



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
CENTRO DE AQUICULTURA DA UNESP  
CAMPUS DE JABOTICABAL



**DESENVOLVIMENTO EMBRIONÁRIO DO  
CAMARÃO-DA-AMAZÔNIA *Macrobrachium  
amazonicum* (HELLER, 1862) (*CRUSTACEA*,  
*DECAPODA*, *PALAEMONIDAE*)**

**Ángel Andrés Arias Vigoya**

Zootecnista

JABOTICABAL – SÃO PAULO  
2012



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
CENTRO DE AQUICULTURA DA UNESP  
CAMPUS DE JABOTICABAL



**DESENVOLVIMENTO EMBRIONÁRIO DO  
CAMARÃO-DA-AMAZÔNIA *Macrobrachium  
amazonicum* (HELLER, 1862) (*CRUSTACEA*,  
*DECAPODA*, *PALAEMONIDAE*)**

**Ángel Andrés Arias Vigoya**

**Orientadora: Profa. Dra. Irene Bastos Franceschini Vicentini**

Dissertação apresentada ao  
Programa de Pós-graduação em  
Aquicultura do CAUNESP, da  
Universidade Estadual Paulista,  
Campus de Jaboticabal, como  
parte dos requisitos para  
obtenção do Título de Mestre em  
Aquicultura.

JABOTICABAL – SÃO PAULO  
2012

Arias Vigoya, Ángel Andrés  
A696d      Desenvolvimento embrionário do camarão-da-amazônia  
              *Macrobrachium amazonicum* (Heller, 1862) (*crustacea, decapoda,*  
              *palaemonidae*) / Ángel Andrés Arias Vigoya. – – Jaboticabal, 2012  
              ix, 113 f. : il. ; 28 cm

              Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Centro  
de Aquicultura, 2012  
              Orientadora: Irene Bastos Franceschini Vicentini  
              Banca examinadora: Elyara Maria Pereira da Silva, Rogério  
Caetano da Costa  
              Bibliografia

              1. Decapoda. 2. *Macrobrachium*. 3. Histologia. 4. Morfologia 5.  
Morfometria I. Título. II. Jaboticabal-Centro de Aquicultura.

CDU 639.512.

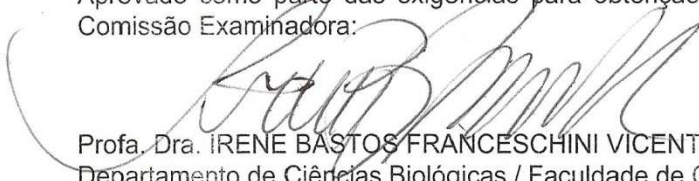
**CERTIFICADO DE APROVAÇÃO**

**TÍTULO:** DESENVOLVIMENTO EMBRIONÁRIO DO CAMARÃO-DA-AMAZÔNIA *Macrobrachium amazonicum* (HELLER, 1862) (CRUSTACEA, DECAPODA, PALAEMONIDAE)

**AUTOR:** ANGEL ÁNDRES ARIAS VIGOYA

**ORIENTADORA:** Profa. Dra. IRENE BASTOS FRANCESCHINI VICENTINI

Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de Mestre em Aquicultura, pela Comissão Examinadora:

  
Profa. Dra. IRENE BASTOS FRANCESCHINI VICENTINI

Departamento de Ciências Biológicas / Faculdade de Ciências de Bauru

  
Prof. Dr. ROGERIO CAETANO DA COSTA

Departamento de Ciências Biológicas / Faculdade de Ciências de Bauru

  
Profa. Dra. ELYARA MARIA PEREIRA DA SILVA

Departamento de Ciências Básicas / Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos de Pirassununga

Data da realização: 16 de maio de 2012.

## **SUMÁRIO**

|                                                                                     |            |
|-------------------------------------------------------------------------------------|------------|
| <b>DEDICATÓRIA</b>                                                                  | <b>i</b>   |
| <b>AGRADECIMENTO ESPECIAL</b>                                                       | <b>ii</b>  |
| <b>AGRADECIMENTOS</b>                                                               | <b>iii</b> |
| <b>APOIO FINANCEIRO</b>                                                             | <b>iv</b>  |
| <b>LISTA DE TABELAS</b>                                                             | <b>v</b>   |
| <b>LISTA DE FIGURAS</b>                                                             | <b>vi</b>  |
| <b>RESUMO</b>                                                                       | <b>1</b>   |
| <b>ABSTRACT</b>                                                                     | <b>3</b>   |
| <b>RESUMEN</b>                                                                      | <b>5</b>   |
| <b>1. INTRODUÇÃO GERAL</b>                                                          | <b>7</b>   |
| <b>2. LITERATURA</b>                                                                | <b>13</b>  |
| <b>3. OBJETIVOS</b>                                                                 | <b>26</b>  |
| 3.1 Objetivo geral                                                                  | 27         |
| 3.2 Objetivos específicos                                                           | 27         |
| <b>4. MATERIAL E METODOS</b>                                                        | <b>28</b>  |
| 4.1 Material biológico                                                              | 29         |
| 4.1.2 Seleção dos reprodutores                                                      | 29         |
| 4.2 Unidades experimentais                                                          | 30         |
| 4.3 Manejo, procedimentos e determinação do processo de desenvolvimento embrionário | 31         |
| 4.4 Processamento histológico das amostras e microscopia óptica                     | 32         |
| 4.5 Análises morfométricas de ovos e embriões                                       | 33         |

|                                                                           |           |
|---------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>4.6 Análises estatísticas</b>                                          | <b>34</b> |
| <b>5. RESULTADOS</b>                                                      | <b>35</b> |
| 5.1 Estágio I. Ovo fertilizado, 0 – 4% do desenvolvimento.                | 42        |
| 5.2 Estágio II. Clivagem, 4 – 7% do desenvolvimento (DE1).                | 42        |
| 5.3 Estágio III. Blástula - Gástrula, 7 – 14% do desenvolvimento (DE2).   | 45        |
| 5.4 Estágio IV. Disco germinativo, 14 – 21% do desenvolvimento (DE3).     | 45        |
| 5.5 Estágio V. Náuplio embrionizado, 21 – 29% do desenvolvimento (DE4-5). | 50        |
| 5.6 Estágio VI. Pós-náuplio, 29 – 50% do desenvolvimento (DE6-8).         | 55        |
| 5.7 Estágio VII. Protozoa, 50 – 64% do desenvolvimento (DE9- 10).         | 65        |
| 5.8 Estágio VIII. Zoea, 64 – 100% do desenvolvimento (DE 11-14).          | 68        |
| <b>6. DISCUSSÃO</b>                                                       | <b>78</b> |
| <b>7. CONCLUSÕES</b>                                                      | <b>97</b> |
| <b>8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>                                      | <b>99</b> |

## DEDICATÓRIA

*A Dios, Señor y principio fundamental de todo lo existente.*

*A mis padres, Miguel Ángel y Margarita, por su infinito amor, comprensión, por sus sacrificios y esfuerzos.*

*A mis queridos hermanos Claudia Marcela y Luis Miguel, por su constante cariño y apoyo.*

*A mi amada Helenita, por estar siempre junto a mí, entregándome incondicionalmente todo su amor, fortaleciéndome, apoyándome, cuidándome y por ser el motivo de mi vida. Mi amor, juntos hemos vencido las dificultades y alcanzado nuestras metas, esta es una aventura mas en nuestras vidas... Gracias por todo.*

## **AGRADECIMENTO ESPECIAL**

*À Professora Dra. Irene Bastos Franceschini Vicentini*

*Mal posso expressar meu agradecimento à professora Irene, pessoa maravilhosa e ótima mestra. Agradeço de tudo coração o carinho, a amizade, a dedicação, o apoio, a ajuda, os conhecimentos recebidos, a confiança e a imensa generosidade a mim oferecidos.*

*Professora, que Deus te abençoe hoje e sempre,*

*E simplesmente... Muito obrigado mesmo!!!*

## AGRADECIMENTOS

*Ao Centro de Aquicultura da Universidade Estadual Paulista – CAUNESP, Campus Jaboticabal, pela oportunidade de dar continuidade à minha formação profissional;*

*A Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pela concessão da Bolsa de Mestrado e auxílio financeiro para a execução do projeto;*

*Ao laboratório de Morfologia de Organismos Aquáticos – LAMOA, do Departamento de Ciências Biológicas, da Faculdade de Ciências da Universidade Estadual Paulista, Campus Bauru, pelo suporte laboratorial e técnico para a realização do projeto;*

*Ao setor de Carcinicultura de água doce do Centro de Aquicultura da Universidade Estadual Paulista – CAUNESP, Campus Jaboticabal, pela doação dos animais;*

*À minha orientadora a Professora Dra. Irene Bastos Franceschini Vicentini, pela disposição, dedicação, confiança e apoio nos momentos mais difíceis, e principalmente pela excelente orientação.*

*Aos Professores membros das bancas examinadoras, Profa. Dra. Maria Terezinha Siqueira Bombonato, Profa. Dra. Elyara Maria Pereira da Silva e Prof. Dr. Rogério Caetano da Costa, pelas valiosas sugestões para o enriquecimento deste trabalho;*

*Ao senhor Antonio Carlos do Amaral pela ajuda incansável durante a execução deste projeto;*

*Aos meus amigos pela acolhida, amizade e ajuda;*

*A todos que colaboraram direta ou indiretamente para a execução deste trabalho.*

## **APOIO FINANCEIRO**

Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP,  
Bolsa de Mestrado, Processo Nº 2010/14576 – 3

## LISTA DE TABELAS

*Página*

**Tabela 1.** Valores médios para eixo maior e menor dos ovos, volume do ovo, área do embrião, área do vitelo e índice do olho para embriões de *M. amazonicum* durante os estágios de desenvolvimento embrionário.....39

**Tabela 2.** Dados comparativos dos tempos de embriogênese em algumas espécies de decápodes.....81

**Tabela 3.** Volume médio de embriões de algumas espécies de decápodes durante a fase inicial e final do período de incubação.....86

## LISTA DE FIGURAS

Página

**Figura 1.** Esquema dos estágios do desenvolvimento embrionário de *M. amazonicum*, apresentando as principais estruturas morfológicas externas. I. Ovo fertilizado; II. Clivagem; III. Blástula - Gástrula; IV. Disco germinativo (vista dorsal); V. Náuplio embrionizado (vista dorsal); VI. Pós-nauplio (vista lateral); VII. Protozoeca (vista lateral) e VIII. Zoea (vista lateral). (ab) abdômen; (al) antênula; (at) antena; (an) apêndices naupliares; (ap) apêndices pós naupliares; (bl) blastômeros; (bp) área blastoporal; (co) córion; (cr) cromatóforos; (dg) disco germinativo; (es) estomodeo; (ex) exoesqueleto; (gv) grânulos de vitelo; (in) intestino; (lc) limites celulares; (lo) lobo óptico; (mn) mandíbula; (ol) olho; (pc) papila caudal; (po) pigmentação ocular; (pe) pereiópodos; (rc) região cardíaca; (sa) somitos abdominais; (te) telson; (vi) vitelo. Barra: 0,125 mm.....37

**Figura 2.** Valores médios do eixo maior e menor dos ovos de *Macrobrachium amazonicum* durante a embriogênese.....40

**Figura 3.** Valores médios do volume do ovo e índice do olho de *Macrobrachium amazonicum* durante a embriogênese.....40

**Figura 4.** Valores médios da área do embrião e do vitelo de *Macrobrachium amazonicum* durante a embriogênese.....41

**Figuras 5 - 8.** Visualização do início do desenvolvimento embrionário de *M. amazonicum* sob análise “*in vivo*” (5 e 7) e histológica (6 e 8, corte longitudinal). **(5)** Estágio I. DE0 ovo recém-fertilizado com córion espesso. Barra: 0,125 mm; **(6)** Estágio I. DE0 vitelo muito volumoso; **(7)** Estágio II. DE1 início da clivagem. Barra: 0,125 mm; **(8)** Estágio II. DE1 surgimento dos blastômeros. (bl) blastômeros; (co) córion; (vi) vitelo.....43

**Figuras 9 - 11.** Formação do blastoderma definitivo (tecido germinativo) e início da migração dos blastômeros no segundo dia de desenvolvimento embrionário. **(9)** Estágio III. DE2 processo de clivagem. Barra: 0,125 mm; **(10)** Estágio II. DE2 formação do blastoderma (Corte longitudinal); **(11)** Estágio III. DE2 migração dos blastômeros para o interior do ovo (Corte longitudinal). (bd) blastoderma; (mb) migração dos blastômeros; (nu) núcleo celular; (vi) vitelo.. 46

**Figuras 12 e 13.** Formação do disco germinativo e dos primórdios das estruturas do embrião. **(12)** Estágio IV. DE3 disco germinativo em constituição. Barra: 0,125 mm; **(13)** Estágio IV. DE3 visualização do embrião

em forma de “V” e dos primórdios das estruturas do corpo de *M. amazonicum* (Corte dorsal). (bp) área blastoporal; (dg) disco germinativo; (lo) lobo óptico; (pl) ponte de ligação; (ra) região anterior; (rp) região posterior; (vi) vitelo..... 48

**Figuras 14 - 16.** Constituição do náuplio embrionizado, apêndices e estomodeo. **(14)** Estágio V. DE4 estomodeo constituído. Barra: 0,125 mm; **(15)** Estágio V. DE4 visualização histológica do náuplio embrionizado (Corte dorsal); **(16)** Estágio V. DE4 visualização dos apêndices naupliares. Barra: 0,125 mm. (al) antênula; (at) antena; (es) estomodeo; (lo) lobo óptico; (mn) mandíbula; (na) náuplio embrionizado; (pc) papila caudal; (vi) vitelo..... 51

**Figuras 17 - 19.** Desenvolvimento do náuplio embrionizado. **(17)** Estágio V. DE5 definição das regiões anterior e posterior do embrião. Barra: 0,125 mm; **(18)** Estágio V. DE5 desenvolvimento dos apêndices naupliares (Corte longitudinal); **(19)** Estágio V. DE5 surgimento da pigmentação embrionária (cromatóforos) e primórdios dos apêndices pós naupliares. Barra: 0,125 mm. (al) antênula; (an) apêndices naupliares; (ap) apêndices pós naupliares; (at) antena; (cr) cromatóforos; (lo) lobo óptico; (mn) mandíbula; (pc) papila caudal; (ra) região anterior; (rp) região posterior; (vi) vitelo..... 53

**Figuras 20 - 22.** Desenvolvimento ativo do pós-náuplio, cuja forma é de meia-lua e a papila cresce em direção aos lobos ópticos. **(20)** Estágio VI. DE6 lobo óptico assume forma mais circular e crescimento dos apêndices naupliares em direção à papila caudal. Barra: 0,125 mm; **(21)** Estágio VI. DE6 início da formação do abdômen (Corte longitudinal); **(22)** Estágio VI. DE6 cromatóforos adjacentes aos lobos ópticos. Barra: 0,125 mm. (ab) abdômen; (an) apêndices naupliares; (cr) cromatóforos; (cn) cordão nervoso ventral; (gv) grânulos vitelo; (lo) lobo óptico; (pe) pereiopódos; (vi) vitelo.....56

**Figuras 23 - 25.** Formação e desenvolvimento da pigmentação ocular. **(23)** Estágio VI. DE7 surgimento da pigmentação do olho. Barra: 0,125 mm; **(24)** Estágio VI. DE7 conjunto de cromatóforos. Barra: 0,125 mm; **(25)** Estágio VI. DE7 abdômen constituído (Corte longitudinal). (ab) abdômen; (an) apêndices naupliares; (co) córion; (cn) cordão nervoso ventral; (cr) cromatóforos; (lo) lobo óptico; (pe) pereiopódos; (po) pigmentação ocular; (rg) região ganglionar; (vi) vitelo.....59

**Figuras 26 e 27.** Desenvolvimento do pós-náuplio associado ao processo de organogênese. **(26)** Estágio VI. DE8 visualização da região cardíaca; **(27)** Estágio VI. DE8 incorporação dos grânulos de vitelo, olho assume a forma elipsoidal e o vitelo apresenta coloração amarelo-pálido. (cr) cromatóforos; (gv) grânulos de vitelo; (lo) lobo óptico; (im) intestino médio; (ol) olho; (pe) pereiopódos; (rc) região cardíaca; (vi) vitelo. Barra: 0,125mm.....61

**Figuras 28 - 30.** Desenvolvimento do sistema nervoso, musculatura, intestino, complexo ocular e abdômen. **(28)** Estágio VI. DE8 desenvolvimento da região ocular e omatídeos (Corte longitudinal); **(29)** Estágio VI. DE8 desenvolvimento dos gânglios cerebrais, do cordão nervoso ventral, intestino, engrossamento e segmentação do abdômen (Corte longitudinal); **(30)** Estágio VI. DE8 início da formação do telson. Barra: 0,125 mm. (ab) abdome; (cn) cordão nervoso ventral; (gc) gânglio cerebral; (lo) lobo óptico; (im) intestino médio; (ip) intestino posterior; (mu) musculatura; (ol) olho; (om) omatídio; (sa) somitos abdominais; (te) telson; (vi) vitelo.....63

**Figuras 31 - 34.** Visualização do desenvolvimento embrionário final do camarão-da-amazonia. **(31)** Estágio VII. DE9 olhos já assumem forma quase circular. Barra: 0,125 mm; **(32)** Estágio VII. DE9 o abdômen atinge a região cefálica. Barra: 0,125 mm; **(33)** Estágio VII. DE9 estabelecem-se os somitos abdominais e o desenvolvimento da musculatura (Corte longitudinal); **(34)** Estágio VII. DE10 observação das estruturas cromatóforo, vitelo, grânulos de vitelo, olho, e da região cardíaca. Barra: 0,125 mm. (ab) abdômen; (cn) cordão nervoso ventral; (cr) cromatóforo; (gv) grânulos de vitelo; (lo) lobo óptico; (mu) musculatura; (ol) olho; (pe) pereiopódos; (rc) região cardíaca; (rc) região ganglionar; (sa) somitos abdominais; (te) telson; (vi) vitelo.....66

**Figuras 35 - 37.** Embrião bem desenvolvido, visualização do vitelo já com volume bastante reduzido. **(35)** Estágio VII. DE10 visualização dos lobos ópticos, cordão nervoso ventral, intestino e musculatura (Corte longitudinal); **(36)** Estágio VIII. DE11 os olhos posicionam-se laterais e apresentam-se circulares. Barra: 0,125 mm; **(37)** Estágio VIII. DE12 o embrião quase pronto para eclodir, grande desenvolvimento da musculatura (Corte longitudinal). (ab) abdômen; (cn) cordão nervoso ventral; (cr) cromatóforo; (ef) esôfago; (gc) gânglio cerebral; (im) intestino médio; (ip) intestino posterior; (lo) lobo óptico; (ol) olho; (pe) pereiopódos; (te) telson; (vi) vitelo.....70

**Figuras 38 - 40.** Embrião na fase final do desenvolvimento. **(38)** Estágio VIII. DE11 formação e desenvolvimento do olho e de suas estruturas (Corte longitudinal); **(39)** Estágio VIII. DE12. Barra: 0,125 mm; **(40)** Estágio VIII. DE13 (Corte longitudinal). (ab) abdômen; (cn) cordão nervoso ventral; (cp) células pigmentadas; (cr) cromatóforos; (ef) esôfago; (gv) grânulos vitelo; (im) intestino médio; (ip) intestino posterior; (lo) lobo óptico; (mb) membrana basal; (mu) musculatura; (ol) olho; (om) omatídio; (pe) pereipódos; (rb) rabdoma; (rc) região cardíaca; (rg) região ganglionar; (te) telson; (vi) vitelo.....72

**Figuras 41 e 42.** Visualização do embrião de *M. amazonicum* desenvolvido e pronto para a eclosão. **(41)** Estágio VIII. DE13 camarão-da-amazônia ao final da embriogênese, quando se evidencia o olho circular; **(42)** Estágio VIII. DE13 embriões completamente formados ao momento da eclosão, com pequenas mudanças relacionadas à maturação dos órgãos internos. (ab) abdômen; (co) CAUNESP

córion; (cr) cromatóforo; (ex) exoesqueleto; (gv) grânulos de vitelo; (in) intestino; (lo) lobo óptico; (ol) olho; (pe) pereiópodos; (rc) região cardíaca; (sa) somitos abdominais; (te) telson; (vi) vitelo. Barra: 0,125 mm.....74

**Figura 43.** Estágio VIII. DE14. Visualização “*in vivo*” das estruturas corporais externas constituintes da larva de *M. amazonicum*, logo após o momento da eclosão. (ab) abdômen; (al) antênula; (at) antena; (ca) carapaça do cefalotórax; (ce) cefalotórax; (cn) cordão nervoso ventral; (ct) cerdas do telson; (gv) grânulos de vitelo; (in) intestino; (lo) lobo óptico; (ol) olho; (pe) pereiópodos; (rc) região do coração; (sa) segmentos abdominais; (te) telson; (vi) vitelo. Barra: 0,5mm.....76

## **RESUMO**

## RESUMO

O camarão-da-amazônia *Macrobrachium amazonicum* é um palaemonideo amplamente distribuído na América do Sul, com um grande potencial para a aquicultura e enorme importância econômica. Apesar das recentes pesquisas acerca da biologia da espécie, não existem estudos relacionados com o desenvolvimento embrionário de *M. amazonicum*. Portanto, o principal objetivo deste trabalho foi realizar uma descrição do desenvolvimento embrionário do camarão-da-amazônia. Assim, a embriogênese da espécie foi descrita em relação às características morfológicas externas, histológicas e morfométricas observadas em embriões vivos e fixados a intervalos de 24 horas (dia embrionário, DE), e associado ao sistema de estagiamento porcentual. O período de incubação foi de 14 dias a 26°C. A embriogênese foi organizada em oito estágios: I. Ovo fertilizado; II. Clivagem; III. Blástula – gástrula; IV. Disco germinativo; V. Náuplio embrionizado; VI. Pós-náuplio; VII. Protozoea e VIII. Zoea. Os valores médios do eixo maior e menor dos ovos, volume do ovo, área do embrião e índice do olho aumentaram durante a incubação, a diferença da área do vitelo que diminuiu. *M. amazonicum* mostrou um padrão de desenvolvimento embrionário semelhante ao observado em crustáceos com ovos centrolécitos, com clivagem superficial parcial (meroblástica), e apresentou características semelhantes às espécies do mesmo gênero. Durante a embriogênese foi observada uma relação entre o desenvolvimento dos órgãos internos com as estruturas externas, e os ritmos de desenvolvimento embrionário revelam uma associação entre as características morfológicas, histológicas e morfométricas.

Palavras-chave: Decapoda, *Macrobrachium*, histologia, morfologia, morfometria.

## **ABSTRACT**

## ABSTRACT

The Amazon River prawn *Macrobrachium amazonicum* is a palaemonid widely distributed in South America, with a great potential for aquaculture and huge economic importance. Despite recent researches about the biology of the species, there are no studies related to the embryonic development of *M. amazonicum*. Thus, the main objective of this study was a description of the embryonic development of Amazon River prawn. Hence, the embryogenesis of the species was described with respect to the morphological, histological and morphometrical features, observed in live and fixed embryos at intervals of 24 hours (embryonic day, ED), associated by percent staging system. The incubation period was 14 days at 26°C. The embryogenesis was organized in eight stages: I. Fertilized egg; II. Cleavage; III. Blastula – Gastrula; IV. Germinal disc; V. Embryonized nauplius; VI. Post-nauplius; VII. Protozoa and VIII. Zoea. The mean values for egg length and width, egg volume, area of the embryo and eye index increased during incubation, contrasting with the area of the yolk that decreased. *M. amazonicum* showed a similar pattern of embryonic development to that observed in crustaceans with centrolecithal eggs and superficial partial cleavage (meroblastic); and showed similar characteristics to species of the genus. During the embryogenesis was observed a relationship between the development of internal organs with the external structures, and the developmental rhythms shows an association among the morphological, histological and morphometric features.

Keywords: Decapoda, *Macrobrachium*, histology, morphology, morphometry.

## **RESUMEN**

## RESUMEN

El camarón de la Amazonia *Macrobrachium amazonicum*, es un palaemonideo ampliamente distribuido en Suramérica, con un gran potencial para la acuicultura y una notable importancia económica. A pesar de las recientes investigaciones sobre la biología de la especie, no existen estudios relacionados con el desarrollo embrionario de *M. amazonicum*. De este modo, el principal objetivo de este trabajo fue realizar una descripción del desarrollo embrionario del camarón de la Amazonia. Así, la embriogénesis de la especie fue descrita en relación a las características morfológicas externas, histológicas y morfométricas observadas en embriones vivos y fijados a intervalos de 24 horas (día embrionario, DE), y asociado al sistema de estadios basados en porcentajes. El periodo de incubación fue de 14 días a 26°C. La embriogénesis fue organizada en ocho periodos: I. Huevo fertilizado; II. Clivaje; III. Blástula – gástrula; IV. Disco germinativo; V. Náuplio embrionizado; VI. Pós-náuplio; VII. Protozoea e VIII. Zoea. Los valores medios del eje mayor y menor de los huevos, volumen del huevo, área del embrión e índice del ojo aumentaron durante la incubación, a diferencia del área del vitelo que disminuyó. *M. amazonicum* mostró un patrón de desarrollo similar al observado en crustáceos con huevos centrolecitos, con clivaje superficial parcial (meroblástica), y presenta características semejantes a las especies del mismo género. Durante la embriogénesis fue observada una relación entre el desarrollo de los órganos internos con las estructuras externas, y los ritmos de desarrollo embrionario indican una asociación entre las características morfológicas, histológicas e morfométricas.

Palabras clave: Decapoda, *Macrobrachium*, histología, morfología, morfometría.

# **1. INTRODUÇÃO GERAL**

## 1. INTRODUÇÃO GERAL

O gênero *Macrobrachium* é o maior em número de espécies da Ordem Decapoda (Latreille, 1803); Sub-ordem Pleocyemata (Burkenroad, 1963); Infra-ordem Caridea (Dana, 1852); Superfamília Palaemonoidea (Rafinesque, 1815); Família Palaemonidae (NEW et al., 2010). A maioria das espécies vive em água doce, pelo menos em alguma fase de sua vida. O gênero é circum-tropical e encontra-se distribuído em todos os continentes exceto Europa e Antártica (NEW et al., 2010; DE GRAVE et al., 2008; NEW, VALENTI, 2000). O gênero está representado por cerca de 230 espécies (NEW et al., 2010), e apresenta sua maior diversidade de espécies na região Oriental, com um total de 123 espécies. Na região Neotropical o número diminui para 53 espécies e a região de Australásia está representada por 28 espécies. Na região Neártica apenas ocorrem três espécies, enquanto a região Paleártica leste apresenta somente quatro espécies, e na região do Pacífico são encontradas dez espécies (DE GRAVE et al., 2008).

Segundo Odinetz-Collart e Moreira (1993), dentre os camarões de água doce, destacam-se as espécies do gênero *Macrobrachium*, que apresentam grande interesse comercial, para a aquicultura e para a exploração das populações naturais.

O grande desenvolvimento da produção de *M. nipponense* na China mostra a grande importância e a viabilidade do uso das espécies nativas para o cultivo (KUTTY et al., 2000). Assim, no Brasil existem três espécies de camarões de água doce com enorme potencial produtivo: *M. acanthurus*, *M. amazonicum* e *M. carcinus* (VALENTI, 1993). Kutty et al. (2000), Kutty (2005), Kutty e Valenti (2010), New (2005) e Valenti (2003) ratificaram que a espécie brasileira com maior potencial para o cultivo comercial é *M. amazonicum*.

Melo (2003) menciona que *M. amazonicum* é uma das 45 espécies do gênero *Macrobrachium* registradas no continente Americano e destas 18 ocorrem no Brasil. A espécie apresenta uma ampla distribuição geográfica nas

regiões tropicais e subtropicais da América do Sul, sendo encontrada na Guiana, Suriname, Guiana Francesa, Venezuela, Colômbia, Peru, Equador, Bolívia, Paraguai, Argentina e no Brasil, onde ocorre em 14 estados. A espécie encontra-se distribuída nas principais bacias hidrográficas do leste da América do Sul, incluindo os rios Amazonas, Orinoco, Araguaia-Tocantins, São Francisco e La Plata (bacias dos rios Paraguai e Paraná), assim como nos rios das bacias do Atlântico Sul e das costas norte, nordeste e leste do Brasil (HOLTHUIS, 1952; BIALETZKI et al., 1997; MELO, 2003).

