

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP
CENTRO DE AQUICULTURA DA UNESP

**DINÂMICA E IMUNO-HISTOQUÍMICA DA
VITELOGÊNESE DURANTE O PROCESSO DE
MATURAÇÃO OVARIANA NO CAMARÃO
Xiphopenaeus kroyeri (Heller, 1862)**

Tiago Henrique Rodrigues Siebert
Biólogo

Jaboticabal, SP
2015

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP
CENTRO DE AQUICULTURA DA UNESP

**DINÂMICA E IMUNO-HISTOQUÍMICA DA
VITELOGÊNESE DURANTE O PROCESSO DE
MATURAÇÃO OVARIANA NO CAMARÃO**
Xiphopenaeus kroyeri (Heller, 1862)

Tiago Henrique Rodrigues Siebert

Orientadora: Prof^a Dr^a Irene Bastos Franceschini Vicentini

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

Jaboticabal, SP

2015

Siebert, Tiago Henrique Rodrigues
S571d Dinâmica e imuno-histoquímica da vitelogênese durante o processo de maturação ovariana no camarão *Xiphopenaeus kroyeri* (Heller, 1862) / Tiago Henrique Rodrigues Siebert. – – Jaboticabal, 2015
ix, 99 f. : il.; 28 cm

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Centro de Aquicultura, 2015

Orientadora: Irene Bastos Franceschini Vicentini

Banca examinadora: Bruno César Schimming, Fernanda Antunes Alves da Costa, Luciene Patrici Papa, Maria Terezinha Siqueira Bombonato

Bibliografia

1. *Xiphopenaeus kroyeri*. 2. Ovário. 3. Oócito. 4. Hepatopâncreas. 5. Vitelogenina. I. Título. II. Jaboticabal-Centro de Aquicultura.

CDU 639.512

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO: DINÂMICA IMUNOHISTOQUÍMICA DA VITELOGÊNESE DURANTE O PROCESSO DE MATURAÇÃO OVARIANO NO CAMARÃO *Xiphopenaeus kroyeri* (Heller, 1862)

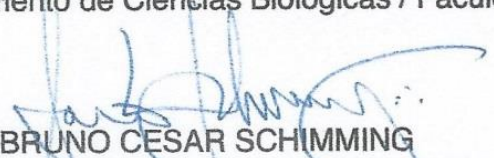
AUTOR: TIAGO HENRIQUE RODRIGUES SIEBERT

ORIENTADORA: Profa. Dra. IRENE BASTOS FRANCESCHINI VICENTINI

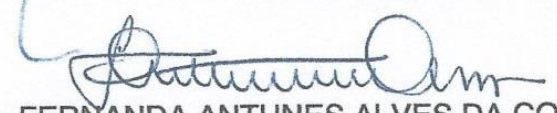
Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de Doutor em Aquicultura , pela Comissão Examinadora:


Profa. Dra. IRENE BASTOS FRANCESCHINI VICENTINI

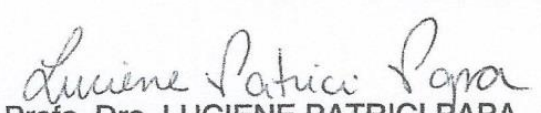
Departamento de Ciências Biológicas / Faculdade de Ciências de Bauru


Prof. Dr. BRUNO CESAR SCHIMMING

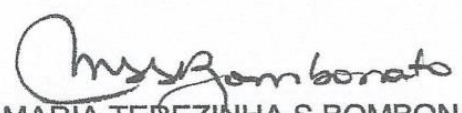
Departamento de Anatomia / Instituto de Biociências de Botucatu


Profa. Dra. FERNANDA ANTUNES ALVES DA COSTA

Universidade Paulista, Instituto de Ciências da Saúde, Bauru-SP


Profa. Dra. LUCIENE PATRICI PAPA

Departamento de Anatomia / Faculdade Sudoeste Paulista


Profa. Dra. MARIA TEREZINHA S BOMBONATO

Departamento de Ciências Biológicas / Faculdade de Ciências de Bauru

Data da realização: 30 de setembro de 2015.

ATESTADO DE APROVAÇÃO - DEFESA

ATESTAMOS que **TIAGO HENRIQUE RODRIGUES SIEBERT**, RG 43.602.985-6 SSPSP, defendeu, no dia 30/09/2015, a tese intitulada "DINÂMICA IMUNOHISTOQUÍMICA DA VITELOGÊNESE DURANTE O PROCESSO DE MATURAÇÃO OVARIANO NO CAMARÃO *Xiphopenaeus kroyeri* (Heller, 1862)", junto ao Programa de Pós-graduação em AQUICULTURA, tendo sido "APROVADO".

Atestamos ainda que a obtenção do título dependerá de homologação pelo Órgão Colegiado competente.



Jaboticabal, 30 de setembro de 2015.

“O sucesso nasce do querer, da determinação e persistência em se chegar a um objetivo. Mesmo não atingindo o alvo, quem busca e vence obstáculos, no mínimo fará coisas admiráveis.”

José de Alencar

Agradecimentos

O desenvolvimento e concretização deste trabalho só puderam ser possíveis graças ao apoio de diversas pessoas e Instituições. A elas, dedico meus agradecimentos e reconhecimento.

As Instituições

A Universidade Estadual Paulista – UNESP, como centro de excelência em pesquisa e na formação de recursos humanos, por fornecer a minha formação profissional.

Ao Centro de Aquicultura da UNESP (CAUNESP) – Campus de Jaboticabal, pela oportunidade de realizar o curso de Mestrado em Aquicultura e Biologia Aquática e pela confiança no meu trabalho para realizar o curso de Doutorado em Aquicultura e Biologia Aquática.

A Faculdade de Ciências da UNESP (FC) – Campus de Bauru, pela minha Graduação em Ciências Biológicas.

Ao Departamento de Ciências Biológicas da UNESP – Campus de Bauru, onde ingressei em 2006 como graduando e, em 2011 e 2012 pude realizar Estágio Docência na Graduação nas disciplinas de Histologia e Embriologia Comparada.

Ao Laboratório de Morfologia de Organismos Aquáticos (LAMO) da UNESP – Campus de Bauru por todo apoio técnico desde minha Iniciação Científica (2008) até hoje.

Ao Laboratório de Biologia de Camarões Marinhos e de Água Doce (LABCAM) da UNESP – Campus de Bauru, pela parceria no desenvolvimento do presente trabalho e no apoio técnico das coletas do material biológico.

Ao Núcleo em Ecologia e Desenvolvimento Sócio Ambiental de Macaé (NUPEM) da Universidade Federal de Rio de Janeiro (UFRJ), por fornecer suporte técnico de laboratórios e alojamentos durante as coletas.

Ao SISBIO/IBAMA por conceder a licença na área estudada.

A Agência de fomento CNPq - Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (março de 2013 a setembro de 2015) - processo 140453/2013-0, pelas bolsas concedidas durante o desenvolvimento deste trabalho.

A família

Especialmente a meus pais, Leopoldo e Maria, que sempre acreditaram em mim e me forneceram todas as bases necessárias para que eu pudesse seguir o meu caminho. Sem eles, nada disso existiria! Agradeço também aos meus irmãos Fernanda e André, ao cunhado Jorge e Andreza, que sempre estiveram presentes em minha vida, em todos os momentos. Aos meus queridos sobrinhos Francisco, Antônio e Matheus que já partilham de minhas alegrias.

Aos meus sogros Valdir e Fernanda, e minha cunhadinha Pollyanna, pelo apoio, torcida e pelos momentos juntos.

Em especial ao meu amor Paloma, pela amizade, companheirismo e carinho dedicados nesses 8 anos e três meses, pelo 1 ano de casamento, no qual fortalecemos nossos laços e selamos um compromisso de vida. Durante todos esses anos ao seu lado compartilhando de momentos felizes e momentos tristes, você sempre incentivando meus trabalhos e compreendendo as dificuldades nos momentos de rispidez. Espero compartilhar de muitos momentos ao seu lado. TE AMO.

In Memoriam

Aos meus queridos avós maternos Olga e Pascoal e paternos Angelina e Laurival pela base da família, por todo o carinho que compartilhamos; eu entrei na universidade com todos vocês presentes e no ano passado eu perdi a última avó (Angelina), hoje termino um ciclo acadêmico sem poder abraça-los, mas desejo que todos vocês estejam em paz onde estiverem e dedico este trabalho a vocês.

Aos Professores

A todos os mestres que passaram pela minha vida, que doaram seus conhecimentos que formaram minhas bases acadêmica, cultural e social.

Ao meu Orientador de Iniciação Científica Prof. Dr. Carlos Alberto Vicentini, pela paciência e dedicação nos primeiros passos de minha carreira acadêmica.

Ao meu Co-orientador de mestrado Prof. Dr. Rogerio Caetano da Costa pelo apoio no desenvolvimento deste trabalho.

A banca examinadora de qualificação, Profa. Dra. Maria Terezinha Siqueira Bomboto, Prof. Dr. Reginaldo José Donatelli e Profa. Dra. Irene Bastos Franceschini Vicentini, pelas sugestões e críticas enriquecendo esse trabalho.

Aos membros da banca examinadora de defesa, Profa. Dra. Maria Terezinha Siqueira Bomboto, Prof. Dr. Bruno César Schimming, Profa. Dra. Fernanda Antunes Alves da Costa, Profa. Dra. Luciene Patrici Papa e Prof. Dra. Irene Bastos Franceschini Vicentini, pela paciência, dedicação e sugestões na análise deste trabalho.

Em especial a minha Orientadora de mestrado e doutorado Prof. Dra. Irene Bastos Franceschini Vicentini, pela oportunidade de trabalharmos juntos e desenvolvermos esta pesquisa, pela amizade, conselhos e dedicação empenhada na minha formação, meu sincero respeito, admiração e confiança.

Aos Amigos

Aos meus queridos amigos: Carol e André, Carlos e Selma, Julia e Daniel, Leandro e Marcos, Kathleen e Rafa, Polly, Danilo e Jaque, Cristiano, Dri, Moises e Lidi. Aos amigos do Cursinho Primeiro de Maio, de Rio Claro, São Carlos, Sorocaba, São Paulo, enfim de todos os lugares. A vocês, meu muito obrigado pela torcida e por se manterem presentes em minha vida, compartilhando alegrias, tristezas, inseguranças, vitórias e por fazer meus dias mais felizes. Um agradecimento especial ao grande amigo e companheiro de trabalhos acadêmicos e aleatórios Abner Carvalho Batista, pelo compartilhamento de ansiedades, inseguranças e conquistas, e a grande ajuda na realização das coletas.

Aos amigos de trabalho, em todas escolas que leciono sempre existem pessoas especiais, valeu Well Nascimento, Mari, Keyla, Nayara, Gu, Vini, Geraldo, Marcos, Edy, Hugo, Bia, Renata, e tantos outros que deram apoio ao meu trabalho.

*Aos meus **queridos alunos e ex-alunos** TODOS VOCÊS são muito importantes, obrigado por tudo!*

Aos amigos de Graduação e Pós-graduação, pela amizade e companhia.

