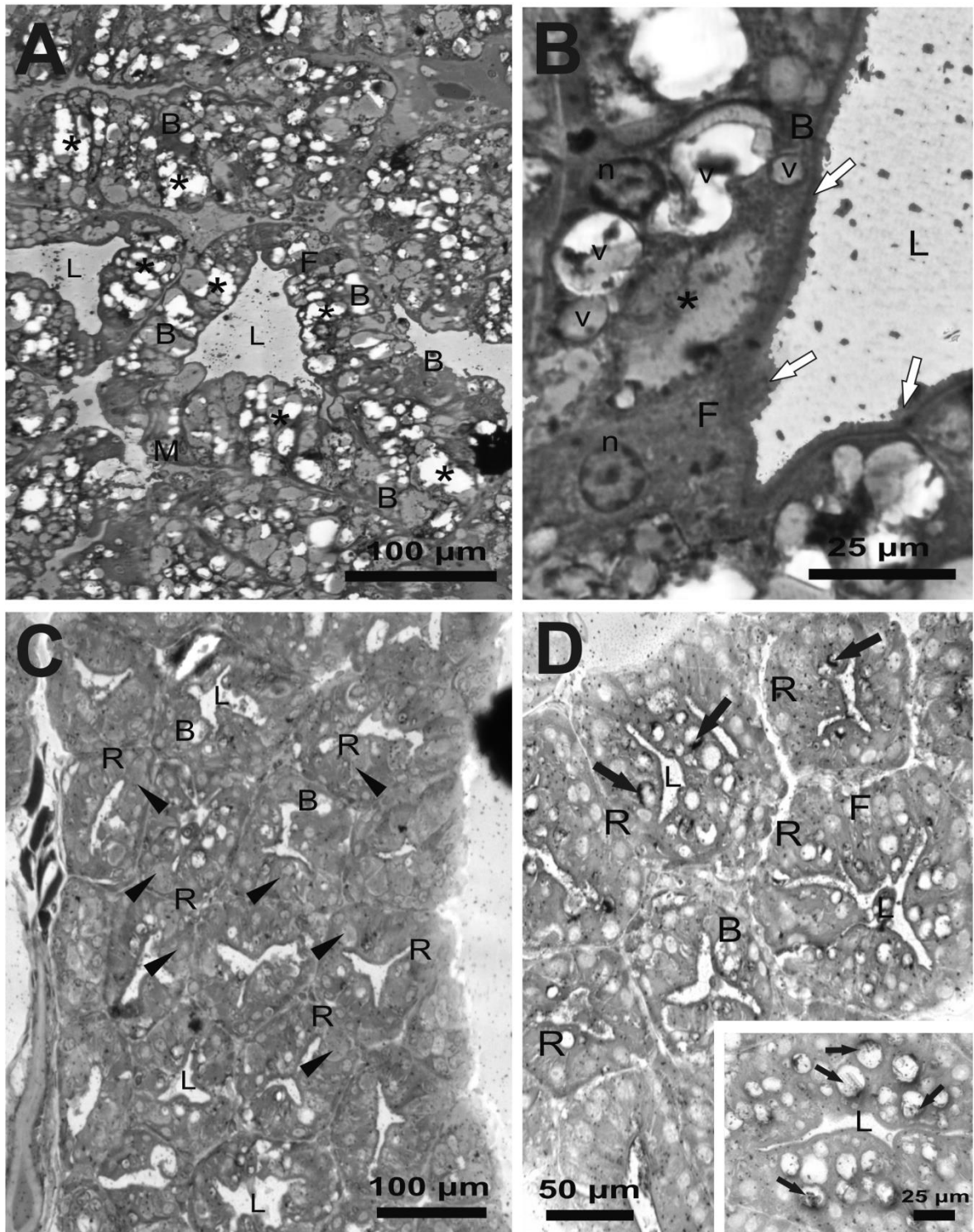


Figura 2. **A.** Túbulos hepatopancreáticos de fêmea de *M. amazonicum* no estágio intermediário (III) de desenvolvimento ovariano mostrando grande quantidade de células B com extensa vacuolização (asteriscos). **B.** Células B apresentando vesículas e um grande vacúolo subapical (asterisco) que ocupa a maior parte do citoplasma. Destaca-se a presença de células F entre células B, e suas regiões apicais com borda em escova (setas brancas). **C.** Túbulos hepatopancreáticos de fêmea em estágio final (V) de desenvolvimento ovariano mostrando grande quantidade de células R com vacúolos estocando lipídeos (cabeças de setas pretas). **D.** Células R com citoplasma e gotas de lipídeos (setas pretas) fortemente

reativos a Sudan black B, e uma pequena quantidade de células B e F próximas a esses tipos celulares. Note as gotas de lipídeos (setas pretas) características das células R. B: célula B; F: célula F; L: lúmen; M: célula M; n: núcleo; R: célula R; v: vesícula.

5. Discussão

A utilização de pesos úmidos superestima os valores de GSI em fêmeas de *M. amazonicum* com ovários em estágios iniciais e intermediário, e subestima os valores registrados para fêmeas com ovários em estágios finais. Estas discrepâncias entre os valores registrados para os índices úmidos e secos podem ser explicadas pelo incremento de componentes protéicos e lipídicos nos ovários ao longo do desenvolvimento do sistema reprodutor feminino. De forma geral, ovários de crustáceos decápodes em estágios iniciais de maturação são compostos por ovogônias e ovócitos pré-vitelogênicos que possuem citoplasma rico em organelas responsáveis pela síntese de glicoprotéínas e lipídeos, como: ribossomos, complexos de Golgi e retículo endoplasmático rugoso (ROTLLANT et al., 2007; SOONKLANG et al., 2012). Posteriormente, à medida que os ovários amadurecem, grânulos de vitelo vão sendo progressivamente acumulados no citoplasma dos ovócitos, reduzindo significativamente a quantidade de organelas citoplasmáticas. Tais grânulos são formados pelo acúmulo de vitelogenina, dentre outros precursores, além de pigmentos carotenoides (i.e. glicolipofosfocarotenoproteína). Estes grânulos somados as gotas de lipídeos serão utilizados como reservas energéticas pelos ovócitos e preencherão quase que totalmente os ovócitos maduros, reduzindo significativamente seu citoplasma (SAROJINI et al., 1981; CHANG e SHIH, 1995; ROTLLANT et al., 2007; SOONKLANG et al., 2012; ZARA et al., 2013; BRAGA et al., 2016). Haefner e Spaargaren (1993) demonstraram que a redução da quantidade de água em ovários imaturos com valores acima de 70% para 46% em ovários em estágios finais de desenvolvimento no carídeo *Crangon crangon* (Linnaeus, 1758), se deve a depleção de água intracelular nos ovócitos promovida pela acumulação de reservas energéticas durante a vitelogênese. Os mesmos autores verificaram que o decréscimo de água nos ovários está diretamente relacionado às maiores taxas de proteínas, carboidratos e lipídeos neste órgão (SPAARGAREN e HAEFNER, 1994).

O HSI em *M. amazonicum* foi superestimado em todos os estágios de desenvolvimento do sistema reprodutor, mesmo com o hepatopâncreas apresentando uma perda de água mais homogênea e não tão evidente como nos ovários. Somente os hepatopâncreas de fêmeas em estágio final (V) de desenvolvimento em ambos os fenótipos, apresentaram uma queda significativa do conteúdo de água. Isto está associado ao maior acúmulo lipídico nesse órgão durante essa fase, que servirá como reserva final de energia para a maturação do ovário (HAEFNER e SPAARGAREN, 1993; SPAARGAREN e HAEFNER, 1994; SOONKLANG et al., 2012; KANGPANICH et al., 2016). Franceschini-Vicentini et al. (2009) e Ribeiro et al. (2014) ao analisar os aspectos histológicos e ultraestruturais dos túbulos hepatopancreáticos de *M. amazonicum*, verificaram que o epitélio que compõe essas estruturas é composto por cinco tipos celulares: células E (embriônicas), F (fibrilares), M (basal), B (vesiculares) e R (reabsortivas). Estes autores apontam que as células R são os tipos celulares mais comuns nos túbulos hepatopancreáticos, seguidos pelas células B. Células R possuem a função de absorção de nutrientes solúveis e armazenamento de glicogênio e lipídeos, e são caracterizadas pelo acúmulo de gotas de lipídeos, enquanto que as células B promovem a digestão intracelular e possuem grandes vacúolos digestivos (AL-MOHANNA e NOTT, 1986, 1987, 1989). Picolo (2013) constatou um padrão de correlação inversa entre quantidade de células B e R durante as flutuações dos HSI em *M. amazonicum*. A autora verificou que em animais com altos valores de HSI, observava-se grande quantidade de células B com intensa vacuolização e poucas células R, enquanto que em animais com baixos valores de HSI, havia o predomínio de células R com formato cilíndrico ou arredondado e um vacúolo subapical. Esta correlação explicaria o padrão celular observado no presente estudo para os túbulos hepatopancreáticos de fêmeas em estágio intermediário e finais de desenvolvimento ovariano. Fêmeas em estágio intermediário (III) e no início da fase final (IV) apresentaram maiores valores de HSI e seus túbulos hepatopancreáticos possuíam grande quantidade de células B com extensa vacuolização, enquanto que em fêmeas próximas a desova (estágio V) com baixos valores de HSI e altos valores de GSI, foi observada uma grande quantidade de células R com vacúolos preenchidos por material lipídico em seus túbulos hepatopancreáticos, assim como gotas de lipídeos bem marcadas nestas células. Como as células R são extremamente ricas em componentes lipídicos (AL-MOHANNA e NOTT, 1987, 1989) e foram os tipos

celulares mais comuns em fêmeas de *M. amazonicum* nos estágios finais de desenvolvimento do sistema reprodutor, pode-se concluir que a acumulação de lipídeos foi responsável pela depleção de água intracelular nos hepatopâncreas neste estágio. Este padrão de decréscimo de água nesse órgão é similar daquele registrado para *C. crangon* (HAEFNER e SPAARGAREN, 1993; SPAARGAREN e HAEFNER, 1994) e explicaria os menores valores significativos do conteúdo de água registrado para fêmeas de *M. amazonicum* em estágio final.

O presente estudo mostrou que o conteúdo de água foi responsável por alterar significativamente os resultados de índices gonadossomáticos e hepatossomáticos ao decorrer da maturidade do sistema reprodutor feminino de *M. amazonicum*. Ainda foi possível perceber que a porcentagem do conteúdo de água em hepatopâncreas demonstrou ser um índice mais sensível do que o HSI, uma vez que o último não foi capaz de mostrar grandes diferenças ao longo dos estágios de desenvolvimento. Os hepatopâncreas possuem diversos tipos celulares ricos em endomembranas e possuem um ciclo de reposição e diferenciação celular muito rápido (AL-MOHANNA et al., 1985a,b; AL-MOHANNA e NOTT, 1986, 1987, 1989) com grande volume de água para seu metabolismo funcional quando comparados aos tipos celulares dos ovários (SPAARGAREN e HAEFNER, 1994). É possível que a utilização do conteúdo de água neste órgão proporcione melhores resultados para análises de transferências de nutrientes aos ovários, uma vez que HSI pode subestimar os resultados. Novos estudos em outros grupos de crustáceos são necessários para confirmar a utilização do conteúdo de água no hepatopâncreas como índice mais preciso na avaliação de transferência de nutrientes e, conseqüentemente, a possível substituição do HSI pelo conteúdo de água disponível no órgão. A similaridade da maturação do sistema reprodutor feminino em carídeos permite que os resultados obtidos sejam extrapolados para outras espécies do grupo, podendo ser o mesmo verdadeiro para os outros decápodes. Desta forma, o uso do peso seco para a estimativa de GSI e HSI são mais precisos e confiáveis para este tipo de estudo.

6. Referências

- ADIYODI, R.T. On the storage and mobilization of organic resources in the hepatopancreas of a crab *Paratelphusa hydrodromus*. **Experientia**, vol. 25, n.1, p. 43-44. 1969.
- ADIYODI, R.G.; ADIYODI, K.G. Hepatopancreas of *Paratelphusa hydrodromus* (Herbst): histophysiology and the pattern of proteins in relation to reproduction and moult. **Biological Bulletin**, vol. 142, n.3, p. 359-369. 1972.
- AL-MOHANNA, S.Y.; NOTT J.D. R-cells and the digestion cycle in *Penaeus semisulcatus* (Crustacea: Decapoda). **Marine Biology**, vol. 95, p. 129-137. 1987.
- AL-MOHANNA, S.Y.; NOTT J.D. Functional cytology of the hepatopancreas of *Penaeus semisulcatus* (Crustacea: Decapoda) during the moult cycle. **Marine Biology**, vol. 101, p. 535-544. 1989.
- AL-MOHANNA, S.Y.; NOTT J.D. B-cells and digestion in the hepatopancreas of *Penaeus semisulcatus* (Crustacea: Decapoda). **Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom**, vol. 66, p. 403-414. 1986.
- AL-MOHANNA, S.Y.; NOTT J.D.; LANE D.J.W. Mitotic E- and secretory F-cells in the hepatopancreas of the shrimp *Penaeus semisulcatus* (Crustacea: Decapoda). **Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom**, vol. 65, p. 901-910. 1985a.
- AL-MOHANNA, S.Y.; NOTT J.D.; LANE D.J.W. M 'midget' cells in the hepatopancreas of the shrimp, *Penaeus semisulcatus* De Haan, 1844 (Decapoda, Natantia). **Crustaceana**, vol. 48, p. 260-268. 1985b.
- BAUER, R.T. **Remarkable shrimps. Adaptations and Natural History of the Carideans**, 1st ed. Oklahoma: University of Oklahoma Press, 2004, 282 p.
- BRAGA, A.A. et al. Histological and histochemical features of the oogenesis in the simultaneous protandric hermaphrodite shrimp *Exhippolysmata oplophoroides* (Decapoda: Caridea). **Micron**, vol. 88 p. 60-67. 2016.
- CHANG, C-F.; SHIH, T-W. Reproductive cycle of ovarian development and vitellogenin profiles in the freshwater prawns, *Macrobrachium rosenbergii*. **Invertebrate Reproduction & Development**, vol. 27, n.1, p. 11-20. 1995.
- CHARNIAUX-COTTON, H. Control of vitellogenesis in Crustacea. **American Zoologist**, vol. 25, p. 197-206. 1985.
- FRANCESCHINI-VICENTINI, I.B. et al. Histoarchitectural features of the hepatopancreas of the Amazon river prawn *Macrobrachium amazonicum*. **International Journal of Morphology**, vol. 27, n. 1, 121-128. 2009.
- GRANT, A.; TYLER, P.A. The analysis of data in studies of invertebrate reproduction. I: Introduction and statistical analysis of gonad indices and maturity indices.

International Journal of Invertebrate Reproduction = Invertebrate Reproduction & Development, vol. 6, n. 5-6, p. 259-269. 1983.

HAEFNER, P.A.; SPAARGAREN, D.H. Interactions of ovary and hepatopancreas during the reproductive cycle of *Crangon crangon* (L.). I. Weight and volume relationships. **Journal of Crustacean Biology**, vol. 13, n.3, p. 523-531. 1993.

KAMARUDING, N.A. et al. Dynamics of glucose in the haemolymph of female giant freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii*, influences reproductive and non-reproductive moulting cycles. **Aquaculture Research**, p. 1-10. 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1111/are.13176>>. Acesso em: 21 jan. 2017.

KANGPANICH, C. et al. Effects of arachidonic acid supplementation in maturation diet on female reproductive performance and larval quality of giant river prawn (*Macrobrachium rosenbergii*). **PeerJ**, vol. 4: e2735. 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.7717/peerj.2735>>. Acesso em: 21 jan. 2017.

MACIEL, C.R.; VALENTI, W.C. Biology, fisheries, and aquaculture of the amazon river prawn *Macrobrachium amazonicum*: a review. **Nauplius**, vol.17, p. 61-79. 2009.

MAGALHÃES, T.; MOSSOLIN, E.C.; MANTELATTO, F.L. Gonadosomatic and hepatosomatic indexes of the freshwater shrimp *Macrobrachium olfersii* (Decapoda, Palaemonidae) from São Sebastião island, southeastern Brazil. **Pan-American Journal of Aquatic Sciences**, vol. 7, n.1. p. 1-9. 2012.

NEW, M.B. Freshwater prawn farming: global status, recent research and a glance at the future. **Aquaculture Research**, vol. 36, p. 210-230. 2005.

PICOLO, J.M. **Estrutura funcional do hepatopâncreas no processo digestivo em *Macrobrachium amazonicum***. 73 f. Dissertação de mestrado (Mestrado em Aquicultura). Universidade Estadual Paulista – UNESP, Jaboticabal. 2013.

PILEGGI, L.A.G. **Sistemática filogenética dos camarões do gênero *Macrobrachium* Bate, 1868 do Brasil: análises morfológicas e moleculares**. 236 f. Tese de doutorado (Doutorado em Biologia Comparada). Universidade de São Paulo – USP, São Paulo. 2009.

R CORE TEAM. **R (The R Project for Statistical Computing)**. Software version 3.3.1. 2017. Disponível em: <www.r-project.org>. Acesso em: 10 fev. 2017.

RIBEIRO, K. et al. Effect of polyunsaturated fatty acids on the fecundity of the Amazon River prawn *Macrobrachium amazonicum* (Heller, 1862). **Aquaculture Research**, vol. 43, n.12, p. 1756-1763. 2012.

RIBEIRO, K. et al. The ultrastructural evaluation of digestive cells in the hepatopancreas of the Amazon River prawn, *Macrobrachium amazonicum*. **Aquaculture Research**, vol. 47, n. 4, p. 1-9. 2014.

ROTLLANT, G. et al. Ovarian maturation of the multi-spawning spider crab *Maja brachydactyla* (Decapoda: Majidae) with special reference to yolk formation. **Marine Biology**, vol. 152, n. 2, p. 383-394. 2007.

SAROJINI, R.; MIRAJKAR, M.S.; NAGABHUSHANAM, R. Histochemistry of the ovary of *Macrobrachium kistnensis*. **Proceedings of the Indian Academy of Sciences (Animal Sciences)**, vol.90, n. 5, p. 577-583. 1981.

SOONKLANG, N. et al. Ultrastructure of differentiating oocyte and vitellogenesis in the giant fresh water prawn, *Macrobrachium rosenbergii* (de Man). **Microscopy Research and Technique**, vol. 75, p. 1402–1415. 2012.

SPAARGAREN, D.H.; HAEFNER, P.A. Interactions of ovary and hepatopancreas during the reproductive cycle of *Crangon crangon* (L.). II. Biochemical relationships. **Journal of Crustacean Biology**, vol. 14, n.1, p. 6-19. 1994.

VERGAMINI, F.G., PILEGGI, L.G.; MANTELATTO, F.L. Genetic variability of the Amazon River prawn *Macrobrachium amazonicum* (Decapoda, Caridea, Palaemonidae). **Contributions to Zoology**, vol. 80, p. 67-83.2011.

ZARA, F.J. et al. Spermatogenesis, spermatophore and seminal fluid production in the adult blue crab *Callinectes danae* (Portunidae). **Journal of Crustacean Biology**, vol. 32, n. 2, p. 249-262. 2012.

ZARA, F.J. et al. The ovarian cycle histochemistry and its relationship with hepatopancreas weight in the blue crab *Callinectes danae* (Crustacea: Portunidae). **Acta Zoologica**, vol. 94, p. 134-146. 2013.

Capítulo 6

**Histoquímica e ultraestrutura do desenvolvimento ovariano e sua
interação com o hepatopâncreas em três fenótipos de
Macrobrachium amazonicum (Heller, 1862)**

**Histoquímica e ultraestrutura do desenvolvimento ovariano e sua interação
com o hepatopâncreas em três fenótipos de *Macrobrachium amazonicum*
(Heller, 1862)**

1. Resumo

Macrobrachium amazonicum é uma espécie de interesse econômico, com ampla distribuição nas Américas e alta variabilidade morfológica e reprodutiva. Três tipos de fenótipos podem ser observados para a espécie: (a) populações anfídromas de grande porte, (b) hololimnéticas de grande e (c) pequeno porte. No presente trabalho, os aspectos morfológicos, histoquímicos e ultraestruturais dos ovários nos três fenótipos foram analisados comparativamente. Além disso, a interação entre o ovário e o hepatopâncreas foi investigada nestes fenótipos por meio dos índices gonadossomáticos (GSI) e hepatossomáticos (HSI). Apesar das diferenças morfológicas e das diferentes estratégias reprodutivas adotadas pelos fenótipos, os padrões macroscópicos, histoquímicos e ultraestruturais de desenvolvimento ovariano não mostraram diferenças entre estes. Os ovários foram macroscopicamente classificados em cinco estágios de desenvolvimento (I a V). Nos estágios iniciais I e II, os ovários estão repletos de ovogônias e ovócitos pré-vitelogênicos, onde a vitelogênese tem origem endógena. Estes ovócitos têm polissacarídeos neutros como sua principal reserva energética. Durante a vitelogênese endógena, o retículo endoplasmático rugoso (RER) recebe material eletrodense de aspecto granular oriundo do complexo de Golgi, que será compactado e formará grânulos de vitelo imaturo. A partir do estágio III, inicia-se a vitelogênese exógena sem a interrupção da vitelogênese endógena. A coloração esverdeada característica dos ovários de *M. amazonicum* aparece pela primeira vez neste estágio. Isto se deve ao acúmulo de grânulos de vitelo glicolipoproteicos que passam a preencher o citoplasma dos ovócitos. Na vitelogênese exógena, as células foliculares nutrem os ovócitos e o material extracelular é absorvido por vesículas endocíticas que são liberadas no citoplasma. Estas se fundem a outras vesículas e formam grânulos de vitelo maduro. Em *M. amazonicum*, os padrões de acréscimo nos diâmetros dos ovócitos são bastante similares entre os fenótipos, sendo maiores no fenótipo de pequeno porte. Isto está relacionado à formação de ovócitos/ovos maiores e a produção de grandes reservas lipídicas para suas larvas. As mudanças nos GSI e HSI ao longo do desenvolvimento ovariano mostram grande similaridade entre os fenótipos, suportando a histologia e ultraestrutura. Fêmeas em estágios III e IV mobilizam reservas do hepatopâncreas para a maturação do ovário, o que justifica os maiores valores de HSI registrados nestes estágios. Enquanto que fêmeas em estágios V apresentam altos valores de GSI e menores de HSI, indicando a mobilização de recursos para o final do desenvolvimento ovariano, estando prontas para desovar.

Palavras-chave: camarão amazônico, índices gonadossomáticos, índices hepatossomáticos, vitelogênese, reprodução.

2. Introdução

Em camarões carídeos gonocóricos, o sistema reprodutor feminino é constituído por um par de ovários conectados aos ovidutos que se abrem nos gonóporos do terceiro par de pereiópodos (BAUER, 2004). Nestas fêmeas, o desenvolvimento ovariano é marcado por transformações volumétricas e colorimétricas (CHANG e SHIH, 1995; SOONKLANG et al., 2012; KANGPANICH et al., 2016). Inicialmente, os ovários imaturos ocupam uma pequena área no cefalotórax e são incolores ou translúcidos, indicando a fase pré-vitelogênica. Ao iniciar a vitelogênese, grânulos de vitelo serão acumulados nos ovários modificando o volume e a coloração do órgão. Devido a tais alterações, o desenvolvimento ovariano pode ser dividido entre cinco a oito estágios em Caridae (HAEFNER e SPAARGAREN, 1993; SPAARGAREN e HAEFNER, 1994; CHANG e SHIH, 1995; SOONKLANG et al., 2012; KANGPANICH et al., 2016).

Na zona germinativa do ovário a ovogênese se inicia com a divisão mitótica das ovogônias (CHAVES e MAGALHÃES, 1993). Posteriormente, as ovogônias aumentam em tamanho, iniciam a meiose e ao fim deste processo migram para zonas periféricas do ovário, tornando-se ovócitos. Tais células iniciais, ovócitos pré-vitelogênicos, têm citoplasma preenchido por polirribossomos, ramos de retículo endoplasmático rugoso e complexos de Golgi, os quais iniciarão a produção dos precursores do vitelo na vitelogênese endógena ou primária (HINSCH e CONE, 1969; SOONKLANG et al., 2012; MOLLEMBERG et al., 2017). Ao iniciarem a vitelogênese exógena ou secundária, os ovócitos começam a apresentar grânulos de vitelo maduros no citoplasma, os quais servirão como reservas energéticas e ocuparão quase toda a célula. No final do processo de vitelogênese, os ovócitos maduros têm grande quantidade de grânulos de vitelo e gotas de lipídeos, prontos para a ovulação (ADIYODI e SUBRAMONIAN, 1983; JASMANI et al., 2000; ZARA et al., 2013; MOLLEMBERG et al., 2017).

O conhecimento dos aspectos morfológicos e histológicos do sistema reprodutor feminino ao longo de seu desenvolvimento ainda é incipiente em camarões carídeos (BRAGA et al., 2016). O principal modelo utilizado é o camarão gigante da malásia *Macrobrachium rosenbergii* (De Man, 1879), o qual foi descrito por meio de histologia, ultraestrutura e imunohistoquímica por Soonklang et al. (2012). Assim como esta espécie asiática, o camarão amazônico *M. amazonicum*

(Heller, 1862) apresenta grande potencial para a aquicultura mundial (NEW et al., 2010). Além disso, mostra grande distribuição nas Américas (Costa Rica até a Argentina) e é bastante consumido nas regiões norte e nordeste do Brasil. Populações de *M. amazonicum* apresentam grande flexibilidade reprodutiva e alta variabilidade intraespecífica (MACIEL e VALENTI, 2009; VERGAMINI et al., 2011; ANGER, 2013). Três tipos de fenótipos podem ser observados para a espécie, por meio da avaliação de sua história de vida, características morfológicas e reprodutivas, sendo eles: (a) populações anfídromas de grande porte, (b) hololimnéticas de grande e (c) pequeno porte (PASCHOAL, 2017 – Capítulo 4). Apesar de sua importância econômica e crescente utilização na aquicultura brasileira (MORAES-VALENTI e VALENTI, 2010), somente a tese de Ribeiro (2006) abordou a vitelogenese e avaliou a interação entre o ovário e o hepatopâncreas durante o ciclo reprodutivo em uma população anfídroma cultivada de *M. amazonicum*. Assim, os objetivos do presente estudo foram analisar de forma comparativa o desenvolvimento ovariano, além dos índices gonadossomáticos (GSI) e hepatossomáticos (HSI) nos três fenótipos conhecidos para *M. amazonicum* provenientes de populações naturais e de cultivo.

3. Material e métodos

3.1. Animais

Durante os meses de Agosto de 2015 a Abril de 2016, fêmeas de *M. amazonicum* com ciclo de vida anfídromo foram obtidas em tanques de cultivo no Laboratório de Carcinicultura do Centro de Aquicultura da UNESP (CAUNESP – Jaboticabal/SP). Estes animais cultivados são provenientes do município de Santa Bárbara do Pará, estado do Pará (Brasil), onde habitam áreas estuarinas com conexão oceânica (MEIRELES et al., 2013). Fêmeas apresentando desenvolvimento hololimnético foram coletadas no rio Grande (20° 30' 53" S; 46° 50' 16" W) na usina hidrelétrica (UHE) de Marechal Mascarenhas de Moraes (município de Cássia), e na UHE de Furnas (município de Carmo do Rio Claro) no estado de Minas Gerais, sudeste do Brasil. Durante os meses de Outubro de 2014 a Dezembro de 2015, animais foram obtidos por coleta ativa (uma peneira 60 cm de diâmetro e malha de 1,25 mm, deslocada durante 30 minutos por um coletor, ao longo da vegetação

marginal e bancos de macrófitas) e passiva (seis armadilhas com 85 cm comprimento X 35 cm largura/altura, iscadas com fígado bovino e retiradas após quatro horas). Imediatamente após a captura, os camarões foram transportados vivos em caixas térmicas com aeração para o laboratório e mantidos por um curto período de tempo (24 horas) em aquários com fundos escuros (45 x 25 x 30 cm), com cascalho basáltico como substrato e macrófitas e fragmentos de rochas para formação de refúgios (temperatura $25 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$).

3.2. Fenótipos e classificação macroscópica do desenvolvimento ovariano

A população anfídroma analisada apresenta fêmeas com grandes proporções corporais (\overline{CL} : $19,4 \pm 4,8$ mm) e carregam muitos ovos de pequeno volume quando estão ovígeras (MEIRELES et al., 2013). Além disso, esta população cultivada apresenta quatro morfótipos em machos (MORAES-RIODADES e VALENTI, 2004). No presente trabalho, a população de *M. amazonicum* da UHE de Marechal Mascarenhas de Moraes foi referida como população hololimnética de grande porte, pois apresentam indivíduos com grandes proporções corporais (\overline{CL} ♂: $13,05 \pm 5,08$; ♀: $14,80 \pm 3,41$ mm), quatro morfótipos em machos e fêmeas ovígeras com ovos de volumes intermediários. A população da UHE de Furnas, como população hololimnética de pequeno porte, uma vez que apresentam animais de tamanhos reduzidos (\overline{CL} ♂: $7,31 \pm 1,14$; ♀: $8,65 \pm 1,72$ mm), sem morfótipos para machos e possuem fêmeas ovígeras com fecundidade reduzida e ovos com volumes maiores (PASCHOAL, 2017 – Capítulos 2 e 4).

Em laboratório, a determinação sexual foi realizada pela inspeção dos caracteres sexuais secundários, posições dos gonóporos e pela dissecção do sistema reprodutor (BAUER, 2004). Após a sexagem, as fêmeas foram separadas e o desenvolvimento ovariano macroscópico foi dividido em cinco estágios, considerando a coloração do ovário e a proporção da área ocupada por tal órgão no cefalotórax, de acordo com Chang e Shih (1995) e Kangpanich et al. (2016). Posteriormente, 45 fêmeas de cada estágio ovariano para cada fenótipo (N: 675) tiveram o comprimento da carapaça (CL) mensurado com paquímetro analógico (0,02 mm) e foram pesadas em balança analítica (0,0001 g). Imediatamente, após estes procedimentos os animais foram dissecados e analisados. Adicionalmente, os

ovários de cada estágio foram checados com o guia de referência de cores Pantone® (Formula guide Solid Coated and Uncoated - GP1401), para padronizar as descrições da coloração ovariana ao longo do desenvolvimento. Assim, foi utilizado o intervalo entre os códigos das tonalidades mais claras e escuras das cores dos ovários em cada estágio.

3.3. Histologia, histoquímica e microscopia eletrônica de transmissão

Para as análises histológicas e histoquímicas, 225 fêmeas recém-coletadas (15 em cada estágio ovariano para os três fenótipos) foram anestesiadas por resfriamento (- 20°C / 5 minutos), dissecadas e tiveram fragmentos dos ovários fixados em paraformaldeído 4% por 24 horas. Posteriormente, os órgãos foram lavados duas vezes em tampão fosfato 0,2 M (pH 7,2), desidratados em uma série crescente de etanol (70 a 95%), embebidos e incluídos em historesina glicometacrilato Leica®. Após a microtomia, as lâminas foram coradas com hematoxilina & eosina (H&E) para a descrição histológica (ZARA et al., 2013). Para as análises histoquímicas foram utilizadas técnicas para proteínas (xylidine ponceau), polissacarídeos ácidos (azul de Alcian pH 1 e 2,5) e neutros (PAS - Ácido periódico de Schiff) e lipídeos (Sudan black B) (PEARSE, 1960; MELLO e VIDAL, 1980; JUNQUEIRA e JUNQUEIRA, 1983). As amostras para lipídeos não foram desidratadas durante a rotina histológica, sendo diretamente embebidas e incluídas em historesina (ZARA et al., 2012).

Para a microscopia eletrônica de transmissão (MET), fragmentos dos ovários com aproximadamente 1 mm³ foram fixados em glutaraldeído 2,5% em tampão cacodilato de sódio 0,08M (pH 7,2) por quatro horas a 4°C, pós-fixados com tetróxido de ósmio 1%, no mesmo tampão e contrastados “Enbloc” com acetato de uranila 1% aquoso (overnight a 4°C). As amostras foram desidratadas em séries crescentes de acetona (70 a 100%), embebidas e incluídas em resina Epon-Araldite®. Os cortes ultrafinos foram obtidos no ultramicrótomo Leica® UC7 e as grades com os cortes foram contrastadas com acetato de uranila 2% e citrato de chumbo 0,4%. Todas as amostras foram observadas e fotografadas no MET Jeol J1010 operado a 80 kV.

3.4. Medidas celulares

Os diâmetros celulares dos ovócitos ao longo do desenvolvimento do sistema reprodutor foram mensurados com o auxílio do software Leica® IM50, utilizando a calibração apropriada para as lentes da objetiva empregada. Os eixos maiores de 50 ovócitos em cada estágio ovariano para os três fenótipos foram mensurados (objetiva 20X) em lâminas coradas por H&E. Lâminas de pelo menos três fêmeas de cada fenótipo foram examinadas (ZARA et al., 2013). Adicionalmente, 50 ovos em estágio inicial de desenvolvimento embrionário para cada fenótipo (N: 150) tiveram os eixos maiores mensurados sob estereomicroscópio (Leica® - 4X), por meio do mesmo software. Diferenças entre os tamanhos médios dos ovócitos ao longo da ovogênese foram verificadas em cada fenótipo por meio do teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis (normalidade não satisfeita - W-Statistic: 0,97 - $p < 0,01$), com teste *a posteriori* de Tukey (α : 0,05) (GOTELLI e ELLISON, 2010).

O cório de 15 ovócitos de pelo menos três fêmeas com ovários em estágio final (V) de maturação foram mensurados nos três fenótipos de *M amazonicum*, por meio do mesmo método. Uma análise de variância (ANOVA) foi utilizada para verificar diferenças entre as espessuras dos córios nos fenótipos (GOTELLI e ELLISON, 2010).

3.5. Interação entre o sistema reprodutor e o hepatopâncreas

Após o reconhecimento do estágio gonadal, 450 fêmeas (30 em cada estágio ovariano para os três fenótipos) foram anestesiadas por resfriamento e tiveram os ovários e hepatopâncreas dissecados. Posteriormente, os órgãos e corpos foram desidratados individualmente em uma estufa a 70°C por 48 horas e logo após pesados em balança analítica (0,0001 g). Os índices gonadossomáticos (GSI) e hepatossomáticos (HSI) foram calculados com base na seguinte relação: $GSI/HSI = \text{peso seco individualizado do ovário ou hepatopâncreas} / \text{peso seco agrupado do indivíduo e dos órgãos} \times 100$ (PASCHOAL, 2017 – Capítulo 5). Como o pressuposto da normalidade não foi satisfeito (W-Statistic = 0,97 - $p < 0,001$), testes não-paramétricos de Kruskal-Wallis (α : 0,05), associados ao teste de comparação múltipla de Tukey foram utilizados para verificar diferenças nos GSI e HSI ao longo

do desenvolvimento do sistema reprodutor para cada fenótipo e entre os índices registrados para os três fenótipos (GOTELLI e ELLISON, 2010).

4. Resultados

Os ovários de *M. amazonicum* são órgãos pares e estão localizados no cefalotórax, dispostos acima do hepatopâncreas. Estes estão associados aos ovidutos que se abrem nos gonóporos dos coxopoditos do terceiro par de pereiópodos. Apesar das diferenças constatadas entre os tamanhos, pesos e tipos de investimento reprodutivo nas fêmeas dos três fenótipos (Tabela I), o sistema reprodutor feminino não apresenta diferenças anatômicas entre as populações analisadas. Em fêmeas de *M. amazonicum*, a maturação dos ovários é marcada pela transformação colorimétrica e volumétrica do ovário ao longo de seu desenvolvimento (Figura 1).

Ovários imaturos em estágio inicial (I) são incolores ou translúcidos [sem código na escala Pantone®] (Figura 1A). Possuem pequena proporção no cefalotórax e apresentam consistência gelatinosa. Podem apresentar cromatóforos em sua região dorsal. Este estágio é identificado somente por dissecção. Apresentam difícil visualização por transparência através da carapaça, não sendo aconselhável sua determinação por visualização devido a sua similaridade a ovários em estágio II.

Os ovários em estágio II apresentam coloração esbranquiçada ou fracamente amarelada [614-617 C/U Pantone®] (Figura 1B). Ocorre um aumento no tamanho e volume do ovário, em relação ao estágio anterior. Apresentam muitos cromatóforos em sua região dorsal. Sua visualização por transparência é difícil, devido à fraca coloração. Não é aconselhável sua determinação por visualização devido a sua similaridade a ovários em estágio I.

No estágio III ou intermediário (Figura 1C), os ovários apresentam pela primeira vez uma coloração totalmente esverdeada [372-376 C/U Pantone®] marcando o início da vitelogênese exógena, assim como o início da maturidade fisiológica. Essa coloração será mantida até o fim do ciclo ovariano. Neste estágio, os ovários possuem muitos cromatóforos em sua região dorsal. O incremento em tamanho e volume ainda é discreto. A visualização por transparência é fácil e pode ser registrada sem erros.

Ovários em estágio IV apresentam-se volumosos e com coloração esverdeada mais intensa [580-577 C/U Pantone®] quando comparada ao estágio III (Figura 1D). O incremento em tamanho e volume em relação ao estágio anterior é grande. A visualização por transparência é fácil e pode ser classificado facilmente. Recomenda-se a dissecação de fêmeas de pequeno porte e indivíduos menores da população de grande porte, pois podem apresentar similaridade a ovários em estágio V, uma vez que os ovários podem adentrar na cavidade celomática do cefalotórax da fêmea.

No estágio final (V) de desenvolvimento, os ovários são muito volumosos e verdes [354-357 C/UPantone®] (Figura 1E), com fácil visualização por transparência através da carapaça. Neste estágio, os ovócitos preenchem toda a cavidade celomática do cefalotórax da fêmea e o ovário estende-se até o primeiro somito abdominal.

Tabela I. Valores médios (\pm desvio padrão) de fecundidade (Fec.) e volume (mm^3) de ovos para fêmeas de *M. amazonicum* em populações anfídroma e hololimnética de grande e pequeno porte, e o comprimento de carapaça (CL), peso fresco (W), índices gonadossomáticos (GSI) e hepatossomáticos (HSI) e diâmetro dos ovócitos (OD) ao longo dos estágios de desenvolvimento do sistema reprodutor para tais populações. Letras diferentes indicam diferenças significativas em comparação por pares. * Meireles et al. (2013); ** Paschoal (2017 – Capítulo 4).

Fenótipo	Fec. - Volume	Estágio	CL (mm)	W (mm)	GSI (%)	HSI (%)	OD (μm)
Anfídromo	2.237 (± 586)*	I	16,71 ($\pm 1,43$)	4,1244 ($\pm 0,3516$)	0,32 ($\pm 0,24$) ^a	2,55 ($\pm 0,96$) ^a	44,39 ($\pm 12,68$) ^a
		II	15,86 ($\pm 2,55$)	3,6120 ($\pm 0,4943$)	0,73 ($\pm 0,42$) ^{ab}	3,29 ($\pm 1,42$) ^a	101,79 ($\pm 27,15$) ^b
		III	17,60 ($\pm 1,49$)	4,1006 ($\pm 0,8111$)	2,71 ($\pm 1,44$) ^b	3,28 ($\pm 1,01$) ^a	340,83 ($\pm 55,34$) ^c
		IV	17,00 ($\pm 1,21$)	3,8140 ($\pm 0,3363$)	7,36 ($\pm 1,60$) ^{bc}	3,02 ($\pm 1,14$) ^a	360,56 ($\pm 55,66$) ^{cd}
		V	16,26 ($\pm 1,52$)	3,1321 ($\pm 0,7254$)	13,88 ($\pm 2,63$) ^c	2,09 ($\pm 1,18$) ^a	415,68 ($\pm 50,00$) ^d
Hololimnético - Grande porte	1.063 (± 501)**	I	16,97 ($\pm 2,52$)	2,3504 ($\pm 0,0088$)	0,17 ($\pm 0,08$) ^a	1,73 ($\pm 1,39$) ^a	89,85 ($\pm 21,76$) ^a
		II	16,71 ($\pm 1,99$)	2,1563 ($\pm 0,5259$)	0,44 ($\pm 0,32$) ^{ab}	2,11 ($\pm 1,18$) ^a	175,33 ($\pm 31,71$) ^b
		III	15,98 ($\pm 3,84$)	1,6636 ($\pm 0,6478$)	2,06 ($\pm 1,44$) ^b	2,27 ($\pm 1,52$) ^a	340,63 ($\pm 67,24$) ^c
		IV	16,15 ($\pm 1,92$)	2,2085 ($\pm 0,9742$)	6,23 ($\pm 1,55$) ^{bc}	2,36 ($\pm 0,81$) ^b	388,19 ($\pm 66,78$) ^{cd}
		V	15,97 ($\pm 2,52$)	1,7209 ($\pm 1,0408$)	11,24 ($\pm 2,19$) ^c	2,55 ($\pm 1,47$) ^b	436,07 ($\pm 65,61$) ^d
Hololimnético - Pequeno porte	214 (± 67)**	I	7,48 ($\pm 0,96$)	0,3886 ($\pm 0,0462$)	0,29 ($\pm 0,16$) ^a	1,97 ($\pm 0,94$) ^a	120,67 ($\pm 27,07$) ^a
		II	7,56 ($\pm 1,05$)	0,4518 ($\pm 0,0957$)	0,50 ($\pm 0,23$) ^{ab}	1,47 ($\pm 0,55$) ^a	205,25 ($\pm 32,49$) ^b
		III	8,64 ($\pm 0,76$)	0,4520 ($\pm 0,0602$)	1,75 ($\pm 1,19$) ^b	1,77 ($\pm 0,69$) ^a	438,75 ($\pm 93,06$) ^c
		IV	8,84 ($\pm 0,72$)	0,4316 ($\pm 0,0918$)	8,51 ($\pm 3,67$) ^{bc}	1,77 ($\pm 0,77$) ^a	466,56 ($\pm 89,49$) ^{cd}
		V	8,87 ($\pm 0,55$)	0,4438 ($\pm 0,0685$)	14,89 ($\pm 5,85$) ^c	1,38 ($\pm 0,50$) ^a	647,74 ($\pm 94,80$) ^d

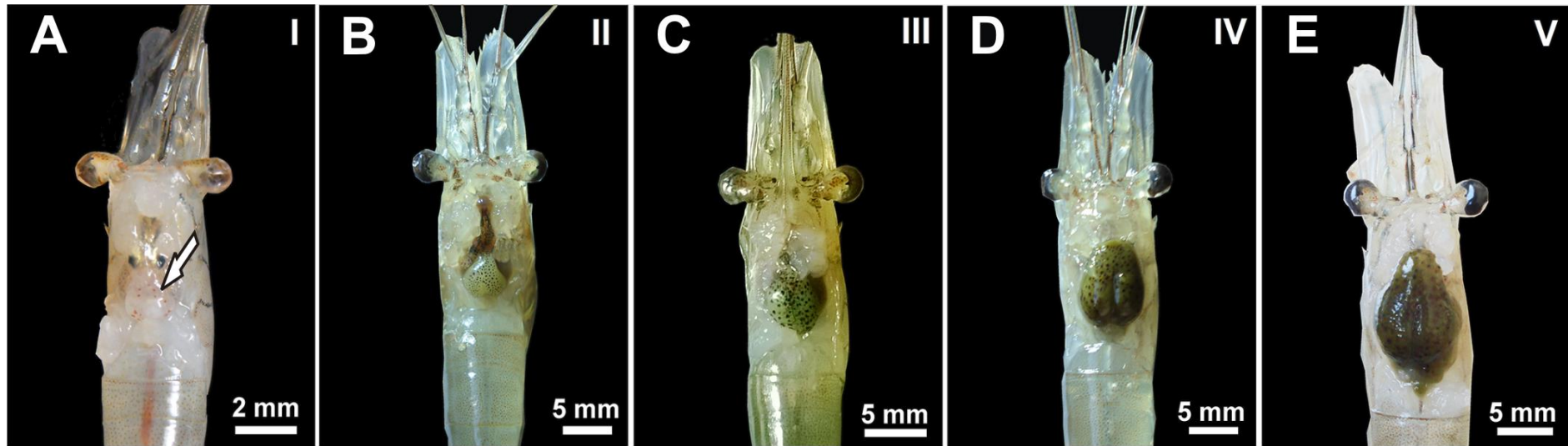


Figura 1. A-E. Vista dorsal de fêmeas de *M. amazonicum* evidenciando a posição, coloração e o tamanho do ovário no cefalotórax durante os cinco estágios de desenvolvimento (I-V).

Os ovários nos três tipos de fenótipos de *M. amazonicum* não mostram diferenças histológicas, histoquímicas e ultraestruturais ao longo de seu desenvolvimento (Figuras 2-4). Em todas as populações, os ovários em estágio de desenvolvimento inicial (I) apresentaram uma zona germinativa com a presença de muitas ovogônias, e ovócitos pré-vitelogênicos dispostos próximos a estes tipos celulares (Figura 2A-C). As ovogônias estão dispostas na porção central do ovário e têm volume nuclear elevado, em relação ao citoplasma, o qual é basófilo (Figura 2B). Os ovócitos pré-vitelogênicos mostram núcleos contendo blocos de heterocromatina dispersos e um ou dois nucléolos. Estas células têm citoplasma fortemente basófilo, agranular e homogêneo. Neste estágio, os ovócitos são envoltos por células foliculares altas com grandes núcleos. Pode-se perceber um incremento do tamanho dos ovócitos à medida que se afastam da zona germinativa (Figura 2A-C). Os ovócitos pré-vitelogênicos possuem o citoplasma fracamente e homogeneamente marcado para lipídeos (Figura 2D). O citoplasma destes ovócitos mostra intensa reação de aspecto granular para polissacarídeos neutros, com distribuição perinuclear em formato de anel (Figura 2E). Proteínas mostram forte reatividade citoplasmática para áreas próximas ao envoltório nuclear e nos nucléolos, enquanto que o citoplasma dos ovócitos é fracamente corado de forma homogênea (Figura 2F). Ovogônias e ovócitos pré-vitelogênicos não apresentam polissacarídeos ácidos em sua composição (não exibidos aqui).

A ultraestrutura dos ovócitos pré-vitelogênicos mostra que este tipo celular contém o citoplasma preenchido por grande quantidade de ribossomos, e em menor número, mitocôndrias e complexos de Golgi. Além disso, apresenta retículo endoplasmático rugoso (RER) com algumas dilatações (Figura 2G-J). Em sua região perinuclear encontram-se muitos grânulos eletrodensos ou *nuages*, correspondente as áreas fortemente coradas por proteínas. Além disso, o envoltório nuclear mostra muitos poros, e observam-se as *nuages* próximas aos poros, porém no citoplasma (Figura 2G). Neste tipo celular, o RER apresenta poucas dilatações com material eletrondenso granular em seu interior. Por entre o RER notam-se mitocôndrias e complexos de Golgi típicos (Figura 2H). Uma característica dos ovócitos em ovários de estágio I é a grande quantidade de polirribossomos livres que ocupam o citoplasma das células (Figura 2H-I). A continuidade do RER com o complexo de Golgi é observada nestes ovócitos, indicando que este recebe materiais oriundos do

RER por meio de vesículas de transporte, pequenas e eletrolúcidas, encontradas em sua face *cis* (Figura 2J).

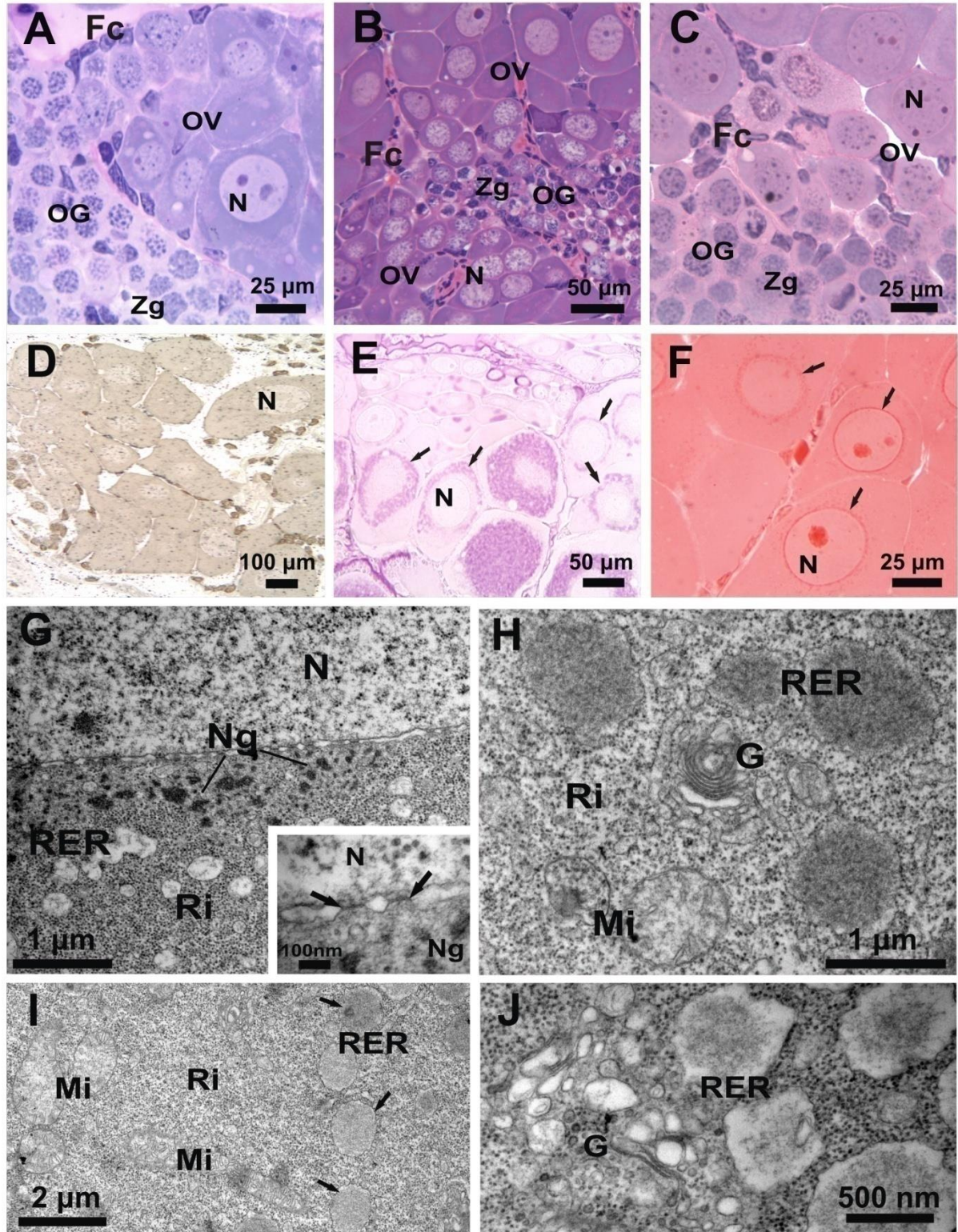


Figura 2. Ovário durante o estágio I em fêmeas anfídromas (A), e hololímnicas de grande (B) e pequeno porte (C) de *M. amazonicum*. A-C. Ovôgonias apresentando grandes núcleos e citoplasma basófilo estão dispostas na zona germinativa.

Ovócitos pré-vitelogênicos com núcleos contendo alguns blocos de heterocromatina e um ou dois nucléolos estão dispostos próximos as ovogônias [H&E]. **D.** Ovócitos pré-vitelogênicos mostram fraca reação para lipídeos [Sudan black B]. **E.** Forte reação de aspecto granular para polissacarídeos neutros no citoplasma dos ovócitos. Note que nos ovócitos pré-vitelogênicos a forte reação a PAS tem padrão perinuclear (setas pretas). **F.** Reação fracamente positiva para proteínas no citoplasma dos ovócitos, enquanto que os nucléolos e a área próxima ao envoltório nuclear (setas pretas) são fortemente corados a xylydine ponceau. **G.** Ovócito pré-vitelogênico mostrando citoplasma com RER dilatado e região perinuclear com muitos grânulos eletrodensos ou *nuages*. Note os poros nucleares (setas pretas), e as *nuages* depositadas no citoplasma, próximas a tais poros. **H.** Citoplasma mostrando mitocôndrias e complexo de Golgi entre o RER dilatado. **I.** Grande quantidade de ribossomos livres no citoplasma com a presença de algumas regiões com RER dilatado (setas pretas). **J.** Complexo de Golgi recebendo materiais de vesículas eletrolúcidas na face *cis*. G: complexo de Golgi; Fc: célula folicular; Mi: mitocôndria; N: núcleo; Ng: *nuage*; OG: ovogônias; OV: ovócitos; RER: retículo endoplasmático rugoso; Ri: ribossomos; Zg: Zona germinativa.

Os ovócitos no estágio II apresentam muitas vesículas lúcidas, as gotas de lipídeo e vesículas contendo material acidófilo, o vitelo endógeno, em seu citoplasma (Figura 3A-C). Os ovócitos são envoltos por células foliculares altas, constituindo um epitélio pavimentoso simples (Figura 3C). Os ovócitos mostram reação moderada para lipídeos, forte reação para proteínas e polissacarídeos neutros no interior das vesículas acidófilas, estando os polissacarídeos ácidos ausentes nesta célula. O vitelo endógeno é, portanto, constituído por glicolipoprotéínas (Figura 3D-F).

A ultraestrutura dos ovócitos pré-vitelogênicos de ovários em estágio II mostra que as emissões de *nuages* ao citoplasma diminuem e que os grânulos maiores destas emissões, tornam-se mais escassos quando comparados a fase anterior (Figura 3G). Todavia, o RER neste estágio celular encontra-se bastante dilatado e apresenta material eletrodense de aspecto granular em seu interior, o vitelo endógeno. A quantidade de vesículas com vitelo endógeno no citoplasma é muito maior quando comparado aos ovócitos no estágio anterior. Estas parecem se fundir umas com as outras para formar grânulos maiores de vitelo imaturo (endógeno). Por entre o RER, podem-se observar muitas mitocôndrias e complexos de Golgi (Figura 3H-I). Durante o estágio II de desenvolvimento ovariano, inicia-se a deposição de gotas de lipídeo no citoplasma dos ovócitos, onde pequenas gotas parecem sofrer fusão com gotas maiores (Figura 3J).

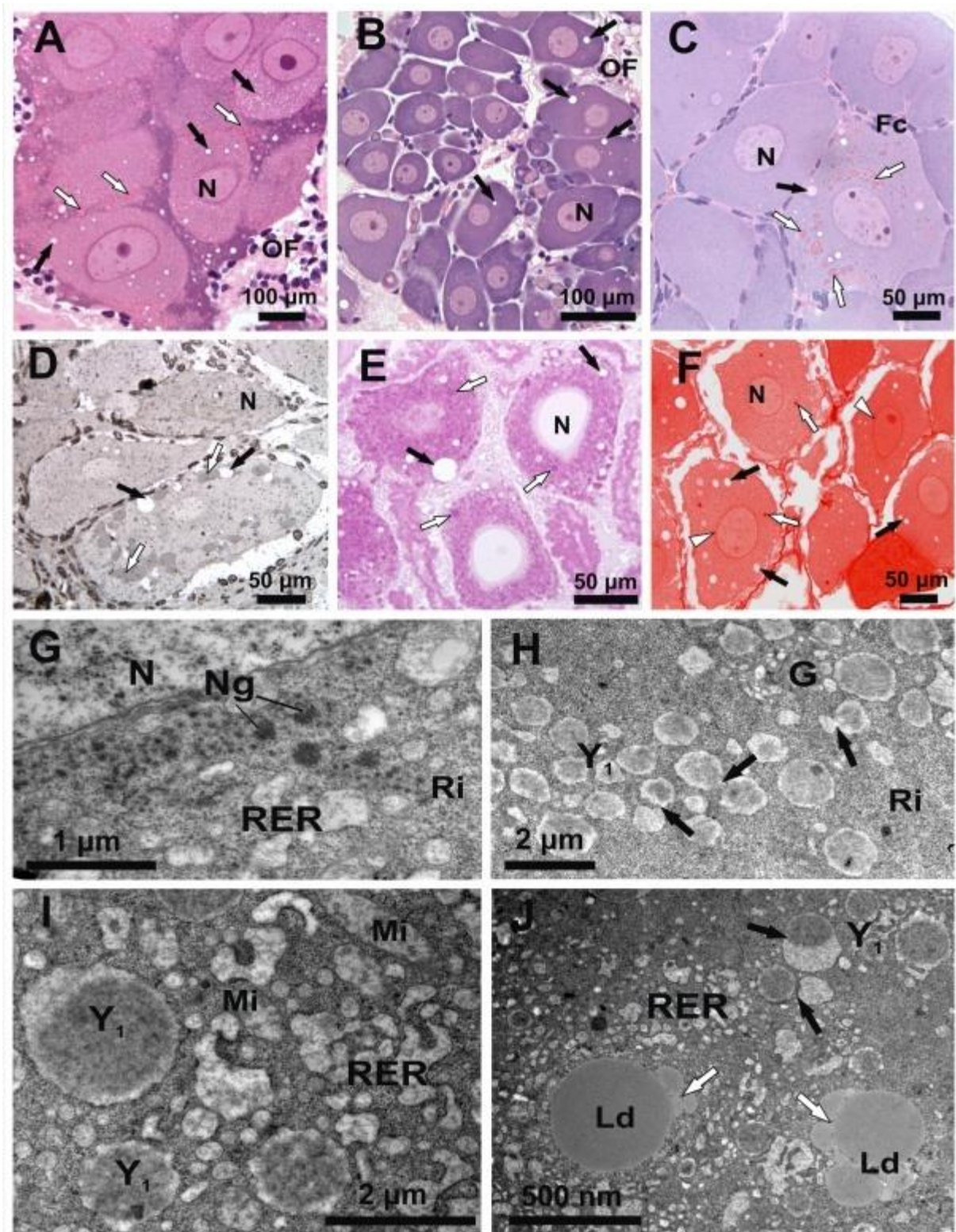


Figura 3. Ovário durante o estágio II em fêmeas anfídromas (A), e hololimnéticas de grande (B) e pequeno porte (C) de *M. amazonicum*. A-C. Ovócitos pré-vitelogênicos apresentando várias vesículas lúcidas (setas pretas) e vesículas com material acidófilo (setas brancas) em seu citoplasma basófilo. Estes ovócitos são envolvidos por células foliculares altas [H&E]. D. Vitelo endógeno ou gotas de lipídeos (setas brancas) são moderadamente corados a Sudan black B. Ainda é possível observar

vesículas lúcidas (setas pretas) próximas aos grânulos. **E.** Forte reação de aspecto granular para polissacarídeos neutros no citoplasma dos ovócitos, com alguns grânulos de vitelo (setas brancas) e vesículas lúcidas (setas pretas) dispersas no citoplasma [PAS]. **F.** Citoplasma de ovócitos pré-vitelogênicos apresentam reação moderada para proteínas e possuem muitas vesículas lúcidas (setas pretas). Vitelo endógeno (setas brancas) e a área próxima ao envoltório nuclear (cabeças de setas brancas) são fortemente corados a xylidine ponceau. **G.** Ovócito pré-vitelogênico mostrando citoplasma com RER bastante dilatado e região perinuclear com pouca *nuages*. **H-I.** Citoplasma mostrando RER bastante dilatado, com complexo de Golgi e mitocôndrias associadas a esta organela. As porções dilatadas do RER apresentam material granular eletrodense, o vitelo endógeno. Note a fusão de algumas vesículas contendo vitelo (setas pretas). **J.** Citoplasma contendo grânulos de vitelo imaturo (setas pretas) e gotas de lipídeos (setas brancas). Pode-se perceber a fusão de gotas lipídicas. Fc: célula folicular; G: complexo de Golgi; Ld: gota de lipídeo; Mi: mitocôndria; N: núcleo; Ng: *nuage*; OF: folículo ovariano; RER: retículo endoplasmático rugoso; Ri: ribossomos, Y₁: grânulo de vitelo imaturo.