O camarão-da-amazônia é um dos importantes recursos biológicos do Brasil. Trata-se de uma espécie que apresenta importantes vantagens para o cultivo, embora seja considerado um camarão pequeno, pode alcançar até 16 cm e 30 g (VALENTI et al., 2003). Esta espécie é de grande interesse econômico, já que apresenta uma carne com textura mais firme e sabor mais intenso, quando comparado com *M. rosenbergii* o que resulta numa maior aceitação no mercado (MORAES-RIODADES; VALENTI, 2001); além disso a espécie apresenta resistência às condições de cultivo e doenças, e seu manejo é relativamente fácil. Por ser uma espécie nativa sua produção comercial não oferece riscos ambientais, pelo escape de indivíduos ou pela introdução de espécies.

A aquicultura pode ser definida como o processo de produção de organismos aquáticos cujo habitat é predominantemente aquático pelo menos durante alguma fase do desenvolvimento, sob condições controladas, seja em áreas continentais ou costeiras. Esta atividade implica por uma parte a influência no processo de criação para aprimorar a produção e por outra parte a propriedade individual ou empresarial do estoque produzido (FAO, 2008).

A aquicultura continua sendo um setor produtivo de alimentos de alta qualidade, crescente, vigoroso e importante. A produção aquícola mundial de peixes, crustáceos, moluscos e outros organismos aquáticos destinados ao consumo, atingiu mais de 51,65 milhões de toneladas no ano de 2006 e 52,5 milhões de toneladas para o ano 2008, gerando respectivamente U\$ 78,76

bilhões e U\$ 98,4 bilhões. A produção total de crustáceos em 1996 passou de 1,11 milhões de toneladas (U\$ 7,09 bilhões) para 4,50 milhões de toneladas (U\$ 17,95 bilhões) em 2006 e 5,0 milhões de toneladas (U\$ 22,7 bilhões) em 2008 (FAO, 2009, 2010). A produção mundial de crustáceos no ano 2006 apresentou um predomínio da produção de camarões marinhos, com 70,37% do total produzido (3,16 milhões de toneladas); em menor escala encontram-se os crustáceos de água doce, representando 23,70% (1,07 milhões de toneladas), os caranguejos com 5,0% (224,8 mil toneladas) e outros diversos grupos de crustáceos com 0,93% (41,8 mil toneladas) da produção mundial (FAO, 2009). Não obstante, a criação e produção de camarões de água doce é um dos setores da aquicultura com maior desenvolvimento a nível mundial (VALENTI, 2004). Recentemente, a produção mundial aumentou aproximadamente 1300% (VALENTI, 2004). Em 2001, considerando as principais espécies cultivadas: *Macrobrachium rosenbergii* e *Macrobrachium nipponense*, o volume produzido ultrapassou as 300.000 toneladas, movimentando mais de US\$ 1 bilhão (VALENTI, 2004). No ano 2006, a situação continuou sem mudanças e a produção mundial alcançou 410.000 toneladas, produzindo mais de US\$ 1,63 bilhões (FAO, 2008).

Embora os camarões de água doce ainda ocupem posição inferior aos marinhos na produção mundial, eles apresentam várias vantagens tais como maior resistência a doenças, um sistema de produção mais simples, independência da água salgada na fase de crescimento, sistema de produção compatível com os pequenos produtores e diminuição dos efeitos prejudiciais para o meio ambiente (NEW; VALENTI, 2000). Além disso, o cultivo de camarões de água doce apresenta características que favorecem o cultivo sustentável em empresas que usam mão de obra familiar (NEW; VALENTI, 2000). Assim, atualmente a carcinicultura de água doce é reconhecida como uma forma rentável de produzir camarões, com baixo impacto ambiental e bem-estar social, adaptando-se aos princípios modernos da aquicultura sustentável (NEW et al., 2010; NEW, VALENTI, 2000).

Várias espécies do gênero têm sido utilizadas com fins experimentais na aquicultura, entre essas *M. acanthurus* (Weigman, 1836), *M. amazonicum* (Heller, 1862), *M. americanum* (Bate, 1868), *M. carcinus* (Linnaeus, 1758), *M. formosense* (Bate, 1868), *M. lamarrei* (H. Milne Edwards, 1837), *M. lanceifrons* (Dana, 1852), *M. lanchesteri* (De Man, 1911), *M. lar* (Fabricius, 1798), *M. malcolmsonii* (H. Milne Edwards, 1844), *M. ohione* (Smith, 1874), *M. rosenbergii* (De Man, 1879) *M. rude* (Heller, 1862) e *M. vollenhovenii* (Herklots, 1857) (NEW et al., 2010; NEW, VALENTI, 2000).

Neste contexto, as pesquisas existentes em referência a *M. amazonicum* estão principalmente relacionadas aos fatores ambientais, ecológicos e da biologia pesqueira das populações no meio natural (ODINETZ-COLLART, 1991; ODINETZ-COLLART, MOREIRA, 1993; ODINETZ-COLLART, MAGALHÃES, 1994). Também são enfocados aspectos como crescimento (SILVA et al., 2007), fecundidade e fertilidade (ODINETZ-COLLART, RABELO, 1996; DA SILVA, et al., 2004), biologia reprodutiva (ODINETZ-COLLART, 1991; ODINETZ-COLLART, MOREIRA 1993), ciclo reprodutivo das fêmeas (SAMPAIO et al., 2007), morfotipos de machos (MORAES-RIODADES, 2002; PAPA, 2003, 2007), efeitos da nutrição sobre o desempenho reprodutivo (RIBEIRO, 2003, 2006), morfofisiologia e histologia do aparelho digestório (JUNIOR, 2006; PAPA, 2003, 2007; RIBEIRO, 2003, 2006), desenvolvimento do intestino médio durante o período larval (MESSIAS, 2007), salinidade, luminosidade e alimentação das larvas (ARAUJO, 2005; VETORELLI, 2008), manejo na larvicultura (VETORELLI, 2004), densidade de estocagem e manejo na fase de crescimento (MORAES-RIODADES, 2005; MORAES-RIODADES, VALENTI, 2007), metabolismo larval e tolerância a compostos nitrogenados (HAYD, 2007), manejo otimizado da alimentação durante a fase larval (MACIEL, 2007), efluentes e qualidade da água (KIMPARA, 2007; NOGUEIRA, 2008), transporte (SPERANDIO, 2004) e avaliação das taxas de estocagem das larvas junto à viabilidade técnica e econômica da atividade (VETORELLI, 2004). No entanto, vários aspectos relacionados à biologia do camarão-da-amazônia ainda não foram

estabelecidos, e não existem estudos que avaliem o desenvolvimento embrionário de *M. amazonicum*, assim o presente trabalho pretende realizar uma primeira aproximação da ontogenia inicial da espécie.

## **2. LITERATURA**

## 2. LITERATURA

O desenvolvimento dos crustáceos exibe uma ampla variedade de alterações morfológicas, fisiológicas, e no conteúdo e distribuição do vitelo nos ovos. Os tipos de desenvolvimento variam desde ovos pequenos até ovos volumosos. Os ovos pequenos apresentam pouco conteúdo de vitelo e clivagem total, e dão origem aos náuplios de natação autônoma, típico dos Euphausiacea e Dendrobranchiata. Os ovos volumosos apresentam muito vitelo, incubação materna, clivagem parcial e eclosão na forma de zoea, padrão descrito para a maioria dos Malacostracos (SCHOLTZ, 2000; HERTZLER, 2002).

Com o objetivo de estudar o desenvolvimento embrionário de várias espécies de crustáceos decápodes, foram utilizadas diversas técnicas tais como: a extração diária de amostras de ovos a partir dos pleópodos da fêmea, a incubação dos ovos sob condições controladas e a remoção do córion e da membrana vitelina do ovo para manipular os embriões e as células embrionárias (CHARMANTIER, MOUNET-GUILLAUME, 1992; HELLUY et al., 1993; LYNN et al., 1993; HERTZLER et al., 1994; CHANG, SHIH, 1995; ODINETZ-COLLART, RABELO, 1996).

Muitas espécies de decápodes e principalmente os membros da família Palaemonidae, apresentam ovos grandes e produzidos em grande quantidade, tornando possível o acompanhamento da embriogênese através do período de incubação (MÜLLER et al., 1996; ODINETZ-COLLART, RABELO, 1996; SANDEMAN R., SANDEMAN D., 1991).

Uma característica do sucesso reprodutivo dos crustáceos está relacionada ao fato de que muitas espécies transportam seus ovos até a eclosão, resultando numa elevada taxa de sobrevivência dos embriões (GIESE, PEARSE, 1974; FELGENHAUER, ABELE, 1983; SANDEMAN R., SANDEMAN D., 1990; CHARNIAUX COTTON et al., 1992). As fêmeas da família Palaemonidae mantêm os ovos unidos aos pleópodos em um grupo compacto até a eclosão. Esta característica permite o acompanhamento da embriogênese ao longo do período de incubação (MÜLLER et al., 2004).

Como regra geral, as espécies que mostram cuidado parental produzem ovos classificados como centrolécitos, e cuja clivagem é meroblástica superficial (FIORONI, 1992). Isto determina um desenvolvimento mais lento, onde o náuplio é modificado e já está presente durante a embriogênese. Assim, ocorre divisão celular intra vitelínica, formação do blastoderma, da área blastoporal, do disco germinal, da papila caudal, surgimento do pós-náuplio e incorporação do vitelo pelo intestino médio (ANDERSON, 1982; MÜLLER et al., 2003). A eclosão ocorre numa forma larval avançada conhecida como zoea, que apresenta estruturas mais desenvolvidas e é característica dos crustáceos decápodes (ANDERSON, 1973; HARTNOLL, 1982; DAHL, 1983; FELGENHAUER, ABELE, 1983; RABALAIS, GORE, 1985).

Durante a embriogênese, é notado um aumento na complexidade das estruturas embrionárias, acompanhado pela reorganização das reservas vitelínicas e estruturais dos ovos (GREEN, 1965). A gradativa incorporação do vitelo pelas células embrionárias disponibiliza espaço no ovo, para o desenvolvimento dos apêndices corporais, crescimento do abdômen, e organização dos órgãos no cefalotórax (MÜLLER et al., 2003).

Diversas pesquisas relacionadas à embriogênese das espécies de crustáceos que possuem ovos volumosos foram desenvolvidas pelo emprego de diferentes metodologias de estagiamento do desenvolvimento embrionário. Estes procedimentos avaliam aspectos como a morfologia tanto interna quanto externa do embrião, o nível de desenvolvimento dos componentes embrionários, informações biométricas de ovos e embriões, além do tempo transcorrido durante a embriogênese (SIMÕES-COSTA et al., 2005).

As características relacionadas à embriogênese de crustáceos com ovos centrolécitos podem ser identificadas na morfologia embrionária (ANDERSON, 1973, 1982; RABALAIS, GORE, 1985). Múltiplas metodologias foram aplicadas para descrever o desenvolvimento embrionário em decápodes, como o índice de olho (PERKINS, 1972), o método de estagiamento quantitativo associado ao índice do olho (HELUY; BELTZ, 1991), o estagiamento porcentual

(SANDEMAN R.; SANDEMAN D., 1991), e o sistema de estagiamento diário (NAZARI et al., 2000, 2003; SIMÕES-COSTA et al., 2005).

De modo geral, nos estudos realizados por Weygoldt (1961) com o camarão de água salobra do Atlântico *Palaemonetes varians* e Müller (1984) com o Pitú “Painted river prawn” *Macrobrachium carcinus*, foram descritos os estágios embrionários nestas espécies, com ênfase na diferenciação das estruturas embrionárias. Num estudo realizado com lagosta americana *Homarus americanus*, Perkins (1972) utilizou o índice do olho pigmentado como parâmetro de avaliação do grau de desenvolvimento para outras estruturas embrionárias. Pinheiro e Hattori (2002) descreveram oito estágios do desenvolvimento embrionário do Siri “Speckled crab” *Arenaeus cribrarius* com base na morfologia interna dos embriões e na biometria dos ovos. Helluy e Beltz (1990, 1991), relacionaram os dias embrionários com o tempo relativo de desenvolvimento do olho e do sistema nervoso da lagosta americana. Sandeman e Sandeman (1991) quantificaram os diferentes estágios do desenvolvimento da lagosta azul “Blue lobster” *Cherax destructor* em porcentagem, que pode ser usado como um referencial para estudos comparativos de desenvolvimento com outras espécies de crustáceos.

Ultimamente têm sido efetuados vários estudos avaliando a embriogênese de diversas espécies do gênero *Macrobrachium*. A utilização de metodologias baseadas na descrição das características morfológicas e os esquemas de estagiamento têm demonstrado serem adequados na descrição da embriogênese, assim os estudos de padronização do desenvolvimento embrionário confirmam a homologia deste processo entre as espécies congêneras.

Müller (1984) fez uma descrição do desenvolvimento embrionário do Pitú, *M. carcinus*, com especial ênfase nas características de divisão, proliferação e diferenciação celular, morfogênese e organogênese. Além disso, foi feita uma comparação do desenvolvimento dos folhetos embrionários e

órgãos da espécie com outros malacostracos e determinação das características primitivas e secundárias do desenvolvimento dos malacostracos.

A descrição dos estágios naupliar e pós naupliar de *Macrobrachium acanthurus* “Pitú – Cinnamon river prawn” foi feita por Bressan e Müller (1997, 1999). O desenvolvimento naupliar e das estruturas ocorre em quatro etapas, sendo caracterizadas pela divisão, proliferação e migração celular, e pelos processos de morfogênese e organogênese, para constituir a morfologia do náuplio embrionizado. Em relação à fase pós naupliar, foram descritas oito etapas de organização de acordo com as mudanças morfológicas observadas no embrião. O desenvolvimento pós naupliar apresentou um gradativo surgimento das estruturas embrionárias como resposta à intensa atividade celular, morfogênese, organogênese e crescimento embrionário, até a formação duma larva com a capacidade para tornar-se livre.

Müller et al (2007) estabeleceram períodos baseando-se nas características morfológicas e morfométricas dos embriões de *M. acanthurus*, a intervalos de 24 horas (dia embrionário) associados ao sistema de estagiamento em porcentagem. O estudo comprovou a dinâmica do desenvolvimento embrionário intralecital da espécie, através da associação das características morfológicas e morfométricas. Os eventos iniciais podem ser observados devido à organização superficial do embrião no ovo, permitindo a visualização do disco germinativo, do náuplio embrionizado e suas estruturas. Posteriormente os eventos estão associados à organogênese, desenvolvimento e funcionalidade dos sistemas orgânicos que preparam ao embrião para a vida após a eclosão. Os ritmos da embriogênese durante sua fase final apresentam uma relação entre o índice do olho e os movimentos embrionários.

Zhao et al (1998a, 1998b) descreveram a embriogênese e o desenvolvimento e diferenciação do sistema digestivo do camarão da Malásia “Giant river prawn” *Macrobrachium rosenbergii*. A embriogênese foi dividida em sete estágios: clivagem, blástula, gástrula, náuplio embrionizado, metanáuplio, protozoea e zoea; destacando as mudanças morfológicas

macroscópicas e microscópicas ocorridas durante o período de incubação. Assim, o estudo faz a caracterização celular das mudanças que acompanham o desenvolvimento embrionário, a formação do embrião e das estruturas que o compõem, e o desenvolvimento do sistema digestivo.

Yao et al. (2006) amplia o conhecimento da embriogênese de *M. rosenbergii*. Segundo os autores os ovos apresentam grande quantidade de grânulos vitelínicos, distribuídos homogeneamente pelo pólo vegetal, durante a etapa de fertilização. Durante a fase de gástrula a prega “tóraco-abdominal” pode ser observada. Esta prega corresponde ao primórdio de alguns órgãos que ocuparão o cefalotórax e o abdômen. Em estágios mais avançados do desenvolvimento, como o estágio de protozoa e zoea, é evidente a formação das estruturas embrionárias, e deste modo, pode-se identificar o surgimento dos olhos, dos gânglios cerebróides, do coração e dos apêndices. O vitelo que persiste ao redor dos primórdios de alguns órgãos e apresenta características muito diferentes do vitelo encontrado na fase de fertilização.

Nazari et al. (2000) estudaram a embriogênese do camarão palaemonideo *Palamonetes argentinus* “camarão fantasma”, e determinaram que o desenvolvimento dura 10 dias. Durante a avaliação das fases embrionárias foram reconhecidos três períodos de desenvolvimento: pré-naupliar, naupliar e pós-naupliar. O período pré-naupliar envolve os estágios I e II onde inicia o processo de clivagem e gastrulação; e os estágios III e IV correspondem ao período de disco germinativo e de náuplio. Os estágios restantes (V à VIII) definem o longo período pós-naupliar, quando ocorre o processo de organogênese e morfogênese. Este período é prolongado, pois as estruturas precisam amadurecer e adquirir a funcionalidade previa a eclosão, que ocorre na forma de zoea.

Müller et al. (2004) analisaram e reforçam o conhecimento da embriogênese dos camarões Palaemonideos. Foram estudadas quatro espécies de água doce e salobra: *Macrobrachium olfersi* “Pitú – Bristled river prawn”, *Macrobrachium potiuna* “camarão Potiúna”, *Palaemon pandaliformis*

“American grass shrimp – Potitinga prawn” e *P. argentinus*. Estes autores estabeleceram a relação existente entre o surgimento das estruturas embrionárias e o tempo de desenvolvimento; e compararam as características morfológicas do embrião durante as diferentes fases da embriogênese. As características estudadas foram: forma do ovo, disposição do vitelo, clivagem; formação dos apêndices naupliares e pós-naupliares, estomodeo, lobos ópticos, olhos e telson; também a curvatura do embrião e o espaço que ocupa no ovo. As espécies anteriormente citadas apresentaram um padrão semelhante de desenvolvimento, descrito para espécies de Palaemonideos com ovos centrolécitos, sendo estabelecidas oito fases morfológicas comuns.

Lavarias et al (2002) analisaram o desenvolvimento embrionário de *Macrobrachium borellii* “camarão de rio”, e determinaram sete estágios de desenvolvimento, além dos padrões de crescimento durante a embriogênese, baseados em medições morfométricas utilizando o analisador de imagens para avaliar as seguintes variáveis: área, diâmetros maior e menor, perímetro e forma do vitelo e do olho.

O estudo comparativo entre *M. potiuna* e *M. olfersi* classificou os ovos em dois estágios de desenvolvimento embrionário, com base na presença ou ausência da pigmentação ocular. Os autores encontraram uma correlação entre o volume do ovo e a fase da embriogênese, assim o volume aumenta conforme avança o período de incubação embrionária (NAZARI, et al., 2003). A espécie *M. potiuna* também foi avaliada por Antunes e Oshiro (2004) que a semelhança de Nazari et al. (2003), consideraram duas fases de desenvolvimento embrionário para esta espécie. Uma inicial que antecede ao início da pigmentação dos olhos e uma final onde é evidente a pigmentação ocular. Os ovos de *M. potiuna* apresentaram forma ovóide e um aumento relativo do volume durante os estágios avaliados.

Müller et al. (2003) descreveram o desenvolvimento embrionário de *M. olfersi*, e observaram as características morfológicas de embriões “in vivo” e fixados, durante o período de incubação (14 dias). Os autores utilizaram

porcentagens não fixas para descrever a embriogênese em dez estágios: pré-clivagem, clivagem, gastrulação, aparição do disco germinativo, fase de náuplio, surgimento da papila caudal, encurvamento do embrião, pigmentação ocular, segmentação do abdômen e pre-eclosão. Neste estudo foram consideradas algumas características distintivas do desenvolvimento como surgimento dos olhos, a pigmentação ocular e o batimento cardíaco. Estas características são critérios de avaliação muito importantes devido a que apresentam uma origem sincrônica em *M. olfersi*.

Simões-Costa et al., (2005) em outro estudo com *M. olfersi*, reforçam o conhecimento da biologia da espécie. Os autores realizaram análise das características morfológicas do embrião associada ao dia em que surgiram. Esta análise diferencia o desenvolvimento por meio do sistema de estagiamento diário. Foram examinados embriões vivos e fixados a cada 24 horas, de tal modo que cada intervalo foi considerado como um dia de desenvolvimento embrionário; sendo caracterizados 14 dias embrionários. Além disso, foi calculado o índice do olho, que foi um parâmetro de avaliação que relacionou diretamente o processo de embriogênese com o desenvolvimento do olho, sendo um critério de análise morfológico e biométrico do desenvolvimento.

O desenvolvimento embrionário do camarão *M. americanum* “Cauque river prawn” foi descrito por García-Guerrero e Hendrickx (2009), usando como critério de avaliação o método de estagiamento fixo baseado em porcentagem. Os ovos foram observados “*in vivo*”, o período de incubação foi de 18 dias a uma temperatura de 24°C, foram descritos 10 períodos de desenvolvimento: (I) clivagem; (II) gastrulação; (III) formação do disco germinal e do náuplio embrionizado; (IV – V) formação, estruturação e maturação do pós náuplio; (VI – VII – VIII) protozoa; (IX – X) zoea. Assim, nos estágios I, II e III são reconhecidas as características da fase naupliar e nos estágios IV a X correspondem à fase pós naupliar. Segundo os autores as características morfológicas observadas no estudo coincidem com o padrão descrito para espécies do gênero *Macrobrachium*.

Existem outras espécies de camarões decápodes que apresentam um padrão de desenvolvimento semelhante ao descrito nas espécies do gênero *Macrobrachium*. Assim, no camarão de roca *Rhynchocinetes typus* foram determinados dez estágios embrionários, de acordo com a coloração do ovo, volume do vitelo, aparecimento de apêndices e pigmentação do olho. A sequência de aparição dos apêndices e estruturas embrionárias segue o padrão descrito nos crustáceos decápodes (DUPRÉ, et al., 1992).

Rudolph e Rojas (2003) descreveram os estágios embrionários e pós-embrionários do camarão escavador “Burrowing crayfish” *Virilastacus araucanius*, com base nas mudanças morfológicas observadas na superfície dos ovos. Foram diferenciados cinco estágios embrionários e três estágios juvenis. O desenvolvimento embrionário tem uma duração de 120 dias e o pós-embrionário 20 dias, até que se forma o terceiro estágio juvenil. O desenvolvimento é contínuo e se apresentou cuidado parental durante os dois primeiros estágios juvenis.

Yávar e Dupré (2007) estabeleceram sete estágios de desenvolvimento embrionário para o camarão de rio *Cryphiops caementarius*, com base na quantidade de vitelo, na forma da pigmentação ocular, no aparecimento dos apêndices naupliares, pereiópodos e telson. O surgimento dos cromatóforos e suas alterações morfológicas também foram importantes para a determinação destes estágios de desenvolvimento. Os estágios descritos são (1) o vitelo está distribuído homogeneamente, e o embrião atinge o estado de mórula; (2) no pólo animal surgem rudimentos da antena, antênula e mandíbula; (3) no abdômen surgem os pereiópodos, os globos oculares com pigmentação; (4) se evidencia o batimento cardíaco; (5) os pereiópodos se expandem em número, a pigmentação ocular se intensifica; (6) emerge o rosto e surgem os cromatóforos; (7) o embrião está completamente desenvolvido e mostra cromatóforos estrelados, movimentação dos apêndices, pereiópodos e abdômen.

Alwes e Scholtz (2006) analisaram o desenvolvimento embrionário do lagostim mármore “Marbled crayfish” *Procambarus fallax*, fazendo a

classificação de acordo com a morfologia externa, a linhagem celular e a formação dos segmentos. Foram identificados dez estágios com base nas mudanças externas dos embriões: Clivagens e formação do blastoderma; gastrulação e formação do disco germinativo; fechamento do blastóporo e formação do primórdio do segmento naupliar; formação dos primeiros segmentos pós naupliares; formação dos pereiópodos; formação e diferenciação dos pleomeros; elongação dos membros torácicos; diferenciação dos pereiópodos; diferenciação dos olhos e pré-eclosão.

Diversas pesquisas foram realizadas em outras espécies de crustáceos decápodes. No caso das lagostas da infraordem Astacidea, Helluy e Beltz (1991), descreveram os diferentes aspectos do desenvolvimento embrionário da lagosta Americana *H. americanus* o período de incubação foi de 180 dias, desde a formação do estágio naupliar até surgimento do primeiro estágio larval. Assim, foi analisada a sequência de aparecimento das características morfológicas, anatômicas e comportamentais. O sistema de estagiamento em porcentagem baseado no índice do olho, foi utilizado para apresentar dez estágios embrionários caracterizados a diferentes níveis de classificação (ovos, embriões dissecados, apêndices e telson).

A análise da embriogênese do lagostim-de-patas-brancas “White-clawed Crayfish” *Astropotamobius pallipes*, foi realizado por Celada et al (1991) onde os autores, mediante a utilização da técnica de microscopia eletrônica de barrido, identificaram quinze estágios embrionários durante um período de incubação de 82 dias.

García-Guerrero et al. (2003) descreveram o desenvolvimento embrionário da lagosta de pinças vermelhas (Redclaw crayfish) *Cherax quadricarinatus*, baseados nas mudanças morfológicas externas. A espécie completa seu desenvolvimento embrionário em 31 dias a 26°C, foram descritos 13 estágios de desenvolvimento, incluindo dois pós-embrionários e um estágio juvenil. Os sub-estágios anteriores a eclosão foram definidos em relação ao tempo de desenvolvimento embrionário. Durante os estágios pós-embrionários

e o juvenil, os indivíduos adquirem proporcionalmente o aspecto do adulto, o vitelo é consumido e o cefalotórax assume a sua forma e proporção definitiva.

Na lagosta azul *Cherax descructor* representante da infra-ordem Parastacidea foram descritos os períodos de desenvolvimento embrionário, baseando-se em intervalos de 5% respeito a tempo total de desenvolvimento e associados às características morfológicas externas. Foram estudados 20 intervalos de desenvolvimento embrionário. Além destes estágios foram analisados dois estágios pós embrionários: I estágio, logo após a eclosão; II estágio, sete ou oito dias pós eclosão; e catorze dias após o segundo estágio pós embrionário se produz o estágio denominado de adulto imaturo (SANDEMAN, R.; SANDEMAN, D. 1991).

Determinados estudos foram feitos descrevendo a embriogênese de algumas espécies de caranguejos da infra-ordem Brachyura, assim Nagao et al., 1999 avaliaram o desenvolvimento embrionário do caranguejo Hair crab, *Erimacrus isenbeckii* sob condições de laboratório, assim as mudanças morfológicas ocorridas durante a embriogênese foram divididas em nove estágios: estágio de pré-clivagem, clivagem e blástula, gástrula, náuplio, meta náuplio, pigmentação ocular, início dos batimentos cardíacos, pré-zoea e pre-eclosão. O período de incubação de *E. isenbeckii* foi de 12 meses.

Pinheiro e Hattori (2002, 2003) estudaram outras duas espécies de caranguejos braquiúros o Siri “Swimming crab” *Arenaeus cribarius* e o Uçá “Mangrove crab” *Ucides cordatus*. Nestas espécies foram descritos oito estágios de desenvolvimento embrionário, classificados de acordo com as características morfológicas, as mudanças cromáticas e as análises biométricas dos ovos. Assim, a determinação dos estágios embrionários torna-se mais exata quando está associado às características morfológicas e morfométricas, o que facilita a interpretação biológica quando são usadas ferramentas estatísticas para analisar o processo de desenvolvimento.

García-Guerrero e Hendrickx (2004) estudaram a embriogênese de duas espécies de caranguejos do manguezal “Mangrove crabs”, e identificaram

oito estágios embrionários para *Goniopsis pulchra* e nove para *Aratus pisonii*, com base nas características morfológicas observadas em embriões vivos. O desenvolvimento embrionário de estas duas espécies foi muito semelhante. O crescimento embrionário foi sincrônico, as estruturas foram formadas no mesmo intervalo de tempo. A maior diferenciação de eventos ocorreu durante a primeira semana do desenvolvimento, enquanto o crescimento das estruturas embrionárias ocorreu durante a segunda semana.