*Aos amigos do LAMOA, **Claudemir, Renata, Ricardo, Rafaela, Val, Elsie (Lê), Marioso, Renata Y. e Giovana** e todos que compartilharam desse momento, em especial a **Janaina** companheira de Graduação e Pós-Graduação, por toda ajuda, dedicação e torcida em todos esses anos de pesquisas e amizade.*

*Aos amigos do LABCAM, em especial ao **Abner, João, Thiago (Chuck Norris)** por ajudarem com as coletas.*

*A amiga **Karen** pela ajuda com a técnica de imuno-histoquímica.*

*Ao amigo **Wagner** do NUPEM/UFRJ pela ajuda na intermediação com os professores para uso dos laboratórios de pesquisa, as conversas e compartilhamento de experiências.*

*Ao amigo e técnico **Antônio Carlos do Amaral** por todo suporte técnico no LAMOA.*

*Ao pescador **Antônio José da Silva Riscado (Ball)** pela competência e conhecimento prático no suporte para realização das coletas.*

*A todos os servidores da UNESP, em especial a **Veralice e David** da secretaria de Pós-graduação.*

*A todos que de alguma forma contribuíram, direta ou indiretamente, para a concretização de mais esta fase, **MUITO OBRIGADO!***

Apoio Financeiro

A Agência de fomento CNPq - Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (março de 2013 a setembro de 2015) - processo 140453/2013-0, pela bolsa concedida durante o desenvolvimento deste trabalho.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	i
LISTA DE TABELAS.....	iv
LISTA DE ESPÉCIES CITADAS.....	v
RESUMO.....	vi
ABSTRACT.....	viii
1. INTRODUÇÃO.....	23
1.1. Atividade pesqueira.....	24
1.2. Biologia da espécie.....	25
1.3. Ciclo reprodutivo dos crustáceos.....	26
1.4. Vitelogênese.....	27
1.5. Justificativa.....	29
2. OBJETIVOS.....	30
3. METODOLOGIA.....	32
3.1. Material de estudo.....	33
3.2. Índices gonadosossomático (IGS) e hepatossomático (IHS).....	35
3.3. Análises de microscopia de luz para Histologia.....	35
3.4. Análises de microscopia de luz para Histoquímica.....	36
3.5. Imuno-histoquímica.....	36
4. RESULTADOS.....	38
4.1. Ovário.....	39
4.1.1. Resultados macroscópicos.....	39
4.1.2. Resultados microscópicos.....	41
4.1.3. Histoquímica.....	46
4.2. Hepatopâncreas.....	48
4.2.1. Morfologia geral do hepatopâncreas.....	48
4.2.2. Morfologia do hepatopâncreas nos diferentes estágios de maturação ovariana.....	50
4.3. Imuno-histoquímica.....	58
4.3.1. Ovário.....	58

4.3.2. Hepatopâncreas.....	62
4.4. Índices gonadosomático (IGS) e hepatossomático (IHS).....	68
5. DISCUSSÃO.....	71
5.1. Análise da estrutura ovariana.....	72
5.2. Hepatopâncreas.....	80
5.3. Vitelogênese.....	82
6. CONCLUSÕES.....	87
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	89
ANEXO.....	98

LISTA DE FIGURAS

- Fig. 1:** Fotografias do barco de pesca comercial utilizado para coletar o material biológico. **A:** rede tipo “otter-trawl” antes do arrasto; **B:** barco realizando o arrasto, redes arrastadas (setas); **C:** rede recolhida contendo material biológico; e **D:** triagem do camarão *Xiphopenaeus kroyeri*. 34
- Fig. 2:** Estádios de maturação ovariana de *Xiphopenaeus kroyeri*. a - IM: imaturo, seta ovário; b – PM: pré-maturação, seta ovário; c - MI: maturação inicial, setas ovário; d - MA: maturação avançada, setas ovário; e - M: maduro, setas ovário. Barra 1cm..... 40
- Fig. 3:** Fotomicrografia do ovário pré-maturo de *Xiphopenaeus kroyeri*, evidenciando a túnica de tecido conjuntivo frouxo (setas), a região da medula (M) (oogônias) e região do córtex (C) (oócitos em diferentes fases de desenvolvimento). Hematoxilina/Eosina..... 41
- Fig. 4:** Fotomicrografias do ovário de *Xiphopenaeus kroyeri* em diferentes fases de maturação: a – IM; b – PM; c – MI; d – MA; e – M: Oogônias 1 (Oog 1), Oogônias 2 (Oog 2) oócitos pré-vitelogênicos (PV), oócitos em vitelogênese inicial (VI), oócitos em vitelogênese avançada (VA), oócitos maduros (OM) e células foliculares (cabeças de setas). Hematoxilina/Eosina..... 42
- Fig. 5:** Fotomicrografia do ovário Imaturo de *Xiphopenaeus kroyeri*, evidenciando a: a túnica de tecido conjuntivo frouxo (setas), região da medula (M) (Oog 1) e região do córtex (C) (Oog 2); b: oogônia tipo 1, oogônia tipo 2 e células foliculares (cabeça de seta). Hematoxilina/Eosina..... 43
- Fig. 6:** Fotomicrografia do ovário Pré-maturo de *Xiphopenaeus kroyeri*, evidenciando a: a túnica de tecido conjuntivo frouxo (setas), região da medula (M) e região do córtex (C); b: oogônias 2 (Oog 2) e oócitos pré-vitelogênicos (PV), células foliculares cúbicas (cabeças de setas) e grânulos perinuclear (estrela). Hematoxilina/Eosina..... 43
- Fig. 7:** Fotomicrografia do ovário em Maturação Inicial de *Xiphopenaeus kroyeri*, evidenciando a: túnica de tecido conjuntivo frouxo (setas), região da medula (M) e região do córtex (C); b: (oócitos em diferentes fases de desenvolvimento): com oogônias 2 (Oog 2) e oócitos pré-vitelogênicos (PV), oócito em vitelogênese inicial (VI) oócito em vitelogênese avançada (VA); c: oócitos em vitelogênese inicial (VI), células foliculares (cabeças de setas) e grânulos perinuclear (estrela). Hematoxilina/Eosina..... 44
- Fig. 8:** Fotomicrografia do ovário em Maturação Avançada de *Xiphopenaeus kroyeri*, evidenciando a: região do córtex (C); b: (oócitos em diferentes fases de desenvolvimento) com oogônias 2 (Oog 2) e oócitos pré-vitelogênicos (PV), oócito em vitelogênese inicial (VI) oócito em vitelogênese avançada (VA), oócitos maduros (OM); c: oócito em vitelogênese avançada (VA), células foliculares (cabeças de setas) e grânulos perinuclear (estrela). Hematoxilina/Eosina..... 45
- Fig. 9:** Fotomicrografia do ovário Maduro de *Xiphopenaeus kroyeri*, evidenciando a: região do córtex (C); b: oócitos maduros (OM), grânulos perinuclear (estrela), c: vesículas corticais (*), células foliculares (cabeças de setas) e grânulos de vitelo (y). Hematoxilina/Eosina..... 46
- Fig. 10:** Fotomicrografias do ovário de *Xiphopenaeus kroyeri* em diferentes fases de maturação: a - Oogônias 2 (Oog 2) PAS negativas; b - oócito pré-vitelogênico (PV) PAS fraco; c - oócito em vitelogênese inicial (VI) PAS muito intensa; d - oócito em vitelogênese avançada (VA) PAS intensa; e - oócito maduros (OM) PAS moderado. Reação ao PAS..... 47
- Fig. 11:** Exemplar de *Xiphopenaeus kroyeri* ovário (O) e hepatopâncreas (H). Barra 1cm..... 48
- Figs. 12 a, b, c, d:** Células do epitélio do Hepatopâncreas: células R – reabsortiva (R), Lúmen (L), células B – vesiculares (B), células F – fibrilares (F), células embrionárias (E) e célula M (M). Hematoxilina/Eosina..... 49

Figs. 13 a, b, c, d: Células do epitélio do Hepatopâncreas: células R – reabsortiva (R), Lúmen (L), células B – vesiculares (B), células F – fibrilares (F), células embrionárias (E), célula M (M) região da borda em escova (setas) e região distal do tubo (*). Hematoxilina/Eosina.....	50
Fig. 14: Células do hepatopâncreas (ovário imaturo). a: H/E; b: Azul de Toluidina; c: Reação histoquímica PAS + AB (2,5). Células B – vesiculares (B), Células R – reabsortivas (R), Células F – fibrilares (F), e Lúmen (L).....	52
Fig. 15: Células do Hepatopâncreas (ovário pré-maturo). a: H/E; b: Azul de Toluidina; c: Reação histoquímica PAS + AB (2,5). Células B – vesiculares (B), Células R – reabsortivas (R), Células F – fibrilares (F), e Lúmen (L).....	53
Fig. 16: Células do hepatopâncreas (ovário em maturação inicial). a: H/E; b: Azul de Toluidina; c: Reação histoquímica PAS + AB (2,5). Células F – fibrilares (F), Células R – reabsortivas (R), e Células B – vesiculares (B) e, Lúmen (L).....	55
Fig. 17: Células do Hepatopâncreas (ovário em maturação avançada). a: H/E; b: Azul de Toluidina; c: Reação histoquímica PAS + AB (2,5). Células B – vesiculares (B), Células R – reabsortivas (R), Células F – fibrilares (F), e Lúmen (L).....	56
Fig. 18: Células do hepatopâncreas (ovário maduro). a: H/E; b: Azul de Toluidina; c: Reação histoquímica PAS + AB (2,5). Células R – reabsortivas (R), células F- fibrilares (F), células B – vesiculares (B), e Lúmen (L).....	57
Fig. 19: Imuno-histoquímica no ovário durante maturação ovariana em <i>Xiphopenaeus kroyeri</i> . a: imaturo; b: pré-maturo; c: maturação inicial; d: maturação avançada; e: maduro: Oogônias tipo 1 (Oog 1); oogônias tipo 2 (Oog 2); oócito pré-vitelogênico (PV); oócito em vitelogênese inicial (VI); oócito em vitelogênese avançada (VA); oócito maduro (OM); células foliculares (▲); e marcação imuno-histoquímica perinuclear; (■)	60
Fig. 20: Imuno-histoquímica no ovário durante maturação ovariana em <i>Xiphopenaeus kroyeri</i> , evidenciando o processo de pavimentação das células foliculares (▲ a: células foliculares cúbicas; b: células foliculares em processo de pavimentação; c: células foliculares pavimentosas.....	61
Figs. 21 a, b, c: Imuno-histoquímica no hepatopâncreas de fêmeas de <i>Xiphopenaeus kroyeri</i> (ovário imaturo). Células B – vesiculares (B), Células R – reabsortivas (R), Células F – fibrilares (F), Lúmen (L), células embrionárias (E), e marcação de Vitelogenina (setas).....	63
Figs. 22 a, b, c, d: Imuno-histoquímica no hepatopâncreas de fêmeas de <i>Xiphopenaeus kroyeri</i> (ovário pré-maturo). Células B – vesiculares (B), Células R – reabsortivas (R), Células F – fibrilares (F), célula M (M), células embrionárias (E), lúmen (L), e marcação de Vitelogenina (setas).....	64
Figs. 23 a, b, c, d: Imuno-histoquímica no hepatopâncreas de fêmeas de <i>Xiphopenaeus kroyeri</i> (ovário em maturação inicial). Células B – vesiculares (B), Células R – reabsortivas (R), Células F – fibrilares (F), Lúmen (L), células embrionárias (E), e marcação de Vitelogenina (setas).....	65
Figs. 24 a, b, c: Imuno-histoquímica no hepatopâncreas de fêmeas de <i>Xiphopenaeus kroyeri</i> (ovário em maturação avançada). Células B – vesiculares (B), Células R – reabsortivas (R), Células F – fibrilares (F), Lúmen (L), células embrionárias (E), e marcação de Vitelogenina (setas).....	66
Figs. 25 a, b, c: Imuno-histoquímica no hepatopâncreas de fêmeas de <i>Xiphopenaeus kroyeri</i> (ovário maduro). Células B – vesiculares (B), Células R – reabsortivas (R), Células F – fibrilares (F), Lúmen (L), e marcação de Vitelogenina (setas).....	67

Fig. 26: Comparação entre os Índices Gonadosômáticos (IGS) e Índices Hepatosômático (IHS) em fêmeas de <i>Xiphopenaeus kroyeri</i> durante maturação ovariana.....	69
Fig. 27: Comparação entre os Índices Gonadosômáticos (IGS) e Hepatosômático (IHS) em fêmeas de <i>Xiphopenaeus kroyeri</i> durante maturação ovariana ($p < 0,01$) (IGS – $a < b < c = c < d$; IHS – $a' > b' = b' = b' = b'$).....	70

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Características que identificam os estágios dos oócitos de <i>Xiphopenaeus kroyeri</i> . -: reação PAS negativa; ± reação PAS fraca; + reação PAS moderada; ++ reação PAS intensa; +++ reação PAS muito intensa. Ø grânulos de vitelo ausente; y presença de grânulos de vitelo.....	46
Tabela 2. Reação das células hepatopancreáticas de fêmeas de <i>Xiphopenaeus kroyeri</i> ao teste histoquímico, PAS+AB (2,5). Intensidade da reação: reação negativa ---; reação fraca +/-; reação moderada ++; reação intensa +++.....	51
Tabela 3: Comparação entre a classificação realizada por Campos et al. (2009) e a reclassificação realizada no presente estudo, dos estágios de maturação macroscópicos e os tipos de células germinativas presentes no ovário de <i>Xiphopenaeus kroyeri</i> : - reação PAS negativa; ± reação PAS fraca; + reação PAS moderada; ++ reação PAS intensa, e +++ reação PAS muito intensa.....	79

