

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA – UNESP  
CENTRO DE AQUICULTURA DA UNESP**

**Morfologia e ultraestrutura do sistema  
reprodutor masculino do camarão sete-  
barbas *Xiphopenaeus kroyeri* (Heller, 1862):  
caracterização da maturidade morfológica e  
fisiológica**

**Guilherme Casemiro Andrioli**

Jaboticabal, São Paulo  
2017

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA – UNESP  
CENTRO DE AQUICULTURA DA UNESP**

**Morfologia e ultraestrutura do sistema  
reprodutor masculino do camarão sete-  
barbas *Xiphopenaeus kroyeri* (Heller, 1862):  
caracterização da maturidade morfológica e  
fisiológica**

**Guilherme Casemiro Andrioli**

**Orientador: Dr. Fernando José Zara**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Aquicultura do Centro de Aquicultura da UNESP - CAUNESP, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Aquicultura.

Jaboticabal, São Paulo  
2017

A573m Andrioli, Guilherme Casemiro  
Morfologia e ultraestrutura do sistema reprodutor masculino do camarão sete-barbas *Xiphopenaeus kroyeri* (Heller, 1862): caracterização da maturidade morfológica e fisiológica / Guilherme Casemiro Andrioli. – – Jaboticabal, 2017  
xi, 101 p. : il. ; 29 cm

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Centro de Aquicultura, 2017  
Orientador: Fernando José Zara  
Banca examinadora: Antonio Leão Castilho, João Alberto Farinelli  
Pantaleão  
Bibliografia

1. Camarão Marinho. 2. Morfologia. 3. Maturidade. I. Título. II. Jaboticabal-Centro de Aquicultura.

CDU 639.512

Ficha catalográfica elaborada pela Seção Técnica de Aquisição e Tratamento da Informação – Diretoria Técnica de Biblioteca e Documentação - UNESP, Câmpus de Jaboticabal.

**CERTIFICADO DE APROVAÇÃO**

**TÍTULO DA DISSERTAÇÃO:** Morfologia e ultraestrutura do sistema reprodutor masculino do camarão sete-barbas *Xiphopenaeus kroyeri* (Heller, 1862): caracterização da maturidade morfológica e fisiológica

**AUTORA:** GUILHERME CASEMIRO ANDRIOLI

**ORIENTADOR:** FERNANDO JOSÉ ZARA

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Mestra em AQUICULTURA, pela Comissão Examinadora:

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

Prof. Dr. ANTONIO LEÃO CASTILHO  
Departamento de Zoologia / Instituto de Biociências de Botucatu/ UNESP

  
Prof. Dr. JOÃO ALBERTO FARINELLI PANTALEÃO  
Departamento de Ciências Biológicas / Universidade Federal do Triângulo Mineiro

Jaboticabal, 01 de novembro de 2017

*“A ciência atua na fronteira entre o conhecimento e a ignorância sem medo de admitir que não sabemos. Não há nenhuma vergonha nisso. A única vergonha é fingir que temos todas as respostas.”*

**Neil deGrasse Tyson**

Dedico este trabalho aos meus familiares,  
em especial a minha avó Zina, que não está  
mais entre nós.

## **Agradecimentos**

Ao programa de Pós-graduação em Aquicultura (CAUNESP) pela vaga e disponibilização de uma bolsa de mestrado do CNPq (158911/2015-6).

Aos fomentos cedidos pelas instituições CAPES Ciências do Mar (CIMAR) II (Proc. #1989/2014) e a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) (Proc. #2010/50188-8 e 2016/25344-2) na obtenção dos espécimes e processamento das amostras.

Ao Prof. Dr. Fernando José Zara pela dedicação, orientação e importantes ensinamentos desde minha IC até o mestrado.

À Márcia Fiorese Mataqueiro que me auxiliou imensamente no laboratório desde 2013, sempre com muito carinho e paciência.

Às todos os amigos do laboratório Bárbara, Camila, Fernanda, Jean, Maria Alice e Tavani pela boa convivência, momentos felizes e auxílios que contribuíram direta ou indiretamente para a conclusão desta dissertação. Aos amigos Léo Jaime, Lucas e Timóteo pelo imenso apoio científico e emocional durante esta fase (trabalhando e relaxando!).

Aos funcionários do Departamento de Biologia Aplicada à Agropecuária (FCAV/UNESP – Jaboticabal), Márcia, Aracyara, Aldo e Lucinda, pelas conversas e auxílios em diversas situações do cotidiano.

Aos funcionários do CAUNESP, David Lorente e Veralice Cappatto pelos auxílios cedidos no cumprimento das burocracias da PG do CAUNESP.

Ao Laboratório de Microscopia Eletrônica da UNESP/FCAV, e todo suporte prestado pelas técnicas Claudinha e Cláudia, no microscópio eletrônico de transmissão e no microscópio eletrônico de varredura.

Aos meus pais, Luis Fernando e Heloisa, à minha irmã Ana Luisa, aos meus tios Plínio e Luciana, aos meus avós Fernando e Maria, e Plínio e Zina, os quais sempre me apoiaram e acreditaram em mim.

À minha noiva Gabriela, por seu amor e carinho, e em especial pelo fruto do nosso relacionamento: nosso filho-cachorro Miojo. Obrigado por me apoiar e estar sempre ao meu lado. Amo você!

Um agradecimento especial aos bons frutos que esta fase me proporcionou, uma amizade incondicional com a Adriany, Timóteo, Ayla, Léo Jaime, Aldenize e

Lucas. Uma parceria que se estendia para fora do trabalho. Prezo muito por vocês.

Muito obrigado!

## **Apoio financeiro**

CNPq – Bolsa modalidade GM (Mestrado) (#158911/2015-6)

Biota FAPESP (#2010/50188-8 e #2016/25344-2)

## Sumário

Resumo.....	1
Abstract.....	2
Introdução geral .....	3
Referências.....	6
<b>Capítulo 1.</b> Maturidade sexual morfológica X fisiológica: desenvolvimento do sistema reprodutor do camarão sete-barbas <i>Xiphopenaeus kroyeri</i> (Crustacea: Penaeidae).....	12
Resumo .....	13
Abstract.....	14
1. Introdução.....	15
2. Material e Métodos .....	17
2.1. Coleta dos animais .....	17
2.2. Determinação da maturidade sexual .....	17
2.3. Ultraestrutura do sistema reprodutor, endopoditos, petasma e télico.....	18
2.4. Histologia e histoquímica.....	18
2.5. Medidas dos espermatóforos .....	19
3. Resultados.....	19
4. Discussão .....	23
5. Conclusões .....	31
Referências.....	32
Tabela.....	40
Lista de Figuras .....	42
<b>Capítulo 2.</b> Ultraestrutura da espermatogênese e produção do fluido seminal do camarão sete barbas <i>Xiphopenaeus kroyeri</i> (Heller, 1862) .....	59
Resumo .....	60
Abstract.....	61
1. Introdução.....	62
2. Material e métodos .....	64
2.1. Coleta e identificação .....	64
2.2. Microscopia eletrônica .....	64
2.3. Histologia e mensuração das células germinativas .....	65
3. Resultados.....	65
3.1. Morfologia geral do sistema reprodutor .....	65

3.2. Testículo, espermatogênese e espermiogênese .....	66
3.3. Vaso deferente .....	69
4. Discussão .....	71
Referências.....	77
Lista de Figuras .....	86
<b>Considerações finais</b> .....	<b>101</b>

## Resumo

Esta dissertação visou estudar o sistema reprodutor masculino do camarão *Xiphopenaeus kroyeri* com o intuito de esclarecer a maturação dos machos e incluir mais informações sobre a morfologia e reprodução dos animais da tribo Trachypeneini. No primeiro capítulo foi testada a sincronia entre a maturidade morfológica, determinada pela presença de petasma, e a maturidade fisiológica, determinada pela observação microscópica de espermatozoides e espermatóforos no vaso deferente (VD). Para isso, o sistema reprodutor de indivíduos machos juvenis e adultos foi analisado histologicamente e descrito. A partir da classe de tamanho de 12 – 13 mm de comprimento de carapaça (CC) os indivíduos apresentam petasma, contudo a presença de espermatozoides e espermatóforos no sistema reprodutor deu-se somente a partir da classe de 14 – 15 mm de CC. O sistema reprodutor apresenta um par de testículos lobados fusionados, onde são produzidos os espermatozoides, os quais se mostram prontos ainda neste órgão. Os espermatozoides são direcionados aos VD, os quais são divididos em região proximal (PVD), onde os espermatóforos são montados, e regiões média (MVD) e distal (DVD), onde são produzidos os principais componentes do fluido seminal. Ao final do VD encontra-se a ampola, uma glândula adjacente ao VD que produz secreção ausente de espermatozoides e espermatóforos. No segundo capítulo, foram descritas ultraestruturalmente a espermatogênese e a produção de secreção pelo VD. No testículo, as células germinativas mostram três estágios da espermiogênese, tornado-se maduras com espinho acrossomal e prolongamento posterior na luz dos túbulos seminíferos. O VD mostra epitélio secretor, na qual a PVD produz secreções que empacotam os espermatozoides e formam a parede do espermatóforo. Ambas MVD e DVD apresentam várias camadas musculares e produzem somente um tipo de vesícula secretora, sendo a DVD responsável pela diluição do fluido seminal. A ampola apresenta epitélio estratificado e produz secreção por mecanismo holócrino. A morfologia do sistema reprodutor é semelhante à *Rimapenaeus similis*, na qual a ampola produz secreção para formação de plug espermático, podendo este ser o padrão para Trachypeneini.

**Palavras-chave:** Penaeidae, morfologia, maturidade, reprodução.

## Abstract

In this work, we analyzed the male reproductive system of the shrimp *Xiphopenaeus kroyeri* to clarify the male maturation and add more information about the morphology and reproduction of the tribe Trachypeneini. In the first chapter, we investigated the synchrony between the morphological maturity, determined by the presence of petasma, and the physiological maturity, determined by the macroscopic observation of spermatozoa and spermatophores in the vas deferens (VD). For this, the male reproductive system of juveniles and adult males was histologically analyzed and described. From the size class of 12 – 13 mm of carapace length (CL) the individuals presented petasma, however the presence of spermatozoa and spermatophores was detected in the male reproductive system from the size class of 14 – 15 mm of CL. The reproductive system presented a pair of fused lobed testes, where the spermatozoa are produced, which are fully matured in this organ. The spermatozoa are directed to the VD, which are divided in proximal region (PVD), where the spermatophores are packed, and medial (MVD) and distal (DVD) regions, where the main compounds of the seminal fluid are produced. At the end of the VD is located the ampoule, an adjacent glandule which produces secretion absent of spermatozoa and spermatophores. In the second chapter, the spermatogenesis and the seminal fluid production were ultrastructurally described. In the testis, the germ cells showed three stages of spermiogenesis, becoming mature with an acrossomal spike and the posterior region, in the lumen of the seminiferous tubules. The VD showed secretory epithelium, in which the PVD produces secretions that pack the spermatozoa and constitute the spermatophore wall. Both MVD and PVD presented many muscular layers and produced only one type of secretory vesicle, being the DVD responsible for the dilution of the seminal fluid. The ampoule presented stratified epithelium and showed holocrine secretion. The morphology of the reproductive system is similar to *Rimapenaeus similis*, in which the ampoule produces the secretion to the formation of sperm plug, being a possible pattern to Trachypeneini.

**Key-words:** Penaeidae, morphology, maturity, reproduction.

## Introdução geral

O camarão *Xiphopenaeus kroyeri* (Heller, 1862), conhecido popularmente por camarão sete-barbas, pertence à tribo Trachypeneini, que juntamente com as tribos Peneini e Parapeneini, compõem a família Penaeidae Rafinesque, 1815. Esta espécie distribui-se amplamente no litoral leste do continente americano, com registros do Rio Grande do Sul (Brasil), até a Carolina do Norte (Estados Unidos da América) (D’Incao, 1999; Costa et al., 2007; Castilho et al., 2015). O hábitat desta espécie é preferencialmente de fundo arenoso, ocorrendo de 2 a 70 metros de profundidade (D’Incao, 1999; Costa et al., 2003). Entretanto, é capturada com maior frequência até 30 metros de profundidade (Branco et al., 2005; Costa et al., 2007). O camarão sete-barbas é considerado um recurso pesqueiro de grande importância econômica (Gillett, 2008; Lopes et al., 2017). No Brasil, a pesca de *X. kroyeri* apresenta valor comercial relevante para as regiões Sul e Sudeste (D’Incao et al., 2002; Costa et al., 2007, 2011). Devido a sua abundância em águas rasas, *X. kroyeri* é um importante recurso da pesca artesanal, podendo representar até 90% do total de camarões peneídeos capturados (Costa et al., 2000, 2007; Fransozo et al., 2002). Nas últimas décadas, *X. kroyeri* tem sido intensamente pescado no estado de São Paulo, sendo o camarão mais explorado em termos de biomassa (Rodrigues et al., 1993; Nakagaki e Negreiros-Fransozo, 1998; Castro et al., 2005).

Os camarões peneídeos possuem estruturas morfológicas relacionadas à transferência dos espermatozoides, como o petasma (Burkenroad, 1934; Bauer, 1991; Pérez-Farfante e Kensley, 1997). Esta estrutura é formada pela união dos endopoditos do primeiro par de pleópodos ao longo do desenvolvimento do animal (Pérez-Farfante e Kensley, 1997). Após esta união, o indivíduo pode ser considerado macho morfológicamente maduro (Bauer, 1986, 1991). Nas espécies de Trachypeneini, para o petasma é creditada a função de conduzir o fluido seminal até o interior do tético, estrutura responsável pelo armazenamento do material seminal dos machos, localizada sobre a superfície do esterno das fêmeas (Burkenroad, 1934; Bauer 1986, 1991; Pérez-Farfante e Kensley, 1997). Segundo Pérez-Farfante e Kensley (1997), o tético em *X. kroyeri* é formado por uma placa lisa do esternito XIV e o capuz anterolateral portando uma protuberância do esternito XIII. Nos machos, além do petasma, o *appendix*

*masculina* também é considerado um carácter sexual secundário, o qual é localizado na porção medial da base de cada endopodito do segundo par de pleópodos (Dall et al., 1990; Pérez-Farfante e Kensley, 1997; Fransozo et al., 2011).

O carácter sexual primário masculino nos peneídeos é composto por um par de testículos unidos por uma comissura central, os quais se abrem em um par de *vasa deferentia*. O vaso deferente é dividido em regiões proximal (PVD), média (MVD) e distal (DVD), sendo esta última região conectada à ampola terminal, formando o duto ejaculatório (Burkenroad, 1934; Tuma, 1967; Bauer, 1991; Bauer e Cash, 1991; Chow et al., 1991; Bauer e Lin, 1993; Fransozo et al., 2016).

A maturação do sistema reprodutor masculino, denominada de maturidade fisiológica, é muito utilizada em trabalhos de biologia populacional, sendo determinada macroscopicamente pela observação do desenvolvimento da ampola terminal, tornando-a evidente (Almeida et al., 2012; Heckler et al., 2013; Castilho et al., 2015). Segundo estes autores, o desenvolvimento da ampola trata-se da presença de espermatóforos no sistema reprodutor. Contudo, a identificação macroscópica da maturidade fisiológica não é um parâmetro seguro a ser utilizado, de modo que a maturação do sistema reprodutor só pode ser identificada pela presença de espermatozoides no lúmen do sistema reprodutor masculino por microscopia (Fransozo et al., 2011).

As maturidades morfológica e fisiológica em Decapoda não apresentam um padrão de ordenação claro, havendo exemplos onde uma é alcançada antes da outra (Hartnoll, 1982; Sastry, 1983; Jivoff et al., 2007; Nascimento e Zara, 2013). Na literatura existem poucos trabalhos tratando a sincronização das maturidades morfológica e fisiológica em peneídeos. Neste grupo, a maturidade morfológica antecedendo a fisiológica foi investigada em *Parapenaeus longirostris* (Lucas, 1846) por meio da observação macroscópica do sistema reprodutor evidente visualizado através da carapaça (Sobrino e García, 2007). Por outro lado, em *Fenneropenaeus merguensis* (de Man, 1888) como *Penaeus merguensis* em Tuma (1967), a maturidade fisiológica, comprovada por histologia, ocorre antes da maturidade morfológica. Desta forma, a existência ou não de padrão para a maturidade que ocorre primeiro (morfológica ou fisiológica) nesta família de interesse econômico ainda foi pouco estudada.

Machos sexualmente maduros devem apresentar espermatozoides e/ou espermatóforos prontos para a transferência, além de possuir estruturas morfológicas relacionadas a transferência espermática desenvolvidas (Hartnoll, 1982; Zara et al., 2012; Nascimento e Zara, 2013). Contudo, a maturação morfológica e fisiológica não é a garantia do sucesso reprodutivo, pois somente após a efetiva capacidade de transferência do material seminal, seguida de fertilização dos ovócitos, é que garante ao indivíduo estar maduro funcionalmente (Elner e Beninger, 1995; Minagawa e Higuchi, 1997; Pardo et al., 2009). A maturidade funcional sem dúvida é a mais difícil de ser avaliada dentro de estudos populacionais, principalmente em Penaeidae.

Existem poucos trabalhos sobre a ultraestrutura do sistema reprodutor e produção de fluido seminal em Penaeidae, quando comparado a grande diversidade de espécies (para revisão, ver De Grave e Fransen, 2011). A ultraestrutura da espermatogênese nos peneídeos foi somente realizada para o Trachypeneini *Metapenaeus monoceros* (Fabricius, 1798), contudo, a descrição ainda carece de detalhes de todo o processo (Abraham et al., 2007). Porém, as outras tribos foram mais estudadas como os Peneini *Litopenaeus schmitti* (Burkenroad, 1936) por Fransozo et al. (2016), *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931) como *Penaeus vannamei* desenvolvido por Alfaro-Montoya (2016), *Fenneropenaeus chinensis* (Osbeck, 1765) em Kang et al. (2008), para *Fenneropenaeus penicillatus* (Alcock, 1905) como *Penaeus penicillatus* em Hong et al. (1999) e para *Penaeus monodon* Fabricius, 1798 conduzido por Feng et al. (2017), e um só trabalho para a tribo Parapeneini com *P. longirostris* realizado por Medina (1994). Por outro lado, a ultraestrutura do vaso deferente foi somente estudada nos Peneini *L. vannamei* (como *P. vannamei* em Chow et al., 1991) e *Litopenaeus setiferus* (Linnaeus, 1767) descrito como *Penaeus setiferus* em Ro et al. (1990) e Chow et al. (1991). Em todos estes trabalhos, ocorre a produção do espermatóforo único e a secreção produzida pela ampola está relacionada à formação da “asa” do espermatóforo, estrutura com função de unir as massas espermáticas liberadas de ambos os lados do sistema reprodutor masculino. Contudo, estes trabalhos foram realizados com espécies em que a fêmea possui tético aberto (para revisão ver Pérez-Farfante e Kensley 1997), sendo a produção espermática pouco estudada em espécies onde a fêmea possui tético fechado.

Portanto, há uma lacuna de informações ultraestruturais do sistema reprodutor em camarões com tético fechado, sendo ainda menos conhecido neste aspecto os integrantes da tribo Trachypeneini. Esta tribo tem estudos limitados a morfologia dos espermatozoides sob o microscópio eletrônico de varredura e transmissão e o sistema reprodutor em microscópio de luz (Bauer e Lin, 1993; Alfaro et al., 2003; Abraham et al., 2007; Camargo et al., 2017).

As características do sistema reprodutor masculino, associadas aos mecanismos de montagem dos espermatóforos que culminam nas estratégias de transferência espermática, são importantes ferramentas para a compreensão das relações evolutivas em peneídeos (King, 1948; Bauer, 1986, 1991; Bauer e Lin, 1993). Além disso, estas informações servem como ferramenta para estudos populacionais e reprodutivos, com o intuito de elaborar medidas que evitem a captura de indivíduos menores ao tamanho de maturação, a fim de preservar os estoques naturais (Fransozo et al., 2011).

Nesta dissertação, o objetivo foi testar a existência de sincronia entre as maturidades fisiológica e morfológica e, posteriormente mostrar como ocorre o desenvolvimento do sistema reprodutor masculino desde a fase juvenil em *X. kroyeri*, o que culminou com os dados organizados no capítulo 1. Assim, após a análise da maturidade morfológica e fisiológica, foi conduzido o capítulo 2 com a descrição detalhada do sistema reprodutor masculino sob o ponto de vista ultraestrutural deste camarão, tendo em vista a carência de estudos ao microscópio eletrônico de transmissão, focando a produção do fluido seminal e formação de espermatóforos em Penaeidae e, principalmente, Thrachypeneini.

## Referências

- Abraham, J., Manisseri, M.K. and Sanil, N.K., 2007. Spermatogenesis and spermatozoal ultrastructure in *Metapenaeus monoceros* (Fabricius, 1798). Indian J Fish 54, 1-9.
- Alfaro, J., Muñoz, N., Vargas, M. and Komen, J., 2003. Induction of sperm activation in open and closed thelycum penaeiod shrimps. Aquaculture 216, 371-381.
- Alfaro-Montoya, J., Braga, A., Vargas, M. and Umaña-Castro, R., 2016. Ultrastructural demonstration of the model of *Litopenaeus vannamei*

- (Crustacea, Penaeidae) male sexual maturation and spermatozoal capacitation. *Invertebr Reprod Dev* 61, 9-17.
- Almeida, A.C., Baeza, J.A., Fransozo, V., Castilho, A.L. and Fransozo, A., 2012. Reproductive biology and recruitment of *Xiphopenaeus kroyeri* in a marine protected area in the Western Atlantic: implications for resource management. *Aquat Biol* 17, 57-69.
- Bauer, R.T., 1986. Phylogenetic trends in sperm transfer and storage complexity in decapod crustaceans. *J Crust Biol* 6, 313-325.
- Bauer, R.T., 1991. Sperm transfer and storage structures in penaeoid shrimps: a functional and phylogenetic perspective. In: Bauer, R.T. and Martin, J.W. (Eds), *Crustacean Sexual Biology*. Columbia University Press, New York, pp. 183-207.
- Bauer, R.T. and Cash, C.E., 1991. Spermatophore structure and anatomy of the ejaculatory duct in *Penaeus setiferus*, *P. duorarum*, and *P. aztecus* (Crustacea: Decapoda): homologies and functional significance. *Trans Am Microsc Soc* 110, 144-162.
- Bauer, R.T. and Lin, M.J., 1993. Spermatophores and plug substance of the marine shrimp *Trachypenaeus similis* (Crustacea: Decapoda: Penaeidae): formation in the male reproductive tract and disposition in the inseminated female. *Biol Bull* 185, 174-185.
- Branco, J.O., 2005. Biologia e pesca do camarão sete-barbas *Xiphopenaeus kroyeri* (Heller) (Crustacea, Penaeidae), na Armação de Itapocoroy, Penha, Santa Catarina, Brasil. *Rev Bras Zool* 22, 1050-1062.
- Burkenroad, M.D., 1934. The Penaeidea of Louisiana, with a discussion of their world relationships. *Bull Am Museum Nat Hist* 68, 61-143.
- Camargo, T.R., Rossi, N., Castilho, A.L., Costa, R.C., Mantelatto, F.L. and Zara, F.J., 2017. Sperm ultrastructure of shrimps from the family Penaeidae (Crustacea: Dendrobranchiata) in a phylogenetic context. *Arthropod Struct Dev* 46, 588-600.
- Castilho, A.L., Bauer, R.T., Freire, F.A.M., Fransozo, V., Costa, R.C., Grabowski, R.C. and Fransozo, A., 2015. Lifespan and reproductive dynamics of the commercially important sea bob shrimp *Xiphopenaeus kroyeri* (penaeoidea): synthesis of a 5-year study. *J Crust Biol* 35, 30-40.

- Castro, R.H., Costa, R.C., Fransozo, A., Mantelatto, F.L.M., 2005. Population structure of the seabob shrimp *Xiphopenaeus kroyeri* (Heller, 1862) (Crustacea, Penaeoidea) in the littoral of São Paulo, Brazil. *Sci. Mar.* 69, 105-112, <http://dx.doi.org/10.3989/scimar.2005.69n1105>.
- Chow, S., Dougherty, M.M., Dougherty, W.J. and Sandifer, P.A., 1991. Spermatophore formation in the white shrimps *Penaeus setiferus* and *P. vannamei*. *J Crust Biol* 11, 201-216.
- Costa, R.C., Fransozo, A., Mantelatto, F.L.M. and Castro, R. H., 2000. Occurrence of shrimp species (Crustacea: Decapoda: Natantia: Penaeidea and Caridea) in Ubatuba Bay, Ubatuba, SP, Brazil. *Proc Biol Soc Washingt* 113, 776-781.
- Costa, R.C., Fransozo, A., Melo, G.A.S. and Freire, F.A.M., 2003. An illustrated key for Dendrobranchiata shrimps from the northern coast of São Paulo state, Brazil. *Biota Neotrop* 3, 1-12.
- Costa, R.C., Fransozo, A., Freire, F.A.M. and Castilho, A.L., 2007. Abundance and ecological distribution of the “sete-barbas” shrimp *Xiphopenaeus kroyeri* (Heller, 1862) (Decapoda: Penaeoidea) in three bays of the Ubatuba region, South-eastern Brazil. *Gulf Caribb Res* 19, 33-41.
- Costa, R.C., Heckler, G.S., Simões, S.M., Lopes, M. and Castilho, A.L., 2011. Seasonal variation and environmental influences in abundance of juveniles of the seabob shrimp *Xiphopenaeus kroyeri* (Heller, 1862) in southeastern Brazil. In: Pessani, D., Frogliá, C., Biaggi, E., Nurra, N., Basile, R., et al. (Eds), *Behaviour, Ecology, Fishery*. Museo Regionale di Scienze Naturali di Torino, Turin, pp. 45-56.
- Dall, W., Hill, B.J., Rothlisberg, P.C. and Sharples, D.J., 1990. *The Biology of the Penaeidae*. Academic Press, San Diego.
- De Grave, S. and Franssen, C.H.J.M., 2011. Carideorum catalogus: the recent species of Dendrobranchiate, Stenopodidean, Procarididean and Caridean shrimps (Crustacea: Decapoda). *Zol Med Leiden* 85, 195-588.
- D’Incao, F., 1999. Subordem Dendrobranchiata (camarões marinhos). In: Backup, L. and Backup, G.B. (Eds), *Os Crustáceos do Rio Grande do Sul*. Ed. Universidade/UFRGS, Porto Alegre, pp. 275-299.

- D’Incao, F., Valentini, H. and Rodrigues, L.F., 2002. Avaliação da pesca de camarões nas regiões Sudeste e Sul do Brasil. 1965-1999. *Atlântica* 24, 103-116.
- Elnor, R.W. and Beninger, P.G., 1995. Multiple reproductive strategies in snow crab, *Chionoecetes opilio*: physiological pathways and behavioral plasticity. *J Exp Mar Biol Ecol* 193, 93-112.
- Feng, T., Patterson, B. and Johnston, S., 2017. New insights into the spermatogenesis of the black tiger prawn, *Penaeus monodon*. *J Morphol* 278, 689-703.
- Fransozo, A., Costa, R.C., Mantelatto, F.L.M., Pinheiro, M.A.A. and Santos, S., 2002. Composition and abundance of shrimp species (Penaeidea and Caridea) in Fortaleza Bay, Ubatuba, São Paulo, Brazil. In: Briones, E.E. and Alvarez, F. (Eds), *Modern Approaches to the Study of Crustacea*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, pp. 117-123.
- Fransozo, V., Santos, D.C., López-Greco, L.S. and Bolla Junior, E.A., 2011. Development of secondary sexual characters in the seabob shrimp *Xiphopenaeus kroyeri* (Heller 1862) (Crustacea, Decapoda, Penaeidae): a scanning electron microscope study. *Invertebr Reprod Dev* 55, 6-15.
- Fransozo, V., Fernandes, A.B., López-Greco, L.S., Zara, F.J. and Santos, D.C., 2016. Functional morphology of the male reproductive system of the white shrimp *Litopenaeus schmitti* (Burkenroad, 1936) (Crustacea, Penaeidea) compared to other *Litopenaeus*. *Invertebr Repr Dev* 60, 161-174.
- Gillett, R., 2008. Global study of shrimp fisheries. In: *FAO Fisheries and Aquaculture Technical Paper*, No. 475. FAO, Rome.
- Hartnoll, R.G., 1982. Growth. In: Bliss, D. E. and Abele, L.G. (Eds), *The Biology of Crustacea*. Academic Press, New York, pp. 11-185.
- Heckler, G.S., Simões, S.M., Lopes, M., Zara, F.J. and Costa, R.C., 2013. Biologia populacional e reprodutiva do camarão sete-barbas na baía de Santos, São Paulo. *Bol Inst Pesca* 39(3), 283-297.
- Hong, S., Xia, C. and Wu, W., 1999. Spermatogenesis in the shrimp *Penaeus penicillatus*. *Oceano Limno Sinica* 30, 368-373.
- Jivoff, P., Hines, A.H. and Quaquerbush, L.S., 2007. Reproduction biology and embryonic development. In: Kennedy, V.S. and Cronin, L.E. (Eds), *The Blue*

- Crab *Callinectes sapidus*. Maryland Sea Grant College, Maryland, pp. 255-298.
- Kang, X., Ge, S., Guo, M., Liu, G., and Mu, S., 2008. A transmission electron microscopy investigation: The membrane complex in spermatogenesis of *Fenneropenaeus chinensis*. *Cytotechnology* 56, 113-121.
- King, J.E., 1948. A study of the reproductive organs of the common marine shrimp, *Penaeus setiferus* (Linnaeus). *Biol Bull* 94, 244-262.
- Lopes, D., Frédou, F.L., Silva, E., Calazans, N. and Peixoto, S., 2017. Reproductive cycle of seabob shrimp *Xiphopenaeus kroyeri* (Crustacea, Penaeidea) from the northeast coast of Brazil. *Invertebr Reprod* 61, 137-141.
- Medina, A., 1994. Spermiogenesis and sperm structure in the shrimp *Parapenaeus longirostris* (Crustacea: Dendrobranchiata): comparative aspects among decapods. *Mar Biol* 119, 449-460.
- Minagawa, M. and Higuchi, S., 1997. Analysis of size, gonadal maturation, and functional maturity in the spiny lobster *Panulirus japonicus* (Decapoda: Palinuridae). *J Crust Biol* 17, 70-80.
- Nakagaki, J.M. and Negreiros-Fransozo, M.L., 1998. Population biology of *Xiphopenaeus kroyeri* (Heller, 1862) (Decapoda: Penaeidae) from Ubatuba Bay, São Paulo, Brazil. *J Shellfish Res* 17, 931-935.
- Nascimento, F.A. and Zara, F.J., 2013. Development of the male reproductive system in *Callinectes ornatus* Ordway, 1863 (Brachyura: Portunidae). *Nauplius* 21, 161-177.
- Pardo, L.M., Fuentes, J.P., Olguín, A. and Orensanz (Lobo), J.M., 2009. Reproductive maturity in the edible Chilean crab *Cancer edwardsii*: methodological and management considerations. *J Mar Biol Assoc UK* 89, 1627-1634.
- Pérez-Farfante, I., and Kensley, B., 1997. Penaeoid and Sergestoid Shrimps and Prawns of the World. Keys and Diagnoses for the Families and Genera. *Mémoires du Muséum National d'Histoire Naturelle*, Paris.
- Rodrigues, E.S., Pita, J.B., Graça-Lopes, R., Coelho, J.A. and Puzzi, A., 1993. Aspectos biológicos e pesqueiros do camarão sete-barbas (*Xiphopenaeus kroyeri*) capturados pela pesca artesanal no litoral do Estado de São Paulo. *Bol Inst Pesca* 19, 67-81.