O desenvolvimento embrionário dos caranguejos braquiúros: *Eurypanopeus canalensis* e *Panopeus chilensis* também foi examinado por García-Guerrero e Hendrickx (2006b). Os autores classificaram oito estágios comuns de desenvolvimento. De um modo geral a embriogênese destas espécies apresenta características morfológicas semelhantes, particularmente durante os primeiros períodos do desenvolvimento. O crescimento foi sincrônico e os apêndices foram formados durante o mesmo estágio para as duas espécies. As principais diferenças foram relacionadas com o tamanho do olho e a proporção do cefalotórax e do abdômen.

Por outro lado, alguns membros da infraordem Anomura foram estudados nos últimos anos. Segundo Lizardo-Daudt e Bond-Buckup (2003) o desenvolvimento embrionário de *Aegla platensis* “Pancora - caranguejo de rio - Barata de rio” apresenta uma sequência de mudanças morfológicas durante o período de incubação dos ovos que permite a identificação de dez estágios: ovo não segmentado, clivagem, blástula, gástrula, náuplio, metanáuplio, zoea inicial, zoea final, decapodid e juvenil. Nesta espécie a clivagem foi centrolécital, o estágio de náuplio foi transitório e o desenvolvimento do intestino foi observado durante o período de zoea. A pigmentação ocular foi observada no início do estágio de zoea e no estágio de decapodid estava completamente formada. As larvas recém eclodidas ainda têm algumas reservas vitelínicas e morfolologicamente são semelhantes ao adulto.

García-Guerrero e Hendrickx (2006a) estudando a embriogênese dos caranguejos anomuros *Petrolisthes armatus* “Green porcelain crab” e

*Petrolisthes robsonae* “Porcelain crab”, identificaram oito estágios comuns de desenvolvimento para as duas espécies. As observações indicam que não existem diferenças morfológicas significativas entre as espécies, exibindo semelhanças relacionadas à sua estreita posição filogenética. Durante a embriogênese a formação das estruturas mostra a mesma tendência, contudo foram observadas pequenas diferenças relacionadas à organização das células primordiais e dos primórdios embrionários.

O desenvolvimento embrionário do caranguejo-rei-azul “Blue king crab” *Paralithodes platypus* foi estudado por Stevens (2006) sob condições de laboratório. Neste estudo foram avaliados nove parâmetros morfométricos, incluindo sete medições (área total, área do vitelo, largura e comprimento embrionário, diâmetro médio, largura e comprimento do olho) e dois índices (porcentagem do vitelo e alongação). O exame visual e o análise das medições morfométricas foram metodologias apropriadas para classificar a embriogênese da espécie em 12 períodos de desenvolvimento.

### **3. OBJETIVOS**

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1 Objetivo geral

Neste contexto, o principal objetivo deste trabalho foi realizar uma descrição dos diferentes estágios do desenvolvimento embrionário do camarão-da-amazônia, *Macrobrachium amazonicum*, com o propósito de obter novos conhecimentos sobre a biologia básica e a compreensão da ontogenia inicial da espécie, em relação aos aspectos morfológicos, histológicos e morfométricos da embriogênese, considerando que não foram encontrados estudos deste tipo em *M. amazonicum*.

#### 3.2 Objetivos específicos

Assim sendo, foram abordados os seguintes tópicos:

- Descrição da morfologia externa e interna das fases do desenvolvimento embrionário de *M. amazonicum*.
- Descrição histológica dos diferentes estágios do desenvolvimento embrionário.
- Análise dos dados biométricos de ovos e embriões durante as fases da embriogênese.

## **4. MATERIAL E METODOS**

## 4. MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho foi desenvolvido na Universidade Estadual Paulista (UNESP), no laboratório de larvicultura do setor de Carcinicultura de água doce do Centro de Aquicultura da UNESP (CAUNESP), Campus de Jaboticabal, e no laboratório de Morfologia de organismos aquáticos, associado ao Centro de Aquicultura da UNESP, do Departamento de Ciências Biológicas, da Faculdade de Ciências, UNESP, no campus de Bauru.

### 4.1 Material biológico

#### 4.1.2 Seleção dos reprodutores

Para o desenvolvimento deste estudo foi utilizado um total de 120 exemplares de *M. amazonicum*, na seguinte proporção: 20 machos sexualmente maduros, do morfotipo Green Claw GC2 (MORAES-RIODADES, 2002; MORAES-RIODADES, VALENTI, 2004), com comprimento médio de  $9,13 \pm 1,17$  cm e peso médio de  $9,41 \pm 1,02$  g e 100 fêmeas adultas, com ovários no estágio V de maturação gonadal de acordo com a classificação proposta por Chang e Shih (1995) e Ribeiro (2003, 2006, 2011), com comprimento médio de  $10,82 \pm 1,21$  cm e peso médio de  $11,12 \pm 1,18$  g. Foram utilizados machos do morfotipo GC2, pois estes indivíduos apresentam maior atividade reprodutiva (MORAES-RIODADES, 2002; MORAES-RIODADES, VALENTI, 2004). Quanto às fêmeas, foram utilizadas aquelas com o ovário no V estágio de maturação gonadal (CHANG, SHIH 1995; RIBEIRO, 2003, 2006, 2011), ou seja, com o ovário completamente formado e maturo (SAMPAIO et al., 2007).

Os indivíduos foram obtidos dos viveiros de reprodutores do setor de carcinicultura, a partir de espécimes coletados na natureza no nordeste do estado de Pará (01°13'S 48°17'W) no ano de 1999.

Os reprodutores foram transferidos para o laboratório e mantidos em tanques plásticos de 120 L acoplados a filtros biológicos de 24 L, com aeração, temperatura ( $26 \pm 0,5^\circ\text{C}$ ) e fotoperíodo (12:12) constante. Cada tanque foi

provido com enriquecimento ambiental e abrigos, para evitar a agressão e as lutas entre os animais.

## 4.2 Unidades experimentais

Cada unidade experimental consistiu de uma caixa plástica com as seguintes medidas: 50 x 40 x 40 centímetros e volume útil de 80 litros, num total de 10 caixas. Cada caixa permaneceu vinculada a um filtro biológico e todas estavam operadas num sistema de recirculação fechado dinâmico (VALENTI; DANIELS, 2000). O volume dos filtros biológicos (16 litros) correspondeu a 20% do volume total de cada caixa. Foi empregado cascalho de conchas de moluscos que foi aproveitado como substrato para o desenvolvimento da população de bactérias nitrificantes nos biofiltros.

A montagem do sistema de recirculação foi feita com uma semana de antecedência, para acondicionamento e maturação dos filtros biológicos, efetuada conforme o seguinte protocolo: diluição de 2 mL de  $\text{NH}_4\text{OH}$  (Amoníaco 25%) em um litro de água filtrada, para cada 100 litros de água do sistema, obtendo-se uma solução final de aproximadamente 5 mg/L de  $\text{NH}_4\text{OH}$  que se distribuiu homogeneamente na água. Diariamente foram verificadas as concentrações de amônia e nitrito da água contida nas caixas, utilizando-se testes colorimétricos (Labcom Test®). Considerando-se os biofiltros maduros quando constatadas concentrações dos compostos próximas à zero.

As caixas foram providas de aeração constante, mantida com auxílio de pedras porosas ligadas ao sistema de aeração do laboratório, para garantir uma concentração de oxigênio dissolvido ao redor de 6.0 ppm ou maior (acima de 75% de saturação). A temperatura foi mantida em média de  $26^\circ\text{C} \pm 0,5^\circ\text{C}$  por meio de termostatos automáticos submersíveis (Atman® 100W). As unidades experimentais receberam água decolorada e deionizada, mediante o uso de um deionizador (Sistema de troca iônica DG300UF Gehaka®), com salinidade de 0,0‰, e foram cobertas com tecido (tela) mosquiteiro para diminuir o estresse gerado aos animais e evitar a fuga dos mesmos. O fotoperíodo de 12 horas foi estabelecido com auxílio de um temporizador digital

CAUNESP

programável (Bivolt® 110v - 60Hz). E cada caixa foi dotada de abrigos, os quais consistiam de tubos de PVC de 3", cortados em segmentos de 15-20 cm.

#### **4.3 Manejo, procedimentos e determinação do processo de desenvolvimento embrionário**

Diariamente os animais foram alimentados com porções de músculo de peixe e/ou ração comercial para camarão (35% PB), fornecidos duas vezes ao dia, as 8:00 e 17:00 horas. A rotina de limpeza das caixas consistiu na extração de 1/4 do volume de água mediante sifonagem, antes do fornecimento da primeira refeição, para remoção dos restos de alimento e fezes.

Os parâmetros físico-químicos da água foram monitorados semanalmente: temperatura (°C) e oxigênio dissolvido (mg/L) por meio da utilização de oxímetro YSI® modelo 55; pH mediante sonda múlti parâmetros YSI® modelo 63 e a análise das concentrações dos compostos nitrogenados amônia e nitrito realizada por método de testes colorimétricos (Labcom Test®). Os valores médios foram: temperatura  $26^{\circ}\text{C} \pm 0,1^{\circ}\text{C}$ , oxigênio dissolvido  $6,38 \pm 0,12$  mg/L, pH  $7,63 \pm 0,17$ , amônia  $0,13 \pm 0,02$  mg/L e nitrito  $0,02 \pm 0,01$  mg/L.

Cada fêmea foi mantida isolada na sua caixa, até a observação do estágio V de maturação ovariana. Nesse momento, o macho foi transferido para a caixa onde permaneceu com a fêmea até a ocorrência da cópula, ou seja, a transferência do espermatóforo. Após a cópula, o macho foi retirado e cada fêmea continuou nesse ambiente até o término do período de desenvolvimento embrionário. Transcorrida a cópula as fêmeas ovígeras (n=10) foram examinadas a cada 24 horas, quando foi retirada uma amostra de aproximadamente 20 ovos, durante um período de 14 dias. Os ovos foram retirados da câmara incubadora (pleópodos) das fêmeas com o auxílio de pinça de ponta fina de aço inox e diariamente determinou-se o estágio de desenvolvimento dos embriões sob estereomicroscópio (Micronal – Olympus® SD30) e microscópio óptico Olympus® BX50 (Tokyo, Japan). A caracterização da embriogênese foi feita em concordância ao sistema de estagiamento indicado por Sandeman R. e Sandeman D. (1991), que definiram a desova como

CAUNESP

o 0% do desenvolvimento e a eclosão como o 100%, e cada período de 24 horas foi considerado como um dia de desenvolvimento embrionário (DE). A avaliação do desenvolvimento embrionário foi efetuada mediante análise de ovos “*in vivo*” para a determinação de características específicas do embrião, tais como aparecimento de cromatóforos, surgimento e movimento dos apêndices corporais e formação do coração, sistemas nervoso e digestivo.

#### **4.4 Processamento histológico das amostras e microscopia óptica**

Os ovos coletados no experimento e destinados às análises histológicas foram fixados em solução de Karnovsky modificado (glutaraldeído a 25%, tampão fosfato pH 7,2 - 0,2 M e paraformaldeído a 8%) durante 24 horas. Posteriormente, os ovos foram lavados em solução tampão, transferidos para a solução de álcool 70% e conservados sob refrigeração (4°C) em geladeira. A seguir, o material foi destinado à rotina de inclusão em historesina (Leica®, Germany). Portanto, após a fixação, as amostras foram desidratadas em álcool em série crescente de concentração, com três repetições: três banhos em álcool 80% (30 minutos cada), três banhos em álcool 90% (30 minutos cada), três banhos em álcool 95% (30 minutos cada) e três banhos em álcool absoluto (30 minutos cada). Em seguida, foram mantidos por 24 horas em solução de pré-infiltração de resina e álcool absoluto, na proporção 1:1. As amostras permaneceram por 24 horas em solução de infiltração de resina para, posteriormente, serem incluídas em histo-moldes contendo resina com solução endurecedora, sendo mantidas por 48 horas em estufa, a 60 °C, para completar a polimerização da resina. As seções histológicas de 3 µm de espessura foram realizadas usando micrótomo automático Leica® RM2265 (Germany), equipado com navalhas de vidro; distendidas em água e colocados sobre lâminas; levadas para secagem em estufa a 60°C por 24 horas e em seguida submetidas à rotina de coloração com Hematoxilina/Eosina (HE) (BANCROFT; GAMBLE, 2002).

A foto documentação das seções histológicas foi realizada em microscópio óptico Olympus® BX50 (Tokyo, Japan) acoplado a um sistema de câmera digital Olympus® DP12. Todo o material foi processado no Laboratório de

Morfologia de Organismos Aquáticos, associado ao Centro de Aquicultura da UNESP, do Departamento de Ciências Biológicas, da Faculdade de Ciências/UNESP, Campus de Bauru.

#### 4.5 Análises morfométricas de ovos e embriões

Após a captura das imagens com auxílio de microscópio óptico Olympus® modelo BX 50 (Tokyo, Japan) adaptado a um sistema computadorizado de análise de imagens, a determinação dos índices biométricos e medições dos ovos e embriões foram realizadas utilizando-se o programa Image Pro Plus® Version 4.1 (MediCybernetics, USA), junto ao Laboratório de Morfologia de Organismos Aquáticos do Departamento de Ciências Biológicas da Faculdade de Ciências da UNESP, Campus de Bauru. De cada estágio embrionário, se selecionaram aleatoriamente amostras de aproximadamente 20 ovos. Avaliaram-se as seguintes variáveis biométricas nos ovos e embriões:

Eixos, maior ( $a$ ) e menor ( $b$ ) dos ovos, equivalente ao comprimento e à largura respectivamente.

O volume foi calculado de acordo com o formato do ovo (elipsoidal), a partir da equação:

$$v = \frac{\pi ab^2}{6}$$

Onde  $a$  é o eixo maior e  $b$  é o eixo menor (ODINETZ-COLART; RABELO, 1996).

O cálculo do índice do olho ou índice de Perkins (Perkins, 1972), foi estimado a partir da média de comprimento e largura da área com pigmentação ocular, aplicando a seguinte fórmula:

$$\text{Índice Olho} = \frac{l+h}{2}.$$

Onde,  $l$  corresponde ao eixo maior do olho e  $h$  ao eixo menor (PERKINS, 1972).

Para o cálculo da área do embrião e do vitelo as imagens foram processadas mediante a utilização do programa analisador de imagens Image Pro Plus® Version 4.1.

#### **4.6 Análises estatísticas**

Para a análise de variância (*one-way ANOVA*), os valores médios obtidos do eixo maior e menor dos ovos, volume do ovo, área do embrião, área do vitelo e índice do olho, foram comparados diariamente pelo teste de Tukey com nível de significância de 5% ( $\alpha=0,05$ ), quando encontradas diferenças significativas. As análises estatísticas foram efetuadas empregando-se o programa SAS® (*Statistical Analysis System*) SAS Institute Inc., Version 9 para Windows.

## **5. RESULTADOS**

## 5. RESULTADOS

Segundo as condições experimentais deste estudo, o desenvolvimento ontogênico de *Macrobrachium amazonicum*, a uma temperatura de  $26^{\circ}\text{C} \pm 0,5^{\circ}\text{C}$  foi completado em 14 dias. O desenvolvimento embrionário da espécie foi organizado em oito estágios: I. Ovo fertilizado; II. Clivagem; III. Blástula - Gástrula; IV. Disco germinativo; V. Náuplio embrionizado; VI. Pós-nauplio; VII. Protozoa e VIII. Zoea (Figura 1).

Neste estudo avaliaram-se seis variáveis morfométricas: eixo maior e menor dos ovos, volume do ovo, área do embrião, área do vitelo e índice do olho. As variáveis examinadas apresentaram variações durante o desenvolvimento. Observando-se um aumento para o eixo maior e menor dos ovos, volume do ovo, área do embrião e índice do olho durante o período de incubação; enquanto a área do vitelo diminuiu durante a embriogênese (Figuras 2, 3 e 4).

Os valores mínimos para a área do embrião, eixos e volume dos ovos foram registrados durante os estágios I e II, e os máximos nos estágios VII e VIII; o índice do olho apresentou uma tendência semelhante, mas isto ocorre durante os dias 7º e 14º respectivamente. Já, área do vitelo mostrou uma resposta inversamente proporcional quando comparada à área do embrião.

A média do eixo maior mostrou diferenças durante os estágios III, VI, VII e VIII (ANOVA,  $p < 0,05$ ); já os valores médios para o eixo menor só diferiram a partir do estágio III. Em relação ao volume observaram-se diferenças apenas para os estágios V ao VIII (ANOVA,  $p < 0,05$ ). A área do embrião apresentou diferenças durante todo o período de incubação (ANOVA,  $p < 0,05$ ). Para a área do vitelo os estágios II, III e IV foram diferentes dos demais estágios (ANOVA,  $p < 0,05$ ). O índice do olho apresentou diferenças desde o dia 7º até o dia 12º (ANOVA,  $p < 0,05$ ); em contraste, os dias 13º e 14º não foram diferentes entre si (ANOVA,  $p > 0,05$ ), mas diferem de todos os outros dias embrionários (ANOVA,  $p < 0,05$ ). Os valores médios destas características são apresentados na tabela 1.

**Figura 1.** Esquema dos estágios do desenvolvimento embrionário de *M. amazonicum*, apresentando as principais estruturas morfológicas externas. I. Ovo fertilizado; II. Clivagem; III. Blástula - Gástrula; IV. Disco germinativo (vista dorsal); V. Náuplio embrionizado (vista dorsal); VI. Pós-nauplio (vista lateral); VII. Protozoea (vista lateral) e VIII. Zoea (vista lateral). (ab) abdômen; (al) antênula; (at) antena; (an) apêndices naupliares; (ap) apêndices pós naupliares; (bl) blastômeros; (bp) área blastoporal; (co) córion; (cr) cromatóforos; (dg) disco germinativo; (es) estomodeo; (ex) exoesqueleto; (gv) grânulos de vitelo; (in) intestino; (lc) limites celulares; (lo) lobo óptico; (mn) mandíbula; (ol) olho; (pc) papila caudal; (po) pigmentação ocular; (pe) pereiópodos; (rc) região cardíaca; (sa) somitos abdominais; (te) telson; (vi) vitelo. Barra: 0,125 mm.

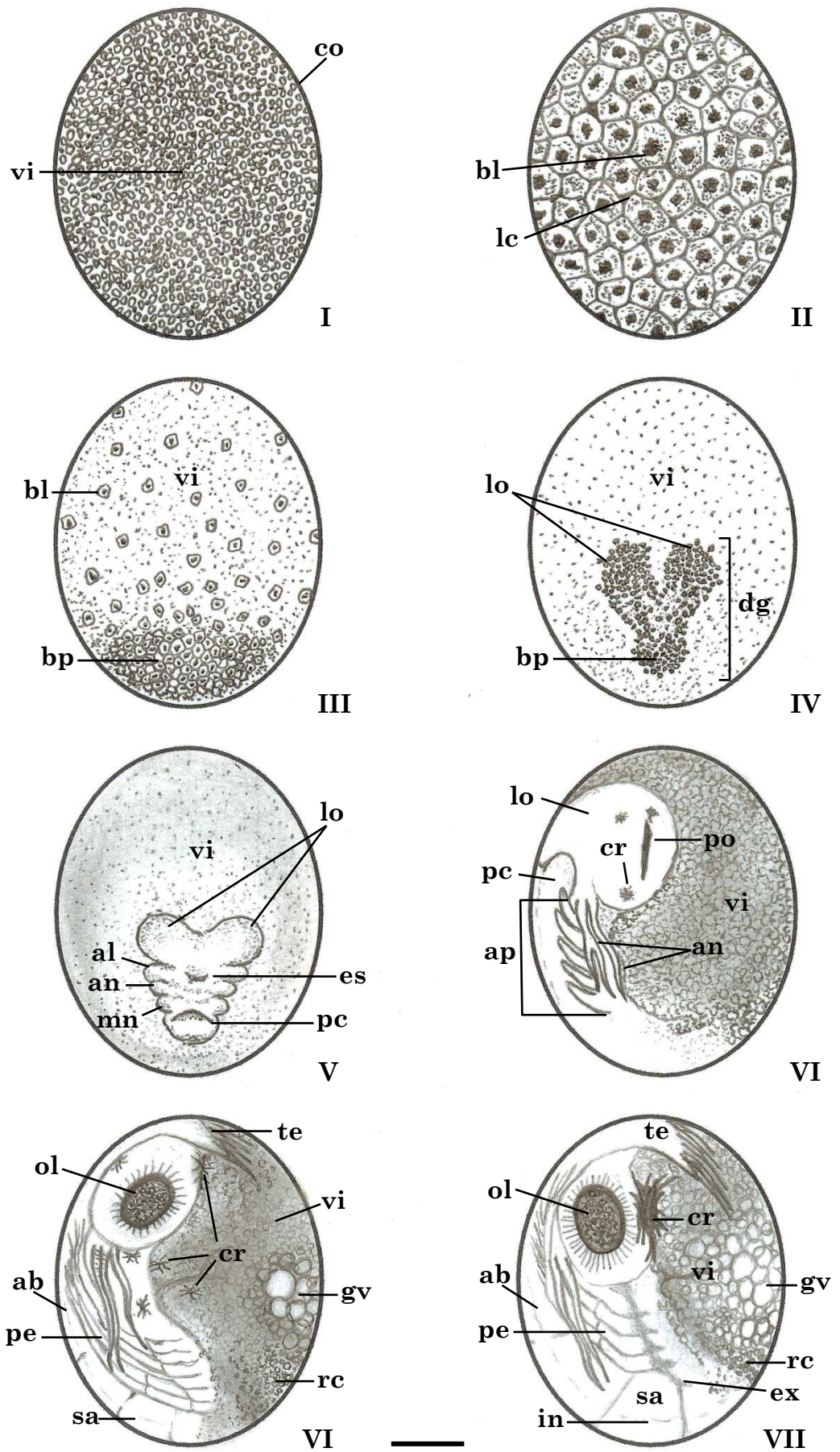


Tabela 1. Valores médios ( $\pm$  desvio padrão) para eixo maior e menor dos ovos, volume do ovo, área do embrião, área do vitelo e índice do olho para embriões de *M. amazonicum* durante os estágios de desenvolvimento embrionário. Médias com a mesma letra não apresentam diferenças significativas ( $p<0,05$ )

| Dia | Estágio | Eixo maior (mm)                  | Eixo menor (mm)                  | Volume ovo (mm <sup>3</sup> )    | Área do vitelo (mm <sup>2</sup> ) | Índice do olho (µm)               |
|-----|---------|----------------------------------|----------------------------------|----------------------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|
| 0   | I       | 0,5886 $\pm$ 0,0008 <sup>a</sup> | 0,4794 $\pm$ 0,0010 <sup>a</sup> | 0,0708 $\pm$ 0,0004 <sup>a</sup> | 0,2216 $\pm$ 0,0006 <sup>a</sup>  | ---                               |
| 1   | II      | 0,5900 $\pm$ 0,0031 <sup>a</sup> | 0,4787 $\pm$ 0,0014 <sup>a</sup> | 0,0708 $\pm$ 0,0007 <sup>a</sup> | 0,2159 $\pm$ 0,0007 <sup>b</sup>  | ---                               |
| 2   | III     | 0,5993 $\pm$ 0,0014 <sup>b</sup> | 0,4960 $\pm$ 0,0021 <sup>b</sup> | 0,0772 $\pm$ 0,0008 <sup>b</sup> | 0,2121 $\pm$ 0,0006 <sup>b</sup>  | ---                               |
| 3   | IV      | 0,6021 $\pm$ 0,0008 <sup>c</sup> | 0,5002 $\pm$ 0,0010 <sup>c</sup> | 0,0789 $\pm$ 0,0004 <sup>b</sup> | 0,2098 $\pm$ 0,0011 <sup>b</sup>  | ---                               |
| 4   | V       | 0,6046 $\pm$ 0,0008 <sup>c</sup> | 0,5058 $\pm$ 0,0012 <sup>d</sup> | 0,0810 $\pm$ 0,0005 <sup>c</sup> | 0,1970 $\pm$ 0,0011 <sup>c</sup>  | ---                               |
| 5   |         |                                  |                                  |                                  |                                   | ---                               |
| 6   |         |                                  |                                  |                                  |                                   | ---                               |
| 7   | VI      | 0,6162 $\pm$ 0,0014 <sup>d</sup> | 0,5195 $\pm$ 0,0019 <sup>e</sup> | 0,0871 $\pm$ 0,0008 <sup>d</sup> | 0,1716 $\pm$ 0,0014 <sup>d</sup>  | 32,098 $\pm$ 0,0051 <sup>a</sup>  |
| 8   |         |                                  |                                  |                                  |                                   | 52,171 $\pm$ 0,0138 <sup>b</sup>  |
| 9   | VII     | 0,6304 $\pm$ 0,0013 <sup>e</sup> | 0,5401 $\pm$ 0,0024 <sup>f</sup> | 0,0963 $\pm$ 0,0011 <sup>e</sup> | 0,1481 $\pm$ 0,0011 <sup>e</sup>  | 59,198 $\pm$ 0,0031 <sup>c</sup>  |
| 10  |         |                                  |                                  |                                  |                                   | 64,107 $\pm$ 0,0027 <sup>d</sup>  |
| 11  |         |                                  |                                  |                                  |                                   | 77,344 $\pm$ 0,1085 <sup>e</sup>  |
| 12  | VIII    | 0,6501 $\pm$ 0,0012 <sup>f</sup> | 0,5711 $\pm$ 0,0023 <sup>g</sup> | 0,1103 $\pm$ 0,0011 <sup>f</sup> | 0,1325 $\pm$ 0,0014 <sup>f</sup>  | 93,801 $\pm$ 0,0047 <sup>f</sup>  |
| 13  |         |                                  |                                  |                                  |                                   | 115,070 $\pm$ 0,0238 <sup>g</sup> |
| 14  |         |                                  |                                  |                                  |                                   | 115,119 $\pm$ 0,0014 <sup>g</sup> |

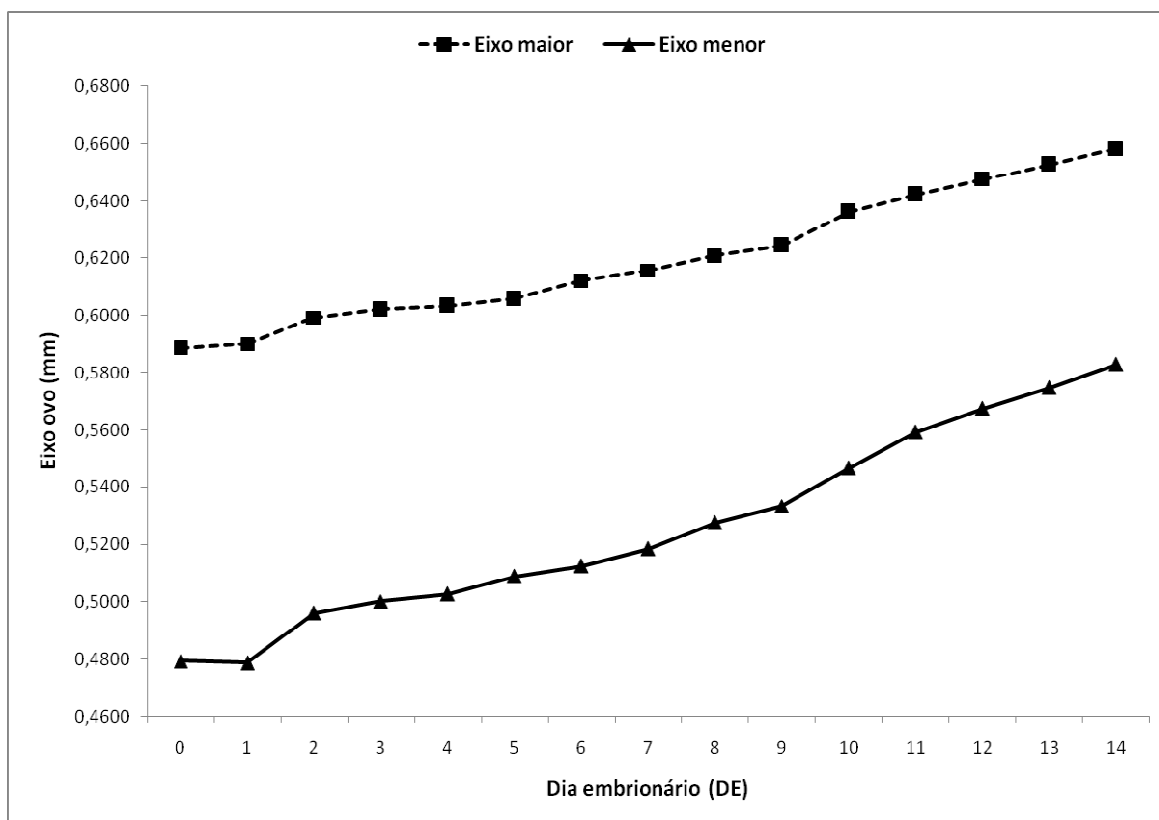


Figura 2. Valores médios do eixo maior e menor dos ovos de *Macrobrachium amazonicum* durante a embriogênese.