LISTA DE ESPÉCIES CITADAS

Espécies	Descritores	Abreviações
<i>Aristaemorpha foliácea</i>	(Risso, 1827)	<i>A. foliacea</i>
<i>Artemesia longinaris</i>	(Spence Bate, 1888)	<i>A. longinaris</i>
<i>Callinectes sapidus</i>	(Rathbun, 1896)	<i>C. sapidus</i>
<i>Farfantepenaeus aztecus</i>	(Ives, 1891)	<i>F. aztecus</i>
<i>Farfantepenaeus brasiliensis</i>	(Latreille, 1817)	<i>F. brasiliensis</i>
<i>Farfantepenaeus paulensis</i>	(Pérez-Farfante, 1967)	<i>F. paulensis</i>
<i>Farfantepenaeus subtilis</i>	(Pérez-Farfante, 1967)	<i>F. subtilis</i>
<i>Fenneropenaeus merguiensis</i>	(De Man, 1888)	<i>F. merguiensis</i>
<i>Fenneropenaeus penicillatus</i>	(Alcock, 1905)	<i>F. penicillatus</i>
<i>Litopenaeus schimitti</i>	(Burkenroad, 1936)	<i>L. schimitti</i>
<i>Litopenaeus setiferus</i>	(Linnaeus, 1767)	<i>L. setiferus</i>
<i>Litopenaeus vannamei</i>	(Boone, 1931)	<i>L. vannamei</i>
<i>Macrobrachium acanthurus</i>	(Wiegmann, 1836)	<i>M. acanthurus</i>
<i>Macrobrachium amazonicum</i>	(Heller, 1862)	<i>M. amazonicum</i>
<i>Macrobrachium rosenbergii</i>	(De Man, 1879)	<i>M. rosenbergii</i>
<i>Marsupenaeus japonicus</i>	(Spence Bate, 1888)	<i>M. japonicus</i>
<i>Metapenaeus dobsoni</i>	(Miers, 1878)	<i>M. dobsoni</i>
<i>Metapenaeus monoceros</i>	(Fabricius, 1798)	<i>M. monoceros</i>
<i>Parastacus defossus</i>	(Faxon, 1898)	<i>P. defossus</i>
<i>Penaeus indicus</i>	(H. Milne Edwards, 1837)	<i>P. indicus</i>
<i>Penaeus japonicus</i>	(Spence Bate, 1888)	<i>P. japonicus</i>
<i>Penaeus kerathurus</i>	(Forskål, 1775)	<i>P. kerathurus</i>
<i>Penaeus merguiensis</i>	(De Man, 1888)	<i>P. merguiensis</i>
<i>Penaeus monodon</i>	(Fabricius, 1798)	<i>P. monodon</i>
<i>Penaeus penicillatus</i>	(Alcock, 1905)	<i>P. penicillatus</i>
<i>Penaeus semisulcatus</i>	(De Haan, 1844)	<i>P. semisulcatus</i>
<i>Penaeus setiferus</i>	(Linnaeus, 1767)	<i>P. setiferus</i>
<i>Penaeus styliferus</i>	(H. Milne Edwards, 1837)	<i>P. styliferus</i>
<i>Penaeus stylirostris</i>	(Stimpson, 1871)	<i>P. stylirostris</i>
<i>Pleoticus muelleri</i>	(Spence Bate, 1888)	<i>P. muelleri</i>
<i>Xiphopenaeus kroyeri</i>	(Heller, 1862)	<i>X. kroyeri</i>

Resumo

RESUMO

O camarão-sete-barbas *Xiphopenaeus kroyeri* está entre as espécies de crustáceos mais importantes do litoral brasileiro, com destaque social, econômico, ambiental e cultural. Além disso, destaca-se a ampla distribuição geográfica no litoral Atlântico Ocidental (Rio Grande de Sul – BR até a Carolina do Norte – EUA). Também evidencia-se o aumento da captura, com consequente diminuição dos estoques naturais. A falta de conhecimento sobre a biologia das espécies, principalmente aquelas visadas pelas frotas pesqueiras, diminui a eficiência de aplicações de medidas para proteção dos estoques naturais. O conhecimento sobre a dinâmica reprodutiva de uma espécie pode ser considerado importante e eficaz para controlar uma população explorada. Com relação aos crustáceos, o ciclo reprodutivo apresenta ovários em diferentes estágios de maturação e a determinação destes estágios envolve as atividades inerentes ao ovário e ao hepatopâncreas. Estes dois órgãos trabalham de forma sincronizada durante a vitelogênese. Assim, o objetivo deste estudo foi reavaliar alguns pontos referente a dinâmica celular em fêmeas de *Xiphopenaeus kroyeri* nos diferentes estágios de maturação ovariana. A classificação macroscópica e microscópica da maturação ovariana e o perfil celular dos túbulos hepatopancreáticos foram estudados através de análises histológicas e histoquímicas; a localização da síntese de vitelogenina no ovário e hepatopâncreas foi estudada através da imuno-histoquímica; e os índices gonadosomático (IGS) e hepatossomático (IHS) foram comparados. Deste modo, o ovário de *X. kroyeri* apresenta seis estágios de maturação: imaturo, pré-maturo, maturação inicial, maturação avançada, maduro e desovado. As células germinativas apresentam seis fases de desenvolvimento: oogônia tipo I, oogônia tipo II, oócitos pré-vitelogênicos, oócitos em vitelogênese inicial, oócitos em vitelogênese avançada e oócitos maduros. O túbulo hepatopancreático está revestido por um epitélio pseudoestratificado formado por cinco tipos celulares, sendo eles, célula E (embrionária), célula F (fibrilar), célula R (reabsortiva), célula B (vesicular) e célula M (basal). Estes tipos celulares variam a quantidade e a plasticidade de acordo com o estágio de maturação ovariano. Sobre a dinâmica da vitelogênese durante o ciclo reprodutivo detecta-se vitelogenina no ovário e no hepatopâncreas. Além disso, em indivíduos adultos ocorre uma relação inversa entre os índices gonadosomático e hepatossomático nos estágios pré-maturo para maturação inicial, devido ao envolvimento funcional entre ovário e hepatopâncreas durante o início do ciclo de maturação ovariana. O IHS não apresenta diferença significativa entre os estágios de maturação ovariana. Dessa forma, o presente estudo apresenta contribuições importantes a cerca do ciclo reprodutivo do camarão *X. kroyeri*.

PALAVRAS-CHAVE

Xiphopenaeus kroyeri, ovário, oócito, hepatopâncreas, vitelogenina

Abstract

ABSTRACT

The shrimp *Xiphopenaeus kroyeri* is among the most important shellfish species off the Brazilian coast, with several highlights such as social, economic, environmental and cultural. In addition, we highlight the wide geographic distribution in the western Atlantic coast (Rio Grande do Sul - BR to North Carolina - USA) and also the increase in artisanal fisheries with consequent reduction of the natural stocks. The lack of knowledge about the biology of the species, especially those targeted by fishing fleets, decreases the efficiency of strategies for protection of natural stocks. Knowledge about reproductive dynamics of a species is considered important and effective to control an exploited population. Regarding the crustaceans, the reproductive cycle is composed of ovaries at different stages of maturation, and the determination of these stages involves activities related to the ovary and hepatopancreas. These two organs work synchronously during vitellogenesis. The objectives of this study were to reevaluate some points in females in different stages of ovarian maturation. Macroscopic and microscopic classification of ovarian maturation and the cellular profile of hepatopancreatic tubules were studied by histological and histochemical analyzes; the location of vitellogenin synthesis in ovary and hepatopancreas was studied by immunohistochemistry and the gonadosomatic (GSI) and hepatosomatic (IHS) indices were compared. Thus, *X. kroyeri* ovary features six maturity stages: immature, pre-mature, early maturation, advanced maturation, mature and spawned. The germ cells exhibit six phases of development: oogonia type I, oogonia type II, pre-vitellogenic oocytes, oocytes in early vitellogenesis, oocytes in advanced vitellogenesis and mature oocyte. The hepatopancreatic tubule is lined by a pseudostratified epithelium with five cell types, cell E (undifferentiated) cells F (fibrillar), cell R (resorptive), B cell (vesicular) and cell M (basal). These cell types vary the amount and plasticity according to each ovarian maturation stage. On the dynamics of vitellogenesis during the reproductive cycle we highlight the presence of vitellogenin in ovaries and hepatopancreas. Moreover, there is an inverse relationship between gonadosomatic and hepatosomatic indices at the beginning of gonadal maturation due to the functional engagement between ovary and hepatopancreas. Finally, this study has important contributions about the reproductive cycle of shrimp *X. kroyeri*.

KEYWORDS

Xiphopenaeus kroyeri, ovary, oocyte, hepatopancreas, vitellogenin.

Introdução

1.1. Atividade Pesqueira

Os recursos pesqueiros marinhos representam grande importância social e econômica em todo o mundo. Segundo a Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação (FAO), a exploração mundial destes recursos entre o 1950 até o final da década de 1980 apresentou um crescimento contínuo, seguido de um pequeno período de declínio no início da década de 1990. Após esse período de declínio, em meados da década de 1990, ocorreu crescimento na produção mundial de pescado principalmente pelo fato do desenvolvimento e crescimento da aquicultura. Em 2002, a aquicultura contribuiu com 40,4 milhões de toneladas e, em 2012, com 66,6 milhões de toneladas, representando um crescimento contínuo na última década (FAO, 2008; FAO, 2014). Em contrapartida, de 2002 a 2012 a exploração mundial do pescado marinho apresentou um declínio, com uma produção mundial de 84,5 a 79,7 milhões de toneladas respectivamente (FAO, 2008; FAO, 2014). Esse declínio se deve principalmente a sobre-exploração dos recursos naturais, causado pelo aumento das frotas pesqueiras, intensificação da exploração e falta de plano de gestão para conservação e manutenção dos estoques (FAO, 2014).

O consumo médio per capita/ano em nível mundial de pescado tem aumentado nas últimas décadas, passando de 9,9 kg em 1960 a 18,9 kg em 2010, com estimativa de 19,2 kg em 2012. Isso se deve ao fato do aumento da população e urbanização, combinado com um forte aumento da expansão da produção pesqueira (FAO, 2014). No Brasil, segundo o Ministério da Pesca e Aquicultura, em 2013 os brasileiros consumiram 17,3 kg de pescado per capita/ano, quantidade que alcança a média mundial divulgada pela Organização Mundial de Saúde (OMS) (BRASIL, 2013).

A produção de pescado brasileiro em 2011 foi de 1.431.974,4 toneladas. Em relação à produção de crustáceos, o camarão-sete-barbas (*Xiphopenaeus kroyeri*) e o camarão-rosa (*Farfantepenaeus brasiliensis*, *Farfantepenaeus paulensis*) continuaram sendo as espécies mais capturadas no país em 2011, com 15.417,8 toneladas e 10.331,2 toneladas, respectivamente, representando, juntas, 45% do total da produção de crustáceos marinhos no Brasil (BRASIL, 2011).

Em 2004, o Ministério do Meio Ambiente publicou a Instrução Normativa (IN/MMA N°005/2004) com a lista oficial das espécies de invertebrados aquáticos

ameaçados de extinção, sobre-explotados ou ameaçados de sobre-explotação. Entre os peneídeos, os camarões *Xiphopenaeus kroyeri*, *Farfantepenaeus brasiliensis*, *Farfantepenaeus paulensis*, *Farfantepenaeus subtilis* e *Litopenaeus schmitti* estão na lista de animais sobre-explotados ou ameaçados de sobre-explotação (BRASIL, 2004). Em 2008, o Ministério do Meio Ambiente publicou a Instrução Normativa (IN/MMA N°189/2008) proibindo o exercício da pesca de arrasto com tração motorizada para a captura de camarão-rosa (*F. brasiliensis*, *F. paulensis* e *F. subtilis*), camarão-sete-barbas (*X. kroyeri*), camarão-branco (*L. schmitti*), camarão-santana (*Pleoticus muelleri*) e do camarão-barba-ruça (*Artemesia longinaris*), anualmente, na área marinha compreendida entre os paralelos 21°18'04,00"S (divisa dos estados do Espírito Santo e Rio de Janeiro) e 33°40'33,00"S (Foz do Arroio Chuí, estado do Rio Grande do Sul), de 1° de março a 31 de maio (BRASIL, 2008).