Diferentemente dos estágios iniciais (I e II), os quais apresentam diferenças entre os tipos celulares, os ovários em estágios intermediário (III) e finais (IV e V) mostram ovócitos bem desenvolvidos com características histológicas, histoquímicas e ultraestruturais similares (Figura 4). A principal diferença entre estes estágios é a quantidade de grânulos de vitelo maduro acumulados nos ovócitos. Ovócitos em vitelogenese exógena ou secundária possuem muitos grânulos de vitelo acidófilos e gotas de lipídeos preenchendo o citoplasma. Os ovócitos estão envoltos por células foliculares achatadas que formam um epitélio pavimentoso simples (Figura 4A-C). Os grânulos de vitelo no citoplasma são irregulares e tem constituição glicolipoprotéica devido a sua forte reação a lipídeos, polissacarídeos neutros e proteínas, além de não apresentar reação a polissacarídeos ácidos (Figura 4D-F). A formação do cório tem início no estágio III, encontrando-se justaposto as células foliculares, sendo de constituição glicoprotéica, muito reativa a polissacarídeos neutros (Figura 4E-F). O cório foi mais espesso na população hololimnética de pequeno porte ($3,01 \pm 0,37 \mu\text{m}$), quando comparada às populações anfídroma ($2,22 \pm 0,60 \mu\text{m}$) e hololimnética de grande porte ($2,37 \pm 0,53 \mu\text{m}$) ($F: 9,43 - p < 0,001$).

Os ovócitos durante os estágios III a V têm a ultraestrutura do citoplasma marcada pela presença de grânulos de vitelo maduro, com gotas de lipídeos e vitelo endógeno ou imaturo entre estes. O início da vitelogenese exógena é marcado pelo acúmulo de grânulos de vitelo maduro no citoplasma. Os grânulos de vitelo maduros são maiores e seu conteúdo é homoganeamente eletrodense, enquanto que os grânulos imaturos (endógenos) são menores, menos eletrolúcidos e de aspecto

granular. Grânulos de vitelo imaturos parecem sofrer fusão uns com os outros. A partir do estágio III ocorre à deposição do cório, uma camada amorfa, espessa e irregular que está disposta entre as microvilosidades dos ovócitos e os prolongamentos das células foliculares. As células foliculares apresentam núcleo achatado com blocos de heterocromatina próximos ao envoltório nuclear e citoplasma preenchido por RER e grande quantidade de mitocôndrias (Figura 4G-I). Estas células bem como os ovócitos apresentam microvilosidades e por entre elas nota-se o cório eletrondenso, homogêneo e granular (Figura 4 H e J-L). Durante a vitelogênese exógena, a córtex ovocítica mostra vesículas endocíticas, formadas por vesículas recobertas de clatrina. Tal material irá se juntar ao vitelo imaturo (endógeno) para formar o vitelo maduro ou exógeno (Figura 4K-M).

Fêmeas de *M. amazonicum* apresentam padrões similares de aumento no diâmetro celular dos ovócitos ao longo do desenvolvimento ovariano. Contudo pode-se observar que o tamanho destas células é significativamente maior na população de pequeno porte ($H = 107,23$; $df: 2 - p < 0,001$), o que corrobora o maior tamanho dos ovos neste fenótipo (Figura 5 e Tabela I). Os diâmetros dos ovócitos diferiram ao longo dos estágios ovarianos nas populações anfídroma (anf. = $H: 205,06 - p < 0,001$) e hololimnética de grande (ghol. = $H: 205,56 - p < 0,001$) e pequeno porte (phol. = $H: 219,19 - p < 0,001$). Os diâmetros dos ovócitos pré-vitelogênicos dobram seu valores durante a passagem do estágio I para o II (Tukey: anf. = $4,76 - p < 0,05$; ghol. = $4,80 - p < 0,05$; e phol. = $4,73 - p < 0,05$). Ao iniciar a vitelogênese exógena no estágio III, os ovócitos podem duplicar ou triplicar suas dimensões (Tukey: anf. = $7,64 - p < 0,05$; ghol. = $6,96 - p < 0,05$; phol. = $7,11 - p < 0,05$). Posteriormente, o crescimento é estabilizado no estágio IV (Tukey: anf. = $3,02 - p \geq 0,05$; ghol. = $3,02 - p \geq 0,05$; phol. = $1,06 - p \geq 0,05$) e V (Tukey: anf. = $3,78 - p \geq 0,05$; ghol. = $2,48 - p \geq 0,05$; phol. = $6,00 - p \geq 0,05$) ocorrendo um menor aumento ($\sim 1 X$) no diâmetro dos ovócitos nestes estágios (Figura 5 e Tabela I).

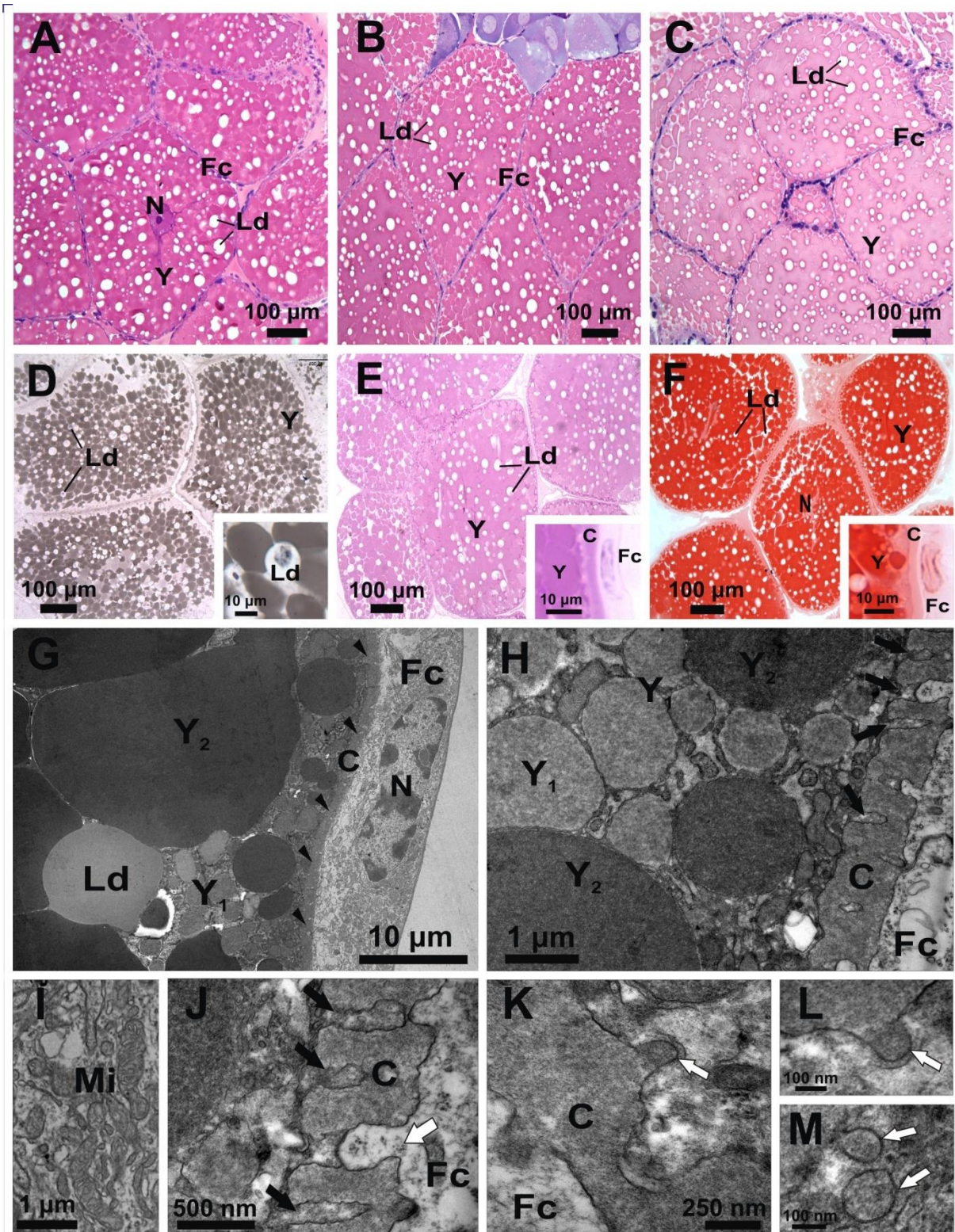


Figura 4. Ovário durante os estágios III a V em fêmeas anídromas (A), e hololimnéticas de grande (B) e pequeno porte (C) de *M. amazonicum*. A-C. Os ovócitos apresentam citoplasma totalmente preenchido por grânulos de vitelo acidófilos e gotas de lipídeos não coradas. Estes são envoltos por tecido conjuntivo e apresentam células foliculares achatadas [H&E]. D. Grânulos de vitelo e gotas de lipídeos são fortemente corados para Sudan black B. E-F. Ovócitos apresentam grânulos de vitelo fortemente reativos a polissacarídeos neutros e proteínas. O cório mostra forte reação a PAS e reação moderada a xylydine ponceau. G. Ovócito com

cório espesso e irregular (cabeças de setas pretas) mostrando citoplasma preenchido com grânulos de vitelo maduro, e entre eles, gotas de lipídeos e vitelo imaturo. A célula folicular que circunda o ovócito possui núcleo achatado com blocos de heterocromatina próximos ao envoltório nuclear. **H.** Cório justaposto a célula folicular apresentando microvilosidades (setas pretas). O citoplasma do ovócito é rico em grânulos de vitelo de maduros e imaturos. **I.** Grande quantidade de mitocôndrias dispersas no citoplasma da célula folicular. **J.** Célula folicular formando uma projeção (seta branca) no cório, em sentido ao citoplasma do ovócito. O cório mostra várias microvilosidades (setas pretas) em seu interior. **K-M.** Formação de vesículas endocíticas. Note a formação da capa de clatrina que irá recobrir totalmente as vesículas (setas brancas). C: cório; Fc: célula folicular; Ld: gota de lipídeo; Mi: mitocôndria; N: núcleo; Y: vitelo; Y₁: grânulo de vitelo imaturo; Y₂: grânulo de vitelo maduro.

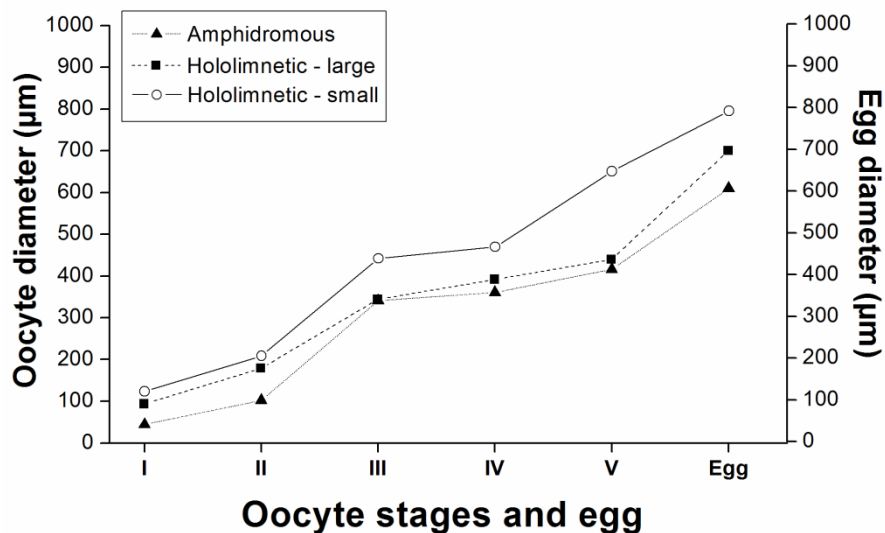


Figura 5. Diâmetro celular médio dos ovócitos durante os estágios de desenvolvimento ovariano e os tamanhos médios dos ovos nas populações anfídroma e hololimnética de grande e pequeno porte de *M. amazonicum*.

Os valores de GSI para fêmeas de *M. amazonicum* apresentam padrões similares de acréscimo ao longo do desenvolvimento ovariano, com maiores valores registrados em populações hololimnéticas de pequeno porte. Os valores de HSI não são similares entre os fenótipos e tendem a ser maiores na população anfídroma cultivada (Figuras 6-8 e Tabela I). Os valores de GSI diferiram entre os estágios de desenvolvimento ovariano nas populações de fêmeas anfídrômas (anf. = H: 48,45 - $p < 0,001$) e hololimnéticas de grande (ghol. = H: 135,81 - $p < 0,001$) e pequeno porte (phol. = H: 128,97 - $p < 0,001$) No entanto, não foram observadas diferenças significativas entre os índices ao longo do desenvolvimento sequencial dos ovários (Tukey: anf. = I-II: 1,22, II-III: 1,73, III-IV: 1,61 e IV-V: 1,60 - $p \geq 0,05$; ghol. = I-II:

0,75, II-III: 0,73, III-IV: 2,25 e IV-V: 1,60 - $p \geq 0,05$; e $phol.$ = I-II: 0,98, II-III: 2,13, III-IV: 0,17 e IV-V: 1,53 - $p \geq 0,05$). O maior incremento do GSI em fêmeas anfídromas e hololimnéticas de grande porte foi observado durante o início da vitelogênese exógena, na passagem do estágio II para o III (3,7 e 4,6 X, respectivamente). Na população de pequeno porte, o maior aumento de GSI foi registrado entre os estágios III e IV (4,9 X). Não foram registradas diferenças significativas entre os valores de HSI para a população anfídroma (H: 7,19 - p : 0,13) e hololimnética de pequeno porte (H: 10,44 - p : 0,06), porém foram verificadas diferenças na população hololimnética de grande porte em seus estágios finais (H: 13,74 - p : 0,01). De forma geral, os HSI apresentam maiores valores nos estágios II e III, até declinarem no estágio final (V) (Figuras 6-8 e Tabela I).

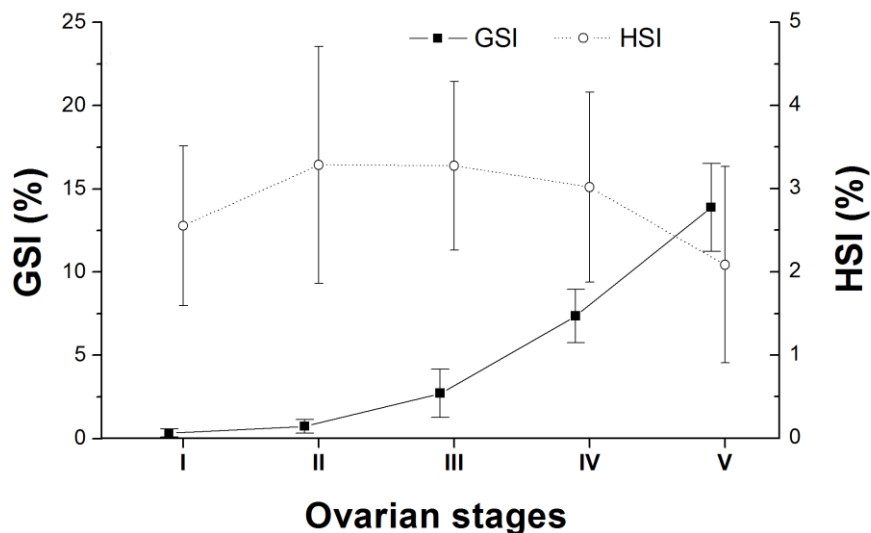


Figura 6. Valores médios e desvio padrão (suíças) dos índices gonadossomáticos (GSI) e hepatossomáticos (HSI), de acordo com o estágio de desenvolvimento do sistema reprodutor para fêmeas anfídromas de *M. amazonicum*.

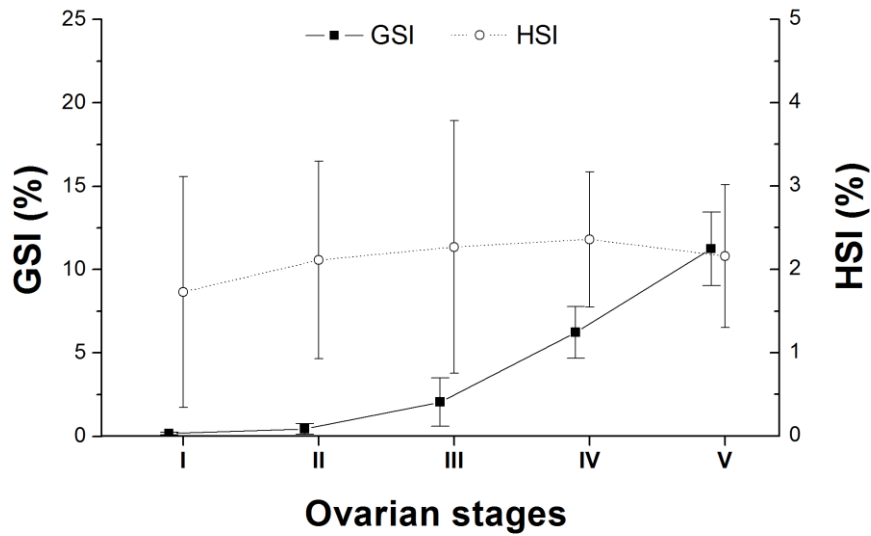


Figura 7. Valores médios e desvio padrão (suíças) dos índices gonadossomáticos (GSI) e hepatossomáticos (HSI), de acordo com o estágio de desenvolvimento do sistema reprodutor para fêmeas hololimnáticas de grande porte de *M. amazonicum*.

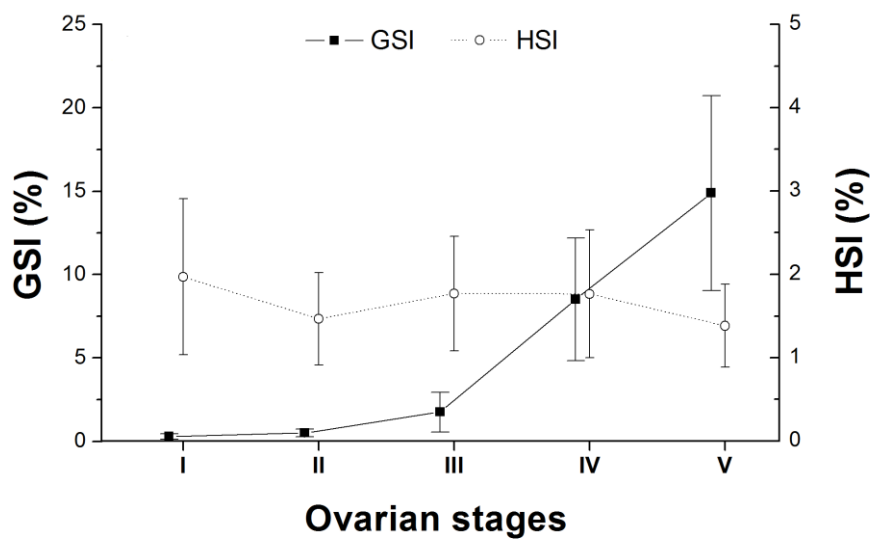


Figura 8. Valores médios e desvio padrão (suíças) dos índices gonadossomáticos (GSI) e hepatossomáticos (HSI), de acordo com o estágio de desenvolvimento do sistema reprodutor para fêmeas hololimnáticas de pequeno porte de *M. amazonicum*.

5. Discussão

Fêmeas dos três fenótipos de *M. amazonicum* apresentam um padrão macroscópico similar ao longo de sua maturação ovariana. Nesta espécie, o desenvolvimento ovariano é marcado por transformações colorimétricas e volumétricas, com cinco estágios bem definidos. À medida que os ovários amadurecem, grânulos de vitelo vão sendo progressivamente acumulados no citoplasma dos ovócitos. Tais grânulos são formados pelo acúmulo de vitelogenina, dentre outros precursores, além de pigmentos carotenoides. Os grânulos de vitelo são uma glicolipofosfocarotenoproteína e estes fazem com que o ovário altere seu padrão colorimétrico ao longo do desenvolvimento (ZARA et al., 2013). Assim em *M. amazonicum*, os ovários modificam-se de translúcidos com tamanhos reduzidos (estágio I), para tornarem-se esbranquiçados ou amarelados (estágio II), e finalmente esverdeados (estágios III a IV), até que ocupem quase que totalmente a cavidade celômica do cefalotórax das fêmeas (estágio V) (RIBEIRO, 2006).

Os ovários em estágio iniciais (I e II) de *M. amazonicum* apresentam uma zona germinativa central com a presença de muitas ovogônias, e ovócitos pré-vitelogênicos próximos a este tipo celular. Ambos os tipos celulares mostram citoplasma fortemente basófilo, muito reativo a hematoxilina. Este padrão é similar ao observado em outras espécies do gênero *Macrobrachium* (CARVALHO e PEREIRA, 1981; CHANG e SHIH, 1995; SOONKLANG et al., 2012). Chaves e Magalhães (1993) sugerem que a forte basofilia nas fases iniciais de desenvolvimento ovariano de *M. amazonicum*, se deve a abundância de RER e poliribossomos livres presentes nos ovócitos, sendo comprovado pelo presente estudo. Durante o processo de vitelogênese, grânulos de vitelo são gradualmente incorporados no citoplasma dos ovócitos mudando o caráter basófilo do citoplasma para acidófilo. Esta mudança se dá pela composição do vitelo acumulado e a redução das organelas citoplasmáticas da fase endógena da vitelogênese (HINSCH e CONE, 1969; CHAVES e MAGALHÃES, 1993; ROTLLANT et al., 2007; MOLLEMBERG et al., 2017). Ovogônias e ovócitos pré-vitelogênicos possuem citoplasma rico em organelas responsáveis pela síntese de glicoprotéínas e lipídeos. Posteriormente, à medida que os ovários amadurecem e os grânulos de vitelo vão sendo acumulados no citoplasma dos ovócitos, a quantidade de organelas

citoplasmáticas é reduzida de maneira significativa. Os grânulos de vitelo e as gotas de lipídeo serão utilizados como reservas energéticas pelos ovócitos e preencherão quase que totalmente os ovócitos maduros, reduzindo significativamente seu citoplasma (SAROJINI et al., 1981; CHANG e SHIH, 1995; ROTLLANT et al., 2007; RAVI et al., 2012; SOONKLANG et al., 2012; ZARA et al., 2013; BRAGA et al., 2016; MOLLEMBERG et al., 2017).

A deposição de polissacarídeos neutros aumenta com o desenvolvimento das células germinativas. As ovogônias, e principalmente os ovócitos pré-vitelogênicos apresentam pequenas reservas destes polissacarídeos dispersos de forma granular em seu citoplasma, indicando que são as primeiras reservas acumuladas durante a pré-vitelogênese em *M. amazonicum*. Nos estágios iniciais, polissacarídeos neutros são produzidos por síntese endógena nos ovócitos, o que explica o padrão perinuclear em formato de anel. Posteriormente, serão obtidos por meio dos espaços intracelulares e irão se acumular no citoplasma e nas inclusões de vitelo nos ovócitos vitelogênicos. Apesar da escassez de estudos histoquímicos com o gênero *Macrobrachium*, esse tipo de padrão de reserva foi registrado em *M. kistiniensis* (Tiwari, 1952) por Sarojini et al. (1981), assim como em outros crustáceos decápodes (JOHNSON, 1980; ZARA et al., 2013, BRAGA et al., 2016; MOLLEMBERG et al., 2017). As diferenças nos padrões de reatividade a proteínas no citoplasma e na região perinuclear dos ovócitos pré-vitelogênicos estão relacionadas à produção de vitelo endógeno. A coloração positiva de forma homogênea no citoplasma destes ovócitos está associada à produção de proteínas no RER, onde tais organelas encontram-se dilatadas nas fases iniciais de desenvolvimento ovariano (ZARA et al., 2013; MOLLEMBERG et al., 2017). Por outro lado, a região perinuclear é fortemente corada, isso se deve a grande quantidade de grânulos eletrodensos ou *nuages* nesta área. Durante a ovogênese, ocorre a segregação do nucléolo e a consequente emissão de *nuages* ao citoplasma por meio dos poros nucleares. Acredita-se que estes grânulos apresentem ribonucleoproteínas e proteínas básicas em sua composição, e são maiores durante a vitelogênese endógena (ROTLLANT et al., 2007; SOONKLANG et al., 2012). Assim, neste trabalho, demonstramos que tais *nuages* são as subunidades ribossomais, ricas em proteínas acumuladas para a montagem futura de polirribossomos livres ou aderidos ao retículo. Ovócitos vitelogênicos em ovários nos estágios III, IV e V apresentam características bastante similares para os grânulos

de vitelo, com padrões de reservas energéticas constantes durante o desenvolvimento ovariano. Histoquimicamente, os grânulos de vitelo para todos os fenótipos de *M. amazonicum* foram fortemente corados para lipídeos, polissacarídeos neutros e proteínas, e não foram corados para polissacarídeos ácidos. Este padrão histoquímico é similar daquele constatado em congêneres (SAROJINI et al., 1981) e foi registrado por Zara et al. (2013) no caranguejo-azul, *Callinectes danae* Smith, 1869, por Braga et al. (2016) no carídeo protândrico *Exhippolysmata oplophoroides* (Holthuis, 1948) e por Molleberg et al. (2017) nos mitracídeos, *Damithrax hispidus* (Herbst, 1790), *Damithrax tortugae* (Rathbun, 1920), *Mithraculus forceps* A. Milne-Edwards, 1875 e *Omalacantha bicornuta* (Latreille, 1825). Os autores apontam que os grânulos de vitelo contêm glicoproteínas e lipoproteínas, e não possuem polissacarídeos ácidos em sua composição, concordando os resultados obtidos no presente estudo.

Em *M. amazonicum*, a vitelogênese endógena apresenta duas fases, uma no estágio I e outra no estágio II, enquanto que a vitelogênese exógena tem apenas uma fase durante os estágios III a V. No estágio I, observamos por meio da ultraestrutura a dinâmica das *nuages* nos ovócitos. Estas são constituídas por um agregado de ribossomos e proteínas, e apresentam-se em grande quantidade na região perinuclear. Após a segregação do nucléolo, *nuages* são remetidas ao citoplasma por meio dos poros nucleares e gradativamente se afastam em direção a periferia do citoplasma. Posteriormente, originam granulações que ocuparão grande parte do citoplasma de ovócitos pré-vitelogênicos. Neste estágio, o citoplasma é ocupado por uma grande quantidade de ribossomos livres e apresenta o RER com algumas dilatações. Estes padrões ultraestruturais são similares ao descrito para *M. rosenbergii* por Soonklang et al. (2012) e para o caranguejo-aranha *Libinia emarginata* Leach, 1815 por Hinsch e Cone (1969). Durante o estágio II, as emissões de *nuages* tornam-se menores e RER mostra-se bastante dilatado, apresentando material eletrodense de aspecto granular em seu interior. Este material é responsável por formar massas de vitelo endógeno. A continuidade do RER com o complexo de Golgi mostra que a última organela é responsável por modificar o material oriundo do RER e enviá-lo ao citoplasma. Dessa forma, o RER e o complexo de Golgi são responsáveis pela síntese de vitelo neste estágio. A produção de vitelo endógeno por meio da diferenciação progressiva do RER, assim como a participação do complexo de Golgi na síntese de material granular para a

formação de grânulos de vitelo imaturo é descrita para alguns braquiúros e camarões carídeos (HINSCH e CONE, 1969; EURENIUS 1973; RAVI et al., 2012; SOONKLANG et al., 2012; MOLLEMBERG et al., 2017). A vitelogênese exógena inicia-se em ovários em estágio III, onde a endocitose apresenta um papel importante na incorporação de vitelo extracelular. Nesta fase, os ovócitos apresentam várias microvilosidades e ocorre a deposição do cório, separando os ovócitos das células foliculares. Além disso, as células foliculares adquirem aspecto de célula secretora, alterando sua morfologia e emitindo projeções no sentido do citoplasma dos ovócitos. Estas células mostram ser a primeira fonte de vitelo exógeno em *M. amazonicum*. O material extracelular é absorvido por vesículas endocíticas que inicialmente são recobertas por proteínas, e irão se unir a grânulos de vitelo imaturo dando origem ao vitelo maduro. Após o início da vitelogênese exógena, a vitelogênese endógena não é interrompida. Todavia, a quantidade de grânulos de vitelo endógeno diminui, enquanto que os grânulos de vitelo exógeno aumentam em número e tamanho. Este padrão de heterossíntese na formação de grânulos de vitelo e de deposição destes no citoplasma parece ser comum em crustáceos decápodes (HINSCH e CONE, 1969; ROTLLANT et al., 2007; RAVI et al., 2012; SOONKLANG et al., 2012; MOLLEMBERG et al., 2017). A participação das células foliculares na fase exógena da vitelogênese em *M. amazonicum* pode seguir as mesmas etapas descritas para *M. rosenbergii*. Nesta espécie, as células foliculares e o hepatopâncreas são responsáveis por produzir e acumular precursores do vitelo (e.g. vitelogenina). O hepatopâncreas libera este precursor na hemolinfa que se une ao precursor das células foliculares. Posteriormente, as células foliculares secretam esse vitelo ao ovócito por endocitose. Dentro dos ovócitos, pequenas vesículas contendo este vitelo sofrem modificações estruturais e se fundem a grânulos imaturos ou maduros de vitelo, formando grandes grânulos de vitelo maduro (SOONKLANG et al., 2012).

Ovócitos de fêmeas de *M. amazonicum* apresentam padrões similares de acréscimo em seu diâmetro durante o desenvolvimento ovariano, e são significativamente maiores na população hololimnética de pequeno porte, assim como seus ovos. Jalihal et al. (1993) apontam que camarões do gênero *Macrobrachium* exibem vários tipos de desenvolvimento larval e os associa ao tamanho e número de ovos na postura. Os autores sugerem que animais com poucos ovos de grande volume apresentam menos estágios larvais (i.e.

desenvolvimento abreviado: ≤ 3 estágios) quando comparados a animais com muitos ovos de pequeno volume (i.e. desenvolvimento prolongado: > 8 estágios). Por meio dos resultados obtidos, seria esperado que a população hololimnética de pequeno porte estivesse abreviando o número de estágios larvais estabelecidos para a espécie (9 a 11 estágios – MACIEL e VALENTI, 2009), uma vez que apresentou maior tamanho de ovócitos e, conseqüentemente dos ovos, quando comparadas as demais populações. No entanto, tal abreviação não foi observada nos estágios iniciais de larvas obtidas em camarões de pequeno porte (PASCHOAL, 2017 – Capítulo 4). O autor verificou que o número de gotas lipídicas nos hepatopâncreas destas larvas é próximo a de animais anfídromos, os quais mostram grande quantidade em seu corpo. Desta forma, acreditamos que fêmeas de pequeno porte deslocam mais energia para formação de ovócitos/ovos maiores e tendem a produzir mais reservas lipídicas para as larvas.

O incremento de GSI foi maior durante a transição de ovários em estágios II para III em animais anfídromos e hololimnéticos de grande porte e entre os estágios III e IV para animais de pequeno porte, com os maiores picos de HSI registrados entre estas transições. Em *M. amazonicum*, o estágio III marca o começo da vitelogênese exógena para a espécie, com o início do acúmulo de vitelo nos ovócitos. Paschoal (2017 – Capítulo 5) verificou que fêmeas de *M. amazonicum* com ovários em estágio III (intermediário) e IV (início da fase final) apresentam maiores valores de HSI, enquanto que fêmeas com ovários em estágio V apresentam baixos valores de HSI e altos de GSI. Além disso, este autor constatou que fêmeas em estágio V acumulam grande quantidade de lipídeos em seus ovários e hepatopâncreas, indicando que estas fêmeas estão com os ovários preparados para a desova e que os hepatopâncreas deslocam nutrientes para este órgão. Estes padrões são comumente observados em decápodes, onde fêmeas em estágios iniciais e intermediários tendem a mobilizar as reservas do hepatopâncreas para a maturação das gônadas, apresentando maiores valores de HSI. Enquanto que fêmeas em estágios finais de desenvolvimento apresentam um maior crescimento ovariano confirmado por maiores valores de GSI, indicando que os ovários estão prontos para desova e que as reservas dos hepatopâncreas foram utilizadas durante a vitelogênese (ZARA et al., 2013).

6. Conclusão

O padrão de desenvolvimento ovariano de *M. amazonicum* é similar ao descrito para outros decápodes e não existem diferenças nos padrões macroscópicos, histológicos, histoquímicos e ultraestruturais entre os três fenótipos analisados. Além disso, os padrões de acréscimo nos diâmetros celulares dos ovócitos e das mudanças nos GSI e HSI ao longo do desenvolvimento ovariano são bastante similares entre tais fenótipos. Nesta espécie, a vitelogênese tem duas fases distintas, a endógena (estágios I e II) e exógena (estágios III a V). Na vitelogênese endógena, o RER e o complexo de Golgi são responsáveis pela síntese de vitelo. Vesículas contendo material eletrodense de aspecto granular são produzidas nos complexos de Golgi, posteriormente o RER recebe tais vesículas, as quais serão compactadas e formarão grânulos de vitelo imaturo. Com o início da vitelogênese exógena no estágio III, os grânulos de vitelo compostos por glicolipoprotéínas passam a preencher o citoplasma dos ovócitos e serão utilizados como reservas energéticas. Nesta etapa, células foliculares nutrem os ovócitos e pequenas vesículas são liberadas ao citoplasma por meio de endocitose, estas se fundem a outras vesículas, até formarem grandes grânulos de vitelo maduro. Em *M. amazonicum*, os ovários em estágios III a V se diferenciam apenas pelo o aumento gradual de ovócitos vitelogênicos e a redução de ovócitos pré-vitelogênicos ao longo da maturação ovariana. Fêmeas de pequeno porte deslocam mais energia (maiores valores de GSI) para formação de ovócitos/ovos maiores quando comparadas as demais populações e isso pode estar relacionado à produção de reservas lipídicas as larvas dessa população.

7. Referências

ADIYODI, R.G.; SUBRAMONIAN, T. Arthropoda-Crustacea. In: ADIYODI, K.G.; ADIYODI, R.G. (Eds.). **Reproductive Biology of Invertebrates, Oogenesis, Oviposition and Oosorption**. 1st ed. New York: Wiley – Sons, 1983. p. 443–495.

ANGER, K. Neotropical *Macrobrachium* (Caridea: Palaemonidae): on the biology, origin, and radiation of freshwater-invading shrimp. **Journal of Crustacean Biology**, vol. 33, n. 2, p. 151-183. 2013.

BAUER, R.T. **Remarkable shrimps. Adaptations and Natural History of the Carideans**. 1st ed. Oklahoma: University of Oklahoma Press, 2004, 282 p.

BRAGA, A.A. et al. Histological and histochemical features of the oogenesis in the simultaneous protandric hermaphrodite shrimp *Exhippolysmata oplophoroides* (Decapoda: Caridea). **Micron**, vol. 88 p. 60–67. 2016.

CARVALHO, H.A.; PEREIRA, M.C.G. Descrição dos estádios ovarianos de *Macrobrachium acanthurus* (Wiegmann, 1836) (Crustacea, Palaemonidae) durante o ciclo reprodutivo. **Ciência e Cultura**, vol. 33, n. 10, p. 1353-1359. 1981.

CHARNIAUX-COTTON, H. Control of vitellogenesis in Crustacea. **American Zoologist**, vol. 25, p. 197-206.1985.

CHANG, C-F.; SHIH, T-W. Reproductive cycle of ovarian development and vitellogenin profiles in the freshwater prawns, *Macrobrachium rosenbergii*. **Invertebrate Reproduction & Development**, vol. 27, n.1, p. 11-20. 1995.

CHAVES, P.T.C.; MAGALHÃES, C.O. O desenvolvimento ovocitário em *Macrobrachium amazonicum* (Heller, 1862) (Crustacea: Decapoda: Palaemonidae), camarãodulcícula da região amazônica. **Acta Amazonica**, vol. 23, p. 17-23. 1993.

EURENIUS, L. An electron microscope study on the developing oocytes of the crab *Cancer pagurus* L. with special reference to yolk formation (Crustacea). **Zoomorphology**, vol. 75, n. 3, p. 243-254. 1973.

GOTELLI, N.J.; ELLISON, A.M. **A Primer of Ecological Statistics**. 1st ed. Massachusetts: Sinauer Associates, Inc. Sunderland, 2004. 510 p.

HAEFNER, P.A.; SPAARGAREN, D.H. Interactions of ovary and hepatopancreas during the reproductive cycle of *Crangon crangon* (L.). I. Weight and volume relationships. **Journal of Crustacean Biology**, vol. 13, n.3, p. 523-531.1993.

HINSCH, GW; CONE, V. Ultrastructural observations of vitellogenesis in the spider crab, *Libinia emarginata* L. **Journal of Cell Biology**, n. 40, p. 336–342. 1969.

JALIHAL, D.R.; SANKOLLI, K.N.; SHENOY, S. Evolution of larval developmental patterns and the process of freshwaterization in the prawn genus *Macrobrachium* Bate, 1868 (Decapoda, Palaemonidae). **Crustaceana**, vol. 65, p. 365-376. 1993.

JASMANI, S. et al. Hemolymph vitellogenin levels during ovarian development in the kuruma prawn *Penaeus japonicus*. **Fisheries science**, vol. 66, p. 535–539. 2000.

JOHNSON, P.T. **Histology of the blue crab *Callinectes sapidus*: a model for the Decapoda**. New York: Praeger, 1980.

JUNQUEIRA, L.C.U.; JUNQUEIRA, L.M.M.S. **Técnicas Básicas de Citologia e Histologia**. 1ed. São Paulo: Ed. Santos, 1983, 123 p.

KANGPANICH, C. et al. Effects of arachidonic acid supplementation in maturation diet on female reproductive performance and larval quality of giant river prawn

(*Macrobrachium rosenbergii*). **PeerJ**, vol. 4: e2735. 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.7717/peerj.2735>>. Acesso em: 21 jan. 2017.

MACIEL, C.R.; VALENTI, W.C. Biology, fisheries, and aquaculture of the amazon river prawn *Macrobrachium amazonicum*: a review. **Nauplius**, vol.17, p. 61-79. 2009.

MEIRELES, A.L.; VALENTI, W.C.; MANTELATTO, F.L. Reproductive variability of the Amazon River prawn, *Macrobrachium amazonicum* (Caridea, Palaemonidae): influence of life cycle on egg production. **Latin American Journal of Aquatic Research**, vol. 41, n.4, p. 718-731. 2013.

MELLO, M.L.S.; VIDAL, B.C. **Práticas de biologia celular**. 1 ed. Campinas: Funcamp, 1980, 71p.

MOLLEMBERG, M.; ZARA, F.J.; SANTANA, W. Morphology and ultrastructure of the adult ovarian cycle in Mithracidae (Crustacea, Decapoda, Brachyura, Majoidea). **Helgoland Marine Research**, vol. 71, p. 1-14, 2017.

MORAES-RIODADES, P.M.C.; VALENTI, W.C. Morphotypes in male amazon river prawns, *Macrobrachium amazonicum*. **Aquaculture**, vol. 236, p. 297–307. 2004.

MORAES-VALENTI, P.M.; VALENTI, W.C. Culture of the Amazon River Prawn *Macrobrachium amazonicum*. In: NEW, M.B. et al. (Eds). **Freshwater prawns: biology and farming**. 1st ed. Oxford: Wiley-Blackwell, 2010. p. 485-501.

NEW, M.B. et al. **Freshwater prawns: biology and farming**, 1st ed. Oxford: Wiley-Blackwell, 2010, 544 p.

PEARSE, A.G.E. **Histochemistry: Theoretical and Applied**. London: J&A Churchill, 1960. 998 p.

RAVI, R.; MANISSERI, M.K.; SANIL, N.K. Ovarian maturation and oogenesis in the blue swimmer crab, *Portunus pelagicus* (Decapoda: Portunidae). **Acta Zoologica**, vol. 94, n. 3, p. 291-299. 2013.

RIBEIRO, K. **Aspectos estruturais do hepatopâncreas, desenvolvimento ovocitário e caracterização hormonal de fêmeas de *Macrobrachium amazonicum* durante as fases de maturação gonadal**. 109 f. Tese de Doutorado (Doutorado em Aquicultura). Universidade Estadual Paulista - UNESP, Jaboticabal. 2006.

ROTLLANT, G. et al. Ovarian maturation of the multi-spawning spider crab *Maja brachydactyla* (Decapoda: Majidae) with special reference to yolk formation. **Marine Biology**, vol. 152, n. 2, p. 383-394. 2007.

SAROJINI, R.; MIRAJKAR, M.S.; NAGABHUSHANAM, R. Histochemistry of the ovary of *Macrobrachium kistnensis*. **Proceedings of the Indian Academy of Sciences (Animal Sciences)**, vol.90, n. 5, p. 577-583. 1981.

SOONKLANG, N. et al. Ultrastructure of differentiating oocyte and vitellogenesis in the giant fresh water prawn, *Macrobrachium rosenbergii* (de Man). **Microscopy Research and Technique**, vol. 75, p. 1402–1415. 2012.

SPAARGAREN, D.H.; HAEFNER, P.A. Interactions of ovary and hepatopancreas during the reproductive cycle of *Crangon crangon* (L.). II. Biochemical relationships. **Journal of Crustacean Biology**, vol. 14, n.1, p. 6-19.1994.

VERGAMINI, F.G.; PILEGGI, L.G.; MANTELATTO, F.L. Genetic variability of the Amazon River prawn *Macrobrachium amazonicum* (Decapoda, Caridea, Palaemonidae). **Contributions to Zoology**, vol. 80, p. 67-83. 2011.

ZARA, F.J. et al. The ovarian cycle histochemistry and its relationship with hepatopancreas weight in the blue crab *Callinectes danae* (Crustacea: Portunidae). **Acta Zoologica (Stockholm)**, vol. 94, p. 134-146. 2013.

ZARA, F.J. et al. Spermatogenesis, spermatophore and seminal fluid production in the adult blue crab *Callinectes danae* (Portunidae). **Journal of Crustacean Biology**, vol. 32, n. 2, p. 249-262. 2012.

Capítulo 7

**How to determine sperm count in caridean shrimps? Description of
a simple protocol developed for the Amazon River prawn**

***Macrobrachium amazonicum* (Heller, 1862)**

Aquaculture, em avaliação

How to determine sperm count in caridean shrimps? Description of a simple protocol developed for the Amazon River prawn *Macrobrachium amazonicum* (Heller, 1862)

1. Abstract

Sperm count is an important quality assessment tool in farming programs and stock improvement in crustaceans. However, this procedure is still little used in caridean shrimps, and standardization of appropriate techniques for the group is lacking. In this study, we propose a simple protocol adapted to determine sperm count in carideans using as model the Amazon River prawn *Macrobrachium amazonicum*. Males of dominant morphotypes (GC1 and GC2) of this species with amphidromous and hololimnetic life cycles were collected and carefully dissected. The ejaculatory duct was removed from the vas deferens and dissociated in a solution of distilled water (9 μ l) and methylene blue (1 μ l). Subsequently, 1 μ l of this new solution was added to distilled water (9 μ l), and then 1 μ l was pipetted and quantified in a Neubauer chamber. The feasibility of this technique was also evaluated in animals preserved (5 - 480 days) in 70% ethanol from collections and the structural morphology of spermatozoa (spz) was examined. Despite morphometric differences observed for the different types of males, the mean sperm count was similar for the species. In amphidromous animals, 60,258 spz/ μ l were observed for GC1 and 65,308 spz/ μ l for GC2, while in hololimnetic prawns, 48,950 spz/ μ l were found in GC1 and 53,850 spz/ μ l in GC2. The variation in sperm count among animals preserved for different periods of time was small and very similar to those of fresh animals. Also, no microscopic changes in the structures of spz were observed. This technique can be applied to obtain a spermiogram in fresh as well as preserved animals, being especially important in studies with animals examined in population studies and deposited in collections or laboratories. This technique can be used as a general model for spermiogram in carideans due to the great similarity of male reproductive systems within the group.

Keywords: spermatozoa, spermogram, morphotypes, animals preserved in ethanol, Caridea.

2. Introduction

The vast majority of carideans are gonochoric and clearly sexually dimorphic. However, in this Infraorder, sex change during lifetime (i.e. hermaphroditism) has been reported for several species. Even with many types of sexual systems, the processes of spermatogenesis and spermiogenesis are similar in gonochoric or hermaphrodite carideans (SAGI et al., 1988; BAUER, 2000; BRAGA et al., 2005; SILVA et al., 2009; NUNES et al., 2010). Spermatogenesis in carideans occurs in the seminiferous tubules of the testicles, and their spermatogonia and spermatocytes have similar characteristics to those of other invertebrates (BRAGA et al., 2005; POLJAROEN et al., 2010). Nevertheless, the latter authors demonstrated that upon entering spermiogenesis, spermatids undergo a differentiation process with unique traits to the group. At the end of this process, tailless and immotile spermatozoa resembling an inverted umbrella are moved to the vas deferens.

The male reproductive system in gonochoric carideans consists of a pair of testicles associated to two vasa deferentia. The testicle is located dorsally on the cephalothorax, between the hepatopancreas and the heart, and is composed of two elongated lobes. The vasa deferentia are connected laterally to the testicle, opening into the gonopores of the fifth pair of pereopod via a genital pore. The diameter of these ducts increase distally and can be divided into three regions according to their anatomical position: proximal, medial, and distal. The proximal region is short, thin, and connected to a long, convoluted medial region, while the distal region is dilated, forming the ejaculatory duct (ED). This portion contains spermatozoa surrounded by secretion and serve as temporary storage of sperm masses until ejaculation (BAUER, 1976, 2004; CHOW et al., 1982; POLJAROEN et al., 2010; MANJÓN-CABEZA et al., 2011).

Knowledge of sperm morphology and production, as well as preservation, quality, density, and possible effects of nutrition are key tools in any shellfish farming program with emphasis on carideans (CHOW et al., 1985; SAMUEL et al., 1999; DANIELS et al., 2010; MORAES-VALENTI and VALENTI, 2010). The results obtained with the use of these practices can be easily seen with increase in production of the giant river prawn *Macrobrachium rosenbergii* (De Man, 1879) as reported by New (2010). With an annual global production of over 215,000 tons in 2014, this is the most farmed freshwater prawn species worldwide (FAO, 2016).

Despite that, approximately 250 species have been described for the genus *Macrobrachium* Spence Bate, 1868 (for revision, see DE GRAVE and FRANSEN, 2011). Kutty and Valenti (2010) evaluated these species based on their potential for farming, ease of rearing and maintenance, and identified 30 species, with the Amazon River prawn *Macrobrachium amazonicum* (Heller, 1862) as the main species for South America.

Macrobrachium amazonicum has a wide geographic distribution, occurring in aquatic environments from Costa Rica to Argentina (VERGAMINI et al., 2011). This species is economically important in the Brazilian aquaculture, and is highly consumed in northern and northeastern Brazil (ODINETZ-COLLART and MOREIRA, 1993; MACIEL and VALENTI, 2009). In addition, *M. amazonicum* is highly variable regarding its morphology, reproduction and phenotypic plasticity, allowing it to colonize several aquatic environments (ODINETZ-COLLART and RABELO, 1996; MACIEL and VALENTI, 2009; VERGAMINI et al., 2011; AUGUSTO and VALENTI 2016). In estuaries, this species has an amphidromous life history, (BAUER, 2013; MEIRELES et al., 2013) but populations of *M. amazonicum* that recently colonized lentic environments became hololimnic (PANTALEÃO et al., 2014). Despite its economic importance and wide distribution in Brazilian aquatic environments, information on aspects of the male reproductive system of *M. amazonicum* is scarce. Currently, only Silva et al. (2009) have briefly discussed the histological pattern of the testicles of this species, but no information was provided regarding sperm production or sperm count.

Sperm concentration is one of the main parameters used to assess sperm quality in aquatic organisms such as mollusks (NAUD and HAVENHAND, 2006), fish (BILLARD et al., 1996; FELIZARDO et al., 2010), and amphibians (DZIMINSKI et al., 2009; OLMSTEAD et al., 2009; SALES et al., 2015). In these studies, the authors used spermatophores (mollusks) or sperm mass (fish), as well as macerated testicles (amphibians), for sperm count with a hemocytometer. These techniques have already been used in penaeid prawns (LEUNG-TRUJILLO and LAWRENCE, 1987; DÍAZ et al., 2001; CEBALLOS VÁZQUEZ et al., 2003), as well as in species of the genus *Macrobrachium* (SAMUEL et al., 1999). However, in all these studies, spermatophores or sperm masses of shrimp were obtained by electroejaculation or manual pressure, possibly increasing sample error due to variability of the ejaculate (SANDIFER and LYNN, 1980; SANDIFER et al., 1984).

In this study, we describe a technique for sperm count (spermiogram) in carideans, using *M. amazonicum* as model. We also test the feasibility of this procedure with animals from zoological collections, preserved for different periods of time and fixatives, and compare animals from populations with different types of life history.

3. Materials and methods

3.1. Animals

Males of *M. amazonicum* with hololimnetic development were collected in the Grande River (20° 30' 53" S; 46° 50' 16" W), located in the reservoir of the HPS of Marechal Mascarenhas de Moraes, municipality of Cássia, state of Minas Gerais, southeastern Brazil. From October 2014 to December 2015, two methods were used to collect animals (a): active sampling with the aid of a sieve (60 cm in diameter and 1.25 mm mesh) moved several times for 30 minutes manually (one collector) along the marginal vegetation and macrophyte banks and (b) passive, using six traps (85 cm in length X 35 cm in width/height) were placed near the margin (0.5 - 2 m margin), baited with small pieces of beef liver, and removed after four hours. Additionally, amphidromous males were obtained from the Crustacean Sector of the Aquaculture Center at São Paulo State University (CAUNESP) of UNESP/Jaboticabal. This population was collected in the municipality of Santa Bárbara do Pará, state of Pará, northern Brazil, where it inhabits estuarine areas connected to the ocean (Meireles et al., 2013). Animals from this population were collected from August 2015 to April 2016. The shrimps were identified according to Melo (2003) and Pileggi (2009 PhD thesis, unpubl.). After capture, live specimens were transported in thermal insulation boxes with aeration to the laboratory. The animals were kept in aquariums with dark bottoms, with basalt gravel as substrate and macrophytes and fragments of rocks for shelter. Shrimp were acclimated and conditioned to a 12 hour photoperiod and 26 °C (± 0.5).

3.2. Determination of morphotypes and measurements

In the laboratory, the sex of the individuals was determined by examining secondary sexual characters: (a) absence (♀) or presence (♂) of appendix masculina in the endopodite of the second pair of pleopods, (b) position of gonopores: opening in the coxopodite of the third (♀) or fifth (♂) pereopod (Fig. 1B); and (c) dissection of the reproductive system: ovaries (♀) and testicles (♂) (Fig. 1A).

Regardless of their life history (amphidromous or hololimnetic), four morphotypes have been described for male prawns of *M. amazonicum*: translucent claw (TC), cinnamon claw (CC), green claw 1 (GC1), and green claw 2 (GC2) (MORAES-RIODADES and VALENTI, 2004; PANTALEÃO et al. 2014; AUGUSTO and VALENTI, 2016). Specimens were separated into morphotypes based on macroscopic visual characteristics, mainly size, cheliped color, and spine angle, and then measured using an analog caliper (0.02 mm) following the anatomical portions established by Moraes-Riodades and Valenti (2004) and Pantaleão et al. (2014) for the species. The dimensions measured were: carapace length (CL), total length (TL), major cheliped length (MCL), propodus length (PPL), and dactyl length (DCL). The fresh weight (W) of each individual was obtained with an analytical balance (0.0001 g).

3.3. Sperm count and viability of the technique

In *Macrobrachium amazonicum*, strong sexual dimorphism and social hierarchy are observed. Dominant males (GC1 and GC2) have selective advantages over submissive individuals (TC and CC) such as obtaining more food resources and territories, and possibly more matings (CORREA and THIEL, 2003; IBRAHIM, 2011 MSc. thesis, unpubl.; AUGUSTO and VALENTI, 2016). In the present study, only GC1 and GC2 morphotypes of both populations of *M. amazonicum* were used to determine sperm count.

After morphotyping and measurement, 15 males of each morphotype and population (N: 60) were anesthetized by cooling (-20 °C / 3-8 min) and had their reproductive systems carefully removed (Fig. 1A). Subsequently, testes were separated from vasa deferentia and maintained in distilled water. Each animal had one vas deferens randomly selected and the ejaculatory duct (ED) was measured and sectioned at the beginning of the dilation that formed this portion of the vas deferens (Fig. 1A), and momentarily maintained in distilled water. This region of the

vas deferens was standardized as the fixed area for sperm count in *M. amazonicum*. The entire ED was dissociated in a solution containing 9 μl of distilled water and 1 μl of methylene blue. After this step, 1 μl of this solution was removed and diluted in 9 μl distilled water, resulting in an 1:10 dilution. Later, 1 μl of the new solution was pipetted and carefully placed on the central portion of a Neubauer chamber for sperm count under light microscope (20x magnification) (Fig. 1E and F). The preparation, randomization, and estimation of the sperm count followed the described by Rouge (2002) and Bastidas (2013). In our study, sperm count was reported as: number of spermatozoa/microliter (spz/ μl). Since no statistical difference in sperm count was found between EDs of the same individual (Student's *t* test - N: 12; $t = 0.147$; $df = 22$; $p = 0.88$), only one duct was used for counting per animal. After the sperm count, the macerated portion of ED was added to the rest of the vasa deferentia and dehydrated in an oven at 60°C for 48 hours and weighed with an analytical balance (0.0001 g). The same procedure was conducted for the testicles in order to obtain the dry weight of the reproductive system of shrimp from amphidromous and hololimnetic populations.

Animals preserved in 70% ethanol and 4% paraformaldehyde in 0.2M sodium phosphate buffer underwent the same procedure used for the dissection and sperm count. These animals were preserved for different time intervals from 5 to 480 days and belonged to the collection of the Invertebrate Morphology Laboratory of DBAA (FCAV/ Campus de Jaboticabal). Six time intervals were used: animals preserved for 5 to 15 days (0); one month (1); two months (2); between three and six months (3-6); between seven and twelve months (7-12); and between thirteenth and sixteen months (13-16). For each time interval, regardless of morphotype and life history, individuals (N: 6) were randomly sampled and later analyzed.

In order to evaluate if the protocol applied in animals preserved in 70% ethanol altered the structure of spermatozoa under light microscope, histological analyzes of the testicle and ED of eight recently-collected animals (two animals of each morphotype per population) were conducted according to Zara et al. (2012). After the dissection, fresh samples were fixed in 4% paraformaldehyde (24 h), washed twice in 0.2M phosphate buffer (pH 7.2), dehydrated in an increasing series of ethanol (70 to 95%), embedded in methacrylate historesin Leica®. Blocks were cut in 4-5 μm sections with a rotary microtome and slides were stained with hematoxylin and eosin (H&E) and toluidine blue (pH 4).

3.4. Data analysis

The morphometric variables of the farmed amphidromous population were compared to the variables of the wild hololimnetic population with the Hotelling's T^2 test. The dry weight of the reproductive systems of the amphidromous and hololimnetic populations was compared with the non-parametric Mann-Whitney test (normality assumption was not satisfied - Shapiro-Wilk: W -Statistic = 0.86, $p < 0.001$).

A two-way analysis of variance (ANOVA) was used to examine if sperm counts differed between morphotypes (GC1 and GC2) and different life histories (amphidromous and hololimnetic) in *M. amazonicum*. An interaction between these two factors (morphotypes X life histories) was also analyzed. The sperm count data were transformed into logarithms (\log_{10}). The relationship between sperm count and CL, TL, MCL, and W of specimens was analyzed with a linear regression. The coefficient of determination (r^2) and the degree of allometry (b - verified with the Student's t test) of the regression lines were calculated in order to examine if the pattern of body growth influenced sperm density of animals.

The Student's t test was used to examine if the values obtained for the fresh sperm count differed from those recorded for animals preserved directly in 4% paraformaldehyde and in 70% ethanol. An ANOVA was used to examine if the sperm counts of preserved individuals varied throughout time of preservation in 70% ethanol. All calculations and statistical analyzes were performed with the software R version 3.3.1. (R DEVELOPMENT CORE TEAM, 2016).