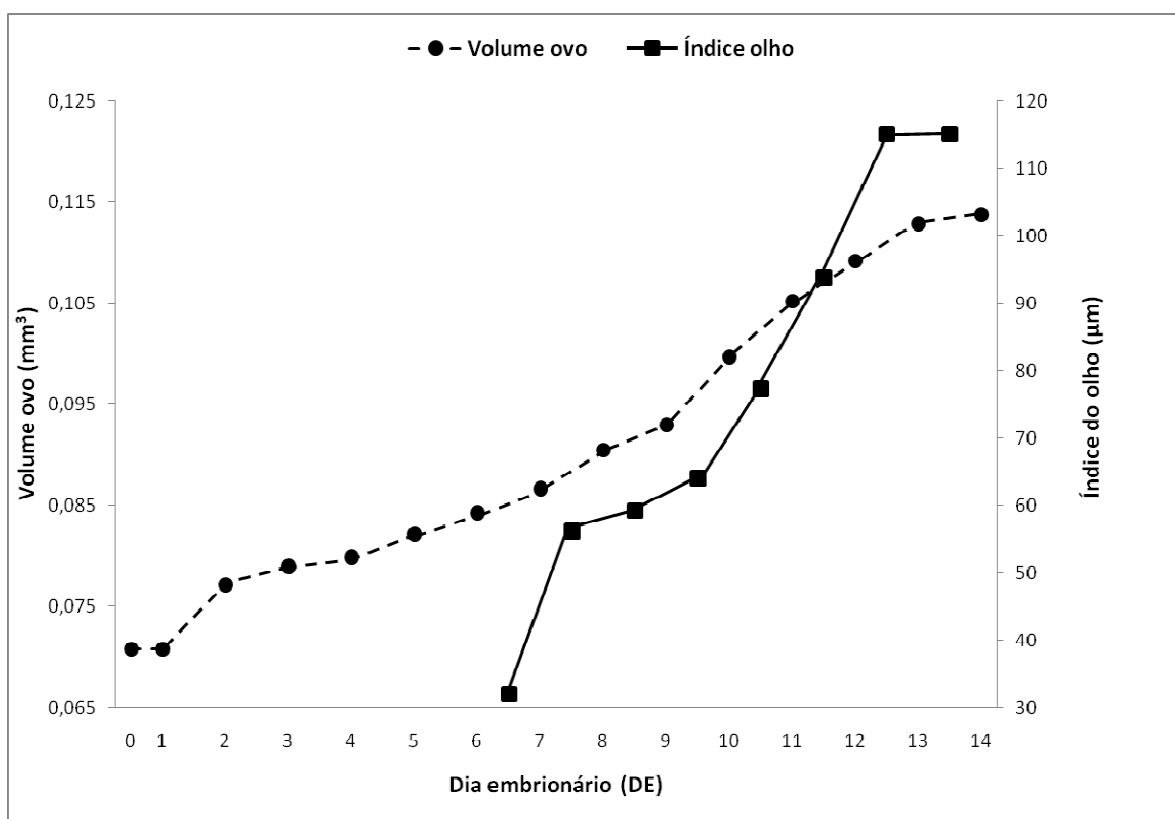


Figura 3. Valores médios do volume do ovo e índice do olho de *Macrobrachium amazonicum* durante a embriogênese.

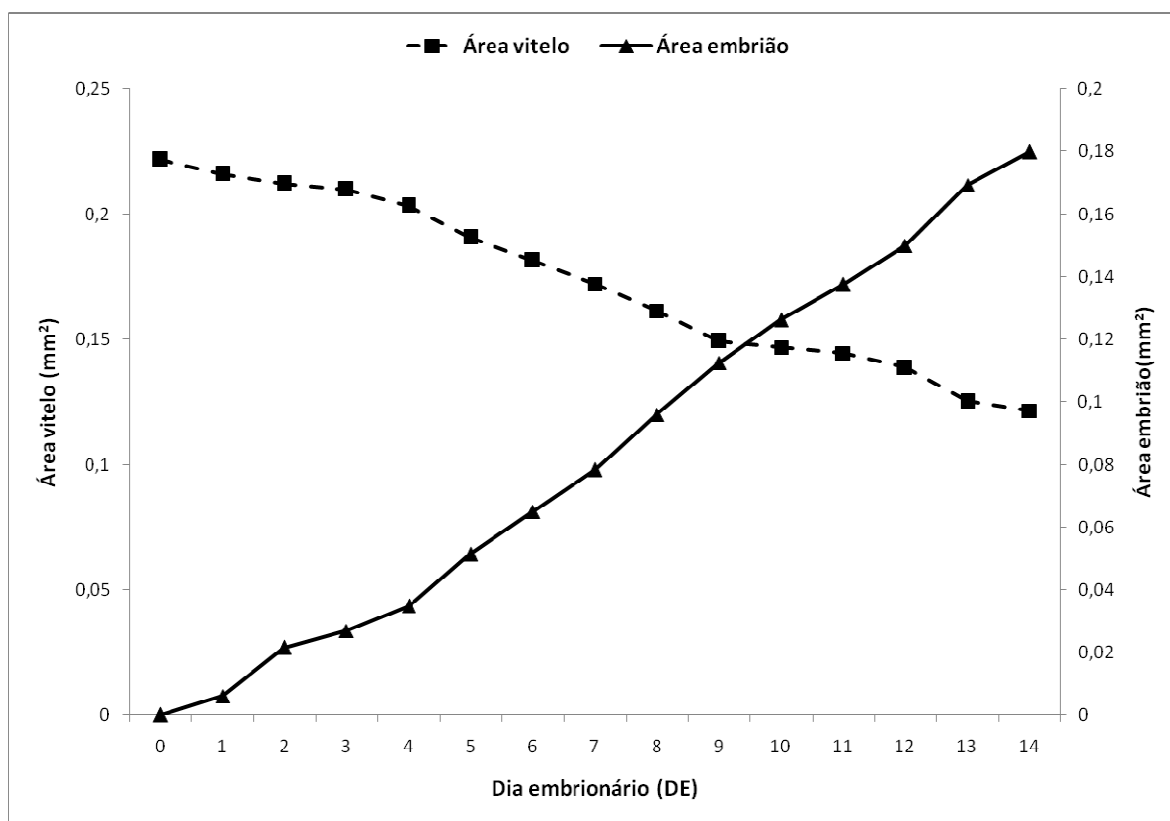


Figura 4. Valores médios da área do embrião e do vitelo de *Macrobrachium amazonicum* durante a embriogênese.

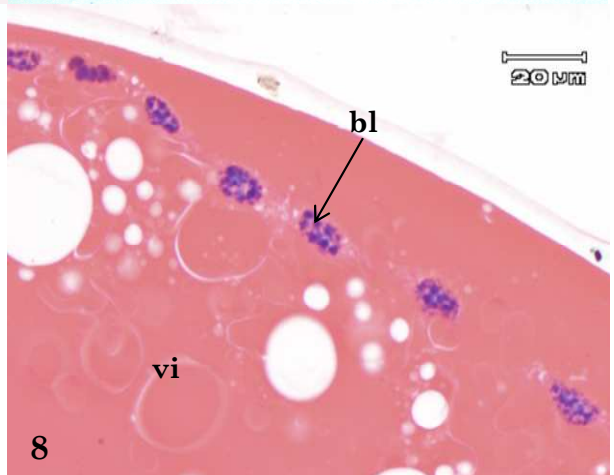
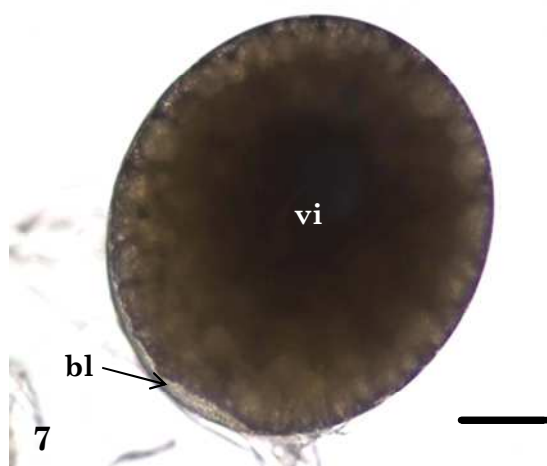
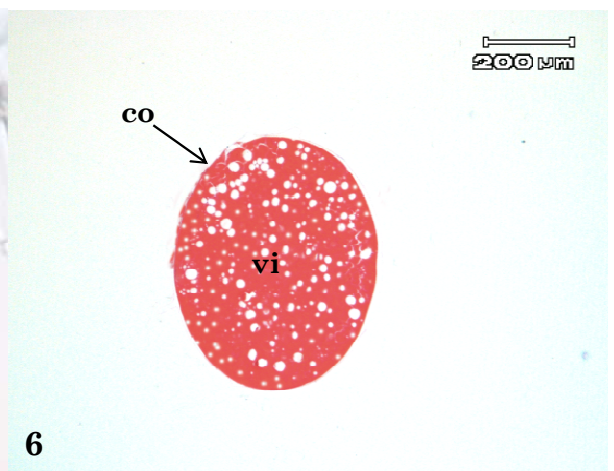
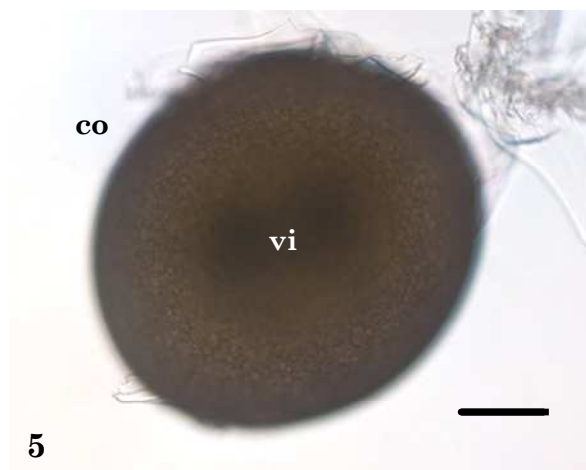
### 5.1 Estágio I. Ovo fertilizado, 0 – 4% do desenvolvimento.

Após a desova na câmara incubadora da fêmea, os ovos fertilizados de *M. amazonicum* apresentam forma elipsoidal, e exibem um córion denso e firmemente ligado à membrana vitelina do ovo (Figura 5). O córion é a membrana externa do ovo, que age como proteção mecânica externa. Esta membrana apresenta-se espessa inicialmente, e à medida que transcorre o desenvolvimento embrionário esta estrutura torna-se cada vez mais fina. O vitelo apresenta-se bastante volumoso e ocupa todo o espaço do ovo (Figuras 5 e 6). A massa de vitelo é constituída por grânulos distribuídos uniformemente (Figura 6) e apresenta uma coloração verde oliva (Figura 5). Neste período não se percebe nenhum indício de divisão celular, nem estrutura embrionária em desenvolvimento. O volume do ovo é de 0,0708 mm<sup>3</sup>.

### 5.2 Estágio II. Clivagem, 4 – 7% do desenvolvimento (DE1).

Durante o primeiro dia embrionário (DE1) ocorre o processo de clivagem, que se inicia aproximadamente 6 horas pós-ovulação (Figura 7). As divisões celulares sucessivas ocorrem e originam 2, 4, 8, 16, 32, 64, 128 células (Figura 8). Na superfície do ovo pode-se observar o aparecimento dos primeiros blastômeros (Figura 8), como resultado da clivagem do pólo animal. Os núcleos se dividem repetidas vezes e os limites celulares dos blastômeros não aparecem definidos dentro da massa de vitelo. O vitelo ocupa a maior parte do ovo e permanece sem segmentar (Figuras 7 e 8). Os blastômeros se concentram na periferia e se dispõem formando uma camada (Figura 8). Os blastômeros constituem a massa celular embrionária responsável pela constituição e formação do embrião e de suas respectivas estruturas. Estas células possuem um tamanho uniforme e seus núcleos são facilmente observados (Figura 8). Durante o processo de clivagem observa-se uma intensa divisão celular, o que gera um aumento rápido no número de blastômeros com a conseqüente diminuição do seu tamanho.

**Figuras 5 - 8.** Visualização do início do desenvolvimento embrionário de *M. amazonicum* sob análise “*in vivo*” (5 e 7) e histológica (6 e 8, corte longitudinal). **(5)** Estágio I. DE0 ovo recém-fertilizado com córion espesso. Barra: 0,125 mm; **(6)** Estágio I. DE0 vitelo muito volumoso; **(7)** Estágio II. DE1 início da clivagem. Barra: 0,125 mm; **(8)** Estágio II. DE1 surgimento dos blastômeros. (bl) blastômeros; (co) córion; (vi) vitelo.



Quando a massa celular atinge um tamanho considerável, inicia-se a formação do blastoderma ou tecido germinativo (Figura 8), o qual está composto de muitas células indiferenciadas, justapostas e de formato poligonal. Posteriormente aparecem os limites celulares que delimitam o blastoderma que circunda o vitelo central não segmentado (Figura 8). O volume do embrião neste estágio é de 0,0708 mm<sup>3</sup>.

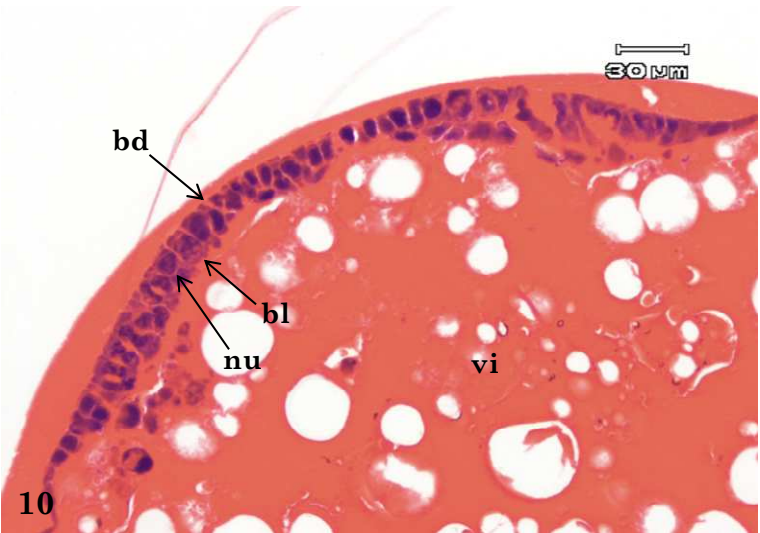
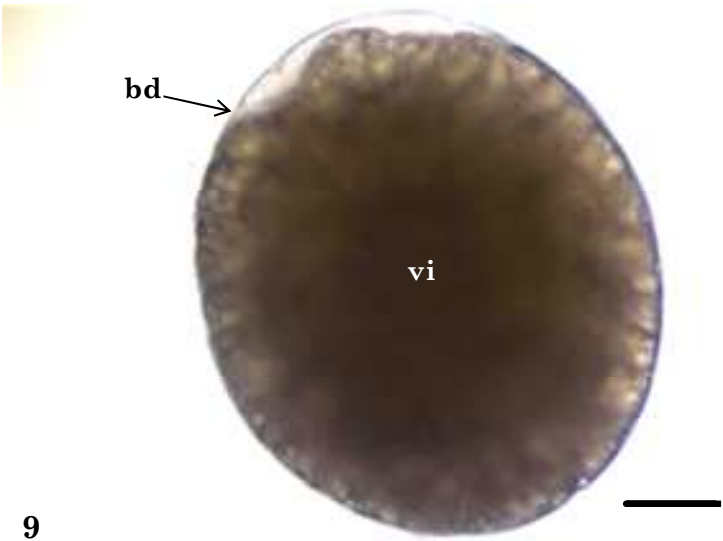
### 5.3 Estágio III. Blástula - Gástrula, 7 – 14% do desenvolvimento (DE2).

Após a formação do blastoderma (Figura 9), os blastômeros exibem um arranjo celular agrupando-se superficialmente e, portanto é possível distinguir uma única camada de células aglomeradas que formam o blastoderma definitivo (Figura 10). Algumas células do blastoderma começam sua migração e agrupam-se numa região determinada do ovo. Este local apresenta muitas células que compõem a região onde será formada a área blastoporal (Figura 11). A gastrulação inicia-se com uma intensa proliferação e migração da massa celular a partir da área blastoporal, em direção de um dos hemisférios do ovo. Posteriormente algumas destas células movimentam-se para o interior do ovo (Figura 11). O conjunto celular origina os tecidos embrionários primordiais e agrupações de células germinativas. A maior parte do volume do ovo é ainda representada pelo vitelo (Figuras 9 e 10). O volume do embrião neste estágio é de 0,0772 mm<sup>3</sup>.

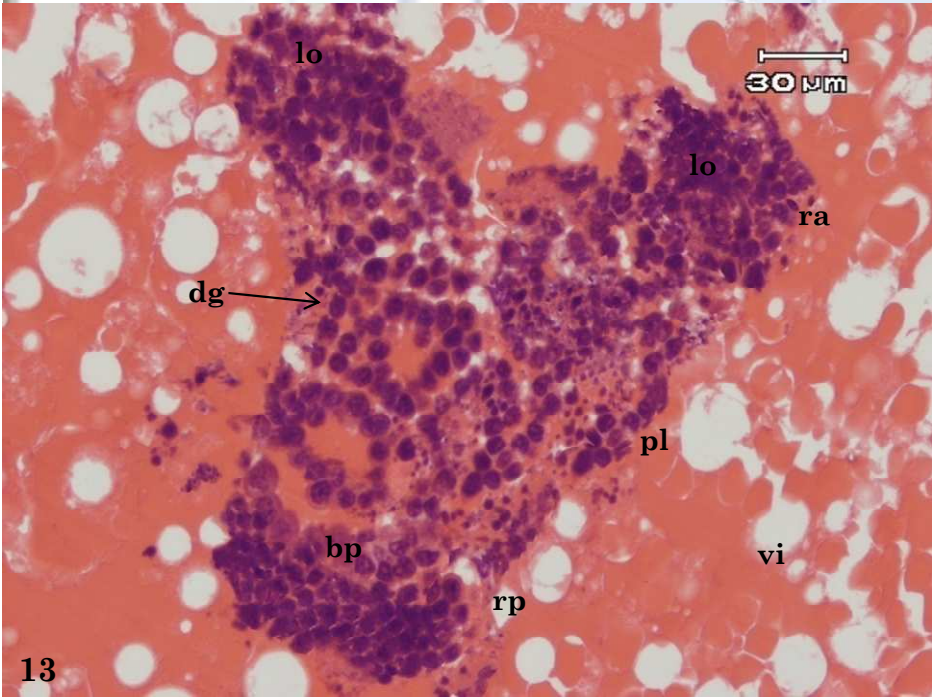
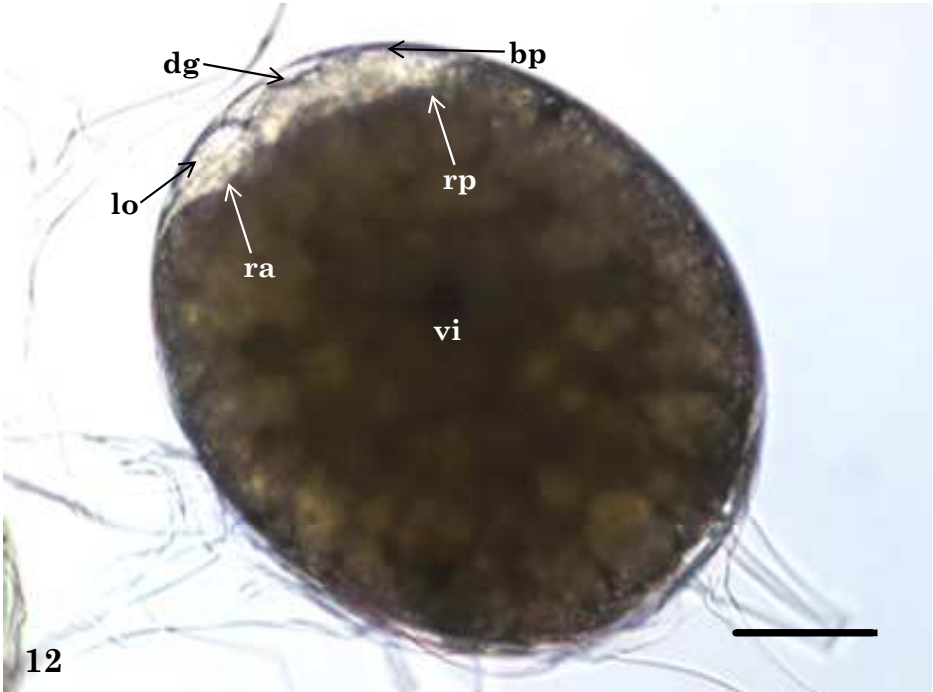
### 5.4 Estágio IV. Disco germinativo, 14 – 21% do desenvolvimento (DE3).

Este estágio corresponde à fase de disco germinativo e ocorre no terceiro dia de desenvolvimento (DE3). A partir desta migração celular, surge uma região com uma grande concentração de células. Posteriormente estas células convergem para organizar o disco germinativo (Figura 12). No decorrer deste dia, o disco germinativo adquire maior tamanho, apresenta-se mais compacto e em corte longitudinal nota-se sua forma de “V” característica (Figura 13). Nesta fase, o disco germinativo é uma estrutura individualizada e dividida em duas partes. Na região anterior do disco germinativo surgem populações celulares com um arranjo simétrico, que correspondem aos primórdios dos lobos ópticos (Figura 13).

**Figuras 9 - 11.** Formação do blastoderma definitivo (tecido germinativo) e início da migração dos blastômeros no segundo dia de desenvolvimento embrionário. **(9)** Estágio III. DE2 processo de clivagem. Barra: 0,125 mm; **(10)** Estágio II. DE2 formação do blastoderma (Corte longitudinal); **(11)** Estágio III. DE2 migração dos blastômeros para o interior do ovo (Corte longitudinal). (bd) blastoderma; (mb) migração dos blastômeros; (nu) núcleo celular; (vi) vitelo.



**Figuras 12 e 13.** Formação do disco germinativo e dos primórdios das estruturas do embrião. **(12)** Estágio IV. DE3 disco germinativo em constituição. Barra: 0,125 mm; **(13)** Estágio IV. DE3 visualização do embrião em forma de “V” e dos primórdios das estruturas do corpo de *M. amazonicum* (Corte dorsal). (bp) área blastoporal; (dg) disco germinativo; (lo) lobo óptico; (pl) ponte de ligação; (ra) região anterior; (rp) região posterior; (vi) vitelo.

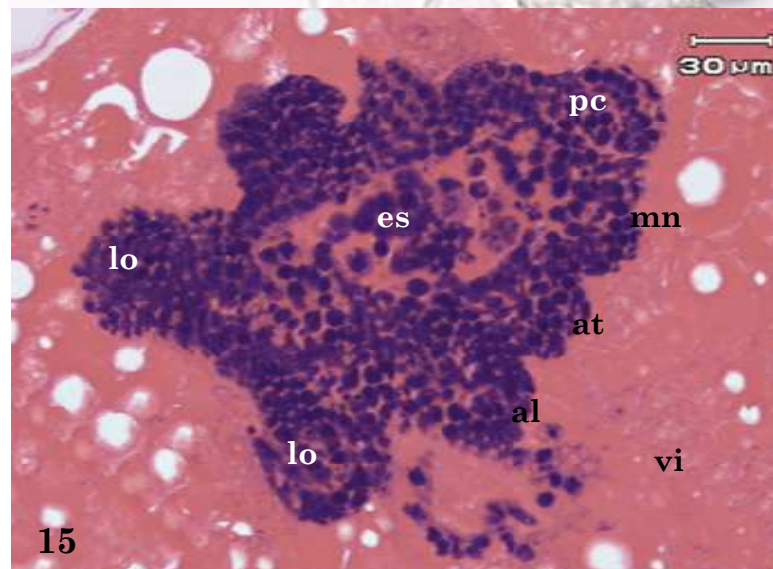


Já na região posterior está localizada a área blastoporal (Figuras 11 e 13), onde se iniciou a migração celular. Uma ponte de ligação, unindo os grupos celulares presentes nas duas extremidades (anterior e posterior), se caracteriza no 3º dia de desenvolvimento (Figura 13). O volume do embrião é de 0,0789 mm<sup>3</sup>.

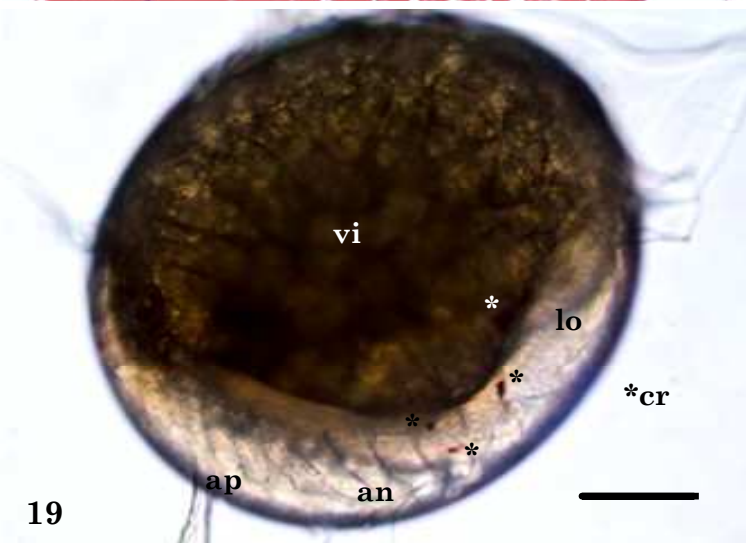
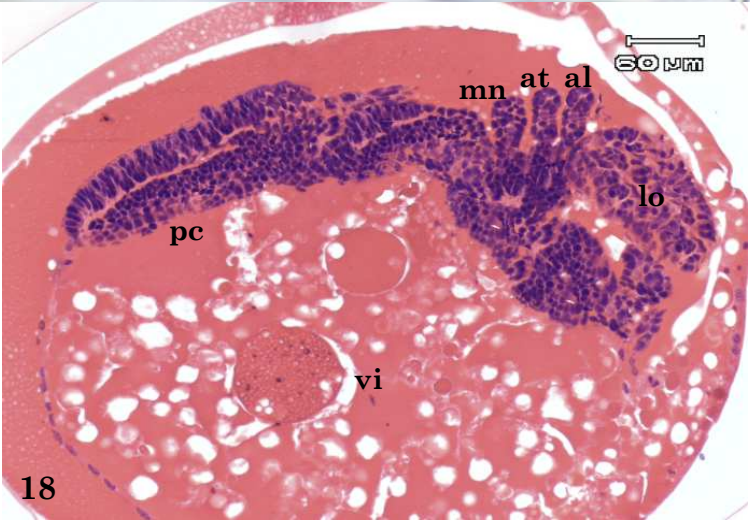
### **5.5 Estágio V. Náuplio embrionizado, 21 – 29% do desenvolvimento (DE4-5).**

Neste estágio organiza-se o náuplio embrionizado, a partir da proliferação e diferenciação celular das regiões anterior e posterior que constituíam o disco germinal. Durante o DE4 o náuplio embrionizado localiza-se num dos pólos do ovo e apresenta grande desenvolvimento (Figura 14). As extremidades, anterior e posterior engrossam-se e alongam-se devido à intensa proliferação celular (Figura 15), e conseqüentemente a delimitação das regiões cefálica e caudal pode ser observada (Figura 15). Na extremidade anterior do náuplio é possível observar três pares de evaginações que formam as primeiras estruturas embrionárias, correspondentes aos primórdios dos apêndices naupliares: antênulas, antenas e mandíbulas (Figura 15). Dos três pares de primórdios dos apêndices, as mandíbulas são aquelas que apresentam menor tamanho, ao contrário das antenas e antênulas que apresentam maior comprimento (Figura 15). Na região central, é formada uma depressão correspondente ao estomodeo (Figuras 14 e 15). Na sequência, a partir do estomodeo, se forma a porção anterior do trato digestivo (esôfago e estômago). Na região posterior do embrião observa-se a área de formação do primórdio da papila caudal (Figuras 15 e 16). Durante o DE5 de desenvolvimento o náuplio cresce longitudinalmente, ou seja, cresce em comprimento (Figura 17). Na região anterior e posterior do embrião são observadas áreas de intensa proliferação celular que marcam os locais de desenvolvimento dos lobos ópticos e da papila caudal (Figuras 17 e 18). Os apêndices naupliares crescem e se alongam em direção à papila caudal (Figura 18). Junto aos apêndices naupliares surgem os apêndices pós naupliares, sendo dificilmente notados os primórdios das maxilas que se organizam lateralmente (Figura 19).