Assim, devido a grande importância do camarão *X. kroyeri* na atividade pesqueira, é necessário o conhecimento aprimorado sobre a biologia da espécie para sustentar medidas que protejam e garantam a pesca sustentável deste recurso.

1.2. Biologia da espécie

O camarão-sete-barbas *Xiphopenaeus kroyeri* apresentam uma ampla distribuição geográfica no Atlântico Ocidental, ocorre da Carolina do Norte (EUA) ao Estado do Rio Grande do Sul (BRASIL) (D'INCAO, 1999). A pesca de camarões no litoral brasileiro é realizada em grande escala, com significativa importância econômica, histórica, social e cultural (BRANCO, 2005). A família Penaeidae apresenta as principais espécies de camarões utilizadas como recursos pesqueiros na costa das regiões Sudeste e Sul do Brasil, destacando-se *Xiphopenaeus kroyeri* como um importante recurso pesqueiro (D'INCAO et al., 2002).

A longevidade máxima dos camarões peneídeos varia entre 2 e 2,5 anos (GARCIA e LE RESTE, 1981). O *X. kroyeri* apresenta o ciclo de vida em torno de 18 meses e mostra um rápido processo de crescimento (NEIVA e WISE, 1967). Em Macaé o tempo de vida do *X. kroyeri* é aproximadamente de 21 meses (DAVANSO, 2015). Esta espécie não apresenta estratificação populacional, ou seja, a ocorrência de juvenis e adultos na mesma área é comum, preferindo águas costeiras rasas com fundo de areia e lama (IWAI, 1973).

Os camarões marinhos podem apresentar quatro tipos diferentes de ciclo reprodutivo em relação aos habitats, sendo espécie-específico. Os quatro tipos de ciclos são: tipo I possui seu ciclo inteiramente estuarino; tipo II, a desova ocorre longe da costa, os estágios planctônicos migram para próximo da costa no final do desenvolvimento larval e as pós-larvas se estabelecem na região estuarina; tipo III, as pós-larvas preferem salinidades mais elevadas, geralmente em águas protegidas próximas à costa; e tipo IV ocorre inteiramente longe da região costeira (DALL et al., 1990). O camarão-sete-barbas *X. kroyeri* apresenta o ciclo tipo III (CASTRO et al., 2005).

O conhecimento sobre a dinâmica reprodutiva e a maturação dos ovários pode ser considerado os parâmetros populacionais mais importantes e eficazes para controlar uma população explorada (CAMPOS et al., 2009). A falta de conhecimento sobre a biologia das espécies, principalmente aquelas visadas pelas frotas pesqueiras, diminui a eficiência de aplicações de alternativas para proteção dos estoques naturais. Um fato importante relacionado às estratégias para a preservação dos estoques pesqueiros é a biologia da reprodução da espécie, destacando o conhecimento sobre a morfologia reprodutiva, ainda apresenta alguns problemas, como a falta de padronização de termos técnicos, e descrições pouco detalhadas sobre a óptica morfológica dos ciclos reprodutivos de camarões (SIEBERT, 2013).

1.3. Ciclo reprodutivo dos crustáceos

Os ovários de crustáceos apresentam diferentes estágios de maturação constituindo um ciclo reprodutivo (CHANG e SHIH, 1995). O estudo deste ciclo reprodutivo é fundamental para que haja melhor controle no crescimento e na reprodução dos animais mantidos em cativeiro e, ainda, os estoques naturais de reprodutores (KROLL et al., 1992; MEDINA et al., 1996). A determinação dos estágios de maturação ovariana durante o ciclo reprodutivo envolve as atividades inerentes ao ovário e ao hepatopâncreas. Estes dois órgãos trabalham de forma sincronizada estabelecendo o período de cada ciclo reprodutivo.

Em crustáceos, o hepatopâncreas é o primeiro órgão responsável pela digestão, absorção de nutrientes, armazenamento de reservas e excreção (JOHNSTON et al., 1998). Sua função envolve a síntese de enzimas digestivas

(ICELY e NOTT, 1992), a detoxificação de xenobióticos (JOHNSTON et al., 1998; SOUZA e PETRIELLA, 2007) e a participação na vitelogênese durante a maturação ovariana (KROLL et al., 1992; TIU et al., 2006). O ovário, durante a maturação, aumenta de peso devido à mobilização de lipídios e proteínas do hepatopâncreas, para o interior dos oócitos (CAHU et al., 1994; LEE e CHANG, 1997). Fato corroborado em fêmeas de *Penaeus japonicus* (JASMANI et al., 2000) e *Penaeus merguensis*, onde o índice gonadossomático (IGS) aumentou durante todo o processo vitelogênico e, conseqüentemente, o maior valor de IGS foi observado no último estágio de maturação gonadal (ovário maduro), o que indicou maior acúmulo de vitelo nos oócitos maduros (PHIRIYANGKUL et al., 2007).

A importância da produção de vitelo é verificada pelo tempo destinado à vitelogênese durante o ciclo reprodutivo feminino. Este processo é crucial para o acúmulo de nutrientes nos oócitos, causando um rápido aumento no tamanho das gônadas (PHIRIYANGKUL et al., 2007). O vitelo é utilizado como alimento endógeno para as larvas recém-eclodidas, proporcionando sua sobrevivência nos primeiros estágios de desenvolvimento (LEE e CHANG, 1997; PHIRIYANGKUL et al., 2007). A vitelogênese, processo de formação do vitelo, é precedida pela formação de vitelogenina (Vg), que é considerada precursora do vitelo (Vt), sendo encontrada, principalmente, na hemolinfa da maioria das fêmeas de crustáceos durante maturação ovariana (PHIRIYANGKUL e UTARABHAND, 2006). Em alguns casos, a Vg é imunologicamente idêntica ao Vt ovariano (LEE e CHANG, 1997; AVARRE et al., 2003). Em *P. merguensis* foi descrito o mesmo gene é responsável por codificar a Vg e o Vt (PHIRIYANGKUL e UTARABHAND, 2006).

1.4. Vitelogênese

A vitelogênese pode ter origem endógena, quando ocorre a produção de Vg no oócito e/ou células foliculares, e exógena quando essa produção é extraovariana, ou ainda, ocorrem por ambas às origens (KROLL et al., 1992; TSANG et al., 2003; TIU et al., 2006). A vitelogenina (Vg) é secretada no sistema circulatório e transportada para o ovário onde é captada pelos oócitos e processada intracelularmente para formar o vitelo (Vt) (JASMANI et al., 2000; LEE e CHANG, 1997; OKUNO et al., 2002). Em crustáceos, o local de síntese de Vg parece variar entre as espécies. Estudos têm produzido diferentes e conflitantes informações a

respeito dos locais de vitelogênese em decápodos. É sugerido que a Vg seja sintetizada no ovário ou hepatopâncreas, ou ambos, podendo diferir, ainda, de acordo com a espécie e estágio vitelogênico ou de muda (PHIRIYANGKUL e UTARABHAND, 2006).

Os lipídios ingeridos, principalmente em forma de triglicerídios, são convertidos no hepatopâncreas em lipídios polares e glicolipoproteínas, como no caso da vitelina e lipovitelina. Durante o ciclo reprodutivo, essas proteínas são transportadas aos ovários através da hemolinfa (CAHU et al., 1994). Assim, enquanto os ovários alcançam o estágio maduro e conseqüentemente a maior concentração lipídica, a quantidade de lipídios no hepatopâncreas diminui, indicando a mobilização dos lipídios do hepatopâncreas às gônadas. O inverso também ocorre, quando as fêmeas encontram-se imaturas ou em estágios iniciais de maturação é observado o acúmulo de lipídios no hepatopâncreas (CAVALLI et al., 2001). Sugere-se, um mecanismo de feedback que regula a síntese e liberação de Vg na hemolinfa, bem como, a captação dessa pelos oócitos (JASMANI et al., 2000).

A partir da imuno-histoquímica, foi possível observar a localização de Vg no ovário e hepatopâncreas do camarão *Macrobrachium amazonicum*, nos diferentes estágios de maturação ovariana (FERREIRA et al., 2012). Recentemente o hepatopâncreas e/ou ovário foram reportados como os responsáveis pela síntese de Vg/Vt baseado na expressão de vitelogenina (PHIRIYANGKUL e UTARABHAND, 2006). Desta forma, foi possível confirmar que a expressão do gene codificante para Vg está expresso no ovário e hepatopâncreas de fêmeas vitelogênicas de *P. merguensis*, (PHIRIYANGKUL e UTARABHAND, 2006), *Penaeus semisulcatus* (AVARRE et al., 2003) e *P. japonicus* (TSUTSUI et al., 2000). A partir da expressão quantitativa de mRNA da Vg no ovário e hepatopâncreas de *P. merguensis* foi possível verificar que nesses órgãos a síntese de Vg é separada, entretanto, ocorre de forma complementar (PHIRIYANGKUL et al., 2007). O ovário apresentou nível de expressão de mRNA de Vg maior do que o hepatopâncreas em todos os estágios de maturação, indicando que este órgão é o local principal para a síntese da Vg em *P. merguensis* e que, qualquer que seja a contribuição do hepatopâncreas, esta deve ser baixa (PHIRIYANGKUL et al., 2007). No entanto, em *Marsupenaeus japonicus*, o ovário apresentou nível de expressão de mRNA de Vg significativo logo no primeiro estágio de maturação ovariana, decrescendo ao longo do ciclo. Já o nível de

expressão de mRNA de Vg no hepatopâncreas de *M. japonicus* apresentou aumento significativo a partir do estágio intermediário de maturação ovariana (OKUMURA et al., 2007). É sugerido, portanto, que a contribuição do ovário para o acúmulo de Vt ocorre nos estágios iniciais de maturação ovariana e que o hepatopâncreas contribui nos estágios finais, onde é preciso um maior acúmulo de Vg para rápido desenvolvimento oocitário (YANG et al., 2005; OKUMURA et al., 2007). Nesse contexto, sabe-se que, em camarões peneídeos, a Vg é sintetizada no ovário e hepatopâncreas (TSUTSUI et al., 2000; OKUMURA et al., 2007; PHIRIYANGKUL et al., 2007), mas a contribuição relativa desses dois tecidos na síntese de Vg ainda é incerta (OKUMURA et al., 2007). Informações básicas a respeito da produção exógena (hepatopâncreas) e/ou endógena (ovário) de Vg auxiliarão no melhor entendimento sobre a biologia reprodutiva do camarão *Xiphopenaeus kroyeri* e trarão dados fundamentais para o estabelecimento de projetos voltados à melhoria do manejo e preservação dos estoques naturais da espécie.

1.5. Justificativa

Diante do exposto percebemos a importância do estudo detalhado sobre a reprodução, para o entendimento das relações entre o ovário e hepatopâncreas no processo de maturação dos oócitos, observando a plasticidade morfológica envolvida no ciclo reprodutivo de *Xiphopenaeus kroyeri*. Ressaltamos ainda, que esta espécie apresenta uma ampla distribuição geográfica e uma crescente captura pela frota pesqueira, sendo de grande importância social e econômica para as comunidades pesqueiras do litoral brasileiro.

Objetivos

2. OBJETIVOS

Com base nas informações levantadas anteriormente, pode-se estabelecer o seguinte objetivo geral do trabalho:

- Compreender a relação funcional entre o ovário e o hepatopâncreas no processo de vitelogênese no camarão *Xiphopenaeus kroyeri*.