4. Results

The male reproductive system of *M. amazonicum* consists of a pair of testicles and vasa deferentia with ejaculatory ducts connected to gonopores (Fig. 1A). The testicles are united at the anterior and posterior regions of the organ and are positioned above the hepatopancreas of the animal. Vasa deferentia are arranged laterally to the testis, directly connected to this organ. These long ducts open into the gonopore of the coxopodite of the fifth pair of pereopods. In males, the gonopores are covered by flaps and their openings are oriented towards one another for the formation of spermatophoric mass (Fig. 1B). Microscopically, the testicles are formed

by seminiferous tubules grouped in lobules, where spermatogenesis and spermiogenesis take place. The tubules are surrounded by accessory or Sertoli-cells lying on a thin layer of connective tissue. Spermatozoa with a spike in their distal portion commonly fill nearly entirely the tubules (Fig. 1C). The EDs have a large quantity of centrally compacted spermatozoa surrounded by secretion, and open into the gonopores through a genital pore. The androgenic gland lies perpendicularly on the muscle layer (Fig. 1A and D). No anatomical or histological differences were observed in the male reproductive system between the studied populations or morphotypes (Fig. 1).

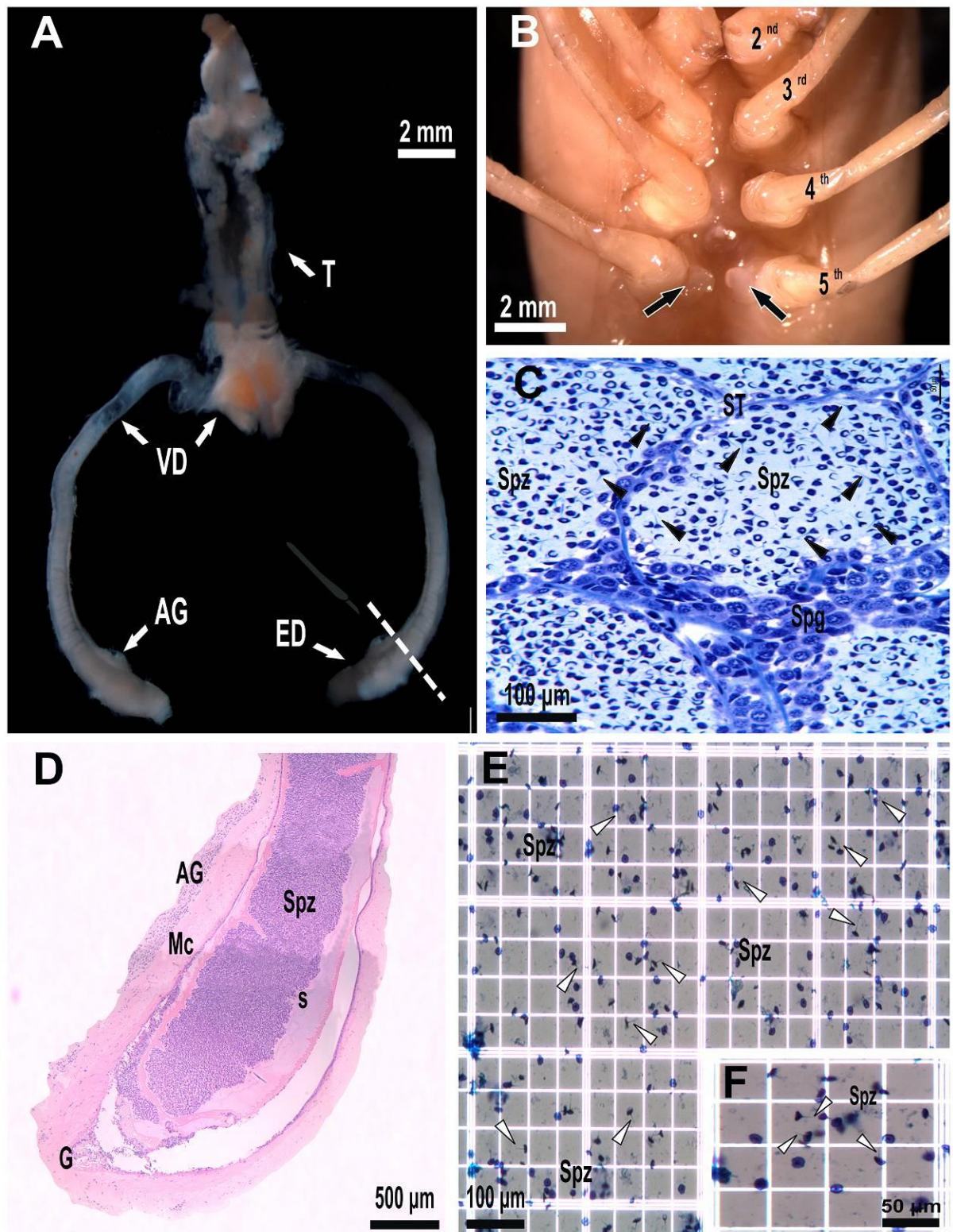


Figure 1. *Macrobrachium amazonicum* (Heller, 1862). **A.** Overview of the reproductive system of an amphidromous male of morphotype green claw 2 (GC2). The scalpel shows the region where the ejaculatory duct was sectioned to determine the sperm count. **B.** Ventral view of the abdominal sternum of a hololimnetic male morphotype of green claw 1 (GC1), with gonopore openings in the fifth pair of pereopods covered by flaps (black arrows). **C.** General appearance of the

seminiferous tubules of the testicle of a hololimnetic GC2 male nearly completely filled with a large quantity of spermatozoa [toluidine blue pH 4]. Note the spike in the distal portion of the spermatozoon (black arrowheads) **D**. Longitudinal section of the ejaculatory duct of a hololimnetic GC1 male filled with spermatozoa surrounded by secretion [H&E]. **E**. Central view of the counting area of the Neubauer chamber with spermatozoa with a spike in their distal portion (white arrowheads) [methylene blue]. **F**. Detail in higher magnification of E, showing a grid used to determine the sperm count in an amphidromous GC2 male [methylene blue]. AG: androgenic gland; ED: ejaculatory duct; G: genital pore; mc: muscle; s: secretion; Spg: spermatogonia; Spz: spermatozoa; ST: seminiferous tubules; T: testicles; VD: vasa deferentia.

The populations analyzed in our study had distinct life histories and morphological characteristics (Table I). The body size of males of the amphidromous population was larger when compared to individuals of the hololimnetic population (Hotelling's $T^2 - F = 11.88$; $p < 0.0001$). In addition, the male reproductive system was heavier than those of the wild hololimnetic population ($U = 129.50$; $p < 0.001$). Despite these differences in morphometric parameters and weight between populations, the mean values of sperm count were similar. In amphidromous GC1 males, the mean sperm count was $60.3 \pm 23.6 \times 10^3$ spz/ μ l, while for the GC2 morphotype, $65.3 \pm 25.0 \times 10^3$ spz/ μ l. The mean density obtained for hololimnetic animals was slightly lower than that recorded for amphidromous prawns, with $48.9 \pm 13.8 \times 10^3$ and $53.9 \pm 21.2 \times 10^3$ spz/ μ l for GC1 and GC2 individuals, respectively (Table II). No differences in sperm count were found between the amphidromous and hololimnetic populations ($F = 3.37$; $p = 0.07$) or between morphotypes ($F = 0.48$; $p = 0.49$). Also, no interaction between the two factors analyzed was observed ($F = 0.0008$; $p = 0.97$) and sperm density was not correlated to morphometric variables (Fig. 2 and Table III).

Table I. *Macrobrachium amazonicum* (Heller, 1862). Comparison of morphometric variables and reproductive systems in male shrimps of morphotypes green claw 1 and 2 with amphidromous and hololimnetic life histories. A: amphidromous; CL: carapace length; DCL: dactyl length; ED: ejaculatory duct; GC1: green claw 1 morphotype; GC2: green claw 2 morphotype; H: hololimnetic; MCL: major cheliped length; PPL: propodus length; RS: reproductive system; TL: total length; W: fresh weight.

Morphotype	Life		CL (mm)	TL (mm)	MCL (mm)	PPL (mm)	DCL (mm)	W (g)	RS (g)	ED (mm)
	history									
GC1	A		22.86	70.50	72.01	23.50	10.43	6.9015	0.0044	3.46
			(± 2.40)	(± 4.87)	(± 13.50)	(± 5.30)	(± 2.34)	(± 1.3539)	(± 0.0022)	(± 0.59)
GC2	A		24.58	74.85	97.35	32.11	13.46	8.8926	0.0067	3.78
			(± 2.58)	(± 6.33)	(± 10.97)	(± 3.83)	(± 1.51)	(± 2.5100)	(± 0.0026)	(± 0.62)
GC1	H		19.04	59.34	55.15	15.79	7.61	3.7112	0.0021	3.09
			(± 1.68)	(± 4.03)	(± 9.00)	(± 3.77)	(± 1.47)	(± 0.8590)	(± 0.0011)	(± 0.57)
GC2	H		21.55	65.44	80.21	26.44	12.28	5.5246	0.0020	3.16
			(± 2.13)	(± 4.94)	(± 11.97)	(± 4.79)	(± 2.16)	(± 1.3165)	(± 0.0008)	(± 0.47)

Table II. *Macrobrachium amazonicum* (Heller, 1862). Mean (\pm standard deviation), minimum, and maximum values for fresh sperm count (number of spermatozoa/ μ l) in male shrimps of morphotypes green claw 1 (GC1) and green claw 2 (GC2) morphotypes with amphidromous (A) and hololimnetic (H) life histories.

Morphotype	Life		Mean (\pm SD)	Minimum	Maximum
	history				
GC1	A		60,258 (\pm 23,611)	32,750	100,500
GC2	A		65,308 (\pm 25,004)	19,250	115,750
GC1	H		48,950 (\pm 13,860)	30,000	83,000
GC2	H		53,850 (\pm 21,211)	32,000	97,500

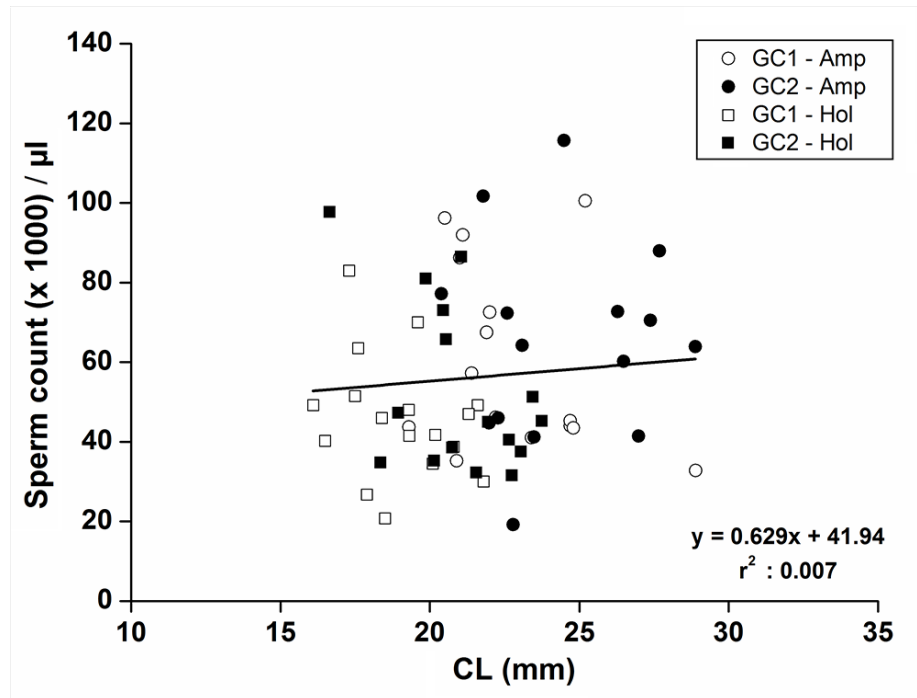


Figure 2. *Macrobrachium amazonicum* (Heller, 1862). Scatter plot of sperm count ratio (number of spermatozoa/ μl) vs. CL for males of the morphotypes green claw 1 (GC1) and green claw 2 (GC2) with amphidromous (Amp) and hololimnetic (Hol) life histories.

Table III. *Macrobrachium amazonicum* (Heller, 1862). Relationship between sperm count and morphometric variables of males of dominant morphotypes. A: allometry; CL: carapace length; MCL: major cheliped length; SC: sperm count; TL: total length; W: fresh weight.

Variables	Linear regression	r^2	t	A
CL (mm)	CL: $0.629 \cdot \text{SC} + 41.94$	0.007	0.39	0
TL (mm)	TL: $0.484 \cdot \text{SC} + 23.14$	0.028	1.40	0
MCL (mm)	TL: $0.819 \cdot \text{SC} + 50.07$	0.004	5.89	0
W (g)	W: $1.815 \cdot \text{SC} + 45.84$	0.040	-0.69	0

The absence of statistical differences in sperm count of fresh animals allowed the randomization of specimens in collection samples. Sperm counts did not differ between animals preserved directly in 4% paraformoldehyde (Student's t test - N: 10; $t = 0.20$; $df = 18$; $p = 0.83$) or 70% ethanol (Student's t test - N: 10; $t = -0.09$; $df = 18$; $p = 0.93$). Using the same procedures for sperm count, no changes were observed in spermatozoon structure in individuals preserved in 70% ethanol under light

microscope, characterized by its tack-like shape, with a concave basal portion and a spike in its distal portion (Fig. 1C, E and F). The analysis of time intervals for the preservation of specimens in 70% ethanol did not reveal significant differences ($F = 0.70$, $p = 0.63$) (Table IV).

Table IV. *Macrobrachium amazonicum* (Heller, 1862). Mean (\pm standard deviation), minimum, and maximum values for sperm count (number of spermatozoa/ μ l) in shrimps preserved for different periods of time in 70% ethanol.

Time (months)	Mean (\pm SD)	Minimum	Maximum
0	57,750 (\pm 24,256)	19,250	88,000
1	61,688 (\pm 16,189)	43,750	86,250
2	45,875 (\pm 18,716)	26,750	72,750
3-6	51,750 (\pm 19,920)	30,000	80,750
7-12	52,375 (\pm 18,531)	32,000	83,000
13-16	65,208 (\pm 26,060)	26,000	97,500

5. Discussion

The technique described here in *M. amazonicum* was very effective to determine the sperm count of fresh and preserved animals, in addition to maintaining the structures that compose the spermatozoa preserved under light microscope. The small number of studies on sperm count in *Macrobrachium* limits the comparison of the results obtained in our study with those of other populations of the species and other congeners. Only Samuel et al. (1999) has reported the use of sperm count with a hemocytometer for the monsoon river prawn, *M. malcolmsonii* (Milne-Edwards, 1844). Comparing the results obtained here for *M. amazonicum* using EDs as standardized area (maximum count: \sim 120,000 spz/ μ l) with those obtained by Samuel et al. (1999) that obtained spermatophoric masses by electroejaculation (maximum count: \sim 500 millions spz/ spermatophoric mass), a wide difference is observed. This might be due to the absence of complex spermatophores in male prawns of the genus *Macrobrachium*, which produce a simple spermatophoric mass instead that varies considerably in size when formed and deposited on the female sternum, added to the possible sampling error promoted by electroejaculation (for revision see SANDIFER and LYNN, 1980; CHOW et al., 1982; SANDIFER et al., 1984). Although few studies have determined the sperm count of *Macrobrachium* species, it has been

reported for the brachyurans: *Callinectes sapidus* Rathbun, 1896 by Kendall et al. (2001) and Hines et al. (2003), and the parastacids: *Cherax quadricarinatus* (von Martens, 1868) by Bugnot and López-Greco (2009 a,b). This protocol has been widely used in penaeid shrimp, such as *Farfantepenaeus paulensis* (Perez-Farfante, 1967) in Braga et al. (2010), *Litopenaeus setiferus* Linnaeus, 1767 in Leung-Trujillo and Lawrence (1987) and Diamond et al. (2008), *L. vannamei* (Boone, 1931) in Ceballos Vázquez et al. (2003), and *Pleoticus muelleri* (Bate, 1888) in Díaz et al. (2001). However, all previously mentioned studies involving penaeids did not evaluate a standardized area, but rather spermatophores to determine sperm count. These studies might have overestimated sperm density in these species (values expressed between 10^6 and 10^9), since these structures have considerable variability in size and are usually modulated by the size and shape of the receptacles and sternum of females, where they are deposited after mating (BAUER, 1986). The wide variability of sperm-carrying structures (spermatophores and spermatophoric mass) would justify the use of the technique described herein, by reducing this type of sample bias, since only an anatomically standardized area (i.e., ED) seems to be more feasible.

The anatomical and histological pattern of the male reproductive system of *M. amazonicum* is similar to those commonly described for carideans. In *M. amazonicum*, the testicles and vasa deferentia with ejaculatory ducts connect to gonopores in the coxopodite of the fifth pair of pereopods. The testicles are joined in the anterior and posterior regions of the organ. The reproductive system of this species is very similar to those of other species of the genus *Macrobrachium* and *Palaemon* Weber, 1795 (SANDIFER and LYNN, 1980; BAUER, 2004), although some differences may be observed, such as those described for *M. rosenbergii*, where the testicle is connected only in the anterior region of the organ (Chow et al., 1982). Histologically, the male reproductive system of *M. amazonicum* is similar, nearly identical, to those of gonochoric and hermaphrodite caridean shrimps already studied (CHOW et al., 1982; SAGI et al., 1988; BRAGA et al., 2005; SILVA et al., 2009; POLJAROEN et al., 2010; NUNES et al., 2010). The similarity of the male reproductive system in carideans allows this technique to be extended to other species of the group. The application of this protocol to determine sperm count in *Macrobrachium olfersii* (Wiegmann, 1836) revealed similar results (N: 3, $\bar{X} \pm SD$: $67,250 \pm 17,430$ spz/ μ l) to that obtained for *M. amazonicum* (PASCHOAL and ZARA,

personal data). In hermaphrodite species with a viable male reproductive system throughout their development and sex change, such as in *Exhippolysmata oplophoroides* (Holthuis, 1948) and *Lysmata wurdemanni* (Gibbs, 1850), this technique may be easily performed, since in these species, EDs are anatomically quickly identified and contain considerable quantities of spermatozoa in all sexual stages (BRAGA et al., 2005; BORTOLINI and BAUER, 2016).

The populations of *M. amazonicum* have very distinct life histories and morphological traits, but not statistically different sperm counts. Males of the farmed amphidromous population had larger body size and heavier reproductive system than individuals of the wild hololimnetic population. This difference is due to the additional nutritional food received during rearing (MORAES-VALENTI and VALENTI, 2010). The similarities in sperm count may be associated to highly conservative patterns of spermatogenesis, spermiogenesis, and other sperm peculiarities at the family or subfamily levels in aquatic organisms (JAMIESON, 1991; POLJAROEN et al., 2010), which would explain the comparable values despite differences in morphology and life history. Unlike females, whose gametes are produced directly proportional to their body size, (BAUER, 2004; MEIRELES et al., 2013), sperm production in males of *M. amazonicum* was not correlated to somatic growth, occurring independently to body size increase. In *M. amazonicum*, males have a social hierarchy, and during the mating period, they protect and guard females. Thus, a smaller portion of energy seems to be destined to the production of gametes and seminal fluid, while a greater portion may be directed to body size increase, production and maintenance of robust chelipeds (i.e. sexual weapons), increasing the fitness of males in intraspecific competitions (CORREA and THIEL, 2003, PASCHOAL et al., 2016). *Macrobrachium amazonicum* has great adaptive and morphological plasticity that can be explained by the synergy of reproductive variability and physiological responses to the environments in which it occurs (MACIEL and VALENTI, 2009; VERGAMINI et al., 2011; PASCHOAL and ZARA, 2017). Recently, individuals of this species with traits only seen in amphidromous populations, such as presence of four morphotypes in males, large body size and ovigerous females with large quantities of small eggs, were found in lentic environments, indicating that this species might be changing its life history pattern (hololimnia) (PASCHOAL and ZARA, 2017).

The present study proposes a simple and easy standardized technique to determine sperm count in *M. amazonicum*. It can be used for the maintenance of

breeders, improvement of stocks, assessment of temporal series of breeders, as well as to aid future assays aimed at cryopreservation of spermatophoric masses in this species and possible crosses between amphidromous and hololimnetic populations. In addition, this protocol can be used in animals preserved in 70% ethanol for over 24 months as well as animals preserved in 10% formaldehyde (PASCHOAL and ZARA, personal data). Thus this protocol may be a useful tool for researchers whose collections are preserved in ethanol or formaldehyde, providing opportunities for new studies on sperm production in different species of carideans.

6. Conclusions

The sperm count protocol proposed here is easy to perform, practical and reproducible, and can be applied successfully in both fresh and preserved animals in various types of fixatives (ethanol, paraformaldehyde and formaldehyde). The technique used in specimens preserved for long periods of time (little more than 24 months) did not interfere with sperm concentration. Also, no changes in the spermatozoa structure were observed applying this protocol. The choice of the Amazon river prawn *Macrobrachium amazonicum* as the standard model for the sperm count protocol allows its extrapolation to other species of the Infraorder Caridea, since this species presents great reproductive and morphometric variability, added to different types of life history (amphidromous vs. hololimnetic). The standardization of an anatomical area makes the results closer to each other, thus reducing sample bias and errors in total sperm concentration values.

7. References

- AUGUSTO, A.; VALENTI, W.C. Are there any physiological differences between the male morphotypes of the freshwater shrimp *Macrobrachium amazonicum* (Heller, 1862) (Caridea: Palaemonidae)? **Journal of Crustacean Biology**, vol. 36, n. 5, p. 716-723. 2016.
- BAUER, R.T. Mating behaviour and spermatophore transfer in the shrimp *Heptacarpus pictus* (Stimpson) (Decapoda: Caridea: Hippolytidae). **Journal of Natural History**, vol. 10, p. 415-440. 1976.
- BAUER, R.T. Phylogenetic trends in sperm transfer and storage complexity in decapod crustaceans. **Journal of Crustacean Biology**, vol. 6, n.3, p. 313-325. 1986.

BAUER, R.T. Simultaneous hermaphroditism in caridean shrimps: a unique and puzzling sexual system in the Decapoda. **Journal of Crustacean Biology**, vol. 20, n. 5, p. 116-128. 2000.

BAUER, R.T. **Remarkable shrimps. Adaptations and Natural History of the Carideans**, 1st ed. Oklahoma: University of Oklahoma Press, 2004, 282 p.

BAUER, R.T. Amphidromy in shrimps: a life cycle between rivers and the sea. **Latin American Journal of Aquatic Research**, vol. 41, n.4, p. 633-650. 2013.

BASTIDAS, O. **Cell counting with Neubauer chamber, basic hemocytometer usage**. Technical Note - Neubauer Chamber Cell Counting. 2013. Disponível em: <<http://www.celeromics.com/en/resources/Technical%20Notes/cell-article-chamber.php/>> Acesso em: 21 out. 15.

BILLARD, R. et al. Sperm physiology and quality. In: BROMAGE, N.R.; ROBERTS, R.J. (Eds). **Brood stock management and egg and larval quality**. 1st ed. Oxford: Blackwell Science Ltd, 1995. p. 25-52.

BORTOLINI, J.L.; BAUER, R.T. Persistence of reduced androgenic glands after protandric sex change suggests a basis for simultaneous hermaphroditism in a caridean shrimp. **The Biological Bulletin**, vol. 230, p. 110-119. 2016.

BRAGA, A.A. et al. Morphological evidence for protandric simultaneous hermaphroditism in the caridean *Exhippolysmata oplophoroides*. **Journal of Crustacean Biology**, vol. 29, n. 1, p. 34-41. 2009.

BRAGA, A.L. et al. Spermatophore quality of the pink shrimp *Farfantepenaeus paulensis* (Decapoda, Dendrobranchiata) broodstock fed with different maturation diets. **Aquaculture**, vol. 307, p. 44-48. 2010.

BUGNOT, A.B.; GRECO, L.S.L. Sperm production in the red claw crayfish *Cherax quadricarinatus* (Decapoda, Parastacidae). **Aquaculture**, vol. 295, p. 292-299. 2009a.

BUGNOT, A.B.; GRECO, L.S.L. Structural alterations in the male reproductive system of the freshwater crayfish, *Cherax quadricarinatus* (Decapoda, Parastacidae). **Journal of Invertebrate Pathology**, vol. 102, p. 160-166. 2009b.

CEBALLOS VÁZQUEZ, B.P.; ROSAS, C.; RACOTTA, I.S. Sperm quality in relation to age and weight of white shrimp *Litopenaeus vannamei*. **Aquaculture**, vol. 228, p. 141-151. 2003.

CHOW, S.; OGASAWARA, Y.; TAKI, Y. Male reproductive system and fertilization of the palaemonid shrimp *Macrobrachium rosenbergii*. **Bulletin of the Japanese Society for the Science of Fish**, vol. 48, n. 2, p. 177-183. 1982.

CHOW, S.; TAKI, Y.; OGASAWARA, Y. Cryopreservation of spermatophore of the fresh water shrimp, *Macrobrachium rosenbergii*. **The Biological Bulletin**, vol. 168, p. 471-475. 1985.

CORREA, C.; THIEL, M. Mating systems in caridean shrimp (Decapoda: Caridea) and their evolutionary consequences for sexual dimorphism and reproductive biology. **Revista Chilena de Historia Natural**, vol. 76, 187-203. 2003.

DANIELS, W.H.; CAVALLI, R.O.; SMULLEN, R.P. Broodstock management. In: NEW, M.B. et al. (Eds). **Freshwater prawns: biology and farming**. 1st ed. Oxford: Wiley-Blackwell, 2010. p. 40-54.

DIAMOND, S. et al. Is spermatophore melanisation in captive shrimp (*Litopenaeus vannamei*) a result of an auto-immune response? **Aquaculture**, vol. 285, p. 14-18. 2008.

DÍAZ, A.C. et al. Reproductive performance of male red shrimp *Pleoticus muelleri* Bate (Decapoda, Penaeoidea) in culture conditions. **Journal of the World Aquaculture Society**, vol. 32, p. 236–242. 2001.

DZIMINSKI, M.A. et al. Sperm competitiveness in frogs: slow and steady wins the race. **Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences**, vol. 276, n. 1675, p. 3955-3961. 2009.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS - FAO. **Macrobrachium rosenbergii (De Man, 1879)**. Fishstat Plus version 2.32. 2016. Disponível em: <http://www.fao.org/fishery/culturedspecies/Macrobrachium_rosenbergii/en/> Acesso em: 03 nov. 16.

FELIZARDO, V.O. et al. Effect of cryopreservant combinations on the motility and morphology of curimba (*Prochilodus lineatus*) sperm. **Animal Reproduction Science**, vol. 122, p. 259-263. 2010.

HINES, A.H. et al. Evidence for sperm limitation in the blue crab, *Callinectes sapidus*. **Bulletin of Marine Science**, vol. 72, p. 287-310. 2003.

JAMIESON, B.G.M. **Fish Evolution and Systematics: Evidence from Spermatozoa**. Cambridge: Cambridge University Press, 1991, 333 p.

KENDALL, M.S. et al. Reproductive potential of individual male blue crabs, *Callinectes sapidus*, in a fished population: depletion and recovery of sperm number and seminal fluid. **Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences**, vol. 58, 1168-1177. 2001.

KUTTY, M.N.; VALENTI, W.C. Culture of Other Freshwater Prawn Species. In: NEW, M.B. et al. (Eds). **Freshwater prawns: biology and farming**. 1st ed. Oxford: Wiley-Blackwell, 2010. p. 502-523.

LEUNG-TRUJILLO, J.R.; LAWRENCE, A.L. Observations on the decline effect in sperm quality of *Penaeus setiferus* under laboratory conditions. **Aquaculture**, vol. 65, p. 363–370. 1987.

MACIEL, C.R.; VALENTI, W.C. Biology, fisheries, and aquaculture of the amazon river prawn *Macrobrachium amazonicum*: a review. **Nauplius**, vol.17, p. 61-79. 2009.

MANJÓN-CABEZA, M.E.; COBOS, V.; RASO, J.E.G., The reproductive system of *Hippolyte niezabitowskii* (Decapoda, Caridea). **Zoology (Jena)**, vol. 114, p. 140-149. 2011.

MEIRELES, A.L.; VALENTI, W.C.; MANTELATTO, F.L., Reproductive variability of the Amazon River prawn, *Macrobrachium amazonicum* (Caridea, Palaemonidae): influence of life cycle on egg production. **Latin American Journal of Aquatic Research**, vol. 41, n. 4, p. 718-731. 2013.

MELO, G.A.S. Famílias Atyidae, Palaemonidae e Sergestidae. In: Melo, G.A.S. (Ed.). **Manual de identificação dos Crustacea Decapoda de água doce do Brasil**. 1 ed. São Paulo: Edições Loyola, 2003, p. 289-415.

MORAES-RIODADES, P.M.C.; VALENTI, W.C. Morphotypes in male amazon river prawns, *Macrobrachium amazonicum*. **Aquaculture**, vol. 236, p. 297–307. 2004.

MORAES-VALENTI, P.M.; VALENTI, W.C. 2010. Culture of the Amazon River Prawn *Macrobrachium amazonicum*. In: NEW, M.B. et al. (Eds). **Freshwater prawns: biology and farming**. 1st ed. Oxford: Wiley-Blackwell, 2010. p. 485-501.

NEW, M.B. et al. **Freshwater prawns: biology and farming**, 1st ed. Oxford: Wiley-Blackwell, 2010, 544 p.

NUNES, E.T. et al. Cytodifferentiation during the spermatogenesis of the hermaphrodite caridea *Exhippolysmata oplophoroides*. **Micron**, vol. 41, p. 585-591. 2010.

ODINETZ-COLLART, O.; MOREIRA, L.C. Potencial pesqueiro de *Macrobrachium amazonicum* na Amazônia Central (Ilha do Careiro): variação da abundância e do comprimento. **Amazoniana**, vol. 12, n. 3-4, p. 399-413, 1993.

ODINETZ-COLLART, O.; RABELO, H. Variation in egg size of the freshwater prawn *Macrobrachium amazonicum* (Decapoda, Palaemonidae). **Journal of Crustacean Biology**, vol. 16, n. 4, p. 684-688. 1996.

OLMSTEAD, A.W. et al. Reproductive maturation of the tropical clawed frog: *Xenopus tropicalis*. **General and Comparative Endocrinology**, vol. 160, n. 2, p. 117-123. 2009.

PANTALEÃO, J.A.F.; HIROSE, G.L.; COSTA, R.C. Occurrence of male morphotypes of *Macrobrachium amazonicum* (Caridea, Palaemonidae) in a population with an entirely freshwater life cycle. **Brazilian Journal of Biology**, vol. 74, n. 3 sup., p. 223-232. 2014.

PASCHOAL, L.R.P.; ZARA, F.J. First record of intersexuality in the Amazon River shrimp *Macrobrachium amazonicum* (Heller, 1862) (Caridea: Palaemonidae). **Journal of Crustacean Biology**, vol. 74, n. 4, p. 1-5. 2017a.

PASCHOAL, L.R.P.; GUIMARÃES, F.J.; COUTO, E.C.G. Growth and reproductive biology of the amphidromous shrimp *Palaemon pandaliformis* (Decapoda, Caridea) in a Neotropical river from northeastern Brazil. **Zoologia (Curitiba)**, vol. 33, n. 6, p. 1-14. 2016.

POLJAROEN, J. et al. Spermatogenesis and distinctive mature sperm in the giant freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii* (De Man, 1879). **Zoologischer Anzeiger**, vol. 249, p. 81-94. 2010.

NAUD, M.J.; HAVENHAND, J.N. Sperm motility and longevity in the giant cuttlefish, *Sepia apama* (Mollusca: Cephalopoda). **Marine Biology**, vol. 148, n. 3, p. 559-566. 2006.

R CORE TEAM. **R (The R Project for Statistical Computing)**. Software version 3.3.1. 2016. Disponível em: <www.r-project.org>. Acesso em: 09 ago. 2016.

ROUGE, M. **Counting Cells with a Hemacytometer**. 2002. Disponível em: <<http://www.vivo.colostate.edu/hbooks/pathphys/reprod/semeneval/hemacytometer.html/>>. Acesso em: 21 out. 2015.

SALLES, N.M.; ZARA, F.J.; PRADO, C. Differences in sperm morphology in foam-nesting leptodactylid frogs (Anura, Leptodactylidae). **Acta Zoologica (Stockholm)**, vol. 98, p. 1-12. 2015.

SANDIFER, P.A.; LYNN, J.W. Artificial insemination of caridean shrimp. In: CLARK JR., W.H.; ADAMS, H.S. (Eds.). **Recent Advances in Invertebrate Reproduction**. 1st ed. Amsterdam: Elsevier, 1980. p. 271-288

SANDIFER, P.A. et al. Electrical stimulation of spermatophore expulsion in marine shrimp, *Penaeus* spp. **Aquaculture**, vol. 41, p. 181-187. 1984.

SAMUEL, M.J.; KANNUPANDI, T.; SOUNDARAPANDIAN, P. Nutritional effects on male reproductive performance in the freshwater prawn *Macrobrachium malcolmsonii* (H. Milne Edwards). **Aquaculture**, vol. 172, p. 327-333. 1999.

SAGI, A.; MILNER, Y.; COHEN, D. Spermatogenesis and sperm storage in the testes of the behaviorally distinctive male morphotypes of *Macrobrachium rosenbergii* (Decapoda, Palaemonidae). **The Biological Bulletin**, vol. 174, p. 330-336. 1988.

SILVA, G.M.F. et al. Gonadal structure analysis of *Macrobrachium amazonicum* (Heller, 1862) from a wild population: a new insight into the morphotype characterization. **Aquaculture Research**, vol. 40, p. 798-803. 2009.

VERGAMINI, F.G.; PILEGGI, L.G.; MANTELATTO, F.L. Genetic variability of the Amazon River prawn *Macrobrachium amazonicum* (Decapoda, Caridea, Palaemonidae). **Contributions to Zoology**, vol. 80, p. 67-83. 2011.

ZARA, F.J. et al. Spermatogenesis, spermatophore and seminal fluid production in the adult blue crab *Callinectes danae* (Portunidae). **Journal of Crustacean Biology**, vol. 32, n. 2, p. 249-262. 2012.

Capítulo 8

Existe uma relação de “trade-off” entre o investimento na produção espermiática e a aquisição de armas sexuais em *Macrobrachium amazonicum* (Heller, 1862) ?

**Existe uma relação de “trade-off” entre o investimento na produção
espermática e a aquisição de armas sexuais em *Macrobrachium amazonicum*
(Heller, 1862) ?**

1. Resumo

Em machos, a aquisição de armas sexuais robustas facilita o acesso às fêmeas e são utilizadas em competições intraespecíficas. Além disso, podem estabelecer uma hierarquia entre estes, como é o caso de *Macrobrachium amazonicum*. Camarões dominantes dos morfótipos quela verde 1 (GC1) e 2 (GC2), com grandes proporções corporais e quelípodos robustos apresentam maior sucesso reprodutivo em relação aos morfótipos submissos, quela translúcida (TC) e canela (CC). No entanto, algumas populações desta espécie não possuem morfótipos dominantes. Neste trabalho, verificamos os padrões de produção e concentração espermática entre os morfótipos e populações com três tipos de fenótipos: (a) animais anfídromos e (b) hololimnéticos de grande porte, ambos com morfótipos dominantes, e (c) animais hololimnéticos de pequeno porte, sem morfótipos. Além disso, descrevemos a espermatogênese e a histoquímica dos vasos deferentes (VD), assim como correlacionamos o investimento na produção espermática e a aquisição de armas sexuais em machos destas populações. Nas populações anfídroma e hololimnética com a presença de morfótipos, a produção e a concentração espermática foram similares entre os morfótipos, com exceção do morfótipo CC. Neste morfótipo, os túbulos seminíferos estão preenchidos por espermatócitos e sua contagem espermática foi baixa. Isto está relacionado ao acúmulo de energia observado neste morfótipo para se tornar machos dominantes com grande quantidade de espermatozoides. A espermatogênese e espermiogênese são processos altamente conservativos e não mostram diferenças entre os fenótipos analisados. Em *M. amazonicum*, os VD são divididos em três regiões (proximal, média e distal) e não apresentam diferenças histológicas e histoquímicas entre si. Não existem diferenças nos VD dos morfótipos ou para animais de diferentes populações. O fluido seminal é composto por secreções do tipo I, II (basófilas) e III (eosinófila) e têm caráter glicolipoprotéico. Machos com morfótipos dominantes investem mais energia no desenvolvimento de armas sexuais robustas em detrimento da energia destinada ao sistema reprodutor durante seu desenvolvimento sequencial, enquanto que machos de pequeno porte investem mais energia na produção e transferência espermática em depleção da energia destinada as armas sexuais. Assim verifica-se a relação de “trade-off” entre o investimento gonadal e a aquisição de armas no camarão amazônico.

Palavras-chave: camarão amazônico, seleção sexual, estratégia reprodutiva, morfótipos.

2. Introdução

A seleção sexual é definida como qualquer tipo de vantagem que um indivíduo possui em relação a outro do mesmo sexo e espécie em relação à questão reprodutiva. Em machos, dois tipos principais de estruturas podem aumentar o sucesso reprodutivo dos indivíduos: os ornamentos, que são atrativos a fêmeas, e as armas utilizadas em competições intraspecíficas (DARWIN, 1871). Em crustáceos, as armas estão presentes em diversos grupos, incluindo isópodos, estomatópodes e principalmente os decápodes. No último grupo, quelípodos robustos são utilizados para dominar e/ou proteger as fêmeas e garantir a cópula, assim como são utilizados em interações agonísticas (lutas) para conquista e defesa de territórios (EMLEM, 2008).

Em alguns grupos, a seleção sexual entre machos da mesma espécie é intensa, e machos com grandes proporções corporais e armas robustas são favorecidos em relação aos demais, como é o caso de camarões carídeos com hierarquia social (CORREA e THIEL, 2003). Em alguns gêneros desta Infraordem, como *Rhynchocinetes* H. Milne Edwards, 1837 e *Macrobrachium* Spence Bate, 1868 o dimorfismo sexual é bastante evidente, e machos com morfótipos dominantes apresentando hipertrofia dos quelípodos possuem maior sucesso reprodutivo quando comparados aos demais morfótipos (RA'ANAN e SAGI, 1985; CORREA et al., 2003).

O camarão amazônico *Macrobrachium amazonicum* (Heller, 1862) é uma das espécies que apresentam hierarquia social, com quatro morfótipos bem definidos (MORAES-RIODADES e VALENTI, 2004; PANTALEÃO et al., 2014). Machos dominantes dos morfótipos queila verde 1 (GC1) e 2 (GC2) apresentam grandes quelípodos e são capazes de obter mais facilmente recursos alimentares e territórios e, conseqüentemente, maior número de cópulas que os machos dos morfótipos submissos, queila translúcida (TC) e canela (CC) (CORREA e THIEL, 2003; IBRAHIM, 2011; AUGUSTO e VALENTI, 2016). Além disso, esta espécie apresenta grande flexibilidade reprodutiva e alta variabilidade intraespecífica em suas populações (MACIEL e VALENTI, 2009; VERGAMINI et al., 2011), com três tipos de fenótipos registrados para a espécie, sendo eles: (a) animais anfídromos de grande porte e (b) animais hololimnéticos de grande e (c) pequeno porte. A presença de morfótipos dominantes não é registrada em machos de pequeno porte e,

consequentemente, este fenótipo apresenta estratégia reprodutiva diferente dos demais (i.e. busca ativa) (MORAES-RIODADES e VALENTI, 2004; PANTALEÃO et al., 2012, 2014; PASCHOAL, 2017 – Capítulo 2).

A ausência e presença de morfótipos dominantes em uma população pode indicar uma relação de “trade-off” entre a garantia no número de cópulas e o sucesso de fertilização. Em alguns artrópodes, o tamanho dos testículos e/ou a produção espermática aumentam em detrimento da diminuição de energia deslocada para o crescimento somático ou para a aquisição de armas sexuais (SAGI et al., 1988; SIMMONS e EMLEN 2006; PASCHOAL et al., 2016). Em *M. amazonicum*, os espermatozoides são produzidos nos túbulos seminíferos dos testículos no final do processo de espermatogênese, e posteriormente são encaminhados aos vasos deferentes e mantidos nos ductos ejaculatórios até o momento da ejaculação e formação de massas espermáticas (PASCHOAL, 2017 – Capítulo 7). Este autor sugere que a produção e a manutenção de armas sexuais robustas em *M. amazonicum* consomem a maior parte da energia dos machos e o restante é utilizado para produção de gametas e fluído seminal, indicando uma possível relação de “trade-off” entre o investimento gonadal e a aquisição de armas na espécie. Neste contexto, os objetivos deste trabalho foram (a) verificar se existem diferenças nos padrões de produção e densidade de espermatozoides entre os morfótipos e fenótipos do camarão amazônico, (b) descrever o sistema reprodutor masculino e a produção do fluído espermático, e (c) correlacionar o investimento reprodutivo e a aquisição de armas sexuais em machos de *M. amazonicum*

3. Material e métodos

3.1. Animais

Camarões da espécie *M. amazonicum* apresentando desenvolvimento hololimnético foram coletados no rio Grande (20° 30' 53" S; 46° 50' 16" W) em dois pontos na usina hidrelétrica (UHE) de Marechal Mascarenhas de Moraes (MMM) - municípios de Cássia (CAS) e São João Batista do Glória (SBG), e em outros dois pontos na UHE de Furnas - municípios de Carmo do Rio Claro (CRC) e São José da Barra (SJB) no estado de Minas Gerais, sudeste do Brasil. Durante os meses de Outubro de 2014 a Dezembro de 2015, os animais foram obtidos por coleta passiva

(seis armadilhas de 85 cm comprimento X 35 cm largura/altura iscadas com pequenos pedaços de fígado bovino e retiradas após quatro horas) e ativa (deslocamento de uma peneira de 60 cm de diâmetro e malha de 1,25 mm por 30 minutos em macrófitas). Adicionalmente, machos com ciclo de vida anfídromo foram obtidos no Laboratório de Carcinicultura do Centro de Aquicultura da UNESP (CAUNESP – Jaboticabal/SP). Estes animais cultivados são provenientes do município de Santa Bárbara do Pará, estado do Pará (norte do Brasil) e foram coletados durante os meses Agosto de 2015 a Abril de 2016. Imediatamente após a captura, os camarões foram transportados vivos em caixas térmicas com aeração para o laboratório e mantidos momentaneamente em aquários com fundos escuros (45 x 25 x 30 cm), com cascalho basáltico como substrato e macrófitas e fragmentos de rochas para formação de refúgios (temperatura $25 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$).

As populações de *M. amazonicum* da UHE de MMM apresentam indivíduos de grande porte ($\overline{TL}_{\text{min-máx}}$: 12,70 - 76,40 mm em CAS; e 15,30 - 68,80 mm em SBG) com a presença de quatro morfótipos bem definidos para machos, enquanto que as populações da UHE de Furnas apresentam animais de pequeno porte ($\overline{TL}_{\text{min-máx}}$: 11,90 - 40,70 mm em SJB; e 15,10 - 37,20 mm em CRC) sem a presença de morfótipos em machos (PASCHOAL, 2017 – Capítulo 2). Devido à presença de dois fenótipos em ambientes aquáticos continentais, tais populações foram aqui referidas como populações hololimnéticas de grande (i.e. populações de MMM) e pequeno porte (i.e. populações de Furnas). Machos da população anfídroma analisada apresentam grandes proporções corporais ($\overline{TL}_{\text{min-máx}}$: 43,2 - 105,8). Além disso, esta população cultivada apresenta quatro morfótipos em machos (MORAES-RIODADES e VALENTI, 2004).

3.2. Determinação de morfótipos e mensuração

Em laboratório, a determinação sexual em *M. amazonicum* foi realizada por meio da inspeção de caracteres sexuais secundários: verificação do apêndice sexual masculino no endopodito do segundo par de pleópodos e das posições dos gonóporos nos coxopoditos (PASCHOAL e ZARA, 2017). Posteriormente, os machos foram separados e seus morfótipos foram classificados de acordo com o tamanho e a coloração dos quelípodos, a angulação dos espinhos nos carpos e

própodos e a pubescência nos dactílos (MORAES-RIODADES e VALENTI, 2004; PANTALEÃO et al., 2014). *Macrobrachium amazonicum* apresenta quatro tipos de morfótipos mesmo em populações anfídromas ou hololimnéticas, são eles: quela translúcida (TC), canela (CC), verde 1 (GC1) e 2 (GC2). Após a verificação dos morfótipos, os animais foram mensurados por meio de paquímetro analógico (0,02 mm) seguindo as porções anatômicas estabelecidas para a espécie (PANTALEÃO et al., 2014; PASCHOAL, 2017 - Capítulo 2). As dimensões mensuradas foram: comprimento de carapaça (CL), comprimento total (TL), comprimento de abdome (AL), comprimento do quelípodo maior (MCL), comprimento do própodo (PCL) e comprimento do dactílo (DCL). Adicionalmente, o comprimento do *appendix masculina* (AML) foi mensurado e o peso fresco (W) de cada indivíduo foi registrado em balança analítica (0,0001 g).

3.3. Histologia, histoquímica e microscopia eletrônica de varredura

Para as análises histológicas, 45 indivíduos recém-coletados (cinco animais em cada morfótipo para cada população) foram anestesiados por resfriamento (-20°C / 5 minutos), dissecados e tiveram seus testículos e vasos deferentes (VD) fixados em paraformaldeído 4% por 24 horas. Posteriormente, os órgãos foram lavados duas vezes em tampão fosfato 0,2M (pH 7,2), desidratados em uma série crescente de etanol (70 a 95%), embebidos e incluídos em historesina glicometacrilato Leica®. Os blocos foram cortados com 4-5 µm de espessura em micrótomo rotativo. Após a microtomia, as lâminas foram coradas com PAS (Ácido periódico de Schiff) contracorado com Hematoxilina (PAS & H) para descrição geral dos testículos, com hematoxilina e eosina (H&E) para descrição dos VD, e com azul de toluidina pH 4,0 para a descrição da espermatogênese (POLJAROEN et al., 2012; ZARA et al., 2012). Os diâmetros celulares das células germinativas durante a espermatogênese e a espermiogênese foram registrados com o software Leica® IM50 e mensurados utilizando a objetiva de 100X, em lâminas coradas com azul de toluidina (ZARA et al., 2012). Para cada tipo celular, lâminas de três machos foram examinadas e cinco células foram mensuradas por lâmina (N: 15). Para as análises histoquímicas foram utilizadas técnicas para polissacarídeos ácidos (Azul de alcian pH 1 e 2,5) e neutros (PAS), proteínas (xylidine ponceau) e lipídeos (Sudan black B) (PEARSE, 1960; JUNQUEIRA e JUNQUEIRA, 1983). As amostras para lipídeos não

foram desidratadas durante a rotina histológica seguindo as propostas de Zara et al. (2012), sendo as mesmas diretamente embebidas e incluídas em historesina.

Para a microscopia eletrônica de varredura (MEV), a região distal dos VD foi fixada em glutaraldeído 2,5% em tampão cacodilato de sódio 0,08M (pH 7,2) por 24 horas. Em seguida, o material foi lavado no mesmo tampão (três vezes por dez minutos). A pós-fixação foi realizada em tetróxido de ósmio 1% tamponado (2-4 horas). Posteriormente, as amostras foram desidratadas em séries crescentes de etanol (70 a 100%) e completamente secadas em ponto crítico EMS 850 com CO₂ líquido. Logo após, as amostras foram cuidadosamente fraturadas e montadas em suportes apropriados (stubs) e vaporizadas com ouro no “sputtering” Denton vacuum desk II. O material foi observado e fotografado no MEV Jeol-JSM 5410, com voltagens variando de 10-20 kV.

3.4. Contagem espermática e índices reprodutivos

Para a análise da contagem espermática, 15 machos de cada morfótipo para as três populações analisadas (N: 135) foram anestesiados por resfriamento e tiveram um ducto ejaculatório do VD removido, mensurado e dissociado em água destilada e corante Azul de metileno para quantificação do número de espermatozoides em câmara de Neubauer (número de espermatozoides / μ l), seguindo o método proposto por Paschoal (2017 – Capítulo 7).

Índices reprodutivos diretos (índices gonadossomáticos) e indiretos (índices hepatossomáticos e de armamento) foram verificados em 25 machos de cada morfótipo para as três populações (N: 225). Estes machos foram anestesiados por resfriamento e tiveram o sistema reprodutor dissecado. A morfologia macroscópica do sistema reprodutor masculino foi analisada sob estereomicroscópio durante a dissecação. Posteriormente, os testículos e VD e o hepatopâncreas foram removidos do cefalotórax, assim como os segundos quelípodos (i.e. armas) foram removidos do esterno. Os órgãos, os quelípodos e os corpos foram secos em uma estufa a 70°C por 48 horas e pesados em balança analítica (0,0001 g) para verificação de índices gonadossomáticos (GSI), aqui considerando o sistema reprodutor, hepatossomáticos (HSI) e de armamento (WI) (PASCHOAL, 2017 - Capítulo 5). Os índices foram calculados com base na seguinte relação: $GSI - HSI - WI = (\text{peso seco}$

individualizado do sistema reprodutor, hepatopâncreas e quelípodos, respectivamente / peso seco agrupado do indivíduo, órgãos e quelípodos) X 100.

3.5. Análise de dados

Diferenças entre os diâmetros médios das células germinativas durante o processo de espermatogênese e espermiogênese foram verificados por meio de uma análise de variância (ANOVA).

Uma ANOVA foi utilizada para verificar diferenças nos valores das contagens espermáticas entre os morfótipos da espécie (dados agrupados). As contagens espermáticas no morfótipo TC das três populações analisadas foram comparadas por uma ANOVA, enquanto que nos demais morfótipos (presente somente em duas populações) foram avaliadas por testes *t*.

ANOVA's associadas ao teste de comparação múltipla de Tukey foram utilizadas para verificar se os GSI, HSI e WI variavam entre os morfótipos nas populações anfídroma e hololimnética de grande porte. O coeficiente de correlação de Pearson foi utilizado para avaliar a associação entre os índices reprodutivos diretos e indiretos na espécie. Como a população hololimnética de pequeno porte possui apenas o morfótipo TC, os índices reprodutivos nesta população foram comparados a demais populações por meio de uma ANOVA (post-hoc de Tukey). Os dados dos índices foram transformados em logaritmos (\log_{10}).

4. Resultados

Os valores médios, mínimos e máximos das variáveis morfométricas, peso e caracteres sexuais analisados para os machos dos três fenótipos de *M. amazonicum* estão sumarizados na Tabela I. Pode-se observar um nítido incremento no tamanho corporal, peso e comprimento dos quelípodos ao longo do desenvolvimento sequencial dos morfótipos nas populações anfídroma e hololimnética de grande porte (Figura 1). Machos do morfótipo TC na população de pequeno porte são menores, menos pesados e possuem todas as estruturas corporais menores que indivíduos do mesmo morfótipo em outras populações (Tabela I).

Tabela I. Comparação das variáveis morfométricas, peso e caracteres sexuais (média \pm desvio padrão) em morfótipos de machos de *M. amazonicum* em uma população anfídroma (Amp.) e populações hololimnéticas (Hol.) de grande e pequeno porte. AL: comprimento do abdome; AML: comprimento do *appendix masculina*; CC: quela canela; CL: comprimento de carapaça; Dp: desvio padrão; EDL: comprimento do ducto ejaculatório; GC1: quela verde 1; GC2: quela verde 2, MCL: comprimento do quelípodo maior; Min.: mínimo; Máx.: máximo; TC: quela translúcida; TL: comprimento total; W: peso fresco.

Morfótipos		CL	TL	AL	MCL	PPL	DCL	W (g)	AML	EDL
Fenótipos	Valores	(mm)	(mm)	(mm)	(mm)	(mm)	(mm)		(mm)	(mm)
TC	Média \pm	14,80 \pm	49,93 \pm	26,73 \pm	26,34 \pm	5,93 \pm	2,67 \pm	2,20 \pm	4,05 \pm	2,47 \pm
	Dp	1,94	5,25	2,73	2,98	0,97	0,44	0,63	0,39	0,35
	(10,90	(37,30	(20,70	(20,00	(4,10 -	(2,00 -	(1,07 -	(3,30 -	(1,90 -	
Amp.	Min. -	-	-	-31,10)	-33,10)	8,20)	3,90)	3,57)	4,90)	3,10)
	Máx.	18,70)	60,10)							
	Média \pm	19,11 \pm	61,26 \pm	31,80 \pm	38,62 \pm	10,19 \pm	4,73 \pm	4,02 \pm	4,86 \pm	3,03 \pm
CC	Dp	3,87	7,85	3,26	11,14	3,85	1,75	1,59	0,55	0,45
	(14,10	(50,30	(26,90	(26,80	(6,40 -	(2,70 -	(1,92 -	(4,00 -	(2,20 -	
	Amp.	Min. -	-29,40)	-79,30)	-37,70)	-	18,40)	8,00)	6,77)	5,70)
Máx.					60,00)					
Média \pm		22,67 \pm	70,47 \pm	36,22 \pm	68,07 \pm	21,57 \pm	9,56 \pm	6,72 \pm	5,73 \pm	3,47 \pm
GC1	Dp	2,40	5,09	2,89	15,39	6,39	2,66	1,35	0,44	0,50
	(19,30	(62,30	(32,10	(41,70	(11,80	(5,40 -	(4,83 -	(4,40 -	(2,30 -	
	Amp.	Min. -	-	-	-	-	-	15,10)	9,53)	6,70)
Máx.		29,10)	83,60)	43,40)	90,70)	32,00)				
Média \pm		25,18 \pm	76,41 \pm	38,30 \pm	98,94 \pm	32,66 \pm	13,64 \pm	9,36 \pm	6,41 \pm	3,79 \pm
GC2	Dp	2,40	6,22	3,22	12,50	4,40	1,73	2,34	0,64	0,54
	(20,40	(67,60	(33,50	(77,50	(24,50	(11,00	(6,03 -	(5,10 -	(2,60 -	
	Amp.	Min. -	-	-	-	-	-	-	12,91)	7,50)
Máx.		28,90)	85,70)	44,20)	118,10)	39,70)	17,20)			
TC		Média \pm	10,74 \pm	38,86 \pm	20,43 \pm	20,85 \pm	5,63 \pm	2,00 \pm	0,95 \pm	2,74 \pm

-	Dp	2,08	6,28	3,17	4,09	7,32	0,52	0,51	0,79	0,39
Hol. (grande porte)	Min. - Máx.	(7,60 - 16,30)	(28,50 - 54,30)	(12,40 - 26,10)	(13,50 -31,30)	(2,90 - 41,20)	(1,30 - 3,30)	(0,34 - 2,61)	(1,70 - 5,10)	(1,30 - 2,80)
CC	Média ±	16,42 ±	52,96 ±	27,66 ±	36,65 ±	9,20 ±	4,39 ±	2,39 ±	4,33 ±	2,53 ±
-	Dp	2,06	5,47	3,23	6,74	2,46	1,22	0,78	0,51	0,43
Hol. (grande porte)	Min. - Máx.	(12,20 -20,50)	(43,10 -64,50)	(22,50 -33,70)	(23,10 -48,80)	(4,26 - 14,80)	(2,12 - 6,52)	(1,21 - 4,15)	(3,10 - 5,20)	(1,90 - 3,30)
GC1	Média ±	19,00 ±	58,57 ±	30,50 ±	55,47 ±	16,11 ±	7,61 ±	3,58 ±	5,10 ±	3,02 ±
-	Dp	1,55	4,24	3,47	8,31	3,56	1,45	0,81	0,36	0,62
Hol. (grande porte)	Min. - Máx.	(16,10 -21,80)	(50,50 - 66,68)	(17,90 - 35,60)	(45,00 - 79,70)	(11,80 - 25,50)	(5,10 - 10,80)	(2,39 - 5,51)	(4,50 - 5,90)	(2,00 - 3,94)
GC2	Média ±	21,14 ±	64,14 ±	32,89 ±	78,31 ±	25,70 ±	12,05 ±	5,04 ±	5,46 ±	3,20 ±
-	Dp	2,03	4,81	3,09	11,73	4,83	2,27	1,35	0,46	0,52
Hol. (grande porte)	Min. - Máx.	(16,70 -24,90)	(53,60 -72,40)	(26,40 -40,50)	(59,70 - 108,90)	(17,90 -39,00)	(8,20 - 19,80)	(2,70 - 8,67)	(4,50 - 6,10)	(2,30 - 4,30)
TC	Média ±	8,37 ±	31,10 ±	16,76 ±	16,70 ±	3,35 ±	1,47 ±	0,47 ±	2,38 ±	1,85 ±
-	Dp	1,07	3,46	1,79	3,21	0,61	0,26	0,17	0,51	0,27
Hol. (pequeno porte)	Min. - Máx.	(6,60 - 11,30)	(25,20 - 40,70)	(14,00 - 21,30)	(12,40 - 28,20)	(2,40 - 5,40)	(1,00 - 2,20)	(0,26 - 0,97)	(1,20 - 3,10)	(1,00 - 2,30)

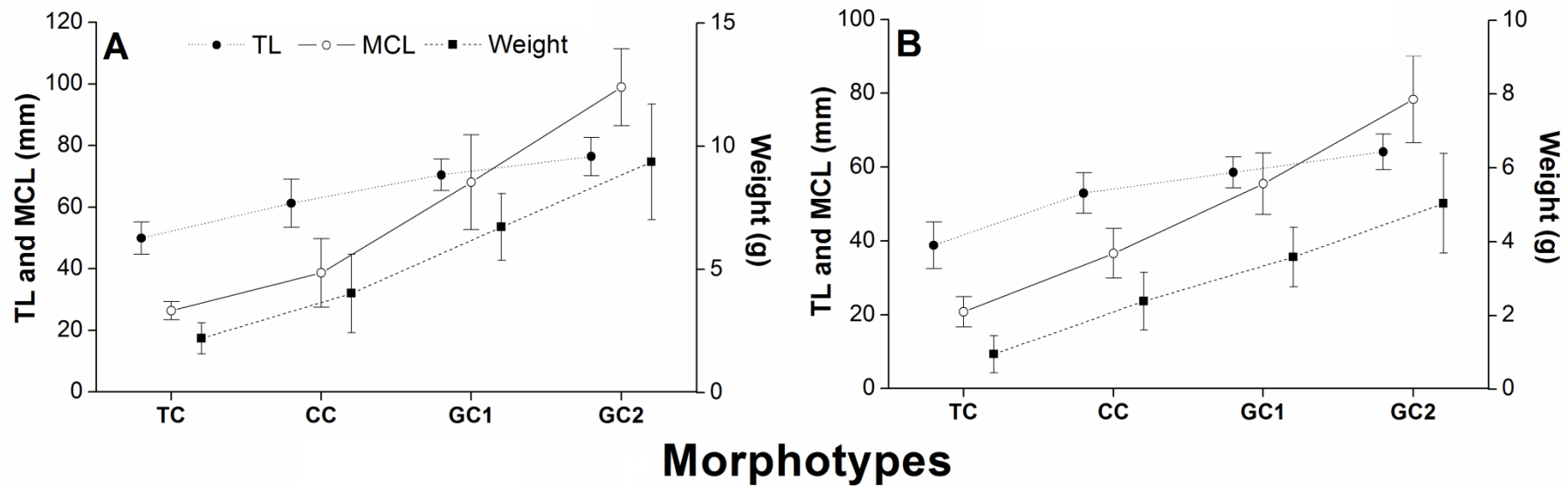


Figura 1. Comprimento total (TL), comprimento do quelípodo maior (MCL) e peso corporal ao longo do desenvolvimento sequencial dos morfótipos de *M. amazonicum* nas populações anfídroma (**A**) e hololimnética de grande porte (**B**). Valores médios e desvio padrão (suíças) foram plotados para cada tipo de morfótipo. CC: quela canela; GC1: quela verde 1; GC2: quela verde 2; MCL: comprimento do quelípodo maior; TC: quela translúcida; TL: comprimento total.