**Figuras 14 - 16.** Constituição do náuplio embrionizado, apêndices e estomodeo. **(14)** Estágio V. DE4 estomodeo constituído. Barra: 0,125 mm; **(15)** Estágio V. DE4 visualização histológica do náuplio embrionizado (Corte dorsal); **(16)** Estágio V. DE4 visualização dos apêndices naupliares. Barra: 0,125 mm. (al) antênula; (at) antena; (es) estomodeo; (lo) lobo óptico; (mn) mandíbula; (na) náuplio embrionizado; (pc) papila caudal; (vi) vitelo.



**Figuras 17 - 19.** Desenvolvimento do náuplio embrionizado. **(17)** Estágio V. DE5 definição das regiões anterior e posterior do embrião. Barra: 0,125 mm; **(18)** Estágio V. DE5 desenvolvimento dos apêndices naupliares (Corte longitudinal); **(19)** Estágio V. DE5 surgimento da pigmentação embrionária (cromatóforos) e primórdios dos apêndices pós naupliares. Barra: 0,125 mm. (al) antênula; (an) apêndices naupliares; (ap) apêndices pós naupliares; (at) antena; (cr) cromatóforos; (lo) lobo óptico; (mn) mandíbula; (pc) papila caudal; (ra) região anterior; (rp) região posterior; (vi) vitelo.



Durante o transcorrer do quinto dia, a papila caudal alonga-se e o embrião recobre a linha media de um dos hemisférios do ovo (Figura 19). Deste modo o náuplio adquire sua forma característica em meia-lua, quando observado lateralmente (Figura 19). No final do quinto dia é possível observar o início da pigmentação embrionária (Figura 19). O volume do embrião para DE4 é de 0,0798 mm<sup>3</sup> e para DE5 é de 0,0821 mm<sup>3</sup>.

### 5.6 Estágio VI. Pós-náuplio, 29 – 50% do desenvolvimento (DE6-8).

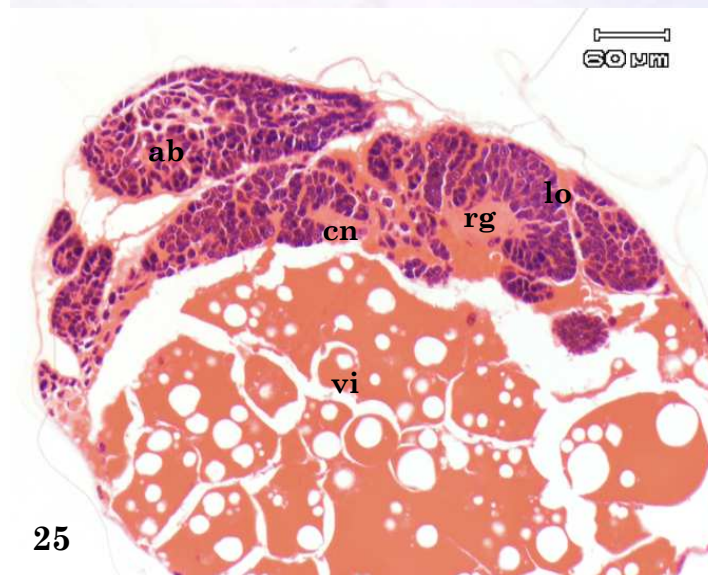
Este estágio está compreendido entre o DE6 e DE8. No transcurso do DE6 se nota um crescimento ativo do pós-náuplio, que aumenta em tamanho, e se alonga assumindo claramente a forma de meia-lua (Figura 20). Os lobos ópticos aumentam seu volume adquirindo um formato circular (Figura 20). No DE6 pode ser observado o início da formação do cordão nervoso ventral (Figura 21). Nesta fase se inicia a formação das maxilas e maxilípedes (apêndices pós naupliares), porém ainda aparecem muito rudimentares. Os apêndices naupliares se projetam em direção à área caudal do embrião (Figura 20) e começam a sua segmentação. As antenas se posicionam sobre as mandíbulas e os primórdios das maxilas e maxilípedes. Durante esta etapa os pereiopódos iniciam seu desenvolvimento projetando-se lateralmente a partir da papila caudal em direção da região cefálica do embrião (Figura 20). A papila caudal se desenvolve e se curva circundando o embrião pela região ventral, em direção dos lobos ópticos (Figuras 20 e 21). O abdômen inicia seu desenvolvimento e torna-se importante destacar que o vitelo se posiciona sobre a porção dorsal do embrião, pode-se observar como inicia a incorporação dos grânulos de vitelo, o que indica a funcionalidade do intestino médio (Figura 20). A pigmentação embrionária está mais avançada e é possível observar cromatóforos adjacentes aos lobos ópticos (Figura 22). A região ocular apresenta uma área pigmentada de coloração vermelha, a qual aparece como uma linha muito fina (Figura 23), o que marca o início da formação do complexo ocular, característica observada durante o DE7. Um conjunto de cromatóforos é distinguível na área perto do olho (Figura 24).

**Figuras 20 - 22.** Desenvolvimento ativo do pós-náuplio, cuja forma é de meia-lua e a papila cresce em direção aos lobos ópticos. **(20)** Estágio VI. DE6 lobo óptico assume forma mais circular e crescimento dos apêndices naupliares em direção à papila caudal. Barra: 0,125 mm; **(21)** Estágio VI. DE6 início da formação do abdômen (Corte longitudinal); **(22)** Estágio VI. DE6 cromatóforos adjacentes aos lobos ópticos. Barra: 0,125 mm. (ab) abdômen; (an) apêndices naupliares; (ap) apêndices pós naupliares; (cr) cromatóforos; (cn) cordão nervoso ventral; (gv) grânulos vitelo; (lo) lobo óptico; (pe) pereiopódos; (vi) vitelo.

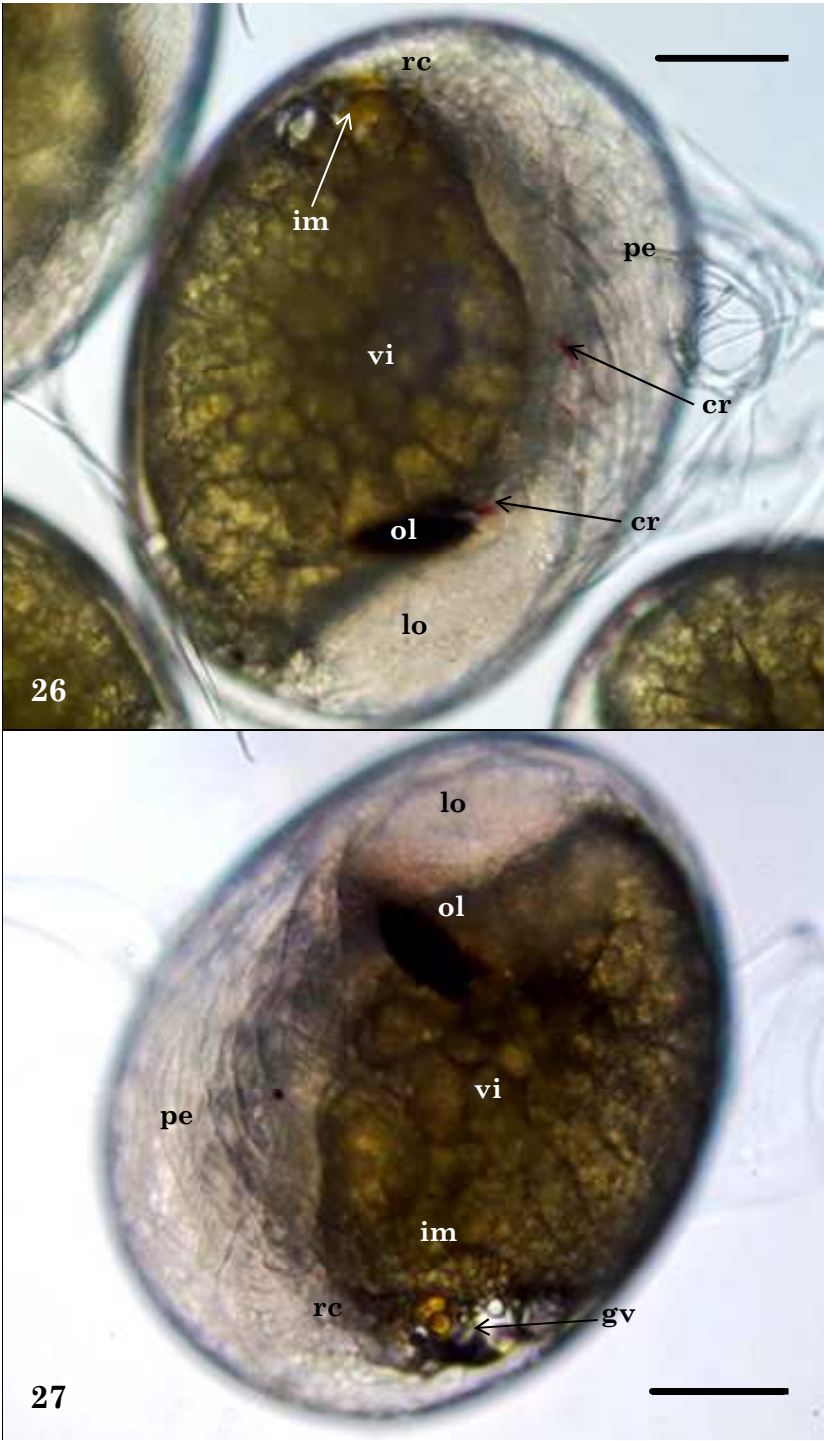


Os apêndices naupliares se apresentam mais finos, e se prolongam sobre os apêndices pós-naupliares. Os pereopódos crescem e se alongam em direção dos lobos ópticos (Figura 24). Na porção cefálica do embrião são percebidos maxilas e maxilípedes. O extremo distal do abdômen encontra-se próximo à região cefálica do embrião (Figura 25). Durante o DE8 os sistemas orgânicos do embrião estão em ativo desenvolvimento e neste momento pode ser notada a atividade cardíaca (Figura 26). O coração apresenta movimentos descontínuos seguidos por longas pausas. Na parte dorsal do embrião se nota como os grânulos de vitelo são incorporados lentamente pelo intestino médio (Figuras 26 e 27). O local onde os grânulos de vitelo são incorporados delimita a futura região do hepatopâncreas. A região pigmentada do olho se desenvolve, aumenta seu tamanho e se mostra de forma elipsoidal (Figuras 26 e 27). Os lobos ópticos aumentam em tamanho e complexidade, destacando-se na região cefálica do embrião. Nesta fase é possível identificar a formação dos omatídios (Figura 28). Associado ao desenvolvimento do complexo ocular observa-se a diferenciação celular dos gânglios cerebrais (Figura 29). O sistema nervoso apresenta os gânglios cerebrais no cefalotórax e continua com o cordão nervoso ventral no abdômen. O cordão nervoso é observado como uma estrutura continua na região ventral do embrião. Este cordão se apresenta desde a região do cefalotórax embrionário até a região caudal (Figura 29). As antênulas e antenas se alongam. Nesta fase, os maxilípedes também se alongam e abdômen torna-se mais espesso (Figura 29). O abdômen se dobra e alonga pela região ventral para alcançar a região cefálica do embrião (Figura 29). O abdômen inicia sua diferenciação com o surgimento dos somitos abdominais (Figura 29). Na extremidade distal da papila caudal se evidencia o rudimento do telson (Figura 30). O embrião apresenta movimentos leves e isolados. O volume do embrião no DE6 é de 0,0842 mm<sup>3</sup>, no DE7 é de 0,0866 mm<sup>3</sup> e no DE8 é de 0,0905 mm<sup>3</sup>.

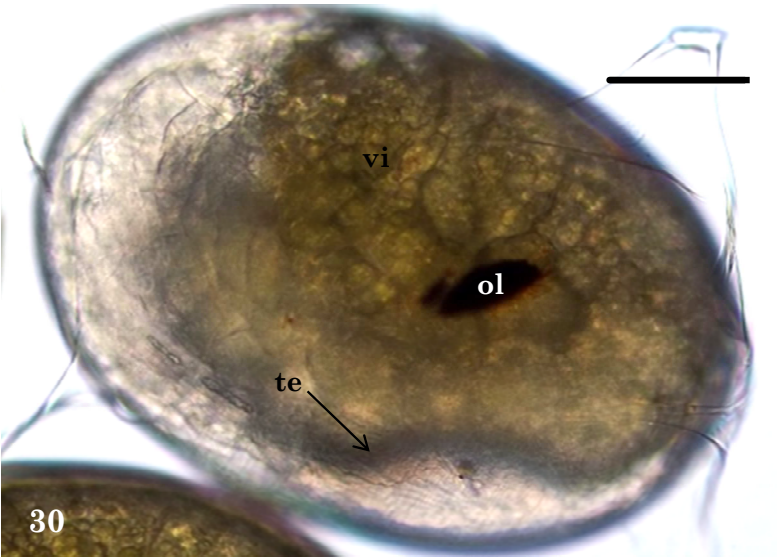
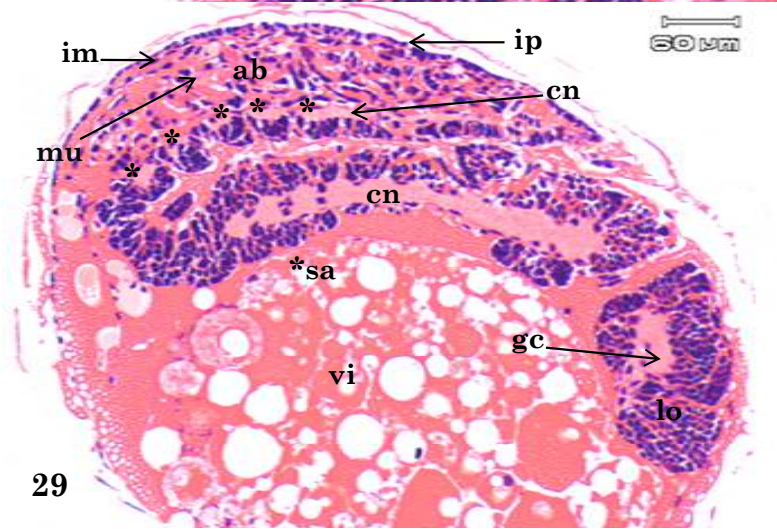
**Figuras 23 - 25.** Formação e desenvolvimento da pigmentação ocular. **(23)** Estágio VI. DE7 surgimento da pigmentação do olho. Barra: 0,125 mm; **(24)** Estágio VI. DE7 conjunto de cromatóforos. Barra: 0,125 mm; **(25)** Estágio VI. DE7 abdômen constituído (Corte longitudinal). (ab) abdômen; (an) apêndices naupliares; (co) córion; (cn) cordão nervoso ventral; (cr) cromatóforos; (lo) lobo óptico; (pe) pereiopódos; (po) pigmentação ocular; (rg) região ganglionar; (vi) vitelo.



**Figuras 26 e 27.** Desenvolvimento do pós-náuplio associado ao processo de organogênese. **(26)** Estágio VI. DE8 visualização da região cardíaca; **(27)** Estágio VI. DE8 incorporação dos grânulos de vitelo, olho assume a forma elipsoidal e o vitelo apresenta coloração amarelo-pálido. (cr) cromatóforos; (gv) grânulos de vitelo; (lo) lobo óptico; (im) intestino médio; (ol) olho; (pe) pereiopódos; (rc) região cardíaca; (vi) vitelo. Barra: 0,125mm.



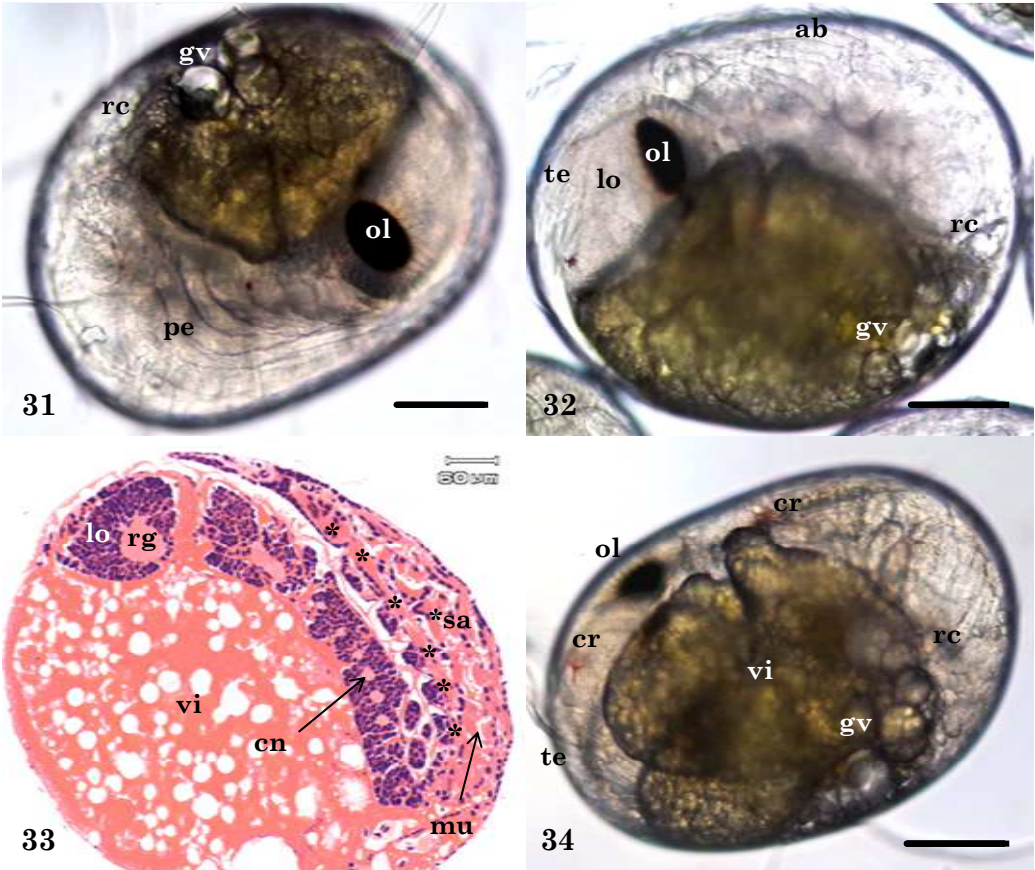
**Figuras 28 - 30.** Desenvolvimento do sistema nervoso, musculatura, intestino, complexo ocular e abdômen. **(28)** Estágio VI. DE8 desenvolvimento da região ocular e omatídeos (Corte longitudinal); **(29)** Estágio VI. DE8 desenvolvimento dos gânglios cerebrais, do cordão nervoso ventral, intestino, engrossamento e segmentação do abdômen (Corte longitudinal); **(30)** Estágio VI. DE8 início da formação do telson. Barra: 0,125 mm. (ab) abdome; (cn) cordão nervoso ventral; (gc) gânglio cerebral; (lo) lobo óptico; (im) intestino médio; (ip) intestino posterior; (mu) musculatura; (ol) olho; (om) omatídio; (sa) somitos abdominais; (te) telson; (vi) vitelo.



### 5.7 Estágio VII. Protozoa, 50 – 64% do desenvolvimento (DE9- 10).

Durante o DE9 os olhos se destacam como estruturas mais complexas, aumentados em tamanho, e do mesmo modo, a pigmentação ocular aumenta a sua área, aparecendo cada vez mais circular (Figura 31). Neste estágio, os omatídios podem ser distinguidos. A porção distal do abdômen atinge a região cefálica do embrião e ultrapassa os lobos ópticos (Figuras 31, 32 e 33). O abdômen se diferencia e se organiza totalmente com o estabelecimento dos somitos abdominais, e a musculatura se desenvolve (Figura 33). O telson pode ser evidenciado mais claramente (Figura 32). Na região do cefalotórax pode ser percebida uma grande atividade devida à absorção do vitelo pelo embrião. Nesta fase, o vitelo adquire uma coloração mais amarelada e apresenta-se granular e concentrado (Figuras 31 e 32). O coração pode ser observado na região próxima do dobramento ventral do abdômen (Figuras 31 e 32). Os movimentos do coração são mais regulares, se apresentam mais uniformes e com períodos de pausa de menor duração. O embrião exibe movimentos musculares mais intensos no abdômen, porém menos freqüentes. No DE10 o complexo ocular se mostra mais definido. Os olhos se apresentam laterais e sua forma é quase circular (Figura 34). Os lobos ópticos aparecem claramente diferenciados (Figuras 34 e 35). Neste estágio, a segmentação do abdômen é evidente, e na extremidade distal o telson está mais desenvolvido e exibe varias cerdas na sua margem (Figuras 34 e 35). O número de cromatóforos aumenta e se concentram na região do cefalotórax embrionário (Figura 34). No cefalotórax, o coração pulsa de forma mais contínua e regular. Os apêndices torácicos têm movimentos sutis e com o desenvolvimento da musculatura abdominal se notam ligeiros movimentos na região caudal. O volume do embrião para DE9 é de 0,0930 mm<sup>3</sup> e no DE10 é de 0,0996 mm<sup>3</sup>.

**Figuras 31 - 34.** Visualização do desenvolvimento embrionário final do camarão-da-amazonia. **(31)** Estágio VII. DE9 olhos já assumem forma quase circular. Barra: 0,125 mm; **(32)** Estágio VII. DE9 o abdômen atinge a região cefálica. Barra: 0,125 mm; **(33)** Estágio VII. DE9 estabelecem-se os somitos abdominais e o desenvolvimento da musculatura (Corte longitudinal); **(34)** Estágio VII. DE10 observação das estruturas cromatóforo, vitelo, grânulos de vitelo, olho, e da região cardíaca. Barra: 0,125 mm. (ab) abdômen; (cn) cordão nervoso ventral; (cr) cromatóforo; (gv) grânulos de vitelo; (lo) lobo óptico; (mu) musculatura; (ol) olho; (pe) pereiopódos; (rc) região cardíaca; (rc) região ganglionar; (sa) somitos abdominais; (te) telson; (vi) vitelo.



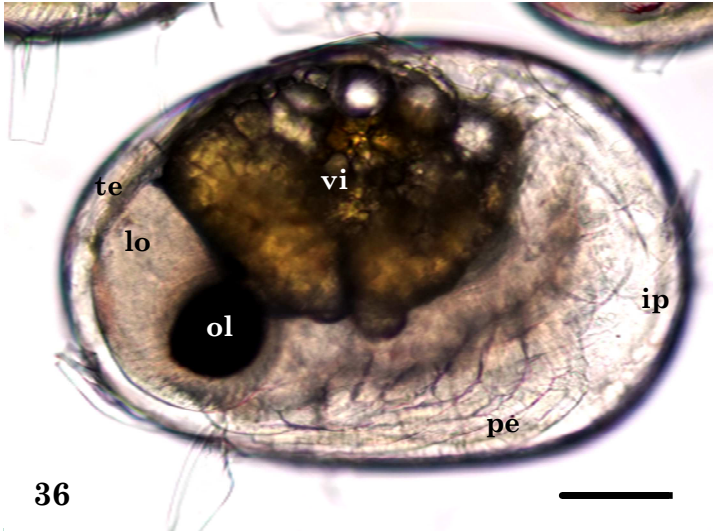
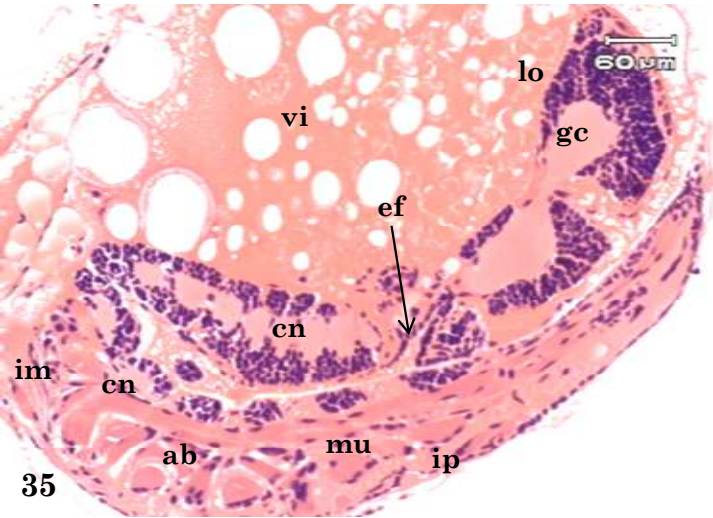
### 5.8 Estágio VIII. Zoea, 64 – 100% do desenvolvimento (DE 11-14).

Este estágio abrange desde os dias décimo primeiro ao décimo quarto. Nota-se grande desenvolvimento do abdômen e da musculatura do embrião (Figuras 37 e 40). Os sistemas nervoso e digestivo se desenvolvem e podem-se observar o cordão nervoso ventral, gânglios cerebrais, esôfago, intestino médio e posterior (Figuras 37 e 40). Na região cefálica, os lobos ópticos (Figura 36) são ocupados em grande parte pelos olhos. A área pigmentada do olho aumenta consideravelmente. Os olhos estão compostos por unidades sensoriais ou omatídios (Figura 38). Cada omatídio está composto por um grupo de células reticulares pigmentadas, associado a uma célula fotossensível conhecida por rabdoma (Figura 38). O rabdoma é uma célula sem pigmento (Figura 38) que se continua por uma porção nervosa, que posteriormente formara o nervo óptico. As células reticulares apresentam duas regiões distintas, o corpo celular pigmentado e a região do núcleo (Figura 38). Ressalta-se que a região da membrana basal em formação separa as porções fotossensível e ganglionar de cada omatídio (Figura 38). A região nuclear das células reticulares pigmentadas apresenta-se distal à membrana basal e suporta a região onde se observa um aglomerado celular que desenvolverá o cristalino (Figura 38).