- Sastry, A.N., 1983. Ecological aspects of reproduction. In: Vernberg, W.B. and Vernberg, F.J. (Eds), *The Biology of Crustacea: Environmental Adaptations*, Vol. 8. Academic Press, New York. pp. 179-270.
- Sobrinho, I. and García, T., 2007. Reproductive aspects of the rose shrimp *Parapenaeus longirostris* (Lucas, 1846) in the Gulf of Cadiz (southwestern Iberian Peninsula). *Bol Inst Esp Oceanogr* 23, 57-71.
- Tuma, D.J., 1967. A description of the development of primary and secondary sexual characters in the banana prawn, *Penaeus merguensis* De Man (Crustacea: Decapoda: Penaeidae). *Aust J Mar Freshw Res* 18, 73-88.
- Zara, F.J., Toyama, M.H., Caetano, F.H. and López-Greco, L.S., 2012. Spermatogenesis, spermatophore, and seminal fluid production in the adult blue crab, *Callinectes danae* (Portunidae). *J Crust Biol* 32, 249-262.

## Capítulo 1.

### Maturidade sexual morfológica X fisiológica: desenvolvimento do sistema reprodutor do camarão sete-barbas *Xiphopenaeus kroyeri* (Crustacea: Penaeidae)

**Guilherme Casemiro Andrioli.\*** Universidade Estadual Paulista (UNESP), FCAV, Centro de Aquicultura da UNESP (CAUNESP), Departamento de Biologia Aplicada, Laboratório de Morfologia de Invertebrados (IML), Via de Acesso Prof. Paulo Donato Castellane, s/n, 14884-900, Jaboticabal, São Paulo, Brasil. gandriol@hotmail.com.

**Thiago Maia Davanço.** Universidade Estadual Paulista (UNESP), Faculdade de Ciências, Departamento de Ciências Biológicas, Laboratório de Biologia de Camarões Marinhos e de Água Doce (LABCAM), 17033-360 Bauru, São Paulo, Brasil. tdavanco@hotmail.com.

**Rogério Caetano da Costa.** Universidade Estadual Paulista (UNESP), Faculdade de Ciências, Departamento de Ciências Biológicas, Laboratório de Biologia de Camarões Marinhos e de Água Doce (LABCAM), 17033-360 Bauru, São Paulo, Brasil. rccosta@fc.unesp.br.

**Fernando Jose Zara.** Universidade Estadual Paulista (UNESP), FCAV, Centro de Aquicultura da UNESP (CAUNESP) e IEAMar/UNESP, Departamento de Biologia Aplicada, Laboratório de Morfologia de Invertebrados (IML), Via de Acesso Prof. Paulo Donato Castellane, s/n, 14884-900, Jaboticabal, São Paulo, Brasil. fjzara@gmail.com.

#### Destaques

- Em *X. kroyeri* a maturidade morfológica antecede a maturidade fisiológica.
- O sistema reprodutor masculino de *X. kroyeri* é idêntico ao de outros Trachypenaeini, sendo assim considerado o padrão da tribo e distinto as outras tribos de Penaeidae.
- A observação macrocópica do desenvolvimento da ampola não é um parâmetro seguro para determinar a maturidade fisiológica em machos de *X. kroyeri*.

Este capítulo foi redigido conforme as normas da Revista Fisheries Research

## Resumo

A maturidade sexual morfológica e a fisiológica em machos de Penaeidae são determinadas pela presença de petasma e pela observação do desenvolvimento da ampola no vaso deferente, respectivamente. Contudo, a maturidade fisiológica apenas pode ser confirmada pela presença de espermatozoides maduros na luz do vaso deferente (VD) por meio de histologia. Este trabalho teve como objetivo testar a sincronia entre a maturidade morfológica e fisiológica de machos do camarão *Xiphopenaeus kroyeri* coletados em Ubatuba (São Paulo), sudeste do Brasil. Os camarões tiveram o comprimento de carapaça (CC) mensurado e, aqueles destinados à microscopia foram processados conforme a rotina de microscopia de luz ou eletrônica de varredura. Os machos de *X. kroyeri* a partir da classe de tamanho 12 – 13 mm de CC apresentaram petasma, porém não apresentaram espermatozoides ou espermatóforos no VD, os quais foram encontrados somente a partir da classe de 14 – 15 mm de CC. O sistema reprodutor é composto por um par de testículos contendo 12 lóbos e um par de VD. Os espermatozoides saem prontos do testículo e desembocam dos dutos seminíferos ao VD. A região proximal do VD é responsável pelo empacotamento dos espermatozoides em espermatóforos. As regiões média e distal do VD produzem os principais componentes do fluido seminal e apresentam gradativo aumento da camada muscular, tornando-se espessa. No final do VD está localizada a ampola, formando uma glândula adjacente apresentando secreção sem espermatozoides.

Palavras-chave: Penaeoidea, histoquímica, histologia, MEV.

**Abstract**

The morphological and physiological sexual maturity in Penaeidae males are determined by the presence of petasma and the observation of the development of the ampoule of vas deferens (VD), respectively. However, the physiological maturity can only be confirmed by the presence of mature sperm in the lumen of the VD through histology. This work aimed to test the synchrony between the morphological and physiological maturity of males of the shrimp *Xiphopenaeus kroyeri* collected in Ubatuba (São Paulo), southeast Brazil. The shrimps had the cephalothorax length (CL) measured and those intended for microscopy were processed according the routine of light microscopy or scanning electron microscopy. The males of *X. kroyeri*, from the size class 12 – 13 mm of CL presented petasma, but they did not present spermatozoa and spermatophores in the VD, which were found from the class size of 14 – 15 mm of CL. The reproductive system is composed of a pair of testes containing 12 lobes and a pair of VD. The spermatozoa become mature in the testes and the seminiferous ducts lead then to the VD. The proximal region of the VD is responsible for packing the spermatophores. The medial and distal regions of the VD produce the main seminal fluid compounds and present a gradual increase of the muscular layers becoming thick. The ampoule is inserted at the end of the VD, forming an adjacent gland showing secretion without any spermatozoa.

Key-words: Penaeoidea, histochemistry, histology, SEM.

## 1. Introdução

O camarão sete-barbas *Xiphopenaeus kroyeri* (Heller, 1862) apresenta ampla distribuição geográfica, ocorrendo desde a Carolina do Norte (Estados Unidos da América) até o Rio Grande do Sul (Brasil) (Castilho et al., 2015; Castro et al., 2005; Costa et al., 2007; Gusmão et al., 2006). Devido a sua ampla distribuição e abundância, é considerada uma espécie de grande importância econômica (Almeida et al., 2012; Gillet, 2008; Lopes et al., 2017). No Brasil, *X. kroyeri* é um dos recursos pesqueiros marinhos mais importantes, sendo um dos mais explorados no litoral norte do Estado de São Paulo (Castro et al., 2005; Nakagaki e Negreiros-Fransozo, 1998). Este camarão é encontrado entre 2 a 70 metros de profundidade (Costa et al., 2003) sendo explorado intensamente até os 25 metros de profundidade pela pesca artesanal (Costa et al., 2007, 2000; Fransozo et al., 2002).

Estudos sobre biologia populacional e pesqueira de camarões da família Penaeidae Rafinesque, 1815 utilizam as características sexuais macroscópicas para identificação da maturidade sexual (Costa e Fransozo, 2004; Eutrópio et al., 2013; Heckler et al., 2014, 2013). Em machos, a transição da fase juvenil para a adulta é marcada pela maturidade sexual morfológica, a qual é determinada pela união dos endopoditos do primeiro par de pleópodos formando o petasma, estrutura que parece atuar na transferência espermática (Bauer, 1996, 1991; Pérez-Farfante, 1969). A determinação da maturidade sexual fisiológica em machos de peneídeos, conduzido principalmente em estudos de dinâmica populacional, é determinada macroscopicamente pela observação do desenvolvimento da ampola na região distal do vaso deferente (Almeida et al., 2012; Castilho et al., 2015; Heckler et al., 2013). Contudo Fransozo et al (2011) ressalva que o parâmetro seguro para determinar a maturidade fisiológica seria por meio de histologia, com a presença de espermatozoides e fluido seminal no sistema reprodutor.

Para a maturidade morfológica e fisiológica em Decapoda, há exemplos nos quais uma antecede a outra, não sendo observado um padrão de sincronia entre as duas (Hartnoll, 1982; Jivoff et al., 2007; Nascimento e Zara, 2013; Sastry, 1983). Em Penaeidae, a maturidade morfológica antecedendo a fisiológica foi demonstrada em machos de *Parapenaeus longirostris* (Lucas, 1846), determinada

por meio da identificação do desenvolvimento do sistema reprodutor, porém observado de forma macroscópica e através da carapaça do esterno (Sobrinho e García, 2007). No Penaeini *Fenneropenaeus merguensis* (de Man, 1888) como *Penaeus merguensis* em Tuma (1967), foi comprovado por histologia que a maturidade fisiológica ocorre antes da morfológica. Portanto, não se pode prever qual é a forma de maturidade (morfológica ou fisiológica) ocorre primeiro nesta família, a qual é diversa em espécies e de importância econômica (De Grave e Fransen, 2011).

De modo geral, o sistema reprodutor masculino de Penaeidae contém um par de testículos e um par de *vasa deferentia*. O vaso deferente é dividido em três regiões: proximal (PVD), média (MVD) e distal (DVD), sendo a última região marcada pela ampola terminal envolta por espessa musculatura, de modo que esta descrição é aplicada tanto para Peneini (Bauer, 1991; Bauer e Cash, 1991; Burkenroad, 1934; Chow et al., 1991a; Fransozo et al., 2016), como para único Trachypeneini estudado, *Rimapenaeus similis* (Smith, 1885) como *Trachypenaeus similis* em Bauer e Lin (1993). Apesar destes vários estudos, nenhum deles descreveu o desenvolvimento sistema reprodutor masculino desde a fase juvenil até a adulta.

Machos sexualmente maduros devem atender ao menos duas premissas básicas: (a) apresentar espermatozoides e/ou espermatóforos prontos para a transferência, (*i.e.*, maturidade fisiológica); (b) possuir estruturas desenvolvidas que auxiliem na transferência espermática (*i.e.*, maturidade morfológica) (Hartnoll, 1982; Nascimento e Zara, 2013; Zara et al., 2012). Uma terceira premissa, a mais difícil de ser estudada, seria a capacidade de reprodução efetiva ou maturidade funcional, observada pela aceitação do material seminal por parte da fêmea, seguido da fertilização dos ovócitos (Elner e Beninger, 1995; Minagawa e Higuchi, 1997; Pardo et al., 2009). Assim, a maturidade funcional torna o indivíduo reprodutivamente apto. O reconhecimento dos animais aptos à reprodução é um fator importante para estudos de biologia reprodutiva, de modo que, de fato estes animais possam contribuir com a manutenção dos estoques naturais, promovendo assim a preservação destas espécies. Tais estudos contribuem para a elaboração de medidas que evitem a captura de indivíduos menores que o tamanho de maturação, tornando a pesca mais sustentável (Fransozo et al., 2011).

Assim, o objetivo deste trabalho foi verificar se existe sincronização ou não entre a maturidade sexual morfológica e a fisiológica, por meio da descrição do desenvolvimento do sistema reprodutor masculino de *X. kroyeri* desde a fase juvenil até a adulta.

## **2. Material e Métodos**

### **2.1. Coleta dos animais**

Machos de *X. kroyeri* foram coletados durante a primavera de 2013, verão de 2014 e inverno de 2016 em Ubatuba (23° 27'S e 45° 02'W), estado de São Paulo, Brasil. Os arrastos foram realizados entre 5 e 15 metros de profundidade durante 20 minutos em cada estação amostral, com a utilização de um barco de pesca camaroeiro equipado com redes do tipo *double-rig*. Após as coletas, os animais foram mantidos vivos em caixas de isopor com aeração e transportados ao laboratório.

### **2.2. Determinação da maturidade sexual**

Os animais foram anestesiados por resfriamento (-20°C / 5 minutos) e separados em classes de tamanho de forma arbitrária, com diferença de um milímetro de amplitude do comprimento do cefalotórax (CC), medido com paquímetro com precisão de 0,05 mm. Foram analisados 32 indivíduos machos com CC variando de 8 a 20 mm. Para a maturidade sexual morfológica, os indivíduos foram considerados juvenis quando os endopoditos do primeiro par de pleópodos (lóbulo do petasma) apresentaram-se separados e, adultos quando os mesmos se encontravam unidos, formando o petasma (Bauer e Rivera Vega, 1992; Fransozo et al., 2011; Pérez-Farfante e Kensley, 1997). Para a maturidade sexual fisiológica foram obtidas amostras do sistema reprodutor masculino de indivíduos juvenis e adultos, utilizando ao menos dois indivíduos de cada classe de tamanho, a fim de verificar a presença de espermatozoides ou espermatóforos no lúmen do vaso deferente (Nascimento e Zara, 2013).

### 2.3. Ultraestrutura do sistema reprodutor, endopoditos, petasma e tólico

Amostras do sistema reprodutor masculino de seis indivíduos, sendo dois juvenis (8-13 mm de CC) e quatro adultos (14-20 mm de CC) foram dissecados e fixados em solução de Karnovsky (glutaraldeído 2,5% e paraformaldeído 2% em tampão cacodilato de sódio 0,1M pH 7,2) por 24 horas e pós-fixados em tetróxido de ósmio 1% no mesmo tampão por 2 horas (Ro et al., 1990). Posteriormente, as amostras foram desidratadas em etanol (30-100%), submetidas ao ponto crítico EMS 850, fixadas à suportes metálicos e recobertas com ouro (5 nm) no vaporizador Denton Vacuum Desk II. Todos os materiais foram analisados e fotografados no microscópio eletrônico de varredura Jeol SEM JSM 5410 operado a 15 kV. O mesmo protocolo foi utilizado para a ultraestrutura do primeiro par de endopoditos dos machos e do petasma. Porém foram utilizadas amostras de ao menos dois indivíduos para cada classe de tamanho, variando de 9 a 21 mm de CC. As regiões do petasma foram identificadas de acordo Bauer (1991) e Pérez-Farfante e Kensley (1997). Adicionalmente, amostras de tólico de fêmeas maduras, com ovário de coloração esverdeada ocupando maior parte do abdômen (Campos et al., 2009), foram dissecadas e processadas utilizando o mesmo protocolo citado anteriormente. Os tólicos foram fotografados em vista ventral externa e celomática com intuito de detectar a presença de fluido seminal e espermatóforos na espermateca.

### 2.4. Histologia e histoquímica

Para a determinação da maturidade fisiológica, 32 indivíduos foram dissecados e tiveram o sistema reprodutor fixado em paraformaldeído 4% em tampão fosfato de sódio 0,2M (pH 7,4) por no mínimo 24h. Após a fixação, as amostras foram lavadas no mesmo tampão, desidratadas, embebidas e incluídas em historesina glicol-metacrilato Leica®. Cortes seriados de 5 a 8 µm foram obtidos em micrótomo rotativo. Para a descrição geral, os cortes foram corados com hematoxilina e eosina (Junqueira e Junqueira, 1983). Para a detecção de proteínas, polissacarídeos neutros e ácidos foram utilizadas as técnicas de Xylidine ponceau (Mello e Vidal, 1980), PAS e azul de Alcian (Junqueira e

Junqueira, 1983), respectivamente. Todas as lâminas foram fotografadas no microscópio óptico Leica DM2000, utilizando o programa Leica® IM50.

## 2.5. Medidas dos espermatozóitos

A média do diâmetro dos espermatozóitos foi obtida em 22 machos adultos de *X. kroyeri* distribuídos por classe de tamanho de 1 mm, utilizando-se ao menos dois indivíduos em cada classe de tamanho. Os espermatozóitos foram obtidos sempre da DVD, sendo estes submetidos à técnica de esmagamento (Zara et al., 2012). O tamanho médio foi obtido pela medida do maior diâmetro de 70 espermatozóitos por indivíduo. A análise de regressão linear simples foi ajustada, tendo CC como variável independente (x) e o diâmetro dos espermatozóitos como variável dependente (y).

## 3. Resultados

Ao microscópio de varredura, pôde-se identificar as diferentes regiões do sistema reprodutor masculino de *X. kroyeri*. Este sistema está dividido em testículo e vaso deferente, sendo este com regiões proximal (PVD), média (MVD) e distal (DVD). Esta última associa-se à ampola terminal antes do gonóporo (Fig. 1). Durante o crescimento corporal, foi observado que o sistema reprodutor masculino não sofre alterações na anatomia geral, somente aumentando em tamanho as diferentes regiões, desde a fase juvenil até a adulta. Contudo, o crescimento parece ser mais acentuado somente a partir da classe de maturação fisiológica (14 – 15 mm de CC). A ampola cresce, qualitativamente, de maneira assimétrica em relação às outras regiões (Fig. 1). A completa união do petasma nos animais coletados ocorreu na classe de tamanho 12 – 13 mm de CC (Fig. 1).

Animais juvenis (menores que 12 mm de CC) apresentam os endopoditos do primeiro par de pleópodos modificados e semelhantes ao petasma, porém nunca fusionados (Fig. 2A). Nesta classe de tamanho, os *cincinnuli* têm morfologia semelhante a pequenos ganchos presentes na face interna de cada endopodito modificado (Fig. 2B). Os endopoditos modificados nestes animais possuem projeções disto-laterais ao comprimento de cada endopodito (Fig. 2A e C). O aspecto do exoesqueleto destas projeções e corpo principal parece ser mais flácido (Fig. 2A - C). A partir da classe de tamanho de 12 – 13 mm de CC, parte

dos indivíduos apresentaram petasma. Nestes animais, o endopodito possui o corpo principal com dois lóbulos, o lateral externo e o médio, o qual está unido ao lóbulo médio do outro endopodito por meio dos *cincinnuli* (Fig. 2D e E). Os cornos laterais do petasma encontram-se abertos desde a porção proximal até a distal, formando um sulco, dando ao corno o aspecto de uma canaleta, a qual é continuamente aberto até a estrutura distal em forma de pá (Fig. 2D e F). Em indivíduos nas maiores classes de tamanho (> 16 mm de CC) o petasma possui a mesma morfologia geral do corpo principal, unido por *cincinnuli* também com a mesma morfologia (Fig. 2G e H). Contudo, os cornos laterais não apresentam mais o sulco longitudinal, devido á uma dobra da margem posterior, sobre a anterior, formando um duto totalmente fechado, restando assim somente a estrutura em forma de pá aberta (Fig. 2G e I).

Indivíduos machos juvenis e adultos entre 12 a 13 mm de CC, não apresentam espermatozoides ou espermatóforos em nenhuma das regiões anatômicas do sistema reprodutor (Fig. 3A - F). O testículo apresenta somente espermatogônias e espermatócitos (Fig. 3A). A PVD é um tubo simples sem diferenciação em porções, apresentando epitélio colunar simples, com núcleos basais, e delgada camada muscular. O lúmen encontra-se com pequena quantidade de secreção, levemente fibrilar acidófila (Fig. 3B). A MVD e DVD apresentam o mesmo aspecto epitelial que a região anterior, incluindo a secreção luminal, sem a presença de espermatozoides e espermatóforos. Estas regiões do vaso tem como principal diferença a espessa camada muscular composta por feixes circulares e oblíquos (Fig. 3C e D). Na DVD ocorre a abertura da ampola, a qual apresenta epitélio estratificado, sendo a última camada marcada por células contendo vesículas de secreção, as quais são liberadas por mecanismo holócrino (Fig. 3D). A pequena quantidade de secreção luminal é acidófila, sendo exclusivamente proteica, sem a presença de polissacarídeos neutros e ácidos (Fig. 3D - F).

Machos com o sistema reprodutor presentes de espermatozoides, espermatóforos e secreção seminal foram encontrados a partir da classe de tamanho 14 - 15 mm. Neste estudo os maiores machos estudados estavam na classe de tamanho de 19 - 20 mm de CC. Estes não apresentaram diferenças morfológicas em relação aos indivíduos imaturos, porém apresentaram

espermatozoides empacotados em espermatóforos imersos em secreção no vaso deferente (Fig. 3 - 6). O menor animal fisiologicamente e morfológicamente maduro apresentou 14,1 mm de CC. O testículo maduro possui lóbulos testiculares contendo túbulos seminíferos enveloados, envolvidos por uma delgada camada de tecido conjuntivo (Fig. 4A - B). Estes túbulos possuem uma zona periférica de proliferação de espermatogônias e uma zona central com células no mesmo estágio, ou estágios subseqüente da espermatogênese ou espermiogênese. As células germinativas, principalmente na espermiogênese, encontram-se intimamente associadas às células acessórias (Sertoli). Esta célula possui núcleos variando de arredondados á elípticos e citoplasma arborescente com regiões basófilas entre as células germinativas (Fig. 4B). As espermatogônias são células com nucléolos visíveis e blocos dispersos de heterocromatina (Fig. 4C). Os espermatócitos primários apresentam cromossomos nas diferentes etapas da prófase meiótica (Fig. 4D). Os espermatócitos secundários mostram redução do citoplasma. Os núcleos são menores com heterocromatina intensamente marcada na periferia do envoltório (Fig. 4E). O núcleo das espermátides iniciais tem coloração homogênea, marcado por finos acúmulos de heterocromatina (Fig. 4F). Nas espermátides intermediárias o núcleo possui heterocromatina delgada disposta na periferia, provavelmente associada ao envoltório nuclear, e no citoplasma nota-se uma região citoplasmática fracamente PAS-positiva (Fig. 4G). As espermátides tardias apresentam um dos lados do citoplasma bastante alongado, formando o prolongamento posterior, o qual está no pólo oposto ao espinho em formação. O núcleo encontra-se mais próximo ao espinho com heterocromatina periférica e intensamente corado ao PAS (Fig. 4H). No testículo, os dutos seminíferos apresentam epitélio cúbico simples, e estão preenchidos por espermatozoides livres, os quais serão encaminhados para o vaso deferente (Fig. 4I). Os espermatozoides possuem o prolongamento posterior alongado fracamente reativo para polissacarídeos neutros e no pólo oposto observa-se o espinho apical, basófilo e curvo (Fig. 4J).

No vaso deferente, a PVD apresenta-se como um túbulo bastante convoluto e, diferente dos indivíduos juvenis, esta região foi subdividida em duas porções: anterior (PVDa) com espermatozoides livres e posterior (PVDp) com espermatóforos (Fig. 5A). Na PVDa, epitélio varia de cúbico a colunar simples,

revestido por delgada camada de tecido conjuntivo. Os espermatozoides livres estão imersos em secreção basófila e homogênea (Fig. 5A e B). Ao longo desta porção, os espermatozoides livres são separados por outra secreção basófila, fracamente glicoproteica, em massas espermáticas esféricas ou elipsóides, sem parede (Fig. 5B - D). Após a formação das massas espermáticas, uma secreção acidófila é progressivamente secretada por entre as massas espermáticas por mecanismos merócrinos. Esta secreção mostra-se reativa para proteínas e fracamente positiva para polissacarídeos neutros, e gradativamente deposita-se ao redor das massas espermáticas levando ao início da formação da parede do espermatóforo (Fig. 5E - G). A PVDp possui epitélio pavimentoso, e no lúmen são encontrados espermatóforos esféricos. A parede do espermatóforo recebe um segundo tipo de secreção acidófila, fortemente glicoproteica, a qual é granular antes da fusão. Esta secreção finaliza a parede acelular dos espermatóforos, o qual está imerso no fluido seminal basófilo e fracamente glicoproteico (Fig. 4H - J). O fluido seminal ao longo da PVD não foi reativo ao para polissacarídeos ácidos.

A MVD acumula os espermatóforos os quais estão imersos em secreção basófila semelhante a da PVDp, porém com menos quantidade de secreção granular acidófila. (Fig. 4K). Esta porção do vaso deferente apresenta epitélio pavimentoso, envolto varias camadas de musculatura, porém delgadas em relação aos juvenis (Fig. 4L).

A DVD é marcada por forte musculatura e grande diâmetro luminal em relação às regiões anteriores, acumulando grande quantidade de secreção com espermatóforos (Fig. 5A). O epitélio é pavimentoso apoiado sobre espessa musculatura com varias fibras disposta em inúmeras camadas. (Fig. 5A e B). No lúmen, o fluido seminal tem a mesma característica observada na PVDp e MVD, sendo a matriz basófila, fracamente positiva para proteínas e reativa para polissacarídeos, e a secreção granular fortemente glicoproteica (Fig. 5C e D). A DVD desemboca na ampola, a qual apresenta epitélio estratificado (Fig. 5A, C-E). A última camada das células do epitélio estratificado da ampola é secretora com células holócrinas, produzindo a secreção luminal intensamente proteica, com pequena reatividade para polissacarídeos neutros (Fig. 5F e G). Durante o desenvolvimento, a DVD possui menor volume de fluido seminal entre os

espermátóforos nos indivíduos com 14 – 15 mm de CC. Este mesmo resultado também ocorre com a secreção ampola (Fig. 5H - I). Contudo, a característica química das secreções em ambas as regiões entre as classes não é alterada (Fig. 5H - I). O resumo histoquímico encontra-se na Tabela 1.

O tético das fêmeas de *X. kroyeri* localiza-se próximo aos gonóporos e é formado por duas placas principais justapostas, a placa anterior, em forma de capuz e a posterior, que é mais ampla (Fig. 7A e B). Entre as placas do tético há uma pequena abertura na qual pode conter discreta secreção em fêmeas inseminadas (Fig. 7B e C). Em vista celomática, são observadas duas bolsas simétricas sob a placa posterior do tético recobertas por exoesqueleto. Estas bolsas são as espermatecas, onde são observados os espermátóforos e secreções provenientes dos machos (Fig. 7D). Na porção mais anterior do espermateca existe uma região mais estreita, onde é observada uma secreção esbranquiçada sem espermátóforos (Fig. 7D e E).

O diâmetro dos espermátóforos não variou em relação ao aumento do tamanho corpóreo, sendo os valores bastante distintos dentro da mesma classe de tamanho (Fig. 8).

#### 4. Discussão

Em *X. kroyeri* a maturidade morfológica antecede a maturidade fisiológica, como demonstrado por meio histológico. Machos morfológicamente maduros com petasma no intervalo de 12 – 14 mm de CC possuem o aparato sexual secundário completamente formado, entretanto, estes não estão aptos à reprodução por não apresentarem espermatozoides e espermátóforos imersos em fluido seminal no vaso deferente. O desenvolvimento sequencial das maturidades observadas em *X. kroyeri* ocorre de forma semelhante a *P. longirostris*, na qual a maturidade morfológica é anterior à fisiológica, contudo, este estudo determina a maturidade fisiológica somente pela observação do sistema reprodutor através da carapaça (Sobrino e Garcia, 2007). Por outro lado, a sequência do desenvolvimento das maturidades que ocorre em *X. kroyeri* é inverso ao que ocorre em *F. merguensis*, na qual a maturidade morfológica determinada pela formação do petasma é alcançada somente após a maturidade fisiológica, ou seja, após o surgimento de espermatozoides no vaso deferente (Tuma, 1967). O

duto presente nos cornos laterais do petasma presente em *X. kroyeri* possivelmente tem a função de condução do fluido seminal até o interior do tético das fêmeas, como proposto por Burkenroad (1934) para os integrantes da tribo Trachypeneini, os quais apresentam elevado grau de fechamento do petasma e esclerotização desta estrutura, e as fêmeas possuem tético do tipo fechado (Bauer, 1986, 1991). O fechamento distal do duto do petasma da espécie estudada ocorre somente em indivíduos em uma classe de tamanho maior que a classe de maturidade fisiológica (> 16 mm de CC), indicando assim uma possível muda adicional na vida adulta, o que caracteriza a maturação desta estrutura. Contudo, tendo em vista a característica glicoproteica da secreção seminal, a morfologia com sulco ou duto parece não ser uma barreira, uma vez que todo o corno deva penetrar no tético, para preencher as bolsas com secreção e espermatozóides. Estudos de bioquímica do sistema reprodutor masculino e de comparação de índices gonadosômicos e hepatossômicos que levem em conta somente a maturidade morfológica podem apresentar falhas, uma vez que se deve levar em consideração que machos menores de 14 mm de CC estão em um momento fisiologicamente diferente dos indivíduos maduros. Para trabalhos de dinâmica populacional em *X. kroyeri*, os quais checam somente o desenvolvimento da ampola para determinar a maturidade fisiológica, como em Costa et al. (2005) e Castilho et al. (2015), as estimativas mostram-se válidas em termos valor, uma vez que há pouca diferença ao estimado para maturidade fisiológica destes estudos com parâmetros macroscópicos (13,7 e 14,8 mm de CC, respectivamente) ou pela histologia neste trabalho (14,1 mm de CC).