Para alcançar o objetivo geral, foram estabelecidos os seguintes objetivos específicos:

- Reavaliar a classificação macroscópica e microscópica da maturação ovariana através de análises histológicas e histoquímicas;
- Comparar o perfil celular dos túbulos hepatopancreáticos nos diferentes estágios de maturação ovariana, através de análises histológicas e histoquímicas;
- Localizar a vitelogenina no ovário e hepatopâncreas através da imunohistoquímica em fêmeas nos diferentes estágios de maturação ovariana;
- Comparar os índices gonadosomático (IGS) e hepatossomático (IHS) nos diferentes estágios ovarianos.

Metodologia

3. METODOLOGIA

3.1. Material de estudo

As coletas do camarão *Xiphopenaeus kroyeri* foram mensais e, iniciaram em julho de 2013 e terminaram em junho de 2014, na região sudeste da costa Brasileira, em Macaé – RJ (22°37' S e 41°78' W). As coletas ocorreram em parceria com o Professor Dr. Rogério Caetano da Costa, responsável pelo Laboratório de Biologia de Camarões, do Departamento de Ciências Biológicas/FC – UNESP, Campus de Bauru, assim, contamos com a infraestrutura necessária para as coletas na região de Macaé/RJ: transporte; contato e verba para realizarmos os arrastos; e alguns materiais como, por exemplo: caixa térmica, balança de precisão, paquímetros, entre outros; e também contamos com a Licença permanente para coleta de material zoológico, fornecida pelo Ministério do Meio Ambiente ao Prof. Dr. Rogério (ANEXO 1 página 98). Em Macaé/RJ, também contamos com a infraestrutura fornecida pela UFRJ/NUPEM, com o suporte técnico de laboratórios e alojamentos durante o período de coletas.

Todo o trabalho de campo foi efetuado com a utilização de um barco de pesca comercial (Figura 1) possuindo redes do tipo “otter-trawl” (Figura 1A). Os arrastos foram realizados nos seguintes transectos: 5 metros (22°21'34" S 41°45'00" W), 10 metros (22°23'30" S 41°44'45" W), e 15 metros (22°24'27" S 41°45'44" W) de profundidade. Cada arrasto teve uma duração de aproximadamente 30 minutos (velocidade de 2 nós). Após o término de cada arrasto, as redes foram recolhidas ao convés e o material biológico passou por uma triagem preliminar (Figuras 1C e D). Em seguida, os camarões foram identificados de acordo com Pérez-Farfante e Kengley (1997) e, em relação à características macroscópicas de maturidade ovariana, de acordo com Siebert (2013). Para este estudo, as fêmeas de *X. kroyeri* capturadas foram separadas em diferentes grupos, de acordo com o estágio de maturação gonadal macroscópico. Esses estágios foram determinados segundo observações das gônadas, com cinco estágios de maturação: IM= imaturo (juvenis), PM= pré-maturos (adultos com gônadas não maduras), MI= maturação inicial, MA= maturação avançada e M= maduro. Não foi possível coletar espécimes no estágio DESOVADO, pois esse estágio é específico e muitas vezes confundido com o estágio PM, assim dificultando sua coleta. Durante o período de coleta foram

separados cerca de 10 a 15 animais de cada estágio de maturação gonadal por mês de coleta, com um total final de aproximadamente 130 animais de cada estágio (total geral 650 animais). As amostras foram fixadas em diferentes fixadores (BOUIN e PARAFORMALDEIDO 4%).



Fig. 1: Fotografias do barco de pesca comercial utilizado para coletar o material biológico. **A:** rede tipo “otter-trawl” antes do arrasto; **B:** barco realizando o arrasto, redes arrastadas (setas); **C:** rede recolhida contendo material biológico; e **D:** triagem do camarão *Xiphopenaeus kroyeri*.

3.2. Índice Gonadosomático (IGS) e Índice Hepatosomático (IHS)

Os animais coletados foram individualmente pesados e, posteriormente, eutanasiados por choque térmico. Foram coletados os ovários e os hepatopâncreas em cada estágio de maturação ovariana. A determinação dos IGS e IHS foi realizada com base na seguinte relação:

$$\text{IHS ou IGS (\%)} = \frac{\text{Peso do órgão}}{\text{Peso do corpo}} \times 100$$

Cada índice foi comparado entre os estágios de maturidade ovariana a partir de teste estatístico ANOVA one-way ($p < 0,01$) e pós-teste de Tukey.

3.3. Análises de microscopia de luz (Histologia)

Para as análises, em microscopia de luz, das células ovarianas de *X. kroyeri* foram utilizados 06 animais de cada estágio gonadal classificado segundo as características macroscópicas (IM, PM, MI, MA e M). Para tanto, as fêmeas capturadas e previamente classificadas foram eutanasiadas por choque térmico e posteriormente dissecadas. Os ovários e os hepatopâncreas foram coletados e fixados em solução de Bouin, por 24 horas. Em seguida o material foi submetido a várias lavagens em solução de álcool 70% e destinado para os estudos histológicos, sendo mantido neste meio até sua inclusão em historesina (HISTORESIN, LEICA®, Germany). Para a inclusão os fragmentos de ovário e hepatopâncreas foram desidratados em séries de concentrações crescentes de etanol: três banhos em etanol 80% (30 minutos cada), três banhos em etanol 90% (30 minutos cada), três banhos em etanol 95% (30 minutos cada) e três banhos em etanol absoluto (30 minutos cada). Em seguida, foram mantidos por 24 horas em solução de pré-infiltração (resina e etanol absoluto, na proporção 1:1). A seguir, as amostras permaneceram por 24 horas em solução de infiltração de resina, para posteriormente serem incluídas em histomoldes contendo resina com solução endurecedora, sendo mantidos por 48 horas em estufa, a 60 °C, para completar a polimerização da resina.

Após inclusão em historesina, os ovários e hepatopâncreas, foram para a microtomia, assim, secções histológicas (2,0 - 4,0µm de espessura) foram realizadas com navalhas de vidro, em micrótomo automático RM2265 (Leica®, Alemanha). Os

cortes histológicos do ovário e do hepatopâncreas foram colocados em lâminas de vidro e mais tarde submetidos à coloração com Hematoxilina e Eosina. As análises e fotodocumentação foram realizadas com auxílio do fotomicroscópio Olympus B Max-40, acoplado a uma câmera fotográfica digital Olympus DP-12. Cabe destacar que, o processamento do material em historesina e suas análises foram desenvolvidas no Laboratório de Morfologia de Organismos Aquáticos da Faculdade de Ciências da UNESP/Bauru.

3.4. Análises de microscopia de luz (Histoquímica)

Para esta técnica foram utilizados os mesmos animais da análise histológica, porém em lâminas diferentes. As secções histológicas dos ovários do camarão *X. kroyeri* nos seguintes estágios: IM, PM, MI, MA e M do foram submetidas à rotina histoquímicas para reações com ácido periódico de Schiff (PAS). Da mesma forma, as secções histológicas do hepatopâncreas destes mesmos animais foram submetidas às reações com ácido periódico de Schiff (PAS) e Alcian Blue (AB 2,5). Todo material foi posteriormente analisado e fotodocumentado com auxílio do fotomicroscópio Olympus B Max-40.

Os estudos histoquímicos foram realizados por meio de reações com ácido periódico de Schiff (PAS), Alcian Blue (pH 2,5) + PAS, conforme preconizado por Cao e Wang (2009). As reações com PAS permitiram evidenciar a presença de polissacarídeos neutros, que possuem grupo glicol em suas estruturas. As reações com AB, em diferentes pHs, permitiram visualizar a presença de polissacarídeos ácidos e distingui-los em sulfatados e carboxilados. Segundo Junqueira e Junqueira (1983), AB com pH 1,7 a 3,2 reage com polissacarídeos carboxilados. Esses polissacarídeos são elementos importantes no processo da vitelogênese dos camarões, conforme descrito para os oócitos em *A. longinaris* por Siebert (2013).

3.5. Imuno-histoquímica

Para as análises da localização da expressão de vitelogenina no ovário e hepatopâncreas de *X. kroyeri* foram utilizados 15 animais de cada estágio gonadal classificado segundo as características macroscópicas (IM, PM, MI, MA e M). Para tanto, as fêmeas capturadas e previamente classificadas foram eutanasiadas por

choque térmico e posteriormente dissecadas. Os hepatopâncreas e os ovários foram coletados e fixados em solução de paraformaldeído 4% por 24 horas. Após fixação, o material foi destinado à rotina de inclusão em Paraplast (Oxford®, USA) a fim de se obter secções histológicas de 3-6µm de espessura com navalhas descartáveis, em micrótomo rotativo American Optical® (USA). As lâminas histológicas (de 4 a 6 lâminas) passaram por um processo de desparafinização em xilol e, em seguida, os cortes foram hidratados em séries graduadas de álcool (etanol) e lavadas em água corrente por 15 minutos. Posteriormente, foi feita a recuperação antigênica por meio da incubação das lâminas em solução de tampão citrato (pH 6,0) a 95 °C. Em seguida, foi feito o bloqueio da peroxidase endógena com peróxido de hidrogênio (H₂O₂) diluído em metanol. Após lavagem em solução de tampão fosfato salina (PBS), as lâminas foram incubadas com anticorpo primário policlonal de anti-vitelogenina de salmão (1:50; V01402201, Biosense Laboratories AS, Bergen, Norway) diluído em solução de albumina a 1,0% em PBS. As incubações foram feitas em câmaras úmidas. Para o controle negativo, as lâminas foram incubadas em solução na qual o anticorpo primário foi substituído por solução de PBS e de albumina a 1,0%. Após a reação primária, as lâminas foram incubadas em solução contendo anticorpos secundários biotinilados, usando o Kit Dako LSAB + Peroxidase (Universal Dako LSAB® + Kit, Peroxidase, Rb/Mo/Goat). A revelação foi feita com substrato cromogênico, diluído em PBS e peróxido de hidrogênio. Ao final destas rotinas, as lâminas foram contra coradas com Hematoxilina por 1 minuto. Posteriormente, as lâminas foram desidratadas em séries graduadas de álcool etanol, solução de xilol álcool (proporção 1:1) por 5 minutos e dois banhos de xilol, por 5 minutos cada. As lâminas foram montadas com solução de Permount. Todo material foi posteriormente analisado e fotodocumentado com auxílio do fotomicroscópio Olympus B Max-40.

Resultados

4. RESULTADOS

Neste capítulo serão apresentados todos os resultados encontrados. Primeiramente apresentaremos os resultados macroscópicos e microscópicos do ovário, esses resultados nortearão as discussões acerca da classificação da maturação ovariana do camarão *X. kroyeri*. Em seguida, com base nas análises do ovário, apresentaremos os resultados morfológicos do hepatopâncreas. Posteriormente, apresentaremos os resultados imuno-histoquímicos da vitelogenina no ovário e hepatopâncreas, respectivamente. Por fim, apresentaremos os resultados dos índices gonadosomático e hepatossomático, destacando a relação existente entre o ovário e o hepatopâncreas durante o processo da maturação ovariana.

4.1. Ovário

4.1.1. Resultados Macroscópicos

Os ovários do camarão *X. kroyeri* são pares, fusionados na região cranial até a região caudal, e estão localizados no cefalotórax, dorsalmente ao hepatopâncreas, e se alongam no abdome em direção caudal até a região próxima ao telson. Os ovários apresentaram, macroscopicamente, cinco estágios de maturação (Fig. 2). Não é possível identificar o sexto estágio denominado desovado pelas análises macroscópicas.