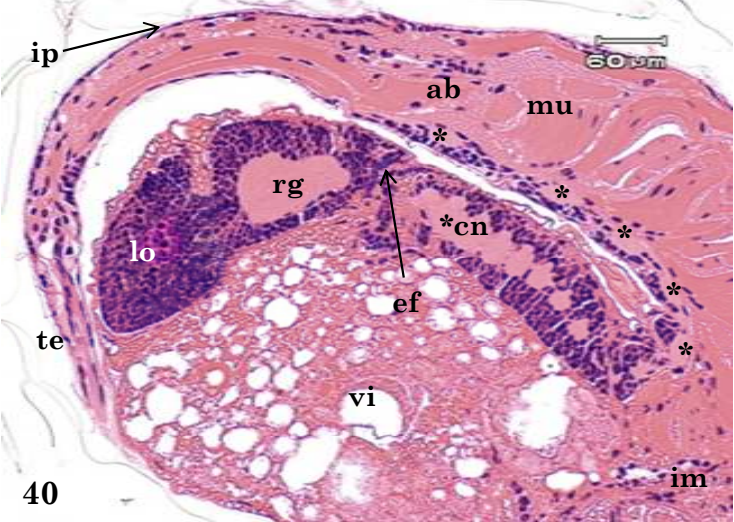
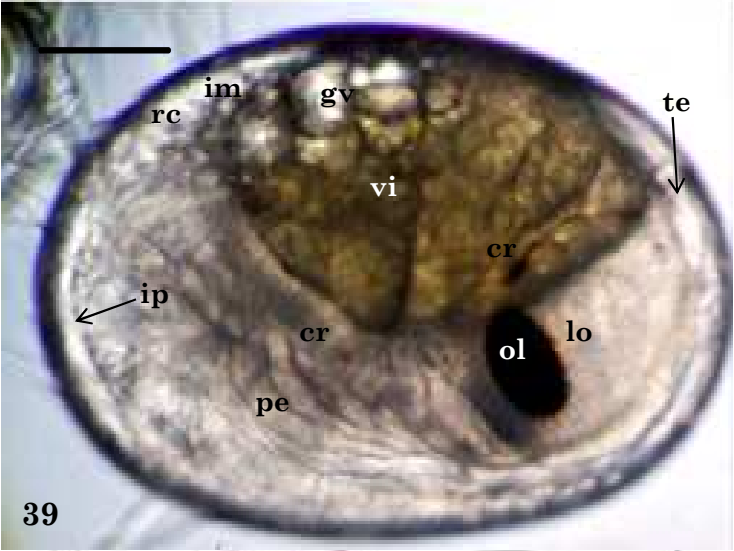
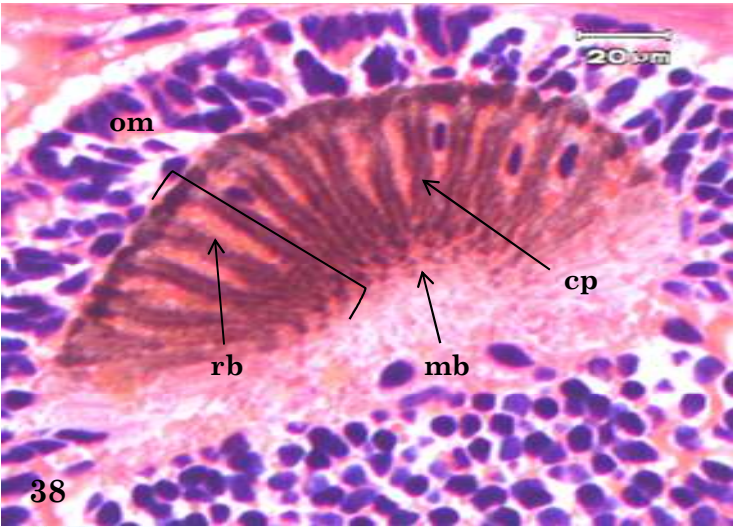
Os movimentos cardíacos são mais regulares e estão mais intensos. Na região dorsal do abdômen são observados numerosos grânulos intestinais próximos ao coração (Figura 39). Estes grânulos são assimilados na região de transição entre o intestino anterior e o médio, mediante movimentos contínuos. O cordão nervoso é observado na zona ventral do abdômen. No transcorrer do DE12, o embrião apresenta seu tamanho muito próximo ao definitivo. Nesta fase, o embrião ocupa aproximadamente todo o espaço disponível no ovo (Figuras 36, 37, 39 e 40). A disposição do embrião no ovo possibilita o acomodamento dos pereiópodos abaixo do abdômen. Os apêndices naupliares e pós naupliares estão bem definidos e desenvolvidos. A segmentação dos apêndices é observada, além da presença de pequenas cerdas. Uma leve movimentação destes apêndices se inicia nesta fase. O abdômen se mostra bem formado, a musculatura e seus segmentos aparecem claramente definidos (Figura 40). Na porção distal do abdômen o telson apresenta múltiplas cerdas

na sua margem (Figura 41). O exoesqueleto inicia sua formação e irá proteger o embrião, e posteriormente a larva. Sua observação é evidente no cefalotórax e nota-se que o embrião incorpora o vitelo na região do cefalotórax, onde o exoesqueleto é mais evidente (Figura 41). A quantidade de vitelo diminuiu, devido à alta atividade metabólica do embrião, e os grânulos são mobilizados de forma intensa (Figura 41). O intestino aparece como um cordão na parte dorsal do abdômen e suas porções anterior, média e posterior estão delimitadas (Figura 41). No DE13, o embrião completa seu desenvolvimento e se encontra coberto pelo exoesqueleto endurecido (Figura 41). A área correspondente aos lobos ópticos está ocupada pelos olhos circulares (Figura 42). Os apêndices naupliares e pós naupliares se encontram definidos e segmentados, e exibem numerosas cerdas. O abdômen agora se encontra totalmente desenvolvido (Figura 40), e na borda do telson são observadas abundantes cerdas alongadas (Figura 41). O volume ocupado pelo vitelo é mínimo e apresenta uma coloração amarelada, restrito à região dorsal do cefalotórax do embrião (Figura 41). Os movimentos do coração são rítmicos e constantes. No término do DE13 (Figura 42) e início do DE14 (Figura 43) os embriões estão completamente formados. As mudanças mais importantes fazem referência à maturação dos órgãos internos. Os apêndices sensoriais e locomotores adquirem sua forma definitiva. Os olhos esféricos estão totalmente formados e ocupam uma grande parte da área cefálica. A carapaça aparece como uma cutícula externa que reveste a região do cefalotórax embrionário e atua como barreira de proteção externa. A quantidade de vitelo é mínima, localizada no cefalotórax e constitui uma reserva energética para a larva. O embrião finaliza seu desenvolvimento e apresenta intensos movimentos musculares no abdômen que auxiliam no rompimento do córion. O volume do embrião para DE11 é de  $0,1052 \text{ mm}^3$ , no DE12 é de  $0,1092 \text{ mm}^3$ , no DE13 é de  $0,1129 \text{ mm}^3$  e no DE14 é de  $0,1138 \text{ mm}^3$ .

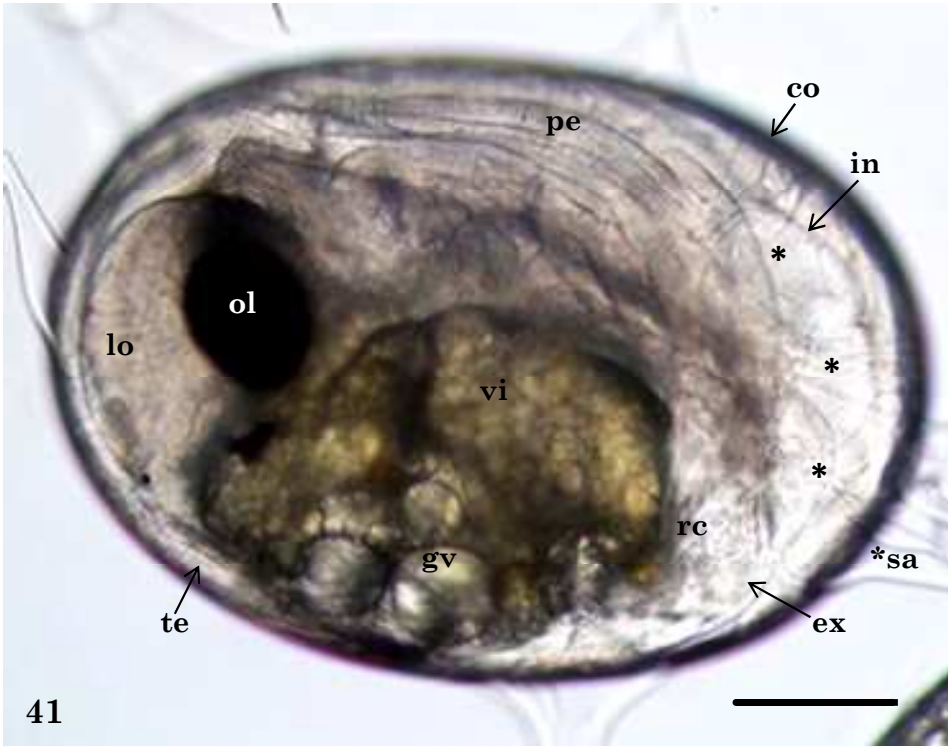
**Figuras 35 - 37.** Embrião bem desenvolvido, visualização do vitelo já com volume bastante reduzido. **(35)** Estágio VII. DE10 visualização dos lobos ópticos, cordão nervoso ventral, intestino e musculatura (Corte longitudinal); **(36)** Estágio VIII. DE11 os olhos posicionam-se laterais e apresentam-se circulares. Barra: 0,125 mm; **(37)** Estágio VIII. DE12 o embrião quase pronto para eclodir, grande desenvolvimento da musculatura (Corte longitudinal). (ab) abdômen; (cn) cordão nervoso ventral; (cr) cromatóforo; (ef) esôfago; (gc) gânglio cerebral; (im) intestino médio; (ip) intestino posterior; (lo) lobo óptico; (ol) olho; (pe) pereiopódos; (te) telson; (vi) vitelo.



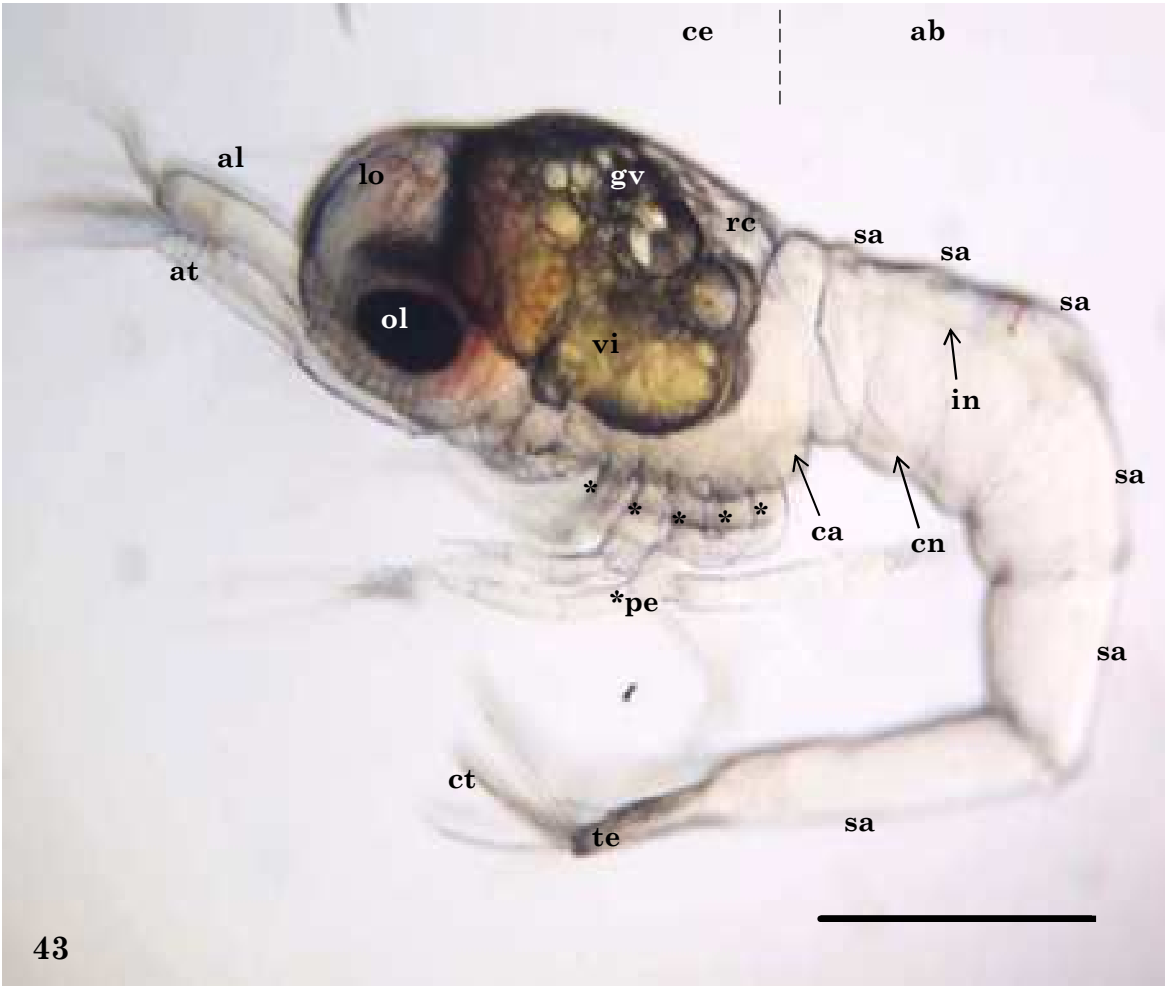
**Figuras 38 - 40.** Embrião na fase final do desenvolvimento. **(38)** Estágio VIII. DE11 formação e desenvolvimento do olho e de suas estruturas (Corte longitudinal); **(39)** Estágio VIII. DE12. Barra: 0,125 mm; **(40)** Estágio VIII. DE13 (Corte longitudinal). (ab) abdômen; (cn) cordão nervoso ventral; (cp) células pigmentadas; (cr) cromatóforos; (ef) esôfago; (gv) grânulos vitelo; (im) intestino médio; (ip) intestino posterior; (lo) lobo óptico; (mb) membrana basal; (mu) musculatura; (ol) olho; (om) omatídio; (pe) pereipódos; (rb) rabdoma; (rc) região cardíaca; (rg) região ganglionar; (te) telson; (vi) vitelo.



**Figuras 41 e 42.** Visualização do embrião de *M. amazonicum* desenvolvido e pronto para a eclosão. **(41)** Estágio VIII. DE13 camarão-da-amazônia ao final da embriogênese, quando se evidencia o olho circular; **(42)** Estágio VIII. DE13 embriões completamente formados ao momento da eclosão, com pequenas mudanças relacionadas à maturação dos órgãos internos. (ab) abdômen; (co) córion; (cr) cromatóforo; (ex) exoesqueleto; (gv) grânulos de vitelo; (in) intestino; (lo) lobo óptico; (ol) olho; (pe) pereiópodos; (rc) região cardíaca; (sa) somitos abdominais; (te) telson; (vi) vitelo. Barra: 0,125 mm.



**Figura 43.** Estágio VIII. DE14. Visualização “*in vivo*” das estruturas corporais externas constituintes da larva de *M. amazonicum*, logo após o momento da eclosão. (ab) abdômen; (al) antênula; (at) antena; (ca) carapaça do cefalotórax; (ce) cefalotórax; (cn) cordão nervoso ventral; (ct) cerdas do telson; (gv) grânulos de vitelo; (in) intestino; (lo) lobo óptico; (ol) olho; (pe) pereiópodos; (rc) região do coração; (sa) segmentos abdominais; (te) telson; (vi) vitelo. Barra: 0,5mm.



## **6. DISCUSSÃO**

## 6. DISCUSSÃO

A utilização da metodologia de estagiamento foi suficiente e de fácil aplicação para descrever a embriogênese de *M. amazonicum*, sendo também freqüentemente empregada em outras espécies de decápodes (SANDEMAN R.; SANDEMAN D., 1991; NAZARI et al., 2000; GARCÍA-GUERRERO et al., 2003; MÜLLER et al., 2003; GARCÍA-GUERRERO; HENDRICKX, 2009). Segundo Müller et al. (2003) este tipo de métodos são indicados para estudos de embriologia em crustáceos, devido à organização em períodos de desenvolvimento homogêneos, permite o acompanhamento dos eventos durante a embriogênese e a análise comparativa do desenvolvimento embrionário entre espécies.

As características morfológicas externas e internas do *Macrobrachium amazonicum* observadas no presente estudo correspondem ao padrão descrito para espécies do mesmo gênero, tais como *M. acanthurus* (MÜLLER et al., 2007), *M. americanum* (GARCÍA-GUERRERO; HENDRICKX, 2009), *M. borelli* (LAVARIAS et al., 2002), *M. carcinus* (MÜLLER, 1984), *M. olfersi* (MÜLLER et al., 2003; MÜLLER et al., 2004; SIMÕES-COSTA et al., 2005), *M. potiuna* (MÜLLER et al., 2004) e *M. rosenbergii* (ZHAO et al., 1998a, 1998b). Segundo García-Guerrero e Hendrickx (2009), o desenvolvimento embrionário das espécies do gênero *Macrobrachium* quando confrontado com o de outros crustáceos decápodes como *Cherax destructor* (SANDEMAN R.; SANDEMAN D., 1991) ou *Cherax quadricarinatus* (GARCÍA-GUERRERO et al., 2003) aparece semelhante. Mesmo assim, seu desenvolvimento também é contínuo e apresentam características comuns, tais como clivagem superficial, organização do disco germinativo e do náuplio embrionizado, entre outras.

Comparando-se o estudo feito com a espécie *M. amazonicum* a outros estudos realizados nas espécies do mesmo gênero e outras espécies de decápodes, pode-se inferir que tanto os ritmos da embriogênese quanto às estruturas e órgãos que são constituídos ao longo dos períodos embrionários apresentam analogias entre as espécies (Tabela 2). Essa semelhança presente

no desenvolvimento embrionário entre espécies do mesmo gênero justifica a aplicação do método de estagiamento para descrever a embriogênese. Apesar de esta semelhança, o número de dias de desenvolvimento embrionário varia consideravelmente entre as espécies (GARCIA-GUERRERO; HENDRICKX, 2009). Estas diferenças entre os tempos de incubação podem estar relacionadas a fatores endógenos e também podem ser influenciados por fatores exógenos (CELADA et al., 1991).

É possível que as diferenças no tempo de desenvolvimento entre espécies congêneras possam estar relacionadas às condições ambientais, tais como a influência da temperatura da água (CELADA et al., 1991) ou às próprias características ontogênicas intrínsecas da espécie. Os eventos internos que ocorrem no corpo do embrião estão intimamente correlacionados com a ontogenia externa (SANDEMAN R.; SANDEMAN D., 1991). Os padrões de desenvolvimento podem ser estabelecidos mediante a associação entre os ritmos de formação das estruturas internas quanto externas, esta relação que permite entender mais claramente a embriogênese nas espécies de crustáceos.

De um modo geral, a aplicação do critério de descrição por estagiamento e a divisão por fases explica de maneira apropriada o desenvolvimento ontogênico de *M. amazonicum*. O padrão de desenvolvimento contínuo e o aparecimento das estruturas embrionárias externas e internas, permite a comparação da embriogênese de espécies próximas, concordando com os estudos realizados por Celada et al. (1991), Dupré et al. (1992), García-Guerrero e Hendricx (2004, 2006a, 2006b, 2009), García-Guerrero et al. (2003), Helluy e Beltz (1990, 1991); Lavarias et al. (2002), Lizardo-Daudt e Bond-Buckup (2003), Müller (1984), Müller et al. (1999, 2003, 2004, 2007), Nagao et al. (1999), Nazari et al. (2000), Perkins (1972); Pinheiro e Hattori (2002, 2003), Rudolph e Rojas (2003), Sandeman R. e Sandeman D. (1991), Simões-Costa et al. (2005), Stevens (2006), Weygoldt (1961), Yávar e Dupré (2007) e Zhao et al. (1998a, 1998b). Embora a utilização desta metodologia possa estar condicionada a fatores genéticos, de manejo e do meio ambiente, o desenvolvimento embrionário entre crustáceos conserva características

ancestrais comuns derivadas das relações filogenéticas e morfológicas (ANDERSON, 1973, 1982; HERTZLER et al., 1994; HERTZLER, 2002, 2005; SCHOLTZ, 2000).

Tabela 2. Dados comparativos dos tempos de embriogênese em algumas espécies de decápodes.

| Espécie                   | Embriogênese<br>(Dias) | Numero<br>estágios | Temperatura | Referência                                             |
|---------------------------|------------------------|--------------------|-------------|--------------------------------------------------------|
| <i>A. cribrarius</i>      | 8                      | VIII               | 25°C        | (PINHEIRO; HATTORI, 2002)                              |
| <i>A. pallipes</i>        | 82                     | XV                 | 15,5°C      | (CELADA et al., 1991)                                  |
| <i>A. pisonii</i>         | 14                     | VIII               | 26-28°C     | (GARCÍA-GUERRERO; HENDRICKX, 2004)                     |
| <i>A. platensis</i>       | 35                     | X                  | 23-30°C     | (LIZARDO-DAUDT; BOND-BUCKUP, 2003)                     |
| <i>C. caementarius</i>    | 25-28                  | VII                | 25°C        | (YÁVAR; DUPRÉ, 2007)                                   |
| <i>C. destructor</i>      | 40                     | XX                 | 19°C        | (SANDEMAN R.; SANDEMAN D., 1991)                       |
| <i>C. quadricarinatus</i> | 31                     | X                  | 26°C        | (GARCÍA-GUERRERO et al., 2003)                         |
| <i>E. canalensis</i>      | 13                     | VIII               | 26-28°C     | (GARCÍA-GUERRERO; HENDRICKX, 2006b)                    |
| <i>E. isenbeckii</i>      | 360                    | IX                 | 5.7°C       | (NAGAO et al., 1999)                                   |
| <i>G. pulchra</i>         | 15                     | IX                 | 26-28°C     | (GARCÍA-GUERRERO; HENDRICKX, 2004)                     |
| <i>H. americanus</i>      | 180                    | XVI                | 18°C        | (HELLUY; BELTZ, 1991)                                  |
| <i>M. acanthurus</i>      | 16                     | XVI                | 26°C        | (MÜLLER et al., 2007)                                  |
| <i>M. amazonicum</i>      | 14                     | VIII               | 26°C        | PRESENTE ESTUDO                                        |
| <i>M. americanum</i>      | 18                     | X                  | 24°C        | (GARCÍA-GUERRERO; HENDRICKX, 2009)                     |
| <i>M. borellii</i>        | 39                     | VII                | 24°C        | (LAVARIAS et al., 2002)                                |
| <i>M. olfersi</i>         | 14                     | X – XIV            | 25-26°C     | (MÜLLER et al., 2003, 2004; SIMÕES-COSTA et al., 2005) |
| <i>M. potiuna</i>         | 21                     | VIII               | 26°C        | (MÜLLER et al., 2004)                                  |
| <i>M. rosenbergii</i>     | 20                     | VII                | 28°C        | (ZHAO et al., 1998a)                                   |
| <i>P. argentinus</i>      | 10-12                  | VIII-X             | 23-26°C     | (NAZARI et al., 2000; MÜLLER et al., 2004)             |
| <i>P. armatus</i>         | 19                     | VIII               | 25-26°C     | (GARCÍA-GUERRERO; HENDRICKX, 2006a)                    |
| <i>P. chilensis</i>       | 13                     | VIII               | 26-28°C     | (GARCÍA-GUERRERO; HENDRICKX, 2006b)                    |
| <i>P. pandaliformis</i>   | 13                     | VIII               | 26°C        | (MÜLLER et al., 2004)                                  |
| <i>P. platypus</i>        | 381-409                | XII                | 5,2°C       | (STEVENS, 2006)                                        |
| <i>P. robsonae</i>        | 19                     | VIII               | 25-26°C     | (GARCÍA-GUERRERO; HENDRICKX, 2006a)                    |
| <i>P. fallax</i>          | -                      | X                  | 18-22°C     | (ALWES; SCHOLTZ, 2006 )                                |
| <i>R. typus</i>           | 20,8-52                | X                  | 13-21°C     | (DUPRÉ et al., 1992)                                   |
| <i>U. cordatus</i>        | 19                     | VIII               | 27°C        | (PINHEIRO; HATTORI, 2003)                              |
| <i>V. araucanius</i>      | 120                    | V                  | 10-21°C     | (RUDOLPH; ROJAS, 2003)                                 |

O desenvolvimento ontogênico de *M. amazonicum* é curto quando comparado com outras espécies de decápodes, como as espécies de caranguejos *E. isenbeckii* (NAGAO et al., 1999) e *P. platypus* (STEVENS, 2006), a lagosta *H. americanus* (HELLUY; BELTZ, 1991) e o camarão *V. araucanius* (RUDOLPH; ROJAS, 2003), mas coincide aproximadamente ao tempo

observado em outras espécies (Tabela 2). Assim, a embriogênese de *M. amazonicum* foi organizada em oito estágios de desenvolvimento: I. Ovo fertilizado; II. Clivagem; III. Blástula – Gástrula; IV. Disco germinativo; V. Náuplio embrionizado; VI. Pós-nauplio ou Metanáuplio; VII. Protozoa e VIII. Zoa (YAO et al., 2006; ZHAO et al., 1998a). A desova equivale a 0% e a eclosão a 100% da embriogênese (MÜLLER et al., 2003; SANDEMAN R., SANDEMAN D., 1991).

Após a desova, os ovos fertilizados de *M. amazonicum* são elipsoidais, com córion denso e ligado à membrana vitelina, ricos em vitelo e de coloração verde oliva. O vitelo aparece granular e distribuído homogeneamente no ovo. Estas características são compartilhadas por espécies do mesmo gênero, além das espécies *A. cribarius* (PINHEIRO; HATTORI, 2002), *C. caementarius* (YAVÁR; DUPRÉ, 2007), *C. destructor* (SANDEMAN R.; SANDEMAN D., 1991) e *U. cordatus* (PINHEIRO; HATTORI, 2003).

Entretanto, Dupré et al. (1992), García-Guerrero e Hendrickx (2006b) e Nagao et al. (1999) reportaram ovos predominantemente esféricos para *R. typus*, *E. canalensis* - *P. chilensis* e *E. isenbeckii* respectivamente. O tamanho e a coloração dos ovos no gênero *Macrobrachium* apresentam variações entre as espécies, embora seja possível encontrarem-se desde ovos pequenos como em *M. olfersi* (MÜLLER et al., 2003, 2004), até ovos grandes como em *M. borellii* e *M. potiuna* (NAZARI et al., 2003). A coloração dos ovos varia entre os tons esverdeados, amarelados e tons marrons. As mudanças cromáticas nos ovos durante a embriogênese é uma característica comum nos crustáceos (PINHEIRO; HATTORI, 2002). Estas mudanças estão principalmente relacionadas à utilização do vitelo durante o desenvolvimento, sua quantidade diminui progressivamente até a eclosão.

As reservas vitelínicas têm como função nutrir o embrião ao longo do desenvolvimento (CELADA et al., 1991). Assim, esta reserva energética é utilizada durante os processos metabólicos, de estruturação, maturação e crescimento embrionário (NAZARI et al., 2000).

As medições biométricas feitas nos ovos e embriões de *M. amazonicum* demonstraram um aumento gradual no decorrer do período de incubação, padrão também foi reportado para *A. pisonii* (GARCÍA-GUERRERO; HENDRICKX, 2004), *A. cribrarius* (PINHEIRO; HATTORI, 2002a), *C. caementarius* (YÁVAR; DUPRÉ, 2007), *E. isenbeckii* (NAGAO et al., 1999), *E. canalensis* (GARCÍA-GUERRERO; HENDRICKX, 2006b), *G. pulchra* (GARCÍA-GUERRERO; HENDRICKX, 2004), *H. americanus* (HELLUY; BELTZ, 1991), *M. acanthurus* (MÜLLER et al., 2007), *M. amazonicum* (ODINETZ-COLLART; RABELO, 1996), *M. Borelli* (LAVARIAS et al., 2002), *M. olfersi* (MÜLLER et al., 2003, 2004; NAZARI et al., 2003), *M. potiuna* (NAZARI et al., 2003), *P. armatus* (GARCÍA-GUERRERO; HENDRICKX, 2006a), *P. robsonae* (GARCÍA-GUERRERO; HENDRICKX, 2006a), *P. pandaliformis* (MÜLLER et al., 2004), *P. argentinus* (MÜLLER et al., 2004; NAZARI et al., 2000), *P. chilensis* (GARCÍA-GUERRERO; HENDRICKX, 2006b), *R. typus* (DUPRÉ et al., 1992), *U. cordatus* (PINHEIRO; HATTORI, 2003b) e *V. araucanius* (RUDOLPH; ROJAS, 2003).