A morfologia do sistema reprodutor masculino em *X. kroyeri* segue o padrão descrito para camarões peneídeos (Bauer, 1991; Bauer e Cash, 1993; Bauer e Lin, 1993; Chow et al., 1991a; Dougherty e Dougherty, 1989; Fransozo et al., 2016; King, 1948; Tuma, 1967), apresentando um par de testículos fusionados e um par de *vasa deferentia* com três regiões distintas principais, terminando em uma porção glandular dilatada, a ampola (Bauer, 1991; Bauer e Lin, 1993; Chow et al., 1991a; Dougherty e Dougherty, 1989; Fransozo et al., 2016; King, 1948; Tuma, 1967)

O testículo de *X. kroyeri* pode ser classificado como do tipo lobular, proposto para Brachyura (Nagao e Munehara, 2003). Nesta classificação, vários lóbulos

testiculares desembocam em um ducto seminífero central. Esta característica é observada para todos os Dendrobranchiata descritos, podendo ser este o padrão para o grupo (Bauer, 1991; Bauer e Lin, 1993; Castilho et al., 2008; Chow et al., 1991b; Fransozo et al., 2016; Ro et al., 1990). De acordo com a terminologia descrita por Grier et al. (1980) e Grier (1993), a organização do testículo de *X. kroyeri* mostra-se do tipo restrito, na qual cada lóbo apresenta células germinativas no mesmo estágio de desenvolvimento. Este padrão restrito é observado na maioria dos peneídeos e braquiúros (Fransozo et al., 2016; García e Silva, 2006; King, 1948; Krol et al., 1992; López-Greco, 2013; Ro et al., 1990; Simeó et al., 2009; Zara et al., 2012). Nos indivíduos juvenis, o testículo apresentou somente células germinativas até a segunda etapa da meiose, e ausente de espermátides e espermatozoides. Portanto, os espermatócitos destes animais estão aprisionados dentro do ciclo celular, os quais somente finalizarão sua maturação após o estímulo hormonal da maturidade fisiológica, por volta de 14,1 mm de CC. Em indivíduos com o sistema reprodutor desenvolvido, os espermatozoides parecem completamente maduros na luz do túbulo seminífero, com o característico prolongamento posterior e um espinho curvo típico da família (Camargo et al., 2017). Porém, para confirmar se o espermatozoide está totalmente maduro ou não, é necessária a análise deste por meio da microscopia eletrônica de transmissão. A presença de espermatozoides maduros, com espinho formado no túbulo seminífero também foi observada para o Parapeneini *P. longirostris* (Medina, 1994). Contudo, em camarões Peneini do gênero *Litopenaeus* Pérez-Farfante, 1969, a maturação dos espermatozoides, pela formação do espinho, ocorre no vaso deferente ou até mesmo depois de transferidos para o tólico da fêmea (Alfaro et al., 2007; Alfaro-Montoya, 2010; Fransozo et al., 2016). Assim, devido maturação dos espermatozoides ser observada nas tribos Trachypeneini e Peneini com o tólico fechado, com exceção a *Litopenaeus* que apresenta tólico aberto, propomos que em peneídeos de tólico fechado, o espermatozoide apresenta-se maduro (com espinho) logo após o final da espermiogênese nos túbulos seminíferos e de espécies com tólico aberto, o espermatozoide amadureça no vaso deferente ou após a transferência espermática.

Na PVD, o achatamento do epitélio de cúbico e alto a pavimentoso que ocorre entre a PVDa e a PVDp em *X. kroyeri* possivelmente está relacionada com o acúmulo de secreção no interior do vaso, aumentando assim o lúmen. Esta região enovelada do vaso deferente foi caracterizada como PVD devido ao seu papel na formação do espermátóforo, sendo diferente do proposto para *R. similis* (Bauer e Lin, 1993). Neste outro Trachypeneini ocorre este mesmo processo de achatamento durante a formação dos espermátóforos, o que foi responsável pela divisão desta porção do vaso em duas regiões distintas, sendo esta região denominada como MVD (Bauer e Lin, 1993). Contudo, estes autores associaram a região do vaso deferente a MVD, dividindo-a em duas porções, como feito na PVD de *X. kroyeri*. Porém, em decápodas que formam espermátóforos semelhantes a *X. kroyeri*, a região do vaso deferente que produz os espermátóforos é mais próxima do testículo (Castilho et al. 2008; Tiseo et al. 2014; Zara et al., 2012). Em *Litopenaeus*, a PVD é uma região simples do vaso deferente, com epitélio simples cúbico ou colunar, e apresenta espermatozoides imersos em somente um tipo de secreção seminal (Fransozo et al., 2016; Ro et al., 1990). A PVDa é voltada para a produção de secreções que compactem os espermatozoides livres em massas espermáticas, iniciando a produção da secreção que forma a parede dos espermátóforos esféricos a elipsoides, os quais são finalizados na PVDp. A montagem dos espermátóforos na porção enovelada do vaso deferente, como observado na PVD de *X. kroyeri* foi o mesmo registrado para *R. similis* (denominada como MVD), pertencente a mesma tribo do camarão sete-barbas (Bauer e Lin, 1993). Porém em peneídeos da tribo Peneini, como *Litopenaeus setiferus* (Linnaeus, 1767), *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931), *Farfantepeneaeus aztecus* (Ives, 1891) como *Penaeus aztecus* em Bauer e Cash (1991), *Farfantepeneaeus duorarum* (Burkenroad, 1939) como *Penaeus duorarum* em Bauer e Cash (1991), *Melicertus kerathurus* (Forskål, 1775) como *Penaeus kerathurus* em Malek e Bawab (1974a, 1974b) e *F. merguensis*, este empacotamento ocorre somente no momento da ejaculação na porção distal do vaso deferente, com a participação de materiais provenientes da ampola terminal (Bauer e Cash, 1991; Chow et al., 1991a; Fransozo et al., 2016; Malek e Bawab, 1974a, 1974b; Tuma, 1967).

Em *Brachyura*, o processo de montagem dos espermatóforos é bastante similar ao observado em *X. kroyeri*, principalmente o descrito para *Portunidae* (Johnson, 1980; Krol, 1992; Nascimento e Zara, 2013; Zara et al., 2012). Porém, as características químicas das secreções da PVD em *X. kroyeri* são diferentes das encontradas nestes braquiúros (denominada como AVD), as quais são caracterizadas pela presença de polissacarídeos ácidos na compactação das massas espermáticas ou formação da parede dos espermatóforos, como ocorre em *Callinectes danae* Smith, 1869, *Callinectes ornatus* Ordway, 1863 e *Pachygrapsus transversus* (Saussure, 1857), observados por Zara et al. (2012), Nascimento e Zara (2013) e Tiseo et al. (2014), respectivamente. A PVD nos juvenis mostra somente epitélio colunar simples. Contudo, nos indivíduos adultos, esta região do vaso deferente foi dividida em duas porções pelo achatamento do epitélio e pelo surgimento de espermatóforos no lúmen. O achatamento do epitélio não foi observado na PVD de indivíduos juvenis, pela pequena quantidade de secreção presente, tornando o epitélio flácido.

Em *X. kroyeri* a MVD tem como provável função o armazenamento e condução dos espermatóforos até a DVD. Em indivíduos sexualmente maduros acima de 14,1 mm de CC, a MVD é um tubo único com musculatura mais espessa que a região anterior, e tem função de aumentar o volume do fluido seminal glicoproteico e ausente de polissacarídeos ácidos, o qual será importante na transferência espermática, porém não participa da formação do espermatóforo. Assim, mostra-se similar ao observado para a região denominada DVD em *R. similis*, o qual apresenta a morfologia semelhante à MVD e DVD em *X. kroyeri* (Bauer e Lin, 1993). Assim, *Xiphopenaeus* Smith, 1869 e *Rimapenaeus* são diferentes do observado para camarões dos gêneros *Litopenaeus* e *Farfantepenaeus*, os quais apresentam dois dutos, um espermático e outro acessório separados por um tiflosole, os quais são observados até a ampola, sendo o duto acessório responsável por produzir secreções associadas à formação do espermatóforo complexo (Bauer, 1991; Bauer e Cash, 1991; Ceballos-Vázquez et al., 2010; Chow, 1991a; Fransozo et al., 2016; Malek e Bawab, 1974a, 1974b). De modo geral, a MVD em indivíduos juvenis mostra a mesma morfologia dos adultos, porém, deferente dos animais fisiologicamente maduros, o epitélio mostra-se do tipo simples e colunar. O achatamento do

epitélio está relacionado com o acúmulo de secreção e ampliação do lúmen, fato também observado na PVD.

A DVD encontrada em *X. kroyeri* tem como principais funções o acúmulo de secreção contendo espermátóforos e auxiliar na transferência do ejaculado por meio de contração muscular. A musculatura da DVD é mais espessa que nas outras regiões associada ao vaso deferente em geral, e parece atuar na motilidade e peristaltismo movendo e misturando as secreções seminais e os espermátóforos. Este processo de contração muscular para a condução do fluido seminal também foi observado para outros decápodes (Bauer e Lin, 1993; Mouchet, 1931; Ryan, 1967; Simeó et al., 2009). A presença de forte musculatura estriada na DVD indica que esta região, em associação com a MVD, é importante para a transferência espermática, uma vez que esta secreção deverá passar através de um tubo rígido do petasma. Em Penaeidae ainda não se sabe ao certo a função do petasma durante a cópula (Bauer, 1991). Segundo Burkenroad (1934), o vaso deferente libera o conteúdo seminal no petasma o qual teria a função de guiá-lo até o interior do tético das fêmeas. Uma comparação análoga pode ser feita com Brachyura, nos quais os gonópodos têm a função de condução dos espermátóforos ou espermatozoides até o interior dos receptáculos seminais (Bauer, 1986; Simeó et al., 2009). Com base na anatomia da DVD, tético e do petasma, aqui neste trabalho nota-se que os cornos direcionam o fluido seminal direto para as duas bolsas (direita e esquerda) sendo mais um indicativo que o petasma tem participação na transferência seminal no camarão sete-barbas. Da mesma forma que na MVD, esta região do vaso deferente apresenta epitélio colunar nos indivíduos fisiologicamente imaturos e sofre achatamento nos indivíduos que contém grande quantidade de secreção. O acúmulo de secreção promove o aumento do lúmen e o conseqüente achatamento do epitélio. Adicionalmente, a secreção dos indivíduos juvenis não mostrou reação para polissacarídeos neutros, diferente do observado para os animais maduros fisiologicamente.

Os espermátóforos da DVD de *X. kroyeri* apresentam as mesmas características desde a sua produção na PVDp, sendo numerosos, esféricos e seu diâmetro não altera com o crescimento corpóreo de 14 até 21mm de CC. Tais estruturas são consideradas como cápsulas de proteção dos espermatozoides.

No camarão sete-barbas, os espermátóforos mostram-se semelhantes ou idênticos aos encontrados para *Rimapenaeus* Pérez-Farfante & Kensley, 1997 (Bauer, 1991; Bauer e Lin, 1993; Burkenroad, 1934). Segundo Bauer (1986, 1991), a organização dos espermatozoides comumente encontrada em Penaeoidea é a estruturação de uma grande massa espermática cercada por uma variedade de materiais acessórios (espermátóforo complexo), sendo somente uma liberada, em cada gonópore, no momento da ejaculação, como observado no gênero *Litopenaeus* e em *M. kerathurus* (Chow et al., 1991a; Pérez-Farfante, 1975; King, 1948; Malek e Bawab, 1974a, 1974b). De acordo Burkenroad (1934) e Bauer (1986; 1991), as características do sistema reprodutor variam conforme a estratégia reprodutiva, na qual machos dos gêneros *Xiphopenaeus* e *Rimapenaeus* depositam seus numerosos espermátóforos imersos em secreção seminal internamente ao tólico da fêmea, enquanto os camarões *Litopenaeus* depositam um par de espermátóforos combinados externamente ao tólico da fêmea (Bauer, 1991; Bauer e Lin, 1993; Chow, 1991a).

Ampola apresenta fortes camadas musculares, as quais possivelmente levam a contrações fortes e contínuas, a qual deve ser investigada ao microscópio eletrônico. O epitélio presente nesta estrutura é distinto do restante do sistema reprodutor, pela presença de epitélio estratificado e seu mecanismo de secreção ser holócrino. A secreção presente na ampola de *X. kroyeri*, por não apresentar espermátóforos e não estar envolvida com a montagem dos mesmos, possivelmente tem a função de auxiliar na transferência da secreção contendo espermátóforos ou até mesmo ter a função de selar a abertura do tólico da fêmea formando um tampão ou plug espermático também demonstrado neste trabalho pelo exame de tólico de fêmeas inseminadas, os quais mostram uma secreção livre de espermátóforos próxima a abertura do tólico enquanto os espermátóforos estão localizados mais ao fundo da espermatéca. Esta função está de acordo com o proposto para os Trachypeneini *Rimapenaeus* e *Parapenaeopsis* Alcock, 1901 (Bauer e Lin, 1993; Burkenroad, 1934). Segundo Bauer e Lin (1993), em *R. similis* ocorre a rápida solidificação desta secreção da ampola após a ejaculação, vedando as placas do tólico de fêmeas inseminadas. Porém, em *X. kroyeri*, não foi observado um plug espermático com uma parte tão exteriorizadas ao tólico como em *R. similis* (Bauer e Lin 1993). O material seminal é transferido no

momento da cópula (fêmea em muda) e no presente, somente fêmeas em intermuda foram analisadas. Assim, o papel da ampola em *X. kroyeri* e, possivelmente em Trachypeneini, é produzir a secreção do plug espermático, ao invés de produzir componenetas do espermátóforo (Bauer, 1991; Bauer e Cash, 1991; Ceballos-Vázquez et al., 2010; Chow, 1991a; Fransozo et al., 2016; Malek e Bawab, 1974a, 1974b). Assim, os trabalhos de biologia populacional que levam em consideração a ampola terminal como portadora de espermátóforos em Trachypeneini devem rever o uso desta estrutura como critério de maturidade, pois a ampola não contém espermátóforos e espermatozoides, participando somente da formação do plug espermático. Além disso, a visualização a ampola pode induzir ao erro de identificação da maturidade, pois animais maduros que acabaram de copular, podem não apresentar a ampola evidente, contudo são maduros fisiologicamente. Considerando que a secreção da ampola não contém espermatozoides e apresenta acúmulo de substâncias em indivíduos fisiologicamente imaturos, os menores indivíduos que apresentam a ampola evidente podem não apresentar o sistema reprodutor maduro. Desta forma, a observação macroscópica da ampola dos machos de *X. kroyeri* não representa um parâmetro preciso para verificação da maturidade fisiológica. Uma alternativa recomendável e menos trabalhosa quanto à histologia é realizar teste de esfregaço da DVD em lâminas. Pachcoal e Zara (in press) mostraram que em Caridea é possível usar amostras preservadas em álcool para verificar a presença e a quantidade de espermatozoides, sendo útil para a análise de amostras em coleções armazenadas em álcool.

A presença de secreção e espermatozoides em espermátóforos no sistema reprodutor de *X. kroyeri* não necessariamente garante sucesso na fertilização dos indivíduos logo a partir de 14,1 mm de CC. Assim, animais desta classe de tamanho apresentam pouco volume de secreção na luz do vaso deferente e ampola e, apesar de poder transferir seu material genético, o volume de secreção pode não ser suficiente para preencher o téllico ou formar um plug espermático eficiente. Uma comparação análoga pode ser feita com a formação de plug espermático em Portunidae, na qual machos em desenvolvimento podem não apresentar volume de secreção suficiente para formar o plug espermático (Nascimento e Zara, 2013; Zara et al., 2012). Desta forma, pode ser proposta a

hipótese que o pouco volume de secreção na ampola pode dificultar ou impossibilitar a transferência espermática ou o não cumprimento de sua função, não vedando a abertura do tético. Contudo, esta hipótese somente poderá ser comprovada por experimentos laboratoriais.

## 5. Conclusões

A partir dos resultados obtidos neste trabalho, pudemos concluir que em *X. kroyeri* a maturidade morfológica antecede a maturidade fisiológica. Além disso, a visualização macroscópica da ampola mostrou ser um parâmetro não efetivo para determinação da maturidade fisiológica, uma vez que está não apresenta espermatozoides e não participa da formação do espermatóforo. A morfologia funcional do sistema reprodutor masculino mostrou muitas similaridades a *R. similis*, e talvez este seja o padrão para Trachypeneini. Para isso, uma análise comparativa do sistema reprodutor entre as tribos, incluído também a família Sicyoniidae pode elucidar se a anatomia está associada à filogenia ou à transferência em fêmeas com tético aberto ou fechado.

## Agradecimentos

Os autores agradecem ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) (#406006/2012-1; IC#184728/2013-4), Coordenação de Aperfeiçoamento de Nível Superior (CAPES) Ciências do Mar II (#1989/2014-23038.004309/2014-51) e Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) (#2010/50188-8 e #2016/25344-2) pelo subsídio financeiro fornecido. Agradecimentos são devidos ao Laboratório de Biologia de Camarões Marinhos e de Água Doce da UNESP de Bauru (LABCAM), ao Laboratório de Microscopia Eletrônica da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal – FCAV, à Márcia F. Mataqueiro pelo suporte técnico e ao pescador Djalma Rosa pelo auxílio nas coletas.

## Referências

- Alfaro, J., Ulate, K., Vargas, M., 2007. Sperm maturation and capacitation in the open thelycum shrimp *Litopenaeus* (Crustacea: Decapoda: Penaeoidea). *Aquaculture* 270, 436-442, <http://dx.doi.org/10.1016/j.aquaculture.2007.05.011>.
- Alfaro-Montoya, J., 2010. The reproductive conditions of male shrimps, genus *Penaeus*, sub-genus *Litopenaeus* (open thelyca penaeoid shrimps): A review. *Aquaculture* 300, 1-9, <http://dx.doi.org/10.1016/j.aquaculture.2009.12.008>.
- Almeida, A.C., Baeza, J.A., Fransozo, V., Castilho, A.L., Fransozo, A., 2012. Reproductive biology and recruitment of *Xiphopenaeus kroyeri* in a marine protected area in the Western Atlantic: implications for resource management. *Aquat. Biol.* 17, 57-69, <http://dx.doi.org/10.3354/ab00462>.
- Bauer, R.T., 1986. Phylogenetic trends in sperm transfer and storage complexity in decapod crustaceans. *J. Crust. Biol.* 6, 313-325, <http://dx.doi.org/10.2307/1548173>.
- Bauer, R.T., 1991. Sperm transfer and storage structures in penaeoid shrimps: a functional and phylogenetic perspective, in: Bauer, R.T., Martin, J.W. (Eds.), *Crustacean Sexual Biology*. Columbia University Press, New York, pp. 183-207.
- Bauer, R.T., 1996. Role of petasma and appendices masculinae during copulation and insemination in the penaeoid shrimp *Sicyonia dorsalis* (Crustacea: Decapoda: Dendrobranchiata). *Invert. Reprod. Dev.* 29, 173-184, <http://dx.doi.org/10.1080/07924259.1996.9672511>.
- Bauer, R.T., Cash, C.E., 1991. Spermatophore structure and anatomy of the ejaculatory duct in *Penaeus setiferus*, *P. duorarum*, and *P. aztecus* (Crustacea: Decapoda): homologies and functional significance. *Trans. Am. Microsc. Soc.* 110, 144-162, <http://dx.doi.org/10.2307/3226751>.
- Bauer, R.T., Lin, M.J., 1993. Spermatophores and plug substance of the marine shrimp *Trachypenaeus similis* (Crustacea: Decapoda: Penaeidae): formation in the male reproductive tract and disposition in the inseminated female. *Biol. Bull.* 185, 174-185, <http://dx.doi.org/10.2307/1541998>.

- Bauer, R.T. and Rivera Vega, L.W., 1992. Pattern of reproduction and recruitment in two sicyoniid shrimp species (Decapoda: Penaeoidea) from a tropical seagrass habitat. *J. Exp. Mar. Bio. Ecol.* 161, 223-240, [https://doi.org/10.1016/0022-0981\(92\)90099-V](https://doi.org/10.1016/0022-0981(92)90099-V).
- Burkenroad, M.D., 1934. The Penaeidea of Louisiana, with a discussion of their world relationships. *Bull. Am. Museum Nat. Hist.* 68, 61-143.
- Castilho, A.L., Bauer, R.T., Freire, F.A.M., Fransozo, V., Costa, R.C., Grabowski, R.C., Fransozo, A., 2015. Lifespan and reproductive dynamics of the commercially important sea bob shrimp *Xiphopenaeus kroyeri* (Penaeoidea): synthesis of a 5-year study. *J. Crust. Biol.* 35, 30-40, <http://dx.doi.org/10.1163/1937240X-00002300>.
- Castilho, G.G., Ostrensky, A., Pie, M.R., Boeger, W.A., 2008. Morphohistology of the male reproductive system of the mangrove land crab *Ucides cordatus* (L.) (Crustacea, Brachyura, Ocypodidae). *Acta Zoologica* 89, 157-161, <http://dx.doi.org/10.1111/j.1463-6395.2007.00304.x>.
- Castro, R.H., Costa, R.C., Fransozo, A., Mantelatto, F.L.M., 2005. Population structure of the seabob shrimp *Xiphopenaeus kroyeri* (Heller, 1862) (Crustacea, Penaeoidea) in the littoral of São Paulo, Brazil. *Sci. Mar.* 69, 105-112, <http://dx.doi.org/10.3989/scimar.2005.69n1105>.
- Ceballos-Vazquez, B.P., Palacios, E., Aguillar-Villavicencio, J., Racotta, I.S., 2010. Gonadal development in male and female domesticated whiteleg shrimp, *Litopenaeus vannamei*, in relation to age and weight. *Aquaculture* 308, 116-123, <http://dx.doi.org/10.1016/j.aquaculture.2010.08.020>.
- Chow, S., Dougherty, M.M., Dougherty, W.J., Sandifer, P.A., 1991a. Spermatophore formation in the white shrimps *Penaeus setiferus* and *P. vannamei*. *J. Crustac. Biol.* 11, 201-216, <http://dx.doi.org/10.1163/193724091X00022>.
- Chow, S., Dougherty, W.J., Sandifer, P.A., 1991b. Unusual testicular lobe system in the white shrimps *Penaeus setiferus* (Linnaeus, 1761) and *P. vannamei* Boone, 1931 (Decapoda, Penaidae): a new character for Dendrobranchiata? *Crustaceana* 60, 304-318, <http://dx.doi.org/10.1163/156854091X00074>.

- Costa, R.C., Fransozo, A., Mantelatto, F.L.M., Castro, R. H., 2000. Occurrence of shrimp species (Crustacea: Decapoda: Natantia: Penaeidea and Caridea) in Ubatuba Bay, Ubatuba, SP, Brazil. *Proc. Biol. Soc. Washingt.* 113, 776-781.
- Costa, R.C., Fransozo, A., Melo, G.A.S., Freire F.A.M., 2003. An illustrated key for Dendrobranchiata shrimps from the northern coast of São Paulo state, Brazil. *Biota Neotrop.* 3, 1-12, <http://dx.doi.org/10.1590/S167606032003000100011>.
- Costa, R.C., Fransozo, A., 2004. Reproductive biology of the shrimp *Rimapenaeus constrictus* (Decapoda, Penaeidae) in the Ubatuba region of Brazil. *J. Crustac. Biol.* 24, 274-281, <http://dx.doi.org/10.1651/C-2437>.
- Castro, R.H., Costa, R.C., Fransozo, A. and Mantelatto, F.L.M., 2005. Population structure of the seabob shrimp *Xiphopenaeus kroyeri* (Heller, 1862) (Crustacea, Penaeoidea) in the littoral of São Paulo, Brazil. *Sci Mar* 69, 105-112.
- Costa, R.C., Fransozo, A., Freire, F.A.M., Castilho, A.L., 2007. Abundance and ecological distribution of the “sete-barbas” shrimp *Xiphopenaeus kroyeri* (Heller, 1862) (Decapoda: Penaeoidea) in three bays of the Ubatuba region, south-eastern Brazil. *Gulf Caribb. Res.* 19, 33-41, <http://dx.doi.org/10.18785/gcr.1901.04>.
- Dougherty, W.J., Dougherty, M.M., 1989. Electron microscopical and histochemical observations on melanized sperm and spermatophores of pond-cultured shrimp, *Penaeus vannamei*. *J. Invertebr. Pathol.* 54, 331-343, [http://dx.doi.org/10.1016/0022-2011\(89\)90117-1](http://dx.doi.org/10.1016/0022-2011(89)90117-1).
- Elnor, R.W., Beninger, P.G., 1995. Multiple reproductive strategies in snow crab, *Chionoecetes opilio*: physiological pathways and behavioral plasticity. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 193, 93-112, [http://dx.doi.org/10.1016/0022-0981\(95\)00112-3](http://dx.doi.org/10.1016/0022-0981(95)00112-3).
- Eutrópio, F.L., Mariante, F.L.F., Krohling, W., Ferreira Júnior, P.D., 2013. Population parameters of the shrimp *Xiphopenaeus kroyeri* (Heller, 1862) (Crustacea, Penaeidae) caught by artisanal fisheries in Anchieta, Espírito Santo State. *Acta Sci.* 35, 141-147, <http://dx.doi.org/10.4025/actascibiolsoci.v35i2.13408>.
- Fransozo, A., Costa, R.C., Mantelatto, F.L.M., Pinheiro, M.A.A., Santos, S., 2002. Composition and abundance of shrimp species (Penaeidea and Caridea) in

- Fortaleza Bay, Ubatuba, São Paulo, Brazil, in: Briones, E.E., Alvarez, F. (Eds.), *Modern Approaches to the Study of Crustacea*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, pp. 117-123.
- Fransozo, V., Santos, D.C., López-Greco, L.S., Bolla Junior, E.A., 2011. Development of secondary sexual characters in the seabob shrimp *Xiphopenaeus kroyeri* (Heller 1862) (Crustacea, Decapoda, Penaeidae): a scanning electron microscope study. *Invertebr. Reprod. Dev.* 55, 6-15, <http://dx.doi.org/10.1080/07924259.2010.548633>.
- Fransozo, V., Fernandes, A.B., López-Greco, L.S., Zara, F.J., Santos, D.C., 2016. Functional morphology of the male reproductive system of the white shrimp *Litopenaeus schmitti* (Burkenroad, 1936) (Crustacea, Penaeidea) compared to other *Litopenaeus*. *Invertebr. Reprod. Dev.* 60, 161-174, <http://dx.doi.org/10.1080/07924259.2016.1174158>.
- García, C.F., Silva, J.R.F., 2006. Testis and vas deferens morphology of the red-clawed mangrove tree crab (*Goniopsis cruentata*) (Latreille, 1803). *Braz. Arch. Biol. Technol.* 49, 339-345, <http://dx.doi.org/10.1590/S1516-89132006000300019>.
- Gillett, R., 2008. *Global Study of Shrimp Fisheries*. Fisheries Technical Paper 475, Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome.
- Grier, H.J., 1993. Comparative organization of Sertoli cells including the Sertoli cell barrier, in: Russell, L.D., Griswold, M.D. (Eds.), *The Sertoli Cell*. Cache River Press, Clearwater, pp. 704-739.
- Grier, H.J., Linton, J.R., Leatherland, J.F., De Vlaming, V.L., 1980. Structural evidence for two different testicular types in teleost fishes. *Am. J. Anat.* 159, 331-45, <http://dx.doi.org/10.1002/aja.1001590307>.
- Gusmão, J., Lazoski, C., Monteiro, F.A., Sole-Cava, A.M., 2006. Cryptic species and population structuring of the Atlantic and Pacific sea-bob shrimp species, *Xiphopenaeus kroyeri* and *Xiphopenaeus riveti*. *Mar. Biol.* 149, 491-502, <http://dx.doi.org/10.1007/s00227-005-0232-x>.
- Hartnoll, R.G., 1982. Growth, in: Bliss, D.E., Abele, L.G. (Eds.), *The Biology of Crustacea*. Academic Press, New York, pp. 11-185.

- Heckler, G.S., Simões, S.M., Lopes, M., Zara, F.J., Costa, R.C., 2013. Biologia populacional e reprodutiva do camarão sete-barbas na baía de Santos, São Paulo. Bol. Inst. Pesca 39, 283-297.
- Heckler, G.S., Lopes, M., Simões, S.M., Shimizu, R.M., Costa, R.C., 2014. Annual, seasonal and spatial abundance of the seabob shrimp *Xiphopenaeus kroyeri* (Decapoda, Penaeidae) off the southeastern coast of Brazil. An. Acad. Bras. Cien. 86, 1337-1346, <http://dx.doi.org/10.1590/0001-3765201420130230>.
- Jivoff, P., Hines, A.H., Quaquerbush, L.S., 2007. Reproduction biology and embryonic development, in: Kennedy, V.S., Cronin, L.E. (Eds.), The Blue Crab *Callinectes sapidus*. Maryland Sea Grant College, Maryland, pp. 255-298.
- Johnson, P.T., 1980. Histology of the Blue Crab (*Callinectes sapidus*): A Model for the Decapoda. Praeger Scientific, New York.
- Junqueira, L.C.U., Junqueira, L.M.M.S., 1983. Técnicas Básicas de Citologia e Histologia. Santos, São Paulo.
- King, J.E., 1948. A study of the reproductive organs of the common marine shrimp, *Penaeus setiferus* (Linnaeus). Biol. Bull. 94, 244-262, <http://dx.doi.org/10.2307/1538251>.
- Krol, R.M., Hawkins, W.E., Overstreet, R.M., 1992. Reproductive components, in: Harrison, F.W., Humes, A.G. (Eds.), Microscopic Anatomy of Invertebrates, vol. 1, : Decapoda Crustacea. Wiley-Liss Inc., New York, pp. 295-343.
- Lopes, D., Frédou, F.L., Silva, E., Calazans N., Peixoto, S., 2017. Reproductive cycle of seabob shrimp *Xiphopenaeus kroyeri* (Crustacea, Penaeidea) from the northeast coast of Brazil. Invertebr. Reprod. 61,137-141, <http://dx.doi.org/10.1080/07924259.2017.1311951>.
- López-Greco, L.S., 2013. Functional anatomy of the reproductive system, in: Watling, L., Thiel, M. (Eds.), Functional Morphology and Diversity, vol. 10, The Natural History of the Crustacea. Oxford University Press, pp. 413-450.
- Ma, K.Y., Chan, T.Y., Chu, K.H., 2009. Phylogeny of penaeoid shrimps (Decapoda: Penaeoidea) inferred from nuclear protein-coding genes. Mol. Phylogenet. Evol. 53, 45-55, <http://10.1016/j.ympev.2009.05.019>.