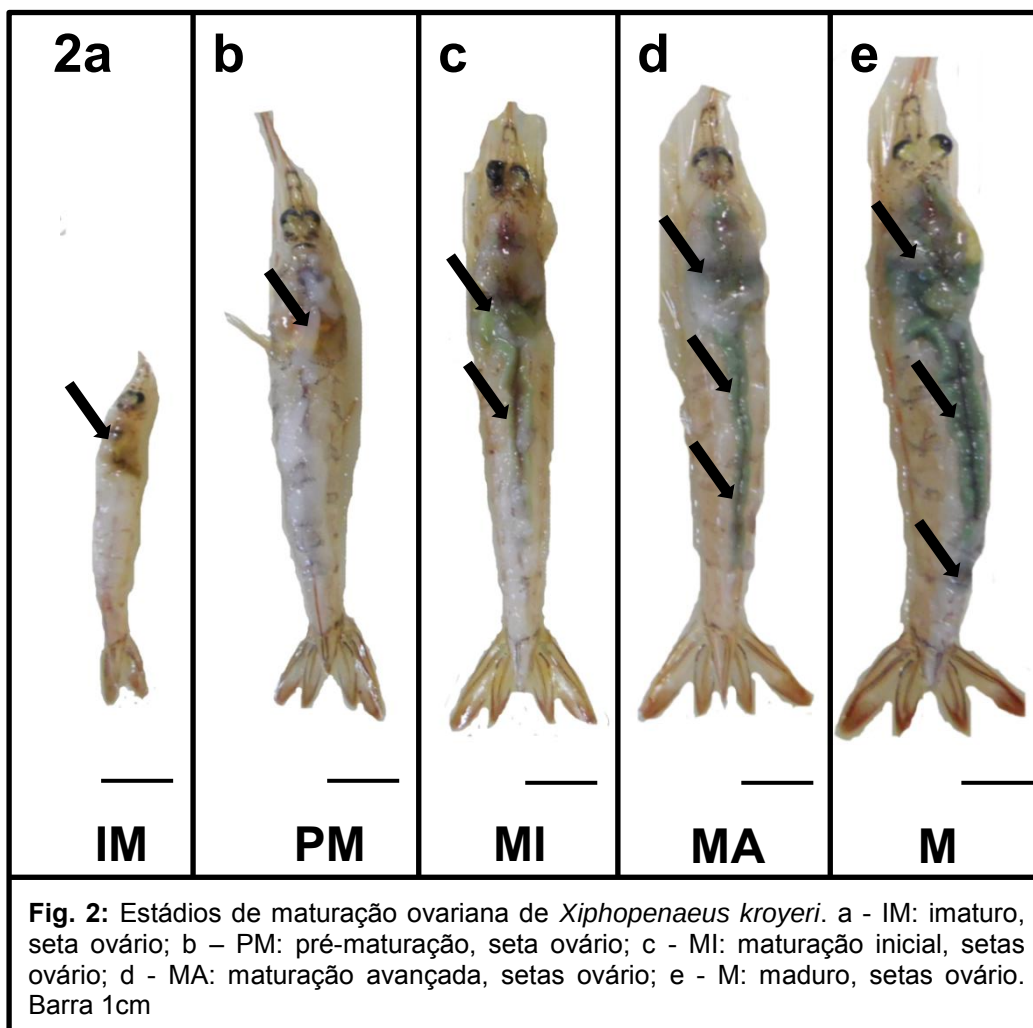
O primeiro estágio é chamado de imaturo (IM). Considera-se imaturo os espécimes cujos ovários não atingiram a fase reprodutiva, apresentando até 10 mm de comprimento de carapaça. Neste estágio, os ovários são extremamente pequenos, apresentando uma coloração pouco evidente e consistência gelatinosa, e não são visíveis através da carapaça por transparência (Fig. 2a).

O segundo estágio é chamado de pré-maturo (PM). A partir desse estágio, os espécimes estão em fase reprodutiva, diferenciando no grau de maturação gonadal. Neste estágio de maturação, os ovários são pequenos, apresentando uma coloração pouco evidente e consistência gelatinosa, não são visíveis através da carapaça por transparência (Fig. 2b).

O terceiro estágio é chamado de maturação inicial (MI). Nesta fase ocorre o início da maturação do ovário, desta forma, a gônada aumenta o tamanho e o volume em relação ao estágio PM. A coloração é verde clara, visível por transparência do cefalotórax até metade cranial do abdômen (Fig. 2c).

O quarto estágio é chamado de maturação avançada (MA). Nesta fase o ovário encontra-se em um nível de maturação mais avançado quando comparado ao estágio MI. A maturação é observada por grande parte da região dorsal do animal, sendo observada do cefalotórax e grande parte do abdome. A coloração esverdeada torna-se mais intensa e visível por transparência através da carapaça (Fig. 2d).

O último estágio é chamado de maduro (M). Nesta fase o ovário alcança o nível máximo de maturação. A gônada é mais volumosa e túrgida, com coloração verde escura e facilmente observada por transparência através da carapaça. Este órgão ocupa toda região dorsal do animal, estendendo-se do cefalotórax até o ultimo somito do abdome (Fig. 2e).



4.1.2. Resultados microscópicos

As análises microscópicas dos ovários do camarão-sete-barbas revelou que estão envolvidos por uma túnica de tecido conjuntivo frouxo e, em todos os estágios de maturação gonadal, é possível identificar oócitos em diferentes fases de desenvolvimento, exceto no estágio imaturo. A distribuição desses diferentes tipos de oócitos na gônada varia dependendo do grau de desenvolvimento em que essas células se encontram. Desta forma, as células mais jovens são comumente observadas na região medular (central) e, à medida que os oócitos se desenvolvem, eles são observados no córtex (periferia) do órgão (Fig. 3). Estas fases celulares são denominadas de oogônia 1, oogônia 2, oócito pré-vitelogênico, oócito em vitelogênese inicial, oócito em vitelogênese avançada e oócito maduro, além das células foliculares que envolvem os oócitos (Fig. 4).

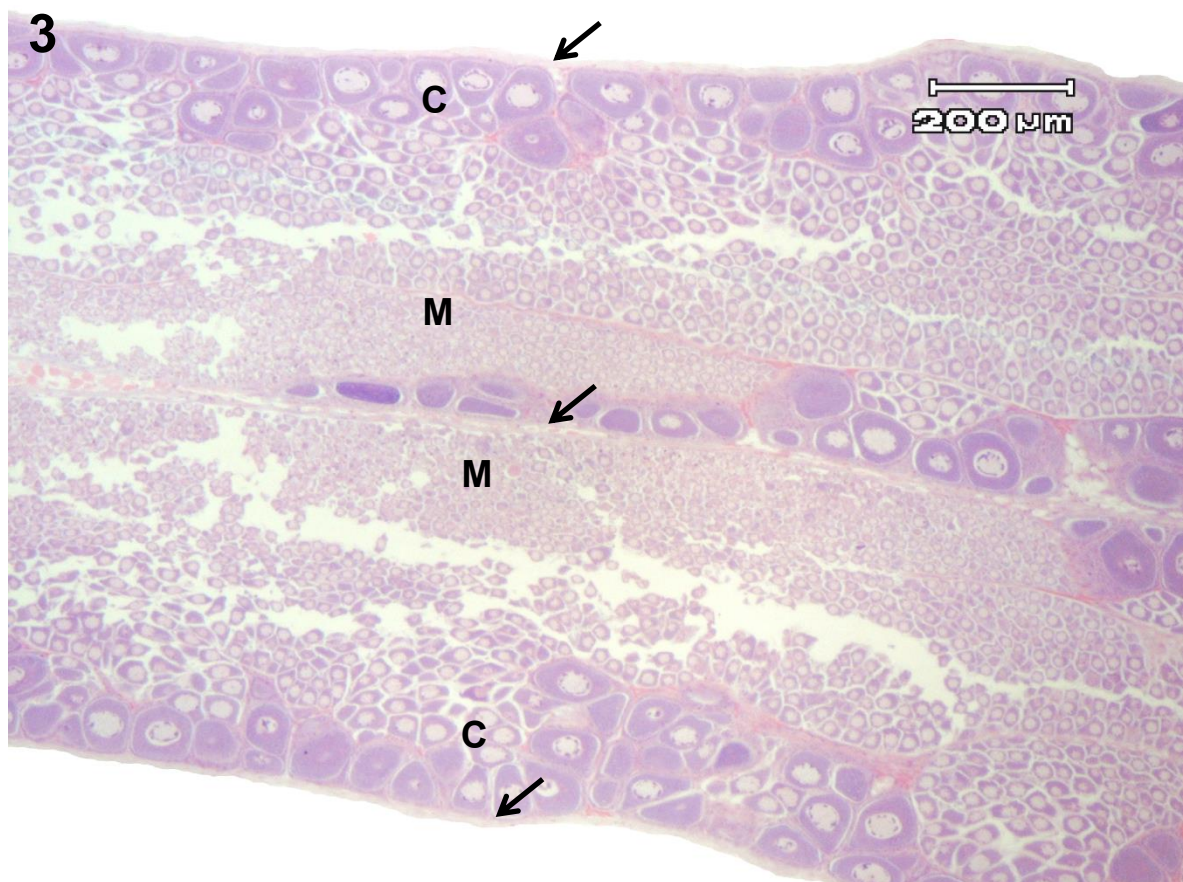


Fig. 3: Fotomicrografia do ovário pré-maturo de *Xiphopenaeus kroyeri*, evidenciando a túnica de tecido conjuntivo frouxo (setas), a região da medula (M) (oogônias) e região do córtex (C) (oócitos em diferentes fases de desenvolvimento). Hematoxilina/Eosina.

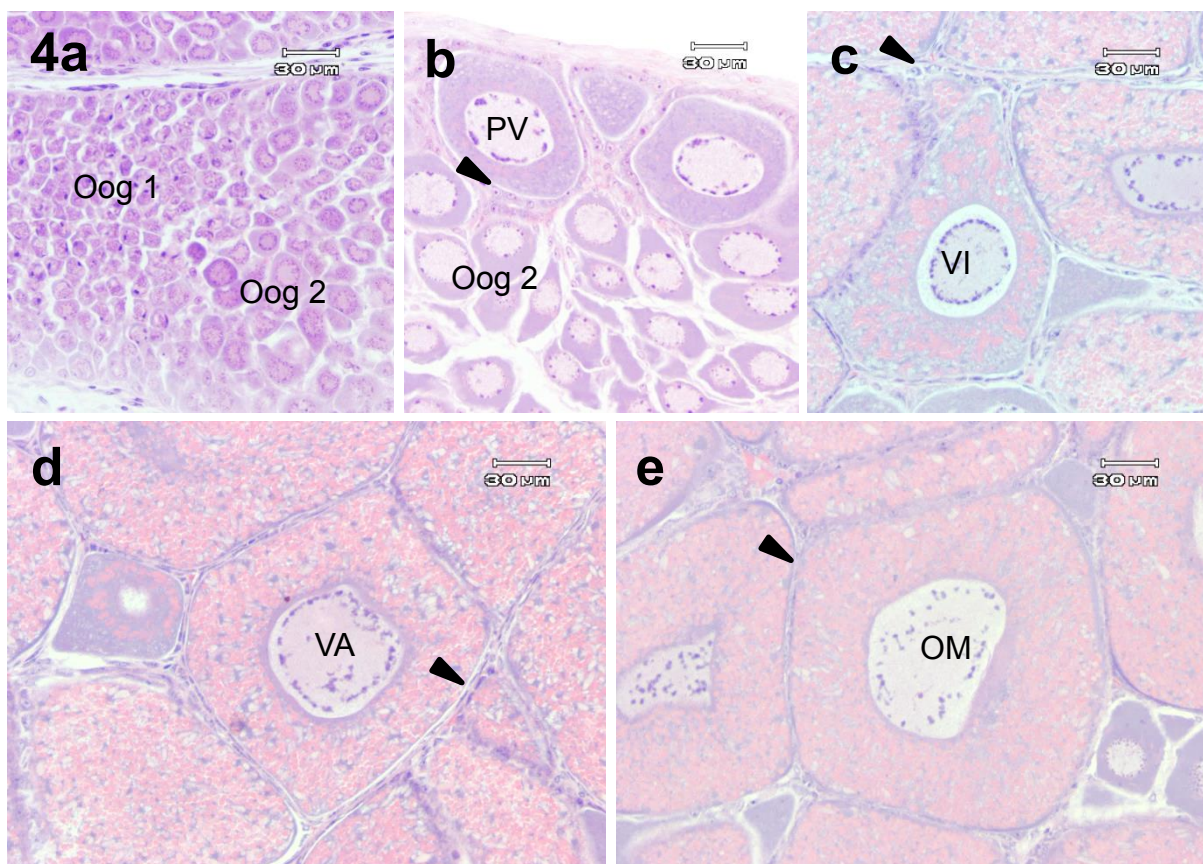


Fig. 4: Fotomicrografias do ovário de *Xiphopenaeus kroyeri* em diferentes fases de maturação: a – IM; b – PM; c – MI; d – MA; e – M: Oogônias 1 (Oog 1), Oogônias 2 (Oog 2) oócitos pré-vitelogenicos (PV), oócitos em vitelogênese inicial (VI), oócitos em vitelogênese avançada (VA), oócitos maduros (OM) e células foliculares (cabeças de setas). Hematoxilina/Eosina.