Do ponto de vista anatômico, o sistema reprodutor masculino não apresenta diferenças entre os quatro morfótipos ou para os fenótipos estudados. É constituído por um par de testículos associados a dois vasos deferentes (VD), que correm lateralmente ao cefalotórax e se abrem nos gonóporos (Figura 2A-C). O testículo está disposto entre o hepatopâncreas e o coração, e é constituído por dois lobos, sendo o anterior mais espesso (Figura 2B). Os VD estão conectados lateralmente ao testículo, com os vasos aumentando seu diâmetro em sentido distal. São divididos em três regiões diferenciadas somente pelo aumento do calibre dos vasos. A região proximal é curta e pouco espessa e está próxima aos testículos, sendo conectada a uma longa região convoluta, a região média. A região distal apresenta-se como um longo vaso retilíneo, com uma dilatação em sua porção final que forma a ampola do ducto ejaculatório. Na margem externa da ampola, as glândulas androgênicas estão dispostas longitudinalmente a esta porção do vaso (Figura 2A). O ducto ejaculatório se abre nos gonóporos do coxopodito do quinto par de pereiópodos. Estas estruturas são recobertas por abas e suas aberturas são orientadas uma em direção a outra para a formação da massa espermática (Figura 2C).

Os testículos de *M. amazonicum* são classificados histologicamente como do tipo lobular. No interior dos lóbulos, os túbulos seminíferos mostram células no mesmo estágio da espermatogênese e espermiogênese (Figura 3A-F). Estes túbulos são circundados por células acessórias ou de Sertoli (Figura 4A-B e E) e estão envoltos por tecido conjuntivo frouxo (Figura 3A-D). O padrão de distribuição e quantidade das células germinativas imaturas (espermatogônias, espermatócitos e espermátides) e maduras (espermatozoides) varia entre os morfótipos, todavia não apresentam diferenças entre os fenótipos analisados. No morfótipo TC, a zona espermatogênica e o lúmen contendo espermatozoides são bem definidos, ocupando aproximadamente metade do túbulo cada. Na periferia dos túbulos, espermatogônias e espermatócitos (em diferentes fases da meiose) compõe a zona espermatogênica, enquanto que a região central do túbulo seminífero apresenta espermatozoides imersos em uma matriz rica em polissacarídeos neutros (Figura 3A-B). No morfótipo CC, a zona espermatogênica ocupa todo o túbulo seminífero, raramente espermatozoides foram encontrados nos testículos deste morfótipo. Este

morfótipo intermediário, comumente apresentou espermátocitos em metáfase, preenchendo quase todo o túbulo seminífero, enquanto que poucos espermátocitos em outras fases são encontrados em uma pequena área na periferia dos túbulos (Figura 3C-D). Morfótipos GC1 e GC2 apresentam um padrão similar de distribuição das células germinativas. A zona espermatogênica é restrita a uma pequena faixa periférica, enquanto que a maior parte do túbulo seminífero é preenchida por uma grande quantidade de espermatozoides com formato de tacha (Figura 3E-F). A matriz no lúmen dos túbulos seminíferos é formada por uma secreção glicolipoprotéica, fortemente reativa a polissacarídeos neutros e fracamente marcada para proteínas e lipídeos (Figura 3G-J). Esta matriz não apresenta polissacarídeos ácidos em sua composição (não exibidos aqui).

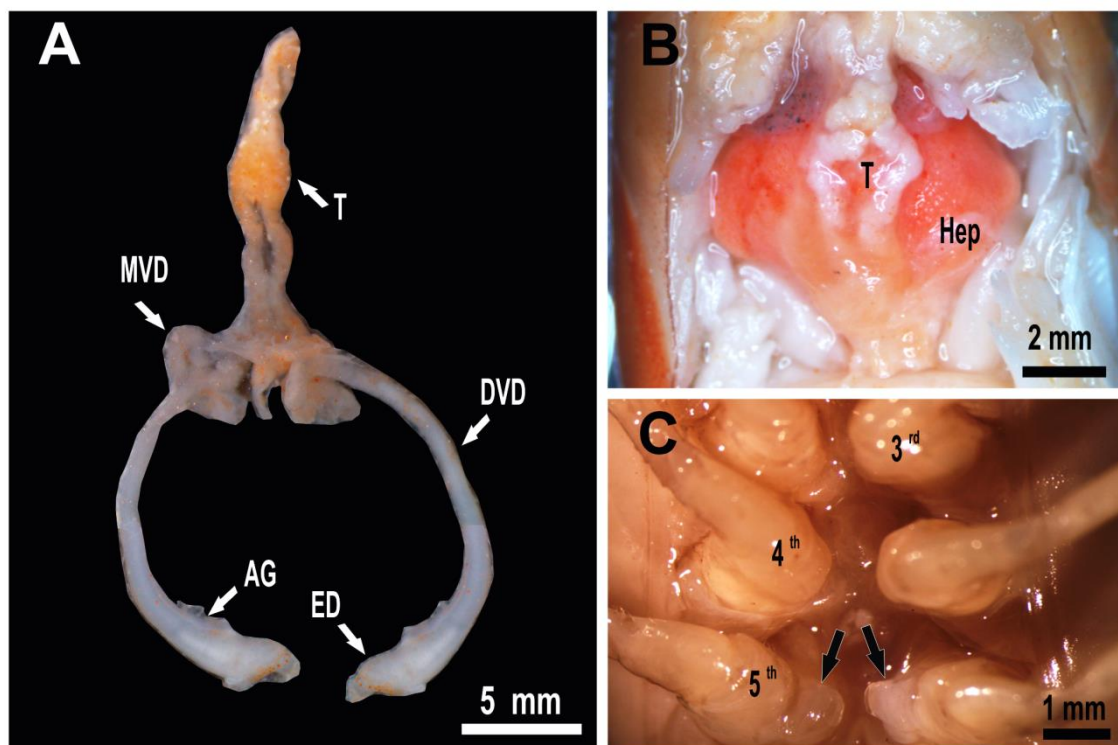


Figura 2. **A.** Vista geral do sistema reprodutor masculino de *M. amazonicum* mostrando os testículos associados aos vasos deferentes. Somente as regiões médias e distais dos vasos deferentes podem ser observadas. **B.** Testículos dispostos sobre o hepatopâncreas. O coração do animal foi removido para melhor visualização do testículo. **C.** Vista ventral do esterno abdominal de um macho com as aberturas dos gonóporos no quinto par de pereiópodos recobertos por abas (setas pretas). AG: glândula androgênica; DVD: região distal do vaso deferente; ED: ducto ejaculatório; Hep: hepatopâncreas; MVD: região média do vaso deferente; T: testículos.

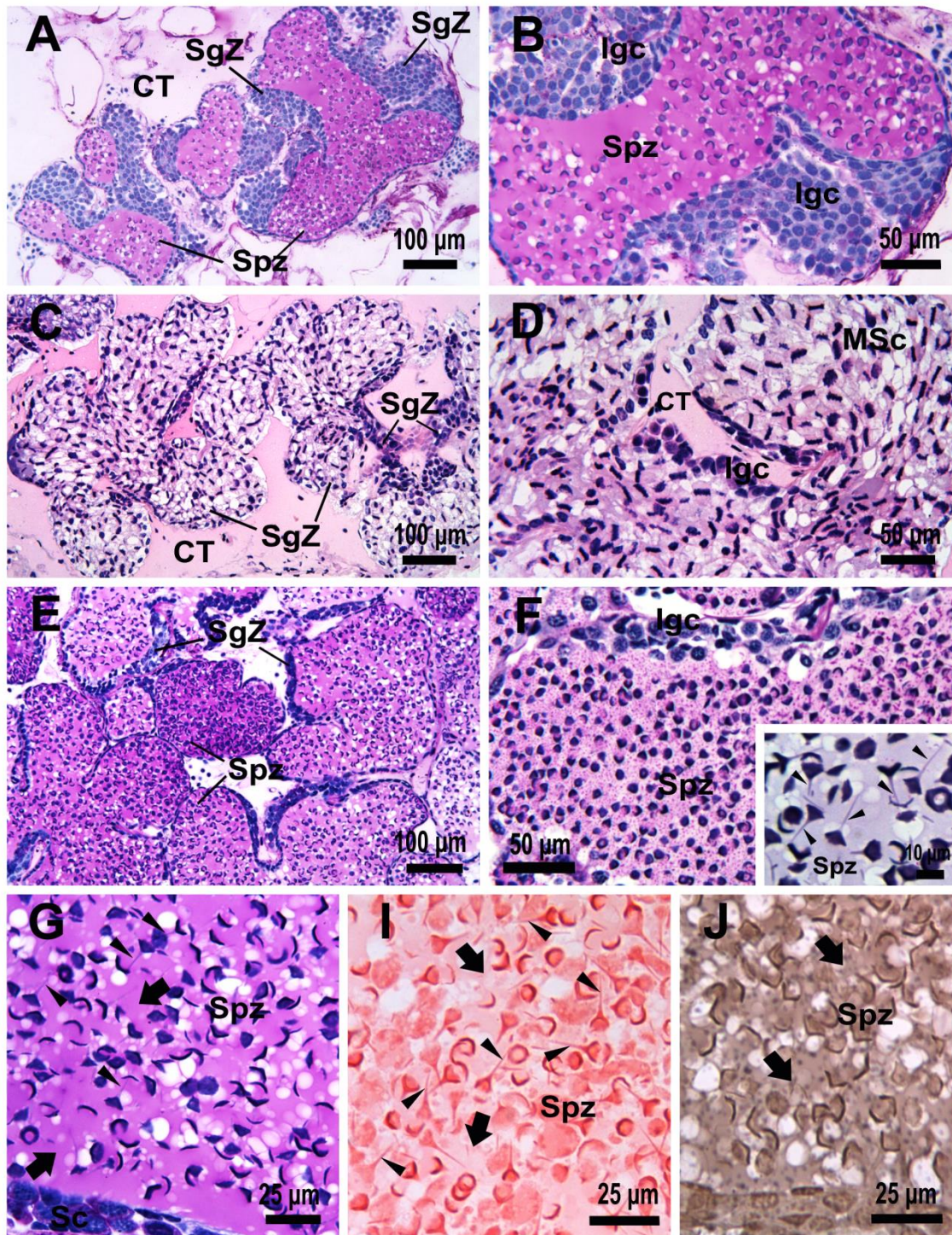


Figura 3. A. Aspecto geral do testículo lobular em machos de *M. amazonicum* do morfótipo TC, os túbulos seminíferos mostram uma zona espermatogênica periférica e espermatozoides imersos em secreção no lúmen. B. Detalhe em maior aumento de A, mostrando um túbulo seminífero isolado. As células germinativas imaturas estão dispostas na periferia, enquanto que os espermatozoides estão imersos em uma matriz rica em polissacarídeos neutros na porção central [PAS & H]. C. Aspecto geral dos túbulos seminíferos em machos do morfótipo CC, a zona espermatogênica ocupa todo o túbulo. D. Detalhe em maior aumento de C, mostrando um túbulo seminífero isolado. Os

espermatócitos em metáfase preenchem quase que totalmente o túbulo, enquanto que células germinativas imaturas em outros estágios estão restritas a uma zona periférica reduzida [PAS & H]. **E.** Aspecto geral dos túbulos seminíferos em machos do morfótipo GC2, com uma zona espermatogênica periférica muito reduzida e uma grande quantidade de espermatozoides distribuída no lúmen. **F.** Detalhe em maior aumento de E, mostrando um túbulo seminífero isolado. Espermatozoides imersos em uma matriz de polissacarídeos neutros preenchem quase todo o túbulo. Os espermatozoides têm formato de tacha com espinho evidente (cabeças de seta) [PAS & H]. **G.** Secreção luminal fortemente reativa para polissacarídeos neutros (setas pretas). Note os espermatozoides em formato de tacha (cabeças de seta) [PAS & H]. **H.** Secreção (setas pretas) e espermatozoides (cabeças de seta) positivos para proteínas ao xylidine ponceau. **J.** Fraca reação para lipídeos na secreção que forma a matriz (setas pretas) [Sudan Black B]. CT: tecido conjuntivo; Igc: células germinativas imaturas; MSc: espermatócitos primários em metáfase; Sc: espermatócitos; SgZ: zona espermatogênica; Spz: espermatozoides.

As células germinativas foram classificadas de acordo com seu tamanho, formato e organização da cromatina. Foram registrados 12 estágios de desenvolvimento: espermatogônia, seis estágios de espermatócitos primários divididos pelas etapas da profase, espermatócito secundário, três estágios de espermatídes e espermatozoide (Figura 4). A espermatogênese começa com as espermatogônias ($30,21 \pm 8,93 \mu\text{m}$), que estão situadas na periferia dos túbulos e estão intimamente associadas às células acessórias (Figura 4A). São ovais ou redondas, com núcleo central e um ou dois nucléolos evidentes e blocos de heterocromatina. Os espermatócitos primários, comumente são esféricos e possuem citoplasma menos reativo que o citoplasma das espermatogônias e são divididos pelas etapas da meiose. Em espermatócitos primários em leptóteno ($20,18 \pm 2,47 \mu\text{m}$), o núcleo é esférico ou ovóide com heterocromatina dispersa em blocos densos (Figura 4B). Os espermatócitos primários em zigóteno ($17,73 \pm 3,04 \mu\text{m}$) possuem núcleo redondo e blocos de heterocromatina de tamanho similares dispersos na eucromatina (Figura 4C). Espermatócitos primários em paquíteno ($15,00 \pm 2,17 \mu\text{m}$) possuem núcleo redondo e grande blocos de heterocromatina interconectados, com alguns blocos aderidos ao envoltório nuclear (Figura 4D). Em espermatócitos primários em diplóteno ($14,77 \pm 3,06 \mu\text{m}$) a heterocromatina é disposta em blocos, próxima ao envoltório nuclear com um padrão de “roda de carroça” (Figura 4E). Os espermatócitos primários em diacinese ($14,27 \pm 1,64$

μm) possuem como característica a perda do envoltório nuclear e a presença de grandes pedaços de cromossomos quase formados distribuídos pelo núcleo (Figura 4F). Espermatócitos primários em metáfase ($16,45 \pm 2,77 \mu\text{m}$) não possuem membrana nuclear e seus cromossomos estão condensados e alinhados na região equatorial da célula (Figura 4G). A divisão meiótica do espermatócito primário gera dois espermatócitos secundários ($15,65 \pm 1,66 \mu\text{m}$) que são caracterizados pelos blocos condensados de heterocromatina em forma de corda que preenchem toda a célula (Figura 4G). Estas células são raramente observadas. O início da espermiogênese começa com as espermátides iniciais ($13,85 \pm 1,14 \mu\text{m}$). Inicialmente, estas células possuem um núcleo redondo e homogêneo com heterocromatina bastante condensada. Logo após, inicia-se a descondensação da eucromatina em uma metade do núcleo, formando as espermátides intermediárias ($12,80 \pm 1,10 \mu\text{m}$) (Figura 4H). Posteriormente, a eucromatina é totalmente descondensada e apenas um pequeno fragmento de heterocromatina com formato de meia lua permanece no pólo anterior do núcleo das espermátides finais ($8,32 \pm 0,67 \mu\text{m}$) (Figura 4I). Ao fim deste processo, espermatozoides ($7,93 \pm 0,75 \mu\text{m}$) aflagelados com formato de tacha ou guarda chuva invertido, núcleo e os espinhos ($13,26 \pm 1,97 \mu\text{m}$) menos corados e o acrossoma e a base dos espinhos intensamente corados (Figura 4J) serão encaminhados para os vasos deferentes (Figura 4K). Durante a espermatogênese e espermiogênese, os diâmetros médios das células germinativas decresceram significativamente ao longo de seu desenvolvimento (F: 28,79 - $p < 0,001$).

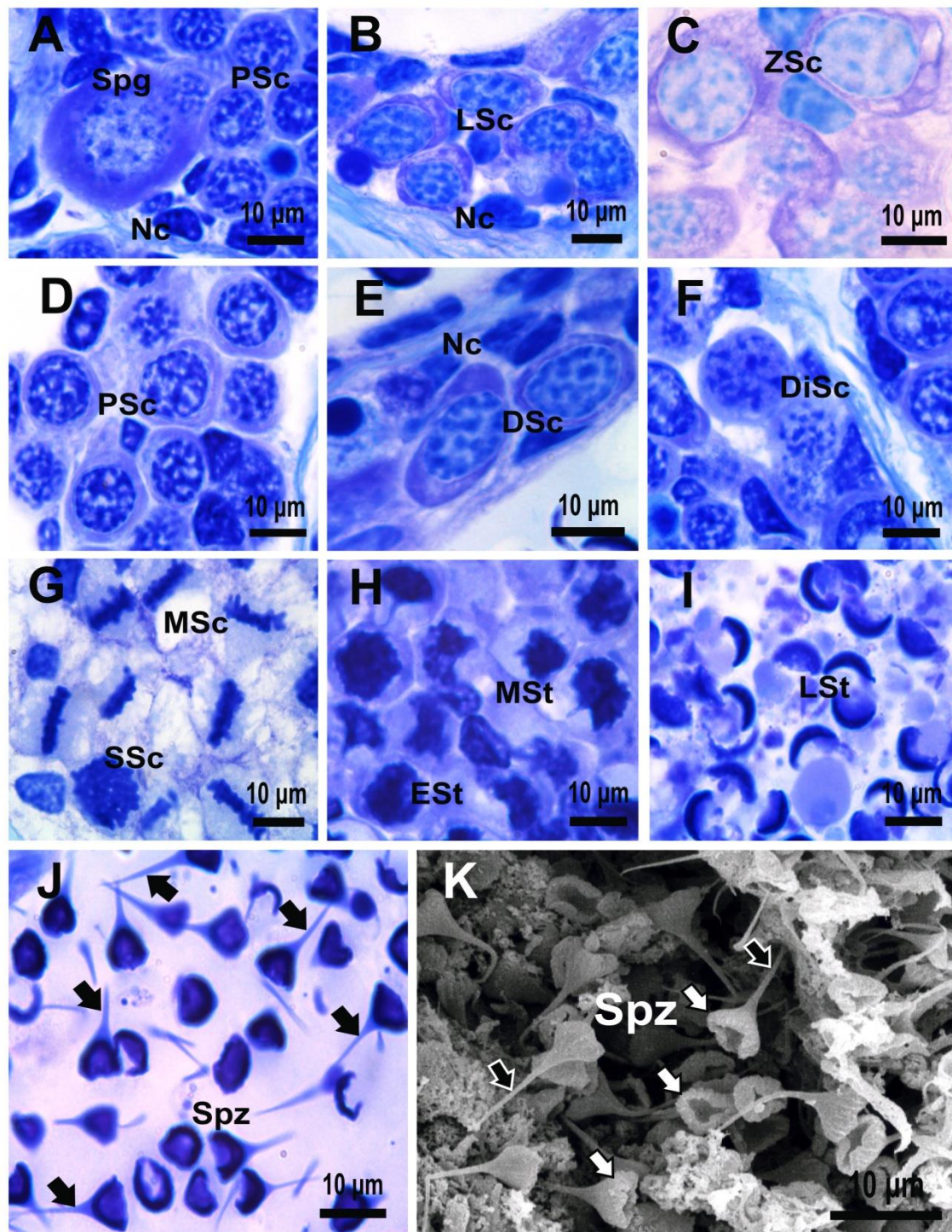


Figura 4. A a G. Espermatogênese em *M. amazonicum* [Azul de toluidina (pH 4,0)]. A. Espermatogônia. B. Espermatócito primário em leptóteno. C. Espermatócito primário em zigóteno. D. Espermatócito primário em paquíteno. E. Espermatócito primário em diplóteno. F. Espermatócito primário em diacinese. G. Espermatócito primário em metáfase e espermatócito secundário. H a J. Espermiogênese [Azul de toluidina (pH 4,0)]. H. Espermatídes iniciais e intermediárias. I. Espermatídes finais. J. Espermatozoides. Note o espinho na porção anterior do espermatozoide (setas pretas). K. Micrografia de MEV mostrando espermatozoides obtidos nos vasos deferentes. Estes têm formato

de guarda-chuva invertido (setas brancas) e um grande espinho em sua superfície convexa (setas pretas). DiSc: espermatócito em diacinese; DSc: espermatócito em diplóteno; ESt: espermátides iniciais; LSc: espermatócito em leptóteno; LSt: espermátides finais; MSc: espermatócito em metáfase; MSt: espermátides intermediárias; PSc: espermatócito em paquíteno; Spg: espermatogônia; Spz: espermatozoides; SSc: espermatócito secundário; ZSc: espermatócito em zigóteno.

As três regiões dos vasos deferentes (VD) mostram o mesmo aspecto histológico, caracterizadas por epitélio cúbico ou pavimentoso simples, com núcleos irregulares envoltos por musculatura (Figura 5A-D). Não existem diferenças na estrutura histológica dos VD para os morfótipos ou entre os diferentes fenótipos. Na região proximal dos VD, observa-se grande quantidade de espermatozoides centralmente compactados e envoltos por secreção basófila do tipo I. Esta massa de espermatozoides é circundada por uma secreção basófila de aspecto fluído e homogêneo, a secreção do tipo II. Nesta região, uma delgada camada muscular reveste o VD (Figura 5A-B). Na região média e distal, os vasos aumentam seu diâmetro luminal, assim como a espessura da musculatura que os revestem (Figura 5C-D). Em ambas as regiões, uma grande quantidade de espermatozoides está imersa em uma matriz basófila, similar a da região proximal. No entanto, nestas regiões observa-se uma secreção eosinófila do tipo III com aparência gelatinosa, envolvendo esta matriz basófila. Além disso, esta secreção emite projeções para o centro dos vasos (Figura 5C-D). Histoquimicamente, a matriz do fluido seminal composta pela secreção do tipo I e II apresenta reação moderada a polissacarídeos neutros, enquanto que a secreção do tipo III é fortemente reativa (Figura 5E-F). As secreções do tipo I e II são fracamente reativas a proteínas, enquanto que a do tipo III é fortemente corada (Figura 5G). Os três tipos de secreção mostram fraca reação para lipídeos (Figura 5H). O fluido seminal de *M. amazonicum* não possui polissacarídeos ácidos em sua composição (não exibidos aqui).

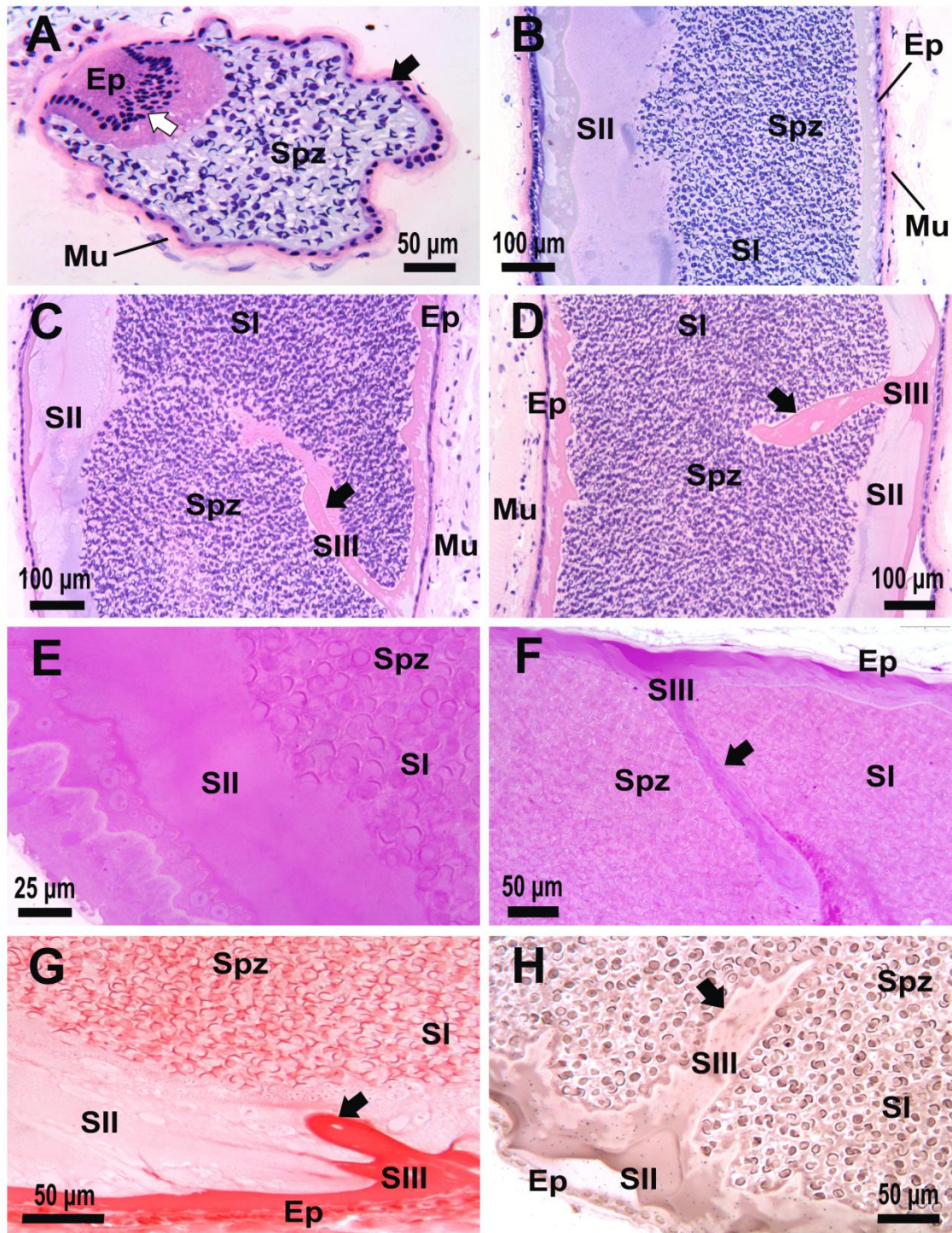


Figura 5. A. Seção transversal da região proximal do vaso deferente de *M. amazonicum*. A maior parte do vaso é revestida por epitélio cúbico (seta preta) e parcialmente por epitélio colunar (seta branca). B. Seção longitudinal da região proximal do vaso deferente mostrando espermatozoides imersos em secreção do tipo I, circundada pela secreção do tipo II. C-D. Seção longitudinal da região média e distal do vaso deferente, respectivamente, mostrando espermatozoides imersos em secreção do tipo I, envoltos pelas secreções do tipo II e III. Note a projeção da secreção tipo III (setas pretas) em sentido ao centro dos vasos [H&E]. E-F. Secreções do tipo I e II são moderadamente coradas para polissacarídeos neutros, enquanto que a secreção do tipo III (seta

preta) é fortemente reativa a PAS. **G.** Secreções do tipo I e II são fracamente coradas para proteínas, enquanto que a secreção tipo III (seta preta) é fortemente reativa ao xylidine ponceau. **H.** Fraca reação para lipídeos nas três secreções que formam o fluido seminal [Sudan Black B]. A secreção do tipo III emite projeções para o centro do vaso (seta preta). Ep: epitélio; Mu: músculo; Sl: secreção tipo I; SII: secreção tipo II; SIII: secreção tipo III; Spz: espermatozoides.

De forma geral, a concentração espermática variou significativamente entre os morfótipos de *M. amazonicum* ($F: 20,27 - p < 0,001$), com menores valores registrados para o morfótipo CC ($\bar{X} : 33 \pm 9,2 \times 10^3$ spz/ μ l) quando comparados aos morfótipos dominantes ($\bar{X} : 53 \pm 20,7$ e $59 \pm 23,7 \times 10^3$ spz/ μ l em GC1 e GC2, respectivamente) e ao morfótipo inicial ($\bar{X} : 58 \pm 14,7 \times 10^3$ spz/ μ l em TC) (Figura 6). No entanto, a concentração espermática não apresenta diferenças para o mesmo morfótipo em diferentes populações (TC = $F: 0,31 - p: 0,74$; CC = $t: 0,55 - p: 0,59$; GC1 = $t: -1,99 - p: 0,06$; GC2 = $t: -1,55 - p: 0,13$).

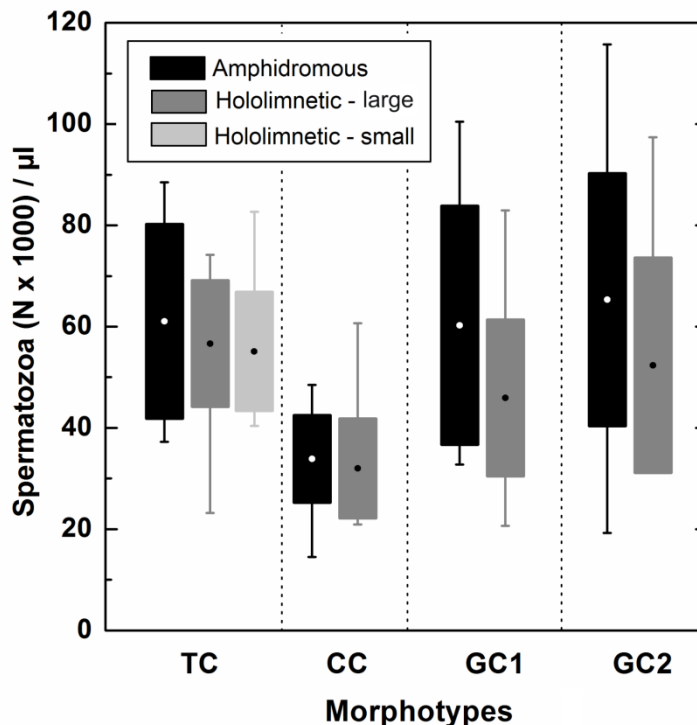


Figura 6. Valores mínimos, máximos (suíças), médias (círculos) e desvio padrão (caixas) da contagem espermática a fresco (número de espermatozoides/ μ l) em morfótipos de machos de uma população anfídroma e

populações hololimnéticas de grande e pequeno porte de *M. amazonicum*. CC: quela canela; GC1: quela verde 1; GC2: quela verde 2; TC: quela translúcida.

Diferenças significativas foram registradas para os valores médios de GSI, HSI e WI ao longo do desenvolvimento dos morfótipos de machos nas populações anfídroma (GSI = F: 11,45 - $p < 0,001$; HSI = 4,98 - $p < 0,01$; WI = F: 150,91 - $p < 0,001$) e hololimnética de grande porte (GSI = F: 13,65 - $p < 0,001$; HSI = 8,57 - $p < 0,001$; WI = 143,43 - $p < 0,001$). Em ambas as populações os GSI declinaram, enquanto que os WI aumentaram à medida que os machos passavam para o próximo morfótipo. Estes índices são inversamente correlacionados ($r: -0,51$; $p < 0,001$). Os valores de HSI aumentaram à medida que os GSI diminuíram ($r: -0,20$; $p < 0,01$) e os WI aumentaram ($r: 0,32$; $p < 0,001$). Os HSI foram maiores em machos da população anfídroma cultivada (Figura 7).

Além de apresentarem diferenças morfométricas e fenotípicas, machos do morfótipo TC mostram valores de índices reprodutivos distintos entre as populações analisadas (GSI = F: 8,76 - $p < 0,001$; HSI = 28,51 - $p < 0,001$; WI: F: 4,62 - $p < 0,001$). Os valores de GSI foram maiores nas populações hololimnéticas de pequeno porte, por outro lado os valores de WI foram menores nesta população (Figura 8).

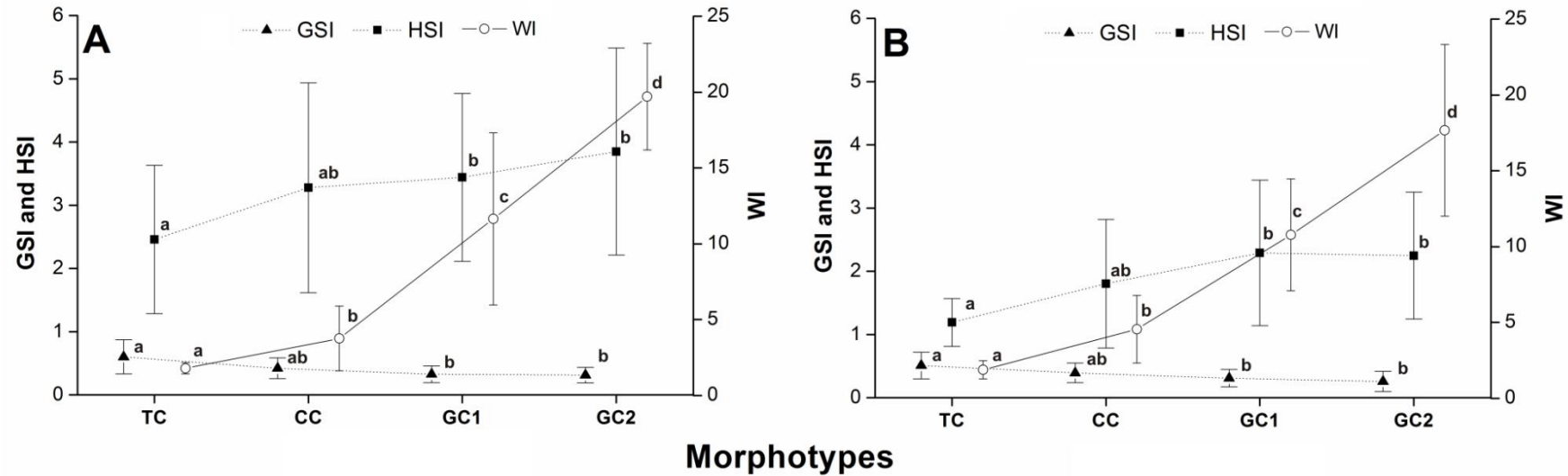


Figura 7. Índices gonadosomáticos (GSI), hepatossomáticos (HSI) e de armamento (WI) nos morfótipos de machos em populações anfidroma (**A**) e hololimnética de grande porte (**B**) de *M. amazonicum*. As médias e desvios padrões (suíças) estão plotados para cada morfótipo. Letras diferentes indicam diferenças significativas em comparação por pares dentro de cada índice. CC: queila canela; GC1: queila verde 1; GC2: queila verde 2; TC: queila translúcida.

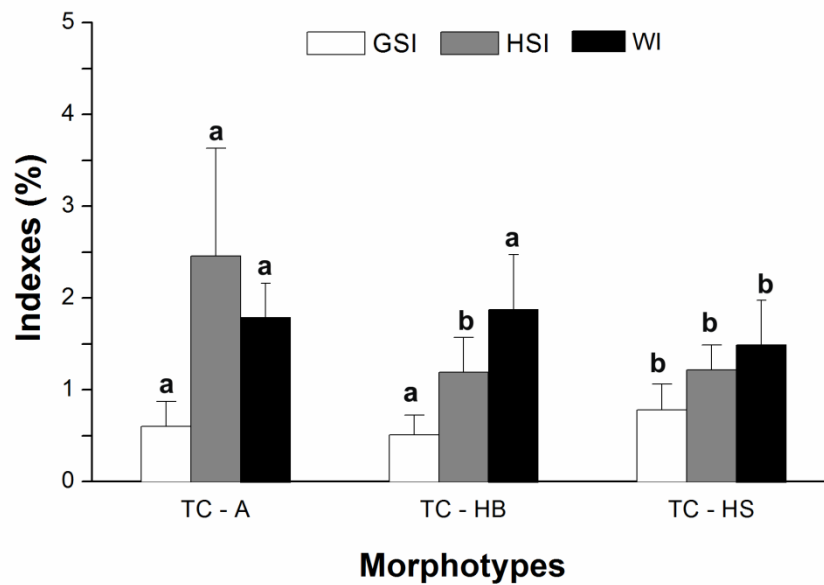


Figura 8. Índices gonadossomáticos (GSI), hepatossomáticos (HSI) e de armamento (WI) nos machos do morfótipo queila translúcida de uma população anfídroma (TC - A) e populações hololimnéticas de grande (TC - HB) e pequeno porte (TC - HS) de *M. amazonicum*. Letras diferentes indicam diferenças significativas em comparação por pares dentro de cada índice.

5. Discussão

Macrobrachium amazonicum apresenta diferenças nos padrões de produção e concentração espermática entre seus morfótipos. Porém, não mostra diferenças entre os três fenótipos descritos para a espécie. Os padrões de distribuição celular nos testículos modulam a produção espermática e, conseqüentemente, a concentração espermática no camarão amazônico. O morfótipo intermediário CC apresenta túbulos seminíferos preenchidos por espermatócitos em diferentes fases da prófase e menor quantidade de espermatozoides que os demais morfótipos. Este mesmo padrão histológico registrado para CC foi verificado no morfótipo intermediário queila laranja (OC) de *M. rosenbergii* (De Man, 1879), com túbulos seminíferos também preenchidos por espermatócitos (SAGI et al., 1988; OKUMURA e HARA, 2004). Segundo estes autores os machos do morfótipo OC não acasalam e acumulam espermatócitos para se tornarem machos dominantes do morfótipo queila azul (BC), equiparável aos morfótipos queila verde 1 e 2 (GC1 e GC2) em *M. amazonicum*. Os machos BC são sexualmente ativos e possuem grande quantidade de espermatozoides em seus testículos e VD, padrão similar ao registrado para

machos GC1 e GC2 neste trabalho. Além disso, os machos BC mostram maior sucesso reprodutivo, com maior acesso a cópulas e dominância de territórios. É possível que este padrão reprodutivo, possa ser uma regra em carídeos que apresentem hierarquia social em sua população, uma vez que populações hololimnéticas de *M. amazonicum* com a presença de machos dominantes possuem características semelhantes, como facilidade na obtenção de territórios e acesso a fêmeas (PASCHOAL, 2017 – Capítulo 2).

Okumura e Hara (2004) associaram a alta atividade reprodutiva em machos BC de *M. rosenbergii* à maior atividade das glândulas androgênicas neste morfótipo dominante. Estas glândulas secretam um peptídeo semelhante à insulina (IAG) responsável por regular a espermatogênese e desenvolver as armas sexuais em *Macrobrachium* (VENTURA et al., 2011). Paschoal (2017 – Capítulo 9) verificou que as glândulas androgênicas em machos de *M. amazonicum* são menores no morfótipo CC, o que pode explicar a baixa frequência de lóbulos com espermiogênese e os baixos valores de concentração espermática neste morfótipo. Desta maneira, o morfótipo CC pode ser um estado de “diapausa reprodutiva” no desenvolvimento sequencial de morfótipos em *M. amazonicum*. Assim, nosso trabalho concorda com o padrão descrito por Silva et al. (2009). Estes autores verificaram que machos deste morfótipo cessam momentaneamente a produção de espermatozoides, para acumular espermatócitos e energia para se tornar machos GC’s sexualmente ativos com uma grande quantidade de espermatozoides, o que nós também observamos para os morfótipos GC1 e GC2.

Os processos de espermatogênese e espermiogênese são idênticos para os três fenótipos de *M. amazonicum*. Estes processos são altamente conservativos em níveis de família ou subfamília em organismos aquáticos (JAMIESON, 1991; POLJAROEN et al., 2010). Em camarões carídeos, as espermatogônias e espermatócitos possuem características similares a de outros invertebrados (NUNES et al., 2005; POLJAROEN et al., 2010). No entanto, os últimos autores mostram que ao iniciar a espermiogênese, as espermátides realizam um processo de diferenciação com características exclusivas para o grupo, com o início da descondensação da eucromatina em um pólo do núcleo (espermátides intermediárias), até estar totalmente descondensada e a heterocromatina ficar restrita ao pólo anterior do núcleo (espermátides finais) (POLJAROEN et al., 2010). No final deste processo, os espermatozoides aflagelados e imóveis com formato de

tacha ou guarda-chuva invertido são produzidos, misturados ao fluido seminal e encaminhados aos vasos deferentes por meio de contrações musculares (HINSCH, 1991). A matriz do fluido seminal em *M. amazonicum* é composta por secreções do tipo I, II (basófilas) e III (eosinófila) de caráter glicolipoprotéico, e isto pode estar relacionado às suas diversas funções. *Macrobrachium rosenbergii* apresenta padrões histológicos e histoquímicos similares ao observado no presente estudo. Nesta espécie, a secreção do tipo I está relacionada à maturação dos espermatozoides, enquanto que as secreções do tipo II e III compõem a massa espermática. Esta estrutura carreadora de espermatozoides possui uma matriz adesiva eosinófila (secreção do tipo III), que é responsável por aderir à massa ao esterno das fêmeas após a cópula, e uma matriz de proteção basófila (secreção do tipo II) que impede que água carregue os espermatozoides, aumentando a probabilidade de fecundação dos ovos (CHOW et al., 1982; BAUER, 1986; POLJAROEN et al., 2010).

Armas sexuais desempenham um importante papel na seleção sexual em *M. amazonicum*, e a aquisição de armas robustas promove um decréscimo no investimento gonadal. Diferentes estratégias reprodutivas observadas nas populações com diferentes fenótipos mostram claramente essa relação de “trade-off”. Em populações de *M. amazonicum* com a presença de morfótipos, machos dominantes utilizam seus quelípodos para proteger, guardar e parear as fêmeas durante as cópulas, além de serem empregados em lutas com outros machos. Além disso, o desenvolvimento destas armas sexuais modula o início da maturidade sexual na espécie (PASCHOAL, 2017 – Capítulo 2). Em populações de grande porte com ciclo de vida anfídromo e hololimnético, os índices gonadossomáticos declinaram com o aumento do índice de armamento. Isto está relacionado ao sistema de acasalamento de dominância de territórios verificado nestes fenótipos (*sensu* CORREA e THIEL, 2003). Estes autores apontam que machos que adotam este tipo de estratégia possuem quelípodos hipertrofiados. Estes machos protegem e guardam as fêmeas no período de cópula. Comumente, destinam a maior parcela de sua energia ao crescimento somático e ao desenvolvimento e manutenção das armas sexuais visando um maior sucesso em competições intraespecíficas (AUGUSTO e VALENTI, 2016; PASCHOAL, 2017 – Capítulo 7), enquanto que uma menor fração de energia é usada na produção de espermatozoides, como constatado no presente estudo. Por outro lado, machos da população hololimnética

de pequeno porte apresentam um padrão inverso, com maior investimento reprodutivo quando comparado as demais populações e morfótipos. Isso se deve ao padrão de busca ativa adotado por esse fenótipo (*sensu* CORREA e THIEL, 2003). Nesta população os animais são gregários e os machos não apresentam comportamento agonístico, uma vez que não defendem e protegem as fêmeas e não são territorialistas. Além disso, não despendem energia para aquisição de armas sexuais, o que pode explicar a ausência de morfótipos nesse fenótipo (PASCHOAL, 2017 - Capítulo 2). Pode-se constatar que nas populações de grande porte, os machos investem mais energia no armamento que irá auxiliar o acesso as cópulas (evento pré-copulatório), enquanto que machos de pequeno porte investem mais energia na produção e transferência espermática (evento pós-copulatório).

6. Conclusão

Apesar das diferenças fenotípicas constatadas nas populações de *M. amazonicum*, não existem diferenças nos aspectos anatômicos e histológicos do sistema reprodutor masculino, assim como nos processos de espermatogênese e produção e concentração espermática. Isso mostra que os mecanismos reprodutivos são altamente conservativos quando comparados aos aspectos morfológicos e comportamentais. Em machos de *M. amazonicum*, existe uma clara relação de “trade-off” entre o investimento reprodutivo e a aquisição de armas, que é responsável por modular os caracteres sexuais reprodutivos e contribuir para a diversificação das estratégias sexuais na espécie. Em populações com morfótipos, o desenvolvimento de armas sexuais em detrimento do sistema reprodutor irá garantir um maior sucesso em cópulas, enquanto que na população sem morfótipos, o maior investimento reprodutivo em depleção da energia destinada as armas sexuais irá otimizar a produção espermática e aumentar a possibilidade de transferir o ejaculado as fêmeas.

7. Referências

AUGUSTO, A.; VALENTI, W.C. Are there any physiological differences between the male morphotypes of the freshwater shrimp *Macrobrachium amazonicum* (Heller,

1862) (Caridea: Palaemonidae)? **Journal of Crustacean Biology**, vol. 36, n. 5, p. 716-723. 2016.

BAUER, R.T. Phylogenetic trends in sperm transfer and storage complexity in decapod crustaceans. **Journal of Crustacean Biology**, vol. 6, n. 3, p. 313-325. 1986.

CHOW, S.; OGASAWARA, Y.; TAKI, Y. Male reproductive system and fertilization of the palaemonid shrimp *Macrobrachium rosenbergii*. **Bulletin of the Japanese Society for the Science of Fish**, vol. 48, n. 2, p. 177-183. 1982.

CORREA, C.; BAEZA, J.A.; HINOJOSA, I.A.; THIEL, M. Male dominance hierarchy and mating tactics in the rock shrimp *Rhynchocinetes typus* (Decapoda: Caridea). **Journal of Crustacean Biology**, vol. 23, n. 1, p. 33-45. 2003.

CORREA, C.; THIEL, M. Mating systems in caridean shrimp (Decapoda: Caridea) and their evolutionary consequences for sexual dimorphism and reproductive biology. **Revista Chilena de Historia Natural**, vol. 76, p. 187-203. 2003.

DARWIN, C. **The descent of man and selection in relation to sex**, 1st ed. London: William Clowes and Sons, 1871, 475 p.

EMLLEN, D.J. The evolution of animal weapons. **The Annual Review of Ecology, Evolution and Systematics**, vol. 39, p. 387-413. 2008.

IBRAHIM, A.N.A.F. **Controle social do crescimento do camarão-da-amazônia *Macrobrachium amazonicum***. 39 f. Dissertação de mestrado (Mestrado em Aquicultura). Universidade Estadual Paulista – UNESP, Jaboticabal. 2011.

HINSCH, G.W. Structure and chemical content of the spermatophores and seminal fluid of reptantian decapods. In: BAUER, R.T.; MARTIN, J.W. (Eds). **Crustacean Sexual Biology**. 1st ed. New York: Columbia University Press, 1991. p. 290-307.

JAMIESON, B.G.M. **Fish Evolution and Systematics: Evidence from Spermatozoa**. Cambridge University Press, Cambridge, 1991, 333 p.

JUNQUEIRA, L.C.U.; JUNQUEIRA, L.M.M.S. **Técnicas Básicas de Citologia e Histologia**. 1ed. São Paulo: Ed. Santos, 1983, 123 p.

MACIEL, C.R.; VALENTI, W.C. Biology, fisheries, and aquaculture of the amazon river prawn *Macrobrachium amazonicum*: a review. **Nauplius**, vol.17, p. 61-79. 2009.

MORAES-RIODADES, P.M.C.; VALENTI, W.C. Morphotypes in male amazon river prawns, *Macrobrachium amazonicum*. **Aquaculture**, vol. 236, p. 297-307. 2004.

OKUMURA, T.; HARA, M. Androgenic gland cell structure and spermatogenesis during the molt cycle and correlation to morphotypic differentiation in the giant freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii*. **Zoological Science**, vol. 21, n. 6, 621-628. 2004.

NUNES, E.T. et al. Cytodifferentiation during the spermatogenesis of the hermaphrodite caridea *Exhippolysmata oplophoroides*. **Micron**, vol 41, p. 585-591. 2010.

PANTALEÃO, J.A.F.; HIROSE, G.L.; COSTA, R.C. Occurrence of male morphotypes of *Macrobrachium amazonicum* (Caridea, Palaemonidae) in a population with an entirely freshwater life cycle. **Brazilian Journal of Biology**, vol. 74, n. 3 sup., p. 223-232. 2014.

PASCHOAL, L.R.P.; GUIMARÃES, F.J.; COUTO, E.C.G. Growth and reproductive biology of the amphidromous shrimp *Palaemon pandaliformis* (Decapoda, Caridea) in a Neotropical river from northeastern Brazil. **Zoologia (Curitiba)**, vol.33, n. 6, p. 1-14. 2016.

PASCHOAL, L.R.P.; ZARA, F.J. First record of intersexuality in the Amazon River shrimp *Macrobrachium amazonicum* (Heller, 1862) (Caridea: Palaemonidae). **Journal of Crustacean Biology**, vol. 74, n. 4, p. 1-5. 2017a.

PEARSE, A.G.E. **Histochemistry: Theoretical and Applied**. London: J&A Churchill, 1960. 998 p.

POLJAROEN, J. et al. Spermatogenesis and distinctive mature sperm in the giant freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii* (De Man, 1879). **Zoologischer Anzeiger**, vol. 249, p. 81-94. 2010.

RA'ANAN, Z.; SAGI, A. Alternative mating strategies in male morphotypes of the freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii* (De Man). **The Biological Bulletin**, vol. 169, p. 592-601. 1985.

R CORE TEAM. **R (The R Project for Statistical Computing)**. Software version 3.3.1. 2017. Disponível em: <www.r-project.org>. Acesso em: 01 dez. 2016.

SAGI, A.; MILNER, Y.; COHEN, D. Spermatogenesis and sperm storage in the testes of the behaviorally distinctive male morphotypes of *Macrobrachium rosenbergii* (Decapoda, Palaemonidae). **The Biological Bulletin**, vol. 174, p. 330-336. 1988.

SILVA, G.M.F. et al. Gonadal structure analysis of *Macrobrachium amazonicum* (Heller, 1862) from a wild population: a new insight into the morphotype characterization. **Aquaculture Research**, vol. 40, p. 798-803. 2009.

SIMMONS, L.W.; EMLLEN, D.J. Evolutionary trade-off between weapons and testes. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, vol. 103, n. 44, p. 16346-16351. 2006.

VENTURA, T.; ROSEN, O.; SAGI, A. From the discovery of the crustacean androgenic gland to the insulin-like hormone in six decades. **General and comparative endocrinology**, vol. 173, n. 3, p. 381-388. 2011.

ZARA, F.J. et al. Spermatogenesis, spermatophore and seminal fluid production in the adult blue crab *Callinectes danae* (Portunidae). **Journal of Crustacean Biology**, vol. 32, n. 2, p. 249-262. 2012.

Capítulo 9

**Morfologia e ultraestrutura da glândula androgênica em morfótipos
de *Macrobrachium amazonicum* (Heller, 1862)**

Morfologia e ultraestrutura da glândula androgênica em morfótipos de *Macrobrachium amazonicum* (Heller, 1862)

1. Resumo

A determinação sexual e os caracteres sexuais primários e secundários em crustáceos machos são modulados por hormônios produzidos na glândula androgênica (GA). Esta glândula também é responsável pela determinação morfológica em camarões carídeos com hierarquia social. *Macrobrachium amazonicum* apresenta quatro morfótipos, queila translúcida (TC), canela (CC), verde 1 (GC1) e 2 (GC2) mesmo em populações com histórias de vida anfídroma e hololimnética. Neste trabalho verificamos as variações anatômicas, histológicas e ultraestruturais da GA nos diferentes morfótipos do camarão amazônico. As GA's em morfótipos submissos (TC e CC) são reduzidas e estão concentradas na dilatação da ampola na região distal do vaso deferente (VD) ou ducto ejaculatório (ED). Em morfótipos dominantes (GC1 e GC2), estas glândulas estão bem distribuídas na porção distal do VD e ultrapassam o ED. As células das GA's em morfótipos dominantes possuem maior volume citoplasmático quando comparado aos outros morfótipos, devido à intensa atividade secretora destas células. Dois estágios morfológicos foram registrados para as células da GA, classificados em: estágio I ou inicial e estágio II ou final. Nos morfótipos submissos, as células em estágio I predominaram nas glândulas, enquanto que nos morfótipos dominantes prevaleceu o estágio morfológico II. As células das GA's em ambos os estágios foram positivas para proteína, confirmando a natureza protéica do hormônio. Células em estágio I mostram o retículo endoplasmático rugoso (RER) com cisternas paralelas entre si, enquanto que no estágio II, o RER encontra-se muito dilatado. As células em estágio II não produzem grânulos de secreção, porém sofrem hipertrofia e iniciam uma liberação de secreção holócrina, emitindo o conteúdo celular a hemolinfa. As GA's nos morfótipos inicial (TC) e dominantes (GC1 e GC2) aumentam à medida que os animais crescem e são maiores no morfótipo GC1. Isto está diretamente relacionado ao desenvolvimento de quelípodos robustos durante sua passagem para o morfótipo GC2. Por outro lado, estas glândulas diminuem no morfótipo CC à medida que o animal cresce, e isto parece estar relacionado ao acúmulo de energia para sua próxima muda para o morfótipo GC1, que é sexualmente ativo. Apesar das diferentes histórias de vida registradas para *M. amazonicum*, não existem diferenças nos padrões morfoanatômicos, histoquímicos e ultraestruturais das GA's para os fenótipos com morfótipos em machos.

Palavras-chave: camarão amazônico, histologia, MET, sistema reprodutor masculino, Caridea.

2. Introdução

Em algumas espécies de camarões carídeos gonocóricos, o dimorfismo sexual é bastante evidente e é responsável por estabelecer uma hierarquia social na população. Machos de morfótipos dominantes com grandes proporções corporais e quelípodos hipertrofiados apresentam vantagens seletivas sobre indivíduos de morfótipos submissos, como o domínio de territórios, facilidade na obtenção de recursos alimentares e maior sucesso reprodutivo (RA'ANAN e SAGI, 1985; CORREA e THIEL, 2003; CORREA et al., 2003; IBRAHIM, 2011). A presença de morfótipos em machos carídeos é comum para os gêneros *Rhynchocinetes* H. Milne Edwards, 1837: *R. brucei* Okuno, 1994 em Thiel et al. (2010), *R. durbanensis* Gordon, 1936 em Prakash et al. (2016) e *R. typus* H. Milne Edwards, 1837 em Correa et al. (2003), e *Macrobrachium* Spence Bate, 1868: *M. amazonicum* (Heller, 1862) em Moraes-Riodades e Valenti (2004) e Pantaleão et al. (2014), *M. dayanum* (Henderson, 1893) em Langer et al. (2002), *M. idella idella* (Hilgendorf, 1898) em Soundarapandian et al. (2013) e *M. rosenbergii* (De Man, 1879) em Ra'anán e Sagi (1985) e Kuris et al. (1987). Em todos estes estudos algumas características em comum são observadas entre os morfótipos dominantes, como a presença de armas sexuais robustas, investimento em crescimento somático, agressividade e interações agonísticas (lutas) no comportamento territorial e reprodutivo.

A determinação sexual e o desenvolvimento de caracteres sexuais primários (i.e. espermatogênese) e secundários (e.g. hipertrofia do quelípodos) em machos de crustáceos são regulados pelas glândulas androgênicas (GA's) (CHARNIAUX-COTTON, 1954, 1958; VENTURA et al., 2011). O conhecimento dos aspectos anatômicos, histológicos e ultraestruturais da GA, assim como a manipulação sexual em carídeos é focado no camarão gigante da malásia *M. rosenbergii* (NAGAMINE et al., 1980 a,b; SAGI et al., 1995, 1990, 1997; OKUMURA e HARA, 2004; PHOUNGPETCHARA et al., 2011; VENTURA et al., 2011; VENTURA e SAGI, 2012 e outros). Isto se deve principalmente a sua grande importância na aquicultura, sendo o crustáceo dulciaquícola mais cultivado no mundo (FAO, 2017). Em carídeos, as GA's estão dispostas de forma paralela a porção distal dos vasos deferentes e são bem marcadas anatomicamente (SAGI et al., 1997; BORTOLINI e BAUER, 2016; PASCHOAL, 2017 - Capítulo 2). A principal característica das células da GA é a abundância de retículo endoplasmático rugoso (RER), além de corpos

eletrodensos ou lisossomos (KING, 1964; RADU e CRĂCIUN, 1976). A GA secreta um hormônio peptídico semelhante à insulina (IAG), responsável pela masculinização dos animais (VENTURA e SAGI, 2012). Este hormônio é responsável por regular a espermatogênese, o desenvolvimento dos gonóporos e a hipertrofia dos quelípodos nos machos, além de promover a determinação dos morfótipos e modular o comportamento agressivo nos morfótipos dominantes (NAGAMINE et al., 1980 a,b; OKUMURA e HARA, 2004; VENTURA et al., 2011). Nagamine et al. (1980a) e Sagi et al. (1995) demonstraram o papel regulatório da GA em *M. rosenbergii* ao realizar a andrectomia (ablação das glândulas) em camarões machos da espécie, promovendo a feminização dos indivíduos após este processo.