- Malek, S.R.A., Bawab, F.A., 1974a. The formation of the spermatophore in *Penaeus kerathurus* (Forsk., 1775) (Decapoda, Penaeidae). I. The initial formation of a sperm mass. *Crustaceana* 26, 273-285, <http://dx.doi.org/10.1163/156854074X00677>.
- Malek, S.R.A., Bawab, F.A., 1974b. The formation of the spermatophore in *Penaeus kerathurus* (Forsk., 1775) (Decapoda, Penaeidae). II. The deposition of the main layers of the body and of the wing. *Crustaceana* 27, 73-83, <http://dx.doi.org/10.1163/156854074X00244>.
- Mantelatto, F.L.M., Fransozo, A., 1996. Size at sexual maturity in *Callinectes ornatus* (Brachyura, Portunidae) from the Ubatuba region (SP), Brazil. *Nauplius* 4, 29-38.
- Medina, A., 1994. Spermiogenesis and sperm structure in the shrimp *Parapenaeus longirostris* (Crustacea: Dendrobranchiata): comparative aspects among decapods. *Mar. Biol.* 119, 449-460.
- Mello, M.L.S., Vidal, B.C., 1980. *Práticas de Biologia Celular*. Funcamp, Campinas.
- Minagawa, M., Higuchi, S., 1997. Analysis of size, gonadal maturation, and functional maturity in the spiny lobster *Panulirus japonicus* (Decapoda: Palinuridae). *J. Crust. Biol.* 17, 70-80, <http://dx.doi.org/10.1163/193724097X00115>.
- Mouchet, S., 1931. Spermatophores des crustacés décapodes anomures et brachyours et castration parasitaire chez quelques pagures. *Ann. Sta. Océanogr. Salammbô* 6, 1-203.
- Nagao, J., Munehara, H., 2003. Annual cycle of testicular maturation in the helmet crab *Telmessus cheiragonus*. *Fish. Sci.* 69, 1200-1208, <http://dx.doi.org/10.1111/j.0919-9268.2003.00746.x>.
- Nakagaki, J.M., Negreiros-Fransozo, M.L., 1998. Population biology of *Xiphopenaeus kroyeri* (Heller, 1862) (Decapoda: Penaeidae) from Ubatuba Bay, São Paulo, Brazil. *J. Shellfish Res.* 17, 931-935.
- Nascimento, F.A., Zara, F.J., 2013. Development of the male reproductive system in *Callinectes ornatus* Ordway, 1863 (Brachyura: Portunidae). *Nauplius* 21, 161-177.

- Pardo, L.M., Fuentes, J.P., Olguín, A., Orensanz (Lobo), J.M., 2009. Reproductive maturity in the edible Chilean crab *Cancer edwardsii*: methodological and management considerations. J. Mar. Biol. Assoc. U. K. 89, 1627-1634, <http://dx.doi.org/10.1017/S0025315409000010>.
- Pérez-Farfante, I., 1969. Western Atlantic shrimps of the genus *Penaeus*. Fish. Bull. 67, 461-590.
- Pérez-Farfante, I., 1975. Spermatophores and thelyca of the American white shrimps, genus *Penaeus*, subgenus *Litopenaeus*. Fish. Bull. 73, 463-486.
- Pérez-Farfante, I., Kensley, B., 1997. Penaeoid and Sergestoid Shrimps and Prawns of the World. Keys and Diagnoses for the Families and Genera. Mémoires du Muséum National d'Histoire Naturelle, Paris.
- Ryan, E.P., 1967. Structure and function of the reproductive system of the crab *Portunus sanguinolentus* (Hersbt) (Brachyura: Portunidae) I. The male system. Proc. Symp. Crust. Mar. Biol. Assoc. 2, 506-521.
- Ro, S., Talbot, P., Leung-Trujillo, J., Lawrence, A.L., 1990. Structure and function of the vas deferens in the shrimp *Penaeus setiferus*: segments 1-3. J. Crust. Biol. 10, 455-468, <http://dx.doi.org/10.2307/1548335>.
- Rodrigues, E.S., Pita, J.B., Graça-Lopes, R., Coelho, J.A., Puzzi, A., 1993. Aspectos biológicos e pesqueiros do camarão sete-barbas (*Xiphopenaeus kroyeri*) capturados pela pesca artesanal no litoral do Estado de São Paulo. Bol. Inst. Pesca 19, 67-81.
- Sastry, A.N., 1983. Ecological aspects of reproduction, in: Vernberg, W.B., Vernberg, F.J. (Eds.), The Biology of Crustacea: Environmental Adaptations, vol. 8. Academic Press, New York, pp. 179-270.
- Simeó, C.G., Ribes, E., Rotllant, G., 2009. Internal anatomy and ultrastructure of the male reproductive system of the spider crab *Maja brachydactyla* (Decapoda: Brachyura). Tissue Cell 41, 345-361, <http://dx.doi.org/10.1016/j.tice.2009.02.002>.
- Sobrino, I., García, T., 2007. Reproductive aspects of the rose shrimp *Parapenaeus longirostris* (Lucas, 1846) in the Gulf of Cadiz (southwestern Iberian Peninsula). Bol. Inst. Esp. Oceanogr. 23, 57-71.
- Tiseo, G.R., Mantelatto, F.L., Zara, F.J., 2014. Is cleistospermy and coenospermy related to sperm transfer? A comparative study of the male reproductive

system of *Pachygrapsus transversus* and *Pachygrapsus gracilis* (Brachyura: Grapsidae). J. Crust. Biol. 34, 704-716, <http://dx.doi.org/10.1163/1937240X-00002275>.

Tuma, D.J., 1967. A description of the development of primary and secondary sexual characters in the banana prawn, *Penaeus merguensis* De Man (Crustacea: Decapoda: Penaeidae). Aust. J. Mar. Freshw. Res. 18, 73-88, <http://dx.doi.org/10.1071/MF9670073>.

Zara, F.J., Toyama, M.H., Caetano, F.H., López-Greco, L.S., 2012. Spermatogenesis, spermatophore, and seminal fluid production in the adult blue crab *Callinectes danae* (Portunidae). J. Crust. Biol. 32, 249-262, <http://dx.doi.org/10.1163/193724011X615479>.

# Tabela

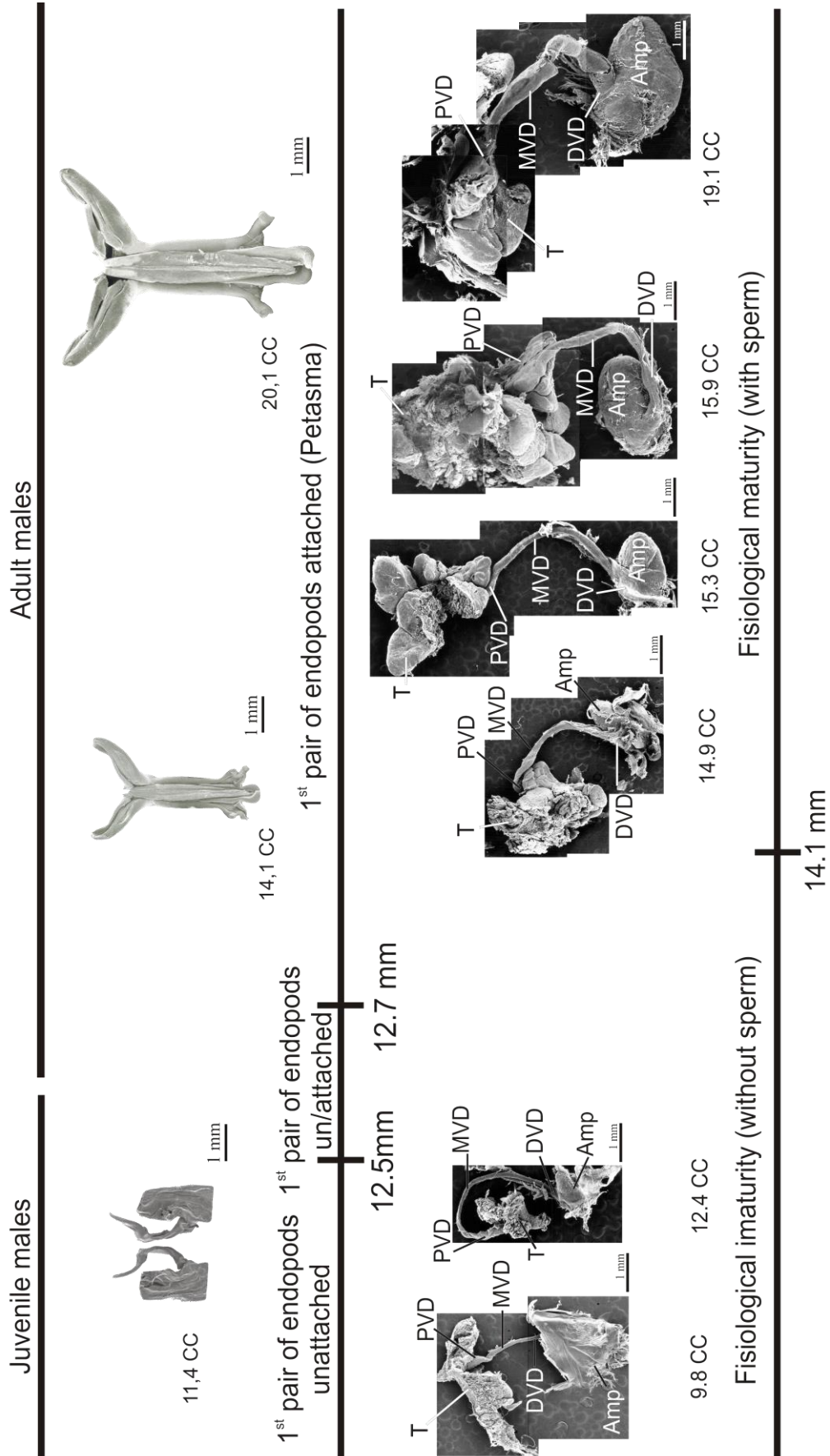
**Tabela 1.** *Xiphopenaeus kroyeri* (Heller, 1862). Composição histoquímica das secreções do sistema reprodutor masculino. Legenda: porção proximal do vaso deferente (PVD), medial (MVD), distal (DVD). +++ = fortemente positivo; ++ = positivo; + = fracamente positivo e - = negativo.

Técnica	Proteínas (xylidine ponceau)	Polissacarídeos ácidos (azul de Alcian)	Polissacarídeos neutros (PAS)
PVD (secreção basófila)	+	-	+
PVD (secreção acidófila)	++	-	++
MVD	+	-	++
DVD	+	-	++
Ampola	+++	-	+
Espermatóforos	++	-	++

# Lista de Figuras

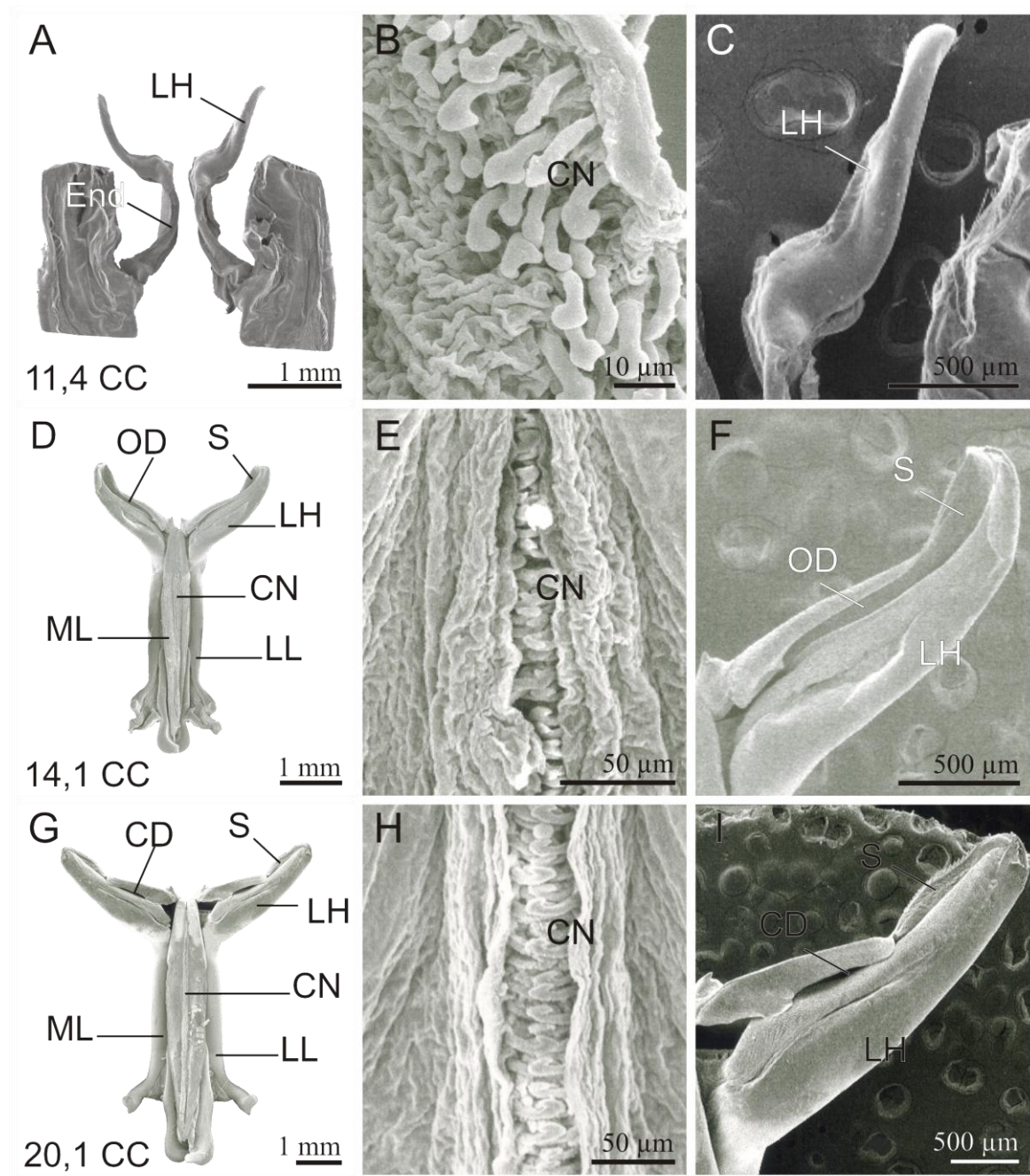
**Fig. 1.** *Xiphopenaeus kroyeri* (Heller, 1862). Esquema ilustrando o desenvolvimento do sistema reprodutor masculino durante o crescimento corporal, mensurado pelo comprimento do cefalotórax (CC em mm). Os comprimentos 12,5 e 12,7 mm apresentam o intervalo de tamanho entre o menor indivíduo apresentando petasma e o maior indivíduo que não apresenta petasma formado, respectivamente. O tamanho de 14,1 mm marca o menor comprimento de cefalotórax no qual o indivíduo apresenta espermatozoides empacotados em espermatóforos no vaso deferente. Legenda: Amp = ampola; DVD = região distal do vaso deferente; MVD = região média vaso deferente; PVD = região proximal do vaso deferente; T = testículo.

Figura 1.



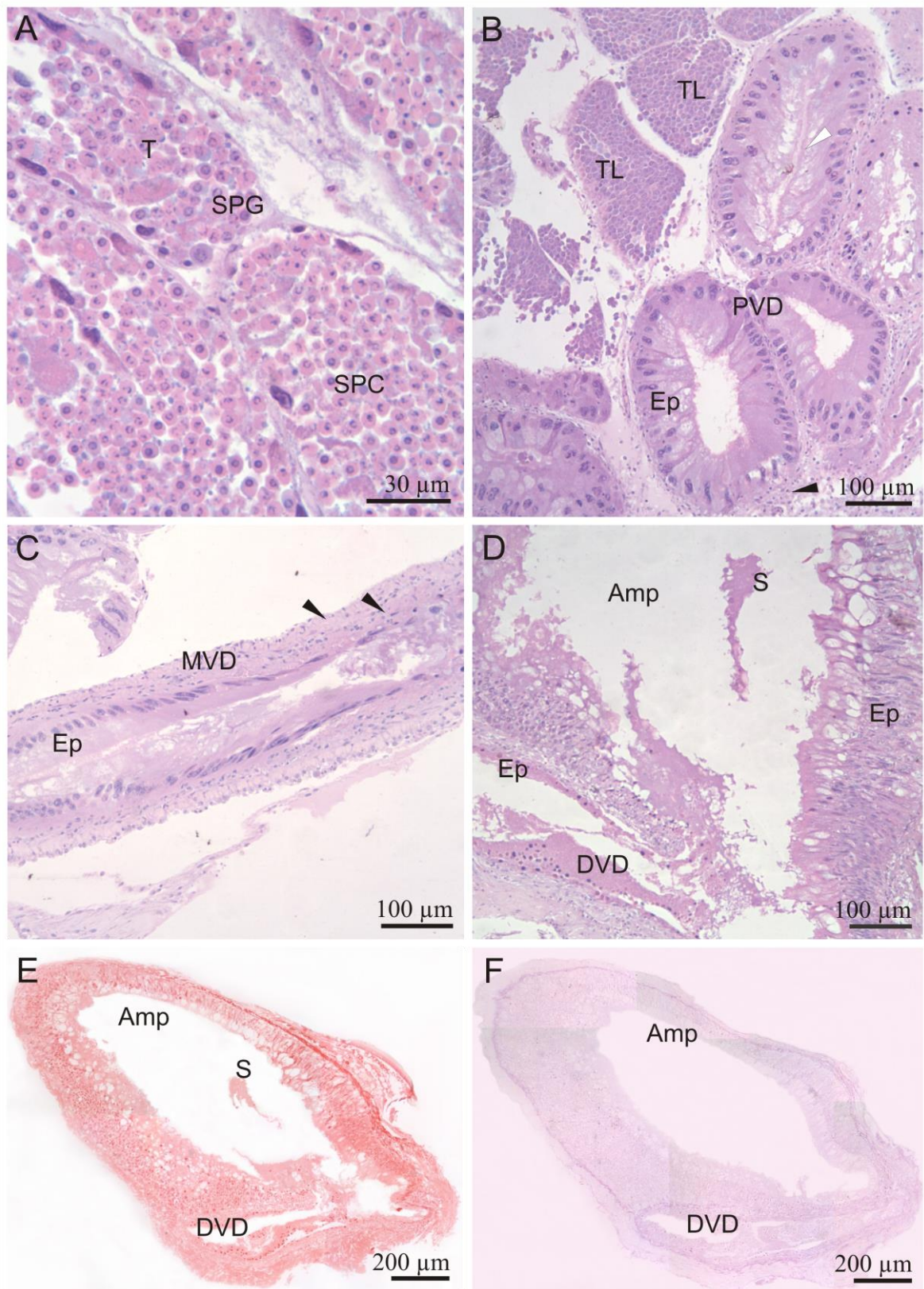
**Fig. 2.** *Xiphopenaeus kroyeri* (Heller, 1862). Ultraestrutura do petasma de indivíduos juvenis e adultos. **A - C.** Endopoditos do primeiro par de pleópodes de indivíduos juvenis (< 12 mm de CC). **A.** Endopoditos do primeiro par de pleópodes modificados lembrando o petasma, porém não fusionados. **B.** Detalhete dos *cincinnuli* presentes na face interna de cada endopodito modificado, apresentando morfologia de pequenos ganchos. **C.** Porção distal do endopodito modificado com a morfologia semelhante ao corno lateral de um petasma. **D - F.** Petasma formado de um indivíduo na classe de menor tamanho de CC com animais adultos (12 – 13 mm de CC). **D.** Petasma formado apresentando um corpo principal formado por um par de lóbulos médios, um par de lóbulos laterais e um de cornos laterais. **E.** Detalhe dos *cincinnuli* juntando os lobulos médios apresentando a mesma morfologia observada nos indivíduos juvenis. **F.** Cornos laterais do petasma apresentando um sulco por toda sua extensão que estende-se até a estrutura distal em forma de pá. **G - I.** Petasma nos indivíduos nas maiores classes de tamanho (> 16 mm de CC). **G.** Petasma apresentando a mesma morfologia geral dos indivíduos adultos na menor classe de tamanho. **H.** Detalhe dos *cincinnuli* também com a mesma morfologia de pequenos ganchos. **I.** Cornos laterais apresentando as margem posterior completamente dobrada sobre a anterior, formando um duto totalmente fechado, restando somente a porção distal em forma de pá aberta. Legenda: CD = dutos fechados dos cornos laterais; CN = *cincinnuli*; End = endopoditos do petasma; LH = cornos laterais do petasma; LL = lóbulo lateral do petasma; ML = lóbulo médio do petasma; OD = dutos abertos dos cornos laterais; S = estrutura em forma de pá.

**Figura 2.**



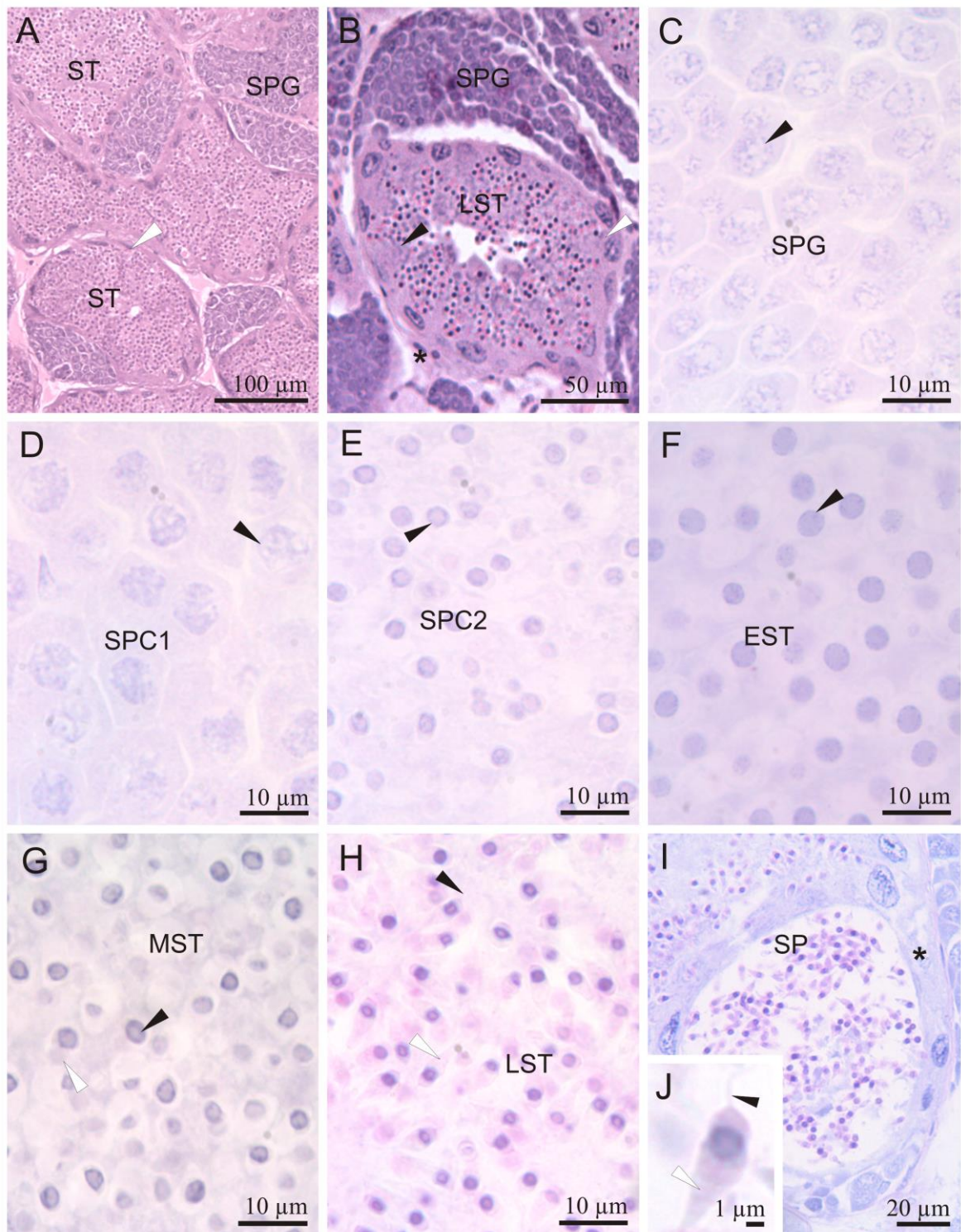
**Fig. 3.** *Xiphopenaeus kroyeri* (Heller, 1862). Morfologia e histoquímica do sistema reprodutor masculino fisiologicamente imaturo. **A.** Testículo apresentando espermatogônias e espermatócitos [HE]. **B.** Detalhe da PVD apresentando epitélio colunar simples, delgada musculatura (cabeça de seta preta) e pouca secreção fibrilar acidófila no lúmen (cabeça de seta branca) [HE]. **C.** Detalhe da MVD mostrando epitélio colunar simples com núcleos basais, musculatura espessa contendo feixes circulares e oblíquos (cabeças de seta preta), e lúmen com ausência de espermatozoides e espermatóforos [HE]. **D.** Duto ejaculatório formado pela união da DVD e da ampola. A parede da DVD apresenta as mesmas características da MVD. A ampola apresenta epitélio estratificado secretor e o lúmen apresenta pequena quantidade de secreção acidófila [HE]. **E.** Detalhe do duto ejaculatório demonstrando a característica proteica da secreção da ampola [Xylidine ponceau]. **F.** Duto ejaculatório apresentando secreção luminal da ampola sem a presença de polissacarídeos neutros [PAS]. Legenda: Amp = ampola; DVD = região distal do vaso deferente; Ep = epitélio; HE = hematoxilina e eosina; MVD = região média do vaso deferente; PVD = região proximal do vaso deferente; S = secreção; SPC = espermatócitos; SPG = espermatogônias; T = testículo; TL = lóbulo testicular.

**Figura 3.**



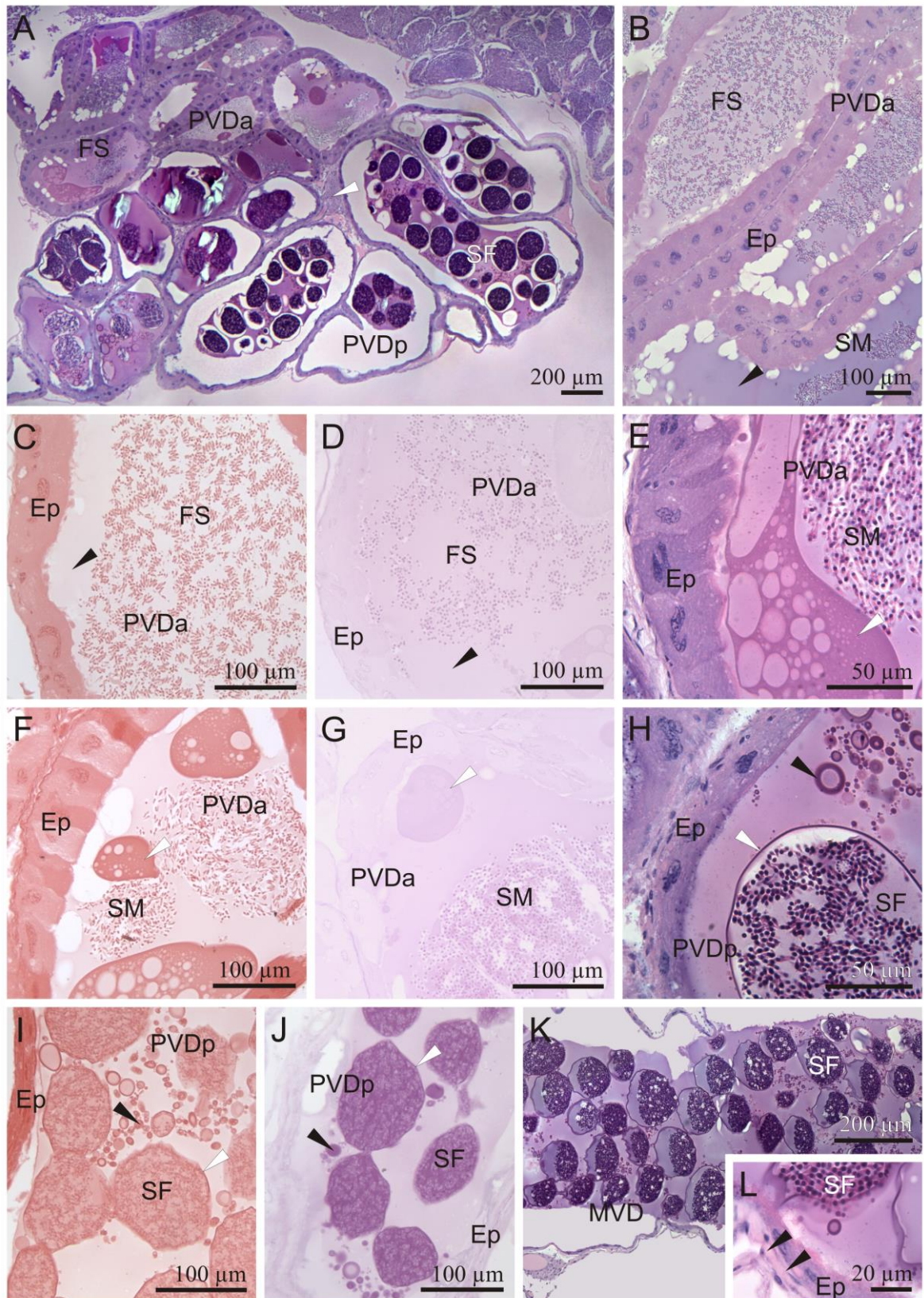
**Fig. 4.** *Xiphopenaeus kroyeri* (Heller, 1862). Espermatogênese e espermiogênese. **A.** Testículo apresentando túbulos seminíferos contendo células germinativas no mesmo estágio ou em estágios subsequentes da espermatogênese ou espermiogênese circundadas pelas células acessórias (cabeça de seta branca) [HE]. **B.** Detalhe do túbulo seminífero apresentando região periférica com espermatogônias e uma zona central com células em maturação circundadas por células acessórias (cabeça de seta branca) apoiadas em tecido conjuntivo (asterisco). O citoplasma das células acessórias é arborescente e contém regiões basófilas (cabeça de seta preta) [HE]. **C.** Espermatogônias apresentando nucléolos e blocos dispersos de heterocromatina no núcleo (cabeça de seta preta) [PAS + hematoxilina]. **D.** Espermatócitos primários mostrando a organização dos cromossomos nas fases da prófase meiótica (cabeça de seta preta) [PAS + hematoxilina]. **E.** Espermatócitos secundários com o núcleo contendo fortes marcações de heterocromatina na periferia do envoltório (cabeça de seta preta) [PAS + hematoxilina]. **F.** Espermátides iniciais apresentando núcleo homogêneo com finos acúmulos de heterocromatina (cabeça de seta preta) [PAS + hematoxilina]. **G.** Espermátides intermediárias com núcleo apresentando heterocromatina delgada na periferia (cabeça de seta preta). O citoplasma apresenta uma região fracamente reativa ao PAS (cabeça de seta branca [PAS + hematoxilina]. **H.** Espermátides tardias apresentando o citoplasma alongado (cabeça de seta branca) e o espinho em formação no polo oposto (cabeça de seta preta) [PAS + hematoxilina]. **I.** Duto seminífero apresentando epitélio cúbico simples (asterisco) e espermatozoides livres no lúmen [PAS + hematoxilina]. **J.** Detalhe do espermatozoide apresentando prolongamento posterior fracamente reativo para polissacarídeos neutros (cabeça de seta branca) e espinho apical basófilo e curvo (cabeça de seta preta) [PAS + hematoxilina]. Legenda: EST = espermátides iniciais; LST = espermátides tardias; MST = espermátides intermediárias; SP = espermatozoides; SPC1 = espermatócitos primários; SPC2 = espermatócitos secundários; SPG = espermatogônias; ST = túbulo seminífero.