Os ovários dos espécimes juvenis, sexualmente imaturos, são muito pequenos quando comparados aos ovários dos espécimes adultos. Esses ovários apresentam apenas oogônias tipo 1 e tipo 2, e poucas células foliculares cúbicas dispersas no parênquima do órgão. As oogônias tipo 1 são as mais abundantes e estão distribuídas pela região medular do ovário, apresentam citoplasma acidófilo pouco evidente e núcleo esférico, que ocupa quase todo o citoplasma celular, com um nucléolo evidente. As oogônias do tipo 2 estão distribuídas pela região cortical, se apresentam maiores que as tipo 1, tanto em relação ao citoplasma quanto em relação ao núcleo, observa-se acúmulo de granulações perinucleares e ausência do nucléolo (Fig. 5).

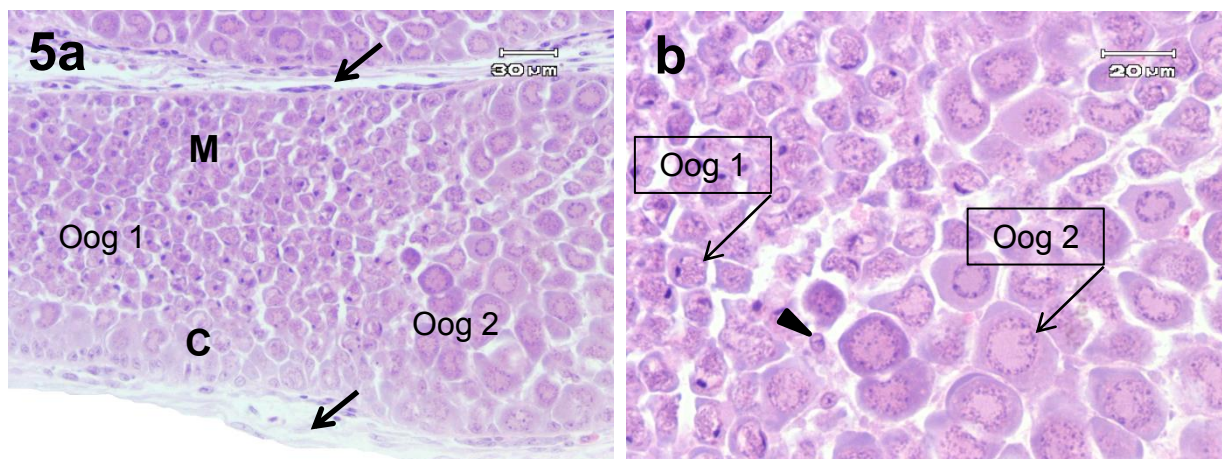


Fig. 5: Fotomicrografia do ovário Imaturo de *Xiphopenaeus kroyeri*, evidenciando a: a túnica de tecido conjuntivo frouxo (setas), região da medula (M) (Oog 1) e região do córtex (C) (Oog 2); b: oogônia tipo 1, oogônia tipo 2 e células foliculares (cabeça de seta). Hematoxilina/Eosina.

O ovário pré-maturo apresenta a zona proliferativa bem definida na região medular com inúmeras oogônias tipo 1 e na região cortical, oogônias tipo 2 e oócitos pré-vitelogênicos (PV). As oogônias (1 e 2) assemelham-se às descritas no ovário imaturo (Fig. 5). Os oócitos PV são maiores em relação às oogônias, apresentam formato poliédrico com citoplasma acidófilo, e núcleo com granulações periféricas maiores em relação a oogônia tipo 2, e estão envolvidos pelas células foliculares cúbicas (Fig. 6).

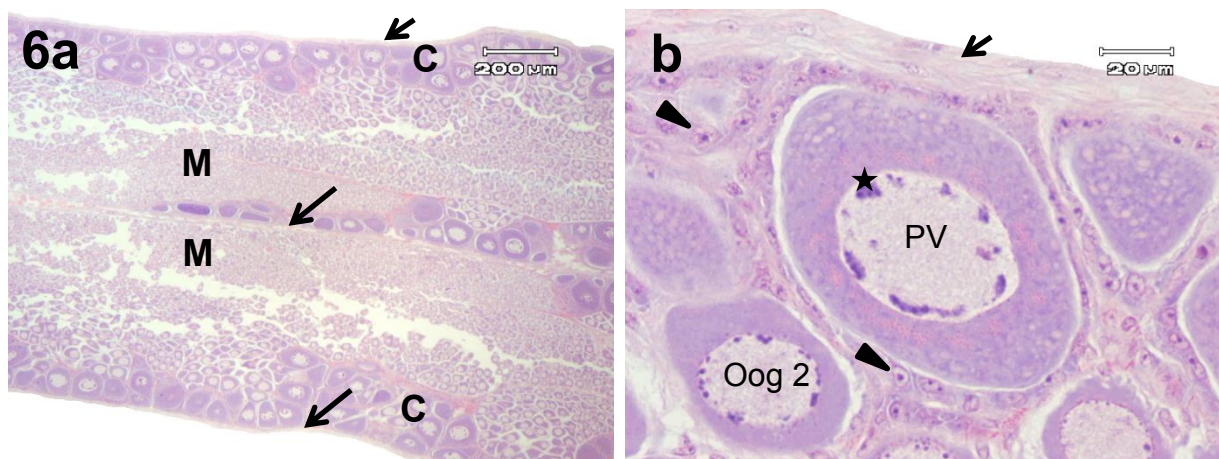


Fig. 6: Fotomicrografia do ovário Pré-maturo de *Xiphopenaeus kroyeri*, evidenciando a: a túnica de tecido conjuntivo frouxo (setas), região da medula (M) e região do córtex (C); b: oogônias 2 (Oog 2) e oócitos pré-vitelogênicos (PV), células foliculares cúbicas (cabeças de setas) e grânulos perinuclear (estrela). Hematoxilina/Eosina.

O ovário em maturação inicial apresenta oócitos em cinco diferentes fases de desenvolvimento, ou seja, oogônias tipo 1 e 2, oócitos PV, oócitos em vitelogênese inicial (VI) e avançada (VA). As características das oogônias e dos oócitos PV são iguais às observadas nos estágios anteriores (Figs 5 e 6). À medida que o ovário amadurece, percebe-se um aumento da região do córtex, com acúmulo de oócitos em processo de desenvolvimento. O oócito VI é o tipo celular mais frequente neste estágio de maturação e está localizado na região cortical do ovário (Fig. 7). Estas células exibem um citoplasma com acidofilia menos acentuada e aumento do volume citoplasmático, quando comparado aos oócitos PV. Além disso, o oócito VI exibe acúmulo inicial de grânulos de vitelo e está envolto pelas células foliculares que se tornam progressivamente pavimentosas. O núcleo do oócito VI exibe granulações periféricas mais intensas que as observadas nos oócitos PV, formando uma marcação perinuclear circular (Fig. 7).

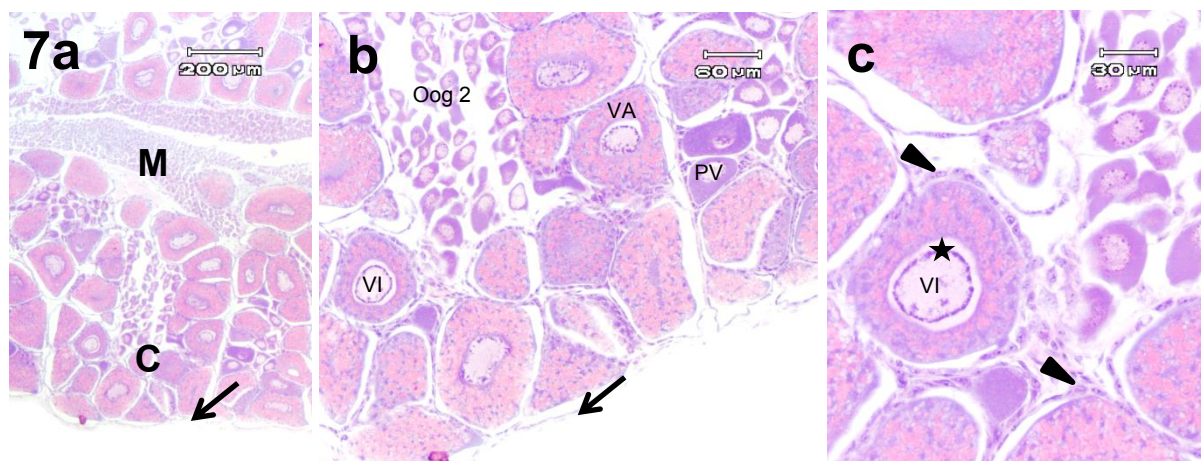


Fig. 7: Fotomicrografia do ovário em Maturação Inicial de *Xiphopenaeus kroyeri*, evidenciando a: túnica de tecido conjuntivo frouxo (setas), região da medula (M) e região do córtex (C); b: (oócitos em diferentes fases de desenvolvimento): com oogônias 2 (Oog 2) e oócitos pré-vitelogênicos (PV), oócito em vitelogênese inicial (VI) oócito em vitelogênese avançada (VA); c: oócitos em vitelogênese inicial (VI), células foliculares (cabeças de setas) e grânulos perinuclear (estrela). Hematoxilina/Eosina.

O ovário em maturação avançada assemelha-se ao ovário em maturação inicial, entretanto as características que diferem estes dois estágios de maturação são: a abundância de oócitos em vitelogênese avançada (VA) nos ovários em maturação avançada; a diminuição de oogônias (tipo 1 e 2), oócitos PV e oócitos VI; aumento da região cortical; e presença de oócitos maduros (OM) (Fig. 8). O oócito VA apresenta núcleo basófilo com menos granulações periféricas e citoplasma

basófilo com mais grânulos de vitelo. Este tipo de oócito apresenta um volume celular caracteristicamente maior em relação aos oócitos VI. O oócito VA apresenta um envoltório folicular composto por células pavimentosas, com o núcleo alongado e citoplasma basófilo, diferentes das células foliculares cúbicas que são observadas ao redor dos oócitos PV. À medida que os oócitos em vitelogênese inicial crescem e entram no estágio de vitelogênese avançada ocorre um maior acúmulo de grânulos de vitelo (Fig. 8 c).

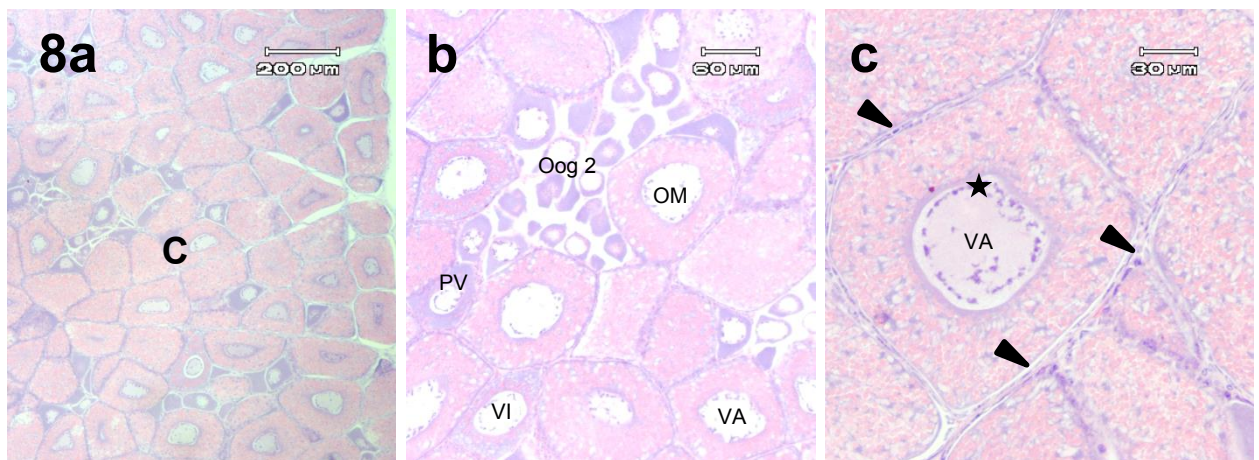


Fig. 8: Fotomicrografia do ovário em Maturação Avançada de *Xiphopenaeus kroyeri*, evidenciando a: região do córtex (C); b: (oócitos em diferentes fases de desenvolvimento) com oogônias 2 (Oog 2) e oócitos pré-vitelogênicos (PV), oócito em vitelogênese inicial (VI) oócito em vitelogênese avançada (VA), oócitos maduros (OM); c: oócito em vitelogênese avançada (VA), células foliculares (cabeças de setas) e grânulos perinuclear (estrela). Hematoxilina/Eosina.