Macrobrachium amazonicum é uma espécie americana com grande potencial para a aquicultura (NEW, 2005), além de ser muito consumida no norte e nordeste do Brasil (MACIEL e VALENTI, 2009). Esta espécie apresenta populações com histórias de vida anfídroma e hololiminética, o que confere um amplo espectro de utilização de ambientes aquáticos (e.g. lagos a estuários) (ANGER, 2013). Em geral, apenas as populações anfídromas são cultivadas, e são as mais estudadas quanto à produção e manejo (ver MORAES-VALENTI e VALENTI, 2010). Independentemente da história de vida adotada, machos do camarão amazônico possuem na maioria das populações estudadas, quatro morfótipos: quela translúcida (TC) e canela (CC) ambos considerados submissos, e quela verde 1 (GC1) e 2 (GC2), os quais mostram comportamento dominante (MORAES-RIODADES e VALENTI, 2004; PANTALEÃO et al., 2014). Apesar da importância da GA para o desenvolvimento e o comportamento dos indivíduos nas populações, assim como sua influência na estrutura populacional (e.g. proporção sexual e morfotípica) (SAGI e AFLALO 2005; VENTURA et al., 2011; BORTOLINI e BAUER, 2016), esta glândula nunca foi estudada no camarão amazônico. Assim, este trabalho tem como objetivo descrever e comparar a GA em diferentes morfótipos de *M. amazonicum* utilizando animais de populações anfídromas e hololimnéticas.

3. Material e métodos

3.1. Animais e morfótipos

Camarões machos de *M. amazonicum* apresentando desenvolvimento hololimnético foram coletados de Outubro de 2014 a Dezembro de 2015 no Rio Grande (20° 30' 53" S; 46° 50' 16" W) município de Cássia, estado de Minas Gerais (sudeste do Brasil). Animais selvagens foram capturados por coleta passiva, por meio de seis armadilhas (85 cm comprimento X 35 cm largura/altura) iscadas com fígado bovino. Os machos anfídromos foram obtidos no Laboratório de Carcinicultura do Centro de Aquicultura da UNESP (CAUNESP – Jaboticabal/SP), entre os meses de Agosto de 2015 a Abril de 2016. Esta população cultivada é oriunda do município de Santa Bárbara do Pará, estado do Pará (norte do Brasil). Os machos hololimnéticos e anfídromos foram separados em morfótipos pelo tipo de coloração e comprimento dos quelípodos, ângulos dos espinhos nos carpos e própodos e pubescência nos dactílos em: quela translúcida (TC), canela (CC), verde 1 (GC1) e 2 (GC2), de acordo com Moraes-Riodades e Valenti (2004) e Pantaleão et al. (2014). Posteriormente, os animais foram pesados a fresco (W) em balança analítica (0,0001g) e tiveram o comprimento de carapaça (CL), comprimento total (TL), comprimento do quelípodo maior (MCL) e comprimento do *appendix masculina* (AML) mensurados com paquímetro analógico (0,02mm).

3.2. Histologia, histoquímica e medidas celulares

Para as análises anatômicas e histológicas, 40 indivíduos recém-coletados (cinco animais em cada morfótipo para cada população) foram anestesiados por resfriamento (- 20°C/ 5 minutos) e dissecados. A porção distal dos vasos deferentes (VD) contendo as GA's foram fixadas em paraformaldeído 4% por 24 horas (4°C), lavados duas vezes em tampão fosfato 0,2M (pH 7,2), desidratados em uma série crescente de etanol (70 a 95 %), embebidos e incluídos em historesinaglicol-metacrilato Leica®. Os blocos foram cortados com 4-5 µm de espessura em micrótomo rotativo e as seções histológicas foram recolhidas em lâminas e coradas com hematoxilina e eosina (H&E) para descrição geral (ZARA et al., 2012). Para as análises histoquímicas, as lâminas foram coradas com xylydine ponceau para proteínas totais (MELLO e VIDAL, 1980), Alcian Blue (pH 1 e 2,5) e PAS (Ácido periódico de Schiff) para polissacarídeos ácidos e neutros, respectivamente (PEARSE, 1960; JUNQUEIRA e JUNQUEIRA, 1983). Para a identificação de lipídeos, as lâminas foram coradas com Sudan black B (JUNQUEIRA e

JUNQUEIRA, 1983). Porém, as amostras para esta técnica não foram desidratadas, sendo embebidas e incluídas diretamente em historesina (ZARA et al., 2012).

A proporção núcleo:citoplasma (N/C) das células da GA foram calculadas segundo a fórmula: $N/C = \text{área do núcleo} / \text{área da célula} \times 100$ (DOUGHTY, 2012). As áreas foram obtidas pela delimitação manual do núcleo e da célula com o software Leica® IM50, mensuradas sob objetiva de 20X, em lâminas coradas com H&E. Para cada morfótipo, lâminas de pelo menos três machos foram examinadas (N: 45 células por morfótipo). A proporção N/C das GA's dos morfótipos foi testada quanto à normalidade por meio do teste de Shapiro-Wilk (normalidade satisfeita - W-Statistic = 0,98 - p : 0,09). Posteriormente, uma análise de variância (ANOVA) com teste *a posteriori* de Tukey (α : 0,05) foi utilizada para verificar diferenças entre a relação N/C das glândulas nos morfótipos.

3.3. Microscopia eletrônica

Para a microscopia eletrônica de transmissão (MET), amostras das GA's foram fixadas em glutaraldeído 2,5% em tampão cacodilato de sódio 0,08M (pH 7,2) por quatro horas a 4°C, pós-fixadas com tetróxido de ósmio 1% no mesmo tampão e contrastadas “Enbloc” com acetato de uranila 1% aquoso (overnight a 4°C). As amostras foram desidratadas em séries crescentes de acetona (70 a 100%), embebidas e incluídas em resina Epon-Araldite®. Os cortes ultrafinos foram obtidos no ultramicrotomo Leica® UC7 e as grades com os cortes foram contrastadas com acetato de uranila 2% e citrato de chumbo 0,4%. Todas as amostras foram observadas e fotografadas no MET Jeol J1010 operado a 80kV.

Para a microscopia eletrônica de varredura (MEV), a região distal dos VD foram fixadas (24 horas) e pós-fixadas com o mesmo protocolo da MET. Posteriormente, as amostras foram desidratadas em séries crescentes de etanol (70 a 100%) e completamente secadas em ponto crítico EMS 850 com CO₂ líquido. Após a secagem, as amostras foram montadas nos suportes metálicos (stubs) com fita dupla face e recobertas com ouro no “sputtering” Denton vacuum desk II. Os materiais foram observados e fotografados no MEV Jeol-JSM 5410, com voltagens variando de 10-20 kV.

3.4. Mensuração da GA

Cinco machos de cada morfótipo de ambas as populações (N: 40) foram anestesiados por resfriamento e tiveram seus sistemas reprodutores cuidadosamente removidos. Posteriormente, os VD foram separados dos testículos dos animais, tiveram seus ductos ejaculatórios (ED) mensurados e foram reservados em paraformaldeído 4%. As GA's foram mensuradas sob estereomicroscópio Leica® por meio da delimitação manual do entorno das glândulas dispostas sobre os VD e ED. As áreas das GA's foram registradas com o software Leica® IM50, com a calibração apropriada para as lentes utilizadas.

Como não existiram diferenças entre as medidas das áreas das GA's de um mesmo indivíduo (teste $t = N: 40; t = 0,04 - p: 0,96$), utilizamos o valor médio obtido pela mensuração das glândulas direita e esquerda de cada animal para a comparação entre morfótipos. As diferenças entre as áreas das glândulas nos morfótipos foram testadas com uma ANOVA seguida pelo teste *a posteriori* de Tukey ($\alpha: 0,05$), uma vez que os dados possuíam distribuição normal (W-Statistic = 0,96 - $p: 0,13$). Regressões lineares foram ajustadas utilizando como variáveis independentes (x) o CL, TL e MCL e relacionando-os com a área da GA (y - variável independente) em cada morfótipo e para todos os animais agrupados. Os coeficientes de determinação (r^2) e as inclinações (b - verificado pelo teste t de Student) das retas foram calculados, a fim de verificar o padrão de crescimento das glândulas em morfótipos de *M. amazonicum* (GOTELLI e ELLISON, 2004). O b da equação das regressões é a constante alométrica que expressa à relação existente entre duas variáveis. Se $b > 1$ é caracterizado um crescimento alométrico positivo, se $b < 1$ o crescimento é alométrico negativo e quando $b = 1$ é tido como isométrico. Se b apresenta um valor negativo, ocorre a enantometria, onde a variável dependente diminui em tamanho com o crescimento corporal (TEISSIER, 1960). Todos os cálculos e análises estatísticas foram realizados no software R versão 3.3.1 (R DEVELOPMENT CORE TEAM, 2016).

4. Resultados

As GA's em machos de *M. amazonicum* estão dispostas longitudinalmente sobre a camada muscular da região distal dos VD (Figuras 1A-C e 2A-B). Estas estruturas apresentam diferenças anatômicas entre os quatro morfótipos, com

padrões de arranjo e distribuição similares entre as populações analisadas. Nos morfótipos TC e CC, as glândulas possuem menor tamanho e comumente estão concentradas na expansão terminal dos VD, as ampolas dos ED (Figuras 1A e 2A). Nos morfótipos GC1 e GC2, as GA's estendem-se da porção distal dos VD e ultrapassam a dilatação dos ED (Figuras 1B-C e 2B). A GA está sempre disposta para a face ventral do vaso, sobre uma delgada camada de tecido conjuntivo, o qual está em contato com a espessa musculatura da região distal dos VD (Figuras 1C-D e 2C-D).

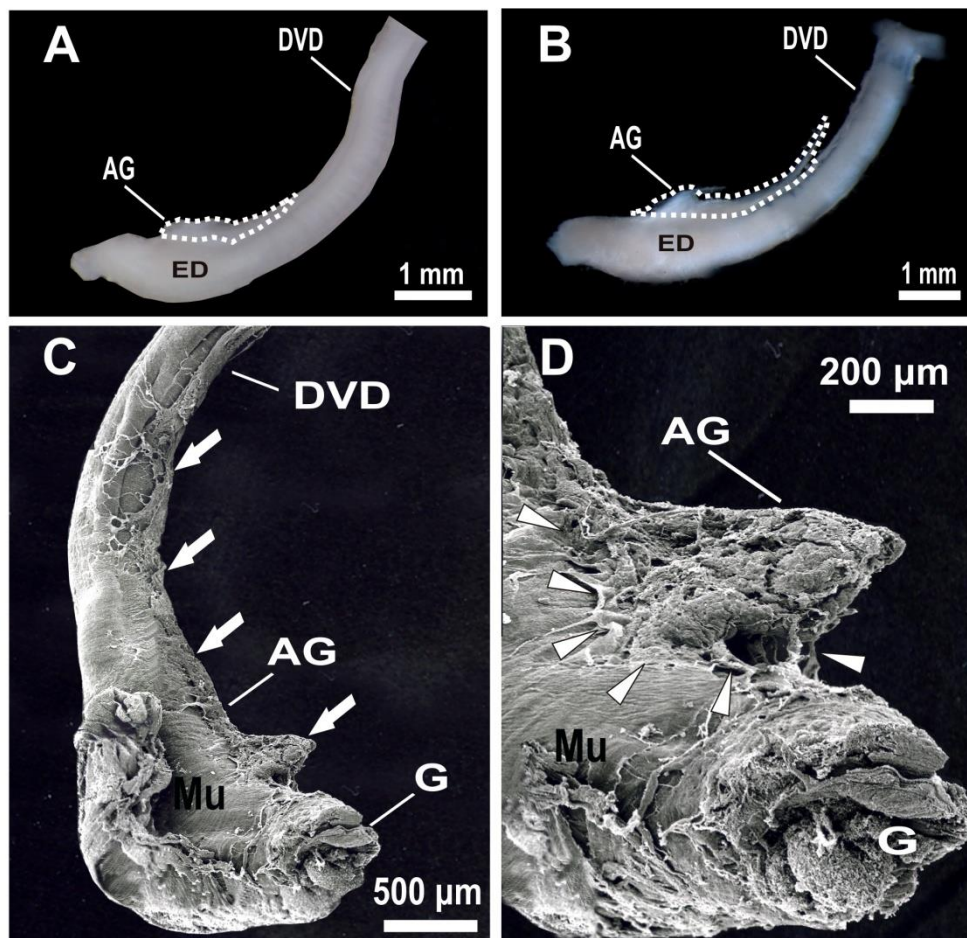


Figura 1. A e B. Região distal do vaso deferente de machos do morfótipo TC e GC2 de *M. amazonicum*, respectivamente, mostrando a glândula androgênica disposta de forma paralela ao vaso. O traçado mostra a delimitação da área da glândula androgênica utilizada para a mensuração desta estrutura. C. Glândula androgênica no morfótipo GC1. Em machos dominantes, esta estrutura ocupa grande parte da porção distal do vaso deferente (setas brancas). D. A glândula androgênica é aderida ao tecido muscular do vaso deferente por tecido conjuntivo (cabeças de setas brancas). AG: glândula androgênica; DVD: porção distal do vaso deferente; ED: ducto ejaculatório; G: poro genital; Mu: camada muscular.

As células das GA's podem ser classificadas quanto ao grau de vacuolização citoplasmática, indicando dois estágios morfológicos distintos da atividade secretora nestas células: I ou inicial e II ou final (Figura 2D-I). As células em estágio I são predominantes nas glândulas do morfótipo inicial TC. Neste estágio, as células apresentam núcleo maior em relação ao citoplasma, o qual não possui vacúolos, o que pode ser notado nas poucas células em estágio II. No geral, as células da GA neste morfótipo estão bem aderidas umas as outras, produzindo um aspecto mais compacto (Figura 2D). No morfótipo intermediário CC, as células em estágio I apresentam-se em proporção similar a células do estágio II, as quais possuem núcleos menores que as células do morfótipo TC (Figura 2E). Machos dos morfótipos GC1 e GC2 apresentam um padrão similar de organização das células da GA. Nestes morfótipos, as células em estágio II são mais volumosas e mais abundantes que células em estágio I, as quais são pouco observadas. Células em estágio II são caracterizadas por grandes vacúolos e/ou citoplasmas não corados (Figura 2F). Apesar das diferenças nos padrões histológicos, não foram detectadas diferenças histoquímicas nas GA's entre os quatro morfótipos ou para os indivíduos das populações. O citoplasma e o núcleo das células da GA foram positivos para proteínas (Figura 2G) e negativos para polissacarídeos ácidos (não exibidos aqui) e neutros (Figura 2H) e lipídeos (Figura 2I).

A proporção N/C das células da GA diferiu entre os morfótipos ($F = 53,05 - p < 0,001$), com redução da proporção N/C ao longo do desenvolvimento sequencial (Tukey = TC-CC: 3,28; CC-GC1: 5,50; e GC1-GC2: 2,55 - $p < 0,001$). Machos dos morfótipos TC (N/C: $57,85 \pm 8,68\%$) e CC (N/C: $51,51 \pm 9,15\%$) apresentam células com citoplasma menor quando comparados aos morfótipos GC1 (N/C: $40,87 \pm 9,98\%$) e GC2 (N/C: $35,96 \pm 8,77\%$).

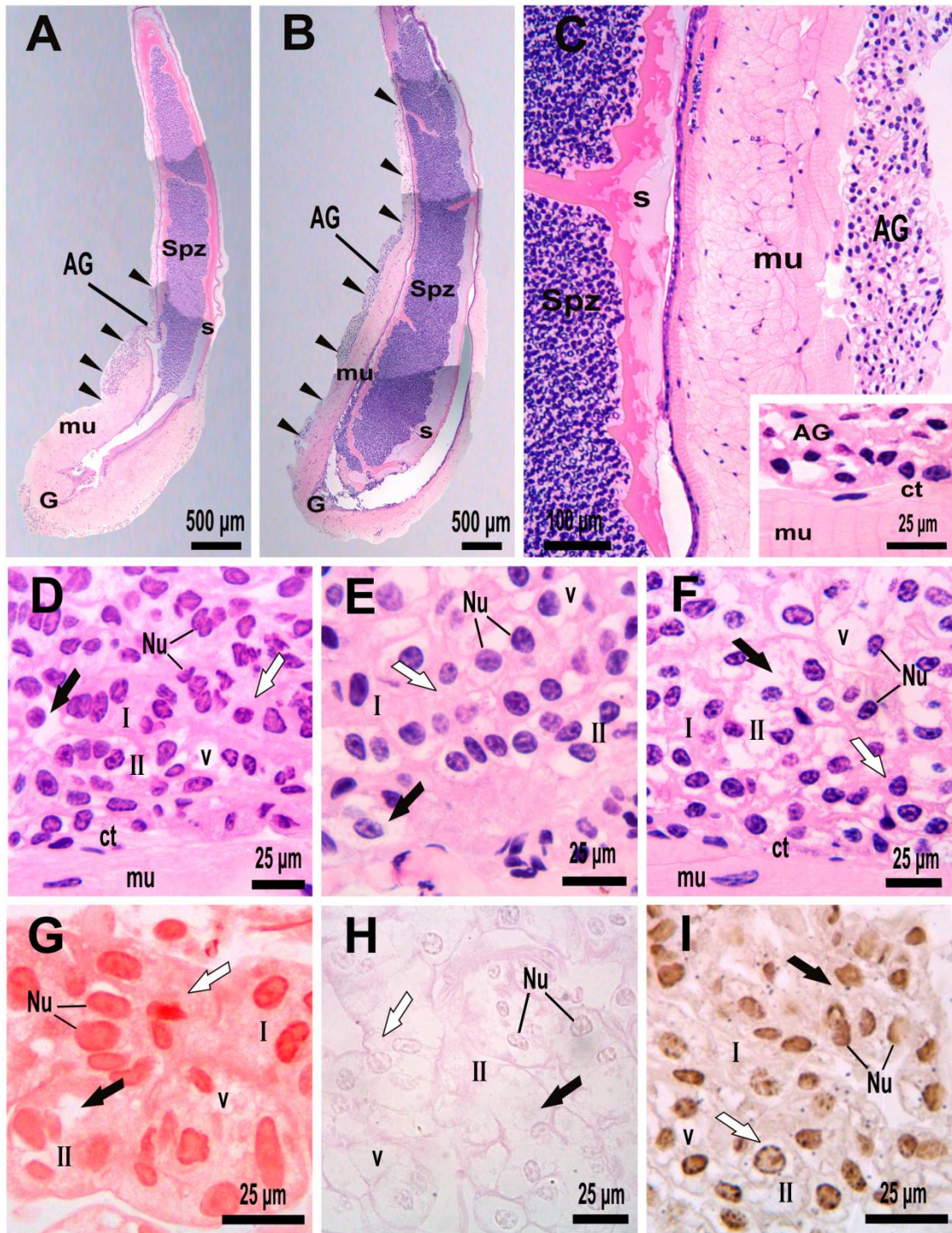


Figura 2. **A.** Porção distal do vaso deferente no morfótipo TC de *M. amazonicum* com glândula androgênica de tamanho reduzido e concentrada na ampola do ducto ejaculatório (cabeças de setas pretas) [H&E]. **B.** Porção distal do vaso deferente de um macho GC1 com a glândula androgênica ocupando grande parte do vaso (cabeças de setas pretas) [H&E]. **C.** Glândula androgênica aderida à espessa camada muscular da porção distal do vaso deferente por uma delgada camada de tecido conjuntivo [H&E]. **D.** No morfótipo TC, as células da glândula androgênica comumente estão em estágio I. Estas são compactadas, com grandes núcleos e sem vacúolos no citoplasma [H&E]. **E.** Glândulas androgênicas em machos CC apresentam proporções similares de células em estágios I e II [H&E]. **F.** Células das

glândulas androgênicas em machos GC2 comumente estão em estágio II e apresentam grandes vacúolos [H&E]. **G.** Reação positiva para proteínas nas células das glândulas androgênicas [xylidine ponceau]. **H e I.** Células das glândulas androgênicas são negativas a técnicas de polissacarídeos neutros e lipídeos [PAS e Sudan black b, respectivamente]. Nota-se em todos os morfótipos, o acúmulo (setas brancas) e liberação (setas pretas) de hormônio no citoplasma destas células. AG: glândula androgênica; ct: tecido conjuntivo; G: abertura genital; I: células em estágio I; II: células em estágio II; mu: camada muscular; Nu: núcleo; s: secreção; Spz: espermatozoides; v: vacúolo.

Por meio da ultraestrutura, nota-se que as células da GA estão envoltas por tecido conjuntivo e que os tipos celulares que a compõem, possuem citoplasma preenchido pelas membranas do retículo endoplasmático rugoso (RER). As células do estágio morfológico I apresentam o RER com cisternas paralelas, enquanto que células em estágio II mostram RER dilatado e vacúolos (Figura 3A). Células em estágio I mostram o citoplasma quase que totalmente preenchido por RER com cisternas achatadas e justapostas umas as outras, e por entre esta organela encontram-se mitocôndrias e complexos de Golgi. A continuidade do RER com o complexo de Golgi é observada nestas células, mostrando que a última organela é responsável por modificar o material oriundo do RER e enviá-lo ao citoplasma. Comumente, vesículas eletrodensas são observadas próximas ao complexo de Golgi (Figura 3B). Material eletrodenso é observado nas cisternas do RER (Figura 3C). No citoplasma são observadas vesículas eletrodensas de tamanho variável, com aproximadamente 3 μm , e parecem sofrer fusão umas as outras, caracterizando assim os lisossomos (Figura 3D-E). Células em estágio II mostram citoplasma com RER apresentando cisternas bastante dilatadas e material granular em seu interior, o que promove a deslocação dos componentes celulares e contribui para a vacuolização do citoplasma neste estágio. Além disso, comumente mitocôndrias degeneradas são observadas no citoplasma destas células (Figura 3 F-G). Estas células sofrem hipertrofia e iniciam um processo de degeneração, caracterizado pelo aumento dos vacúolos e descamação da célula, ou seja, secreção holócrina.

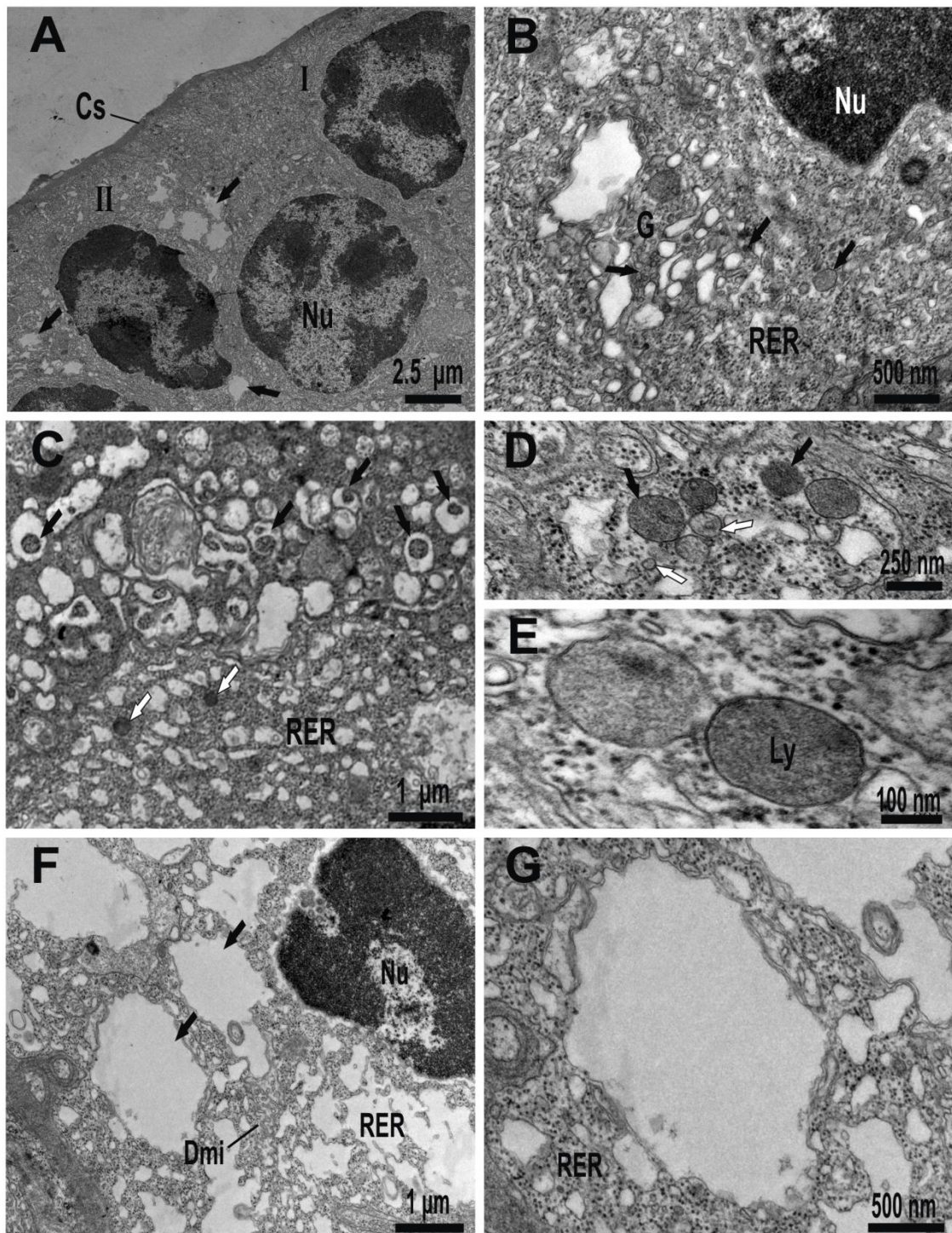


Figura 3. A. Células das glândulas androgênicas em diferentes estágios. Células em estágio I apresentam o citoplasma sem vacúolos, o que caracteriza o citoplasma do estágio II (setas pretas). B. Células em estágio I com RER mostrando cisternas pouco dilatadas no citoplasma. Note que o complexo de Golgi possui vesículas eletrodensas (setas pretas). C. Formação (setas brancas) e condensação (setas pretas) de corpos eletrodensos nas cisternas do RER. D. Corpos eletrodensos mostram variação na eletrodensidade e tamanho (setas pretas e brancas). E. Fusão de lisossomos. Note que estas organelas são envolvidas por apenas uma membrana e mostram variação em seu conteúdo. F. Células em estágio II apresentando RER com cisternas bastante dilatadas (setas pretas) e mitocôndrias degeneradas em seu

citoplasma. **G.** Detalhe em maior aumento de F, mostrando RER dilatado com material granular em seu interior. I: células em estágio I; II: células em estágio II; Cs: tecido conjuntivo; Dmi: mitocôndria degenerada; G: complexo de Golgi; Ly: lisossomo; Nu: núcleo; RER: retículo endoplasmático rugoso.

Em *M. amazonicum*, nota-se o aumento gradual no tamanho corporal, peso e comprimento dos quelípodos (Tabela I), assim como as áreas das GA's durante a passagem de um morfótipo a outro. As áreas da GA em *M. amazonicum* diferiram ao longo do desenvolvimento dos morfótipos ($F = 17,08 - p < 0,001$). No morfótipo inicial TC, a área da glândula foi de $0,69 \pm 0,18 \text{ mm}^2$, valor superior ao registrado para o morfótipo intermediário CC, com $0,62 \pm 0,14 \text{ mm}^2$. Apesar do incremento corporal observado em CC, as áreas das glândulas não apresentaram diferenças significativas entre estes morfótipos (Tukey = 0,71 - p : 0,48). Ao passar para o morfótipo GC1, ocorre um aumento significativo da área das glândulas (Tukey = 5,76 - $p < 0,001$), havendo uma posterior estabilização do crescimento desta estrutura ao tornar-se machos GC2 (Tukey = 0,84 - p : 0,41). Nos morfótipos dominantes a área da GA foi de $1,15 \pm 0,26 \text{ mm}^2$ em GC1 e de $1,07 \pm 0,21 \text{ mm}^2$ para GC2. A análise comparativa das áreas das GA's em relação às variáveis morfométricas mostrou que em machos de *M. amazonicum* estas estruturas aumentaram à medida que os animais cresceram (alometria negativa), todavia quando analisados separadamente, os morfótipos apresentaram características distintas. Morfótipos TC, GC1 e GC2 apresentaram crescimento alométrico negativo para a relação área da GA vs. CL, TL e MCL, com o morfótipo GC1 apresentando grande variabilidade no tamanho da glândula e exibindo maiores valores médios registrados quando comparados aos demais morfótipos. Por outro lado, no morfótipo CC ocorre a diminuição da área da GA à medida que o indivíduo cresce, ou seja, enantometria (*sensu* Teissier, 1960) (Tabela II e Figura 4).

Tabela I. Valores médios (\pm desvio padrão) das variáveis morfométricas, peso e caracteres sexuais nos morfótipos de machos de *M. amazonicum*. AML: comprimento do *appendix masculina*; CC: quela canela; CL: comprimento de carapaça; EDL: comprimento do ducto ejaculatório; GC1: quela verde 1; GC2: quela verde 2; MCL: comprimento do quelípodo maior; TC: quela translúcida; TL: comprimento total; W: peso fresco.

Morfótipos	CL (mm)	TL (mm)	MCL (mm)	W (g)	AML (mm)	EDL (mm)
TC	13,33	46,27	24,27	1,7896	3,96	2,40
	$\pm 2,71$	$\pm 8,31$	$\pm 3,76$	$\pm 0,8778$	$\pm 0,62$	$\pm 0,46$
CC	17,17	57,61	32,71	3,1970	4,67	2,98
	$\pm 1,37$	$\pm 3,76$	$\pm 3,39$	$\pm 0,7897$	$\pm 0,38$	$\pm 0,28$
GC1	21,72	68,68	56,22	5,9885	5,85	3,46
	$\pm 0,90$	$\pm 4,22$	$\pm 11,84$	$\pm 0,8924$	$\pm 0,26$	$\pm 0,27$
GC2	26,25	79,00	98,55	9,8632	6,74	3,64
	$\pm 2,10$	$\pm 5,50$	$\pm 15,51$	$\pm 1,8928$	$\pm 0,51$	$\pm 0,37$

Tabela II. Regressões lineares entre a área da glândula androgênica (GA) e variáveis morfométricas para cada morfótipo e em machos agrupados de *M. amazonicum*. A: alometria; CC: quela canela; CL: comprimento de carapaça; e: eniantometria; GC1: quela verde 1; GC2: quela verde 2; MCL: comprimento do quelípodo maior; r^2 : coeficiente de determinação; TC: quela translúcida; TL: comprimento total. * Estatisticamente significante a $p < 0,001$.

Relação	Morfótipos	b	a	r^2	t (b=1)	A
GA vs. CL	TC	0,054	0,032	0,64	66,06*	-
	CC	-0,025	1,054	0,06	30,28*	e
	GC1	0,071	0,411	0,06	9,23*	-
	GC2	0,032	0,217	0,10	28,75*	-
	Agrupado	0,039	0,119	0,45	137,71*	-
GA vs. TL	TC	0,016	0,051	0,53	21,49*	-
	CC	-0,014	1,470	0,17	12,53*	e
	GC1	0,014	0,169	0,05	5,46*	-
	GC2	0,018	0,351	0,22	9,44*	-
	Agrupado	0,015	0,058	0,44	42,89*	-
GA vs. MCL	TC	0,028	0,043	0,43	8,23*	-
	CC	-0,003	0,710	0,01	10,81*	e
	GC1	0,008	0,678	0,14	16,91*	-
	GC2	0,003	0,694	0,08	27,56*	-
	Agrupado	0,006	0,535	0,40	96,43*	-

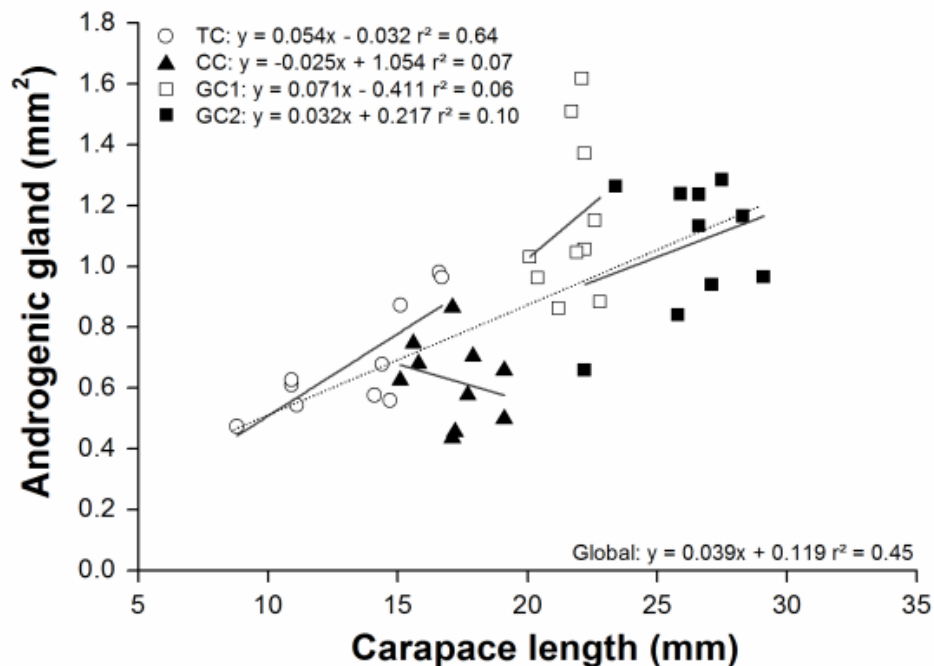


Figura 4. Relação entre a área da glândula androgênica e o comprimento de carapaça para cada morfótipo (linhas sólidas) e em machos agrupados (Global: linha pontilhada) de *M. amazonicum*. CC: quela canela; GC1: quela verde 1; GC2: quela verde 2; r^2 : coeficiente de determinação; TC: quela translúcida.

5. Discussão

As GA's de *M. amazonicum* estão dispostas com o arranjo típico de outros carídeos, gonocóricos ou hermafroditas potândricos (HOFFMAN, 1989; OKUMURA e HARA, 2004; PHOUNGPETCHARA et al., 2011; BORTOLINI e BAUER, 2016). Nestes animais estas glândulas secretam o IAG, hormônio responsável pela determinação sexual e morfológica, além de promover o desenvolvimento de caracteres sexuais. Sua funcionalidade foi comprovada por meio da silenciagem da expressão genética do IAG com o RNA interferência (RNAi), ao inibir o crescimento e o desenvolvimento de caracteres sexuais secundários em machos de *M. rosenbergii* que receberam tratamento com RNAi (VENTURA et al., 2011). Recentemente, a intersexualidade na espécie aqui estudada, foi atribuída à disfunção hormonal e uma possível falha na expressão do IAG, uma vez que *M. amazonicum* é estritamente gonocórico (PASCHOAL e ZARA, 2017).

Células das GA's em *M. amazonicum* apresentam dois estágios de atividade secretora e secretam hormônio de natureza proteica. Em morfótipos submissos (TC

e CC) do camarão amazônico, as GA's eram mais compactas e repletas de células em estágio I, coesas e sem vacuolização. Enquanto que nos morfótipos dominantes (GC1 e GC2), células em estágio II eram predominantes e apresentavam áreas bastante vacuolizadas, indicando a secreção direta de hormônio. No entanto, as características histoquímicas dos estágios celulares eram idênticas, mostrando marcação somente para proteínas. A diferença entre os estágios se deve ao deslocamento de componentes celulares após a dilatação do RER no início do estágio II. Estes resultados mostram que os diferentes estágios de desenvolvimento histológico das GA's estão relacionados ao acúmulo e exocitose de secreção como proposto por Hoffman (1969) e Taketomi (1986), ao invés de tipos celulares diferentes e com funções distintas, como sugerido por Okumura e Hara (2004) e Phoungpetchara et al. (2011). Padrões histoquímicos e ultraestruturais similares ao observado em *M. amazonicum* foram verificados nas células das GA's de *M. rosenbergii* (AWARI e DUBE, 1999; JOSEPH, 2002; OKUMURA e HARA, 2004; PHOUNGPETCHARA et al., 2011). Nesta espécie, o hormônio androgênico é constituído por peptídeos com baixo peso molecular (16-18 kd), o que confere resultados positivos para testes histoquímicos para proteínas nas células das GA's (SUN et al., 2000). A natureza proteica do hormônio das GA's foi inicialmente sugerida por King (1964), por meio da análise dos aspectos ultraestruturais das células desta estrutura. O autor verificou uma grande abundância de RER bastante dilatado e mitocôndrias no citoplasma destas células em *Pachygrapsus crassipes* (Randall, 1840), relacionando este padrão a células produtoras de proteínas em vertebrados (e.g. células pancreáticas). Pode-se verificar que as células das GA's em *M. amazonicum* possuem características típicas de células que sintetizam proteínas em um curto espaço de tempo e armazenam seus produtos dentro das cisternas dilatadas do RER quando não são imediatamente secretados, como plasmócitos (JUNQUEIRA e CARNEIRO, 2004) ou células do corpo gorduroso em insetos (LOCKE, 1984). Este padrão de produção e armazenamento é similar daquele constatado em outros carídeos, assim como em isópodos, lagostins e braquiúros (KING, 1964; RADU e CRĂCIUN, 1976; TAKETOMI et al., 1990; MARTIN et al., 1996; PHOUNGPETCHARA et al., 2011).

Glândulas androgênicas não produzem grânulos de secreção. Durante a secreção ocorre a hipertrofia da célula, seguida de liberação e emissão do conteúdo celular a hemolinfa. A ausência de produtos secretórios nas GA's parece ser uma

regra em crustáceos (KING, 1964; HOFFMAN; 1969; RADU e CRĂCIUN, 1976; MARTIN et al., 1996). KING (1964) demonstrou que os corpos eletrodensos de células de GA's (com até 4 μm) apresentam fosfatase ácida em sua composição mostrando que estas organelas são lisossomos, o que também foi observado em *M. amazonicum*, porém sem a comprovação enzimática, somente a ultraestrutural. Estes componentes celulares mostram aspectos estruturais bastante variáveis e acumulam hidrolases ácidas. Além disso, podem armazenar proteínas recém-sintetizadas (LUZIO et al., 2007). Todavia a função desta organela na GA de crustáceos ainda não é totalmente compreendida. Hoffman (1969) sugere que lisossomos liberam enzimas autolíticas assim que as células das GA's começam a se degenerar. Em *M. amazonicum*, a secreção do hormônio provavelmente ocorre após a degeneração celular. Este processo é similar ao descrito por Radu e Crăciun (1976) no isópodo terrestre *Porcellio scaber* Latreille, 1804. De acordo com estes autores, o balanço fisiológico da célula ao ser alterado durante o processo de hipertrofia, torna a regeneração impossível de ser realizada. Conseqüentemente, a degeneração torna-se irreversível, ocorrendo à destruição celular e a liberação do conteúdo a hemolinfa (i.e. glândula holócrina).

As GA's nos morfótipos inicial (TC) e dominantes (GC1 e GC2) de *M. amazonicum* aumentam à medida que o animal cresce e são maiores no morfótipo GC1, enquanto que no morfótipo intermediário (CC) estas estruturas tendem a diminuir (i.e. processo enantométrico - *sensu* Teissier, 1960). Em *Macrobrachium* a hipertrofia dos quelípodos é modulada pelas GA's (NAGAMINE, et al. 1980,a,b; VENTURA et al., 2011). Camarões machos de *M. amazonicum* tendem a investir muita energia para a aquisição de grandes quelípodos (i.e. armas sexuais) para obterem maior sucesso em competições intraespecíficas (CORREA e THIEL, 2003; MORAES-RIODADES e VALENTI, 2004; PASCHOAL, 2017 - Capítulos 2 e 7). Recentemente, Pantaleão et al. (2014) e Paschoal (2017 - Capítulo 2) constataram a alometria positiva para comprimento do quelípodo (MCL) somente para o morfótipo GC1. O último autor sugere que machos do morfótipo GC1 acumulam muita energia para a aquisição de armas sexuais robustas durante sua passagem para o morfótipo GC2. Isso pode explicar a grande amplitude da área das GA's, assim como os maiores valores registrados para o morfótipo GC1. Visto que a maior atividade das GA's é observada em morfótipos dominantes e o desenvolvimento de armas sexuais é regulado por estas glândulas (OKUMURA e HARA, 2004; VENTURA et al., 2011).

O menor tamanho das glândulas registrado para o morfótipo GC2 corrobora este resultado, pois o crescimento somático deste morfótipo é interrompido logo após sua passagem de GC1 para GC2 e a energia acumulada pelo animal passa a ser destinada a manutenção de processos metabólicos em vez da manutenção das armas sexuais e produção de espermatozoides (MORAES-RIODADES e VALENTI, 2004; AUGUSTO e VALENTI, 2016; PASCHOAL, 2017 – Capítulos 2 e 8). Por outro lado, a diminuição da área das GA's no morfótipo intermediário CC pode estar relacionada a uma “diapausa reprodutiva” durante o desenvolvimento sequencial de morfótipos. Os túbulos seminíferos dos testículos de machos CC são preenchidos por espermátócitos, ou seja, não ocorre espermiogênese neste morfótipo (SILVA et al., 2004; PASCHOAL, 2017 - Capítulo 8). Além disso, apresentam altos valores de índices hepatossomáticos, próximos aos registrados para os morfótipos dominantes (PASCHOAL, 2017 - Capítulo 8). Este padrão provavelmente se deve a menor atividade da GA neste morfótipo, similar ao que ocorre no morfótipo intermediário de *M. rosenbergii* e pode ser uma regra em carídeos que apresentem hierarquia social em sua população (SAGI et al., 1988; JOSEPH e KURUP, 2001). Comumente, camarões de morfótipos intermediários acumulam energia para se tornarem machos dominantes sexualmente ativos com grande quantidade de espermatozoides (SAGI et al., 1988; SILVA et al., 2004; PASCHOAL, 2017 - Capítulo 8).

Apesar das diferentes histórias de vida registradas para *M. amazonicum*, não existem diferenças nos aspectos anatômicos e histológicos das GA's para as populações analisadas. As GA's em morfótipos de machos de *M. amazonicum* possuem padrões histoquímicos e ultraestruturais similares ao longo do desenvolvimento sequencial. No entanto, o tamanho destas estruturas muda ao decorrer da passagem de um morfótipo a outro e isto está diretamente relacionado ao tipo de estratégia de investimento reprodutivo apresentado por cada morfótipo: acúmulo de energia e espermátócitos no morfótipo intermediário e desenvolvimento de armas sexuais em morfótipos dominantes. As informações do presente trabalho poderão ser utilizadas na manutenção de reprodutores e melhoria de estoques, assim como poderão ser empregadas em futuros estudos envolvendo a manipulação e reversão sexual em *M. amazonicum*. Além disso, podem ser uma ferramenta útil para novos trabalhos que avaliem outras características ligadas direta ou indiretamente a GA's e que permitam sua comparação a outras espécies do gênero. Todavia, o mecanismo de excreção das GA's em crustáceos ainda é incerto. Dessa

forma, futuros trabalhos enfocando exclusivamente quais são as vias de secreção destas glândulas são necessários para preencher tal lacuna.

6. Referências

ANGER, K. Neotropical *Macrobrachium* (Caridea: Palaemonidae): on the biology, origin, and radiation of freshwater-invading shrimp. **Journal of Crustacean Biology**, vol. 33, n. 2, p. 151-183. 2013.

AUGUSTO, A.; VALENTI, W.C. Are there any physiological differences between the male morphotypes of the freshwater shrimp *Macrobrachium amazonicum* (Heller, 1862) (Caridea: Palaemonidae)? **Journal of Crustacean Biology**, vol. 36, n. 5, p. 716-723. 2016.

AWARI, S.A.; DUBE, K. Histological and histochemical study of the androgenic gland of *Macrobrachium rosenbergii* (De Man). **Journal of Aquaculture in the Tropics**, vol. 14, n. 2, p.101-112. 1999.

BAUER, R.T. **Remarkable shrimps. Adaptations and Natural History of the Carideans**, 1st ed. Oklahoma: University of Oklahoma Press, 2004, 282 p.

BORTOLINI, J.L.; BAUER, R.T. Persistence of reduced androgenic glands after protandric sex change suggests a basis for simultaneous hermaphroditism in a caridean shrimp. **The Biological Bulletin**, vol. 230, p. 110-119. 2016.

CHARNIAUX-COTTON, H. Découverte chez un crustacé amphipode (*Orchestia gamarella*) d'une glande endocrine responsable de la différenciation des caractères sexuels primaires et secondaires males. **Comptes Rendus de l'Académie des Sciences**, vol. 239, p. 780-782. 1954.

CHARNIAUX-COTTON, H. Contrôle hormonal de La différenciation du sexe et de la reproduction chez lês crustacés supérieurs. **Bulletin de la Société zoologique de France**, vol. 83, p. 314-336. 1958.

CORREA, C. et al. Male dominance hierarchy and mating tactics in the rock shrimp *Rhynchocinetes typus* (Decapoda: Caridea). **Journal of Crustacean Biology**, vol. 23, n. 1, p. 33-45. 2003.

CORREA, C.; THIEL, M. Mating systems in caridean shrimp (Decapoda: Caridea) and their evolutionary consequences for sexual dimorphism and reproductive biology. **Revista Chilena de Historia Natural**, vol. 76, p. 187-203. 2003.

DOUGHTY, M.J. Reliability of nucleus-to-cell and nucleus-to-cytoplasm calculations for conjunctival impression cytology specimens. **Current Eye Research**, vol. 37, n. 7, p. 583-591.2012.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS - FAO. **Macrobrachium rosenbergii (De Man, 1879)**. Fishstat Plus version 2.32. 2017.

Disponível em:
 <http://www.fao.org/fishery/culturedspecies/Macrobrachium_rosenbergii/en/>.
 Acesso em: 03 mar. 17.

GOTELLI, N.J.; ELLISON, A.M. **A Primer of Ecological Statistics**. 1st ed. Massachusetts: Sinauer Associates, Inc. Sunderland, 2004. 510 p.

HOFFMAN, D.L. The development of the androgenic glands of a protandric shrimp. **The Biological Bulletin**, vol. 137, p. 286–296. 1969.

IBRAHIM, A.N.A.F. **Controle social do crescimento do camarão-da-amazônia *Macrobrachium amazonicum***. 39 f. Dissertação de mestrado (Mestrado em Aquicultura). Universidade Estadual Paulista – UNESP, Jaboticabal. 2011.

JOSEPH, A. **Histological, histochemical and biochemical characterisation of male morphotypes of *Macrobrachium rosenbergii* (De Man)**. 212 p. Phd Thesis (Doctor of Philosophy). Cochin University of Science and Technology, Cochin. 2002.

JOSEPH, A.; KURUP, B.M. Histological characterization of male morphotypes of *Macrobrachium rosenbergii* (de Man). In: BOOPENDRNATH, M.R. et al. (Eds). **Riverine and Reservoir Fisheries of India**. 1st ed. Society of Fisheries Technologists: Cochin. 2001. p. 245-255.

JUNQUEIRA, L.C.U.; CARNEIRO, J. **Histologia básica**. 11 ed. Rio de Janeiro: Ed. Guanabara Koogan, 2008, 524 p.

JUNQUEIRA, L.C.U.; JUNQUEIRA, L.M.M.S. **Técnicas Básicas de Citologia e Histologia**. 1 ed. São Paulo: Ed. Santos, 1983, 123 p.

KURIS, A. M. et al. Morphotypic differentiation of male Malaysian prawns, *Macrobrachium rosenbergii*. **Journal of Crustacean Biology**, vol. 7, p. 219-237. 1987.

LANGER, S.; CHALOTRAR.; KOUR T. The occurrence and description of male morphotypes of *Macrobrachium dayanum*. **Journal of Animal Morphology and Physiology**, vol. 49, p. 49-54. 2002.

LOCKE, M. The structure and development of the vacuolar system in the fat body of insects. In: KING, R.C.; AKAI, H. (Eds). **Insect Ultrastructure**. 1st ed. Boston: Springer, 1984. p. 151-197.

LUZIO, J. P.; PRYOR, P.R.; BRIGHT, N.A. Lysosomes: fusion and function. **Nature reviews Molecular cell biology**, vol. 8, n. 8, p. 622-632. 2007.

MARTIN, G. et al. Ultrastructural and experimental studies on the androgenic gland in juvenile and puberal males of *Sphaeroma serratum* (Isopoda, Flabellifera). **Crustaceana**, vol. 69, n. 3, p. 349-358. 1996.

MELLO, M.L.S.; VIDAL, B.C. **Práticas de Biologia Celular**. 1 ed. Campinas: Funcamp, 1980, 71p.

MACIEL, C.R.; VALENTI, W.C. Biology, fisheries, and aquaculture of the amazon river prawn *Macrobrachium amazonicum*: a review. **Nauplius**, vol.17, p. 61-79. 2009.

MORAES-RIODADES, P.M.C.; VALENTI, W.C. Morphotypes in male amazon river prawns, *Macrobrachium amazonicum*. **Aquaculture**, vol. 236, p. 297-307. 2004.

MORAES-VALENTI, P.M.; VALENTI, W.C. Culture of the Amazon river prawn *Macrobrachium amazonicum*. In: NEW, M.B. et al. (Eds). **Freshwater prawns: biology and farming**. 1st ed. Oxford: Wiley-Blackwell, 2010. p. 485-501.

NAGAMINE, C. et al. Effects of androgenic gland ablation on male primary and secondary sexual characteristics in the Malaysian prawn, *Macrobrachium rosenbergii* (de Man) (Decapoda, Palaemonidae), with first evidence of induced feminization in a non hermaphroditic decapod. **General and Comparative Endocrinology**, vol. 41, p. 423-441. 1980a.

NAGAMINE, C. et al. Masculinization of female *Macrobrachium rosenbergii* (de Man) (Decapoda, Palaemonidae) by androgenic gland implantation. **General and Comparative Endocrinology**, vol. 41, p. 442-457. 1980b.

NEW, M.B. Freshwater prawn farming: global status, recent research and a glance at the future. **Aquaculture Research**, vol. 36, p. 210-230. 2005.

OKUMURA, T.; HARA, M. Androgenic gland cell structure and spermatogenesis during the molt cycle and correlation to morphotypic differentiation in the giant freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii*. **Zoological Science**, vol. 21, n. 6, 621-628. 2004.

PANTALEÃO, J.A.F.; HIROSE, G.L.; COSTA, R.C. Occurrence of male morphotypes of *Macrobrachium amazonicum* (Caridea, Palaemonidae) in a population with an entirely freshwater life cycle. **Brazilian Journal of Biology**, vol. 74, n. 3 sup., p. 223-232. 2014.

PASCHOAL, L.R.P.; ZARA, F.J. First record of intersexuality in the Amazon River shrimp *Macrobrachium amazonicum* (Heller, 1862) (Caridea: Palaemonidae). **Journal of Crustacean Biology**, vol. 74, n. 4, p. 1-5. 2017b.

PEARSE, A.G.E. **Histochemistry: Theoretical and Applied**. London: J&A Churchill, 1960. 998 p.

PHOUNGPETCHARA, I. et al. Cells producing insulin-like androgenic gland hormone of the giant freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii*, proliferate following bilateral eyestalk-ablation. **Tissue and Cell**, vol. 43, n. 3, p. 165-177.2011.

PRAKASH, S., et al. Reproductive morphology and mating behaviour in the hingebeak shrimp *Rhynchocinetes durbanensis* Gordon, 1936 (Decapoda: Caridea: Rhynchocinetidae) in India. **Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom**, vol. 96, n. 6, p. 1331-1340. 2016.

R CORE TEAM. **R (The R Project for Statistical Computing)**. Software version 3.3.1. 2017. Disponível em: <www.r-project.org>. Acesso em: 01 dez. 2016.

RADU, V. Gh; CRĂCIUN, C. The ultrastructure of the androgenic gland in *Porcellio scaber* Latr. (terrestrial isopods). **Cell and tissue research**, v. 175, n. 2, p. 245-263. 1976.

RA'ANAN, Z.; SAGI, A. Alternative mating strategies in male morphotypes of the freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii* (De Man). **The Biological Bulletin**, vol. 169, p. 592-601. 1985.

SAGI, A.; AFLALO, E.D. The androgenic gland and monosex culture of freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii* (De Man): a biotechnological perspective. **Aquaculture Research**, vol. 36, p. 231-237. 2005.

SAGI, A.; COHEN, D.; MILNER, Y. Effect of androgenic gland ablation on morphotypic differentiation and sexual characteristics of male freshwater prawns, *Macrobrachium rosenbergii*. **General and comparative endocrinology**, vol. 77, n. 1, p. 15-22. 1990.

SAGI, A.; MILNER, Y.; COHEN, D. Spermatogenesis and sperm storage in the testes of the behaviorally distinctive male morphotypes of *Macrobrachium rosenbergii* (Decapoda, Palaemonidae). **The Biological Bulletin**, vol. 174, p. 330-336. 1988.

SAGI, A.; SNIR, E.; KHALAILA, I. Sexual differentiation in decapod crustaceans: role of the androgenic gland. **Invertebrate Reproduction & Development**, vol. 31, n. 1-3, p. 55-61. 1997.

SAGI, A.; SNIR, E.; ZIMMERMANN, S. Efeitos da ablação da glândula androgênica no crescimento e na reversão sexual de machos do camarão de água doce *Macrobrachium rosenbergii* (De Man). **Revista Brasileira de Zootecnia**, vol. 24, n. 2, p. 300-309. 1995.

SILVA, G.M.F. et al. Gonadal structure analysis of *Macrobrachium amazonicum* (Heller, 1862) from a wild population: a new insight into the morphotype characterization. **Aquaculture Research**, vol. 40, p. 798-803. 2009.

SOUNDARAPANDIAN, P.; DINAKARAN, G.K.; VARADHARAJAN, D. Alternative mating strategies in male morphotypes of the prawn *Macrobrachium idella idella* (Hilgendorf, 1898). **Journal of Aquaculture Research & Development**, vol. 5, n. 1, p. 1-10. 2013.

SUN, P.S. et al. Developmental changes in structure and polypeptide profile of the androgenic gland of the freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii*. **Aquaculture International**, vol. 8, n. 4, p. 327-334. 2000.

TAKETOMI, Y. Ultrastructure of the androgenic gland of the crayfish, *Procambarus clarkii*. **Cell biology international reports**, v. 10, n. 2, p. 131-136. 1986.

TAKETOMI, Y.; MURATA, M.; MIYAWAKI, M. Androgenic gland and secondary sexual characters in the crayfish *Procambarus clarkii*. **Journal of Crustacean Biology**, v. 10, n. 3, p. 492-497. 1990.

TEISSIER, G. Relative growth. In: WATERMAN, T.H. (Ed). **The Physiology of Crustacea, Vol. 2. Metabolism and growth**. New York: Academic Press, 1960. p. 537–560.

THIEL, M.; CHAK, S.T.C.; DUMONT, C.P. Male morphotypes and mating behavior of the dancing shrimp *Rhynchocinetes brucei* (Decapoda: Caridea). **Journal of Crustacean Biology**, vol. 30, n. 4, p. 580-588. 2010.

VENTURA, T.; ROSEN, O.; SAGI, A. From the discovery of the crustacean androgenic gland to the insulin-like hormone in six decades. **General and comparative endocrinology**, vol. 173, n. 3, p. 381-388. 2011.

VENTURA, T.; SAGI, A. The insulin-like androgenic gland hormone in crustaceans: From a single gene silencing to a wide array of sexual manipulation-based biotechnologies. **Biotechnology advances**, vol. 30, n. 6, p. 1543-1550. 2012.

WORTHAM, J.L.; VAN MAURIK, L.N.; LAUREN, N. Morphology and morphotypes of the Hawaiian river shrimp, *Macrobrachium grandimanus*. **Journal of Crustacean Biology**, vol. 32, p. 545-556. 2012.

ZARA, F.J. et al. Spermatogenesis, spermatophore and seminal fluid production in the adult blue crab *Callinectes danae* (Portunidae). **Journal of Crustacean Biology**, vol. 32, n. 2, p. 249-262. 2012.

Capítulo 10

Can intersexes occur in natural populations of gonochoric palaemonid shrimps? First record of intersexuality in the Amazon river shrimp *Macrobrachium amazonicum* (Heller, 1862)

Can intersexes occur in natural populations of gonochoric palaemonid shrimps? First record of intersexuality in the Amazon river shrimp

***Macrobrachium amazonicum* (Heller, 1862)**

1. Abstract

Intersexuality in a gonochoric palaemonid shrimp is reported here for the first time in a wild population of *Macrobrachium amazonicum*. This phenomenon was confirmed based on an investigation of anatomic and morphometric traits and a comparison of the ultramorphology of gonopores of specimens of different sexes. During a period of 15 months (Oct. 2014 – Dec. 2015), water, sediment, and shrimps were collected in the Grande River, Minas Gerais, southeastern Brazil. In October 2014, a shrimp with hybrid traits was collected and examined. Externally, the specimen resembled a dominant male (GC2 morphotype) but had ovary, oviducts, and complete vas deferens. Vitellogenic oocytes and spermatozoa were not found in its reproductive system. The identification of this intersex in the population of *M. amazonicum* was confirmed by comparative analysis of morphometric variables in females and by the presence of four gonopores through macroscopic examination and scanning electron microscopy. The intersex had very distinct morphometric characteristics compared to those of females (e.g. hypertrophied chelipeds) and was an outlier in all analyzes. Unlike males, the intersex had vestigial gonopore complexes in the fifth pereopod in addition to female gonopores in the third pereopod. Intersexuality in this population might be associated with intrinsic factors (hormonal dysfunction), since external mechanisms were not observed such as pollution and/or parasitism in the population. Non-functional hermaphroditism is a very rare event in *M. amazonicum*, indicating that this species is gonochoric, and intersex individuals are not reproductively viable.