**Figura 4.**



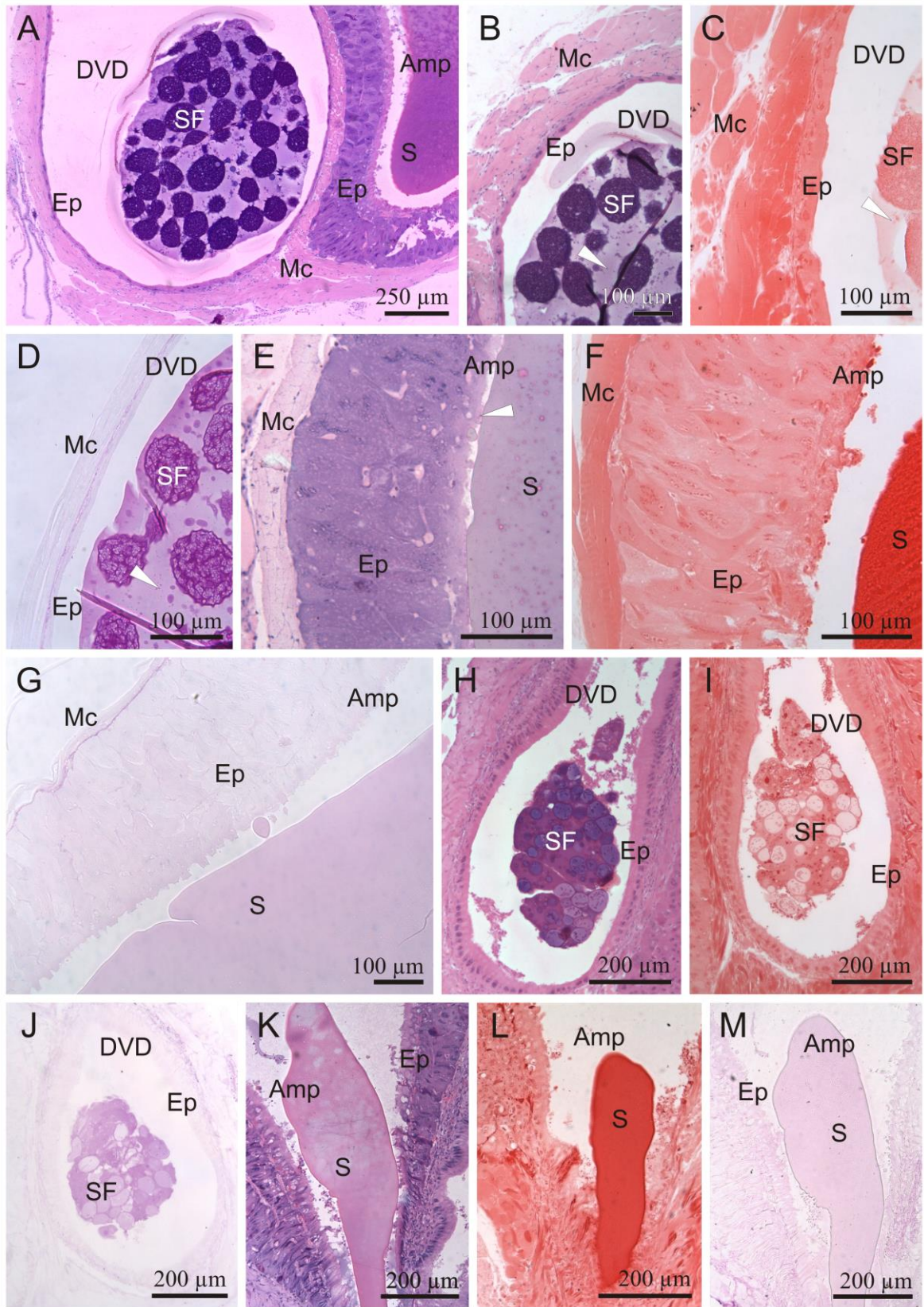
**Fig. 5.** *Xiphopenaeus kroyeri* (Heller, 1862). Histologia e histoquímica das regiões proximal e média do vaso deferente de indivíduos maduros. **A.** Vista geral da PVD envolta por uma camada de tecido conjuntivo delgado (cabeça de seta branca), mostrando duas regiões distintas para formação do espermatóforo: a anterior (PVDa) e posterior (PVDp) [HE]. **B.** Detalhe da PVDa apresentando epitélio cúbico ou colunar simples, com espermatozoides livres e massas espermáticas compactados por secreção basófila homogênea (cabeça de seta preta) [HE]. **C.** Presença de secreção proteica no processo de compactação das massas espermáticas, demonstrado pela fraca reação para proteínas da secreção basófila (cabeça de seta preta) no lúmen da PVDa [Xylidine ponceau]. **D.** Fraca reação para polissacarídeos neutros da secreção basófila (cabeça de seta preta) na luz da PVDa [PAS]. **E.** Secreção acidófila na PVDa envolvendo as massas espermáticas para a formação dos espermatóforos (cabeça de seta branca) [HE]. **F.** Forte reação para proteínas na secreção acidófila que envolve as massas espermáticas (cabeça de seta branca) na luz da PVDa [Xylidine ponceau]. **G.** Fraca reação para polissacarídeos neutros na secreção acidófila (cabeça de seta branca) que deposita-se iniciando a formação dos espermatóforos no lúmen da PVDa [PAS]. **H.** Detalhe da PVDp apresentando epitélio pavimentoso e espermatóforos envoltos pela secreção acidófila (cabeça de seta branca) no lúmen e grumos de um segundo tipo de secreção acidófila e granular são liberada no lúmen (cabeça de seta preta) [HE]. **I.** Lúmen da PVD mostrando a forte reação para proteínas na secreção que compõe a parede do espermatóforo (cabeça de seta branca) e nos grumos do segundo tipo de secreção granular (cabeça de seta preta) [Xylidine ponceau]. **J.** Detalhe do lúmen da PVDp mostrando secreção que envolve os espermatóforos (cabeça de seta branca) e os grumos do segundo tipo de secreção que finaliza a parede do espermatóforo (cabeça de seta preta), ambos apresentando forte reação ao PAS [PAS]. **K.** Vista geral da MVD apresentando espermatóforos imersos em secreção basófila [HE]. **L.** Detalhe do epitélio da MVD apoiada em várias camadas musculares delgadas (cabeças de setas pretas) [HE]. Legenda: Ep = epitélio; FS = espermatozoides livres; HE = hematoxilina e eosina; MVD = região média do vaso deferente; PVD = região proximal do vaso deferente; PVDa = porção anterior da região proximal do vaso deferente; PVDp = porção posterior da região proximal do vaso deferente; SF = espermatóforos; SM = massas espermáticas.

**Figura 5.**



**Fig. 6.** *Xiphopenaeus kroyeri* (Heller, 1862). Histologia e histoquímica comparativa do ducto ejaculatório de um indivíduo completamente maduro (19,1 mm de CC; **A.** - **F.**) e do menor indivíduo com sistema reprodutor desenvolvido (14,1mm de CC; G-L). **A.** Duto ejaculatório formado pela DVD e Amp evidenciando forte musculatura. Indivíduos maduros apresentam espermátóforos formados na DVD e secreção na Amp [HE]. **B.** Detalhe do epitélio pavimentoso da DVD, apoiada em tecido conjuntivo e musculatura. O lúmen mostra espermátóforos imersos em secreção basófila (cabeça de seta branca) [HE]. **C.** Histoquímica para proteínas das secreções presentes na DVD, mostrando reação fortemente positiva dos espermátóforos e positiva para a secreção onde espermátóforos estão imersos (cabeça de seta branca) [Xylidine ponceau]. **D.** Região distal do vaso deferente demonstrando reação positiva para a secreção luminal (cabeça de seta branca) e forte reação dos espermátóforos e para polissacarídeos neutros [PAS]. **E.** Detalhe da ampola mostrando epitélio estratificado com secreção holócrina (cabeça de seta branca) [HE]. **F.** Ampola apresentando forte reação para proteínas na secreção luminal [Xylidine ponceau]. **G.** Ampola contendo secreção com fraca reação para polissacarídeos neutros [PAS]. **H-M.** Vaso deferente distal do menor indivíduo apresentando espermatozoides e espermátóforos (14,1mm de CC). **H.** Detalhe da DVD com espermátóforos imersos em secreção [HE]. **I.** Técnica para detecção de proteínas na DVD mostrando reação para proteínas na secreção do lúmen [Xylidine ponceau]. **J.** Técnica para detecção de polissacarídeos neutros na DVD evidenciando reação positiva para a secreção luminal [PAS]. **K.** Ampola com secreção homogênea e basófila [HE]. **L.** Ampola com a forte reação para proteínas da secreção no lúmen [Xylidine ponceau]. **M.** Ampola com fraca reação para polissacarídeos neutros na secreção luminal [PAS]. Legenda: Amp = ampola; DVD = região distal do vaso deferente; Ep = epitélio; Mc = musculatura; S = secreção; SF = espermátóforo.

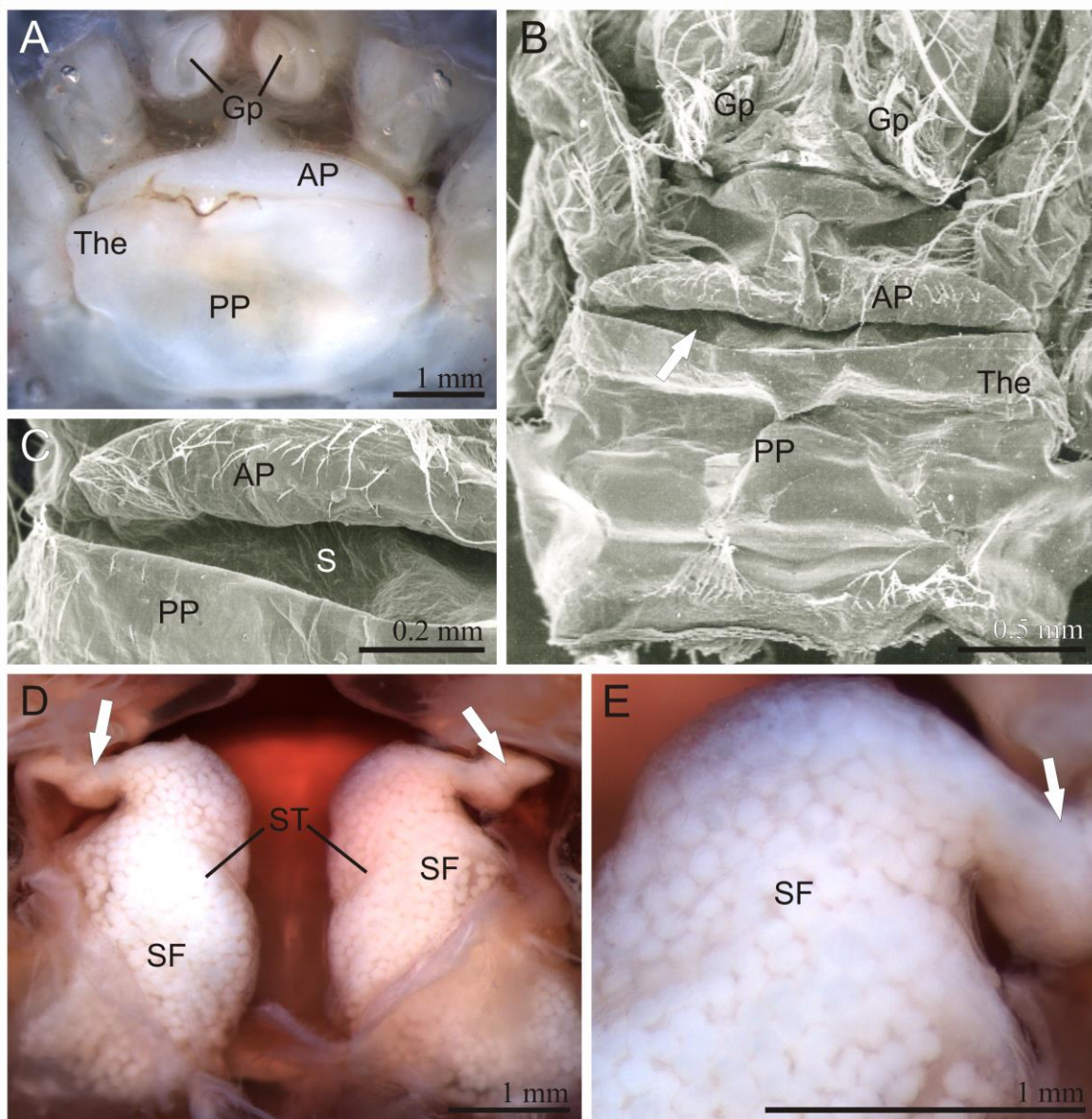
Figura 6.



**Fig. 7.** *Xiphopenaeus kroyeri* (Heller, 1862). Anatomia interna e externa do tólico.

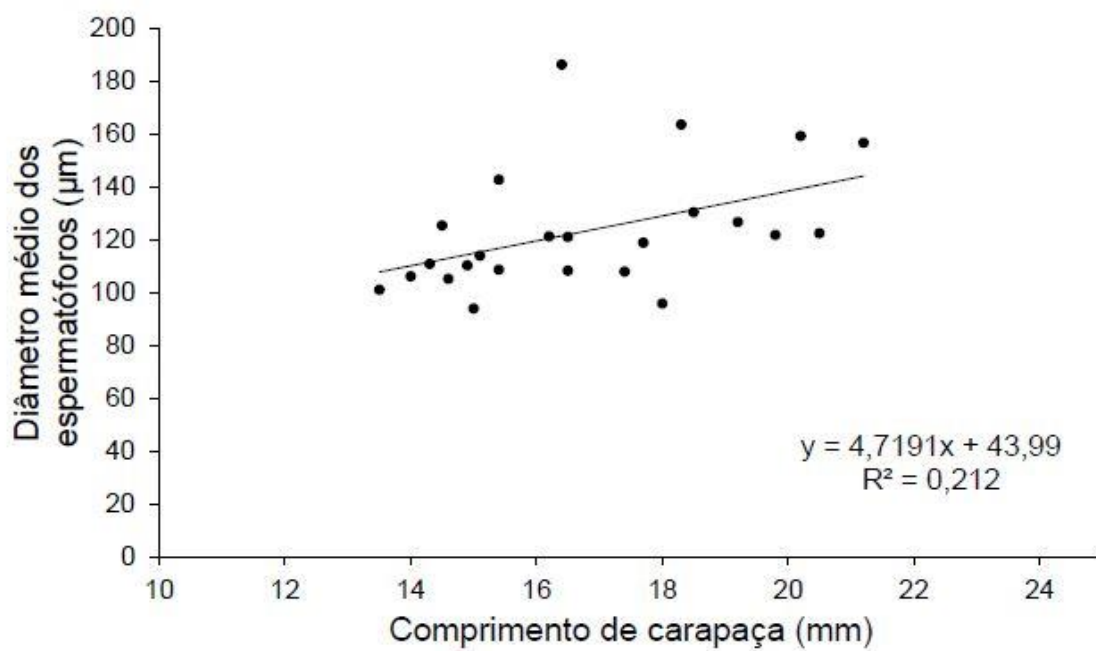
**A.** Vista ventral do tólico sob o estereomicroscópio, o qual é formado pela placa anterior ou capuz (AP) e a placa posterior (PP) a qual é mais ampla. Esta estrutura está localizada próximo aos gonóporos. Nota-se que entre as placas encontra-se a abertura do tólico. Nesta micrografia o tólico encontra-se esbraquiçado devido a presença de material seminal transferido na cópula. **B.** Tólico ao microscópio eletrônico de varredura, mostrando a abertura do tólico entre as placas anterior e posterior (seta branca). **C.** Detalhe da abertura do tólico, mostrando a discreta secreção do plug espermático. **D.** Vista dorsal da face celomática do tólico, mostrando as espermatecas inseminadas repletas de espermatóforos. Note um duto na porção anterior repleto de secreção esbranquiçada. **E.** Detalhe de uma espermateca mostrando os espermatóforos e a secreção do plug junto a abertura do tólico (seta branca). Legenda: AP = placa anterior; Gp = gonóporo; PP = placa posterior do tólico; S = secreção; SF = espermatóforos; ST = espermateca; The = tólico.

Figura 7.



**Fig. 8.** *Xiphopenaeus kroyeri* (Heller, 1862).Relação entre o diâmetro médio dos espermátóforos e o comprimento de carapaça.

Figura 8.



## Capítulo 2.

### Ultraestrutura da espermatogênese e produção do fluido seminal do camarão sete barbas *Xiphopenaeus kroyeri* (Heller, 1862)

**Guilherme Casemiro Andrioli.** Universidade Estadual Paulista (UNESP), FCAV, Centro de Aquicultura da UNESP (CAUNESP), Departamento de Biologia Aplicada, Laboratório de Morfologia de Invertebrados (IML), Via de Acesso Prof. Paulo Donato Castellane, s/n, 14884-900, Jaboticabal, São Paulo, Brasil. gandriol@hotmail.com.

**Fernando Jose Zara.** Universidade Estadual Paulista (UNESP), FCAV, Centro de Aquicultura da UNESP (CAUNESP) e IEAMar/UNESP, Departamento de Biologia Aplicada, Laboratório de Morfologia de Invertebrados (IML), Via de Acesso Prof. Paulo Donato Castellane, s /n, 14884-900, Jaboticabal, São Paulo, Brasil. fjzara@gmail.com.

#### Destaques

- A espermiogênese forma o prolongamento posterior e vesícula acrossomal pouco usual para Peneidae.
- Espermatozoides maduros são observados desde o testículo, com vesícula acrossomal (espinho) desenvolvida.
- Células secretoras semelhantes produzem os diferentes tipos de fluido seminal.
- Espermatóforos são montados na PVD e a ampola produz o plug espermático.

Este capítulo foi redigido conforme as normas da revista *Arthropod Structure & Development*

## Resumo

Neste trabalho nós descrevemos a ultraestrutura da espermatogênese e da produção de fluido seminal, incluindo os espermátóforos, de *Xiphopenaeus kroyeri* por meio de microscopia eletrônica de varredura (MEV) e de transmissão (MET). As amostras foram fixadas em solução Karnovsky (glutaraldeído 2,5% e paraformaldeído 2% em tampão cacodilato de sódio 0,1M [pH 7,2] e sacarose 5%) e seguiram rotina de MEV e MET. Os testículos são compostos de 12 lóbos com túbulos seminíferos os quais possuem uma zona periférica de proliferação de espermatogônias e uma zona central apresentando células germinativas em maturação. A espermiogênese mostra três estágios e os espermatozoides são maduros no lúmen do testículo, apresentando uma região posterior alongada e o espinho acrossomal formados. O vaso deferente mostra epitélio secretor. Na porção anterior do vaso deferente proximal, são liberados dois tipos de secreção por exocitose. Estas secreções são responsáveis por empacotar a secreção do testículo contendo espermatozoides, formando a parede do espermátóforo. As regiões média e distal do vaso deferente mostram somente um tipo de vesícula secretora, entretanto a região distal é abundante em mitocôndrias na base das células e provavelmente dilui o fluido seminal. Ambas as regiões são apoiadas em fibras musculares, que são espessas na região distal, mostrando um nervo ventral e muitos gânglios que controlam a contração muscular durante a ejaculação. A ampola não apresenta espermatozoides e mostra uma musculatura bem desenvolvida com muitas fibras que promovem uma poderosa e contínua contração para formar o plug espermático que é produzido por secreção holócrina pela camada mais interna do epitélio estratificado.

Palavras-chave: espermiogênese, fluido seminal, espermátóforos, MET, MEV.

## Abstract

In this work we describe the ultrastructure of the spermatogenesis and the seminal fluid production, including spermatophores, of *Xiphopenaeus kroyeri* by means of scanning (SEM) and transmission electron microscopy (TEM). The samples were fixed in Karnovsky solution (glutaraldehyde 2,5% and paraformaldehyde 2% with sodium cacodilate buffer 0,1M [pH 7,2] and sucrose 5%) and followed the routine of SEM and TEM. The testes are composed of 12 lobes with seminiferous tubules showing a peripheral zone with spermatogonia and a central zone showing germinative cells in maturation. The spermiogenesis show three stages and the spermatozoa are mature in the testis lumen showing alongated posterior region and the acrosomal spike formed. The vas deferens presents secretory epithelium. At the anterior part of proximal vas deferens, two types of vesicles are observed and released under exocytosis. These secretions are responsible to pack the secretion from testis with spermatozoa, forming the spermatophore wall. The median and distal vas deferens regions show only one type of secretory vesicle; however, the distal region is abundant in basal cell mitochondria and probably dilutes the seminal fluid. Both regions are lying on muscular fibers, which are thicker in the distal region, showing a ventral nerve and many ganglia that control the muscular contraction during the ejaculation. The Ampoule lacks of spermatozoa and shows a well-developed musculature with many fibers that promote a powerfull and constant contraction to form the sperm plug that is produced by holocrine secretion from the inner layer of stratified epithelium.

Key-words: spermiogenesis, seminal fluid, spermatophores, TEM, SEM.

## 1. Introdução

A família Peaneidae Rafinesque, 1815 é composta pelas tribos Peneini, Parapeneini e Trachypeneini, na qual nesta última *Xiphopenaeus kroyeri* (Heller, 1862) está incluído (Burkenroad, 1934). A ultraestrutura da espermiogênese em peneídeos é somente conhecida para os Peneini, em *Litopenaeus schmitti* (Burkenroad, 1936) descrito por Fransozo et al. (2016), *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931) em Alfaro-Montoya et al. (2016), *Fenneropenaeus chinensis* (Osbeck, 1765) por Kang et al. (2008), *Fenneropenaeus penicillatus* (Alcock, 1905) como *Penaeus penicillatus* em Hong et al. (1999), *Penaeus monodon* Fabricius, 1798 por Feng et al. (2017) e para os Parapeneini, *Parapenaeus longirostris* (Lucas, 1846) em Medina (1994). Os integrantes de Trachypeneini possuem espermatozoides com morfologia mais distinta dentro da família, como a presença de um prolongamento citoplasmático no corpo principal e, no polo oposto há um espinho apical curvo na vesícula acrossomal. Este padrão morfológico foi confirmado por meio de microscopia eletrônica de varredura (MEV) para *Xiphopenaeus riveti* Bouvier, 1907, *Rimapenaeus byrdi* (Burkenroad, 1934) como *Trachypenaeus byrdi* realizado por Alfaro et al. (2003) e *Rimapenaeus similis* (Smith, 1885) como *Trachypenaeus similis* em Bauer e Lin (1993) e detalhado por microscopia eletrônica de transmissão (TEM) em *Rimapenaeus constrictus* Stimpson, 1871 e *X. kroyeri* (Camargo et al. 2017). Assim, os espermatozoides de Trachypeneini possuem mais similaridades a uma linhagem de Sicyoniidae Ortmann, 1898 quando comparadas as outras tribos de Penaeidae (Camargo et al., 2015, 2017). Apesar desta morfologia ímpar, não existem trabalhos detalhando a ultraestrutura da espermatogênese para a formação deste espermatozoide pouco usual.

O sistema reprodutor masculino em Penaeidae é composto por um par de testículos e um par de *vasa deferentia*, o qual é subdividido em três regiões: proximal (PVD), média (MVD) e distal (DVD). A DVD possui uma porção dilatada próximo ao gonópore, denominada ampola terminal (Burkenroad, 1934; Bauer, 1991; Bauer e Cash, 1991; Chow et al., 1991a; Bauer e Lin, 1993; Fransozo et al., 2016). Os únicos trabalhos com a ultraestrutura do vaso deferente foram realizados para os Peneini do gênero *Litopenaeus*, como *Litopenaeus setiferus* (Linnaeus, 1767) e *L. vannamei* (Chow et al. 1991; Ro et al., 1990). Estes

trabalhos descrevem principalmente a produção de fluido seminal relacionada à formação das várias camadas que envolvem a massa espermática, levando a formação de estruturas do espermatóforo único deste Peneini, o qual é depositado sobre o esterno da fêmea (téllico aberto). Contudo, não se conhece a ultraestrutura das células e das secreções das diferentes regiões do vaso deferente no restante das espécies. Este ponto torna-se ainda mais importante, uma vez que, na maioria das espécies de Penaeidae, o material seminal é depositado no interior do receptáculo seminal, tendo as fêmeas consideradas como portadoras de téllico fechado (para revisão ver Perez-Farfante e Kensley, 1997). Para os Trachypeneini *R. similis* e *X. kroyeri*, no vaso deferente ocorre a formação de múltiplos espermatóforos arredondados, semelhantes aos de *Brachyura* e a secreção produzida pela ampola terminal atua como plug espermático (Bauer, 1991; Bauer e Lin, 1993; Andrioli et al., capítulo 1). Assim, a ultraestrutura da produção do fluido seminal e formação do espermatóforo característico desta tribo, os quais nunca foram analisados, pode contribuir para o entendimento da transferência espermática no camarão sete-barbas.

*Xiphopenaeus kroyeri* pode ser um excelente modelo para estudos biológicos devido sua abundância e pela ocorrência de indivíduos maduros ao longo do ano todo (Castro et al., 2005). Esta espécie é amplamente encontrada na costa oriental do continente americano desde o sul dos Estados Unidos da América (Carolina do Norte) até o Brasil (Rio Grande do Sul) (D’Incao et al., 1999; Costa et al., 2007; Castilho et al., 2015) e habita preferencialmente águas costeiras com fundos arenosos em profundidades de 2 a 70 metros (D’Incao, 1999; Costa et al., 2003). Este camarão tem importância adicional pois representa o camarão mais explorado em termos de biomassa no Estado de São Paulo, no sudeste brasileiro (Rodrigues et al., 1993; Nakagaki e Negreiros-Fransozo, 1998). Assim, neste trabalho descrevemos a ultraestrutura da espermatogênese e formação do espermatóforo, além da organização celular nas diferentes regiões do vaso deferente do camarão sete-barbas *X. kroyeri*.

## 2. Material e métodos

### 2.1. Coleta e identificação

Os animais foram coletados na região da enseada de Ubatuba, São Paulo, Brasil (23° 27'S e 45° 02'W) durante a primavera e outono dos anos de 2015 e 2016 por meio de arrastos de barco de pesca camaroneira equipados com redes do tipo *Double-rig*. Os espécimes foram transportados vivos ao laboratório em caixas térmicas com água do mar e aeradores. Os indivíduos maduros, de tamanho acima de 15 mm de cefalotórax (ver capítulo 1) foram anestesiados por resfriamento (-20°C / 5 minutos) e dissecados para a remoção do sistema reprodutor.

### 2.2. Microscopia eletrônica

As amostras do sistema reprodutor de cinco indivíduos para a microscopia eletrônica de varredura (MEV) e de oito indivíduos para a microscopia eletrônica de transmissão (MET) foram fixadas em solução Karnovsky (glutaraldeído 2,5% e paraformaldeído 2%) em tampão cacodilato de sódio 0,1M (pH 7,2) e sacarose 5% (Ro et al., 1990) por 4-24h a 4°C, lavadas três vezes no mesmo tampão e pós-fixadas em tetróxido de ósmio a 1% tamponado por 2h. Os tecidos para MEV foram desidratados em uma serie crescente de etanol (30-100%) e submetidas ao ponto crítico EMS 850. Uma vez completamente secas, as amostras foram fixadas à suportes metálicos e recobertas com ouro (5 nm) no vaporizador Danton Vacuum Desk II. Todas as amostras foram analisadas e fotografadas no microscópio eletrônico de varredura Jeol SEM JSM 5410 operado a 15 kV.