Em relação às medições dos eixos maior e menor dos ovos, observou-se um incremento gradual durante o período de desenvolvimento, porém as mudanças mais significativas apresentam-se nos valores do eixo maior, à medida que a embriogênese transcorre (Tabela 1). Assim, o crescimento do ovo é de tipo longitudinal, e o incremento é claramente notado durante os últimos estágios prévios a eclosão (Figura 1). Isto devido ao ativo crescimento do embrião. Estas observações coincidem com o reportado por Odinetz-Collart e Rabelo (1996), que relataram que o diâmetro dos ovos de *M. amazonicum* aumenta durante o período de incubação. Esta tendência foi observada nas espécies de palaemonídeos e algumas outras espécies de crustáceos decápodes estudadas, onde os ovos apresentaram um formato predominantemente elipsoidal, esta característica morfológica determina que o crescimento do ovo seja principalmente de tipo longitudinal (GARCÍA-GUERRERO, HENDRICKX, 2003; GARCÍA-GUERRERO, HENDRICKX, 2004, 2006a, 2006b; LIZARDO-DAUDT, BOND-BUCKUP, 2003; PINHEIRO, HATTORI,

2002, 2003; MÜLLER et al., 2003, 2004, 2007; NAGAO et al., 1999; NAZARI et al., 2000; STEVENS, 2006). Lavarias et al. (2002) mencionam que o incremento do tamanho dos ovos de *M. borellii* está relacionado com a entrada de água e o crescimento embrionário, e como resultado o diâmetro dos ovos aumenta. O eixo menor apresentou um comportamento semelhante, no entanto o incremento foi menor quando comparado com o eixo maior.

Durante o desenvolvimento embrionário de *M. amazonicum* os ovos aumentaram seu volume de  $0,0708 \text{ mm}^3 (\pm 0,0004)$  para  $0,1103 \text{ mm}^3 (\pm 0,0011)$ . Estes valores correspondem às médias registradas em ovos fertilizados e embriões próximos a eclosão. Por outro lado, Odinetz-Collart e Rabelo (1996) reportaram para *M. amazonicum* ovos recém desovados e pré-eclosão com tamanhos de  $0,14$  e  $0,20 \text{ mm}^3$  respectivamente; assim, estes ovos procedentes da bacia do rio Tocantins e classificados como pequenos são claramente maiores aos registrados neste estudo. Confrontando os dados obtidos neste estudo com os valores do volume do ovo registrado em outras espécies de decápodes, evidencia-se que os ovos e embriões de *M. amazonicum* apresentaram tamanhos equivalentes e/ou menores (Tabela 3). O aumento no volume dos ovos durante a embriogênese se apresenta como uma característica comum entre os crustáceos. O aumento do volume está diretamente associado ao crescimento do embrião, em resposta as mudanças que experimenta o embrião durante o período de desenvolvimento. Esta característica morfométrica apresenta variações entre as espécies de crustáceos decápodes, inclusive quando comparada com as espécies do mesmo gênero (Tabela 3).

No decorrer do período de incubação de *M. amazonicum* a área ocupada pelo embrião aumentou a partir do primeiro dia de desenvolvimento, alcançando seu máximo valor no dia 14 (Figura 3). O aumento da área corporal embrionária se dá em resposta à intensa proliferação e diferenciação celular, o que se relaciona com os processos de organogênese e crescimento. Este padrão também foi descrito para *E. isenbeckii*, onde o tamanho da área embrionária e da pigmentação do olho estiveram estreitamente correlacionadas com o desenvolvimento embrionário (NAGAO et al., 1999). Resultados semelhantes

CAUNESP

foram reportados por Pinheiro e Hattori (2003) para *U. cordatus*, que apresenta um acentuado incremento da área ocupada pelo embrião a partir do IV estágio do desenvolvimento. De acordo com Stevens (2006), durante o extenso desenvolvimento embrionário de *P. platypus* a área do embrião mostrou uma gradual diminuição desde a desova até o dia 72, posteriormente começou a aumentar de forma constante e alcançou um platô entre os dias 240 e 329, já na fase final da embriogênese foi observado um rápido incremento desde o dia 353 até o dia 381, quando se iniciou a eclosão. Estas observações confirmam que as características associadas ao desenvolvimento são espécie específicas e estão afetadas por fatores tanto intrínsecos quanto extrínsecos.

A avaliação da proporção entre as áreas do vitelo e do embrião dos ovos de *M. amazonicum*, comprovaram a existência de uma relação inversamente proporcional; assim, a área do vitelo diminuiu constantemente a partir do primeiro dia e apresentou seu menor valor no dia 14 (Figura 3), devido à utilização das reservas vitelínicas pelo embrião, para o mantimento dos processos metabólicos, organogênese, estruturação dos componentes embrionários e especialmente o crescimento. Este é um dos eventos característicos do desenvolvimento, sendo verificado nas espécies de crustáceos estudadas (Tabela 2). A redução da área do vitelo foi analisada por Lavarias et al. (2002), Pinheiro e Hattori (2003) e Stevens (2006), os autores concluíram que a área do vitelo decresce gradualmente, sendo que durante a fase final da embriogênese diminui mais rapidamente, já que o vitelo é intensamente absorvido pelo embrião.

Os primeiros estágios do desenvolvimento de *M. amazonicum* (I, II, III, IV) compreendidos desde 0 até 21% do desenvolvimento seguem o padrão descrito para crustáceos decápodes. Os primeiros eventos, ou seja, as primeiras divisões celulares são perceptíveis, e geralmente apresentam características comuns propostas para os diversos crustáceos.

Nas etapas iniciais do desenvolvimento notam-se repetidas divisões celulares. Neste contexto, como regra geral, na maioria dos crustáceos com

ovos ricos em vitelo, incluindo as espécies do gênero *Macrobrachium*, o fato de apresentarem clivagem superficial parcial ou meroblástica (ANDERSON, 1982; HELLUY, BELTZ, 1991; SCHOLTZ, 2000; HERTZLER, 2002; ZHAO et al., 1998b).

O padrão de desenvolvimento embrionário do *M. amazonicum* mostra uma seqüência de eventos semelhante às demais espécies descritas do gênero *Macrobrachium* e outras espécies de decápodes (Tabela 2).

Tabela 3. Volume médio de embriões de algumas espécies de decápodes durante a fase inicial e final do período de incubação.

| Espécie                | Volume médio mm <sup>3</sup> |        | Referência                          |
|------------------------|------------------------------|--------|-------------------------------------|
|                        | Inicial                      | Final  |                                     |
| <i>A. cribarius</i>    | 0,0100                       | 0,0192 | (PINHEIRO; HATTORI, 2002)           |
| <i>A. pisonii</i>      | 0,0966                       | 0,1247 | (GARCÍA-GUERRERO; HENDRICKX, 2004)  |
| <i>C. caementarius</i> | 0,0830                       | 0,1250 | (YÁVAR; DUPRÉ, 2007)                |
| <i>E. canalensis</i>   | 0,0141                       | 0,0287 | (GARCÍA-GUERRERO; HENDRICKX, 2006b) |
| <i>G. pulchra</i>      | 0,1130                       | 0,1328 | (GARCÍA-GUERRERO; HENDRICKX, 2004)  |
| <i>M. acanthurus</i>   | 0,052                        | 0,109  | (MÜLLER et al., 2007)               |
| <i>M. amazonicum</i>   | 0,14                         | 0,20   | (ODINETZ-COLLART; RABELO, 1996)     |
| <i>M. amazonicum</i>   | 0,0708                       | 0,1138 | PRESENTE ESTUDO                     |
| <i>M. olfersi</i>      | 0,0229                       | 0,0720 | (MÜLLER et al., 2003)               |
| <i>M. olfersi</i>      | 0,035                        | 0,056  | (NAZARI et al., 2003)               |
| <i>M. potiuna</i>      | 1,789                        | 2,290  | (NAZARI et al., 2003)               |
| <i>P. armatus</i>      | 0,0194                       | 0,0256 | (GARCÍA-GUERRERO; HENDRICKX, 2006a) |
| <i>P. chilensis</i>    | 0,0141                       | 0,0206 | (GARCÍA-GUERRERO; HENDRICKX, 2006b) |
| <i>P. robsonae</i>     | 0,0227                       | 0,0297 | (GARCÍA-GUERRERO; HENDRICKX, 2006a) |
| <i>U. cordatus</i>     | 0,0411                       | 0,0788 | (PINHEIRO; HATTORI, 2003)           |

Entende-se por seqüência de eventos, a formação do blastoderma e dos tecidos embrionários primários ectoderma, endoderma e mesoderma (ZHAO et al., 1998b). Seguidamente forma-se o disco germinal, primórdios dos lobos ópticos, apêndices naupliares e mandibulares.

Nos organismos aquáticos existe uma relação inversamente proporcional entre os processos fisiológicos/metabólicos e a temperatura. Este

fato é também observado em crustáceos, onde a incubação dos ovos, desenvolvimento embrionário e crescimento, são espécie específicos e dependentes da temperatura (DUPRÉ et al., 1992; HELLUY, BELTZ, 1991; NAGAO et al., 1999).

A clivagem é um processo semelhante entre os diferentes gêneros de crustáceos, e segue um padrão comum para as espécies dentro de um mesmo gênero. Segundo a literatura, as espécies estudadas do gênero *Macrobrachium* apresentam clivagem do tipo superficial, que se inicia pouco tempo após a fertilização. No primeiro dia de desenvolvimento de *M. acanthurus* (MÜLLER et al., 2007), *M. americanum* (GARCÍA-GUERRERO; HENDRICKX, 2009), *M. olfersi* (MÜLLER et al., 2003; MÜLLER et al., 2004; SIMÕES-COSTA et al., 2005), e *M. potiuna* (MÜLLER et al., 2004) foi registrada a clivagem. Da mesma forma, Zhao et al. (1998a, 1998b) observaram que em *M. rosenbergii*, 3 ou 4 horas pós fertilização inicia-se a clivagem, a uma temperatura de 28°C.

Por outro lado, em outras espécies de decápodes a clivagem se apresentou mais tardiamente. Nas lagostas do gênero *Cherax*, a clivagem foi observada a partir do segundo dia pós-fertilização (SANDEMAN R., SANDEMAN D., 1991; GARCÍA-GUERRERO et al., 2003). Na lagosta americana (*H. americanus*) ocorre nos primeiros oito dias do desenvolvimento. Para o Hair crab (*E. isenbeckii*), Nagao et al. (1999), observaram que a clivagem ocorreu treze dias após a desova. Stevens (2006) demonstrou que em Blue king crab (*P. platypus*), as primeiras divisões celulares podem ser observadas após quatro dias.

Assim, é importante ressaltar que o início das clivagens é espécie específico. O ovo freqüentemente produz e armazena RNA mensageiros que serão utilizados somente após a fertilização. Aqueles mRNA permanecem num estado latente até que são ativados por sinais iônicos que se propagam a través do ovo durante a ovulação e/ou a fertilização (GILBERT, 2010). Alguns destes mRNA codificam proteínas que serão utilizadas na clivagem, quando o embrião produz grandes quantidades de cromatina, membrana celular e componentes

do citoesqueleto. Alguns mRNA codificam proteínas cíclinas que regulam os tempos das primeiras divisões celulares (ROSENTHAL et al., 1980; STANDART et al., 1986, citados por GILBERT, 2010). Assim, em muitas espécies a manutenção das taxas normais e o padrão das divisões celulares iniciais, não precisam do núcleo, em seu lugar, é necessária a síntese contínua de proteínas a partir dos mRNA maternos que foram armazenados (WAGENAAR, MAZIA, 1978; EDGAR et al., 1994, citados por GILBERT, 2010).

No decorrer do desenvolvimento de *M. amazonicum* ocorre o aparecimento dos blastômeros que inicialmente, apresentam grande tamanho e núcleos claramente visíveis. Os blastômeros diminuem seu tamanho e aumentam em número, devido às repetidas divisões celulares, característica também comum para outros crustáceos, independentemente da espécie e da duração da embriogênese (NAZARI et al., 2000; MÜLLER et al., 2003; SIMÕES-COSTA et al., 2005; STEVENS, 2006; ZHAO et al., 1998a, 1998b). A migração celular é observada durante a fase de gastrulação. O movimento celular ocorre a partir das células do blastoderma organizadas na área blastoporal (ZHAO et al., 1998b). O movimento celular é uma consequência da proliferação celular superficial e posterior entrada para a parte interna do vitelo (ANDERSON, 1982). Este tipo de migração celular foi observado em *M. amazonicum* no presente estudo, e também em *A. platensis*, *E. isenbeckii*, *M. olfersi* e *M. rosenbergii* (LIZARDO-DAUDT, BOND-BUCKUP, 2003; NAGAO et al., 1999; MÜLLER et al., 2003, 2007; ZHAO et al., 1998a, 1998b). Esta migração celular a partir do blastoderma é acompanhada por mudanças na forma dos blastômeros que migram para o interior do ovo para organizar camadas celulares (MÜLLER et al., 2003, 2007; SIMÕES-COSTA et al., 2005; ZHAO et al., 1998a, 1998b).

A migração celular ocorre em quatro estágios, segundo Gilbert (2010). O primeiro estágio é a polarização, onde as células definem sua orientação anterior e posterior. A polarização pode ser dirigida por sinais de difusão ou por sinais procedentes da matriz extracelular. Estes sinais reorganizam o

citoesqueleto, de modo que as células possuem uma parte anterior e uma posterior, e estas regiões na célula são estruturalmente diferentes (RODIONOV, BORISY, 1997; MALIKOV et al., 2005, citados por GILBERT, 2010). O segundo estágio é a protrusão das margens celulares. Assim, a força mecânica que participa da protrusão é a polimerização dos microfilamentos de actina da membrana celular, e forma bandas cumpridas ou largas camadas. O terceiro estágio implica a adesão das células ao substrato extracelular. As integrinas (proteínas) atravessam a membrana celular e conectam a matriz extracelular com o citoesqueleto, de este modo se formam pontos de adesão, onde a membrana está em contato com a matriz extracelular. Finalmente, no quarto estágio os pontos de adesão na parte posterior são liberados, o que permite a migração celular para frente.

Assim, durante o estágio de disco germinativo, as células se organizam formando regiões de alta densidade celular. Nesta fase ocorre à estruturação do embrião na típica forma de “V” descrita para as espécies citadas do gênero *Macrobrachium* e outras espécies de decápodes (HELLUY, BELTZ, 1991; MÜLLER et al., 1984, 2003, 2004, 2007; SIMÕES-COSTA et al., 2005; ZHAO et al., 1998a, 1998b). Embora existam algumas diferenças como no caso de *E. isenbeckii* (NAGAO et al., 1999) e *P. pandaliformis* (MÜLLER et al., 2004) onde o disco germinativo defere da clássica forma em “V” e apresenta forma de “U”.

Como consequência da grande proliferação e migração celular, e do alongamento das regiões anterior e média, o embrião adquire uma forma triangular (BRESSAN; MÜLLER, 1997). Este modelo de desenvolvimento foi observado em *M. amazonicum* e também em *M. carcinus* (MÜLLER, 1984).

No estágio subsequente (V) que vai desde 21 até 29% da embriogênese de *M. amazonicum*, observa-se que a partir do disco germinativo organiza-se o náuplio embrionizado, evento típico dos crustáceos com desenvolvimento meroblástico (ANDERSON, 1973, 1982; MÜLLER, 1984; HELLUY, BELTZ, 1991; SANDEMAN R., SANDEMAN D., 1991; SCHOLTZ, 2000). O arranjo do náuplio em *M. amazonicum* é semelhante com o observado

por Bressan e Müller (1997). O desenvolvimento foi caracterizado pelos processos de organogênese e morfogênese. Na sequência de eventos os primórdios dos lobos ópticos são as primeiras estruturas a se formar, seguidos por antênulas, antenas e mandíbulas. Depois da diferenciação das estruturas a fase naupliar é finalizada pelo aparecimento da morfologia do náuplio embrionizado.

Nos crustáceos que se desenvolvem a partir de ovos pequenos, como no caso dos Branchiopoda, Cephalocarida, Cirripeda, Copepoda, Eucarida, Mystacocarida, Penaeidea e Ostracoda, a eclosão libera o embrião na forma de náuplio (ANDERSON, 1982). Segundo Scholtz (2000) entre os Malacostracos o náuplio é observado unicamente nos representantes da ordem Euphausiacea, e nos camarões decápodes da subordem Dendrobranchiata. Por outro lado, nos crustáceos que se desenvolvem em ovos grandes, o estágio naupliar ocorre durante a embriogênese e, portanto nestes casos é denominado náuplio embrionizado. Esta característica é principalmente observada nos Malacostracos (ANDERSON, 1982). O náuplio embrionizado está amplamente distribuído entre os crustáceos Malacostracos. Encontra-se nos membros das Ordens Leptostraca, Stomatopoda, Thermosbaenacea, Syncarida e Decapoda (Infra-ordens Caridea e Reptantia) (SCHOLTZ, 2000). O náuplio embrionizado é associado com os ovos ricos em vitelo, mas não está necessariamente correlacionado ao desenvolvimento direto. Este tipo de desenvolvimento é encontrado nos crustáceos das ordens Leptostraca, Syncarida, Thermosbaenacea e alguns Decapoda, tais como os caranguejos de água doce e lagostas.

Os crustáceos que apresentam o náuplio numa forma embrionizada exibem o embrião superficialmente no ovo sobre a massa de vitelo. O náuplio está constituído por três regiões claramente diferenciadas: A região anterior está ocupada pelos lobos ópticos, são visíveis três pares de apêndices naupliares (antênulas, antenas e mandíbulas) e na região posterior do embrião encontra-se a papila caudal. Na região central observa-se o estomodeo

(ANDERSON, 1982; MÜLLER, 1984; HELLUY, BELTZ, 1990, 1991; SCHOLTZ, 2000).

Estas características do náuplio embrionizado também foram confirmadas para *M. amazonicum* e para outras espécies de crustáceos decápodes, e especialmente para as espécies do gênero *Macrobrachium*. As diferenças entre espécies estão principalmente relacionadas com os tempos de desenvolvimento e surgimento das estruturas.

Neste contexto, o *M. olfersi*, é a única espécie que desenvolve o náuplio num período de tempo igual ao observado para *M. amazonicum*, no presente estudo. Em *M. olfersi* (MÜLLER et al., 2003; SIMÕES-COSTA et al., 2005) e *M. amazonicum* o náuplio organizou-se entre os dias quatro e cinco, ou seja, correspondente ao 21 a 29% do desenvolvimento. Um comportamento similar foi observado em *M. acanthurus* e *M. americanum*, onde o náuplio se desenvolve entre o quinto e sexto dia (MÜLLER et al., 2007; GARCÍA-GUERRERO, HENDRICKX, 2009).

Já para outras espécies de decápodes, o náuplio em sua forma embrionizada apresentou-se mais tardiamente, como relatado para *H. americanus* (HELLUY; BELTZ, 1991), *E. isenbeckii* (NAGAO et al., 1999) e *P. platypus* (STEVENS, 2006), uma vez que o período de desenvolvimento embrionário ocorre entre 180 e 400 dias.

Segundo Rabalais e Gore (1985), as espécies que apresentam o náuplio embrionizado como um estágio do desenvolvimento embrionário, exibem um desenvolvimento prolongado. A eclosão se produz numa forma larvária avançada chamada zoea, morfologicamente mais complexa que o náuplio, presente nos ovos oligolécitos e mesolécitos. Para os ovos centrolécitos algumas fases larvárias podem ser retidas no ovo, o que resulta num desenvolvimento larval abreviado. Scholtz (2000) menciona que os crustáceos da ordem Stomatopoda e muitos da ordem Decapoda eclodem como larvas planctônicas bem desenvolvidas. Essas larvas são semelhantes às larvas dos

Dendrobranchiata e Euphasiacea, que passam através da fase de náuplio de vida livre.

Após a organização do náuplio forma-se o pós náuplio, a protozoa e a zoea, estes estágios do desenvolvimento são comuns para várias espécies de crustáceos da classe Malacostraca, subclasse Eumalacostraca e principalmente para os membros de varias famílias da ordem Decapoda (CELADA et al., 1991; DUPRÉ et al., 1992; GARCÍA-GUERRERO et al., 2003; GARCÍA-GUERRERO, HENDRICKX, 2004, 2006a, 2006b, 2009; HELLUY, BELTZ, 1990, 1991; HELLUY et al., 1993; LAVARIAS et al., 2002; LIZARDO-DAUDT, BOND-BUCKUP, 2003; MÜLLER, 1984; MÜLLER et al., 2003, 2004, 2007; NAGAO et al., 1999; NAZARI et al., 2000; PINHEIRO, HATTORI, 2003; RUDOLPH, ROJAS, 2003; SANDEMAN R., SANDEMAN D., 1991; SIMÕES-COSTA et al., 2005; STEVENS, 2006; WEYGOLDT, 1961; YÁVAR, DUPRÉ, 2007; ZHAO et al., 1998a).

De acordo com Müller et al. (1999) durante o estágio pós naupliar de *P. pandaliformis*, o desenvolvimento é caracterizado pelo gradual aumento na complexidade dos componentes e crescimento embrionário, em resposta aos ativos processos de diferenciação celular, organogênese e maturação dos sistemas. Estes processos estabelecem as características morfológicas distintivas dos embriões. Deste modo, a morfologia embrionária pode ser facilmente reconhecida e visualizada, devido à disposição espacial do embrião localizado superficialmente no ovo (SIMÕES-COSTA et al., 2005). Estes ritmos de desenvolvimento foram também descritos para *M. acanthurus* (BRESSAN; MÜLLER, 1999), onde o desenvolvimento pós naupliar exibe um gradual aparecimento das estruturas embrionárias, devido ao crescimento, a partir da atividade celular da região anterior da papila caudal. Neste contexto, durante o acompanhamento da embriogênese de *M. amazonicum* observou-se que a espécie segue o padrão de desenvolvimento embrionário notado nas fases iniciais e finais de outras espécies de crustáceos, principalmente aquelas do gênero *Macrobrachium* (Tabela 2).

Com respeito à formação do olho, os resultados demonstram que *M. amazonicum* apresenta um padrão semelhante às espécies do gênero *Macrobrachium*. Durante o estágio de disco germinativo, as células se concentram para formar os primórdios dos lobos ópticos e já durante o estágio de náuplio embrionizado estas estruturas se diferenciam. Igualmente, e de acordo com Bressan e Müller (1997), para *M. acanthurus* o início da formação do olho ocorre durante o período de transição entre o disco germinativo e o náuplio embrionizado. Zhao et al. (1998a) afirma que no caso do camarão-da-Malásia (*M. rosenbergii*) a formação dos lobos ópticos ocorre durante o estágio pré naupliar, 62 horas após a desova. Segundo os autores, os rudimentos dos lobos ópticos aparecem como duas estruturas esféricas na região anterior do embrião, onde é notada uma intensa proliferação celular.

Para García-Guerrero e Hendrickx (2009) os lobos ópticos podem ser distinguidos como estruturas diferenciadas, mais espessas e escuras a partir do sétimo dia (30 – 40% do desenvolvimento). Esta característica é observada após a formação do disco germinativo, quando o náuplio embrionizado está constituído.

Müller et al. (2004) no estudo feito com *M. olfersi*, *M. potiuna*, *P. pandaliformis* e *P. argentinus* comentam que as extremidades anteriores do disco germinativo correspondem aos futuros lobos ópticos. Assim, o desenvolvimento destas estruturas formará o complexo ocular.

Müller et al. (2003) e Simões-Costa et al. (2005) comentam que para *M. olfersi* os lobos ópticos se desenvolvem a partir das extremidades superiores do disco germinativo. Assim, no náuplio embrionizado os lobos ópticos aparecem diferenciados. Este padrão de desenvolvimento também foi descrito por Müller (1984) para *M. carcinus* e Müller et al. (2007) para *M. acanthurus*.

As variações entre espécies estão dadas pelo tempo transcorrido na formação do complexo ocular e não pelo estágio de desenvolvimento. Assim, no período naupliar os lobos ópticos aparecem como duas estruturas diferenciadas, porém ainda rudimentares. Algumas espécies de decápodes os

CAUNESP 93

lobos ópticos são formados mais rapidamente como no caso de *A. cribarius* (PINHEIRO; HATTORI, 2002); *A. platensis* (LIZARDO-DAUDT; BOND-BUCKUP, 2003); *C. quadricarinatus* (GARCÍA-GUERRERO et al., 2003); *E. canalensis* e *P. chilensis* (GARCÍA-GUERRERO; HENDRICKX, 2006b); *G. pulchra* e *A. pisonii* (GUERRERO; HENDRICKX, 2004); *P. argentinus* (NAZARI et al, 2000); *P. robsonae* e *P. armatus* (GUERRERO; HENDRICKX, 2006a) e *U. cordatus* (PINHEIRO; HATTORI, 2003) onde os lobos ópticos são distinguidos durante os primeiros dias pós fertilização (período naupliar).

Por outro lado, o tempo de surgimento destas estruturas é muito mais prolongado para determinadas espécies, também durante o período naupliar. Esta característica foi observada em *A. pallipes* (CELADA et al., 1991), *C. destructor* (SANDEMAN R.; SANDEMAN D., 1991), *H. americanus* (HELLUY; BELTZ, 1991) e *P. platypus* (STEVENS, 2006).

Em estudos feitos com várias espécies de decápodes que apresentam ovos centrolécitos, a sequência de desenvolvimento desde a clivagem até o início da formação do olho e sua pigmentação corresponde aproximadamente a 50% do tempo total de incubação, conforme observado em *A. cribarius* (PINHEIRO; HATTORI, 2002); *A. pisonii* (GARCÍA-GUERRERO; HENDRICKX, 2004); *C. caementarius* (YÁVAR; DUPRÉ, 2007); *C. destructor* (SANDEMAN R.; SANDEMAN D., 1991); *C. quadricarinatus* (GARCÍA-GUERRERO et al., 2003); *E. canalensis* (GARCÍA-GUERRERO; HENDRICKX, 2006b); *G. pulchra* (GARCÍA-GUERRERO; HENDRICKX, 2004); *H. americanus* (HELLUY; BELTZ, 1991) e *P. argentinus* (NAZARI et al., 2000); *P. armatus* e *P. robsonae* (GARCÍA-GUERRERO; HENDRICKX, 2006a); *P. chilensis* (GARCÍA-GUERRERO; HENDRICKX, 2006b) *P. platypus* (STEVENS, 2006) e *R. typus* (DUPRÉ et al., 1992). Do mesmo modo, durante o desenvolvimento embrionário de *M. amazonicum* o tempo transcorrido entre o início da clivagem do pólo animal e a formação do complexo ocular e o aparecimento da pigmentação também equivale a 50% período de incubação do embrião.

No decorrer do período compreendido entre os dias 7º e 14º, que corresponde a 50 – 100% do desenvolvimento ontogênico de *M. amazonicum* foi observado um aumento gradual e considerável da área pigmentada do olho (Figura 2). Esta característica pode ser relacionada à formação, diferenciação, crescimento e maturação das estruturas e órgãos constituintes do embrião, aparecendo diretamente ligada à evolução do sistema nervoso e os outros sistemas orgânicos.

A pigmentação ocular aparece a partir do período pós naupliar nas espécies citadas, independentemente do tempo de desenvolvimento (Tabela 2). As informações relatadas neste estudo para *M. amazonicum* coincidem com o descrito em outros estudos. Assim, a pigmentação ocular inicia-se durante o período pós naupliar e termina no momento da eclosão da larva.

É importante mencionar que o camarão-da-amazônia apresenta um ativo desenvolvimento do sistema nervoso e musculatura do embrião, a partir do estágio pós naupliar. Assim, no período compreendido entre DE8 a DE14, podem-se estabelecer relações entre a funcionalidade dos sistemas corporais e o aumento da complexidade da região ocular. Isto como consequência do processo de organogênese que manifesta uma maior e intensa atividade.

Também deve-se destacar o surgimento dos movimentos corporais, sob a forma de espasmos (PINHEIRO, HATTORI, 2002; SIMÕES-COSTA et al., 2005), o que indica o desenvolvimento da musculatura corporal, ligada à maturação do sistema nervoso do embrião. À medida que a musculatura se define e o sistema nervoso se desenvolve, de modo a atingir uma maior complexidade, os movimentos corporais tornam-se cada vez mais intensos e regulares, pode-se inferir então uma estreita relação entre eles. Estes movimentos corporais também foram observados em *M. amazonicum*.

O início da atividade cardíaca em *M. amazonicum* é observado claramente depois da formação e diferenciação do pós náuplio. A funcionalidade do coração está estreitamente relacionada aos processos de morfogênese, organogênese e crescimento presentes nesta fase do

desenvolvimento embrionário. Estas observações concordam com o reportado por García-Guerrero e Hendrickx (2004, 2006a, 2006b, 2009), García-Guerrero et al. (2003), Helluy e Beltz (1991), Müller et al. (2003, 2004, 2007), Nazari et al. (2000), Pinheiro e Hattori (2002) Sandeman R. e Sandeman D. (1991) e Simões-Costa et al. (2005). Em *M. amazonicum*, os movimentos do coração, inicialmente são leves e acompanhados de longas pausas. Posteriormente, com a maturação dos sistemas orgânicos, apresentam-se intensos e rítmicos. Segundo as observações feitas por Simões-Costa et al. (2005), a evolução da atividade cardíaca é essencialmente igual para *M. olfersi*. Conseqüentemente pode-se inferir que existe uma associação entre o desenvolvimento dos sistemas orgânicos e o ritmo dos batimentos cardíacos. Quanto maior é a demanda por oxigênio e nutrientes, maior será a exigência da musculatura cardíaca.