Keywords: Non-functional hermaphroditism, morphology, SEM, gonopores, Caridea

2. Introduction

Caridean shrimps are found in various aquatic environments, from caves connected to rivers to deep sea hydrothermal vents (NYE and COPLEY, 2014; JUGOVIC et al., 2015). These animals comprise a large number of species (~3500 spp.) and are the second largest group among the Decapoda (DE GRAVE and FRANSEN, 2011; DE GRAVE et al., 2015). Additionally, carideans are of great economic importance, with several species used for aquaculture and by aquarium hobbyists (BAUER, 2004; NEW et al., 2010).

In this Infraorder, a significant number of species exhibits a highly specialized migratory behavior for breeding termed amphidromy (BAUER and DELAHOUSSEY, 2008; BAUER, 2013). Commonly, carideans that adopt or not this strategy are gonochoric with clear sexual dimorphism. Some species have social hierarchy, where males with hypertrophied chelipeds and large body size (dominant morphotypes) have selective advantages over smaller individuals (submissive morphotypes), such as the dominance of territories and greater reproductive success (CORREA and THIEL, 2003; AUGUSTO and VALENTI, 2016). However, carideans have a wide variety of sexual systems, from gonochorism to different types of hermaphroditism, such as sequential, simultaneous and mixed (BAUER, 2000, 2004; ONAGA et al., 2012; BAEZA, 2013).

Different strategies of hermaphroditism have direct consequences in the biology, reproduction, and life history of carideans, which have been widely studied (BAEZA and BAUER, 2004; BAEZA et al., 2010; BAEZA, 2007, 2010, 2013; BORTOLINI and BAUER, 2016). On the other hand, there are no clear evidences of natural hermaphroditism (not-human induced) in species considered non-hermaphroditic, such as the genus *Macrobrachium* Spence Bate, 1868. To date, only Rao (1967) has reported a possible sexual reversal in individuals in a wild population of the giant freshwater shrimp *Macrobrachium rosenbergii* (De Man, 1879). In this species, two females with male traits were observed after consecutive molts, characterized by the loss of female gonopores and the development of male gonopore complexes. Nagamine et al. (1980a,b), however, questioned this latter study due to the short and subjective description and the lack of anatomical or histological details of the animals. These authors pointed out that *M. rosenbergii* is not hermaphrodite, and masculinized females induced by laboratory procedures

retain female gonopores even after induction and complete sex change. The anomalous pattern detected by Rao (1967) in *M. rosenbergii* might be associated with a non-functional hermaphroditism. Intersexuality in carideans is associated with the development of gonopores and other non-functional secondary sexual characters (TÓTH and BAUER, 2007, 2008). In crustaceans, this phenomenon is caused by hormonal disruptions and sexual differentiation during late embryonic development, resulting in intersex individuals with external secondary characteristics and/or abnormal reproductive organs of both sexes (FORD, 2012). The Amazon River shrimp *Macrobrachium amazonicum* (Heller, 1862), like *M. rosenbergii*, is considered a species of great importance in Brazilian aquaculture (MACIEL and VALENTI, 2009; NEW et al., 2010). This gonochoric species commonly exhibits strong sexual dimorphism, with dominant (GC1 and GC2) and submissive (CC and TC) male morphotypes. Populations of this species have large phenotypic plasticity, high morphological and reproductive variability, and can inhabit different aquatic environments (VERGAMINI et al., 2011; AUGUSTO and VALENTI, 2016). Recently, this species colonized inland freshwater habitats in different Brazilian regions (PANTALEÃO et al., 2014), abandoning amphidromy as a reproductive strategy.

In this study, we present the first record of intersexuality in native populations of a gonochoric palaemonid species, the Amazon River shrimp *M. amazonicum*. This rare event is described here based on anatomical and morphometric traits, as well as an ultramorphological comparison of secondary sexual characteristics.

3. Materials and methods

Monthly samples of water, sediment, and shrimps were collected from October 2014 to December 2015 in the Grande River (20° 30' 53" S, 46° 50' 16" W), in the reservoir of the "Marechal Mascarenhas de Morais" Hydroelectric Power Station (MMM HPS), municipality of Cássia, state of Minas Gerais, southeastern Brazil.

Water samples were obtained below the water surface with 1000 ml polyethylene bottles for physical and chemical variables, except for dissolved oxygen, which was collected with a 250 ml amber bottle. Samples were processed and stored according to the methods described in the "Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater" (APHA, 1999). The physical and chemical parameters analyzed in the field were: pH - measured with a digital potentiometer, temperature -

obtained with a thermometer, conductivity - determined with a digital conductivity meter, and dissolved oxygen - measured with the Winkler method modified with sodium azide, according to Golterman et al. (1978). In the laboratory, organic matter content, water alkalinity and hardness (GOLTERMAN et al., 1978), total coliforms (APHA, 1999), chlorophyll- α (Nush, 1980), total phosphorus (P) (STRICKLAND and PARSONS, 1960), and total nitrogen (N) (VALDERRAMA, 1981) were measured. Levels of cadmium (Cd), calcium (Ca), copper (Cu), chromium (Cr), iron (Fe), magnesium (Mg), manganese (Mn), potassium (K), sodium (Na), and zinc (Zn) were determined by atomic absorption spectrophotometry (APHA, 1999). Samples of sediment were obtained with a granulometric sieve (500 μm). Levels of aluminum (Al), boron (B), calcium (Ca), copper (Cu), sulfur (S), iron (Fe), phosphorus (P), magnesium (Mg), manganese (Mn), potassium (K), and zinc (Zn) were determined by atomic absorption spectrophotometry according to Raji et al. (2001).

Two methods were used to collect shrimps: (a) active sampling with the aid of a sieve (60 cm in diameter and 1.25 mm mesh) moved several times for 30 minutes manually (one collector), along the marginal vegetation and macrophyte banks, and (b) passive collection consisted of six traps (85 cm long x 35 cm width / height) placed near the margin (0.5 - 2 m from the bank) baited with small pieces of beef liver and removed after four hours. Immediately after being collected, animals were anesthetized by cooling (-20 °C / 5 min.) and later fixed in 70% ethanol, placed in labeled bottles, and transported to the laboratory, where they were identified according to Pileggi (2009).

All specimens sampled during monthly collections were counted, and sub-samples were taken according to Wenner et al. (1991): If $80 < n < 160$ individuals were collected, 80 individuals were randomly selected to be examined. If $160 < n < 320$ individuals were collected, 50% of specimens were evaluated; and in case of samples with > 320 animals, 25% of the individuals were examined. In the laboratory, the sex of individuals from the sub-samples was determined in three stages: (I) verification of secondary sexual characteristics: absence (♀) or presence (♂) of appendix masculina in the endopodite of the second pair of pleopods, (II) position of the gonopore: opening in the coxopodite of the 3rd (♀) or 5th (♂) pereopod, and (III) dissection of the reproductive system: ovaries (♀) and testicles (♂). The presence of parasites on the animals was determined based on macroscopic examination under stereomicroscope.

After specimens of *M. amazonicum* were sexed and inspected for parasites, different structures were measured with the aid of an analog caliper (0.02 mm) according to Pantaleão et al. (2014) as follows: carapace length (CL), total length (TL), second abdominal pleura width (2nd PL), abdominal length (AL), major cheliped length (MCL), propodus length (PP), and dactyl length (DCL). The largest height of propodus (LHP) was also measured. The fresh weight (W) of each individual was obtained with an analytical scale (0.0001 g). The angle of spines in chelipeds, as well as the absence or presence of pubescence in dactyls was determined. Male shrimps of this species have four described morphotypes: translucent (TC), cinnamon (CC), green 1 (GC1), and green 2 (GC2) claw (PANTALEÃO et al., 2014; AUGUSTO and VALENTI, 2016). Females were also examined for the presence of macroscopic visual characteristics described for males of the species, primarily based on color and angles of spines in chelipeds.

After macroscopic classification and measurement, a principal component analysis (PCA) was performed to separate the possible morphological groups of females, using all body dimensions examined (\log_{10}). Subsequently, a linear regression was adjusted using the variable with the highest contribution in the PCA. The coefficient of determination (r^2) and degree of allometry (b – verified with the Student's t test) of the function were calculated in order to evaluate the growth pattern of this variable in females (GOTELLI and ELLISON, 2004). Only the morphometric data of females were used in this study, since the analyses using data from males did not provide additional information.

The reproductive systems of specimens were carefully removed. During dissection, the macroscopic morphology of the reproductive systems of males, females and the intersex were examined under stereomicroscope. Smears of the ejaculatory ducts of males and the intersex were prepared to examine the presence of sperm (ZARA et al., 2012). The developmental stage of the ovaries of females and the intersex was determined based on the detection of exogenous vitellogenesis indicated by the presence of yolk granules in smears of ovarian lobes (CUZIN-ROUDY and AMSLER, 1992). After the morphometric and macroscopic examination, individuals (N: 9) were selected for the description of the position, shape, and ornamentation of gonopores in the different sexes by scanning electron microscopy (SEM). The abdominal sterna with pereopods of six females (two ovigerous), two males, and the intersex were carefully removed. After dissection, the sterna were

washed in an ultrasound bath for 3 minutes and re-fixed in 4% paraformaldehyde in 0.1 M sodium phosphate buffer (pH 7.2) for 24 to 48 hours at 4°C. The material was then washed in the same buffer and post-fixed with 1% buffered osmium tetroxide (2 hours). Subsequently, samples were dehydrated in an increasing ethanol series (70 to 100%) and completely dried at critical point with liquid CO₂ (BAL-TEC dryer). Samples were later mounted in stubs and gold sputtered with a Denton Vacuum Desk II. The material was examined and photographed with a JEOL JSM-5410 SEM, with voltages ranging between 10-20 kV.

4. Results

The aquatic environments of the reservoir were mesotrophic, slightly acidic, with good oxygenation, low primary productivity (chlorophyll- α), with no measurable levels of heavy metals, and a high concentration of phosphorus. In the sediment, no high levels of any chemical elements analyzed were found (Table I).

Table I. Means (\pm standard deviation), minimum (Min) and maximum (Max) values for the limnological variables analyzed in the water and sediment between the months of October 2014 and December 2015 in Cássia (Minas Gerais, southeastern Brazil). Cr, Ca, Cu, Mn and Zn in water are not represented due to negligible levels. Alk, alkalinity; Chl-a, chlorophyll- α ; Cond., conductivity; DO, dissolved oxygen; Hard., hardness; ND, not determined; OM, organic matter; TCol., total coliforms; Temp., temperature;

Water	Mean (\pm SD)	Min – Max
pH	6.68 (\pm 0.53)	5.7 - 7.76
Temp. (°C)	24.64 (\pm 2.24)	21 – 28
Cond. (mS l ⁻¹)	73.44 (\pm 17.59)	44.97 - 115.7
DO (mg l ⁻¹)	10.28 (\pm 2.74)	6 – 15
OM (mg l ⁻¹)	6.36 (\pm 2.66)	3.2 -11.84
Alk. (mg l ⁻¹)	31.07 (\pm 13.51)	11 - 55
Hard. (mg l ⁻¹)	24.72 (\pm 6.74)	15 - 43
TCol (NMP)	346 (\pm 552)	ND - >1600
Chl- α (μ g l ⁻¹)	2.37 (\pm 2.66)	ND - 6.3
P (μ g l ⁻¹)	130.06 (\pm 175.28)	ND - 629
N (mg l ⁻¹)	2.20 (\pm 2.26)	ND - 8.12
Ca (mg l ⁻¹)	4.69 (\pm 1.05)	2.79 - 6.91
Fe (mg l ⁻¹)	1.64 (\pm 1.78)	0.07 - 6.29
Mg (mg l ⁻¹)	1.92 (\pm 0.47)	1.06 - 2.76
K (mg l ⁻¹)	3.02 (\pm 0.66)	2.06 - 4.28
Na (mg l ⁻¹)	5.56 (\pm 2.14)	3.33 - 11.09

Sediment	Mean (\pm SD)	Min – Max
Al (mg kg ⁻¹)	10.92 (\pm 7.21)	8.99 - 35.97
B (mg kg ⁻¹)	0.30 (\pm 0.23)	0.06 - 0.85
Ca (g kg ⁻¹)	0.93 (\pm 0.21)	0.36 - 1.22
Cu (mg kg ⁻¹)	2.63 (\pm 1.19)	0.38 - 5.26
S (mg kg ⁻¹)	7.71 (\pm 4.48)	2 - 16
Fe (g kg ⁻¹)	0.29 (\pm 0.29)	0.07 - 1.11
P (mg kg ⁻¹)	20.64 (\pm 11.38)	8 - 49
Mg (mg kg ⁻¹)	107.66 (\pm 43.66)	12.15 - 182.34
Mn (mg kg ⁻¹)	60.01 (\pm 17.69)	34.46 - 85.94
K (mg kg ⁻¹)	51.11 (\pm 14.09)	23.46 - 82.11
Zn (mg kg ⁻¹)	1.69 (\pm 0.88)	0.54 - 3.56

During the 15 months of the study, 5088 individuals were collected. In a sample with 1540 animals, 1244 were females and 295 were males (δ : ♀ = 1: 4.2; χ^2 = 293.02, df = 1, p < 0.001). Parasitism was not observed in the study population. During the examination, a specimen with external and internal characteristics of both sexes was observed (Fig. 1), representing 0.06% of the population sampled.

The intersex individual was collected in October 2014 and had typical external features of a dominant male (GC2 morphotype) with large body size (TL) and only one developed cheliped (i.e. heterochely) (Fig. 1A, Table 2). It differs from the sampled females, which were similar in body size (Fig. 1B, Table 2). Externally, the *M. amazonicum* intersex had no appendix masculina on both endopodites of the second pleopods (Fig. 1C). During the dissection, an ovary was observed in normal anatomical position, arranged over the hepatopancreas, with the pair of oviducts on the sides of the carapace (Fig. 1D, E), ending in the gonopores of the coxopodite of the third pereopod (Fig. 1E). In addition, two extremely thin ducts were observed running from the ovarian caudal extremity and ending in a terminal expansion, inserted into the fifth coxopodite (Fig. 1F, G). This characterized the male reproductive system, with a pair of vasa deferentia and a dilated portion representing the bulb of the ejaculatory duct (Fig. 1F). Under the stereomicroscope, the abdominal sternum of this individual had openings of female gonopores in the third pair of pereopods and two white cuticular scars on the fifth pair of pereopods (Fig. 1G). The right ejaculatory duct was removed (Fig. 1F) for the preparation of a smear, in which spermatozoa were not found. Smears made with fragments of the ovary revealed

only oogonia and pre-vitellogenic oocytes. Yolk granules were not observed in any of the temporary preparations of the different portions of the ovary analyzed.

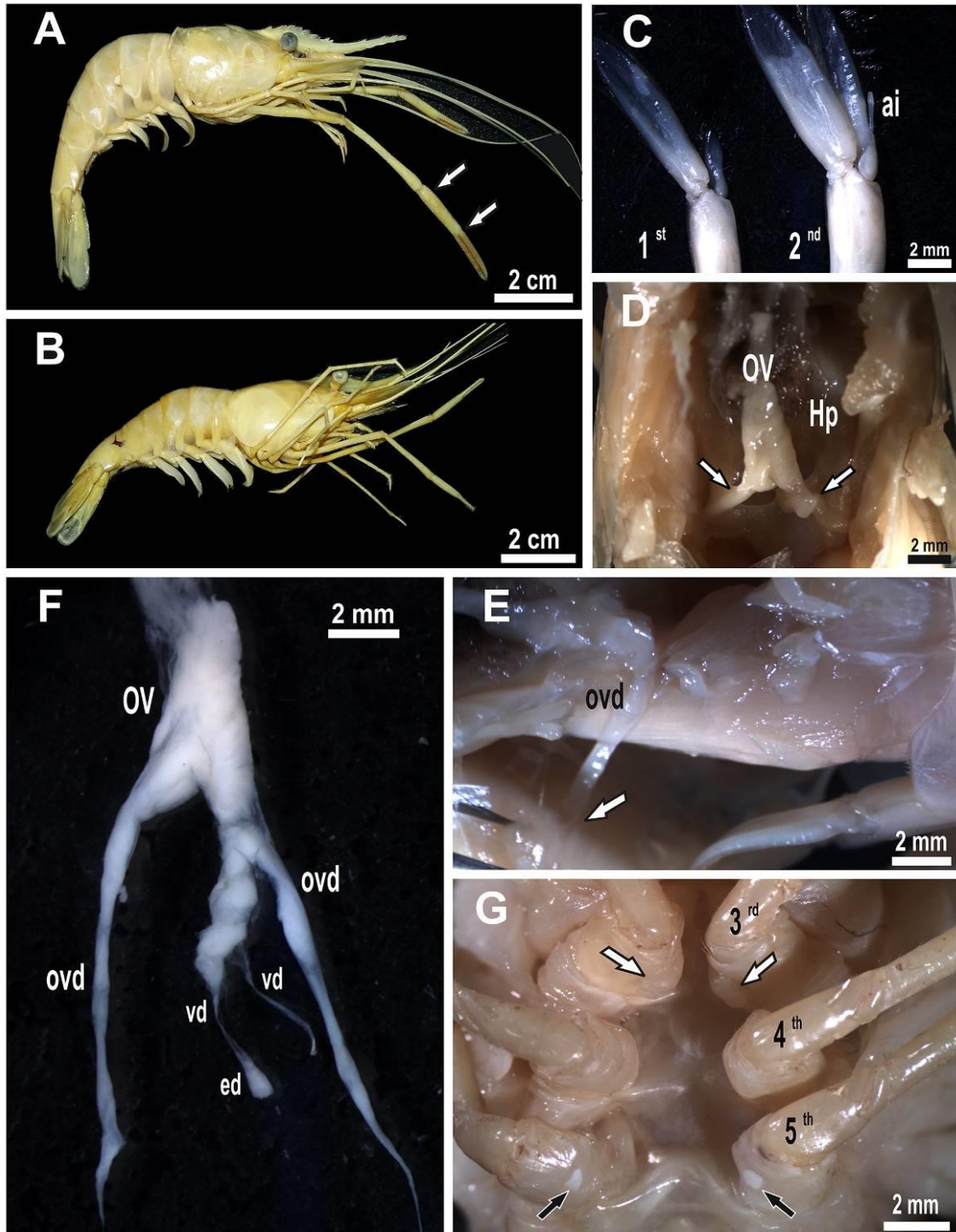


Figure. 1. *Macrobrachium amazonicum* (Heller, 1862). **A.** Side view of the intersex. The shrimp was large with only one well-developed cheliped (white arrows). **B.** Side view of a female with large body size (for details, see female (1) in Table 1). **C.** First and second pleopods of the intersex. **D.** Ovary of the intersex located on the hepatopancreas with oviducts arranged on the sides of its carapace (white arrows). **E.**

Oviducts of the intersex connected to the gonopores of the third pereopod (white arrow). **F.** Overview of ovary removed from the intersex, with one extremity exhibiting vasa deferentia. The right ejaculatory duct was removed to examine the presence of spermatozoa. **G.** Ventral view of the sternum of the intersex, with openings of the female gonopores in the third pair of pereopods (white arrows) and cuticular scars on the fifth pair of pereopods (black arrows). ai, appendix interna; ed, ejaculatory duct; hp, hepatopancreas; OV, ovary; OVD, oviduct; vd, vas deferens.

The comparative analysis of the morphometric variables of individuals of body size similar to that of the intersex indicated that the latter shared features found in both males and females simultaneously (Table II). Similar to females, the abdomen and the second pleura of the intersex were larger than those observed in males, but the size of its major cheliped and its associated parts were larger than those observed in females. The length, angle of spines, and pubescence of chelipeds were very similar to those recorded for males with CG2 morphotype in *M. amazonicum* (Table II). Additionally, the morphometry of body traits did not separate females in morphotypes, despite visual differences in cheliped patterns in 94 females. The latter exhibited hypertrophied chelipeds, while the remaining females (N: 1153) had normal chelipeds (Figs. 2, 3). The first two PCA axes explained most of the variability of the data (95.45%) (Fig. 2). Although morphotypes were not separated, the variable with the largest contribution to axis 1 (90.12%) was major cheliped length (MCL) (Table III). This morphometric variable increases as females grow, showing a positive allometric growth ($t: 133.08, p < 0.001$) (Fig. 3). The intersex was clearly distinct from the rest of females, appearing as an outlier in the analyzes (Figs. 2, 3).

Table II. Comparison of morphometric variables and other aspects analyzed in some female and male shrimps with similar body proportions to that of the intersex found in the population of *Macrobrachium amazonicum* (Heller, 1862) in Cássia (Minas Gerais, southeastern Brazil). The intersex is represented in bold. *, gonopore complexes; 2nd PL, width of the second abdominal pleura; AL, abdomen length; CL, carapace length; DCL, dactyl length; Ind., individuals; LHP, largest height of propodus; MCL, major cheliped length; PCL, propodus length; TL, total length; W, fresh weight.

Sexes (Ind.)	Ovary/ morphotype stage	Gonopores formula	CL (mm)	TL (mm)	AL (mm)	2 nd PL (mm)	MCL (mm)	PCL (mm)	DCL (mm)	LHP (mm)	W (g)	Spine angulation (°)	Pubescence on chelae
Female (1)	2	2-0	26.4	80.4	45.6	10.8	64.5	18.5	8.6	2.1	8.4200	45	Absent
Female (2)	4	2-0	24.6	72.5	41.9	9.9	57.5	15.1	6.2	1.9	7.4260	< 45	Absent
Female (3)	2	2-0	23.6	72.6	38.5	7.8	55.4	14.9	7.1	1.8	4.8920	< 45	Absent
Female (4)	3	2-0	26	81.2	40.5	10.7	63.3	15.9	7.7	2.2	7.4700	< 45	Absent
Female (5)	2	2-0	27.4	82	41.6	10.7	58.4	12.5	7.1	2	6.9430	< 45	Absent
Intersex	2 / GC2	2-2*	26.6	84.7	47.6	10	83.8	25.6	12.6	3.1	7.6000	> 45	Present
Male (1)	GC2	0-2	26.4	80.4	43.1	9.8	112.6	38.7	17.2	4.1	11.6190	> 45	Present
Male (2)	GC2	0-2	26.5	70.9	38.2	8.8	111.5	37	13.7	4.2	9.2100	> 45	Present
Male (3)	GC2	0-2	27.7	85.7	41	9.8	109.6	34.3	14	3.95	12.6130	> 45	Present
Male (4)	GC2	0-2	23.8	71	38.5	8.7	108.9	39	19.8	3.95	7.7125	> 45	Present
Male (5)	GC2	0-2	22.7	66.8	34.1	7.1	76.1	24.7	12.6	3.1	5.0425	> 45	Present

Table III. Correlation (Cor) and contribution (Cont) of morphometric variables in the principal component analysis used in Figure 2. Values in bold indicate the largest contribution in axes. For abbreviations, see Table 2.

Variable	PC1		PC2		PC3	
	Cor	Cont	Cor	Cont	Cor	Cont
CL	-0.964	0.129	-0.096	0.021	0.071	0.049
TL	-0.961	0.128	-0.194	0.088	0.041	0.017
AL	-0.956	0.127	-0.209	0.103	0.048	0.023
2 nd PL	-0.922	0.118	-0.293	0.202	-	0.499
RCL	-0.972	0.131	0.115	0.031	0.023	0.005
PPL	-0.931	0.120	0.338	0.268	0.048	0.022
DCL	-0.925	0.119	0.349	0.286	0.065	0.041
W	-0.962	0.128	0.000	0.000	0.188	0.344
Variation / Eigenvalues	90.12 / 7.21		5.33 / 0.43		1.27 / 0.10	

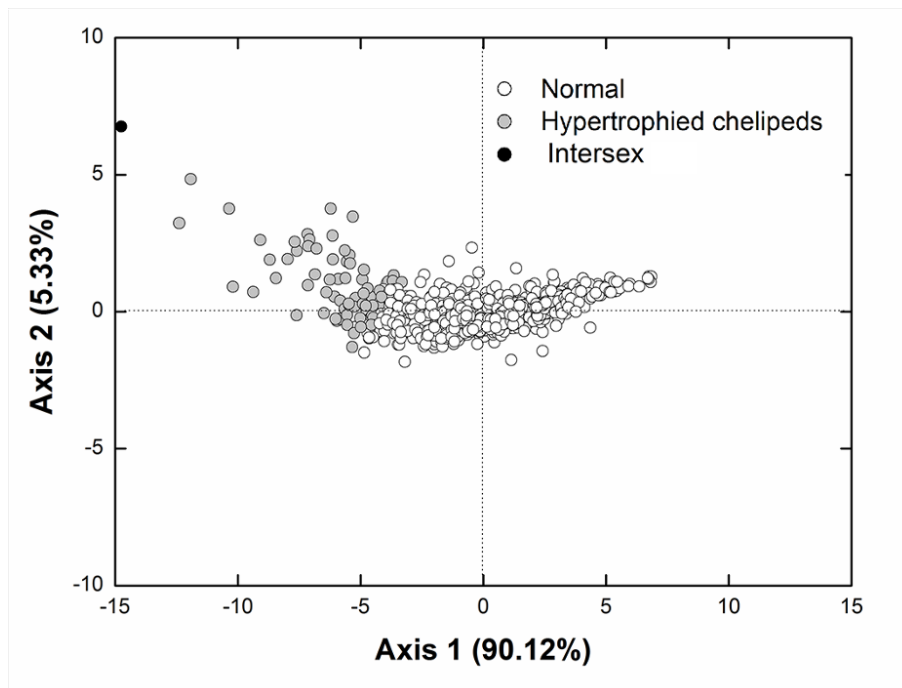


Figure 2. Ordination diagram of the morphometric variables for normal females, females with hypertrophied chelipeds, and the intersex in the population of *Macrobrachium amazonicum* (Heller, 1862) in Cássia (Minas Gerais, southeastern Brazil) based on the values obtained in the first two axes of the principal component analysis.

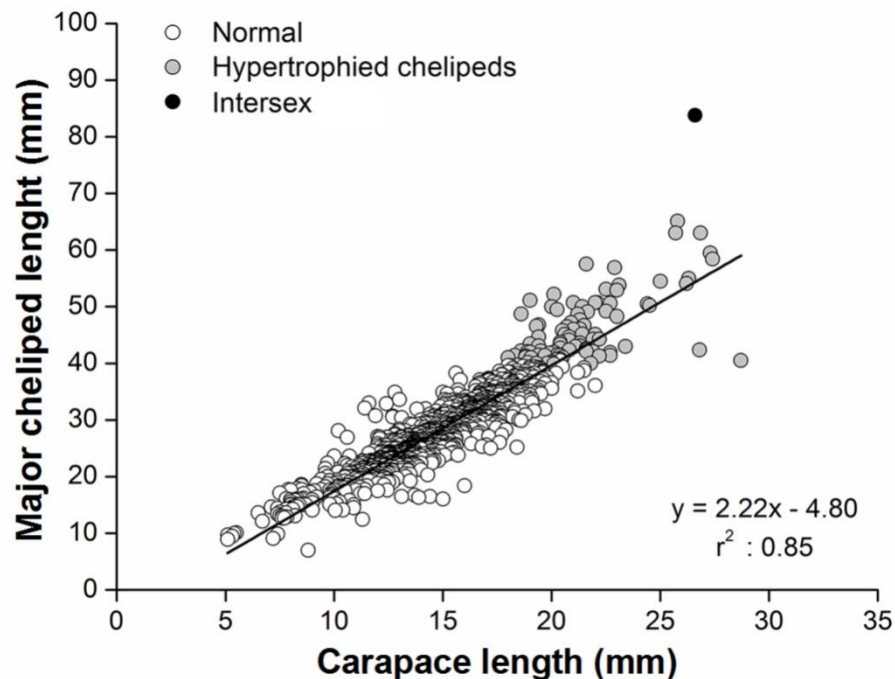


Figure 3. Dispersion of points for the morphometric relationship MCL vs. CL for normal females, females with hypertrophied chelipeds, and the intersex in the population of *Macrobrachium amazonicum* (Heller, 1862) in Cássia (Minas Gerais, southeastern Brazil).

The ultrastructural features of the sternum and genital openings of normal gonochoric individuals (non-ovigerous and ovigerous females, and GC males) were compared with those of the intersex (Fig. 4). Gonopores of non-ovigerous and ovigerous females were located on the medial surface of the coxopodite of the third pereopod with the opening facing the base of the sternum (Fig. 4A, B). In non-ovigerous females, setae were not observed on the edges of the gonopore (Fig. 4D), while in ovigerous females, many temporary egg-guiding setae were present on this structure and on the sternum (Fig. 4E). The medial/basal surface of the coxopodite of the fifth pereopod in females exhibited a mild depression toward the center of coxopodite extending to its base and was devoid of gonopores (Fig. 4G, H). In *M. amazonicum* males GC morphotypes, gonopores were located on the medial surface of the arthrodial membrane between the coxopodite of the fifth pereopod and the abdominal sternum, covered with flap-like projections. The opening of the male gonopore was horizontally oriented toward the other opening (Fig. 4C, I). The surface of coxopodites of the third pereopod of males was smooth and regular, and devoid of gonopores and setae (Fig. 4F). In the coxopodite of the fifth pereopod, a projection

with a prominent edge was observed in the same region, and underneath it, the flap of the gonopore on the medial surface of the arthrodial membrane of the coxopodite (Fig. 4I). In the intersex, female gonopores were located on the medial surface of the coxopodite of the third pereopod, while gonopore complexes were observed on the medial surface of the arthrodial membrane between the coxopodite of the fifth pereopod and abdominal sternum (Fig. 4J-N). As observed in non-ovigerous females, the opening of the female gonopore faced the base of the sternum and was devoid of setae (Fig. 4K). At the same place where a cuticular scar was macroscopically found in the central portion of each coxopodite of the fifth pereopod (Fig. 1G), gonopore complexes were observed by SEM, underneath a projection with a prominent border (Fig. 4L, N). This region was characterized by a groove in its central portion, which was interrupted near the scar of each coxopodite (Fig. 4L). Unlike in males, the gonopore complexes of the intersex were not covered by flaps, and had a rudimentary appearance (Fig. 4M, N).

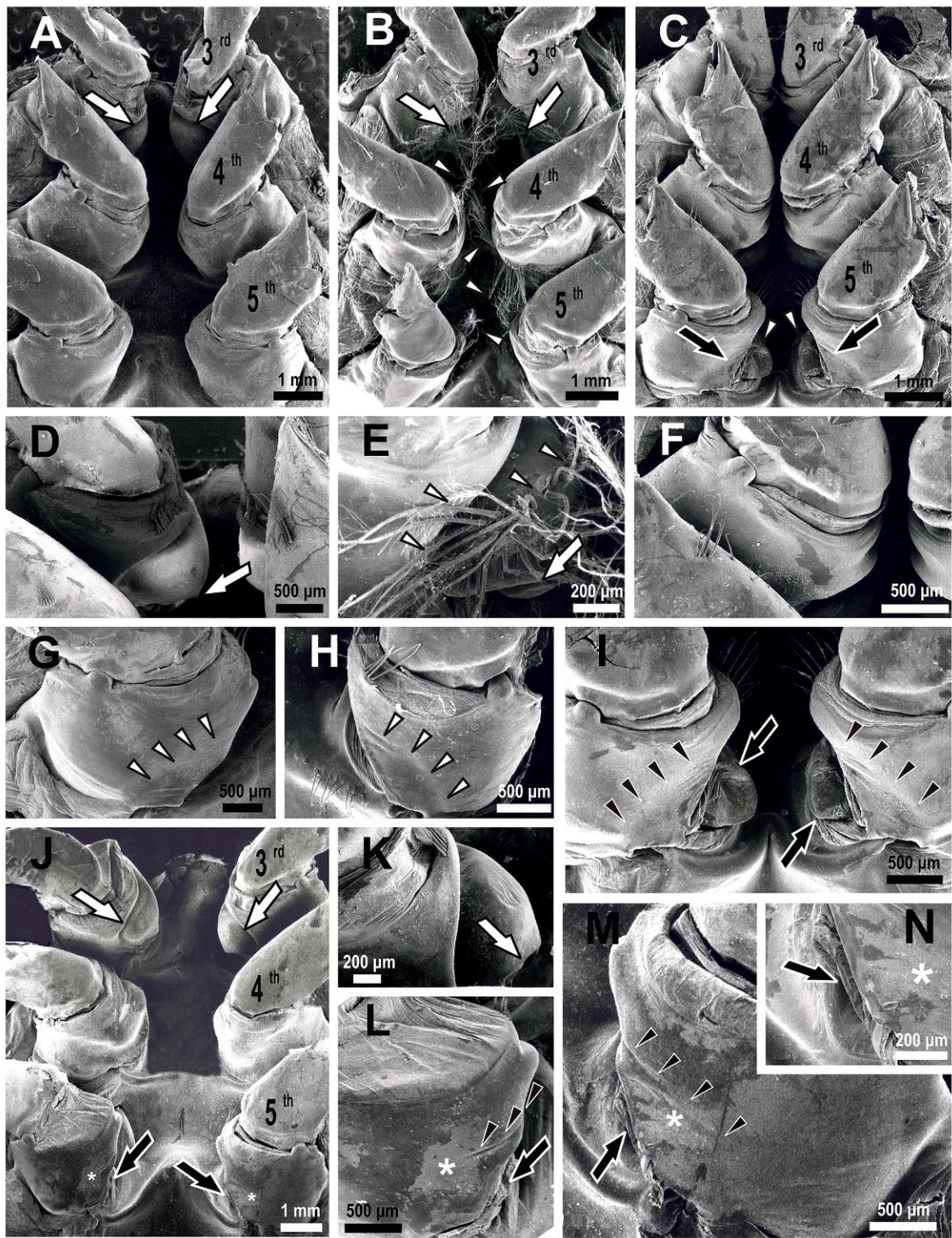


Figure 4. *Macrobrachium amazonicum* (Heller, 1862). **A** and **B**. Ventral view of the sternum of a non-ovigerous and ovigerous female, respectively showing gonopores in the third pereiopod (white arrows). Note the egg-guiding setae (white arrow heads) in the ovigerous female. **C**. Ventral view of the sternum of a GC1 male showing gonopores in the fifth pereiopod (black arrows) covered by flaps (white arrow heads); **D** and **E**. Gonopore of a non-ovigerous and ovigerous female, respectively, with opening facing the base of the sternum (white arrow). In the ovigerous female, this structure is surrounded by setae (white arrow heads). **F**. Regular surface lacking gonopore in the third pereiopod of a GC1 male. **G** and **H**. Depression toward the

central portion of the coxopodite until its base (white arrow heads) in the fifth pereopod of a non-ovigerous and ovigerous female, respectively. **I.** Projections with prominent edges of the fifth pereopod (black arrow head), located above the flaps of gonopores (black arrows) of a GC1 male. **J.** Ventral view of the sternum of the intersex showing female gonopores (white arrows) and male gonopore complexes (black arrows) with scars in the central portion of coxopodites (asterisks). **K.** Opening of the female gonopore of the intersex (white arrow). **L.** Groove in the central portion of the fifth pereopod (black arrow heads) where the gonopore complex is located (black arrow) interrupted near the scar (asterisk). **M.** Gonopore complex (black arrow) underneath the projection of the fifth pereopod (black arrow heads). **N.** Gonopore complex (black arrow) located between the coxopodite of the fifth pereopod (asterisk) and the abdominal sternum.

5. Discussion

This study confirms for the first time the presence of intersexuality in a wild population of the gonochoric caridean *Macrobrachium amazonicum*. Commonly, sex determination in this species and other decapods is primarily regulated by the androgenic gland (AG) (CHARNIAUX-COTTON, 1958; NAGAMINE et al., 1980a, 1980b; BORTOLINI and BAUER, 2016). Ventura et al. (2011) and Ventura and Sagi (2012) reported that in *Macrobrachium*, AG is arranged perpendicularly to the ejaculatory ducts and is responsible for secreting an insulin-like peptide (IAG), which modulates primary (spermatogenesis) and secondary sexual traits (e.g. hypertrophy of chelipeds, formation of gonopores and its auxiliary parts), and behavior. On the other hand, sex determination in crustaceans can also be altered by external mechanisms, such as pollution and parasitism (SANT'ANNA et al., 2010; FORD, 2012). In this study, these external mechanisms could not be used to explain intersexuality, since parasites were not observed (internal and external) in the intersex or other gonochoric individuals in the population. Additionally, more than 30 physical and chemical variables of the water and sediment of the sampling area were analyzed, and heavy metals and other contaminants were not found, except for elevated levels of phosphorus. However, the high concentration of this element in addition to the low primary productivity were peculiar characteristics of the reservoir of the MMM HPS (ANDRADE et al., 2012). Thus, intrinsic factors seem to be the most likely explanation for the change in the endocrine homeostasis of this individual, unlike the proposed for hermit crabs (SANT'ANNA et al., 2010, 2012). However, our study did not examine the presence of insecticides or pesticides in the water and

sediment, thus the effect of pollution cannot be completely ruled out. Since the sampling sites are located in areas used as water supply sources for human consumption (ANDRADE et al., 2012), these contaminants are expected to be absent or at low levels. In addition, if this hormonal dysfunction was caused by pollution, a higher frequency of intersex individuals would be expected (2-7%), as reported for hermit crabs (TURRA and LEITE, 2000; SANT'ANNA et al., 2009).

The intersex had a hypertrophied second cheliped, and cuticular scars and gonopore complexes in the coxopodite of the fifth pereopod. The reproductive system was composed of an ovary without signs of vitellogenesis and vasa deferentia devoid of spermatozoa. Laboratory experiments involving andrectomy (ablation of AG) showed that male prawns of *M. rosenbergii* underwent feminization after this procedure (NAGAMINE et al., 1980a). According to these authors, the andrectomized juvenile males began to develop oviducts and ovaries, with the latter associated with testis, forming ovotestes. These animals did not develop male secondary sexual traits. Oogenesis was initiated; however, vitellogenesis (exogenous phase) was observed only in andrectomized juvenile animals in early stages of gonadal development. In another study, the same authors reported the masculinization of *M. rosenbergii* females after AG implantation. Females developed hypertrophied chelipeds, appendix masculina, and gonopore complexes, and began spermatogenesis in their ovotestes. As observed in andrectomized males of this species, when masculinized females began oogenesis, vitellogenesis could not be completed, not entering the exogenous phase (NAGAMINE et al., 1980b). Thus, the same morpho-anatomical and histological pattern found in *M. rosenbergii* after the induction of sex change (NAGAMINE et al., 1980a,b) was observed in *M. amazonicum* intersex.

Although we did not find morphotypes in females based on morphometric analysis, this tool was effective to distinguish the intersex from the other females examined. In addition to the visual differences in chelipeds, a positive allometric growth for this morphometric variable was observed. This pattern differs from that observed for *M. rosenbergii* females, in which morphotypes were observed despite the absence of significant differences in cheliped length (LIMA et al., 2015). According to Bauer (2004), the positions of gonopores in coxopodites of the third (females) and fifth (males) pereopods are reliable traits for sex determination in

carideans. Additionally, in some species of the genus *Synalpheus* Spence Bate, 1888, the presence of gonopores of both sexes in the same individual has been reported, similarly to those observed in this study, which are valid for the determination of intersex individuals (TÓTH and BAUER, 2007, 2008). The characteristics observed in males and females of the Amazon River shrimp are in agreement with the common pattern described for gonochoric carideans; however, the male gonopore of the intersex appeared undeveloped or vestigial, i.e. a gonopore complex. Although Nagamine et al. (1980a,b) reported the formation of gonopore complex in *M. rosenbergii*, these authors did not present anatomical details of these parts. Piyaviriyakul and Darawiroj (2014) demonstrated the process of differentiation of the sexes in *M. rosenbergii* by SEM and also found the presence of gonopore complexes in juvenile males, while females were devoid of these structures. These authors showed that these structures were arranged on the medial surface of the arthrodistal membrane between the coxopodite of the fifth pereopod and abdominal sternum. This structure was arranged in the same region of the pereopod, and it is similar to the observed for the intersex of *M. amazonicum*.

Hermaphroditism in decapod crustaceans has been reported mainly in the infraorder Caridea, with protandry as the most common type (i.e. males become females) (BAUER, 2000, 2004). Natural sex reversal is well documented in species of the families Lysmatidae, Merguillidae, and Pandalidae, with a strictly protandric sexual system (BAUER, 2000; BAEZA, 2013). However, in some families, such as Hippolytidae and Alpheidae, protandrous as well gonochoric species have been observed within the same genus (e.g. *Thor* Kingsley, 1878 and *Hippolyte* Leach, 1814) (BAUER, 2000, 2004; MANJÓN-CABEZA et al., 2011). In the latter family, in some genera, such as *Synalpheus*, intersexes have also been reported (Tóth and Bauer, 2007, 2008). On the other hand, hermaphroditism in Palaemonidae, a typically gonochoric family, has been reported exclusively for marine species associated with anemones (e.g. *Periclimenes poupini* Bruce, 1989) (BRUCE, 1989). In the present study, we described the first non-functional record of hermaphroditism in *M. amazonicum*, a hololimnetic palaemonid. This finding raises further questions for this Infraorder. Many freshwater species of Palaemonidae are derived from marine animals with high phenotypic plasticity. Their marine ancestors invaded and colonized freshwater environments, promoting multiple speciation events (ASHELBY et al., 2012). Recently, Pantaleão et al. (2014) reported a process of adjustment and

stabilization of *M. amazonicum* in continental aquatic environments. Similarly to the population analyzed by these authors, the population studied in our study might have recently colonized freshwater lentic environments, considering that species was introduced in the reservoir of the MMM HPS (PASCHOAL, personal communication). Thus this species could be adapting to new types of environments and might have genetic triggers that modulate this adaptation. As suggested by Rumbold et al. (2015), the most plausible hypothesis seems to be associated with genetic mutation and/or hormonal dysfunction, leading to the occurrence of low percentage of intersex in the population. Thus, studies involving gene structure and IAG expression to examine the occurrence of intersexes and even hermaphrodites in this species may provide further insight. Thus, despite the intersexuality found in Amazon River shrimps, this phenomenon is rare, indicating that this species is gonochoric and that intersexes are not reproductive viable.

6. References

AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION - APHA. **Standard methods for the examination of water and wastewater**. 20th ed. Washington: APHA, 1999, 1161 p.

ANDRADE, D.P. et al. Assessment of Hydroelectric Power Station Marechal Mascarenhas de Morais fifth-order tributaries water quality at the Rio Grande watershed (Minas Gerais State, Brazil). **Acta Limnologica Brasiliensia**, vol. 24, n. 3, p. 326-337. 2012.

ASHELBY, C.W. et al. Regional scale speciation reveals multiple invasions of freshwater in Palaemoninae (Decapoda). **Zoologica Scripta**, vol. 41, n. 3, p. 293-306. 2012.

AUGUSTO, A.; VALENTI, W.C. Are there any physiological differences between the male morphotypes of the freshwater shrimp *Macrobrachium amazonicum* (Heller, 1862) (Caridea: Palaemonidae)? **Journal of Crustacean Biology**, vol. 36, n. 5, p. 716-723. 2016.

BAEZA, J. A. Sex allocation in a simultaneously hermaphroditic marine shrimp. **Evolution**, vol. 61, p. 2360-2373. 2007.

BAEZA, J. A. The symbiotic lifestyle and its evolutionary consequences: social monogamy and sex allocation in the hermaphroditic shrimp *Lysmata pederseni*. **The Science of Nature = Naturwissenschaften**, vol. 97, p. 729-741. 2010.

BAEZA, J.A. Molecular phylogeny of broken-back shrimps (genus *Lysmata* and allies): A test of the 'Tomlinson–Ghiselin' hypothesis explaining the evolution of

hermaphroditism. **Molecular phylogenetics and evolution**, vol. 69, n. 1, p. 46-62. 2013.

BAEZA, J.A.; BAUER, R.T. Experimental test of socially mediated sex change in a protandric simultaneous hermaphrodite, the marine shrimp *Lysmata wurdemanni* (Caridea: Hippolytidae). **Behavioral Ecology and Sociobiology**, vol. 55, p. 544-550. 2004.

BAEZA, J.A. et al. Population dynamics, sex ratio and size at sex change in a protandric simultaneous hermaphrodite, the spiny shrimp *Exhippolysmata oplophoroides*. **Marine Biology**, vol. 157, p. 2643-2653. 2010.

BAUER, R.T. Simultaneous hermaphroditism in caridean shrimps: a unique and puzzling sexual system in the Decapoda. **Journal of Crustacean Biology**, vol. 20, n. 5, p. 116-128. 2000.

BAUER, R.T. **Remarkable shrimps. Adaptations and Natural History of the Carideans**. 1st ed. Oklahoma: University of Oklahoma Press, 2004, 282 p.

BAUER, R.T. Amphidromy in shrimps: a life cycle between rivers and the sea. **Latin American Journal of Aquatic Research**, vol. 41, n. 4, p. 633-650. 2013.

BAUER, R.T.; DELAHOUSAYE, J. Life history migrations of the amphidromous river shrimp *Macrobrachium ohione* from a continental large river system. **Journal of Crustacean Biology**, vol. 28, n. 4, p. 622-632. 2008.

BORTOLINI, J.L.; BAUER, R.T. Persistence of reduced androgenic glands after protandric sex change suggests a basis for simultaneous hermaphroditism in a caridean shrimp. **The Biological Bulletin**, vol. 230, p. 110-119. 2016.

BRUCE, A.J. *Periclimenes poupini* sp. nov., a new anemone-associated shrimp from deep-water traps (Crustacea, Decapoda, Palaemonidae). **Bulletin du Muséum national d'Histoire naturelle, 4ème série, section A, Zoologie, Biologie et Écologie animals**, vol. 11, p. 851-863. 1989.

CHARNIAUX-COTTON, H. Contrôle hormonal de la différenciation du sexe et de la reproduction chez les Crustacés supérieurs. **Bulletin de la Société zoologique de France**, vol. 83, p. 314-336. 1958.

CORREA, C.; THIEL, M. Mating systems in caridean shrimp (Decapoda: Caridea) and their evolutionary consequences for sexual dimorphism and reproductive biology. **Revista Chilena de Historia Natural**, vol. 76, p. 187-203. 2003.

CUZIN-ROUDY, J.; AMSLER, M.O.L. Ovarian development and sexual maturity staging in Antarctic krill, *Euphausia superba* Dana (Euphausiacea). **Journal of Crustacean Biology**, vol. 11, n. 2, p. 236-249. 1991.

DE GRAVE, S.; FRANSEN, C.H.J.M. Carideorum Catalogus: the recent species of the Dendrobranchiate, Stenopodidean, Procarididean and Caridean shrimps (Crustacea: Decapoda). **Zoologische Mededelingen**, vol. 85, p. 195-589. 2011.

DE GRAVE et al. Dead shrimp blues: a global assessment of extinction risk in freshwater shrimps (Crustacea: Decapoda: Caridea). **PloS one**, vol. 10, p. 1-14. 2015.

DE MAN, J.G. On some species of the genus *Palaemon* Fabr. With descriptions of two new forms. **Notes from the Leyden Museum**, vol. 1, p. 165-184. 1879.

FORD, A.T. Intersexuality in Crustacea: an environmental issue? **Aquatic toxicology**, vol. 108, p. 125-129. 2012.

GOLTERMAN, H.L.; CLYMO, R.S.; OHNSTAD, M.A.M. **Methods for physical and chemical analysis of freshwaters**. 1st ed. Oxford: Blackwell Scientific Publications, 1978, 213 p.

GOTELLI, N.J.; ELLISON, A.M. **A Primer of Ecological Statistics**. 1st ed. Massachusetts: Sinauer Associates, Inc. Sunderland, 2004. 510 p.

HELLER, C. Beiträge zur näheren Kenntnis der Macrouren. **Sitzungsberichte der mathematisch-naturwissenschaftlichen Classe der Kaiserlichen Akademie der Wissenschaften in Wien**, p. 389-426. 1862.

JUGOVIC, J. et al. Estimating population size of the cave shrimp *Troglocaris anophthalmus* (Crustacea, Decapoda, Caridea) using mark–release–recapture data. **Animal Biodiversity and Conservation**, vol. 38, p. 77-86. 2015.

LIMA, W.M.G. et al. Morfótipos em fêmeas de *Macrobrachium rosenbergii* (De Man, 1879) de áreas alagadas do litoral amazônico brasileiro. **Biota Amazônia**, vol. 5, n. 3, p. 38-43. 2015.

MACIEL, C.R.; VALENTI, W.C. Biology, fisheries, and aquaculture of the amazon river prawn *Macrobrachium amazonicum*: a review. **Nauplius**, vol.17, p. 61-79. 2009.

MANJÓN-CABEZA, M.E.; COBOS, V.; RASO, J.E.G., The reproductive system of *Hippolyte niezabitowskii* (Decapoda, Caridea). **Zoology (Jena)**, vol. 114, p. 140-149. 2011.

NAGAMINE, C. et al. Effects of androgenic gland ablation on male primary and secondary sexual characteristics in the Malaysian prawn, *Macrobrachium rosenbergii* (de Man) (Decapoda, Palaemonidae), with first evidence of induced feminization in a nonhermaphroditic decapod. **General and Comparative Endocrinology**, vol. 41, p. 423-441. 1980a

NAGAMINE, C. et al. Masculinization of female *Macrobrachium rosenbergii* (de Man) (Decapoda, Palaemonidae) by androgenic gland implantation. **General and Comparative Endocrinology**, vol. 41, p. 442-457. 1980b.

NEW, M.B. et al. **Freshwater prawns: biology and farming**, 1st ed. Oxford: Wiley-Blackwell, 2010, 544 p.

NUSCH, E.A. Comparison of different methods for chlorophyll and phaeopigments determination. **Archiv für Hydrobiologie-Beiheft Ergebnisse der Limnologie**, vol. 14, p. 14-36. 1980.

NYE, V.; COPLEY, J.T. Reproductive ecology of a hippolytid shrimp, *Lebbeus virentova* (Caridea: Hippolytidae) at the Von Damm Vent Field, Mid-Cayman Spreading Centre. **Marine Biology**, vol. 161, p. 2371-2380. 2014.

ONAGA, T.; FIEDLER, C.; BAEZA, J.A. Protandric simultaneous hermaphroditism in *Parahippolyte misticia* (Crustacea: Decapoda: Hippolytidae): implications for the evolution of mixed sexual systems in marine shrimps. **Journal of Crustacean Biology**, vol. 32, p. 383–394. 2012.

PANTALEÃO, J.A.F.; HIROSE, G.L.; COSTA, R.C. Occurrence of male morphotypes of *Macrobrachium amazonicum* (Caridea, Palaemonidae) in a population with an entirely freshwater life cycle. **Brazilian Journal of Biology**, vol. 74, n. 3 sup., p. 223-232. 2014.

PILEGGI, L.A.G. **Sistemática filogenética dos camarões do gênero *Macrobrachium* Bate, 1868 do Brasil: análises morfológicas e moleculares**. 236 f. Tese de doutorado (Doutorado em Biologia Comparada). Universidade de São Paulo – USP, São Paulo. 2009.

PIYAVIRIYAKUL, P.; DARAWIROJ, D. Timing for male reproductive tract gene expression and gonopore complex development of giant freshwater prawn (*Macrobrachium rosenbergii*). **The Thai Journal of Veterinary Medicine**, vol. 44, n. 4, 523, 2014.

RAIJ, B. Van; ANDRADE, J.C.; CANTARELLA, H.; QUAGGIO, J.A. **Análise química para avaliação da fertilidade de solos tropicais**. 1 ed. Campinas: Instituto Agrônômico, 2001, 284 p.

RAO, R.M. Studies on the biology of *Macrobrachium rosenbergii* (de Man) of the Hooghly estuary with notes on its fishery. **Proceedings of the National Institute of Sciences of India**, vol. 33, n. 5, p. 252-279. 1967.

RUMBOLD, C.E. et al. Intersex in the gonochoristic crustacean *Tanais dulongii* (Audouin, 1826) (Peracarida: Tanaidacea: Tanaididae): a comparison of external reproductive characteristics. **Journal of Natural History**, vol. 49, p. 775-788. 2015.

SANT'ANNA, B.S. et al. Effects of tributyltin exposure in hermit crabs: *Clibanarius vittatus* as a model. **Environmental Toxicology and Chemistry**, vol. 31, n. 3, p. 632-638. 2012.

SANT'ANNA, B.S.; REIGADA, A.L.D.; PINHEIRO, M.A.A. Population biology and reproduction of the hermit crab *Clibanarius vittatus* (Decapoda: Anomura) in an estuarine region of southern Brazil. **Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom**, vol. 89, p. 761–767. 2009.

SANT'ANNA, B.S.; TURRA, A.; ZARA, F.J. Simultaneous activity of male and female gonads in intersex hermit crabs. **Aquatic Biology**, vol. 10, n. 3, p. 201-209. 2010.

STRICKLAND, J.D.H.; PARSONS, T.R. A manual of seawater analysis. **Bulletin of the Fisheries Research Board of Canada**, vol. 125, p. 1-185. 1960.

TÓTH, E.; BAUER, R.T. Gonopore sexing technique allows determination of sex ratios and helper composition in eusocial shrimps. **Marine Biology**, vol. 151, n. 5, p. 1875-1886. 2007.

TÓTH, E.; BAUER, R.T. *Synalpheus paraneptunus* (Crustacea: Decapoda: Caridea) populations with intersex gonopores: a sexual enigma among sponge-dwelling snapping shrimps. **Invertebrate Reproduction & Development**, vol. 51, n. 1, p. 49-59. 2008.

TURRA, A.; LEITE, F.P.P. Population biology and growth of three sympatric species of intertidal hermit crabs in southeastern Brazil. **Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom**, vol. 80, p. 1061–1069. 2000.

VALDERRAMA, J.C. The simultaneous analysis of total nitrogen and phosphorus in natural waters. **Marine Chemistry**, vol. 10, p. 109-122. 1981.

VERGAMINI, F.G.; PILEGGI, L.G.; MANTELATTO, F.L. Genetic variability of the Amazon River prawn *Macrobrachium amazonicum* (Decapoda, Caridea, Palaemonidae). **Contributions to Zoology**, vol. 80, p. 67-83. 2011.

VENTURA, T.; ROSEN, O.; SAGI, A. From the discovery of the crustacean androgenic gland to the insulin-like hormone in six decades. **General and Comparative endocrinology**, vol. 173, n. 3, p. 381-388. 2011.

VENTURA, T.; SAGI, A. The insulin-like androgenic gland hormone in crustaceans: From a single gene silencing to a wide array of sexual manipulation-based biotechnologies. **Biotechnology Advances**, v. 30, n. 6, p. 1543-1550. 2012.

WENNER, E.L. et al. **A comparison of species composition and abundance of decapod crustaceans and fishes from the North and South Edisto rivers in South Carolina**. South Carolina Marine Research Center: Technical Report No. 78, Charleston, 1991, 48 p.

ZARA, F.J. et al. Spermatogenesis, spermatophore and seminal fluid production in the adult blue crab *Callinectes danae* (Portunidae). **Journal of Crustacean Biology**, vol. 32, n. 2, p. 249-262. 2012.

Capítulo 11

Ultraestrutura e patologia produzida pelo parasita *Inodosporus* (Microsporidia: Thelohaniidae) causador da “doença do camarão colorido” em *Macrobrachium amazonicum* (Caridea: Palaemonidae)

Ultraestrutura e patologia do parasita *Inodosporus* (Microsporidia: Thelohaniidae) causador da “doença do camarão colorido” em *Macrobrachium amazonicum* (Caridea: Palaemonidae)

1. Resumo

Neste trabalho apresentamos o primeiro registro do parasita microsporídeo *Inodosporus* no camarão amazônico *Macrobrachium amazonicum*. Animais parasitados foram detectados em uma população selvagem em São José da Barra, estado de Minas Gerais, sudeste do Brasil. Durante o período de Outubro de 2014 a Janeiro de 2016, 100 camarões com cores aberrantes e natação errática foram coletados e a presença de microsporídios foi detectada nestes animais. A taxa de infestação média nesta população foi de 1,7% ($\pm 1,8$), com ocorrência em adultos de ambos os sexos e juvenis. A coloração mais frequente nos camarões infectados foi à azul (72%), principalmente em machos, sendo a cor alaranjada e o padrão misto menos frequentes. Em animais infectados, a natação errática se devia a mobilidade restrita do abdome, levando intensa movimentação dos pleópodes. A restrição da mobilidade destes animais foi ocasionada pela desorganização das fibras musculares do abdome, promovida pela infestação de microsporídios. Esta infestação foi responsável por modificar o ângulo abdominal, além de afetar a natação e também o mecanismo de escape dos animais infectados, tornando os hospedeiros mais susceptíveis à predação. Em *M. amazonicum*, a transmissão dos esporos se dá por via horizontal (predação por peixes), enquanto que a transmissão vertical (maternal) é ausente. Por meio da microscopia eletrônica de transmissão, pode-se observar que os esporos que infectam o camarão amazônico são elipsóides e estão envoltos em vesículas esporofíticas, contendo oito esporos com $1,9426 \pm 0,3101 \mu\text{m}$ cada. Não foi observada a formação de xenomas nas fibras musculares. Os esporos maduros possuem três ou quatro projeções caudais filamentosas aderidas lateralmente à parede externa. O polaroplasto lamelar é envolto pelo filamento polar, que possui sete a oito voltas com $0,0847 \pm 0,0059 \mu\text{m}$ de largura. Tais características ultraestruturais do microsporídeo que infecta *M. amazonicum* pertencem ao gênero *Inodosporus*, sendo este uma nova espécie a ser descrita. A descrição de aspectos comportamentais e histopatológicos dos hospedeiros e dos caracteres ultraestruturais dos esporos maduros elucidam a “doença do camarão colorido” e podem ser utilizados para o monitoramento de microsporidioses e na manutenção de estoques afetados.