As diferentes regiões do vaso deferente submetidas a MET, após a pós-fixação, foram contrastadas “En Bloc” em solução de 1% de acetato de uranila aquosa por 12 horas, desidratadas em series crescentes de acetona (70-100%), infiltradas e incluídas em resina Epon-Araldite. Cortes ultrafinos (50-70 nm) foram obtidos no ultramicrotomo Leica UC7, recolhidos em grades de cobre, contrastadas em acetato de uranila 2% e citrato de chumbo a 0,4% em 0,1N NaOH (Reynolds, 1963; Venable e Coggeshall, 1965). As grades foram visualizadas e fotografadas no MET JEOL – JEM 1010 operado a 80 kV.

### 2.3. Histologia e mensuração das células germinativas

Para a histologia as amostras do sistema reprodutor masculino foram dissecadas e fixadas em paraformaldeído 4% em tampão fosfato de sódio 0,2M (pH 7,4) por 24h. Posteriormente, as amostras foram lavadas no mesmo tampão, desidratadas em série crescente de etanol (70%-95%), embebidas e incluídas em historesina Leica®. Cortes seriados de 4,5 a 7 µm de espessura foram obtidos no micrótomo rotativo. Posteriormente, estes cortes foram corados com hematoxilina e eosina (H&E) para descrição geral (Junqueira e Junqueira, 1983) e pela técnica de Feulgen, para detecção de DNA (Pearse, 1985). As imagens foram obtidas no fotomicroscópio Leica DM2000 pelo software Leica® IM50.

O tamanho médio do núcleo em cada fase da espermatogênese e espermiogênese foram obtidos pela mensuração do maior eixo do núcleo quando totalmente aparente. Para isso, lâminas de pelo menos três animais foram examinadas (Zara et al., 2012). Para cada fase de desenvolvimento das células germinativas foram tomadas 30 medidas do diâmetro nuclear. As médias foram testadas quanto à normalidade (Shapiro-Wilk), e posteriormente uma análise de variância (ANOVA) seguido do teste *post-hoc* de Tukey foram utilizadas para verificar uma possível diferença entre os tipos celulares. Para todas as análises estatísticas foi utilizada a significância de  $p < 0,05$  (Sokal e Rohlf, 1995).

## 3. Resultados

### 3.1. Morfologia geral do sistema reprodutor

O sistema reprodutor masculino de *X. kroyeri* é formado por um par de testículos multilobulares fusionados ventralmente a um eixo central e um par de *vasa deferentia*. Estes estão localizados na porção dorso-medial do cefalotórax, acima do hepatopâncreas e desembocam no vaso deferente o qual caminha lateralmente no cefalotórax, até desembocar junto à ampola no coxopodito do quinto par de pereópodos (Fig. 1A) onde se localiza o gonóporo masculino. O vaso deferente é dividido em três regiões: proximal (PVD), média (MVD) e distal (DVD). O duto ejaculatório é formado pela porção mais distal da DVD unindo-se a ampola (Fig. 1A).

O testículo de *X. kroyeri* mostra lóbos testiculares formados por túbulos seminíferos apresentando células germinativas (Fig. 1A - D). Os túbulos seminíferos convergem até a base dos lóbos, onde alcançam a PVD (Fig. 1A e E). A PVD mostra-se altamente convoluta e totalmente recoberta por uma camada de tecido conjuntivo, sendo distendida de sua união com o testículo até a MVD (Fig. 1A e E). A MVD apresenta-se como um túbulo simples e reto, recoberto por musculatura e com maior diâmetro luminal quando comparado a PVD (Fig. 1A e F). Esta região é caracterizada por musculatura circular, apresentando um feixe nervoso ao longo do mesmo (Fig. 1F). Em cortes transversais nota-se que no interior da MVD mostra-se com um só tubo, sem dutos acessórios, preenchido por secreções e espermátóforos (Fig. 1G). No interior de espermátóforos rompidos, os espermatozoides caracterizam-se como células alongadas, com espinho apical delgado, longo e curvo (Fig. 1H). O corpo principal também é bastante desenvolvido e, na face oposta ao espinho, nota-se um prolongamento em forma de cone, o prolongamento posterior (Fig. 1H).

A DVD é marcada pelo aumento do diâmetro tubular e espessamento da musculatura (Fig. 1A e I). Esta porção do vaso penetra na base da ampola formando o ducto ejaculatório (Fig. 1J). A DVD mostra forte musculatura circular, com gânglios do sistema nervoso, dos quais partem várias fibras nervosas terminais (Fig. 1I). A ampola apresenta várias camadas de musculatura tanto circulares quanto longitudinais (Fig. 1K).

### 3.2. Testículo, espermatogênese e espermiogênese

Ao MET, os testículos possuem uma zona periférica de proliferação de espermatogônias e uma zona central, com células germinativas em geral na mesma etapa de maturação, sendo estas zonas separadas pelas células acessórias ou de Sertoli (Fig. 2A). As células de Sertoli apresentam núcleo variando de achatado a arredondado, com heterocormatina periférica (Fig. 2A e B) e seu citoplasma arborescente penetra por entre as células germinativas no interior do túbulo seminífero (Fig. 2A). O citoplasma está preenchido por retículo endoplasmático rugoso (RER) e complexos de Golgi bem desenvolvidos, mitocôndrias e pequenas vesículas de eletron densidade variada (Fig. 2B). Os

corpos residuais são mais abundantes durante a espermiogênese, espalhados por toda a célula (Fig. 2C).

Durante a espermatogênese e espermiogênese, os diâmetros médios das células germinativas decresceram significativamente ao longo de seu desenvolvimento ( $F = 1075,73$ ;  $p < 0,0001$ ). As espermatogônias são arredondadas e apresentam núcleo arredondado e grande ( $6,36 \pm 0,55 \mu\text{m}$ ), com nucléolo bem evidente. No citoplasma destas células são observadas mitocôndrias alongadas, grande quantidade de polirribossomos e algumas poucas membranas do RER. Na região perinuclear notam-se a presença de grânulos eletrondensos ou *Nuages* (Fig. 2D e E). Os espermatócitos primários tem núcleo grande ( $6,64 \pm 0,47 \mu\text{m}$ ), com tamanho maior que das espermatogônias (Tukey = 4,79;  $p < 0,05$ ). Nestas células é possível detectar os estágios da prófase meiótica, pela presença dos complexos sinaptonêmicos, inclusive ancorados na membrana plasmática, no início do zigóteno (Fig. 2F-G). O citoplasma mostra poucas modificações para o estágio de espermatogônia, com mitocôndrias pequenas e polirribossomos (Fig. 2F). Os espermatócitos secundários possuem o diâmetro nuclear próximo aos observados nos espermatócitos primários ( $6,50 \pm 0,32 \mu\text{m}$ ) (Tukey = 2,408). A cromatina está particularmente condensada, principalmente na periferia do núcleo junto ao envoltório nuclear. No citoplasma dos espermatócitos secundários são observadas poucas cisternas do retículo endoplasmático, mitocôndrias mostrando sinais de degeneração, pela redução do número de cristas e algumas gotas de lipídeos (Fig. 2H-I).

O processo de espermiogênese em *X. kroyeri* foi dividido em três fases: espermátides iniciais (Fig. 3A - E), intermediárias (Fig. 3F - H) e finais (Fig. 3I - K). As espermátides iniciais ( $3,28 \pm 0,19 \mu\text{m}$ ) são marcadas pela redução do núcleo ( $p < 0,01$ ) em relação ao estágio anterior. Nestas células em início da espermiogênese, a cromatina está particularmente condensada junto ao envoltório nuclear. O citoplasma está preenchido por cisternas do retículo endoplasmático rugoso (RER), complexos de Golgi e junto a estes se nota a presença de gotas de lipídeos e várias vesículas. As mitocôndrias continuam com o aspecto alterado notado desde a fase anterior (Fig. 3A e B). Nas células de Sertoli, ricas em RER e complexos de Golgi, notam-se corpos residuais, porém com tamanho reduzido. Em espermátides iniciais mais avançadas, o núcleo mantém o aspecto ultraestrutural, porém encontra-se deslocado para o pólo

oposto ao da formação da vesícula proacrossomal, menos eletrondensa que o citoplasma e com material finamente granular (Fig. 3C). Os materiais são provenientes de vesículas golgeanas, as quais se fundem à unidade de membrana da vesícula proacrossomal (Fig. 3D). A última modificação observada nas espermátides iniciais é o desaparecimento do envoltório nuclear, ao mesmo tempo em que a cromatina torna-se muito descondensada com aspecto granular periférico, com grumos heterocromáticos mais centrais. O citoplasma, apesar de estar em contato com o nucleoplasma, mantém sua regionalização na periferia do pólo nuclear, marcado pelas membranas do RER paralelas e as mitocôndrias. A vesícula proacrossomal tem o maior volume, com material finamente granular, e na sua face em contato com a célula de Sertoli, começa a haver a formação de uma vesícula eletron-lúcida recobrimdo todo o pólo proacrossomal (Fig. 3E).

As espermátides intermediárias apresentam o mesmo diâmetro do núcleo que as espermátides iniciais ( $3,27 \pm 0,31 \mu\text{m}$ ) (Tukey = 0,081). Estas células apresentam citoplasma consideravelmente reduzido na periferia da região “nuclear”, porém em contato com o nucleoplasma devido à ausência do envoltório nuclear. A cromatina encontra-se granular e com pequenos grumos heterocromáticos mais centrais. Sobre o núcleo, nota-se o início da formação da vesícula acrossomal em forma de domo o qual constitui o capuz acrossomal, com a presença de material granular e outro material fino, ambos mais eletrondensos que o restante, concentrados no ápice deste domo. Estes materiais serão o prospectivo espinho e a área eletrondensa do capuz acrossomal. O pólo acrossomal mostra-se com uma vesícula de maior amplitude no citoplasma em contato com a célula de acessória (Fig. 3F). Nas espermátides intermediárias mais avançadas, o envoltório nuclear reorganiza-se, ocupando uma porção mais central. O citoplasma encontra-se concentrado sob o núcleo, com muitas membranas e mitocôndrias. No pólo oposto, o capuz acrossomal tem o ápice mais largo, o qual vai se tornando mais estreito com o progredir sobre o núcleo, na direção ao citoplasma (Fig. 3G). Na porção mais larga do capuz acrossomal encontra-se uma área mais eletrondensa, e sobre ela nota-se material eletrondenso granular do início da formação do espinho (Fig. 3H). Sob o capuz acrossomal, na região subacrossomal, acumula-se material finamente granular formando a placa eletrondensa em contato com o envoltório nuclear e o capuz.

Esta placa está particularmente disposta sobre a área eletrondensa no interior do capuz (Fig. 3G e H).

As espermatídes tardias são caracterizadas pelo citoplasma cônico, sob o núcleo, formando a região posterior alongada. O citoplasma encontra-se preenchido por muitas membranas paralelas, mitocôndrias e grânulos de glicogênio (Fig. 3I e J). Sobre o capuz acrossomal nota-se a formação do espinho eletrondenso, culminando assim a com a estrutura da vesícula acrossomal. As células Sertoli têm a vesícula eletron-lúcida acompanhando toda da vesícula acrossomal e, em algumas espermatídes tardias, ela alcança inclusive a região posterior alongada, tornando a espermatíde livre dentro da vesícula citoplasmática da célula de Sertoli (Fig. 3J e K). Esta vesícula eletron-lúcida da célula de Sertoli recebe seu conteúdo a partir do complexo de Golgi por meio de fusão vesicular (Fig. 3L). O núcleo das espermatídes tardias tem menor diâmetro ( $2,29 \pm 0,10 \mu\text{m}$ ) na espermiogênese em *X. kroyeri*, sendo significativamente menor em relação as espermatídes iniciais e intermediárias ( $p < 0,01$ ). Esta célula está preenchida por cromatina granular periférica com grânulos heterocromáticos centrais, confirmados pela reação positiva para DNA ao Feulgen, lembrando um nucléolo (Fig. 3I, J, M e N). Toda a célula de Sertoli com as espermatídes tardias são liberadas para o lúmen do túbulo seminífero, onde o espermatozoide encontra-se totalmente maduro (Fig. 3M).

### 3.3. Vaso deferente

A porção anterior da região proximal do vaso deferente (PVDa) apresenta epitélio simples, basófilo, envolto por delgada camada muscular e no lúmen os espermatozoides encontra-se livres imersos em secreção (Fig. 4A). Os núcleos são basais e irregulares, com grumos de heterocromatina e mais de um nucléolo (Fig. 4A e B). A basofilia é principalmente devida á estas células serem tipicamente secretoras, ricas em RER e complexos de Golgi vesiculares (Fig. 4B). O pólo basal apresenta poucas invaginações e a lâmina basal é bastante delgada em contato com a musculatura. Além disso, notam-se várias mitocôndrias com aspecto morfológico típico, sem sinais de degeneração (Fig. 4C e D). A maior parte do citoplasma esta preenchido pelo RER o qual pode ser encontrado como cisternas paralelas ou vesículas e complexos de Golgi vesiculares (Fig. 4E). No

pólo apical, pode-se notar a presença de dois tipos de vesículas de secreção, sendo uma mais eletrondensa, maior e menos abundante que a outra, mais comum e menor (Fig. 4F). Tais secreções são liberadas por exocitose e no lúmen da PVDa formam as secreções tipo II, menos eletrondensa e a tipo III granular eletrondensa (Fig. 4F e G). Os espermatozoides são imersos na secreção tipo I proveniente do testículo. A secreção tipo II separa os espermatozoides livres em massas espermáticas, e a secreção tipo III acumula-se no contato da secreção tipo I (Fig. 4H e I). A porção posterior da PVD (PVDp) tem a mesmo aspecto histológico e ultraestrutural, apesar do epitélio ser mais achatado nesta região (Fig. 4J e K). No pólo apical notam-se as mesmas vesículas de secreção, porém as vesículas parecem menores (Fig. 4K e L). A secreção tipo II parece ter aspecto finamente granular, e a secreção tipo III eletrondensa encontra-se floculada nesta porção (Fig. 4L e M). A secreção tipo III se compacta com outros grumos que são adicionados à parede do terminam a parede do espermatóforo (Fig. 4N - P).

A MVD apresenta-se menos basófila que a região anterior, porém com epitélio simples e colunar, com núcleos bastante irregulares, mais próximos do pólo basal, sendo estas células com a extremidade apical muito desenvolvida em área. Uma das principais características desta região do vaso deferente é o aumento das camadas musculares, sendo a mais próxima do epitélio oblíqua e as mais distantes, longitudinais (Fig. 5A - C). O pólo basal possui invaginações da membrana plasmática mais profundas, com mitocôndrias normais entre elas, sendo a lamina basal com a mesma característica da PVD (Fig. 5D). As células estão preenchidas por RER e complexos de Golgi com o mesmo padrão já descrito. No pólo apical, as células estão aderidas umas as outras por profundas e acentuadas interdigitações, as quais têm como reforço junções septadas, sendo esta junção de adesão mais comum nas células do vaso deferente (Fig. 5E e F). Neste pólo, somente vesículas de secreção tipo II são observadas, também liberadas por exocitose (Fig. 5G).

Em *X. kroyeri*, a DVD é mais ampla que a região anterior, e tem como característica principal a ampola, a qual é uma glândula adjacente associada a parte final do vaso deferente. O epitélio desta região é bastante delgado e envolto por uma capsula muscular mais espessa (Fig. 6A e B). O pólo basal apresenta muitas mitocôndrias e invaginações da membrana plasmática basal, ocupando grande parte do volume deste compartimento. As mitocôndrias estão

particularmente distribuídas até a altura do núcleo, o qual é achatado, menos irregular, mas com a mesma distribuição de heterocromatina junto ao envoltório nuclear (Fig. 6B e C). O pólo apical apresenta o mesmo aspecto que a MVD, com RER, Complexo de Golgi vesicular e várias vesículas de secreção pequenas. No detalhe nota-se as vesículas de secreção do tipo II com materiais de diferentes eletrondensidade associadas aos microtúbulos, liberadas por mecanismo merócrino (Fig. 6D - F). A ampola está envolvida por muitos pacotes de fibras musculares e amplas camadas de tecido conjuntivo entre eles. O tecido conjuntivo é rico em fibras de colágeno com feixes delgados característicos do colágeno III (Fig. 6A G - I). Várias fibras musculares estão conectadas umas as outras por meio de um padrão ultraestrutural semelhante ao disco intercalar, com desmossomos (Fig. 6J e K). O epitélio é estratificado, sendo as células com complexos de Golgi lamelares (Fig. 6L e M). As células da última camada sofrem descamação sendo a secreção produzida por mecanismo holócrino, e a secreção luminal bastante heterogênea e com diferenças de eletrondensidade (Fig. 6N).

#### 4. Discussão

A morfologia geral do sistema reprodutor masculino segue o padrão observado ao microscópio de luz e eletrônica de varredura proposto para Penaeidae e o descrito para *X. kroyeri* (King, 1948; Tuma, 1967; Dougherty e Dougherty, 1989; Bauer, 1991; Chow et al., 1991; Bauer e Cash, 1993; Bauer e Lin, 1993; Fransozo et al., 2016; Andrioli et al., capítulo 1). O testículo é formado anatomicamente por seis lóbos bem separados em cada lado. Em Penaeidae, é comum a presença de testículo bilateral e multilobulado, fundido por uma comissura central (Dougherty and Dougherty, 1989; Chow et al., 1991; Bauer e Lin, 1993; Medina, 1994; Fransozo et al., 2016). Quanto ao número de lóbos, o testículo de *X. kroyeri* é semelhante ao de *R. similis*, ambos contendo por volta de 12 lóbos (Bauer e Lin, 1993). Em *L. setiferus* e *L. vannamei* são descritos como contendo por volta de 16 lóbos e para *Litopenaeus schmitti* (Burkenroad, 1936) são observados testículos contendo de 8 a 14 lóbos (Chow et al., 1991; Fransozo et al., 2016). Portanto, esta característica mostra-se variável dentro desta família.

Todas as regiões do vaso deferente em *X. kroyeri* possuem camadas musculares, sendo delgada na PVD e progressivamente mais espessa, com um

maior número de feixes de fibras na MVD e DVD. Esta musculatura é enervada ventralmente, com muitos gânglios, o que demonstra o controle refinado do peristaltismo para a condução do fluido seminal (Bauer e Lin, 1993). Nestas regiões do vaso deferente, a presença de forte musculatura também é importante para as contrações no momento da ejaculação, como proposto para outros Penaeidae (Ro et al., 1990; Chow et al., 1991; Bauer e Lin, 1993). Porém, a ampola recebe um ramo nervoso específico, indicando um controle diferenciado para esta estrutura no momento da ejaculação, concordando com o proposto para *R. similis* (Bauer e Lin, 1993).

Nos túbulos seminíferos do testículo são observadas duas zonas distintas, uma periférica, onde as espermatogônias se multiplicam, as quais não mostram grande diferenciação em termos de organelas e uma central, onde as células germinativas sofrem diferenciação durante a espermatogênese e espermiogênese. Esta estruturação aparece com frequência em Penaeidae sem distinção entre as tribos (King, 1948; Bell e Lightner, 1988; López-Greco, 2013; Fransozo et al., 2016; Andrioli et al., capítulo 1). Ao longo da espermatogênese, o citoplasma dos espermátócitos primários mostra-se semelhante ao observado nas espermatogônias, contudo, nos espermátócitos secundários, o citoplasma sofre redução em volume e em número de organelas. Este processo mostra-se similar a espermatogênese de *L. vannamei*, contudo, este apresenta um grande grânulo entrondenso no citoplasma, o qual não foi observado em *X. kroyeri*. Durante a espermiogênese, o envoltório nuclear desaparece e reaparece algumas vezes. Em peneídeos é comum a ruptura do envoltório nuclear somente uma vez, ao final da espermiogênese, o qual não se reestabelece nos espermatozoides como observado por Fransozo et al. (2016) para *L. schmitti* e por Feng et al. (2017) em *Penaeus monodon* Fabricius, 1798. Os processos de ruptura e rápida reorganização do envoltório nuclear, promovidos em vários processos celulares independente do ciclo de divisão celular, vêm sendo muito estudados e relacionados inclusive com diferentes causas de mutação (para revisão, Shah et al., 2017). Desta maneira, a desorganização e o reaparecimento do envoltório nuclear destas células parecem fazer parte do processo normal da espermiogênese em Penaeidae.

No início da espermiogênese em *X. kroyeri*, as espermátides iniciais possuem vesículas citoplasmáticas as quais migram para o polo oposto ao núcleo

formando a vesícula pró-acrossomal. A origem destas vesículas foi comumente creditada ao retículo endoplasmático para diferentes espécies de Peneini, Parapeneini e Sycioniidae (Shigekawa e Clark, 1986; Medina, 1994; Kang et al., 2008; Feng et al., 2017). Porém, neste trabalho está demonstrado que em *X. kroyeri*, tais vesículas têm origem do complexo de Golgi. Nesta fase, as mitocôndrias mostram-se degeneradas, caracterizadas pelo menor número de cristas perdendo sua função primordial, e permanecendo com a mesma característica até o espermatozoide. Este processo parece ser comum em Decapoda, porém em Brachyura as mitocôndrias perdem os citocromos durante a espermiogênese, e perdem progressivamente as cristas, que ficam reduzidas em número ou desaparecem nos espermatozoides (Pearson e Walker, 1975; Tudge, 2009). O surgimento de um grânulo de glicogênio no citoplasma a partir das espermátides tardias indica um mecanismo anaeróbio de produção de energia, reduzindo a dependência de mitocôndrias, as quais se encontram em degeneração. Contudo, durante a espermiogênese em *X. kroyeri*, a entrada em metabolismo anaeróbio não pode ser totalmente creditada, uma vez que as mitocôndrias são numerosas e observadas nos espermatozoides, ainda com cristas, indicando sinal de atividade aeróbia. A modificação das mitocôndrias durante a espermiogênese e nos espermatozoides pode ser consequência da baixa necessidade energética da própria célula, uma vez que os espermatozoides deste grupo são imóveis (Jamieson e Tudge, 2000; Feng et al., 2017). No caso da espermiogênese, neste trabalho mostramos que as mitocôndrias das células de Sertoli associadas às espermátides tem o aspecto normal, assim, estas células podem prover as quantidades necessárias de ATP para o desenvolvimento destas células germinativas. A partir de espermátides intermediárias, há formação de uma vesícula eletrólucida sobre a vesícula acrossomal. Esta vesícula tem origem dos complexos de Golgi das células de Sertoli, e aumenta em tamanho durante a espermiogênese, chegando a recobrir toda a célula germinativa. A formação desta vesícula parece estar relacionada com a separação das espermátides das células de Sertoli, tornando se livres no lúmen ao final da espermiogênese. Em *P. longirostris*, a formação de uma vesícula eletrólucida sobre a vesícula acrossomal indica que o mecanismo de liberação da espermátide final seja semelhante a *X. kroyeri*, tornando-se espermatozoides (Medina, 1994).

Durante a espermatogênese e espermiogênese, as células de Sertoli absorvem o citoplasma das células germinativas, resultando na redução de tamanho. O citoplasma excedente é degradado pelos corpos residuais no citoplasma das células de Sertoli. Na espermátide intermediária, a vesícula acrossomal alonga-se lateralmente e recobre todo o núcleo e parte do citoplasma, formando o capuz acrossomal. Nesta fase, esta vesícula apresenta todos os componentes observados nos espermatozoides, incluindo a deposição dos materiais que darão origem ao espinho. Isto está de acordo com a ultraestrutura da espermiogênese dos peneídeos descritos, os quais apresentam um capuz acrossomal formado durante a este processo (Medina, 1994; Kang et al., 2008; Alfaro-Montoya et al., 2016; Fransozo et al., 2016; Feng et al., 2017). No final da maturação dos espermatozoides, estes apresentam um capuz acrossomal e um espinho formados. O surgimento do prolongamento posterior e do espinho dos espermatozoides é o passo final da espermiogênese, uma vez que apresentam as mesmas características descritas por Camargo et al. (2017) para espermatozoides maduros de *X. kroyeri*. Estas células germinativas estão presentes no lúmen dos túbulos seminíferos, sugerindo que o desenvolvimento dos espermatozoides é completado ainda no testículo. Este processo é o mesmo observado ao final da maturação dos espermatozoides de *P. longirostris* (Medina, 1994; Sobrino e García 2007), *Metapenaeus monoceros* (Fabricius, 1798) demonstrado por Abraham et al. (2007) e *F. chinensis* (Kang et al., 2008). Contudo, nos camarões do gênero *Litopenaeus* Pérez-Farfante, 1969 (King, 1948; Alfaro, 1994; Alfaro-Montoya, 2016; Fransozo et al. 2016;) e em *Sicyonia ingentis* (Burkenroad, 1938) como relatado por Shigekawa e Clark (1986) e Subramonian (1995), o processo de amadurecimento dos espermatozoides, com o desenvolvimento da vesícula acrossomal e surgimento do espinho só são observados na luz do vaso deferente. Devido a proximidade de *X. kroyeri* de *Sicyonia* Milne Edwards, 1830, a maturação final do espermatozoide no vaso deferente ocorre nas diferentes tribos e famílias de forma independente da filogenia. Portanto, como proposto por Alfaro-Montoya et al. (2016), a região onde os espermatozoides amadurecem trata-se de uma diferença de desenvolvimento sem explicação filogenética. A morfologia dos espermatozoides de *X. kroyeri* classifica-o como unistelado, padrão encontrado em camarões Dendrobranchiata e Caridea (Bauer e Lin, 1993; Alfaro et al., 2003; Braga et al., 2013; Camargo et

al., 2016). Camargo et al. (2017) descreveu a estrutura nucleolar mostrada como um nucléolo, contudo, trata-se de heterocromatina compactada. Apesar de ser muito semelhante à um nucléolo, esta região foi positiva para DNA ao Feulgen.

O epitélio do vaso deferente em *X. kroyeri* mostra-se tipicamente secretor por toda sua extensão, preenchido por retículo endoplasmático rugoso e complexos de Golgi vesiculares, típicos de células produtoras de proteínas, como encontrados em glândulas salivares de insetos (Akai, 1983; Zara e Caetano, 2002). Andrioli et al. (capítulo 1) subdividiram a PVD em *X. kroyeri* em porção anterior (PVDa) e posterior (PVDp) ao microscópio de luz. A PVDa, mostra epitélio simples cúbico apresentando espermatozoides livres imersos em secreção proveniente do testículo, e a PVDp tem epitélio pavimentoso com espermatóforos de apresentando uma parede acelular, imersos em secreção seminal. Ultraestruturalmente, as duas regiões são idênticas, porém na PVDp existe uma preponderância de vesículas de secreção do tipo III em relação do tipo II. Assim na PVD, dois tipos principais de vesículas de secreção são observados e excitados (secreção merócrina), sem grandes acúmulos no citoplasma, o que parece indicar produção e trânsito rápido das mesmas para a produção do fluido seminal. Estes componentes são denominados secreção tipo II, menos eletrondensa e que no lúmen torna-se homogênea, e secreção tipo III, a qual é eletrondensa e granular. Em crustáceos, a secreção do tipo II parece estar envolvida na separação dos espermatozoides em massas, os quais estão imersos na secreção tipo I, proveniente do testículo, enquanto que a secreção tipo III irá formar a parede dos espermatóforos. Esta descrição guarda grande semelhança com outros crustáceos como na lagosta *Homarus americanus* H. Milne Edwards, 1837 descrito por Kooda-Cisco e Talbot (1982) e caranguejos (Cronin, 1947; Ryan, 1967; Hinsch, 1974; Uma e Subramoniam, 1984; Adiyodi e Anilkumar, 1988; Simeó et al., 2009). Em *R. similis* o processo de montagem e a morfologia dos espermatóforos mostram-se semelhantes a *X. kroyeri*, porém a região de montagem dos espermatóforos de *R. similis* foi identificada como MVD (Bauer e Lin, 1993). Contudo, a ultraestrutura de ambas as porções da PVD mostram diferenças, principalmente no tocante às vesículas de secreção no citoplasma das células epiteliais em relação às regiões posteriores do vaso deferente.

A MVD e a DVD mostraram o mesmo aspecto ultraestrutural que a PVD, porém, as células epiteliais somente produzem a secreção tipo II. Assim, a MVD

em *X. kroyeri* não está relacionada à formação dos espermátóforos como em *R. similis* (Bauer e Lin, 1993). Na verdade, tanto a MVD quanto a DVD têm a função de armazenar espermátóforos e produzir um só componente do fluido seminal. As únicas diferenças entre estas regiões são: I) diâmetro luminal, II) volume de secreção e espermátóforos, III) mitocôndrias e invaginações da membrana plasmática basal da célula e IV) camadas musculares. Todas estas características são acentuadas na DVD, sendo esta região particularmente mais ativa na absorção de substâncias da hemolinfa, provavelmente água e íons (Zara e Caetano, 2002), tornando o fluido seminal menos viscoso e mais diluído. A similaridade entre a MVD e DVD é descrito para vários Penaeidae. Contudo, nos Peneini *Litopenaeus* e *Farfantepenaeus* estas regiões apresentam dois dutos, o duto acessório que produz secreção livre de espermatozoides e o duto espermático (Ro et al., 1990; Bauer, 1991; Bauer e Cash, 1991; Chow et al., 1991; Fransozo et al., 2016). O duto espermático destes Peneini mostrou epitélio tipicamente secretor, os quais produzem dois tipos de secreções de diferentes eletrondensidades, uma flocular e menos eletrondensa e outra granular e mais eletrondensa, iniciando a deposição das camadas do espermátóforo (Ro et. al. 1990; Chow et al., 1991). Estas secreções apresentam sua ultraestrutura semelhante às secreções II e III, respectivamente, produzidas durante a montagem dos espermátóforos na PVD de *X. kroyeri*. Adicionalmente, nos Peneini citados anteriormente, o duto acessório também produz dois tipos de secreção, os quais serão depositados no espermátóforo somente ao final do vaso deferente (Ro et. al. 1990; Chow et al., 1991).