O desenvolvimento do sistema nervoso, a pigmentação ocular, os movimentos da musculatura abdominal, a assimilação dos grânulos de vitelo e as contrações cardíacas são eventos associados que ocorrem simultaneamente, e são observadas durante as fases mais avançadas da embriogênese de *M. amazonicum*, e também em outras espécies do mesmo gênero e outros crustáceos decápodes (Tabela 2).

Assim, durante o período final do desenvolvimento embrionário de *M. amazonicum*, observa-se uma intensa organização e maturação das estruturas internas e externas, principalmente como consequência do processo de organogênese que promove a funcionalidade dos sistemas, preparando o embrião para a eclosão a qual ocorre na forma larvária de zoea. Este padrão é característico dos malacostracos (ANDERSON, 1982), e foi observado nas diferentes espécies de crustáceos decápodes estudados (Tabela 2).

## **7. CONCLUSÕES**

## 7. CONCLUSÕES

I. De acordo às condições experimentais deste estudo, a utilização da metodologia de estagiamento, associada à análise das características morfológicas, histológicas e morfométricas, é suficiente para descrever o desenvolvimento embrionário de *M. amazonicum*.

II. A embriogênese de *M. amazonicum* pode ser organizada em estágios de desenvolvimento, assim no presente estudo são descritos oito estágios: Ovo fertilizado; Clivagem; Blástula - Gástrula; Disco germinativo; Náuplio embrionizado; Pós-nauplio; Protozoa e Zoa.

III. *M. amazonicum* mostrou um padrão de desenvolvimento embrionário semelhante ao observado em crustáceos com ovos centrolécitos, com clivagem superficial parcial (meroblástica), e apresenta características semelhantes às espécies do mesmo gênero, porém com tempos de incubação espécie específico, além de considerar a influencia dos fatores endógenos e exógenos.

IV. Ao longo da embriogênese existe uma relação entre o desenvolvimento dos órgãos internos com as estruturas externas.

V. Os ritmos de desenvolvimento embrionário de *M. amazonicum* revelam uma associação entre as características morfológicas, histológicas e morfométricas.

## **8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

## 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANDERSON, D. T. Embryology and phylogeny in annelids and arthropods: Oxford. Pergamon Press. 1-495 p. 1973.

ANDERSON, D. T. Embryology. In: D. E. BLISS & L. ABELE (eds.), The biology of Crustacea, **2**, Embryology, morphology and genetics: Cambridge, U. K. Academic Press, 1-440 p. 1982.

ANTUNES, L. D. S.; OSHIRO, L. M. Y. Aspectos reprodutivos do camarão de água doce *Macrobrachium potiuna* (Müller, 1880) (Crustácea, Decapoda, Palaemonidae) na Serra do Piloto, Mangaratiba, Rio de Janeiro, Brasil. Revista Brasileira de Zoologia, v. 21, n. 2, p. 261-266. 2004.

ARAUJO, M. C. Efeitos da salinidade, luminosidade e alimentação na larvicultura do camarão-da-amazonia, *Macrobrachium amazonicum*. 2001. 87 p. Tese de Doutorado, Centro de Aquicultura da UNESP, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal. 2005.

BANCROFT, J. D.; GAMBLE, M. Theory and Practice of Histological Techniques. 5<sup>a</sup> ed. New York. Churchill Livingstone. 796 p. 2002.

BIALETZKI, A.; NAKATANI, K.; BAUMGARTNER, G.; BOND-BUCKUP, G. Occurrence of *Macrobrachium amazonicum* (Heller) (Decapoda, Palaemonidae) in Leopoldo's inlet (Ressaco do Leopoldo), upper Paraná river, Porto Rico, Paraná, Brazil. Revista Brasileira de Zoologia, Curitiba, v. 14, n. 2, p. 379 – 390. 1997.

BRESSAN, C. M.; MÜLLER, Y. M. R. Characterization of embrionized nauplius development of *Macrobrachium acanthurus* (Crustacea, Decapoda). Brazilian Journal of Morphological Sciences, v. 14, n. 2, p. 243 – 246. 1997.

BRESSAN, C. M.; MÜLLER, Y. M. R. Postnaupliar embryonic development of *Macrobrachium acanthurus* (Crustacea, Decapoda). Brazilian Journal of Morphological Sciences, v. 16, n. 2, p. 155 – 160. 1999.

CELADA J. D.; CARRAL J. M.; GONZALEZ J. A Study on the Identification and Chronology of the Embryonic Stages of the Freshwater Crayfish *Austropotamobius pallipes* (Lereboullet, 1858). *Crustaceana*, v. 61, n. 3, p. 225 – 232. 1991.

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

CHARMANTIER, G.; MOUNET-GUILLAUME, R. Temperature-specific rates of embryonic development of the European lobster *Homarus gammarus* (L.). *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, v. 16, p. 61 – 66. 1992.

CHARNIAUX COTTON, H.; PAYEN, G. G.; GINSBURGER-VOGEL, T. Arthropoda Crustacea: sexual differentiation. In: K. G. Adiyodi & R. G. Adiyodi (eds.), *Reproductive biology of invertebrates*. New York. John Wiley & Sons, v. 5, p. 281 - 324. 1992.

DA SILVA, R. R.; SAMPAIO C. M. S.; SANTOS, J. A. Fecundity and fertility of *Macrobrachium amazonicum* (Crustacean, Palaemonidae). *Brazilian Journal of Biology*, v. 67, n. 3a, p. 489 - 500. 2004.

DE GRAVE, S.; CAI, Y.; ANKER, A. Global diversity of shrimps (Crustacea: Decapoda: Caridea) in freshwater. *Hydrobiologia*, v. 595, p. 287 – 293. 2008.

DAHL, E. Malacostracan phylogeny and evolution. In: F. R. Schram (ed.), *Crustacean phylogeny*, *Crustacean Issues*, v. 1, p. 189-212. 1983.

DUPRÉ, E.; BELLOLIO, G.; LOHRMANN, K. Desarrollo embrionario del camarón de roca (*Rhynchocinetes typus*, H. Milne Edwards 1837), en condiciones de laboratorio. *Revista Chilena de Historia Natural*, v. 65, p. 435 - 442. 1992.

FELGENHAUER, B. E.; ABELE, L. G. Phylogenetic relationships among shrimp-like decapods. In: F. R. Schram (ed.), *Crustacean phylogeny*, *Crustacean Issues*, v.1, p. 291 - 311. 1983.

FIORONI, P. Allgemeine und vergleichende Embryologie der Tiere. Berlin. Springer Verlag, p. 1 - 429. 1992.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS (FAO). Glossary of Aquaculture. Compiled by Valerio Crespi and André Coche. Italy, Rome, 401 p. 2008.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS (FAO). Yearbook of fishery statistics: summary tables. Roma. Disponível em: <http://www.fao.org/fi/STAT/summary/default.htm#aqua>. 2009.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS (FAO). El estado mundial de la pesca y la acuicultura. Departamento de Pesca y Acuicultura de la FAO. Roma. 2010.

GARCÍA-GUERRERO M.; HENDRICKX M. E. Embryology of decapod crustaceans I. Embryonic development of the mangrove crabs *Goniopsis pulchra* and *Aratus pisonii* (Decapoda: Brachyura). Journal of Crustacean Biology, v. 24, n. 4, 666 - 672. 2004.

GARCÍA-GUERRERO M.; HENDRICKX M. E. Embryology of decapod crustaceans, II: Gross embryonic development of *Petrolisthes robsonae* (Glassell, 1945) and *Petrolisthes armatus* (Gibbes, 1850) (Decapoda, Anomura, Porcellanidae). Crustaceana, v. 78, n. 9, p. 1089 - 1097. 2006a.

GARCÍA-GUERRERO M.; HENDRICKX M. E. Embryology of decapod crustaceans, III: Embryonic development of *Eurypanopeus canalensis* Abele & Kim, 1989, and *Panopeus chilensis* H. Milne Edwards & Lucas, 1844 (Decapoda, Brachyura, Panopeidae). Belgian Journal of Zoology, v. 136, n. 2, p. 249 - 253. 2006b.

GARCÍA-GUERRERO, M.; HENDRICKX, M. E. External description of the embryonic development of the prawn, *Macrobrachium americanum* bate, 1868 (Decapoda, Palaemonidae) based on the staging method. Crustaceana, v. 82, n. 11, p. 1413 - 1422. 2009.

GARCÍA-GUERRERO, M.; HENDRICKX, M. E.; VILLARREAL, H. Description of the embryonic development of *Cherax quadricarinatus* (Von Martens, 1868) (Decapoda, Parastacidae), based on the staging method. *Crustaceana*, v. 76, n. 3, p. 269-280. 2003.

GLESE, A. C.; PEARSE, J. S. Reproduction of marine invertebrates. New York. Academic Press, v. 1, p. 1 - 546. 1974.

GILBERT, S. F. Developmental Biology. 9<sup>a</sup> ed. Sinauer Associates, Inc. Sunderland, Massachusetts USA. 711 p. 2010

GREEN, J. Chemical embryology of the Crustacea. *Biological Review*. Cambridge, v. 40, p. 580 - 600. 1965.

GUEST, W. C. Laboratory life history of the palaemonid shrimp *Macrobrachium amazonicum* (Heller) (Decapoda, Palaemonidae). *Crustaceana*, Leiden. v. 37, n. 2, p. 141 - 152. 1979.

HARTNOLL, R. G. GROWTH. In: L. G. ABELE (ed.), Embryology, morphology and genetics. The biology of Crustacea. New York, Academic Press, v. 2, p. 111 - 196. 1982.

HAYD, L. A. Ciclo de muda e metabolismo durante o desenvolvimento larval do camarão-da-amazônia *Macrobrachium amazonicum* (Heller, 1862). 2007. 87p. Tese de Doutorado, Centro de Aquicultura da UNESP, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal. 2007.

HELLUY, S.; BELTZ, B. S. Stages in the embryonic development of the American lobster with special emphasis on its nervous system. In: K. Wiese, W. D. Krenz, J. Tautz, H. Heichert & B. Mulloney (eds.), *Frontiers in Crustacean neurobiology*. v. 1, p. 530 - 536. 1990.

HELLUY, S. M.; BELTZ, B. S. Embryonic development of the American lobster (*Homarus americanus*): Quantitative staging and characterization of an embryonic molt cycle. *Woods Hole, Biological Bulletin*, v. 180, p. 355 - 371. 1991.

HELLUY, S.; SANDEMAN, R.; BELTZ, B.; SANDEMAN, D. Comparative brain ontogeny of the crayfish and clawed lobster: Implications of direct and larval development. *Journal of Comparative Neurology*, v. 335, p. 343 - 354. 1993.

HERTZLER, P. L. Development of the mesendoderm in the dendrobranchiate shrimp *Sicyonia ingentis*. *Arthropod Structure & Development*, v. 31, p. 33 – 49. 2002.

HERTZLER, P. L. Cleavage and gastrulation in the shrimp *Penaeus (Litopenaeus) vannamei* (Malacostraca, Decapoda, Dendrobranchiata). *Arthropod Structure & Development*, v. 34, p. 455 – 469. 2005.

HERTZLER, P. L.; WANG, S. W.; CLARK, W. H. Jr. Mesendoderm cell and archenteron formation in isolated blastomeres from the shrimp *Sicyonia ingentis*. *Developmental Biology*, v. 164, p. 333 - 344. 1994.

HOLTHUIS, L.B. A general revision of the Palaemonidae (Crustacea, Decapoda, Natantia) of the Americas. II. The subfamily Palaenominae. *Occasional Papers of the Allan Hancock Foundation*, v. 12, p. 1 - 339. 1952.

JUNIOR, J. M. Aspectos estruturais do hepatopâncreas do camarão de água doce *Macrobrachium amazonicum* (Heller, 1862). 2006. 57p. Dissertação de Mestrado, Centro de Aquicultura da UNESP, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal. 2006.

KIMPARA, J. M. Intensificação do cultivo de *Macrobrachium amazonicum*: efeito das estratégias de estocagem e despesca na água dos viveiros, efluentes e sedimentação em viveiros de crescimento final. 2007. 60p. Dissertação de Mestrado, Centro de Aquicultura da UNESP, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal. 2007.

KUTTY, M. N.; HERMAN, F.; LE MENN, H. Culture of other prawn species. In: NEW, M.B.; VALENTI, W.C. *Freshwater prawn culture: The farming of Macrobrachium rosenbergii*. Oxford: Blackwell Science. cap. 21, p. 393 - 410. 2000.

KUTTY, M. N. Towards sustainable freshwater prawn aquaculture – lessons from shrimp farming, with special reference to India. *Aquaculture Research*. v. 36, p. 255 - 263. 2005.

KUTTY, M. N.; VALENTI, W. C. Culture of other freshwater prawn species. p. 502-523. In: M. B. New; W. C. Valenti; J. H. Tidwell; L. R. D'Abramo, and M. N. Kutty, (eds). *Freshwater prawns: biology and farming*. Oxford, Wiley-Blackwell. 2010.

LAVARIAS, S.; HERAS H.; DEMICHELIS S.; PORTIANSKY E.; POLLERO R. Morphometric study of embryonic development of *Macrobrachium borellii* (Arthropoda: Crustacea). *Invertebrate Reproduction and Development*, v. 41, p. 157 - 163. 2002.

LIZARDO-DAUDT H. M.; BOND-BUCKUP G. Morphological aspects of the embryonic development of *Aegla platensis* (Decapoda, Aeglidae). *Crustaceana*, v. 76, n. 1, p. 13 - 25. 2003.

LYNN, J. W.; GLAS, P. S.; HERTZLER, P. L.; CLARK, W. H. Jr.; GREEN, J. D. Manipulation of shrimp embryos: a viable technique for the removal of the hatching envelope. *Journal of the World Aquaculture Society*, v. 24, n. 1, p. 1 - 5. 1993.

MACIEL, C. R. Alimentação do camarão-da-amazônia *Macrobrachium amazonicum* durante a fase larval. 2007. 141p. Tese de Doutorado, Centro de Aquicultura da UNESP, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal. 2007.

MACIEL, C. R.; VALENTI, W. C. Biology, Fisheries, and Aquaculture of the Amazon River Prawn *Macrobrachium amazonicum*: A Review. *Nauplius*, v. 17, n. 2, p. 61 - 79. 2009.

MELO, G. A. S. Famílias Atyidae, Palaemonidae e Sergestidae. Manual de identificação dos crustácea, Decapoda de água doce do Brasil. São Paulo. Edições Loyola. p. 289 - 415. 2003.

MESSIAS, A. G. Caracterização estrutural do intestino anterior e médio de *Macrobrachium amazonicum* durante o desenvolvimento larval. 2007. 98p. Tese de Doutorado, Centro de Aquicultura da UNESP, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal. 2007.

MORAES-RIODADES, P. M. C. Diferenciação morfotípica de machos de camarão de água doce *Macrobrachium amazonicum* (Heller, 1862) (Crustacea, Decapoda, Palaemonidae). 2002. 56p. Dissertação de Mestrado, Centro de Aquicultura da UNESP, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal. 2002.

MORAES-RIODADES, P. M. C. Cultivo do camarão-da-amazonia, *Macrobrachium amazonicum* (Heller, 1862) (Crustácea, Decapoda, Palaemonidae) em diferentes densidades: fatores ambientais, biologia populacional e sustentabilidade econômica. 2005. 117p. Tese de Doutorado, Centro de Aquicultura da UNESP, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal. 2005.

MORAES-RIODADES, P. M. C.; VALENTI, W. C. Crescimento relativo do camarão canela *Macrobrachium amazonicum* (Heller) (Crustacea, Decapoda, Palaemonidae) em viveiros, Revista Brasileira de Zoologia, v. 19 n. 4, p. 1169 - 1176. 2002.

MORAES-RIODADES, P. M. C.; VALENTI, W. C. Freshwater prawn farming in Brazilian Amazonia shows potential for economic and social development, Global Aquaculture Advocate, v. 4, n. 5, p. 73 – 74. 2001.

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

MORAES-VALENTI, P. M. C.; VALENTI, W. C. Effect of intensification on grow-out of the Amazon River Prawn *Macrobrachium amazonicum*, Journal of the World Aquaculture Society, v. 38, n. 4, 516 - 526. 2007.

MÜLLER, Y. M. R. Die Embryonalentwicklung von *Macrobrachium carcinus* (L.) (Malacostraca, Decapoda, Natantia). Zoological Jahrbücher Anatomie, Jena, v. 112, p. 51 - 78. 1984.

MÜLLER, Y. M. R.; NAZARI, E. M.; BRESSAN, C. M.; AMMAR, D. Aspectos da reprodução de *Palaemon pandaliformis* (Stimpson) (Decapoda, Palaemonidae) no manguezal de Ratones, Florianópolis, Santa Catarina. Revista Brasileira de Zoologia, v. 13, n. 3, p. 633 - 642. 1996.

MÜLLER, Y. M. R.; NAZARI, E. M.; SIMÕES-COSTA, M. S.; AMMAR, D. The characterization of embryonic phases of prawn *Palaemon pandaliformis* (Stimpson, 1871) (Crustacea, Decapoda). Brazilian Journal of Morphological Sciences, São Paulo. v. 16, n. 2, p. 161 - 166. 1999.

MÜLLER, Y. M. R.; NAZARI, E. M.; SIMÕES-COSTA, M. S. Embryonic stages of the freshwater prawn *Macrobrachium olfersi* (Decapoda, Palaemonidae). Journal of Crustacean Biology, v. 23, n. 4, p. 869 - 875. 2003

MÜLLER, Y. M. R.; NAZARI, E. M.; AMMAR, D. Embryonic development of four species of palaemonid prawns (Crustacea, Decapoda): pre-naupliar, naupliar and post-naupliar periods. Revista Brasileira de Zoologia, v. 21, n.1, p. 27 - 32. 2004

MÜLLER, Y.; PACHECO, C.; SIMÕES-COSTA, M. S.; AMMAR, D.; NAZARI, E. M. Morphology and chronology of embryonic development in *Macrobrachium acanthurus* (Crustacea, Decapoda). Invertebrate Reproduction and Development, v. 50, n. 2, p. 67 - 74. 2007.

NAGAO, J.; MUNEHARA, H.; SHIMAZAKI, K. Embryonic Development of the Hair Crab *Erimacrus isenbeckii*. Journal of Crustacean Biology, v. 19, n. 1. p. 77 - 83. 1999.

NAZARI, E.; MÜLLER, Y.; AMMAR, D. Embryonic development of *Palaemonetes argentinus* Nobili, 1901 (Decapoda, Palaemonidae), reared in the laboratory. Crustaceana, v. 73, p. 143 - 152. 2000.

NAZARI, E. M.; SIMÕES-COSTA, M. S.; MÜLLER, Y. M. R.; AMMAR, D.; DIAS, M. Comparisons of fecundity, egg size, and egg mass volume of the freshwater prawns *Macrobrachium potiuna* and *Macrobrachium olfersi* (Decapoda, Palaemonidae). Journal of Crustacean Biology, v. 23, n. 4, p. 862 - 868. 2003.

NEW, M. B.; VALENTI, W. C. Freshwater Prawn Culture. The farming of *Macrobrachium rosenbergii*. Oxford. Ed. Blackwell Science Ltd. 465 p. 2000.

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

NEW, M. B.; VALENTI, W. C.; TIDWELL, J. H.; D'ABRAMO, L. R.; KUTTY, M. N. Freshwater Prawns: Biology and Farming. Oxford. Ed. Blackwell Publishing Ltd. 560 p. 2010.

NOGUEIRA, M. Estudo da qualidade dos efluentes gerados em diferentes fases do cultivo do camarão-da-amazônia *Macrobrachium amazonicum*. 2008. 77p. Tese de Doutorado, Centro de Aquicultura da UNESP. Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal. 2008.

ODINETZ-COLLART, O. Stratégie de reproduction de *Macrobrachium amazonicum* en Amazonie Centrale. Crustaceana, v. 61, n. 2, p. 253 - 270. 1991.

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

ODINETZ-COLLART, O.; MAGALHÃES, C. Ecological constraints and life history strategies of Palaemonid prawns in Amazonia. Verhandlungen des Internationalen Verein Limnologie, v. 25, p. 2460 - 2467. 1994.

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

PAPA, L. P. Aspectos Estruturais dos Testículos dos Diferentes Morfotipos de *Macrobrachium amazonicum* arraçados com dietas contendo diferentes níveis de colesterol. 2003. 81p. Dissertação de Mestrado, Centro de Aquicultura da UNESP. Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal. 2003.

PAPA L. P. Caracterização estrutural do sistema reprodutor masculino e do hepatopâncreas dos diferentes morfotipos de *Macrobrachium amazonicum*. 2007. 94p. Tese de Doutorado, Centro de Aquicultura da UNESP. Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal. 2007.

PERKINS, H. C. Developmental rates at various temperatures of embryos of the northern lobster (*Homarus americanus* Milne-Edwards). Fishery Bulletin. v. 70, n. 1, p. 95 - 99. 1972.

PINHEIRO, M. A. A.; HATTORI, G. Y. Embriologia do siri *Arenaeus cribrarius* (Lamarck) (Crustacea, Brachyura, Portunidae). Revista Brasileira de Zoologia, Curitiba, v. 19, p. 571 - 583. 2002a.

PINHEIRO, M. A. A.; HATTORI, G. Y. Embryology of the Mangrove Crab *Ucides cordatus* (Brachyura: Ocypodidae). Journal of Crustacean Biology, v. 23, n. 3, p. 729 - 737. 2003b.

RABALAIS, N. N.; GORE, R. H. Abbreviated development in decapods. In: A. M. Wenner (ed.), Crustacean phylogeny. Crustacean Issues, v. 2, p. 67 - 126. 1985.

RIBEIRO, K. Efeito dos ácidos graxos poli insaturados sobre o desempenho reprodutivo de fêmeas de *Macrobrachium amazonicum* (Heller, 1862). 2003. 60p. Dissertação de Mestrado, Centro de Aquicultura da UNESP. Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal. 2003.

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

RIBEIRO, K.; FRANCHESCHINI-VICENTINI, I. B.; PAPA, P. L.; NEW, M. B.; VALENTI, W. C. Effect of polyunsaturated fatty acids on the fecundity of the Amazon river prawn *Macrobrachium amazonicum* (Heller, 1862). Aquaculture Research, v. 43, p. 1 - 8. 2011.

RUDOLPH E. H.; ROJAS C. S. Embryonic and Early Postembryonic Development of the Burrowing Crayfish, *Virilastacus araucanius* (Faxon, 1914) (Decapoda, Parastacidae) under Laboratory Conditions. Crustaceana, v. 76, n. 7 p. 835 - 850. 2003.

SAMPAIO, C. M. S.; DA SILVA, R. R.; SANTOS, J. A.; SALES S. P. Reproductive cycle of *Macrobrachium amazonicum* females (Crustacea, Palaemonidae). Brazilian Journal of Biology, v. 67, n. 3, p. 551 - 559. 2007.

SANDEMAN, R.; SANDEMAN, D. Development and identified neural systems in the crayfish brain. In: K. Wiese, W. D. Krenz, J. Tautz, H. Heichert & B. Mulloney (eds.), *Frontiers in crustacean neurobiology*, v. 1, p. 498 - 508. 1990.

SANDEMAN, R.; SANDEMAN, D. Stages in the development of the embryo of the fresh-water crayfish *Cherax destructor*. *Roux's Archives of Developmental Biology*, v. 200, p. 27 - 37. 1991.

SCHOLTZ, G. Evolution of the nauplius stage in malacostracan crustaceans. *Journal of Zoological Systematics and Evolution Research*, v. 38, p. 175 – 187. 2000.

SILVA, M. C. N.; FRÉDOU, F. L.; FILHO J. S. R. Estudo do crescimento do camarão *Macrobrachium amazonicum* (Heller, 1862) da Ilha de Combú, Belém, Estado do Pará. *Amazônia: Ciência & Desenvolvimento*. Belém, v. 2, n. 4. 2007.

SIMÕES-COSTA, M. S.; PACHECO, C.; NAZARI, E. M.; MÜLLER, Y. M. R.; AMMAR D. Estagiamento de embriões de *Macrobrachium olfersi* (Wiegman) (Crustacea, Palaemonidae) através de critérios morfológicos nos dias embrionários. *Revista Brasileira de Zoologia*, v. 22, n. 2, p. 501 - 508. 2005.

SPERANDIO, L. M. Transporte de pós-larvas e juvenis de camarões de água doce. 2004. 43p. Dissertação de Mestrado, Centro de Aquicultura da UNESP. Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal. 2004.

STEVENS, B. G. Embryo development and morphometry in the blue king crab *Paralithodes platypus* studied by using image and cluster analysis. *Journal of Shellfish Research*, v. 25, n. 2, p. 569 – 576. 2006.

VALENTI, W. C.; DANIELS, W. H. Recirculation Hatchery Systems and Management. In: NEW, M.B.; VALENTI, W.C. (Eds.) *Freshwater prawn culture: The farming of *Macrobrachium rosenbergii**. Oxford, Blackwell Science. p. 69 - 90. 2000.

VALENTI, W. C.; FRANCESCHINI-VICENTINI, I. B.; PEZZATO, L. E. The potential for *Macrobrachium amazonicum* culture. In: *World Aquaculture 2003* Salvador, Brazil, “Realizing the potential: responsible aquaculture for a secure

future”, realizado no período de 19 a 23 de maio de 2003, na cidade Salvador, Bahia, Anais. 804p. 2003.

VALENTI, W. C. Carcinicultura de água doce como agro negócio. In: I Congresso da Sociedade Brasileira de Aquicultura e Biologia Aquática (Aquabio), Vitória, Anais p. 52. 2004.

VALENTI, W.C. Freshwater prawn culture in Brazil. World Aquaculture, Baton Rouge. v. 24, n. 1, p. 29 - 34. 1993.

VETORELLI, M. P. Salinidade e composição iônica da água na larvicultura do camarão-da-amazonia *Macrobrachium amazonicum*. 2008. 123p. Tese de Doutorado, Centro de Aquicultura da UNESP. Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal. 2008.

VETORELLI, M. P. Viabilidade técnica e econômica da larvicultura do camarão-da-amazonia, *Macrobrachium amazonicum*, em diferentes densidades de estocagem. 2004. 89p. Dissertação de Mestrado, Centro de Aquicultura da UNESP. Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal. 2004.

WEYGOLDT, P. Beitrag zur kenntnis der ontogenie der Dekapoden: Embriologysche untersuchungen an *Palaemonetes varians* (Leach). Zoologische Jahrbücher Anatomie, Jena, v. 79, p. 223 - 270. 1961.

YAO, J. J.; ZHAO, Y. L.; WANG, Q.; ZHOU, Z. L.; HU, X. C.; DUAN, X. W.; AN, C. G. Biochemical compositions and digestive enzyme activities during the embryonic development of prawn, *Macrobrachium rosenbergii*. Aquaculture, v. 253, p. 573 – 582. 2006.

YÁVAR, C.; DUPRÉ, E. Desarrollo embrionario del camarón de río *Cryphiops caementarius* (Decapoda: Palaemonidae) en condiciones de laboratorio. Revista de Biología Tropical, v. 55, n. 1, p. 15 - 24. 2007.

ZHAO, Y. L.; WANG, Q.; DU, N. S.; LAI, W. Embryonic development of the giant freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii* (Crustacea: Decapoda): I. Morphogenesis of external structures of embryo. Acta Zoologica Sinica, v. 44, p. 249 – 256. 1998a.

ZHAO, Y. L.; WANG, Q.; LAI, W.; DU, N. S. A study on embryonic development of the giant freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii* (De man) (Crustacea, Decapoda) II. The formation of the primary organ rudiment and development of the digestive system. Journal of Sea Science, v. 5, p. 42 – 46. 1998b.