Palavras-chave: camarão amazônico, microsporidiose, esporos com caudas, coloração Luna, MET.

2. Introdução

O gênero *Macrobrachium* Spence Bate, 1868 destaca-se na família Palaemonidae Rafinesque, 1815, devido a sua grande importância biológica (e.g. participação em teias tróficas e ciclagem e transporte de nutrientes) e econômica (BAUER, 2004; NEW et al., 2010; NOVAK et al., 2017). Com aproximadamente 240 espécies no mundo (DE GRAVE e FRANSEN, 2009), seus representantes apresentam ampla distribuição em regiões tropicais e subtropicais (ANGER, 2013). No Brasil, 19 espécies são registradas em ambientes aquáticos interiores e costeiros (VERA-SILVA et al., 2017). Dentre estas, o camarão amazônico *Macrobrachium amazonicum* (Heller, 1862) é a espécie com maior distribuição geográfica, além de ser uma das espécies mais cultivadas e importantes para a aquicultura brasileira. Uma característica desta espécie é a alta variabilidade reprodutiva e morfológica de suas populações e a capacidade de utilizar diferentes tipos de ambientes aquáticos, características responsáveis por determinar diferentes histórias de vida observadas no camarão amazônico, a anfidromia e a hololimínia (MACIEL e VALENTI, 2009; MORAES-VALENTI e VALENTI, 2010; VERGAMINI et al., 2011; PASCHOAL e ZARA, 2017).

Devido a estas características, a facilidade de obtenção dos indivíduos e de sua manutenção ao longo do tempo, *M. amazonicum* tem sido cada vez mais utilizado no aquarismo (PLANETA INVERTEBRADOS, 2017). Recentemente, entusiastas verificaram animais com grandes variações no padrão típico de coloração do camarão amazônico (translúcido ou opaco), com cores variando entre azul a dourado. Todos os animais apresentando colorações aberrantes sempre possuíam dificuldades para flexionar o abdome ou eram incapazes de realizar tal função, conseqüentemente não promoviam de forma eficiente a natação e o mecanismo de escape. Popularmente, esta condição foi designada como “doença do camarão colorido” ou “doença do camarão azul” (PASCHOAL, dados pessoais). Até o momento, não se sabe exatamente o que promove tais alterações comportamentais e fisiológicas em *M. amazonicum*. Todavia, este padrão de alteração colorimétrica e morfológica é similar ao registrado por Ding et al. (2016) em camarões da espécie *M. nipponense* (De Haan, 1849) afetados por microsporídios, assim como em *Caridina formosae* Hung, Chan & Yu, 1993 analisado por Wang et al. (2013).

Os Microsporidia Balbiani, 1882 são parasitas intracelulares obrigatórios com características peculiares, como: ausência de mitocôndrias e complexos de Golgi. Estes eucariotos possuem taxas metabólicas reduzidas, sendo as demandas energéticas proveniente de uma cadeia respiratória alternativa encontrada nos mitossomas (BEZNOUSSENKO et al., 2007; DOLGIKH et al., 2011). Microsporidioses afetam todas as classes de vertebrados (incluindo o homem) e quase todos os filos de invertebrados, podendo ser hiperparasitas em alguns grupos (STENTIFORD et al., 2013). A maioria das espécies afetadas são peixes e artrópodes, principalmente insetos e crustáceos (WANG et al., 2013; AZEVEDO et al., 2016). Wang et al. (2013) verificaram que aproximadamente 40 gêneros de microsporídios estão descritos para crustáceos, com 11 gêneros registrados em camarões. Dentre eles, o gênero *Inodosporus* Overstreet & Weidner, 1974, recebe atenção especial devido à capacidade de infectar palemonídeos, o grupo com maior número de espécies dentro da Infraordem Caridea (DE GRAVE e FRANSEN, 2009). Estes esporos com caudas possuem como principais hospedeiros, os camarões marinhos e anfídromos do gênero *Palaemon* Weber, 1795 na região europeia (CODREANU, 1966; SPRAGUE e COUCH, 1971; OVERSTREET e WEIDNER, 1974; AZEVEDO et al., 2000). Neste trabalho apresentamos o primeiro registro para o microsporídio *Inodosporus* nas Américas e em água doce, o qual é parasita de populações selvagens de *M. amazonicum*. Adicionalmente, descrevemos as alterações morfológicas e comportamentais desencadeadas no hospedeiro, a ultraestrutura dos esporos, a histopatologia da infecção, bem como o provável mecanismo de transmissão e as taxas de infestação do microsporídio no camarão amazônico.

3. Material e métodos

3.1. Animais

Indivíduos de *M. amazonicum* apresentando coloração, morfologia abdominal e comportamento aberrantes foram coletados durante Outubro de 2014 a Janeiro de 2016, no reservatório da usina hidrelétrica de Furnas, no Rio Grande (20° 30' 53" S; 46° 50' 16" W), município de São José da Barra, estado de Minas Gerais, sudeste do Brasil. Os animais foram obtidos por meio de coleta ativa (uma peneira de 60 cm de

diâmetro e malha de 1,25 mm, deslocada diversas vezes durante 30 minutos por uma pessoa, ao longo da vegetação marginal e bancos de macrófitas) e passiva (seis armadilhas de 85 cm comprimento X 35 cm largura/altura, contendo pedaços de fígado bovino dispostas de 0,5 a dois metros da margem, mantidas imersas por quatro horas). Após a coleta, os animais com características aberrantes foram separados dos demais e transportados vivos em caixas térmicas com aeração. No laboratório, estes animais foram mantidos em aquários com fundo escuro (50 cm x 30 cm x 45 cm), com cascalho basáltico, macrófitas e fragmentos de rochas para refúgios. Os camarões foram aclimatados por 24 horas, condicionados ao fotoperíodo de 12 horas e temperatura $25 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$.

Cinco camarões apresentando características aberrantes foram anestesiados por resfriamento ($- 20^{\circ}\text{C} / 5 \text{ min.}$), eutanasiados e tiveram pequenos pedaços de músculo abdominal, sistema nervoso e sistema reprodutor ($1-3 \text{ mm}^3$) semeados em placas de Petri contendo meio de cultura Potato Dextrose Agar e tubos contendo caldo Brain Heart Infusion. Após 24 horas de incubação a 37°C , preparações (lâminas) temporárias foram realizadas com esfregaços obtidos do microcultivo. Com o auxílio de uma alça de platina, esfregaços foram realizados em lâminas e corados com a técnica de Gram, Azul-algodão lactofenol (Cotton blue) e Azul de metileno 2% (SEAL, 1997; GARCIA, 2002). Para a contagem de esporos no interior da vesícula esporofítica, utilizaram-se lâminas coradas com Cotton blue, as quais foram analisadas sob microscópio de contraste de fase (DIC) ZeissAxiovision Z2.

3.2. Microscopia eletrônica de transmissão

Fragmentos do músculo abdominal de animais infectados, com aproximadamente 1 mm^3 foram fixados em glutaraldeído 2,5% em tampão cacodilato de sódio 0,08M (pH 7,2) por quatro horas a 4°C , pós-fixadas com tetróxido de ósmio 1%, no mesmo tampão e contrastadas “Enbloc” com acetato de uranila 1% aquoso (overnight a 4°C). As amostras foram desidratadas em séries crescentes de acetona (70 a 100 %), embebidas e incluídas em resina Epon-Araldite®. Os cortes ultrafinos foram realizados no ultramicrotomo Leica® UC7 e as grades com estes cortes foram contrastadas com acetato de uranila 2% e citrato de chumbo 0,4%. Todas as grades foram observadas e fotografadas no MET Jeol J1010 operado a 80 kV. O comprimento e a morfologia dos esporos, assim como o número de voltas e a

largura do filamento polar, caracteres utilizados para a confirmação taxonômica em microsporídios (SPRAGUE et al., 1992), foram analisados e mensurados com o software ImageJ versão 1.50 (RASBAND, 2016) por meio da análise de 15 esporos de diferentes animais.

3.3. Comportamento e morfologia abdominal

Para a descrição do comportamento natatório e alteração da conformação (angulação) do abdome dos animais parasitados, 50 saudáveis e 50 indivíduos infectados, de ambos os sexos foram analisados. Dois aquários (45 cm x 25 cm x 30 cm) contendo 25 animais saudáveis e 25 infectados foram filmados por cinco dias consecutivos com uma câmera digital imersa (GoPro HERO3 Black Edition® 12 megapixels). Para as filmagens noturnas, LEDs de luz infravermelho com até cinco metros de alcance foram posicionados próximos aos aquários. Os vídeos foram editados em programas específicos e fotografias obtidas nas filmagens foram utilizadas para verificar a modificação do ângulo abdominal. Para isto foi utilizado o protocolo proposto por Arnott et al. (1998), onde são utilizados três pontos interligados por duas retas para a verificação do ângulo do mecanismo de escape em camarões. Para a plotagem bidimensional dos pontos foram considerados: (I) as órbitas oculares; (II) a borda do abdome no ponto de flexão, ou seja, ápice do terceiro somito abdominal; e (III) a margem posterior do sexto somito abdominal ou o telso. Os ângulos de 30 animais saudáveis (normais) e 30 infectados (aberrantes) foram registrados durante a natação (i.e. distensão total) e mensurados no programa de edição de fotos CorelDraw X3®. O teste não-paramétrico de Mann-Whitney (U) (normalidade não satisfeita - W-Statistic = 0,89 - $p < 0,001$) foi utilizado para verificar diferenças entre os ângulos do abdome de animais saudáveis e infectados.

3.4. Estudo histopatológico

Amostras de diferentes tecidos (musculatura do abdome, sistema nervoso, sistema reprodutor, sistema digestivo, hepatopâncreas e brânquias) de 10 indivíduos infectados de ambos os sexos foram utilizados para a histopatologia. Após anestesia por resfriamento e dissecação, as amostras foram fixadas em paraformaldeído 4% em tampão fosfato 0,2M (pH 7,2) por 24 horas, desidratadas em série crescente de

etanol (70 a 95%), embebidas e incluídas em historesinaglico-metacrilato Leica®. Os blocos foram seccionados em micrótomo rotativo e as lâminas com os cortes (4-5 µm de espessura) foram coradas com hematoxilina & eosina (H&E) para a descrição histológica e com a técnica de Luna, para detecção de microsporídios (PETERSON et al., 2011).

3.5. Vias de transmissão e análise populacional

Quinze ovos de três fêmeas ovígeras infectadas (N: 45) foram processados segundo a rotina descrita para histopatologia, e posteriormente as lâminas foram coradas com a técnica de Luna para verificar a possibilidade de transmissão vertical ou materna de microsporídeos (SANDERS et al., 2013). A transmissão horizontal da microsporidiose em *M. amazonicum* promovida pela predação por peixes na área de coleta foi investigada durante os meses de Junho e Julho de 2015. Todos os peixes capturados juntos aos camarões nas armadilhas foram separados e transportados vivos em caixas térmicas com aeração para o local mais adequado, para a imediata anestesia por resfriamento, identificação segundo Britski et al. (2007) e dissecação para a retirada do estômago. Logo após a dissecação, o conteúdo estomacal foi analisado com o emprego de preparações temporárias por meio de esfregaços corados com Cotton blue, buscando a identificação de massas ou esporos de microsporídios, assim como fragmentos de exoesqueleto ou apêndices de *M. amazonicum*.

A taxa de infestação (%) na população e a proporção de machos e fêmeas afetados foram calculadas durante os meses de Outubro de 2014 a Janeiro de 2016. A prevalência de parasitismo entre os sexos foi avaliada por meio do teste de qui-quadrado (χ^2 - α : 0,05). Todos os animais infectados foram sacrificados e tiveram o comprimento de carapaça (CL) mensurado por meio de paquímetro analógico (0,02 mm).

4. Resultados

Indivíduos saudáveis de *M. amazonicum* apresentam coloração críptica e tendem a ser opacos ou translúcidos (Figura 1A). Estes animais são capazes de flexionar e distender o abdome, e possuem conformação abdominal de angulação

aberta. Por outro lado, animais infectados possuíam colorações e comportamento natatório aberrantes. Nestes camarões, a coloração variou entre o azul e laranja, podendo ocorrer uma mescla dessas tonalidades (Figura 1B-D). Camarões infectados não eram capazes de distender completamente seu abdome e exibiam curvatura abdominal muito pronunciada (Figura 1 e Apêndices I-IV).

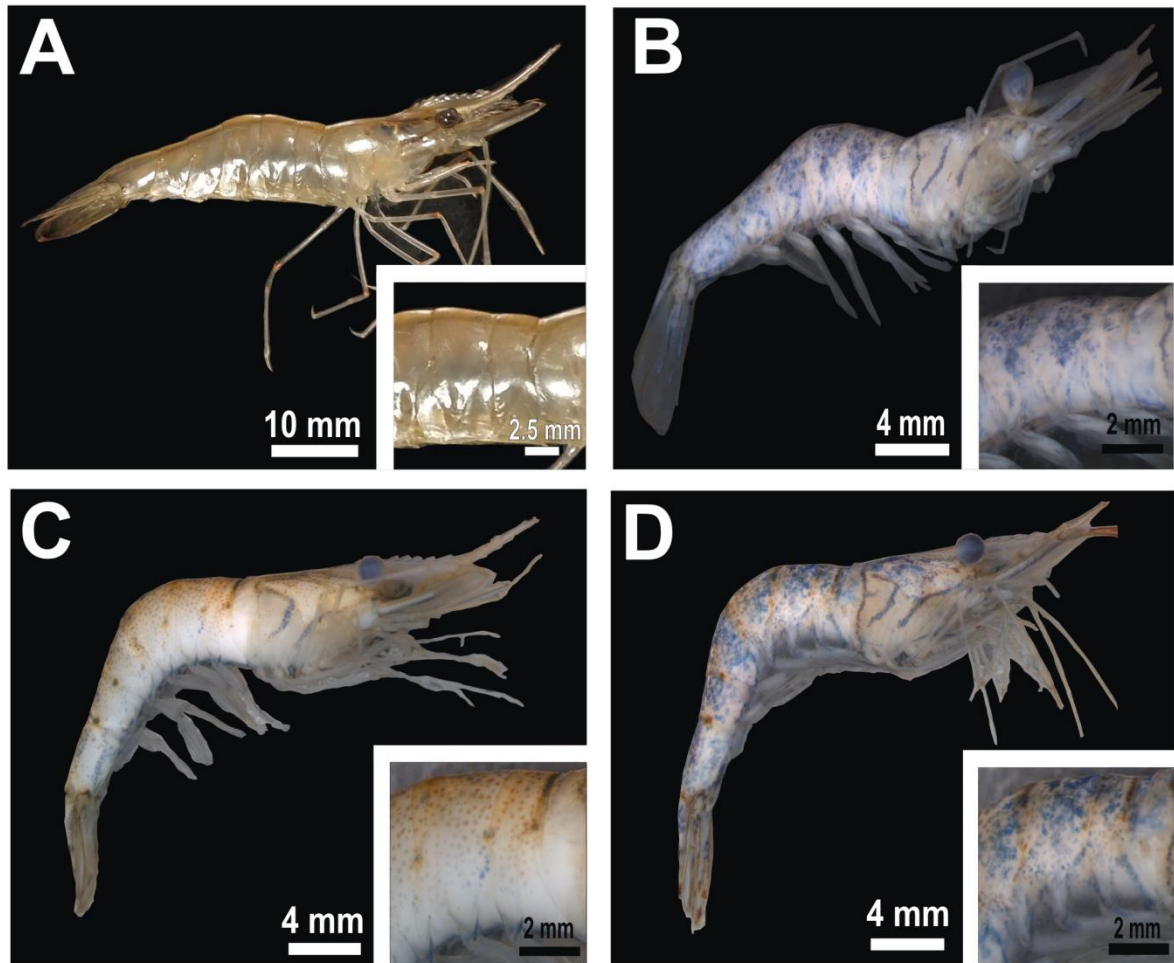


Figura 1. Coloração e conformação abdominal típica de *M. amazonicum* em animal saudável (A) e em animais infectados com microsporídios (B-D). Camarões infectados podem possuir coloração azul (B), laranja (C) ou mista (D). Além disso, mostram pronunciada curvatura do abdome. Detalhes: coloração em maior aumento.

Esporos maduros de microsporídios intensamente corados com o Cotton blue, Gram e Azul de metileno 2% foram obtidos nos microcultivos de músculo abdominal de *M. amazonicum* (Figura 2A-C). As vesículas esporofíticas analisadas ao DIC mostram a presença de oito esporos elipsóides encapsulados (Figura 2D-E).

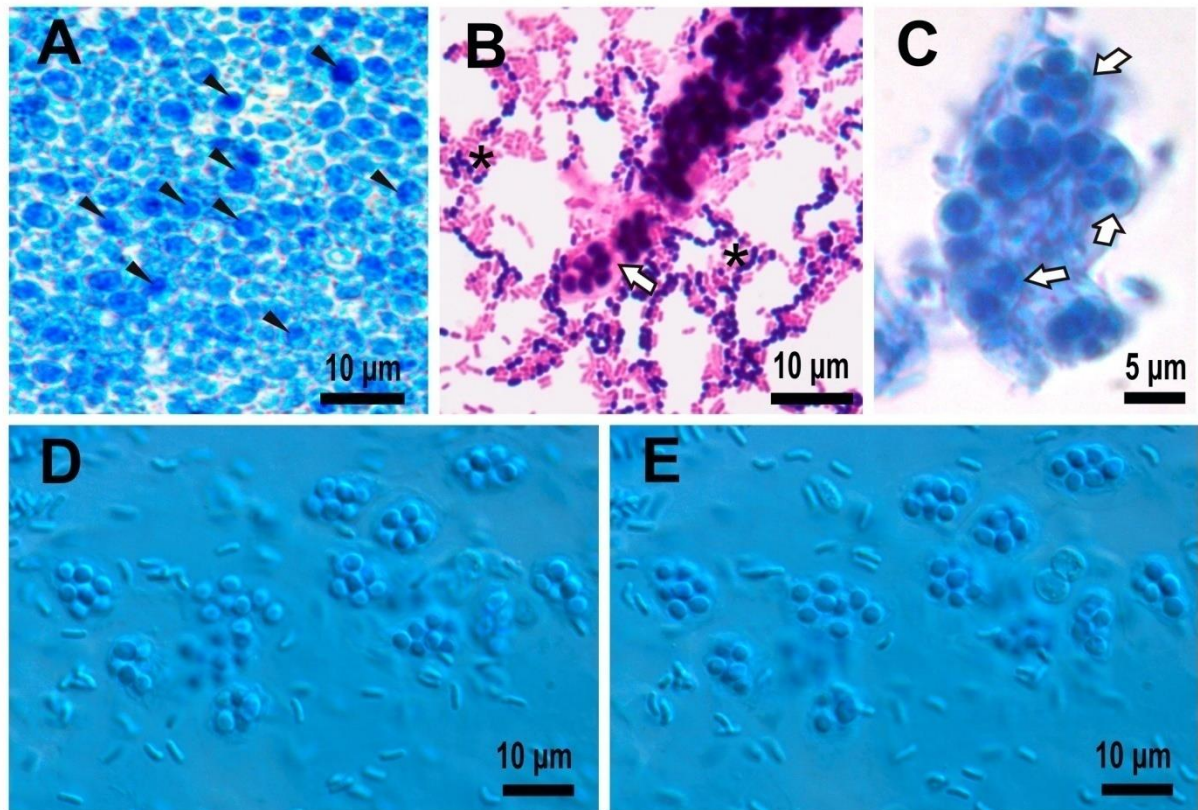


Figura 2. Preparações temporárias de esfregaços de músculo abdominal, evidenciando massas de microsporídios em *M. amazonicum*. **A.** Esporos maduros apresentam áreas fortemente coradas, correspondente ao vacúolo posterior (setas pretas) [Cotton blue]. **B.** Esporos gram positivo encapsulados em vesículas esporofíticas (seta branca), assim como bactérias gram positivas e negativas (asteriscos) [Gram]. **C.** Esporos encapsulados em vesículas esporofíticas (setas brancas) [Azul de metileno 2%]. **D-E.** Preparação a fresco de esporos maduros, observados sob contraste de fases. Esporos apresentam formato elipsóide e são encapsulados em vesículas esporofíticas. Note o número constante de esporos (N: 8) em cada vesícula nos diferentes planos de observação [Cotton blue].

Os esporos de microsporídios que infectam *M. amazonicum*, desenvolvem-se livremente nas fibras musculares sem formar qualquer estrutura de proteção, os xenomas. Massas livres com oito esporos elipsóides de $1,9426 (\pm 0,3101) \mu\text{m}$ de comprimento são observados dentro das fibras (Figura 3A). Cada um dos esporos possui três apêndices externos alongados, uma projeção é situada na porção anterior e outras duas projeções caudais filamentosas são aderidas lateralmente à parede externa (exosporo) (Figura 3B). O exosporo é uma camada eletrodensa delgada ($0,0337 \pm 0,0097 \mu\text{m}$), enquanto que o endosporo (camada interna) é mais espesso ($0,0460 \pm 0,0138 \mu\text{m}$) e eletrolúcido (Figura 3B-F). Os esporos são uninucleados e seus núcleos estão dispostos na região central entre o polaroplasto e

o vacúolo posterior. O posterossoma está dentro do vacúolo posterior e é irregular e eletrodense (Figura 3C e E). O polaroplasto possui aspecto lamelar e é composto pelo disco de ancoragem e o filamento polar. A última estrutura é disposta em uma linha única e contínua com sete a oito voltas, e cada volta possui aproximadamente $0,0847 \pm 0,0059 \mu\text{m}$ de largura. Foi possível observar ribossomos aderidos às voltas dos filamentos polares (Figura 3C-E). Os esporos em fissão binária são frequentemente observados dentro dos tecidos musculares (Figura 3F).

Animais parasitados de diferentes colorações tornavam-se mais discrepantes nas filmagens noturnas (Apêndices III e IV). Tais animais apresentam ângulo abdominal (em distensão) de $131 \pm 18^\circ$, sendo o mais pronunciado com $98,65^\circ$, enquanto que o ângulo abdominal nos animais sadios foi de $153 \pm 7^\circ$, sendo o mais pronunciado com $137,17^\circ$. Os ângulos abdominais diferiram significativamente entre animais saudáveis e parasitados (U: 1255, $p < 0,001$). Os animais parasitados apresentaram natação errática fora do centro de massa, com ampla inclinação alternada direita e esquerda, devido a pouca mobilidade (rigidez) da musculatura abdominal. Como consequência, os pleópodes apresentavam movimentação mais intensa que nos animais sadios. Em geral, os animais parasitados encontravam-se mais isolados do restante, com coloração normal (translúcidos ou opacos) (Apêndices I-IV). Todos os 50 animais parasitados morreram em cinco dias, ao contrário dos animais saudáveis, que tiveram 100% de sobrevivência no mesmo período.

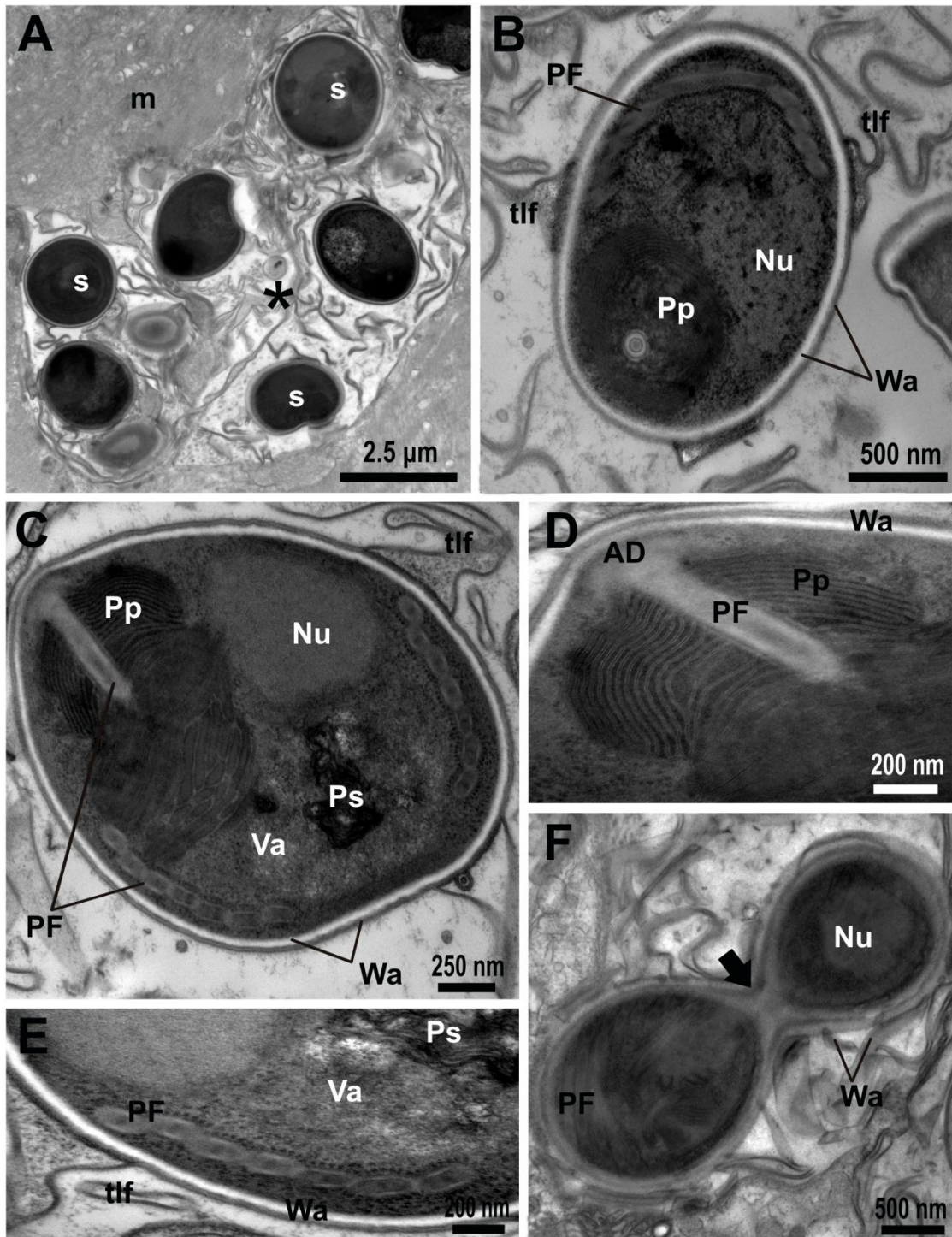


Figura 3. **A.** Massa de esporos (asterisco) desenvolvem-se livres nas fibras musculares de *M. amazonicum*. **B.** Projeções caudais filamentosas aderidas à parede do esporo maduro. **C.** Esporo maduro mostrando o polaroplasto, núcleo e vacúolo com posterossoma. Os filamentos polares são organizados em uma única linha, próxima ao vacúolo posterior. **D.** Detalhe da região apical de C, mostrando o disco de ancoragem e o arranjo lamelar do polaroplasto. **E.** Detalhe da parede do esporo contendo uma projeção caudal, com as voltas do filamento polar próxima a esta estrutura. **F.** Fissão binária (seta preta) de um esporo. AD: disco de ancoragem; m: músculo; Nu: núcleo; PF: filamento polar; Pp: polaroplasto; Ps: posterossoma; s:

esporo maduro; tlf: projeções caudais filamentosas; Va: vacúolo posterior; Wa: parede do esporo.

Microsporídios foram ausentes em todos os tecidos de *M. amazonicum*, com exceção do tecido muscular abdominal. Esporos de microsporídios causam a desorganização das fibras musculares. Além de microsporídios, muitas bactérias Gram positivas e negativas também foram observadas no interior das fibras musculares, provocando infecções secundárias (Figura 4A). Neste tecido foram encontrados microsporídios em estágios iniciais, os quais são menos reativos, e esporos maduros, intensamente corados, pela técnica de Luna (Figura 4C-E). Os microsporídios encontram-se isolados (Figura 4B) ou em pequenas ou grandes massas (Figura 4C e E) por entre as miofibrilas, modificando o padrão usual da distribuição ordenada do citoesqueleto (Figura 4B). Além desta distribuição, os parasitas também foram observados com frequência no sarcoplasma perinuclear (Figura 4A e D). As fibras musculares não apresentaram evidências de necrose, células gigantes de corpo estranho ou xenomas (diferenciação de uma estrutura protetora para ambos os organismos) (Figura 4A-B). Os esporos desenvolvem-se como massas de células parasíticas livres, desorganizando as fibras musculares (Figura 4A-E).

Em relação aos mecanismos de transmissão do microsporídio em *M. amazonicum*, não foi verificada a transmissão vertical de microsporídios de fêmeas para embriões. Os tecidos musculares dos embriões, assim como as demais estruturas do organismo não apresentaram nenhum indício de infestação (Figura 5A). Por outro lado, a transmissão horizontal foi observada na população estudada. Três espécies de peixes predadores foram coletadas no local de ocorrência de microsporidiose, os peixes caraciformes: *Astyanax faciatu*s (Cuvier, 1819), *A. lacustris* (Lütken, 1875) e *Hyphessobrycon eques* Steindachner, 1882. Porém, somente na última espécie (N: 20) foi detectada a presença de massas de microsporídios (Figura 5B), assim como fragmentos de exoesqueleto e apêndices natatórios de *M. amazonicum* nos conteúdos estomacais (Figura 5C).

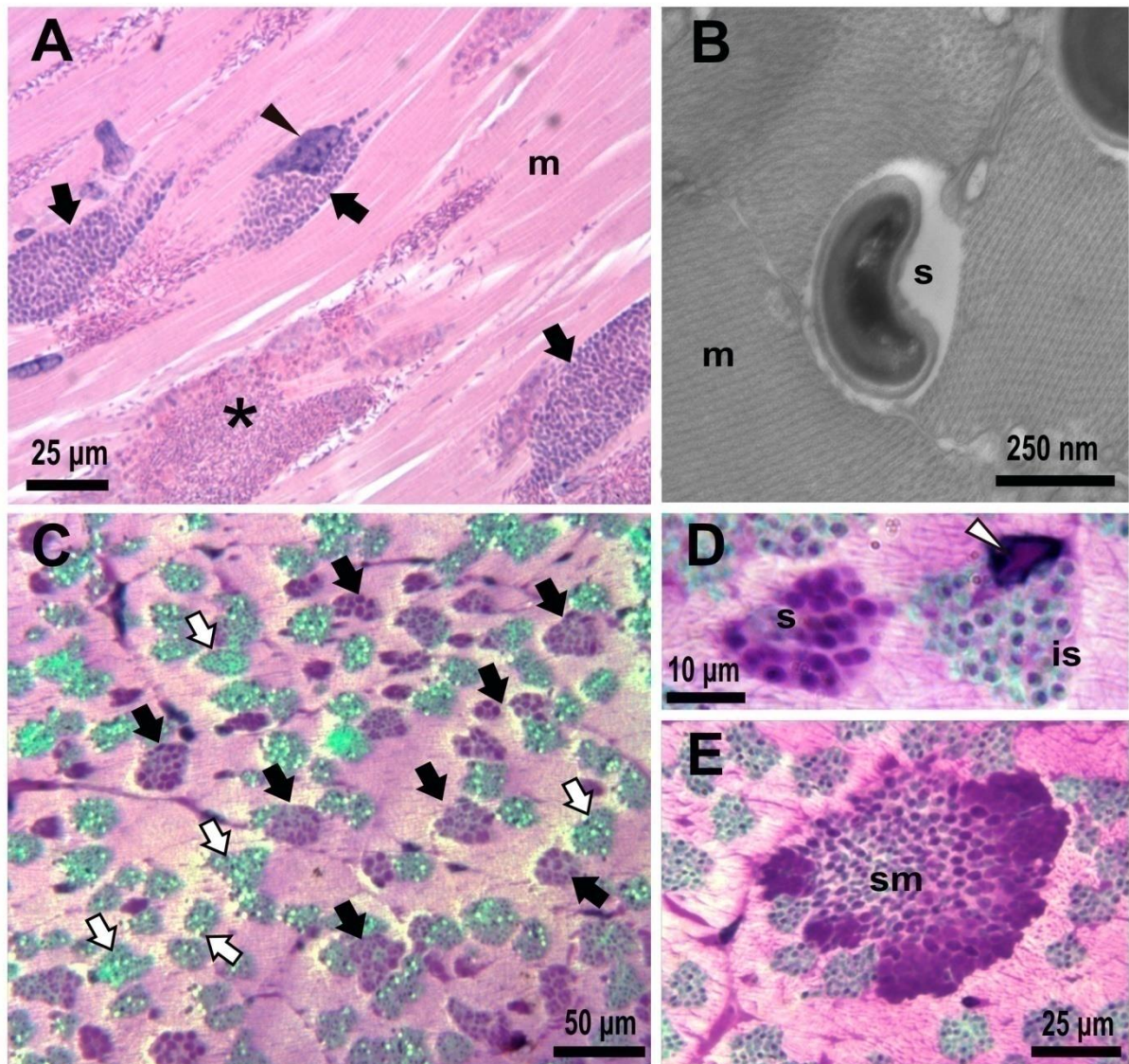


Figura 4. A. Músculo abdominal de *M. amazonicum* infectado por massas de microsporídios (setas pretas) e bactérias (asterisco). Percebe-se a desorganização das fibras musculares devido à infecção conjunta, e algumas massas podem estar próximas ao núcleo das células (cabeça de seta) [H&E]. B. Ausência de formação de xenomas, os esporos desenvolvem-se livres nas fibras musculares [MET]. C. Grande quantidade de pequenas massas de microsporídios em tecidos musculares. Nota-se uma diferença de reatividade para esporos maduros (setas pretas) e iniciais (setas brancas) [Luna]. D. Massas de microsporídios em estágios iniciais e maduros dentro dos tecidos musculares dos hospedeiros. Note os esporos em estágio inicial envolvendo o núcleo da fibra muscular (seta branca) [Luna]. E. Grande massa de esporos disposta entre os feixes musculares [Luna]. is: esporos em estágio inicial; m: músculo; s: esporos maduros; sm: massa de esporos.

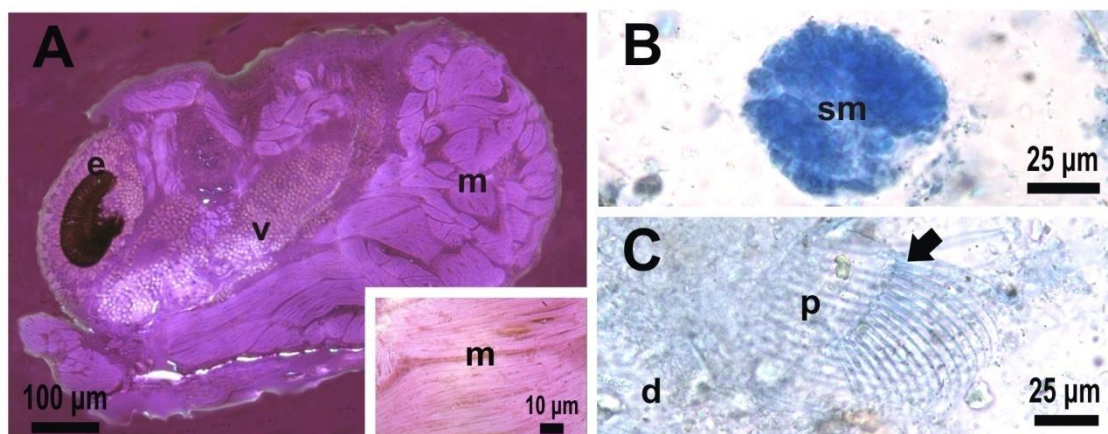


Figura 5. **A.** Ausência de infecção por microsporídios em embriões de *M. amazonicum*. As fibras musculares estavam intactas em embriões de fêmeas ovígeras infectadas [Luna]. **B.** Grande massa de esporos encontrada no conteúdo estomacal de *Hyphessobrycon eques*. **C.** Parte de um pleópode de *M. amazonicum* com cerdas ainda intactas (seta preta) junto a detritos em conteúdo estomacal de *H. eques* [Cotton blue]. d: detritos; e: olho; m: músculo; p: pleópode; sm: massa de esporos; v: vitelo.

A partir de Janeiro de 2015, foi constatada a presença de camarões com colorações aberrantes na população estudada (Tabela I). No total, 100 indivíduos infectados foram coletados. A taxa de infestação média foi de $1,7 \pm 1,8\%$, sendo a maior infestação observada em Outubro de 2015, com 6% (Tabela I). A maior incidência de microsporídios foi observada nos machos (proporção $\text{♀}:\text{♂} = 1:3$; $\chi^2: 6,26 - p < 0,05$). O CL médio para machos parasitados foi de $6,84 \pm 1,04$ mm, em fêmeas foi de $7,59 \pm 1,79$ mm, sendo as ovígeras com $9,13 \pm 0,80$ mm, e os juvenis com $3,68 \pm 0,64$ mm. A coloração predominante entre os animais parasitados foi à azul (72%) e a menos frequente a laranja (12%) (Figura 1). Os machos apresentaram cor azul (N: 48) ou laranja (N: 12), as fêmeas exibiam cor azul (N: 11) ou coloração mista (N: 16), incluído as ovígeras (N: 3), e os juvenis sempre apresentavam cor azul (N: 13).

Tabela I. Taxa de infestação mensal, total e números absolutos de fêmeas, machos e juvenis de *M. amazonicum* infectados por microsporídios na população de São José da Barra, Minas Gerais (Brasil), entre Outubro de 2014 a Janeiro de 2016.

Meses	N Total	Fêmeas (ovígeras)	Machos	Juvenis	Taxa infestação (%)
Out-2014	88	0	0	0	0,00
Nov-2014	70	0	0	0	0,00
Dez-2014	312	0	0	0	0,00

Jan-2015	227	0	1	4	2,20
Fev-2015	409	1	2	0	0,73
Mar-2015	510	0	3	0	0,59
Abr-2015	467	1	3	0	0,86
Mai-2015	532	2	4	0	1,13
Jun-2015	322	0	2	1	0,93
Jul-2015	335	3	2	2	2,09
Ago-2015	678	5 (2)	4	0	1,33
Set-2015	544	6 (1)	11	0	3,13
Out-2015	430	4	22	0	6,05
Nov-2015	281	0	0	5	1,78
Dez-2015	190	0	1	1	1,05
Jan-2016	180	5	5	0	5,56
Total	5.575	27 (3)	60	13	1,79

5. Discussão

Por meio das características ultraestruturais dos esporos e especificidade da área de infecção destes (i.e. músculo abdominal), somadas as modificações anatômicas e comportamentais dos animais infectados foi possível determinar que o organismo infectante do camarão *M. amazonicum* pertence ao gênero *Inodosporus* Overstreet & Weidner, 1974. Os gêneros de microsporídios que infectam músculos em camarões carídeos são: *Inodosporus*, *Pleistophora* Gurley, 1893, *Potaspora* Casal et al. 2008, *Thelohania* Henneguy, 1892 e *Vavraia* Weiser, 1977. Até o momento, relatos envolvendo microsporidioses em carídeos dulciaquícolas eram restritos ao gênero *Potaspora* (SPRAGUE et al., 1992; WANG et al., 2013; DING et al., 2016). Todavia, os esporos maduros verificados em *M. amazonicum* mostram três ou quatro projeções caudais filamentosas aderidas lateralmente à parede externa e não formam xenomas, pois se desenvolvem livremente nas fibras musculares. Além disso, quando encapsulados nas vesículas esporofíticas apresentam-se sempre em oito esporos. Estas características taxonômicas são exclusivas dos esporos com caudas do gênero *Inodosporus* (OVERSTREET e WEIDNER, 1974; AZEVEDO et al., 2000). Microsporídios com caudas possuem projeções filamentosas nos esporos. Estes canais de membranas têm função de adesão a substratos ou partículas, quando os esporos estão se movendo livremente na água (OVERSTREET e WEIDNER, 1974). Atualmente, duas espécies estão registradas no gênero: *I. spraguei* Overstreet & Weidner, 1974 e *I. octospora*

(Henneguy, 1892). Ambas as espécies possuem esporos elipsóides, iguais ao do organismo encontrado em *M. amazonicum*, porém possuem tamanhos diferentes, menor número de voltas no filamento polar (*I. spraguei*: 4 a 5, e *I. octospora*: 5 a 6) e infectam palaemonídeos estuarinos e marinhos europeus (SPRAGUE et al., 1992). As características divergentes podem indicar que o microsporídio que infecta *M. amazonicum* é uma nova espécie, porém para tal serão necessárias análises moleculares com base no sequenciamento do gene SSU rDNA.

A infestação de microsporídios promove a desorganização das fibras musculares em *M. amazonicum*, nos quais as massas de microsporídios alteram o padrão de ordenação do citoesqueleto. Esse padrão é similar ao observado em *Palaemon pugio* (Holthuis, 1949) por Street e Sprague (1974) e *P. serratus* (Pennant, 1777) por Azevedo et al. (2000) infectados por *Inodosporus* spp.. Dyková e Lom (2000) mostraram que microsporídios com o desenvolvimento sem formação de xenoma formam focos de infecção dentro das fibras musculares e induzem a desorganização do sarcoplasma. Esta característica foi constatada no presente estudo, além disso, infecções secundárias promovidas por colônias de bactérias também foram observadas nos tecidos musculares, ocasionando uma infecção mista em *M. amazonicum*. Existem poucos relatos de infecções mistas envolvendo microsporídios em crustáceos. Desta forma, sua causa, origem e mecanismos patológicos e fisiológicos ainda não são totalmente compreendidos. Até o momento, somente Stentiford e Bateman (2007) e Purivirojkul e Khidprasert (2009) observaram este tipo de infestação. Ao que parece, os microsporídios são os agentes causadores indiretos da mortalidade em crustáceos, sendo a letalidade da infecção promovida por bactérias (PURIVIROJKUL e KHIDPRASERT, 2009).

A propagação da microsporidiose em *M. amazonicum* não está relacionada à transmissão vertical, sendo a transmissão horizontal o principal mecanismo de propagação e transmissão determinado neste trabalho. A desorganização das fibras musculares promoveu a modificação do ângulo do abdome, afetando a natação e o mecanismo de escape dos animais infectados. Animais parasitados apresentando natação errática e dificuldade de locomoção e escape, provavelmente, são mais susceptíveis à predação (SIMON, 1983). Esta hipótese é reforçada, ao constatar a presença de massas de microsporídios junto a fragmentos corporais de *M. amazonicum* nos conteúdos estomacais do caracídeo *H. eques*. Isto indica que peixes podem participar ativamente no ciclo de propagação horizontal deste

microsporídeo. Segundo Ruehl-Fehlert et al. (2005), microsporídios podem ser transmitidos aos hospedeiros definitivos pela ingestão direta de esporos e/ou pela excreta contaminada com esporos. É possível que na área de estudo, algumas espécies de peixes atuem como hospedeiros intermediários e que sejam os vetores de dispersão dos esporos que infectam *M. amazonicum*. Além disso, a alteração colorimétrica nos camarões infectados por microsporídios pode ter auxiliado na predação por predadores visuais, os peixes. Comumente, palaemonídeos de pequeno porte que adotam a camuflagem como um tipo de defesa e/ou evitação da predação, tem coloração críptica (CARVALHO et al., 2006), ou seja, não possuem pigmentação em sua cutícula, como é o caso de *M. amazonicum*. Animais infectados por microsporídios possuíam colorações aberrantes e isso pode ter sido ocasionado por uma disfunção hormonal. O movimento de pigmentos em crustáceos é regulado pelo sistema endócrino e a mudança do padrão colorimétrico se deve ao aumento ou decréscimo de concentração de pigmentos e dos números de cromatóforos nos tecidos (AUERSWALD et al., 2008). Todavia, se faz necessário futuros estudos que comprovem esse mecanismo de dispersão e infecção.

A infecção causada por microsporídios no camarão *M. amazonicum* foi constatada em uma população selvagem e monitorada ao longo de 16 meses, apresentando baixas taxas de infestação. Comumente, os registros de microsporidioses em crustáceos são constatados em populações cultivadas, analisados em um curto período de tempo e apresentam altas proporções de infestação. Purivirojkul e Khidprasert (2009) registraram uma taxa de infestação de 50% no anostrácodo *Branchinella thailandensis* (Sanoamuang, Saengphan & Murugan, 2002), enquanto que Ding et al. (2016) estimaram uma taxa de 14% no camarão *M. nipponense*. Purivirojkul e Khidprasert (2009) sugerem que os altos valores de infestação em animais cultivados devem-se a autoinfecção em ambientes totalmente isolados (e.g. tanques) e a ausência de renovação da água contaminada por esporos. Desta forma, os baixos valores de infestação verificados no presente estudo podem estar associados à maior variabilidade dos aspectos físico-químicos da água ao longo do tempo e a menor possibilidade de autoinfecção em ambientes naturais.

Em conclusão, este é o primeiro registro de infecção por microsporídios na espécie *M. amazonicum* e mostra que as alterações morfológicas, natatorias e colorimétricas do hospedeiro são promovidas por esporos do gênero *Inodosporus* e

parecem facilitar a predação, levando a transmissão horizontal dos microsporídios por peixes. Este é o primeiro registro deste gênero nas Américas, além de ser a primeira descrição em uma espécie hololimnética. As informações aqui apresentadas elucidam a “doença do camarão colorido” e poderão ser utilizadas para o monitoramento de microsporidioses e na manutenção de plantéis e estoques afetados, assim como na escolha de medidas profiláticas e tratamentos a serem utilizados. Assim, possíveis perdas de produção de animais em cultivo devem levar em conta a investigação da presença de microsporídios. Futuros estudos envolvendo populações anfídromas de *M. amazonicum* ou espécies próximas dentro do gênero *Macrobrachium*, como por exemplo, *M. jelskii* (Miers, 1877) redescrita por Vera-Silva et al. (2017), poderão mostrar se esporos de *Inodosporus* infectam e comprometem outras populações e/ou espécies, uma vez que microsporídios comumente infectam espécies geneticamente próximas (WANG et al., 2013).

6. Referências

ANGER, K. Neotropical *Macrobrachium* (Caridea: Palaemonidae): on the biology, origin, and radiation of freshwater-invading shrimp. **Journal of Crustacean Biology**, vol. 33, n. 2, p. 151-183. 2013.

ARNOTT, S.A; NEIL, D.M.; ANSELL, A.D. Tail-flip mechanism and size-dependent kinematics of escape swimming in the brown shrimp *Crangon crangon*. **The Journal of Experimental Biology**, vol. 201, p. 1771–1784. 1998.

AUERSWALD, L. et al. Physiological and morphological colour change in Antarctic krill, *Euphausia superba*: a field study in the Lazarev Sea. **Journal of Experimental Biology**, vol. 211, n. 24, p. 3850-3858. 2008.

AZEVEDO, C. et al. Ultrastructure and phylogeny of *Glugea arabica* n. sp. (Microsporidia), infecting the marine fish *Epinephelus polyphemadion* from the Red Sea. **European Journal of Protistology**, vol. 52, p. 11-21. 2016.

AZEVEDO, C.; CORRAL, L.; VIVARÈS, C.P. Ultrastructure of the microsporidian *Inodosporus octospora* (Thelohaniidae), a parasite of the shrimp *Palaemon serratus* (Crustacea, Decapoda). **Diseases of Aquatic Organisms**, vol. 41, p. 151–158. 2000.

BAUER, R.T. **Remarkable shrimps. Adaptations and Natural History of the Carideans**. 1st ed. Oklahoma: University of Oklahoma Press, 2004, 282 p.

BEZNOUSSENKO, G.V. et al. Analogs of the Golgi complex in microsporidia: structure and vesicular mechanisms of function. **Journal of Cell Science**, vol. 120, n. 7, p. 1288-1298. 2007.

BRITSKI, H.A. **Peixes do Pantanal: manual de identificação**. 2 ed. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2007, 230 p.

CARVALHO, L.N.; ZUANON, J.; SAZIMA, I. The almost invisible league: crypsis and association between minute fishes and shrimps as a possible defence against visually hunting predators. **Neotropical Ichthyology**, vol. 4, n. 2, p. 219-224. 2006.

CODREANU, R. On the occurrence of spore or sporont appendages in the Microsporidia and their taxonomic significance. In: CORRADETTI, A. (Ed.), **Proceedings of 1st International Congress of Parasitology**. Nova York: Pergamon Press, 1966. p. 602–603.

DE GRAVE, S.; FRANSEN, C.H.J.M. Carideorum Catalogus: the recent species of the Dendrobranchiate, Stenopodidean, Procarididean and Caridean shrimps (Crustacea: Decapoda). **Zoologische Mededelingen**, vol. 85: 195-589. 2011.

DING, Z. et al. A new microsporidium, *Potaspora macrobrachium* n. sp. infecting the musculature of pond-reared oriental river prawn *Macrobrachium nipponense* (Decapoda: Palaemonidae). **Journal of Invertebrate Pathology**, vol. 136, p. 57–64. 2016.

DOLGIKH, V.V. et al. Immunolocalization of an alternative respiratory chain in *Antonosporea (Paranosema) locustae* spores: Mitosomes retain their role in microsporidial energy metabolism. **Eukaryotic Cell**, vol. 10, n. 4, p. 588-593. 2011.

DYKOVÁ, I.; LOM, J. Histopathology of *Kabatana arthuri* (Microspora) infection in sutchi catfish, *Pangasius sutchi*. **Folia Parasitologica**, vol.47, p. 161–166. 2000.

GARCIA, L.S. Laboratory identification of the microsporidia. **Journal of Clinical Microbiology**, vol. 40, n. 6, p. 1892-1901. 2002.

MACIEL, C.R.; VALENTI, W.C. Biology, fisheries, and aquaculture of the amazon river prawn *Macrobrachium amazonicum*: a review. **Nauplius**, vol.17, p. 61-79. 2009.

MORAES-VALENTI, P.M.; VALENTI, W.C. 2010. Culture of the Amazon River Prawn *Macrobrachium amazonicum*. In: NEW, M.B. et al. (Eds). **Freshwater prawns: biology and farming**. 1st ed. Oxford: Wiley-Blackwell, 2010. p. 485-501.

NEW, M.B. et al. **Freshwater prawns: biology and farming**, 1st ed. Oxford: Wiley-Blackwell, 2010, 544 p.

NOVAK, P. A. et al. Do upstream migrating, juvenile amphidromous shrimps, provide a marine subsidy to river ecosystems? **Freshwater Biology**, vol. 62, n. 5, p. 880-893. 2017.

OVERSTREET, R.M.; WEIDNER, E. Differentiation of microsporidian spore-tails in *Inodosporus spraguei* gen. et sp. n. **Zeitschrift für Parasitenkunde**, vol. 44, p. 169–186. 1974.

PASCHOAL, L.R.P.; ZARA, F.J. First record of intersexuality in the Amazon River shrimp *Macrobrachium amazonicum* (Heller, 1862) (Caridea: Palaemonidae). **Journal of Crustacean Biology**, vol. 37, n. 4, p. 507-511. 2017.

PETERSON, T.S. et al. Luna stain, an improved selective stain for detection of microsporidian spores in histologic sections. **Diseases of Aquatic Organisms**, vol. 95, p. 175-180. 2011.

PLANETA INVERTEBRADOS. **Macrobrachium amazonicum**. 2017. Disponível em: <http://www.planetainvertibrados.com.br/index.asp?pagina=especies_ver&id_categoria=24&id_subcategoria=19&com=1&id=88&local=2>. Acesso em: 12 abr. 17.

PURIVIROJKUL, W.; KHIDPRASERT, S. First report of microsporidiosis in fairy shrimp *Branchinella thailandensis* (Sanoamuang, Saengphan and Murugan, 2002). **Aquaculture**, vol. 289, p. 185–190. 2009.

RASBAND, W.S. **ImageJ: Image Processing and Analysis in Java. Version 1.5**. National Institutes of Health, Research Services Branch Bethesda. 2016. Disponível em: <<http://rsb.info.nih.gov/ij/docs/index.html>>. Acesso em: 12 abr. 2017.

RUEHL-FEHLERT, C. et al. *Pleistophora* infestation in fathead minnows, *Pimephales promelas* (Rafinesque). **Journal of Fish Diseases**, vol. 28, n. 11, p. 629-637. 2005.

SANDERS, et al. Verification of intraovum transmission of a microsporidium of vertebrates: *Pseudoloma neurophilia* infecting the zebrafish, *Danio rerio*. **PlosOne**, vol. 8, n. 9, p.1-9. 2013

SEAL, D.V. Antibiotic management of presumed microbial keratitis. **Hong Kong Journal of Ophthalmology**, vol. 1, n. 3, p. 129-138. 1997.

SIMON, N. **Predators and prey**. 1 st ed. London: Olympic Marketing Corp, 1985, 46 p.

SPRAGUE, V.; BECKNEL, J.J.; HAZARD, E.I. Taxonomy of the phylum Microspora. **Critical Reviews in Microbiology**, vol 18, p. 285–395. 1992.

SPRAGUE, V.; COUCH, J. An annotated list of protozoan parasites, hyperparasites, and commensals of decapod crustacean. **The Journal of Protozoology**, vol. 18, p. 526– 537. 1971.

STENTIFORD, G.D. et al. Microsporidia: diverse, dynamic, and emergent pathogens in aquatic systems. **Trends in Parasitology**, vol. 29, n. 11, p. 567-578. 2013.

STENTIFORD, G.D.; BATEMAN, K.S. *Enterospora* sp., an intranuclear microsporidian infection of hermit crab *Eupagurus bernhardus*. **Diseases of Aquatic Organisms**, vol. 75, n. 1, p. 73-78. 2007.

STREETS, D.A.; SPRAGUE, V. A new species of *Pleistophora* (Microsporida: Pleistophoridae) parasitic in the shrimp *Palaemonetes pugio*. **Journal of Invertebrate Pathology**, vol. 23, p. 153-156, 1974.

VERA-SILVA, A.L.; CARVALHO, F.L.; MANTELATTO, F.L. Redescription of the freshwater shrimp *Macrobrachium jelskii* (Miers, 1877) (Caridea, Palaemonidae). **Zootaxa**, vol. 4269, n.1, p. 44-60. 2017.

VERGAMINI, F.G.; PILEGGI, L.G.; MANTELATTO, F.L. Genetic variability of the Amazon River prawn *Macrobrachium amazonicum* (Decapoda, Caridea, Palaemonidae). **Contributions to Zoology**, vol. 80, p. 67-83. 2011.

WANG, T-C. et al. A new microsporidium, *Triwangia caridinae* gen. nov., sp. nov. parasitizing fresh water shrimp, *Caridina formosae* (Decapoda: Atyidae) in Taiwan. **Journal of Invertebrate Pathology**, vol. 112, n. 3, p. 281-293. 2013.

7. Material complementar

Apêndice I. Filmagem diurna. Animais infectados por microsporídios apresentam natação errática e evitam ficar agrupados a demais indivíduos saudáveis. Note as diferenças entre os ângulos abdominais entre animais saudáveis e doentes. Disponível em: <https://youtu.be/QsN5EGLc_FI>

Apêndice II. Filmagem diurna. Fêmea infectada de *M. amazonicum* com coloração mista apresentando ângulo abdominal muito menor quando comparado a animais saudáveis. Disponível em: <<https://youtu.be/s0LLIF3s8Cq>>

Apêndice III. Filmagem noturna. Animal infectado severamente comprometido próximo a um animal saudável. Disponível em: <<https://youtu.be/WICqjzq2PzE>>

Apêndice IV. Filmagem noturna. Animais infectados apresentam coloração aberrante e ângulo abdominal muito menor quando comparado a animais saudáveis. Disponível em: <<https://youtu.be/08A19RSvjXQ>>

Capítulo 12

Considerações finais

1. Biologia e ecologia de *M. amazonicum* em reservatórios neotropicais

Populações hololimnéticas dos reservatórios analisados apresentaram dois fenótipos, definidos pela proporção corporal e aquisição de armas sexuais: (a) animais de grande e (b) pequeno porte. Animais de grande porte mostraram quatro morfótipos bem definidos para machos: quela translúcida (TC), canela (CC), verde 1 (GC1) e 2 (GC2). Machos deste fenótipo destinam energia para o crescimento somático e desenvolvimento de quelípodos robustos. Enquanto que machos de pequeno porte não investem tanta energia neste processo e não possuem morfótipos. Assim como machos, fêmeas de grande porte investem energia para o desenvolvimento dos quelípodos, enquanto que fêmeas de pequeno porte otimizam energia para a produção de uma câmara incubadora maior. A maturidade sexual mostrou padrões similares entre fêmeas de diferentes fenótipos e foi distinta em machos, seguindo o esquema: ♀: fisiológica → funcional ≅ morfológica, ♂ grande porte: fisiológica → morfológica → funcional e ♂ pequeno porte: fisiológica = funcional → morfológica. Isso reflete o tipo de sistema de acasalamento adotado por cada fenótipo, a dominância de territórios em animais de grande porte e a busca ativa em animais de pequeno porte.

Populações de *M. amazonicum* em reservatórios neotropicais não apresentaram grandes diferenças em sua estrutura durante eventos de estresse hídrico ao longo do tempo. Isso mostra à grande resiliência e a capacidade de adaptação da espécie em novos ambientes. Em todas as populações, as fêmeas foram maiores que machos, sendo mais frequentes na população de CAS. Na população de SJB, os machos predominaram e nas demais populações não houve predominância de um dos sexos. A seca não alterou significativamente a dinâmica populacional e o recrutamento de juvenis em *M. amazonicum* nos reservatórios analisados. Fêmeas apresentaram padrão reprodutivo contínuo, com uma maior proporção de animais com ovários em estágios iniciais de desenvolvimento (I e II) ao longo do tempo. Estas mostraram posturas múltiplas e rápido ciclo de desenvolvimento ovariano. Em populações de pequeno porte, o aumento na proporção destas fêmeas foi correlacionado ao aumento da pluviosidade, enquanto que nas populações de grande porte foi associado ao aumento dos níveis da coluna de água. A presença de morfótipos em machos *M. amazonicum* está mais bem

correlacionada à abundância de fêmeas na população, e não está associada a aspectos ambientais e a predação por peixes.