Em crustáceos, as características musculares como força e velocidade da contração são influenciadas pela inserção das fibras musculares e comprimento dos sarcômeros, entre outras adaptações individuais deste tecido (Chapple, 1982). A musculatura associada ao vaso deferente possui um padrão ultraestrutural apresentando feixes musculares anastomosados, com junções semelhantes a discos intercalares que indicam contrações fortes e rítmicas, as quais são necessárias quando o produto deve ser expelido com grande pressão (para revisão Junqueira e Carneiro, 2008).

A ampola de *X. kroyeri* produz secreção heterogênea e livre de espermátóforos, possivelmente com função de formar plug espermático. Em *R. similis* e em *X. kroyeri* a ampola foi descrita como uma glândula adjacente ao

vaso deferente (Bauer e Lin, 1993; Andrioli et al., capítulo 1). Ao MEV, foi observada secreção livre de espermátóforos nas extremidades das placas do tético nas fêmeas inseminadas destes Trachypeneini (Bauer e Lin, 1993; Andrioli et al., capítulo 1). Portanto, é proposto que a secreção presente na ampola destas espécies tem a função de vedação do tético das fêmeas após a inseminação, uma vez que se solidifica ao ser externalizada (Bauer e Lin, 1993). Em *Litopenaeus*, a ampola possui morfologia distinta de Trachypeneini, sendo um duto complexo com várias glândulas que se abrem no duto espermático, depositando a principal camada do espermátófo, a qual tem função adesiva (Ro et al., 1990; Chow et al., 1991; Fransozo et al., 2016).

Este trabalho trouxe informações acerca do sistema reprodutor masculino, bem como a produção de fluido seminal em *X. kroyeri*. Por meio da ultraestrutura, mostramos que em *X. kroyeri* a espermiogênese é ímpar e os espermatozoides não sofrem modificações ao longo do vaso deferente. As células do vaso deferente são secretoras, sendo a PVD com três tipos de componentes para a montagem dos espermátóforos e as outras regiões produzem um só tipo de componente. A MVD e DVD estocam os espermátóforos, sendo o fluido seminal diluído na DVD, a qual é associada à ampola, cuja função é a produção do plug espermático.

## **Agradecimentos**

Os autores agradecem à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) (#2010/50188-8 e #2016/25344-2) e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Nível Superior (CAPES) Ciências do Mar II #1989/2014-23038.004309/2014-51 pelo subsídio financeiro fornecido. Agradecimentos são devidos ao Laboratório de Microscopia Eletrônica da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal – FCAV, à Márcia F. Mataqueiro pelo suporte técnico e ao pescador Djalma Rosa pelo auxílio nas coletas.

## **Referências**

Abraham, J., Manisseri, M.K. and Sanil, N.K., 2007. Spermatogenesis and spermatozoal ultrastructure in *Metapenaeus monoceros* (Fabricius, 1798). Indian J Fish 54, 1-9.

- Adiyodi, K.G., Anilkumar, R.G., 1988. Accessory sex glands. In: Adiyodi, K.G., and Adiyodi, R.G. (Eds), *Reproductive Biology of Invertebrates*, vol. 3. John Wiley and Sons, Kerala, pp. 261-318.
- Alfaro, J., Muñoz, N., Vargas, M. and Komen, J., 2003. Induction of sperm activation in open and closed thelycum penaeid shrimps. *Aquaculture* 216, 371-381.
- Alfaro, J., Ulate, K. and Vargas, M., 2007. Sperm maturation and capacitation in the open thelycum shrimp *Litopenaeus* (Crustacea: Decapoda: Penaeoidea). *Aquaculture* 270, 436-442.
- Alfaro-Montoya, J., Braga, A., Vargas, M. and Umaña-Castro, R., 2016. Ultrastructural demonstration of the model of *Litopenaeus vannamei* (Crustacea, Penaeidae) male sexual maturation and spermatozoal capacitation. *Invertebr Reprod Dev* 61, 9-17.
- Akai, H., 1983. The structure and ultrastructure of the silk-gland. *Experientia*, 39, 443-449.
- Aungsuchawan, S., Browdy, C.L. and Withyachumnarnkul, B., 2011. Sperm capacitation of the shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Aquac Res* 42,188-195.
- Bauer, R.T., 1986. Phylogenetic trends in sperm transfer and storage complexity in decapod crustaceans. *J Crust Biol* 6, 313-325.
- Bauer, R.T., 1991. Sperm transfer and storage structures in penaeid shrimps: a functional and phylogenetic perspective. In: Bauer, R.T. and Martin, J.W. (Eds), *Crustacean Sexual Biology*. Columbia University Press, New York, pp. 183-207.
- Bauer, R.T. and Cash, C.E., 1991. Spermatophore structure and anatomy of the ejaculatory duct in *Penaeus setiferus*, *P. duorarum*, and *P. aztecus* (Crustacea: Decapoda): homologies and functional significance. *Trans Am Microsc Soc* 110, 144-162.
- Bauer, R.T. and Lin, M.J., 1993. Spermatophores and plug substance of the marine shrimp *Trachypenaeus similis* (Crustacea: Decapoda: Penaeidae): formation in the male reproductive tract and disposition in the inseminated female. *Biol Bull* 185, 174-185.
- Bell, T.A. and Lightner, D.V., 1988. A handbook of normal penaeid shrimp histology. The World Aquaculture Society, Baton Rouge.

- Braga, A.L., Nakayama, C.L., Poersch, L. and Wasielesky, W., 2013. Unistellate spermatozoa of decapods: comparative evaluation and evolution of the morphology. *Zoomorphology* 132, 261-284.
- Branco, J.O., 2005. Biologia e pesca do camarão sete-barbas *Xiphopenaeus kroyeri* (Heller) (Crustacea, Penaeidae), na Armação de Itapocoroy, Penha, Santa Catarina, Brasil. *Rev Bras Zool* 22, 1050-1062.
- Burkenroad, M.D., 1934. The Penaeidea of Louisiana, with a discussion of their world relationships. *Bull Am Museum Nat Hist* 68, 61-143.
- Camargo, T.R., Rossi, N., Castilho, A.L., Costa, R.C., Mantelatto, F.L. and Zara, F.J., 2015. Integrative analysis of sperm ultrastructure and molecular genetics supports the phylogenetic positioning of the sympatric rock shrimps *Sicyonia dorsalis* and *Sicyonia typica* (Decapoda, Sicyoniidae). *Zoomorphology* 135, 67-81.
- Camargo, T.R., Rossi, N., Castilho, A.L., Costa, R.C., Mantelatto, F.L. and Zara, F.J., 2017. Sperm ultrastructure of shrimps from the family Penaeidae (Crustacea: Dendrobranchiata) in a phylogenetic context. *Arthropod Struct Dev* 46, 588-600.
- Campos, B.R., Dumont, L.F.C., D'Incao, F. and Branco, J.O., 2009. Ovarian development and length at first maturity of the sea-bob shrimp *Xiphopenaeus kroyeri* (Heller) based on histological analysis. *Nauplius* 17, 9-12.
- Castilho, G.G., Ostrensky, A., Pie, M.R. and Boeger, W.A., 2008. Morphohistology of the male reproductive system of the mangrove land crab *Ucides cordatus* (L.) (Crustacea, Brachyura, Ocypodidae). *Acta Zoologica* 89, 157-161.
- Castro, R.H., Costa, R.C., Fransozo, A. and Mantelatto, F.L.M., 2005. Population structure of the seabob shrimp *Xiphopenaeus kroyeri* (Heller, 1862) (Crustacea, Penaeoidea) in the littoral of São Paulo, Brazil. *Sci Mar* 69, 105-112.
- Chapple, W.D., 1982. Muscle. In: Bliss, D.E. and Abele, L.G. (Eds), *The Biology of Crustacea*. Academic Press, New York, pp. 151-184.
- Chow, S., Dougherty, W.J. and Sandifer, P.A., 1991a. Unusual testicular lobe system in the white shrimps *Penaeus setiferus* (Linnaeus, 1761) and *P. vannamei* Boone, 1931 (Decapoda, Penaeidae): a new character for Dendrobranchiata? *Crustaceana* 60, 304-318.

- Chow, S., Dougherty, M.M., Dougherty, W.J. and Sandifer, P.A., 1991b. Spermatophore formation in the white shrimps *Penaeus setiferus* and *P. vannamei*. *J Crust Biol* 11, 201-216.
- Clark, W.H., Yudin, A.H., Shigekawa, K.J. and Griffin, F.J., 1986. Cellular events of fertilization in the Penaeoid *Sicyonia ingentis*. In: Thompson, M.F., Sarojini, R. and Nagabhushanam, R. (Eds), *Indian Ocean: Biology of Benthic Marine Organisms*. Oxford and IBH, New Delhi, pp. 44-149.
- Costa, R.C., Fransozo, A., Mantelatto, F.L.M. and Castro, R.H., 2000. Occurrence of shrimp species (Crustacea: Decapoda: Natantia: Penaeidea and Caridea) in Ubatuba Bay, Ubatuba, SP, Brazil. *Proc Biol Soc Washingt* 113, 776-781.
- Costa, R.C., Fransozo, A., Melo, G.A.S. and Freire, F.A.M., 2003. An illustrated key for Dendrobranchiata shrimps from the northern coast of São Paulo state, Brazil. *Biota Neotrop* 3, 1-12.
- Costa, R.C., Fransozo, A., Freire, F.A.M. and Castilho, A.L., 2007. Abundance and ecological distribution of the “sete-barbas” shrimp *Xiphopenaeus kroyeri* (Heller, 1862) (Decapoda: Penaeoidea) in three bays of the Ubatuba region, south-eastern Brazil. *Gulf Caribb Res* 19, 33-41.
- Costa, R.C., Heckler, G.S., Simões, S.M., Lopes, M. and Castilho, A.L., 2011. Seasonal variation and environmental influences in abundance of juveniles of the seabob shrimp *Xiphopenaeus kroyeri* (Heller, 1862) in southeastern Brazil. In: Pessani, D., Frogliã, C., Biaggi, E., Nurra, N., Basile, R., et al. (Eds), *Behaviour, Ecology, Fishery*. Museo Regionale di Scienze Naturali di Torino, Turin, pp. 45-56.
- Cronin, L.E., 1947. Anatomy and histology of the male reproductive system of *Callinectes sapidus*. *J Morphol* 81, 209-240.
- D’Incao, F., 1999. Subordem Dendrobranchiata (camarões marinhos). In: Buckup, L. and Buckup, G.B. (Eds), *Os crustáceos do Rio Grande do Sul*. Ed. Universidade/UFRGS, Porto Alegre, pp. 275-299.
- D’Incao, F., Valentini, H. and Rodrigues, L.F., 2002. Avaliação da pesca de camarões nas regiões Sudeste e Sul do Brasil. 1965-1999. *Atlântica* 24, 103-116.

- Dougherty, W.J. and Dougherty, M.M., 1989. Electron microscopical and histochemical observations on melanized sperm and spermatophores of pond-cultured shrimp, *Penaeus vannamei*. *J Invertebr Pathol* 54, 331-343.
- Feng, T., Patterson, B. and Johnston, S., 2017. New insights into the spermatogenesis of the black tiger prawn, *Penaeus monodon*. *J Morphol* 278, 689-703.
- Fransozo, A., Costa, R.C., Mantelatto, F.L.M., Pinheiro, M.A.A. and Santos, S., 2002. Composition and abundance of shrimp species (Penaeidae and Caridea) in Fortaleza Bay, Ubatuba, São Paulo, Brazil. In: Briones, E.E. and Alvarez, F. (Eds), *Modern Approaches to the Study of Crustacea*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, pp. 117-123.
- Fransozo, V., Fernandes, A.B., López-Greco, L.S., Zara, F.J. and Santos, D.C., 2016. Functional morphology of the male reproductive system of the white shrimp *Litopenaeus schmitti* (Burkenroad, 1936) (Crustacea, Penaeidea) compared to other *Litopenaeus*. *Invertebr Repr Dev* 60, 161-174.
- Gillett, R., 2008. *Global Study of Shrimp Fisheries*. Fisheries Technical Paper 475, Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome.
- Grier, H.J., Linton, J.R., Leatherland, J.F. and De Vlaming, V.L., 1980. Structural evidence for two different testicular types in teleost fishes. *Am J Anat* 159, 331-345.
- Hinsch, G.W. and Walker, M.H., 1974. The vas deferens of the spider crab, *Libinia emarginata*. *J Morphol* 143, 1-19.
- Hong, S., Xia, C. and Wu, W., 1999. Spermatogenesis in the shrimp *Penaeus penicillatus*. *Oceano Limno Sinica* 30, 368-373.
- Jamieson, B.G.M. and Tudge, C.C., 2000. Crustacea - Decapoda. In: Adiyodi, K.G., Adiyodi, R.G. and Jamieson, B.G.M. (Eds), *Reproductive Biology of Invertebrates. Progress in Male Gamete Ultrastructure and Phylogeny*, vol. 9C. Wiley, Chichester, pp. 1-95.
- Johnson, P.T., 1980. *Histology of the Blue Crab (Callinectes sapidus): A Model for the Decapoda*. Praeger Scientific, New York.
- Junqueira, L.C.U. and Carneiro, J., 2008. *Histologia Básica*. 11th edition. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro.
- Junqueira, L.C.U. and Junqueira, L.M.M.S., 1983. *Técnicas Básicas de Citologia e Histologia*. Santos, São Paulo.

- Kang, X., Ge, S., Guo, M., Liu, G. and Mu, S., 2008. A transmission electron microscopy investigation: The membrane complex in spermatogenesis of *Fenneropenaeus chinensis*. *Cytotechnology* 56, 113-121.
- King, J. E., 1948. A study of the reproductive organs of the common marine shrimp, *Penaeus setiferus* (Linnaeus). *Biol Bull* 94, 244-62.
- Kleve, M.G., Yudin, A.I. and Clark Jr., W.H., 1980. Fine structure of the unistellate sperm of the shrimp, *Sicyonia ingentis* (Natantia). *Tissue Cell* 12, 29-45.
- Kooda-Cisco, M.J. and Talbot, P., 1982. A structural analysis of the freshly extruded spermatophore from the lobster *Homarus americanus*. *J Morphol* 172, 193-207.
- Krol, R.M., Hawkins, W.E. and Overstreet, R.M., 1992. Reproductive components. In: Harrison, F.W. and Humes, A.G. (Eds), *Microscopic Anatomy of Invertebrates*, vol. 10, Decapoda Crustacea. Wiley-Liss Inc., New York, pp. 295-343.
- Lane, N.J., 1982. Insect intercellular junctions: their structure and development. In: King, R.C. and Akai, H. (Eds), *Insect Ultrastructure*, vol. 1. Plenum Press, New York, pp. 402-430.
- Lopes, D., Frédou, F.L., Silva, E., Calazans N. and Peixoto, S., 2017. Reproductive cycle of seabob shrimp *Xiphopenaeus kroyeri* (Crustacea, Penaeidea) from the northeast coast of Brazil. *Invertebr Reprod* 61, 137-141.
- López-Greco, L.S., 2013. Functional anatomy of the reproductive system. In: Watling, L. and Thiel, M. (Eds), *Functional Morphology and Diversity. The Natural History of the Crustacea*. Oxford University Press, Oxford, pp. 413-450.
- Ma, K.Y., Chan, T.Y. and Chu, K.H., 2009. Phylogeny of penaeoid shrimps (Decapoda: Penaeoidea) inferred from nuclear protein-coding genes. *Mol Phylogenet Evol* 53, 45-55.
- Medina, A., 1994. Spermiogenesis and sperm structure in the shrimp *Parapenaeus longirostris* (Crustacea: Dendrobranchiata): comparative aspects among decapods. *Mar Biol* 119, 449-460.
- Medina, A., Lopez de La Rosa, I., Santos, A., 1994a. Ultrastructural comparison of the spermatozoa of *Sicyonia carinata* (Sicyoniidae) and *Penaeopsis serrata* (Penaeidae) shrimps (Crustacea, Dendrobranchiata), with particular

- emphasis on the acrosomal structure. *J Submicrosc Cytol Pathol* 26, 395-403.
- Medina, A., Mourente, G., Lopez de La Rosa, I., Santos, A. and Rodriguez, A., 1994b. Spermatozoal ultrastructure of *Penaeus kerathurus* and *Penaeus japonicus* (Crustacea, Dendrobranchiata). *Zoomorphology* 114, 161-167.
- Medina, A., 1995. Spermatozoal ultrastructure in Dendrobranchiata (Crustacea, Decapoda): taxonomic and phylogenetic considerations. In: Jamieson, B.G.M., Ausio, J. and Justine, J.L. (Eds), *Advances in Spermatozoal Phylogeny and Taxonomy*, vol. 166. *Memoires Du Museum National D'Histoire Naturelle*, Paris, pp. 231-242.
- Nagao, J. and Munehara, H., 2003. Annual cycle of testicular maturation in the helmet crab *Telmessus cheiragonus*. *Fish Sci* 69, 1200-1208.
- Nakagaki, J.M. and Negreiros-Fransozo, M.L., 1998. Population biology of *Xiphopenaeus kroyeri* (Heller, 1862) (Decapoda: Penaeidae) from Ubatuba Bay, São Paulo, Brazil. *J Shellfish Res* 17, 931-935.
- Nascimento, F.A. and Zara, F.J., 2013. Development of the male reproductive system in *Callinectes ornatus* Ordway, 1863 (Brachyura: Portunidae). *Nauplius* 21, 161-177.
- Pearse, A.G.E., 1985. *Histochemistry: Theoretical and Applied*, vol 2, Ch. 16. 4th edition. Churchill Livingstone, Edinburgh.
- Pearson, P.J. and Walker, M.H., 1975. Alteration of cytochrome c oxidase activity during spermatogenesis in *Carcinus maenas*. *Cell Tiss Res* 164, 401-410.
- Pérez-Farfante, I., 1975. Spermatophores and thelyca of the American white shrimps, genus *Penaeus*, subgenus *Litopenaeus*. *Fish Bull* 73, 463-486.
- Pérez-Farfante, I., and Kensley, B., 1997. *Penaeoid and Sergestoid Shrimps and Prawns of the World. Keys and Diagnoses for the Families and Genera. Mémoires du Muséum National d'Histoire Naturelle*, Paris.
- Reynolds, E.S., 1963. The use of lead citrate at high pH as an electron-opaque stain in electron microscopy. *J Cell Biol* 17, 208-212.
- Ro, S., Talbot, P., Leung-Trujillo, J. and Lawrence, A.L., 1990. Structure and function of the vas deferens in the shrimp *Penaeus setiferus*: Segments 1-3. *J Crust Biol* 10, 455-468.
- Rodrigues, E.S., Pita, J.B., Graça-Lopes, R., Coelho, J.A. and Puzzi, A., 1993. Aspectos biológicos e pesqueiros do camarão sete-barbas (*Xiphopenaeus*

- kroyeri*) capturados pela pesca artesanal no litoral do Estado de São Paulo. Bol Inst Pesca 19, 67-81.
- Ryan, E.P., 1967. Structure and function of the reproductive system of the crab *Portunus sanguinolentus* (Hersbt) (Brachyura: Portunidae) I. The male system. Proc Sym Crust 2, 506-521.
- Shah, P., Wolf, K. and Lammerding, J., 2017. Bursting the bubble. Nuclear envelope rupture as a path to genomic instability? Trends Cell Biol 27, 546-555.
- Shigekawa, K. and Clark, W.H., 1986. Spermiogenesis in the marine shrimp, *Sicyonia ingentis*. Dev Growth Differ 28, 5-112.
- Simeó, C.G., Ribes, E. and Rotllant, G., 2009. Internal anatomy and ultrastructure of the male reproductive system of the spider crab *Maja brachydactyla* (Decapoda: Brachyura). Tissue Cell 41, 345-361.
- Smith, D.S., 1968. Insect Cells. Their Structure and Function. Oliver and Boyd, Edinburgh.
- Sobrinho, I. and García, T., 2007. Reproductive aspects of the rose shrimp *Parapenaeus longirostris* (Lucas, 1846) in the Gulf of Cadiz (southwestern Iberian Peninsula). Bol Inst Esp Oceanogr 23, 57-71.
- Sokal, R.R. and Rohlf, F.J., 1995. Biometry. Freeman and Company, New York, pp. 877.
- Subramoniam, T., 1995. Light and electron microscopic studies on the seminal secretions and the vas deferens of the penaeidean shrimp, *Sicyonia ingentis*. J Biosci 20, 691-706.
- Tudge, C.C., 2000. Spermatozal morphology and its bearing on decapod phylogeny. In: Mantin, J.W., Crandall, K.A. and Felder, D.L. (Eds), Decapoda Crustacean Phylogenetics. CRC Press, Boca Raton, pp. 101-119.
- Tuma, D.J., 1967. A description of the development of primary and secondary sexual characters in the banana prawn, *Penaeus merguensis* De Man (Crustacea: Decapoda: Penaeidae). Aust J Mar Freshw Res 18, 73-88.
- Uma, K. and Subramoniam, T., 1984. A comparative study on the spermatophore in *Scylla serrata* (Forsk.) (Decapoda: Brachyura) and *Clibanarius longitarsus* (De Haan) (Decapoda: Anomura). J Mar Biol Ass India 26, 103-108.

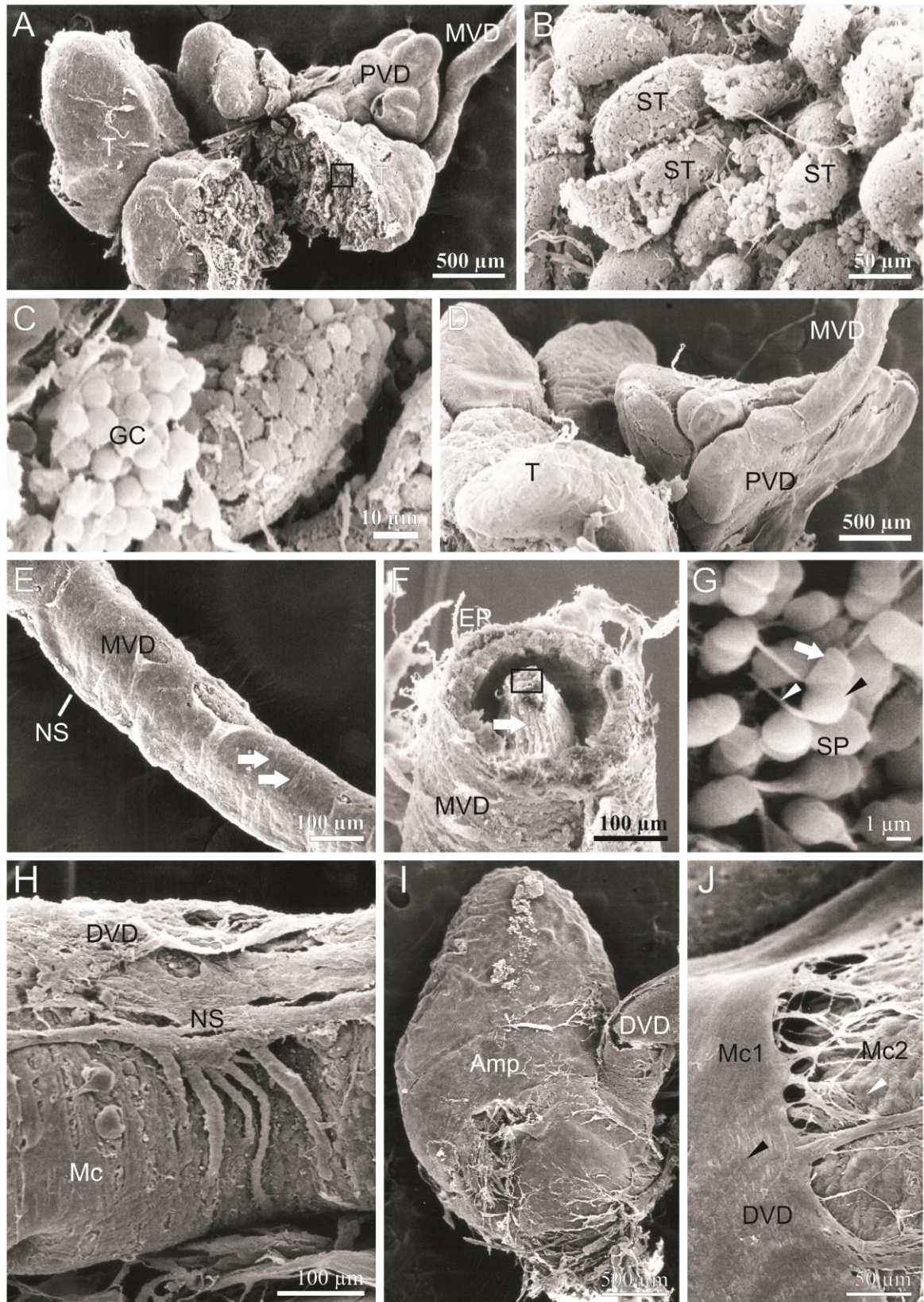
Venable, J.H., Coggeshall, R., 1965. A simplified lead citrate stain for use in electron microscopy. *J Cell Biol* 25, 407-408.

Zara, F.J., Toyama, M.H., Caetano, F.H. and López-Greco, L.S., 2012. Spermatogenesis, spermatophore, and seminal fluid production in the adult blue crab, *Callinectes danae* (Portunidae). *J Crust Biol* 32, 249-262.

# **Lista de Figuras**

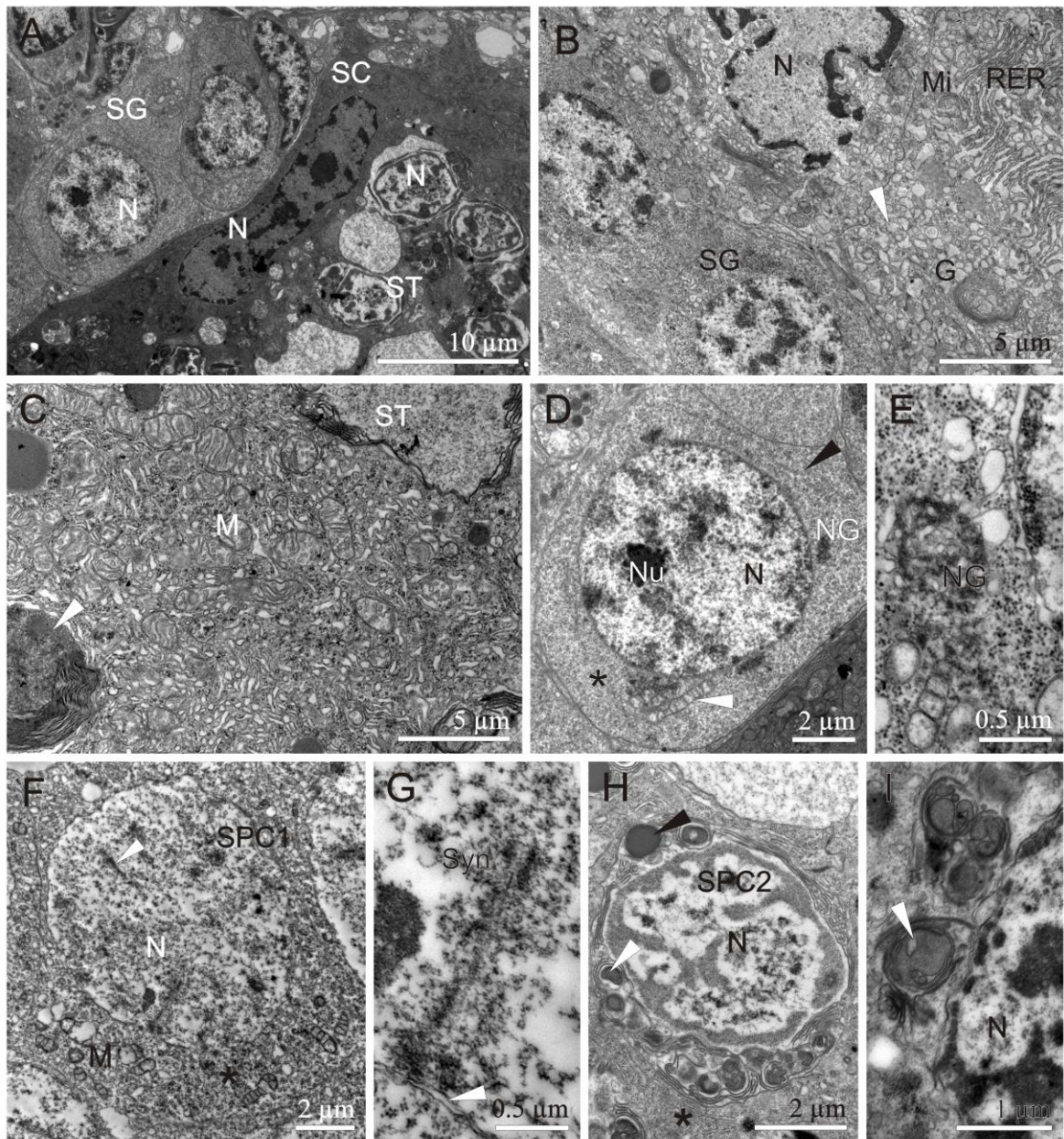
**Fig. 1.** *Xiphopenaeus kroyeri* (Heller, 1862). Ultraestrutura do sistema reprodutor masculino maduro sob microscópio eletrônico de varredura. **A.** Vista geral do sistema reprodutor masculino apresentando testículo e vaso deferente, o qual apresenta regiões proximal (PVD), média (MVD) e distal (DVD). Esta última apresenta uma glândula adjacente, a ampola. **B.** Lóbulos testiculares e vaso deferente proximal detalhando a região apresentada em C e D. **C.** Túbulos seminíferos no interior dos lóbulos testiculares caracterizando o testículo lobular. **D.** Detalhes dos lóbulos testiculares com os túbulos seminíferos apresentando células germinativas. **E.** Detalhe da PVD recoberta do tecido conjuntivo (seta branca). **F.** Região média do vaso deferente envolta por musculatura circular (setas brancas) apontando um feixe do sistema nervoso adjacente ao vaso. **G.** Corte transversal da MVD apresentando fluido seminal no lúmen (seta branca), destacando os espermatozoides presentes. **H.** Espermatozoides do interior dos espermatozoides rompidos na MVD, apresentando corpo principal alongado (cabeça de seta preta) e espinho apical longo e curvo (cabeça de seta branca). **I.** Detalhe da DVD com um gânglio do sistema nervoso associado e musculatura circular envolvendo o vaso deferente. **J.** União entre DVD e Ampola, formando o ducto ejaculatório. Note a presença de feixes nervosos associados ao vaso deferente (cabeça de seta branca). **K.** Ampola apresentando uma camada muscular externa delgada (cabeça de seta preta) e uma camada muscular interna espessa e circular (cabeça seta branca). Legenda: Amp = ampola; EP = epitélio; GC = células germinativas; Mc = musculatura; NS = sistema nervoso; SP = espermatozoides; ST = túbulos seminíferos; T = testículo.