Fêmeas de diferentes fenótipos de *M. amazonicum* apresentaram grande variabilidade nos quesitos reprodutivos. Fêmeas ovígeras de pequeno porte carregavam poucos ovos com grande volume, enquanto que fêmeas de grande porte tinham muitos ovos com volume menor. Em ambos os fenótipos, o fenômeno “El niño” não afetou de forma significativa os aspectos reprodutivos da espécie. Este atuou como um fator estressante para as populações da UHE’s analisadas, modificando os padrões reprodutivos em uma escala espaço-temporal. A flexibilidade reprodutiva apresentada pela espécie é uma resposta a este evento climático. Fêmeas ovígeras da população de pequeno porte foram mais abundantes em ambientes mais profundos com a presença de macrófitas, os quais são utilizados como refúgios. Por outro lado, as ovígeras das populações de maior porte foram mais encontradas em áreas rasas com sedimento arenoso que são utilizadas como abrigo e berçário.

2. Sistemas reprodutores, intersexualidade e padronização de métodos

Independentemente da história de vida e estratégia sexual adotada, todos os fenótipos de *M. amazonicum* mostraram padrão histoanatômico similar para seus sistemas reprodutores. O desenvolvimento ovariano é marcado por transformações colorimétricas e volumétricas, com cinco estágios definidos para fêmeas. O acúmulo progressivo de grânulos de vitelo promove estas transformações. Nesta espécie, a vitelogênese tem duas fases distintas, a endógena (estágios I e II) e exógena (estágios III a V). Na vitelogênese endógena, o retículo endoplasmático rugoso e o complexo de Golgi são responsáveis pela síntese de vitelo, enquanto que na vitelogênese exógena, as células foliculares passam a nutrir os ovócitos e o material extracelular é absorvido por vesículas endocíticas que serão liberadas no citoplasma. A partir do estágio III, com o começo da vitelogênese exógena, grandes inclusões de vitelo, ricas em lipídeos, polissacarídeos neutros e proteínas são incorporadas no citoplasma dos ovócitos e posteriormente irão preencher totalmente os ovócitos no estágio V (final), até estar prontos para a desova. Fêmeas de pequeno porte deslocam mais energia para formação de ovócitos/ovos maiores e para a produção de reservas lipídicas para larvas, enquanto que fêmeas de grande

porte anfídromas e hololimnéticas possuem um padrão mais próximo, com a produção de ovócitos/ovos menores.

Em machos com a presença de morfótipos, a produção e a concentração espermática foram similares entre estes, com exceção do morfótipo canela (CC). Neste morfótipo, os indivíduos possuem os túbulos seminíferos preenchidos por espermátocitos e mostram baixos valores de contagem espermática. O que indica um estado de diapausa reprodutiva no desenvolvimento sequencial de morfótipos em *M. amazonicum*. Nesta espécie, os vasos deferentes são divididos em três regiões: proximal, média e distal. Estas regiões não apresentam diferenças histológicas e histoquímicas entre si, havendo apenas o aumento da espessura do vaso em sentido distal. O fluido seminal de *M. amazonicum* é composto por três secreções de caráter glicolipoprotéico, com cada uma mostrando função específica na maturação, transporte e proteção dos espermatozoides. Machos de grande porte anfídromos e hololimnéticos investem energia na produção e desenvolvimento de armas sexuais robustas em detrimento de suas gônadas, diferentemente de machos de pequeno porte que adotam um padrão inverso. Em *M. amazonicum* foi possível observar um nítido “trade-off” entre o investimento gonadal e o armamento sexual em machos. Fêmeas e machos das populações de pequeno porte tendem a investir mais energia em quesitos reprodutivos, quando comparados a animais de grande porte anfídromos e hololimnéticos. Isso indica diferentes tipos de estratégia de reprodução, que irão refletir nos padrões populacionais.

A glândula androgênica em *M. amazonicum* mostrou padrão histoanatômico distinto entre morfótipos, sem diferenças entre os fenótipos anfídromos e hololimnéticos. Em morfótipos submissos (TC e CC) estas glândulas estão concentradas na ampola do ducto ejaculatório (ED) na região distal dos vasos deferentes (VD). Enquanto que em morfótipos dominantes (GC1 e GC2), estas são bem distribuídas na porção distal dos VD. As células destas glândulas são responsáveis por secretar um hormônio de origem protéica e apresentam dois estágios, que estão relacionadas ao seu padrão de secreção: (I) inicial e (II) final. Nos morfótipos submissos, as células do tipo I foram mais predominantes nas glândulas, enquanto que nos morfótipos dominantes, as células do tipo II foram mais recorrentes. Células em estágio I mostram o retículo endoplasmático rugoso (RER) com cisternas amplas e paralelas entre si, enquanto que no estágio II a dilatação do RER promove o deslocamento dos componentes celulares. As mesmas não

produzem grânulos de secreção. A secreção do hormônio provavelmente tem origem a partir da degeneração das células, com a emissão do conteúdo celular a hemolinfa. Somente no morfótipo intermediário CC ocorreu o decréscimo das áreas das glândulas androgênicas à medida que o animal crescia. Este padrão foi associado ao maior investimento reprodutivo observado neste morfótipo intermediário. Machos deste morfótipo tendem a acumular energia e espermátócitos para se tornar machos dominantes com uma grande quantidade de espermatozoides, o que justifica o decréscimo das glândulas.

Macrobrachium amazonicum é uma espécie gonocórica, apesar de ser registrada a intersexualidade na população de CAS. Este raro fenômeno foi associado à disrupção hormonal e/ou mutação genética, o que levou a baixa incidência de ocorrência na espécie (0,06%).

A padronização de métodos para a contagem espermática em machos e de avaliação dos índices gonadossomáticos e hepatossomáticos em fêmeas proporcionou melhores resultados ao presente trabalho, uma vez que evitaram vieses amostrais que existiam em outros métodos anteriormente empregados.

3. Microsporidiose em *M. amazonicum*

Alterações no comportamento natatório e na coloração de *M. amazonicum* foram registradas nos camarões da população de pequeno porte de SJB durante as coletas mensais. Posteriormente, foi verificado que essas alterações se deviam a uma infecção com origem nos músculos abdominais destes animais, a qual era promovida por microsporídios e bactérias. Este é o primeiro registro de infecção por microsporídios em palemonídeos na América e foi constatado nesta população selvagem. A “doença do camarão colorido” promoveu alterações nos padrões colorimétricos, na natação e no mecanismo de escape dos animais infectados, e tornaram os camarões mais susceptíveis à predação por predadores visuais. Foi verificado que esporos de microsporídios do gênero *Inodosporus*, se desenvolvem dentro das fibras musculares e induzem a desorganização do sarcoplasma. Em *M. amazonicum*, a transmissão destes esporos é por meio de via horizontal, enquanto que a transmissão vertical é ausente. Esporos de *Inodosporus* apresentaram características divergentes de outras espécies do gênero, o que indica que o microsporídio que infecta *M. amazonicum* é uma nova espécie.

Material complementar

I - Dispositivo de contenção para realização de teste de ecotoxicidade em ambiente aquático

Patente: Modelo de Utilidade

Número do registro: BR 20 2016 020098 4

INPI - Instituto Nacional da Propriedade Industrial

Dispositivo de contenção para realização de teste de ecotoxicidade em ambiente aquático

[01] O presente modelo de utilidade descreve um dispositivo de contenção para realização de teste de ecotoxicidade *in situ* em ambiente aquático, permitindo a padronização metodológica e a aplicabilidade a ecossistemas aquáticos (lênticos e lóticos) e vários grupos de animais, tendo um formato hexaédrico que permite a ancoragem das bases em qualquer superfície, além do maior contato direto com o sedimento e/ou contaminante, bem como apresentando um fecho que evita o escape dos organismos testes e o comprometimento do teste a qualquer intempérie.

[02] Para avaliar os efeitos adversos de um agente tóxico nos organismos vivos sob condições padronizadas, de maneira a permitir comparações com outras substâncias e espécies testadas, são realizados os testes de toxicidade. Toxicidade é uma propriedade relativa de uma substância química que se refere ao seu potencial de causar danos aos organismos vivos e é uma função da concentração da substância química e da duração da exposição (RAND, G.M.; PETROCELLI, S.R. Introduction. In: RAND, G.M.; PETROCELLI, S.R. (Eds.). **Fundamentals of aquatic toxicology: methods and applications**, Nova York: Hemisphere, 1985, p.1-28).

[03] A presença de componentes tóxicos e/ou poluentes em ambientes aquáticos pode ser detectada por meio de análises físico-químicas de amostras abióticas do próprio ambiente ou por maior dos efeitos deletérios teciduais observados em organismos. No entanto, muitas vezes é impossível ou inviável detectar todas as substâncias presentes em amostras de água e sedimentos de ambientes poluídos, fazendo com que a utilização de sistemas biológicos seja uma alternativa mais prática e viável (PETTS, G.; CALOW, P. **River Restoration**. Oxford: Blackwell Science, 1996, 231p.; HOFFMAN, D.J. et al. Ecotoxicology. In: DERELANKO, M.J.; HOLLINGER, M.A. (Eds). **Handbook of toxicology**. Boca Raton: Lewis Publishers, 2002. p. 872-917).

[04] Testes de ecotoxicidade são componentes primordiais em estudos de avaliação de impactos em ecossistemas aquáticos, sendo que órgãos ambientais competentes determinam quais atividades e empreendimentos deverão realizar tais procedimentos. Tais testes podem avaliar tanto os efeitos crônicos (exposição prolongada e repetida a certo agente tóxico), quanto os agudos (exposição a um xenobiótico por um curto período de tempo, ou seja, horas ou dias) em laboratório,

sob condições e ambientes controlados (HOFFMAN, D.J. et al. Ecotoxicology. In: DERELANKO, M.J.; HOLLINGER, M.A. (Eds). **Handbook of toxicology**. Boca Raton: Lewis Publishers, 2002. p. 872-917; BRASIL. MINISTERIO DO MEIO AMBIENTE. CONSELHO NACIONAL DO MEIO AMBIENTE - CONAMA. Resoluções do Conama: Resoluções vigentes publicadas entre setembro de 1984 e janeiro de 2012. Brasília, 2012. 1126 p.).

[05] Entretanto, muitas vezes os testes laboratoriais são dispendiosos e complexos, além de não apresentarem exposições realísticas aos contaminantes e suas interações dentro de um determinado ecossistema aquático (influência da temperatura e suspensão de partículas sólidas na coluna d'água).

[06] Uma das alternativas de viabilizar estes testes de ecotoxicidade de forma comercial, econômica e científica são os testes agudos *in situ* (mais rápidos, com menor esforço laboral). Neste procedimento simples, organismos são expostos aos agentes tóxicos sob condições reais, ficando confinados em dispositivos de contenção para testes de toxicidade mergulhados nos ambientes aquáticos a serem avaliados, por um período de 96 horas (BURTON, G.A., Jr. **Sediment Toxicity Assessment**. Florida: Lewis Publishers. 1992; HOFFMAN, D.J et al. Ecotoxicology. In: DERELANKO, M.J.; HOLLINGER, M.A. (Eds). **Handbook of toxicology**. Boca Raton: Lewis Publishers, 2002. p. 872-917; MELETTI, P.C.; ROCHA, O. Development of a chamber for *in situ* toxicity tests with small fishes. **Brazilian Journal of Biology**, vol. 62, p. 187-190. 2002).

[07] O estado da técnica descreve dispositivos de contenção para realização de testes de toxicidade *in situ*, tal como o equipamento desenvolvido por Melletti e Rocha (MELETTI, P.C.; ROCHA, O. Development of a chamber for *in situ* toxicity tests with small fishes. **Brazilian Journal of Biology**, vol. 62, p. 187-190. 2002), apresentado na figura 4, que compreende uma câmara-teste específica para peixes de pequeno porte. Esse equipamento possui basicamente duas estruturas: uma área central, denominada de corpo da câmara, onde os peixes são mantidos, e uma base para manter o equilíbrio e fixar a câmara no substrato. O corpo da câmara e sua tampa são confeccionados com tubos de material polimérico (PVC), unidos à base por meio de rebites e parafusos. Somente a base inferior da câmara fica em contato com o sedimento e é protegida por uma tela de nylon (com malha de 2 mm), enquanto que nas laterais da câmara são previstas aberturas menores

diametralmente opostas protegidas por telas de nylon coladas à parede, permitindo a renovação da água dentro da câmara.

[08] Entretanto, estes dispositivos de contenção se prestam para peixes de pequeno porte, apresentando problemas estruturais em virtude do formato (que limita a área de contato do dispositivo de contenção com o sedimento e/ou contaminante) e uma ou mais entradas diminutas que não são eficientes em ambientes com sedimento de frações granulométricas maiores que o convencional. Ainda, podem provocar o escape de organismos-teste, comprometendo a viabilidade dos testes e podendo trazer problemas para todo o ecossistema (MELETTI, P.C. **Avaliação da degradação ambiental por meio de testes de toxicidade com sedimento e de análises histopatológicas em peixes.** 231 f. Tese de Doutorado (Doutorado em Ciências da Engenharia Ambiental). Universidade Federal de São Carlos - UFSCar, São Carlos, 2003).

[09] Adicionalmente, um dos fatores que interfere no resultado do teste de toxicidade *in situ* é o tipo de material usado para realizar as junções dos componentes do dispositivo de contenção, geralmente utilizando colas/epóxi que podem provocar efeitos tóxicos nos organismos testados, comprometendo o teste (MELETTI, P.C.; ROCHA, O. Development of a chamber for *in situ* toxicity tests with small fishes. **Brazilian Journal of Biology**, vol. 62, p. 187-190. 2002).

[010] Dessa forma, devido a necessidade de realizar testes de toxicidade *in situ*, utilizando um dispositivo eficiente na contenção dos organismos-teste e que permita conter a maior quantidade de organismos bioindicadores possíveis (tal como crustáceos, moluscos e insetos), é objeto do presente modelo de utilidade um dispositivo de contenção para realização de teste de ecotoxicidade em ambiente aquático de formato hexaédrico, que permite a ancoragem das bases em qualquer superfície, além de promover maior contato direto com o sedimento e/ou contaminante, bem como apresentando um fecho que evita o escape dos organismos testes.

[011] O modelo de utilidade descreve um dispositivo de contenção para realização de teste de ecotoxicidade em ambiente aquático que permite a padronização metodológica de testes de ecotoxicidade *in situ*, além de generalizar sua aplicabilidade a ecossistemas aquáticos (lênticos e lóticos) e vários grupos de animais.

[012] O modelo de utilidade descreve um dispositivo de contenção para realização de teste de ecotoxicidade em ambiente aquático de característica portátil e de fácil montagem, que não necessita de profissionais especializados para aplicação do dispositivo em campo.

[013] O modelo de utilidade descreve um dispositivo de contenção para realização de teste de ecotoxicidade em ambiente aquático que provê maior contato com o sedimento e contaminantes devido ao formato hexaédrico.

[014] O modelo de utilidade descreve um dispositivo de contenção para realização de teste de ecotoxicidade em ambiente aquático com maior resistência a impactos e correntes de água.

[015] O modelo de utilidade descreve um dispositivo de contenção para realização de teste de ecotoxicidade em ambiente aquático que elimina o uso de produtos tóxicos na fabricação do dispositivo que pode comprometer os resultados do teste.

[016] O modelo de utilidade descreve um dispositivo de contenção para realização de teste de ecotoxicidade em ambiente aquático que proporciona um contato constante com o sedimento, uma vez que equipamentos com apenas uma ou mais entradas diminutas não são tão eficientes em ambientes com sedimento de frações granulométricas maiores.

[017] A fim de melhor descrever as características técnicas do dispositivo de contenção para realização de teste de ecotoxicidade em ambiente aquático, são apresentadas as figuras a seguir relacionadas:

[018] A figura 1 apresenta a vista em perspectiva.

[019] A figura 2 apresenta a vista explodida da estrutura tubular.

[020] A figura 3 apresenta detalhamento do posicionamento das malhas interna e externa na estrutura tubular.

[021] A figura 4 apresenta a vista explodida do dispositivo de contenção do estado da técnica desenvolvido por Melletti e Rocha.

[022] O dispositivo de contenção para realização de teste de ecotoxicidade em ambiente aquático, objeto do presente modelo de utilidade, compreende uma estrutura tubular de formato hexaédrico (10) que conforma uma câmara interna adequada para a contenção de animais de pequeno porte utilizados em testes de ecotoxicidade in situ para ecossistemas aquáticos (lênticos e/ou lóticos) e testes laboratoriais.

[023] Pelo menos uma das faces da estrutura hexaédrica (10) apresenta uma abertura protegida por uma tampa (11) solidarizada à estrutura tubular (10) por meios de fixação removíveis (111), tal como parafusos e porcas tipo borboleta.

[024] A estrutura hexaédrica (10) e a tampa (11) são revestidas com uma malha externa (20) e uma malha interna (30), ditas malhas (20) e (30) fixadas à estrutura tubular (10) por meio de costura utilizando fio de nylon, evitando o efeito tóxico gerado pela colagem uma vez que, convencionalmente, os dispositivos de contenção fazem uso de colas/epóxi que podem provocar efeitos tóxicos nos organismos testados, comprometendo o teste. De acordo com Meletti e Rocha (MELETTI, P.C.; ROCHA, O. Development of a chamber for *in situ* toxicity tests with small fishes. **Brazilian Journal of Biology**, vol. 62, p. 187-190. 2002), o sucesso do teste está relacionado a vários fatores, sendo um dos fatores determinantes o tipo de material usado para realizar as junções dos componentes do equipamento.

[025] A malha externa (20) é rígida e apresenta aberturas maiores que as aberturas da malha interna flexível (30), de forma que a malha externa (20) protege os animais contidos na câmara do dispositivo do ataque de organismos externos (tal como predadores), e a malha interna (30) mantém os organismos teste contidos na câmara da estrutura hexaédrica (10).

[026] Preferentemente, a malha externa (20) é de aço galvanizado revestido com material polimérico, PVC).

[027] Preferentemente a malha interna (30) é de poliéster.

[028] Na estrutura tubular (10) é acoplado um cabo de aço (40) para ancoragem do dispositivo de contenção, caso necessário.

[029] Inicialmente, testes laboratoriais foram realizados com *Macrobrachium amazonicum* (Crustacea: Decapoda) de pequeno (N: 30, Comprimento de carapaça (CC): 9.44 ± 0.48 mm) e grande porte (N: 10, CC: 19.83 ± 1.57 mm). Os camarões foram acondicionados nos dispositivos de contenção e mantidos por 30 dias dentro de aquários para verificar a eficácia desses dispositivos. No primeiro teste foi constatado, após 30 dias em laboratório, que os dispositivos de contenção portátil para testes de ecotoxicidade *in situ* não interferiram na sobrevivência de *M. amazonicum*.

[030] Posteriormente, indivíduos de ambas as populações foram mantidos por um período de 96 horas em áreas de rápidos e remansos, dentro dos dispositivos de

contenção mergulhados no corpo d'água. Não foi constatada mortalidade e escape dos espécimes durante os monitoramentos diários em campo.

[031] Foram realizados testes de toxicidade aguda utilizando como organismos-testes as espécies: *Corbicula fluminea* (Mollusca: Bivalvia) (N: 30); *Macrobrachium amazonicum* (Crustacea: Decapoda) (N: 30); ninfas de Libellulidae (Insecta: Odonata) (N: 15) e *Trycomicterus* sp. (Siluriformes: Trichomycteridae) (N: 10). Não foi observado escape e morte de nenhum dos indivíduos testados durante o período de 96 horas.

[032] O dispositivo objeto do presente modelo de utilidade possibilita a entrada de organismos, como invertebrados aquáticos e algas filamentosas, proporcionando interação entre os indivíduos testados com os do ambiente, sendo possível que os organismos-testes possam utilizá-los como recurso alimentar.

[033] O dispositivo pode ter suas dimensões modificadas e suas malhas interna e externa adaptadas para atender demandas de testes com organismos maiores (e.g. peixes de grande porte) ou menores (e.g. larvas de insetos).

REIVINDICAÇÃO:

1. DISPOSITIVO DE CONTENÇÃO PARA REALIZAÇÃO DE TESTE DE ECOTOXICIDADE EM AMBIENTE AQUÁTICO dotado de um cabo de aço (40) para ancoragem, **caracterizado por** compreender uma estrutura tubular de formato hexaédrico (10) tendo pelo menos uma das faces provida de uma abertura protegida por uma tampa (11) solidarizada à estrutura tubular (10) por meios de fixação removíveis (111), dita estrutura hexaédrica (10) e a tampa (11) revestidas com uma malha externa rígida (20) que apresenta aberturas maiores que as aberturas da malha interna flexível (30), ditas malhas (20) e (30) fixadas à estrutura tubular (10) por meio de costura utilizando fio de nylon.

RESUMO
DISPOSITIVO DE CONTENÇÃO PARA REALIZAÇÃO DE TESTE DE
ECOTOXICIDADE EM AMBIENTE AQUÁTICO

É descrito um modelo de utilidade de dispositivo de contenção para realização de teste de ecotoxicidade *in situ* em ambiente aquático, permitindo a padronização metodológica e a aplicabilidade a ecossistemas aquáticos (lênticos e lóticos) e vários grupos de animais, tendo um formato hexaédrico (10) que permite a ancoragem das bases em qualquer superfície, além do maior contato direto com o sedimento e/ou contaminante, bem como apresentando um fecho que evita o escape dos organismos testes e o comprometimento do teste a qualquer intempérie.

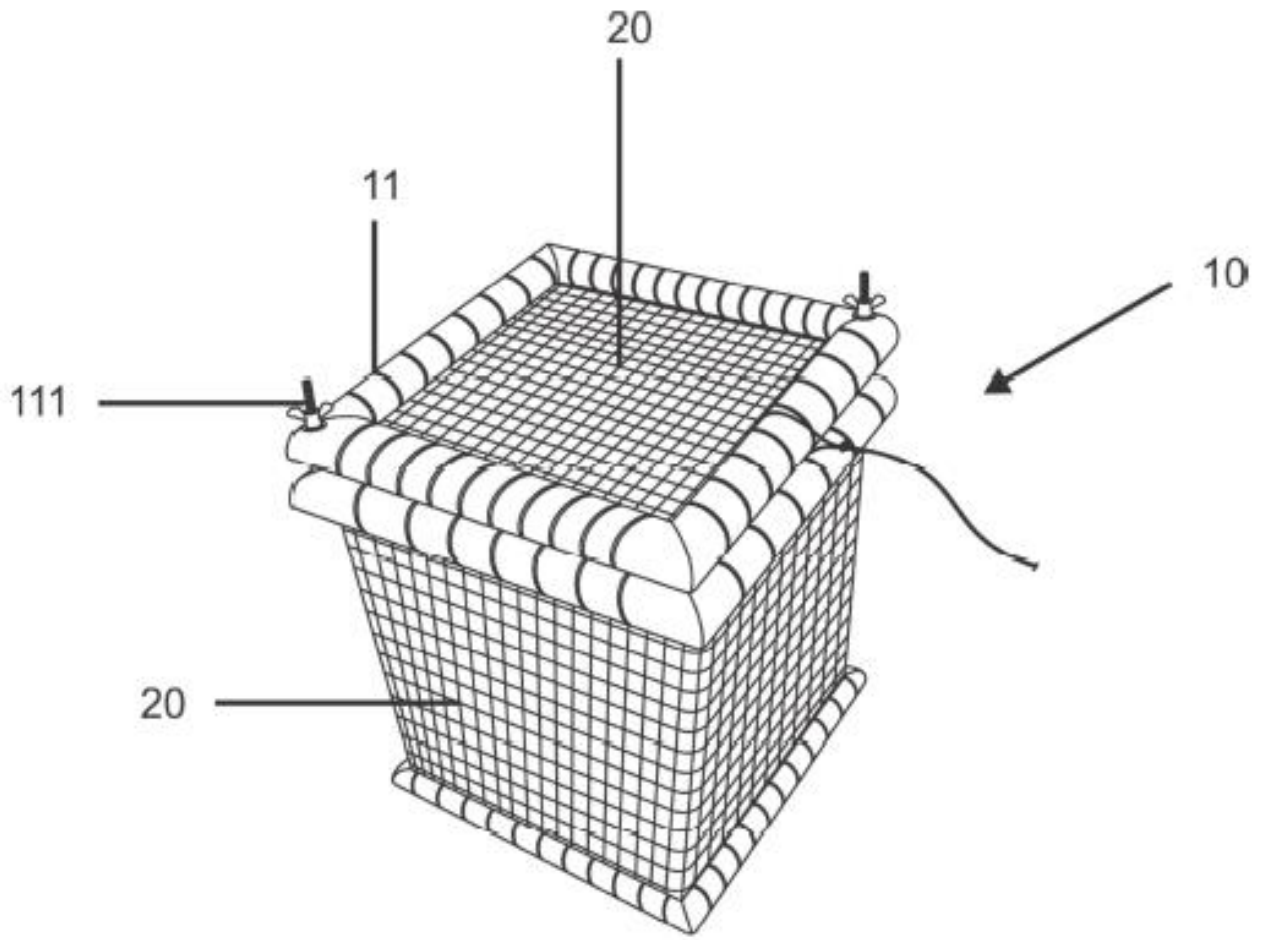


Fig. 1

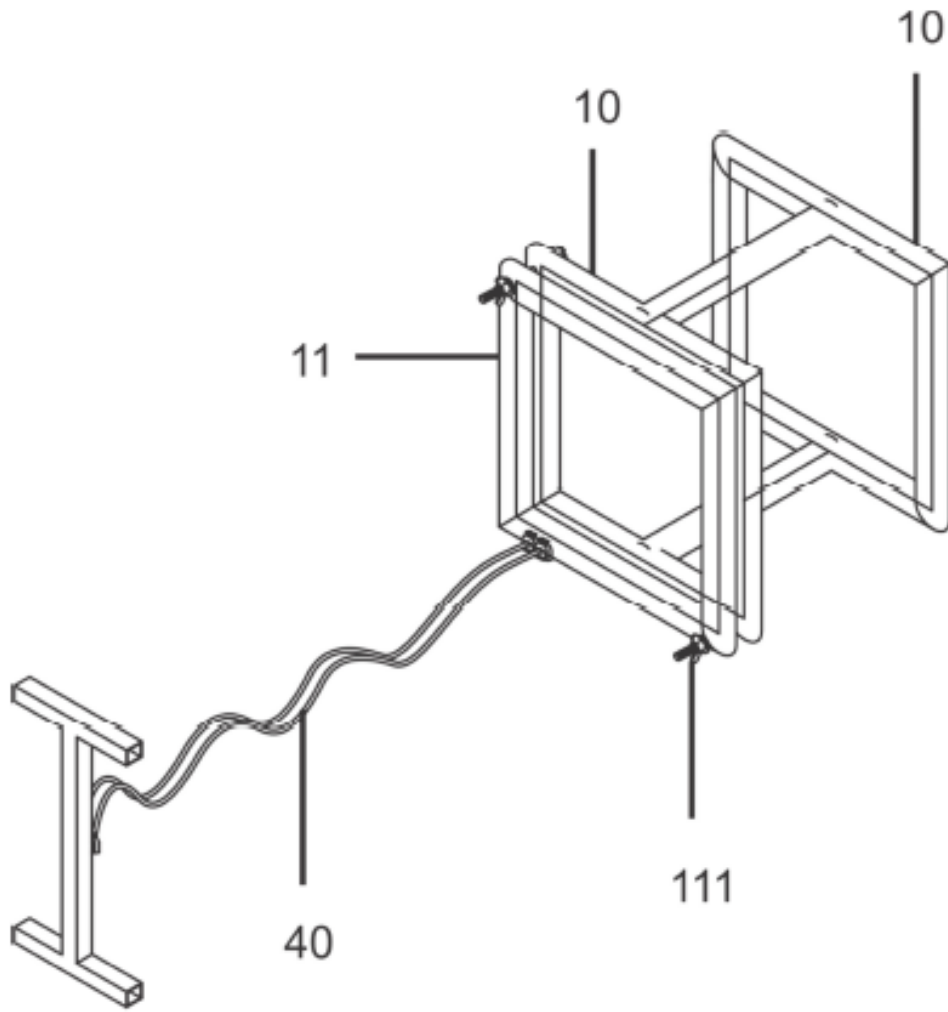


Fig. 2

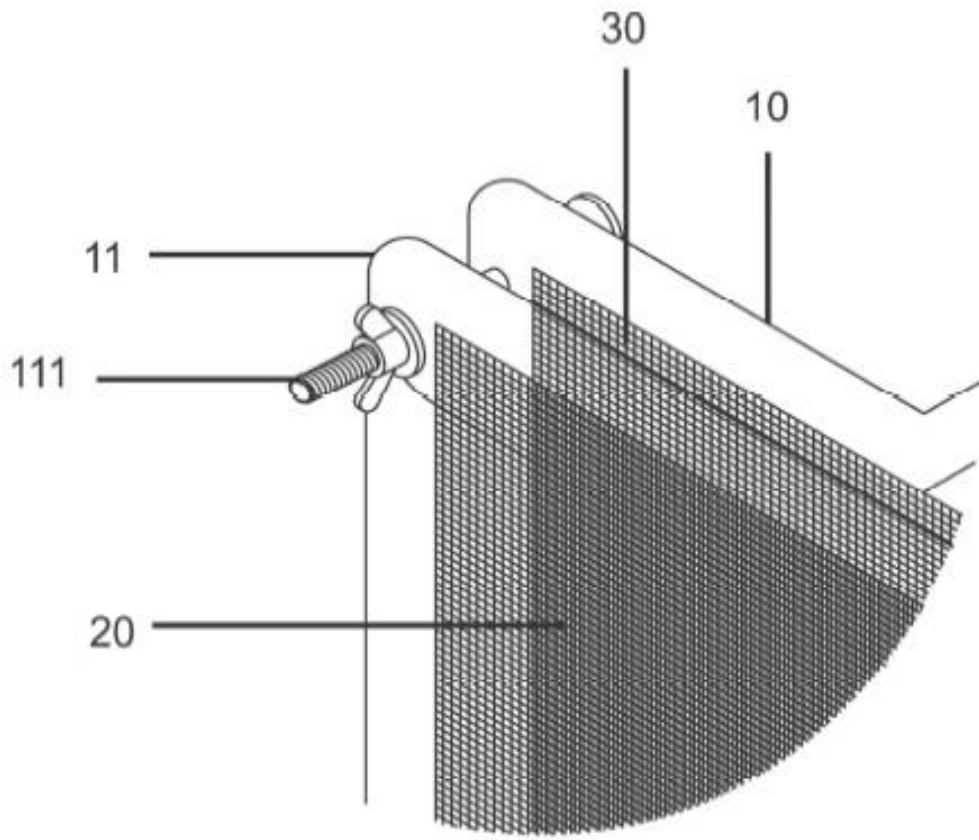


Fig. 3

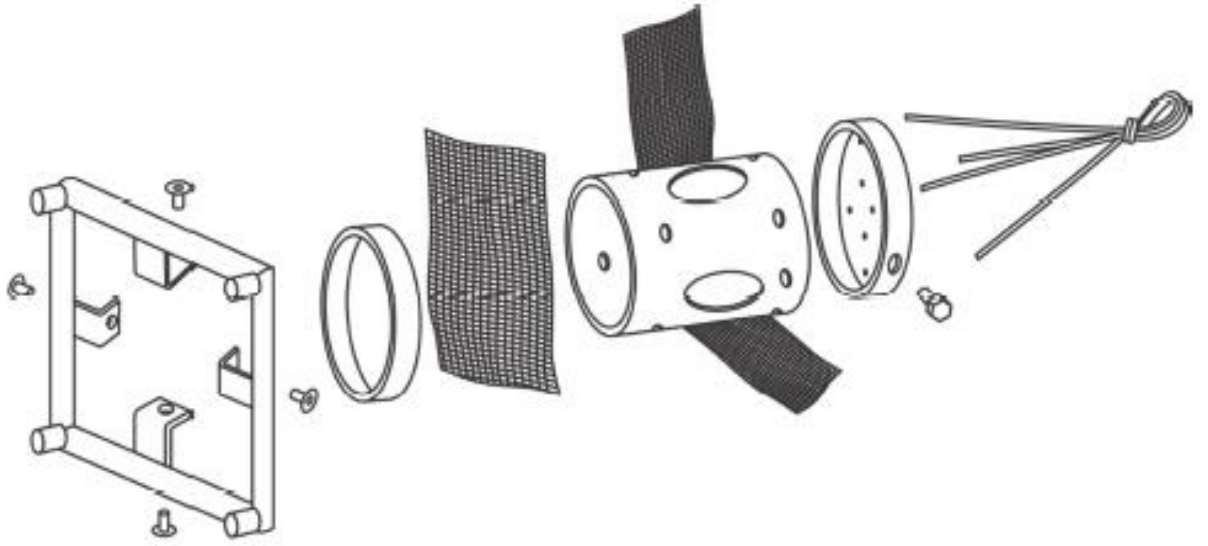


Fig. 4

Material complementar

II - Estrutura modular para captura e contenção de crustáceos

Patente: Modelo de Utilidade. Em análise final.

INPI - Instituto Nacional da Propriedade Industrial

Estrutura modular para captura e contenção de crustáceos

[01] O presente modelo de utilidade descreve uma estrutura modular para captura e contenção de crustáceos. Mais especificamente compreende uma estrutura modular que, na condição de captura de crustáceos, apresenta extremidades providas de funis com abertura interna de tamanho ajustável, permitindo uma maior seletividade durante a captura e, na condição de contenção pós-captura, apresentando tampas que vedam as aberturas extremas, em substituição aos funis.

[02] Os métodos de amostragem de peixes e crustáceos são separados, segundo a participação do operador, em ativos e passivos (NIELSEN, L.A.; JOHNSON, D.L. **Fisheries Techniques**. Blacksburg, Virginia: Southern Printing Company, 1983, 468p.). A amostragem passiva é realizada utilizando-se dispositivos sem a intervenção direta do coletor, causando uma menor perturbação ao ambiente, contrariamente ao método ativo, que consiste na captura utilizando-se petrechos que perturbam o ambiente, seja pela movimentação dos coletores ou pela alteração de micro habitats (RIBEIRO, O.M.; ZUANON, J. Comparação da eficiência de dois métodos de coleta de peixes em igarapés de terra firme da Amazônia Central. **Acta Amazônica**, vol. 36, n. 3, p. 389-394. 2006.).

[03] Dentre os métodos passivos existentes, o encarceramento consiste em dispositivos de armadilha que capturam os organismos que entram em uma área delimitada através de um ou mais funis – ou aberturas em forma de “V”, e que, uma vez ingressando, não conseguem encontrar um caminho para escape (HUBERT, W.A. 1996. Passive capture techniques. In: MURPHY, B.R.; WILLIS, D.W. (Eds.) **Fisheries techniques**. 2nd ed. Bethesda, Maryland: American Fisheries Society. p. 157-181).

[04] A ordem Decapoda, que constitui a maior ordem dos crustáceos, compreende os camarões, lagostins, lagostas e caranguejos (RUPPERT, E.E.; BARNES, R.D. **Zoologia dos Invertebrados**. 6 ed. São Paulo: Ed. Roca, 1996, 1029 p.).

[05] As amostragens de crustáceos aquáticos geralmente são realizadas por meio de um puçá, uma rede de piscina com abertura ovalada e saco feito com tela de náilon com 2 mm de intervalo entre nós adjacentes. Alternativamente, são utilizadas garrafas PET onde o gargalo é invertido, funcionando como um funil por onde ingressa o crustáceo em direção ao interior da garrafa, onde fica aprisionado. No

entanto, armadilhas de garrafas PET são voltadas à obtenção de iscas de pequeno porte, uma vez que essas garrafas possuem pequeno espaço de contenção e não permitem a regulagem da abertura dos funis extremos, afora o fato de terem baixa durabilidade e podendo poluir ambientes aquáticos quando perdidas ou descartadas.

[06] As vantagens da utilização de armadilhas são a facilidade de confecção, de operação e de uso, permitindo a utilização manual sem requerimento de máquinas e muito treino (HUBERT, W.A. 1996. Passive capture techniques. In: MURPHY, B.R.; WILLIS, D.W. (Eds.) **Fisheries techniques**. 2nd ed. Bethesda, Maryland: American Fisheries Society. p. 157-181), baixo custo operacional, além de permitir o seu uso mesmo em condições climáticas desfavoráveis, uma vez que podem permanecer instaladas no meio por prolongados períodos (ATAR, H.H. et al. Comparison of three different traps for catching blue crab (*Callinectes sapidus* Rathbun, 1896) in Beymelek Lagoon. **Turkish Journal of Veterinary and Animal**, vol. 26, n. 1, p. 1145-1150. 2002.). Outra vantagem da utilização desse método é que os animais ficam vivos, portanto, indivíduos juvenis e fêmeas ovígeras podem ser devolvidos logo após a captura (ATAR, H.H. et al. Comparison of three different traps for catching blue crab (*Callinectes sapidus* Rathbun, 1896) in Beymelek Lagoon. **Turkish Journal of Veterinary and Animal**, vol. 26, n. 1, p. 1145-1150. 2002.).

[07] O documento KR20000021653 descreve um equipamento de captura de seres aquáticos dotado de ganchos e redes.

[08] O documento BRPI0701491 descreve uma armadilha para captura de camarões que utiliza garrafas PET.

[09] Ainda que o estado da técnica descreva armadilhas para crustáceos, é verificado que as mesmas são produzidas de forma artesanal e apresentam dificuldades no que diz respeito à captura, contenção e manejo dos animais coletados, impedindo a padronização metodológica do equipamento e sua aplicabilidade em qualquer tipo de ecossistema aquático.

[010] Dessa forma, é objeto do presente modelo de utilidade uma estrutura modular que, na condição de captura de crustáceos, apresenta extremidades providas de funis com diâmetro ajustável, permitindo uma maior seletividade durante a pesca, capturando apenas animais com tamanho próximo ao diâmetro da abertura dos funis e, na condição de contenção pós-captura, apresentando tampas que vedam as aberturas extremas, em substituição aos funis utilizados para a captura.

[011] A fim de melhor descrever a estrutura modular para captura e contenção de crustáceos, são apresentadas as figuras a seguir discriminadas:

[012] A figura 1A apresenta a vista em perspectiva da estrutura modular com os funis dispostos nas extremidades para a captura de crustáceos, a figura 1B apresenta a vista explodida e a figura 1C apresenta a vista lateral.

[013] A figura 2A apresenta a vista em perspectiva da estrutura modular com as tampas dispostas nas extremidades, em substituição aos funis, para a contenção dos crustáceos e a figura 2B apresenta a vista lateral.

[014] A estrutura modular para captura e contenção de crustáceos, objeto do presente modelo de utilidade, compreende uma estrutura tubular prismática com extremidades vazadas limitadas por uma moldura quadrangular (10) e pelo menos uma moldura quadrangular (11) na porção intermediária da estrutura tubular, ditas molduras (10) e (11) interligadas entre si por um segmento (12) fixado nos vértices das molduras quadrangulares (10) e (11).

[015] A estrutura tubular prismática apresenta superfície externa revestida com uma malha de abertura entre 10 a 15 mm (20) de fios de aço galvanizado revestido com um material polimérico (preferentemente policloreto de vinila (PVC)), impedindo o contato com organismos externos (tal como predadores).

[016] A superfície interna da estrutura tubular é revestida com uma malha de abertura de 1 a 3 mm (21), preferentemente de poliéster revestido com PVC, a fim de evitar o escape dos crustáceos que se encontram na região interna da estrutura tubular.

[017] A estrutura tubular é immobilizada no curso de água através de um cabo com ancoragem (100).

[018] Para a captura dos crustáceos, na moldura quadrangular extrema (10) da estrutura tubular é fixada uma estrutura em formato de funil provida de abertura de maior medida (30) coincidente com a região vazada da moldura quadrangular extrema (10) e abertura de menor medida (31) posicionada na região interna da estrutura tubular, na proximidade da moldura quadrangular intermediária (11), conformando uma zona central de contenção de crustáceos (zccc).

[019] A abertura de menor medida (31) da estrutura em forma de funil é ajustada, a fim de selecionar as espécies a serem capturadas.

[020] A estrutura em forma de funil é revestida com malha de poliéster com

abertura de 1 a 3 mm revestida com PVC (32).

[021] O crustáceo ingressa pela abertura de maior medida (30) da estrutura em forma de funil, sendo direcionado à abertura de menor medida (31) e ficando contido na região central da estrutura tubular (zccc).

[022] Uma vez capturado o crustáceo, as estruturas em forma de funil são retiradas da estrutura tubular, sendo fixadas tampas (40) nas molduras quadrangulares extremas (10), provendo um dispositivo de contenção e manejo pós-captura, conforme apresentado nas figuras 2A e 2B.

[023] As tampas (40) apresentam uma moldura rígida com revestimento externo com uma malha de abertura entre 10 a 15 mm de fios de aço galvanizado revestido com um material polimérico (preferentemente policloreto de vinila (PVC)), e revestimento interno com uma malha de abertura de 1 a 3 mm.

REIVINDICAÇÃO:

1. ESTRUTURA MODULAR PARA CAPTURA E CONTENÇÃO DE CRUSTÁCEOS que compreende uma estrutura tubular prismática imobilizada no curso de água através de um cabo com ancoragem (100), dita estrutura prismática com extremidades vazadas limitadas por uma moldura quadrangular (10) e pelo menos uma moldura quadrangular (11) na porção intermediária da estrutura tubular, ditas molduras (10) e (11) interligadas entre si por um segmento (12) fixado nos vértices das molduras quadrangulares (10) e (11), caracterizado por apresentar:
 - a) estrutura tubular prismática com superfície externa revestida com uma malha de abertura entre 10 a 15 mm (20) de fios de aço galvanizado revestido com um material polimérico e superfície interna revestida com uma malha de abertura de 1 a 3 mm.;
 - b) uma estrutura em formato de funil fixada na moldura quadrangular extrema (10), dita estrutura em formato de funil provida de abertura de maior medida (30) coincidente com a região vazada da moldura quadrangular extrema (10) e abertura de menor medida ajustável (31) posicionada na região interna da estrutura tubular, na proximidade da moldura quadrangular intermediária (11), conformando uma zona central de contenção de crustáceos (zccc), dita estrutura em forma de funil revestida com malha de poliéster com abertura de 1 a 3 mm;
 - c) uma tampa (40) fixada na moldura quadrangular extrema (10) dotada de uma moldura rígida com revestimento externo com uma malha de abertura entre 10 a 15 mm de fios de aço galvanizado revestido com um material polimérico e revestimento interno com uma malha de abertura de 1 a 3 mm.

RESUMO

ESTRUTURA MODULAR PARA CAPTURA E CONTENÇÃO DE CRUSTÁCEOS

É descrita a patente de modelo de utilidade de uma estrutura modular para captura e contenção de crustáceos de forma prismática com extremidades vazadas limitadas por uma moldura quadrangular (10) e pelo menos uma moldura quadrangular (11) na porção intermediária, com superfície externa revestida com uma malha de abertura entre 10 a 15 mm (20) de fios de aço galvanizado revestido com um material polimérico (preferentemente policloreto de vinila (PVC)), impedindo o contato com organismos externos (tal como predadores) e superfície interna revestida com uma malha de abertura de 1 a 3 mm (21), apresentando nas extremidades a disposição de estruturas em forma de funil com abertura interna ajustável (31), permitindo uma maior seletividade durante a captura, e tampas (40) que vedam as aberturas extremas, em substituição aos funis, na condição de contenção pós-captura.

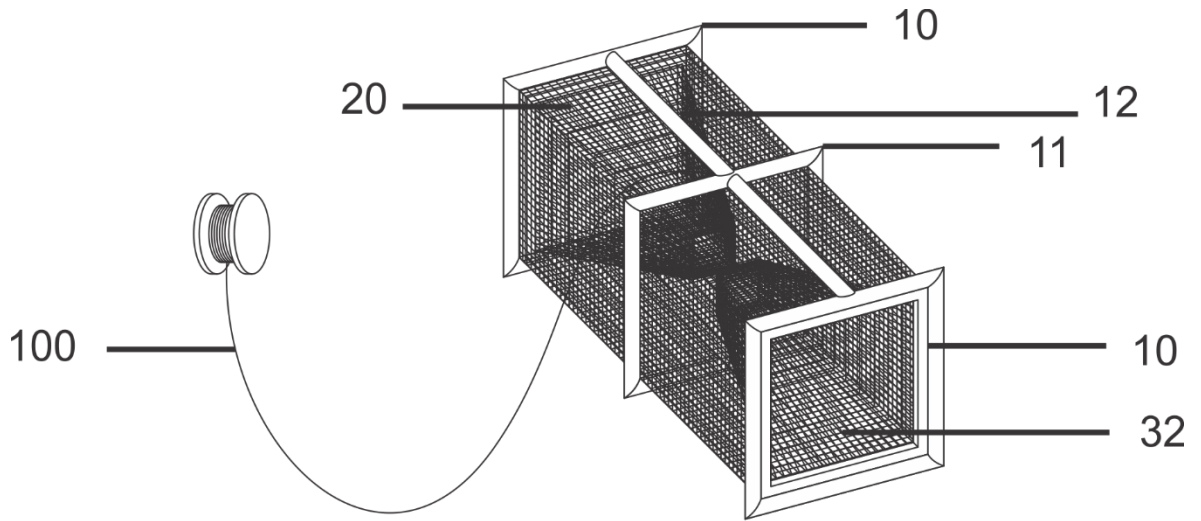


Fig. 1A

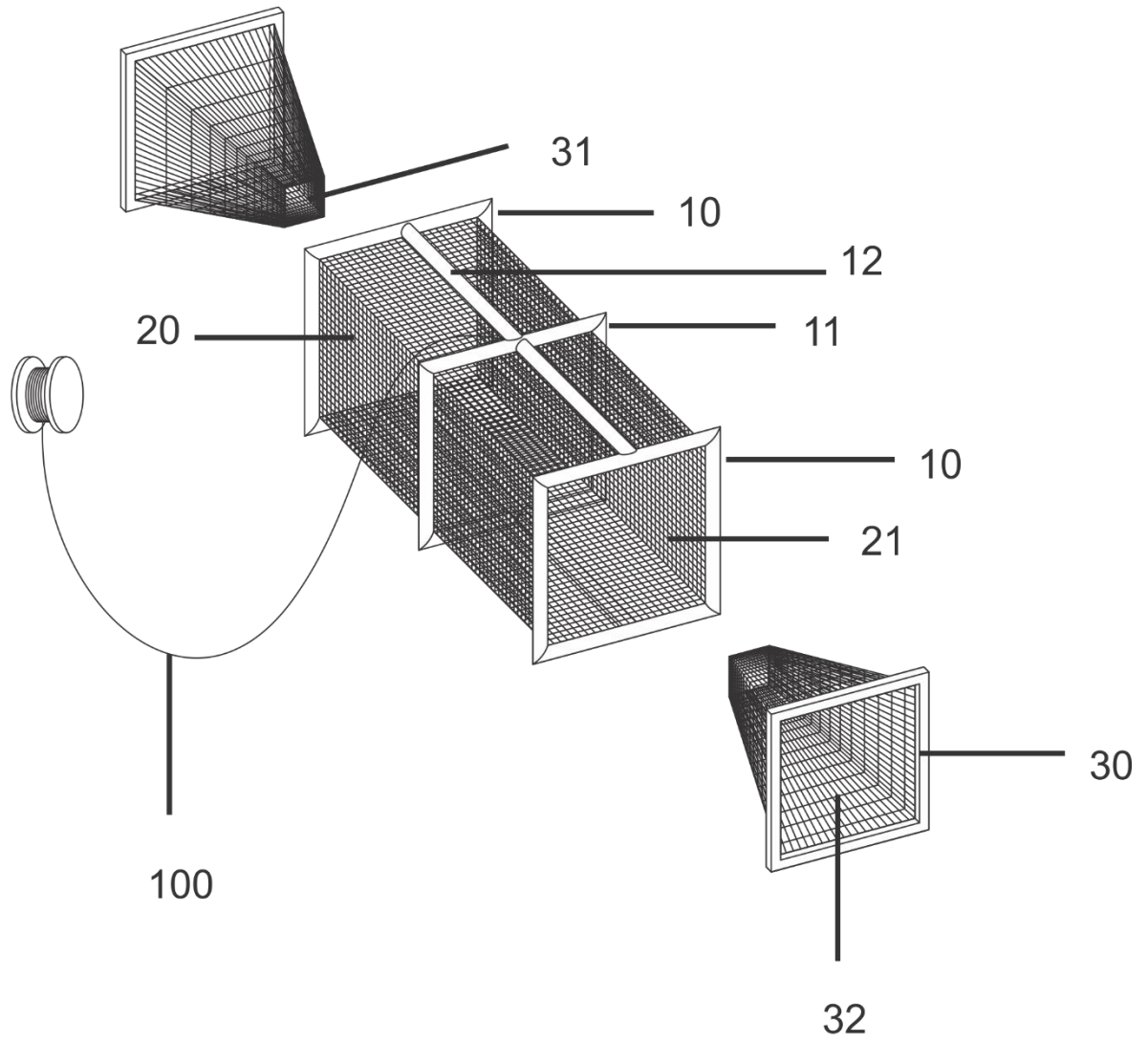


Fig. 1B

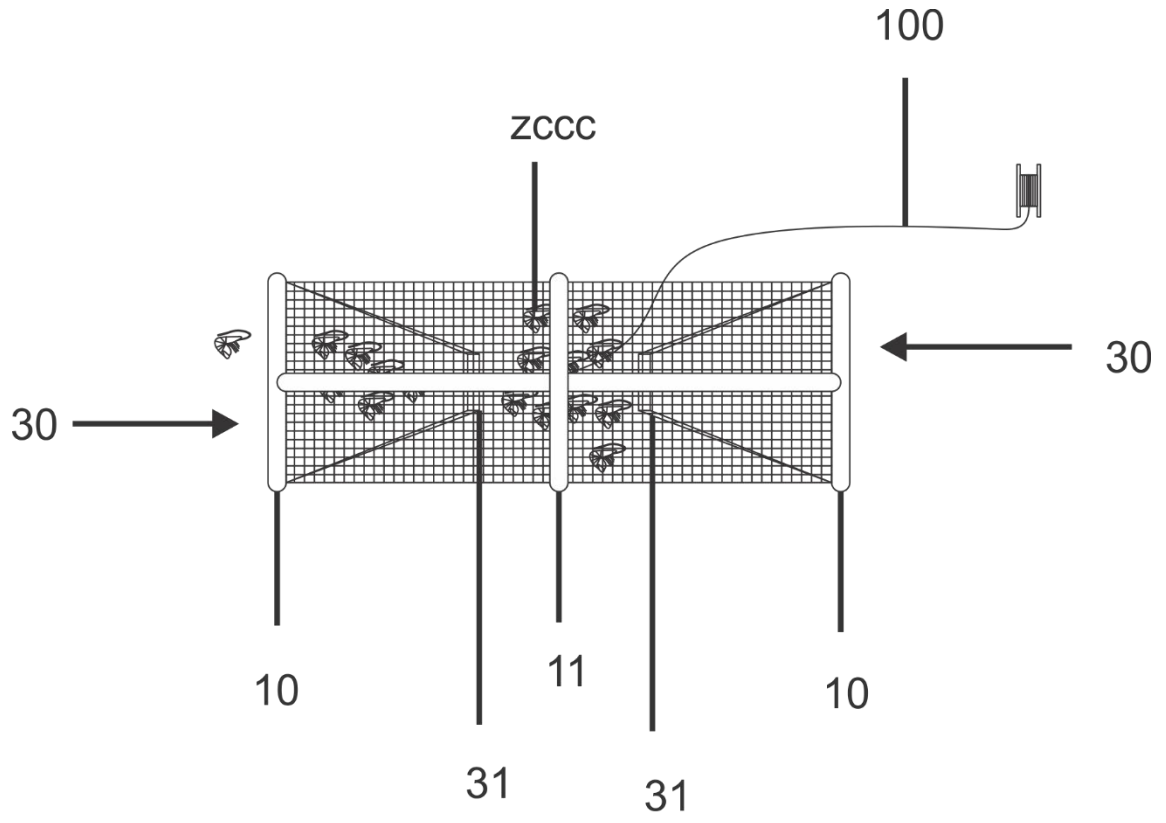


Fig. 1C

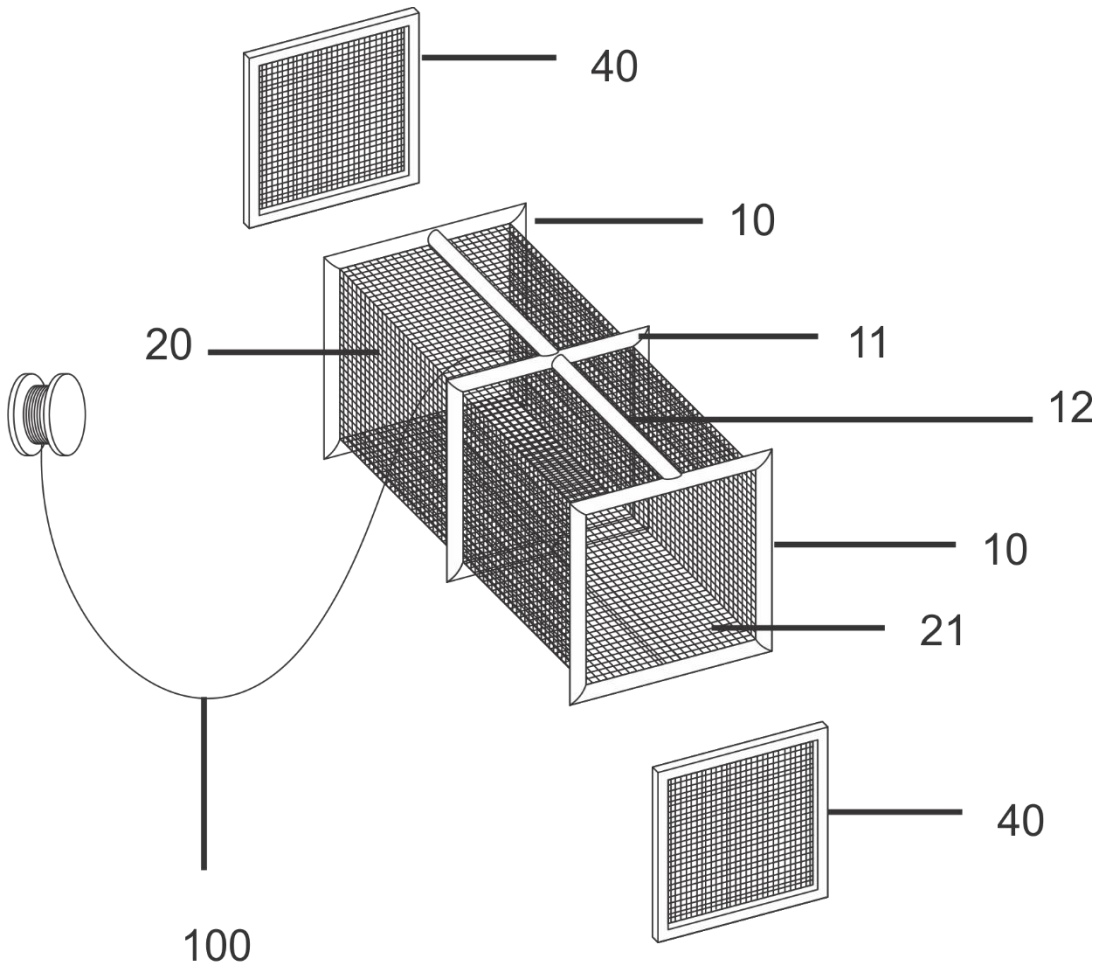


Fig. 2A

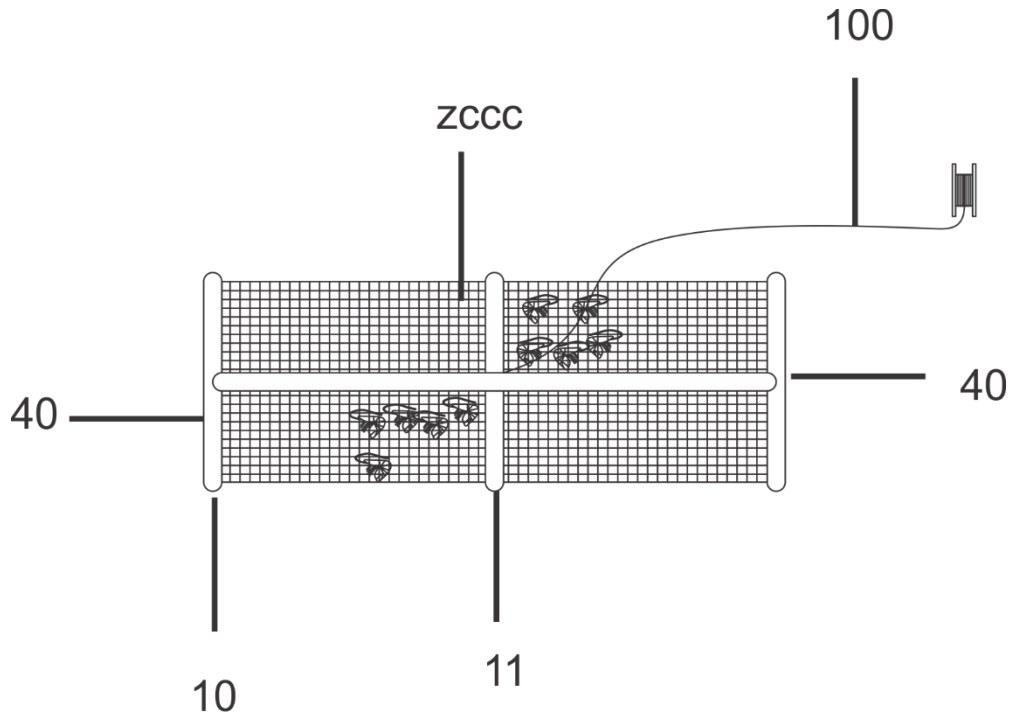


Fig. 2B