**Figura 1.**



**Fig. 2.** *Xiphopenaeus kroyeri* (Heller, 1862). Ultraestrutura do testículo e espermatogênese. **A.** Vista geral do túbulo seminífero mostrando a zona periférica contendo espermatogônias e zona central contendo células germinativas em maturação. **B.** Detalhe do citoplasma arborescente das células acessórias (Sertoli) associadas às espermatogônias, apresentando complexo de Golgi e retículo endoplasmático rugoso bem desenvolvidos, mitocôndrias e muitas vesículas de eletron densidades variadas (cabeça de seta branca). **C.** Vista geral das células de Sertoli associadas as espermátides, as quais apresentam muitos corpos residuais no citoplasma (cabeça de seta branca). **D.** Espermatogônia apresentando núcleo arredondado com nucléolo evidente. Mitocôndrias alongadas (cabeça de seta branca), polirribossomos (asterisco), retículo endoplasmático rugoso (cabeça de seta preta) e grânulos eletron densos periféricos ao núcleo (*Nuages*) são observados no citoplasma. **E.** Detalhe de uma *Nuage* próximo ao núcleo da espermatogônia. **F.** Espermatócito primário em zigóteno apresentando complexos sinaptonêmicos (cabeça de seta branca). O citoplasma apresenta mitocôndrias e polirribossomos (asterisco). **G.** Detalhe do complexo sinaptonêmico ancorado no envoltório nuclear (cabeça de seta branca). **H.** Espermatócito secundário apresentando cromatina condensada na periferia do núcleo. Poucas cisternas de retículo endoplasmático (asterisco), mitocôndrias com sinais de degeneração (cabeça de seta branca) e algumas gotas de lipídeos (cabeça de seta preta) são observadas no citoplasma espermatócito secundário. **I.** Detalhe das mitocôndrias com sinais de degeneração no citoplasma dos. Legenda: G = complexo de Golgi; M = mitocôndria; N = núcleo; NG = *Nuage*, Nu = nucléolo; RER = retículo endoplasmático rugoso; SC = célula de Sertoli; SG = espermatogônia; SPC1 = espermatócito primário; SPC2 = espermatócito secundário; ST = espermátide; Syn = complexo sinaptonêmico.

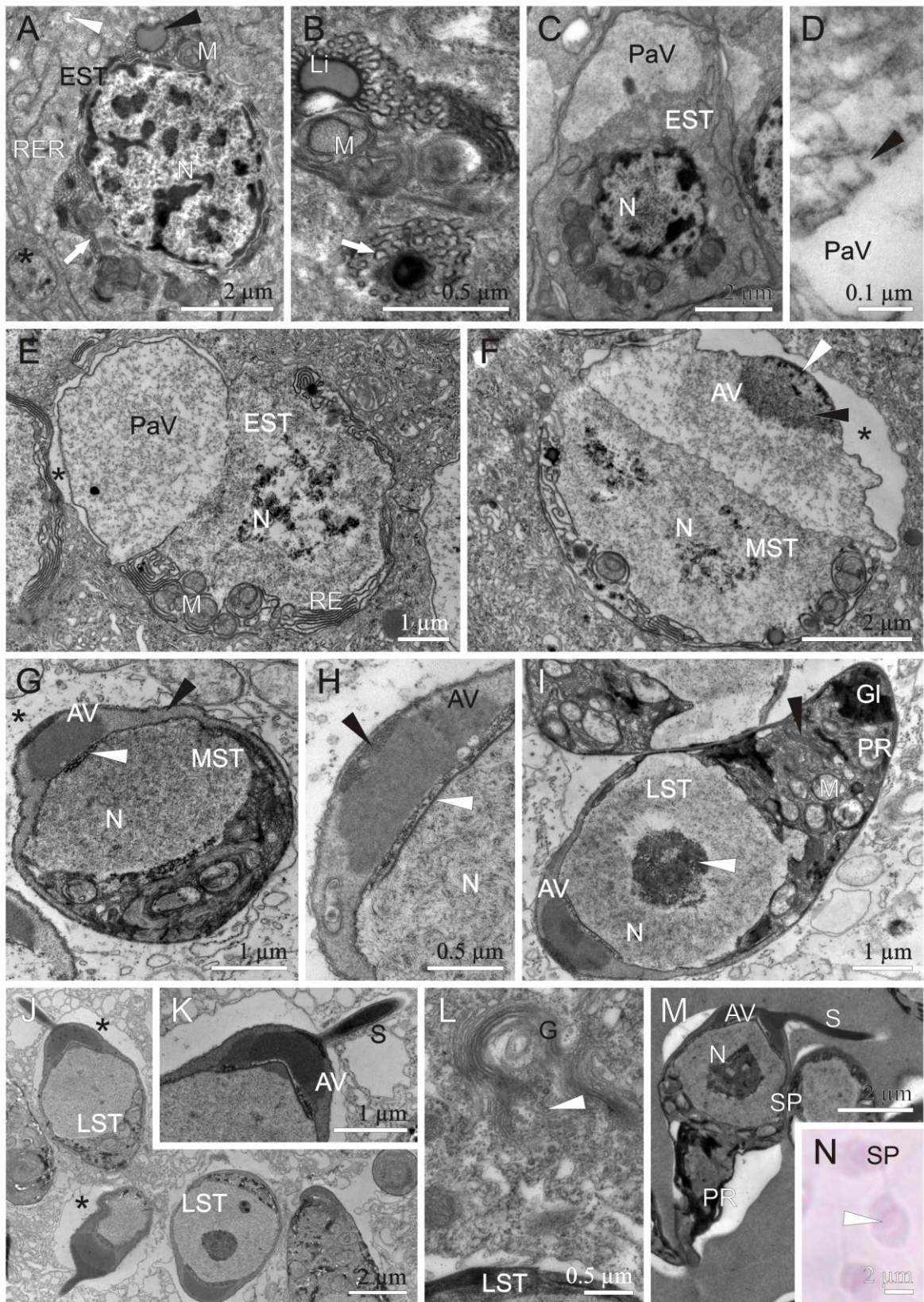
**Figura 2.**



**Fig. 3.** *Xiphopenaeus kroyeri* (Heller, 1862). Ultraestrutura das células germinativas em espermiogênese. **A.** Espermátides iniciais mostrando cromatina principalmente condensada na periferia do núcleo, com alguns grumos centrais. Complexos de Golgi (seta branca), retículo endoplasmático rugoso, muitas vesículas (cabeça de seta branca), gotas de lipídeos (cabeça de seta preta) e mitocôndrias são presentes no citoplasma. Note os corpos residuais nas células de Sertoli adjacentes. **B.** Detalhe das mitocôndrias de aspecto degenerado presentes no citoplasma das espermátides iniciais. **C.** Espermátides iniciais mostrando a formação da vesícula proacrossomal (PaV) de material finamente granular. **D.** Detalhe de vesículas liberadas pelo complexo de Golgi fundindo-se a membrana da PaV (cabeça de seta preta). **E.** Estágio avançado da espermátide inicial demonstrando desaparecimento do envoltório nuclear e a cromatina descondensada de aspecto granular. Note a formação de uma vesícula eletrólúcida recobrimdo todo o pólo da PaV (asterisco). **F.** Espermátide intermediária com cromatina granular e grumos heterocromáticos centrais com ausência de envoltório nuclear. Nota-se o início de deposição de um material eletrondenso fino (cabeça de seta preta) e outro eletrondenso granular (cabeça de seta branca) compondo a vesícula acrossomal (AV) em forma de domo. A vesícula eletrólúcida torna-se mais espessa (asterisco). **G.** Estágio avançado da espermátide intermediária evidenciando o reaparecimento do envoltório nuclear, e a AV tornando-se mais espessa recobrimdo o núcleo (cabeça de seta preta), formando o capuz acrossomal. Nota-se o início da formação de uma placa eletrondensa em contato com o envoltório nuclear e o capuz acrossomal (cabeça de seta branca). **H.** Detalhe da espermátide intermediária mostrando o material eletrondenso granular da AV, iniciando a formação do espinho (cabeça de seta preta) e a formação da placa eletrondensa sob o capuz acrossomal (cabeça de seta branca). **I.** Espermátide tardia apresentando uma região citoplasmática alongada contendo membranas paralelas (cabeça de seta preta), mitocôndrias e grânulos de glicogênio. Nota-se o surgimento de um grânulo heterocromático no núcleo (cabeça de seta branca). **J.** Espermátides tardias associadas as células de Sertoli, com a formação da vesícula eletrólúcida começando pela região da AV e podendo se estender por todo o entorno da espermátide tardia (asterisco). **K.** Detalhe da AV de uma espermátide tardia mostrando a formação do espinho eletrondenso. **L.** Detalhe do citoplasma das células de Sertoli apresentando

complexo de Golgi liberando pequenas vesículas (cabeça de seta branca) as quais irão se fundir com a vesícula de material eletrôn-lúcido. **M.** Espermatozoide imerso em secreção apresentando prolongamento posterior e espinho apical e curvo. **N.** Grânulo heterocromático central ao núcleo dos espermatozoides mostrando reação positiva para DNA (seta branca) [Feulgen]. Legenda: EST = espermátide inicial; G = complexo de Golgi; GI = grânulos de glicogênio; HE = hematoxilina e eosina; Li = gota de lipídio; LST = espermátide final; M = mitocôndria; MST = espermátide intermediária; N = núcleo; PaV = vesícula proacrossomal; PR = prolongamento posterior; RER = retículo endoplasmático rugoso; S = espinho; SP = espermatozoide.

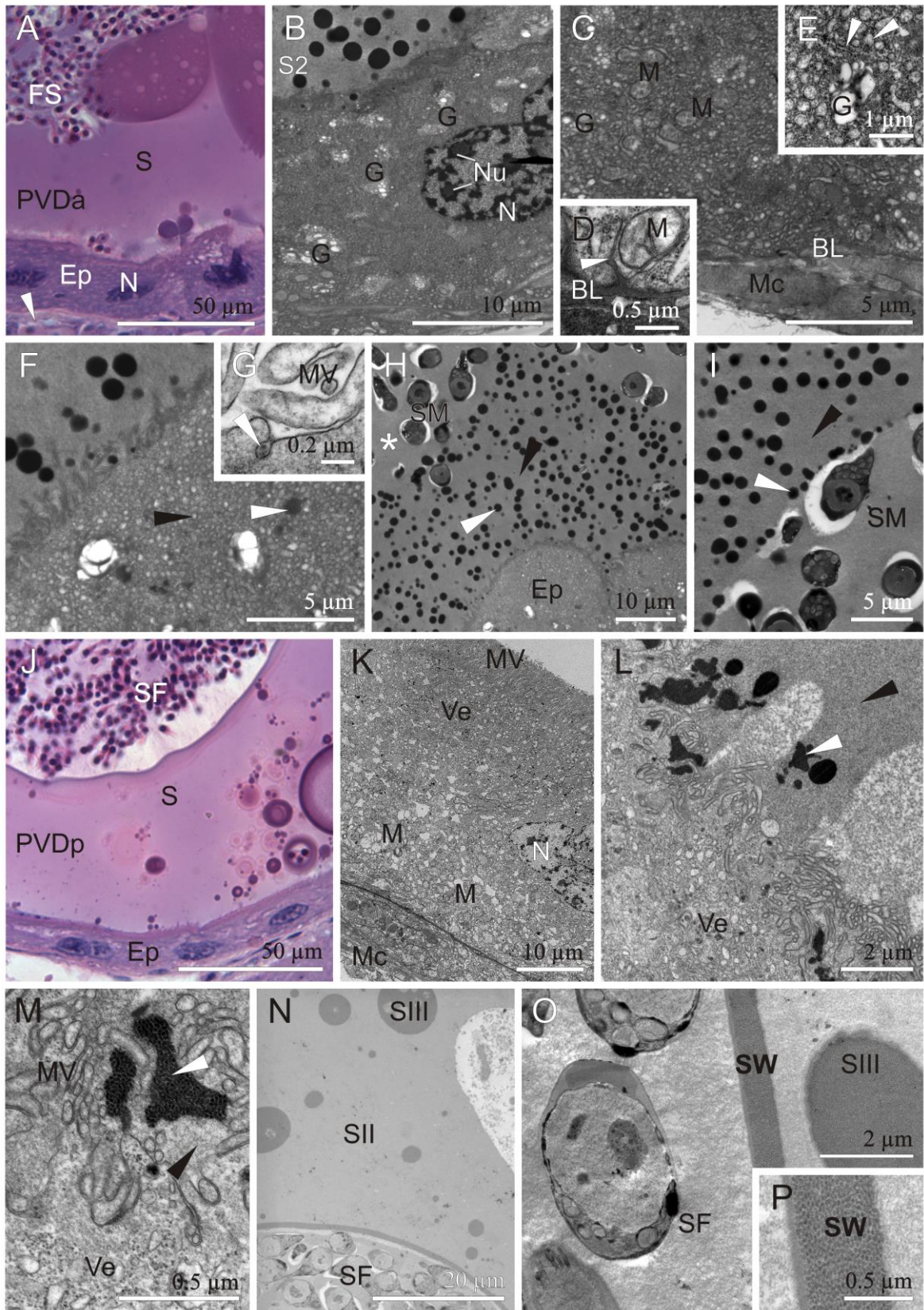
**Figura 3.**



**Fig. 4.** *Xiphopenaeus kroyeri* (Heller, 1862). Ultraestrutura da região proximal vaso deferente. **A - I.** Porção anterior da região proximal do vaso deferente (PVDa). **A.** Vista geral da PVDa apresentando epitélio simples e basófilo com núcleos basais, envolto por uma delgada camada muscular (cabeça de seta branca) e espermatozoides livres imersos em secreção no lúmen [HE]. **B.** Vista geral do epitélio da PVDa mostrando núcleo com nucléolo evidente e citoplasma contendo complexo de Golgi vesiculares. **C.** Pólo basal das células epiteliais da PVDa contendo mitocôndrias e camada muscular recobrando o vaso. **D.** Detalhe do pólo basal evidenciando lâmina basal delgada, invaginações da membrana plasmática (cabeça de seta branca), onde encontram-se mitocôndrias. **E.** Citoplasma das células epiteliais contendo complexo de Golgi e retículo endoplasmático rugoso organizado em cisternas paralelas ou vesículas (cabeças de seta brancas). **F.** Pólo apical com pequenas vesículas de material menos eletrondenso e mais abundante (cabeça de seta preta) e vesículas maiores e menos abundantes de material mais eletrondenso (cabeça de seta branca). **G.** Membrana plasmática apical mostrando mecanismo exocítico (cabeça de seta branca) entre as microvilosidades. **H.** Detalhe do lúmen da PVDa mostrando espermatozoides imersos em secreção I proveniente do testículo (asterisco) e liberação por exocitose das secreções II menos eletrondensa (cabeça de seta preta) e III mais eletrondensa (cabeça de seta branca). **I.** Detalhe das secreções luminiais mostrando a secreção II (cabeça de seta preta) separando os espermatozoides em massas espermáticas e a secreção III (cabeça de seta branca) acumulando-se entre as secreções I (asterisco) e II. **J - P.** Porção posterior da região proximal do vaso deferente (PVDp). **J.** Vista geral da PVDp com epitélio pavimentoso e espermatóforos imersos em secreção no lúmen [HE]. **K.** Camada muscular da PVDp, sobre a qual apoiam-se células epiteliais com mitocôndrias no pólo basal e pequenas vesículas de secreção no pólo apical. **L.** Polo apical do epitélio demonstrando liberação das secreções II (cabeça de seta preta) e III (cabeça de seta branca). **M.** Detalhe das secreções II com aspecto finamente granular (cabeça de seta preta), e secreção III eletrondensa com aspecto granular (cabeça de seta branca). **N.** Lúmen da PVDp mostrando grumos de secreção tipo III imersos em secreção do tipo II. **O.** Espermatóforo formado revestido por parede acelular. **P.** Detalhe da secreção do tipo III como principal componente da parede do espermatóforo, eletrondensa e granular. Legenda: BL =

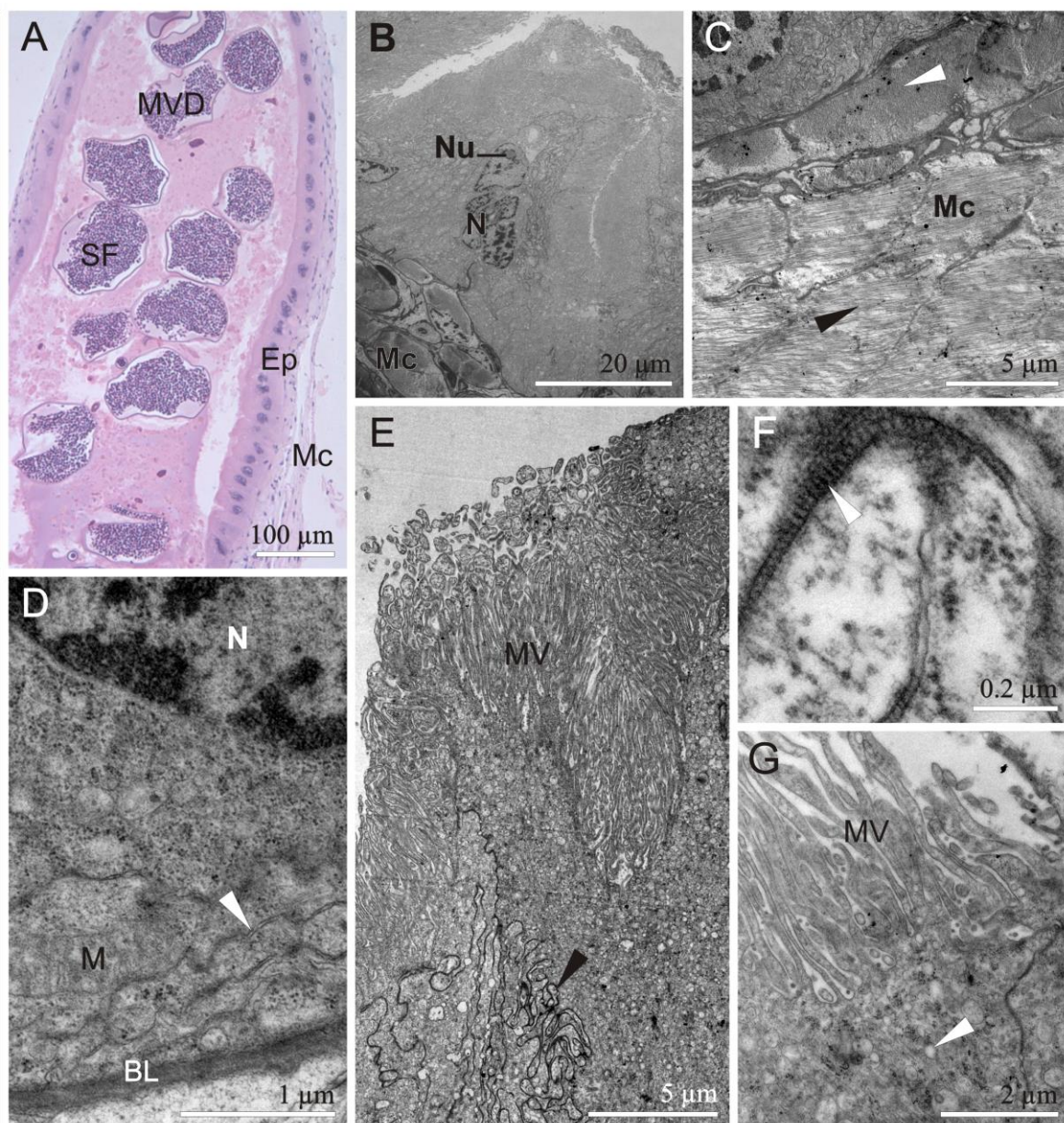
lamina basal; Ep = epitélio; FS = espermatozoides livres; G = complexo de Golgi; HE = hematoxilina e eosina; M = mitocôndria; Mc = camada muscular; MV = microvilosidades; N = núcleo; Nu = nucléolo; S = secreção; SF = espermatóforo; SII = secreção do tipo II; SIII = secreção do tipo III; SM = massa espermática; Sp = espermatozoides; SW = parede do espermatóforo; Ve = vesículas.

Figura 4.



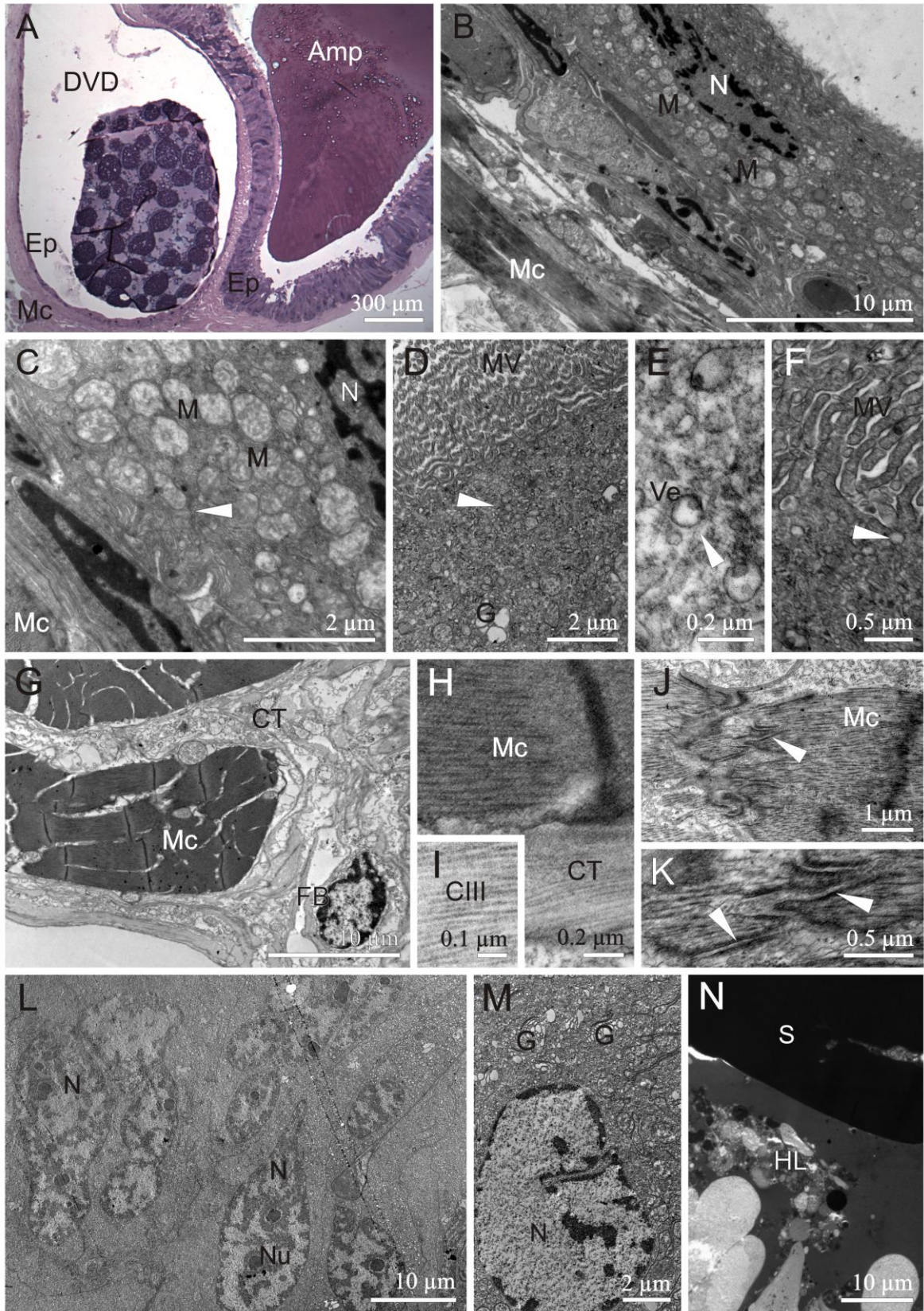
**Fig. 5.** *Xiphopenaeus kroyeri* (Heller, 1862). Ultraestrutura da região média do vaso deferente (MVD). **A.** Vista geral da MVD, com epitélio colunar simples e espermátóforos imersos em secreção acidófila no lúmen [HE]. **B.** Detalhe de uma célula epitelial de MVD com núcleos irregulares no pólo basal e nucléolo evidente. O pólo apical da célula é bem desenvolvido **C.** Detalhe das camadas musculares da MVD, sendo a interna oblíqua (cabeça de seta branca) e a mais externa longitudinal em relação ao vaso (cabeça de seta preta). **D.** Pólo basal das células epiteliais com delgada lamina basal e mitocôndrias entre as invaginações da membrana plasmática (cabeça de seta branca). **E.** Células epiteliais unidas lateralmente por acentuadas interdigitações (cabeça de seta preta). **F.** Detalhe das interdigitações mostrando junções septadas (cabeça de seta branca). **G.** Pólo apical das células epiteliais apresentando somente vesículas de secreção do tipo I. Legenda: Ep = epitélio; HE = hematoxilina e eosina; N= núcleo; Nu = nucléolo; M = mitocôndria; Mc = camada muscular; MV = microvilosidades; SF = espermátóforo; Sp = espermatozoide;.

**Figura 5.**



**Fig. 6.** *Xiphopenaeus kroyeri* (Heller, 1862). Ultraestrutura da região distal do vaso deferente e da ampola. **A - F.** Região distal do vaso deferente. **A.** Vista geral do ducto ejaculatório formado pela união da região distal do vaso deferente (DVD) e ampola [HE]. **B.** Vista geral do epitélio pavimentoso delgado da DVD apresentando núcleo achatado, e envolto por uma camada muscular mais espessa. **C.** Detalhe do pólo basal das células epiteliais contendo muitas mitocôndrias entre as invaginações da membrana plasmática (cabeça de seta branca). **D.** Pólo apical das células epiteliais mostrando complexos de Golgi e pequenas vesículas de secreção de baixa eletrondensidade (cabeça de seta branca). **E.** Detalhe do citoplasma apical demonstrando vesículas de secreção tipo I com materiais de eletrondensidades variadas. Note que tais vesículas estão associadas a microtúbulos (cabeça de seta branca) **F.** Detalhe do mecanismo merócrino (cabeça de seta branca), liberando secreções entre as microvilosidades. **A, G - N.** Ampola. **G.** Região periférica da ampola com muitos pacotes de fibras musculares e tecido conjuntivo entre eles. **H.** O tecido conjuntivo é rico em fibras colágenas. **I.** Detalhe das delgadas fibras colágenas características do tipo III. **J.** As fibras musculares são conectadas entre si por um padrão ultraestrutural semelhante ao disco intercalar. **K.** Detalhes das conexões entre as fibras musculares apresentando desmossomos (cabeça de seta branca). **L.** Vista geral do epitélio estratificado secretor da ampola. **M.** Célula epitelial com complexos de Golgi lamelares. **N.** Detalhe do mecanismo holócrino de secreção e lúmen da ampola contendo secreção eletrondensa. Legenda: Amp = ampola; CIII = colágeno tipo III; CT = tecido conjuntivo; DVD = região distal do vaso deferente; Ep = epitélio; FB = fibroblasto; G = complexo de Golgi; HE = hematoxilina e eosina; HL = secreção holócrina; M = mitocôndria; Mc = camadas musculares; MV = microvilosidades; N = núcleo; Nu = nucléolo; S = secreção; SF = espermátóforo; Ve = vesículas.

Figura 6.



## Considerações finais

Esta dissertação abordou aspectos reprodutivos do camarão *Xiphopenaeus kroyeri* (Heller, 1862) e sua relação com a maturidade morfológica e a fisiológica. Desta forma, trouxe informações mais detalhadas destes importantes parâmetros, os quais são essenciais para elaboração de medidas que preservem esta espécie que é um importante recurso pesqueiro. Como ferramenta principal, o sistema reprodutor de *X. kroyeri* foi descrito em seu aspecto histológico e ultraestrutural, bem como os processos de espermatogênese e espermiogênese. Foi concluído neste trabalho que a maturidade morfológica, identificada pela presença de petasma, ocorre antes da maturidade fisiológica, determinada pela observação de espermatozoides e espermatóforos no lúmen do sistema reprodutor masculino. A ampola produz secreção voltada à formação de plug espermático e não contém espermatóforos, portanto a observação macroscópica da ampola pela carapaça mostra-se um parâmetro não seguro para a identificação da maturidade sexual fisiológica desta espécie. Adicionalmente, a morfologia do sistema reprodutor masculino e a produção de espermatóforos são semelhante à *Rimapenaeus similis* (Smith, 1885), o único integrante de sua tribo com sistema reprodutor descrito histologicamente.

A espermiogênese de *X. kroyeri* descrita em seu aspecto ultraestrutural mostrou-se ímpar entre os Penaidae Rafinesque, 1815 e que os espermatozoides não sofrem modificações dentro do sistema reprodutor masculino após a espermiogênese nos túbulos seminíferos. O epitélio do vaso deferente é tipicamente secretor, com a região proximal do vaso deferente com três tipos de componentes durante a montagem dos espermatóforos, e a as regiões média e posterior do vaso deferente produzem somente um tipo de componente. Estas últimas regiões do vaso deferente estocam os espermatóforos, sendo que a região distal do vaso deferente é responsável por diluir o fluido seminal. As informações obtidas nesta dissertação complementam o conhecimento acerca da biologia reprodutiva dos camarões peneídeos, servindo de base para estudo futuros de biologia reprodutiva, pesca e carcinicultura desta espécie.