O ovário maduro apresenta todos os estágios de desenvolvimento oocitário. Entretanto, o tipo celular mais frequente neste estágio de maturação ovariana é o oócito maduro. Estas células estão concentradas na região cortical do ovário. O oócito maduro exibe citoplasma basófilo com muitos grânulos de vitelo e vesículas corticais próximas à região da membrana plasmática (Fig. 9 a,b). O núcleo do oócito maduro apresenta granulações periféricas menos intensas em relação ao oócito VA. As células foliculares se distribuem ao redor dos oócitos maduros e se restringem a um cordão de células pavimentosas pouco evidentes com núcleos achatados (Fig. 9 c).

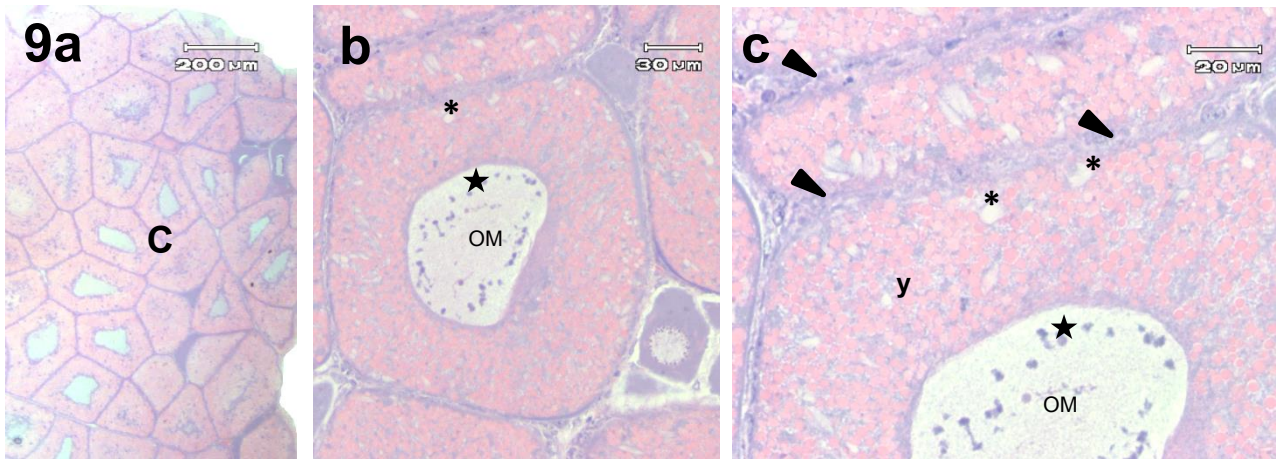


Fig. 9: Fotomicrografia do ovário Maduro de *Xiphopenaeus kroyeri*, evidenciando a: região do córtex (C); b: oócitos maduros (OM), grânulos perinuclear (estrela), c: vesículas corticais (*), células foliculares (cabeças de setas) e grânulos de vitelo (y). Hematoxilina/Eosina

4.1.3. Histoquímica

Através da reação com o ácido Periódico de Schiff (PAS), foi possível encontrar algumas diferenças entre os diferentes tipos celulares germinativos presentes no ovário. Deste modo foi possível elaborar uma tabela comparativa que identifica os estágios de desenvolvimento dos oócitos de *Xiphopenaeus kroyeri* (Tabela 1).

Tabela 1: Características que identificam os estágios dos oócitos de *Xiphopenaeus kroyeri*. -: reação PAS negativa; ± reação PAS fraca; + reação PAS moderada; ++ reação PAS intensa; +++ reação PAS muito intensa. Ø grânulos de vitelo ausente; y presença de grânulos de vitelo.

Estágio de maturação	PAS	Grânulos de vitelo
Oogônias Tipo 1	-	Ø
Oogônias Tipo 2	-	Ø
Oócitos Pré-vitelogênicos	±	Ø
Oócitos em Vitelogênese inicial	+++	y
Oócitos em Vitelogênese avançada	++	yy
Oócitos Maduros	+	yyy

As oogônias não reagiram ao PAS, portanto são consideradas PAS negativas (Fig. 10 a, Tabela 1). Os oócitos PV reagiram ao PAS, no entanto, essa reação foi fraca (Fig. 10b). Os oócitos VI apresentam uma intensa reatividade ao PAS. O

citoplasma desta célula contém uma grande quantidade de mucossubstâncias PAS positivas (Fig. 10c, Tabela 1).

À medida que os oócitos VI crescem no estágio de vitelogênese avançada ocorre um acúmulo de grânulos de vitelo e uma notável redução à reação ao PAS. Esse vitelo fica armazenado em vesículas que não reagem ao PAS. A reação ao PAS ocorre em algumas vesículas dispersas pelo citoplasma, com maior concentração na periferia celular (Fig. 10d).

Os oócitos M reagem ao PAS, entretanto na região da periferia citoplasmática diminui a concentração de mucossubstâncias PAS positivas quando comparado ao oócito VA. Isso se deve ao fato do oócito M acumular mais grânulos de vitelo. A reação ao PAS nos oócitos M fica menos intensa e a reação se restringe à mucossubstâncias dispersas pelo citoplasma (Fig. 10e).

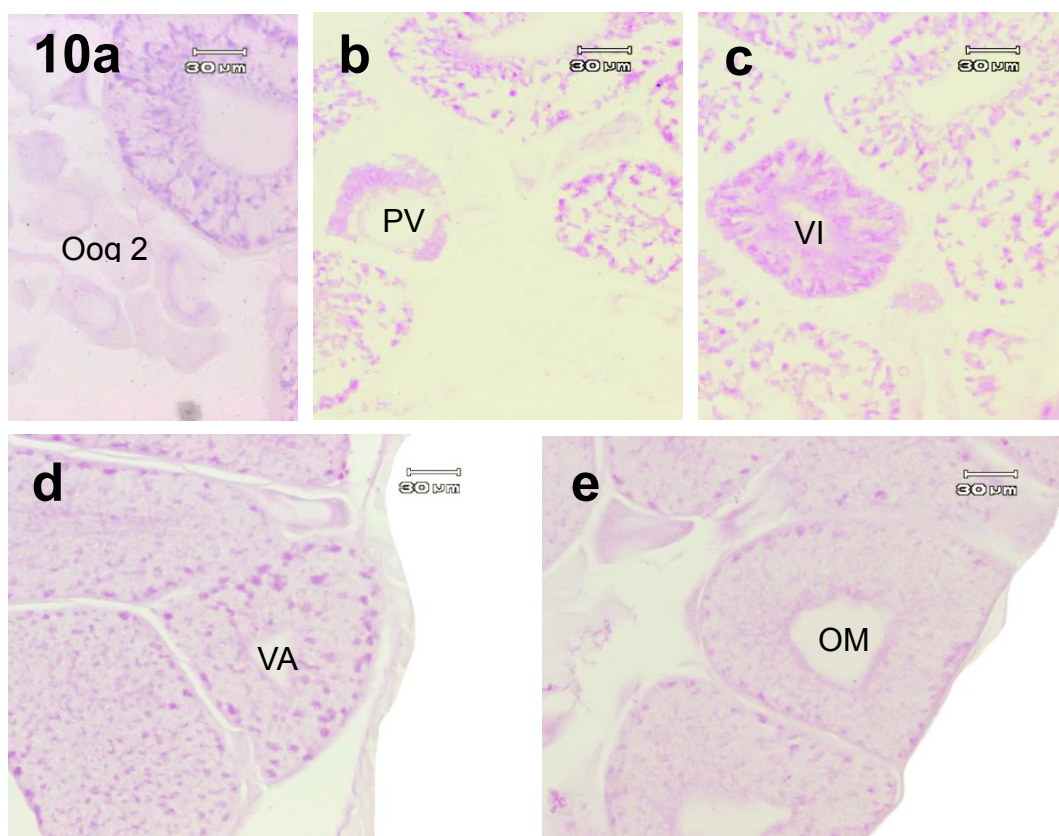


Fig. 10: Fotomicrografias do ovário de *Xiphopenaeus kroyeri* em diferentes fases de maturação: a - Oogônias 2 (Oog 2) PAS negativas; b - oócito pré-vitelogênico (PV) PAS fraco; c - oócito em vitelogênese inicial (VI) PAS muito intensa; d - oócito em vitelogênese avançada (VA) PAS intensa; e - oócito maduros (OM) PAS moderado. Reação ao PAS.

4.2. Hepatopâncreas

4.2.1. Morfologia geral do hepatopâncreas

O hepatopâncreas de *Xiphopenaeus kroyeri* é um órgão maciço revestido por uma cápsula de tecido conjuntivo. Este órgão ocupa grande parte da cavidade cefalotorácica, está localizado ventralmente ao ovário e organizado em dois lobos: direito e esquerdo, os quais envolvem o tubo digestório na altura da transição do estômago com intestino (Fig. 11). Cada lobo é constituído por uma série de ductos e túbulos secretores que correm paralelamente entre si em direção à periferia do órgão onde terminam em fundo cego.

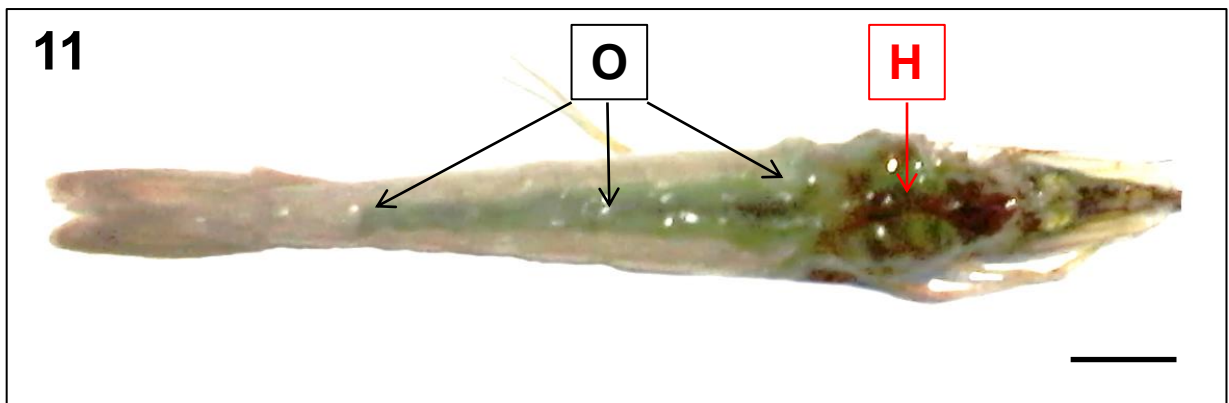


Fig. 11: Exemplar de *Xiphopenaeus kroyeri* ovário (O) e hepatopâncreas (H). Barra 1cm.

O túbulo hepatopancreático em *X. kroyeri* está revestido por um epitélio pseudoestratificado que consiste de cinco tipos celulares, sendo eles, célula E (embrionária), célula F (fibrilar), célula R (reabsortiva), célula B (vesicular) e célula M (basal) (Figs. 12 e 13).

As células E são cubicas e indiferenciadas, apresentam núcleo arredondado e proeminente com nucléolo e citoplasma basófilo. Esse tipo celular apresenta região de borda em escova e está localizado na região distal do túbulo hepatopancreático. Por se tratar de uma célula indiferenciada ela é responsável pela divisão mitótica para renovação do epitélio tubular (Figs. 12 a, d; 13a).

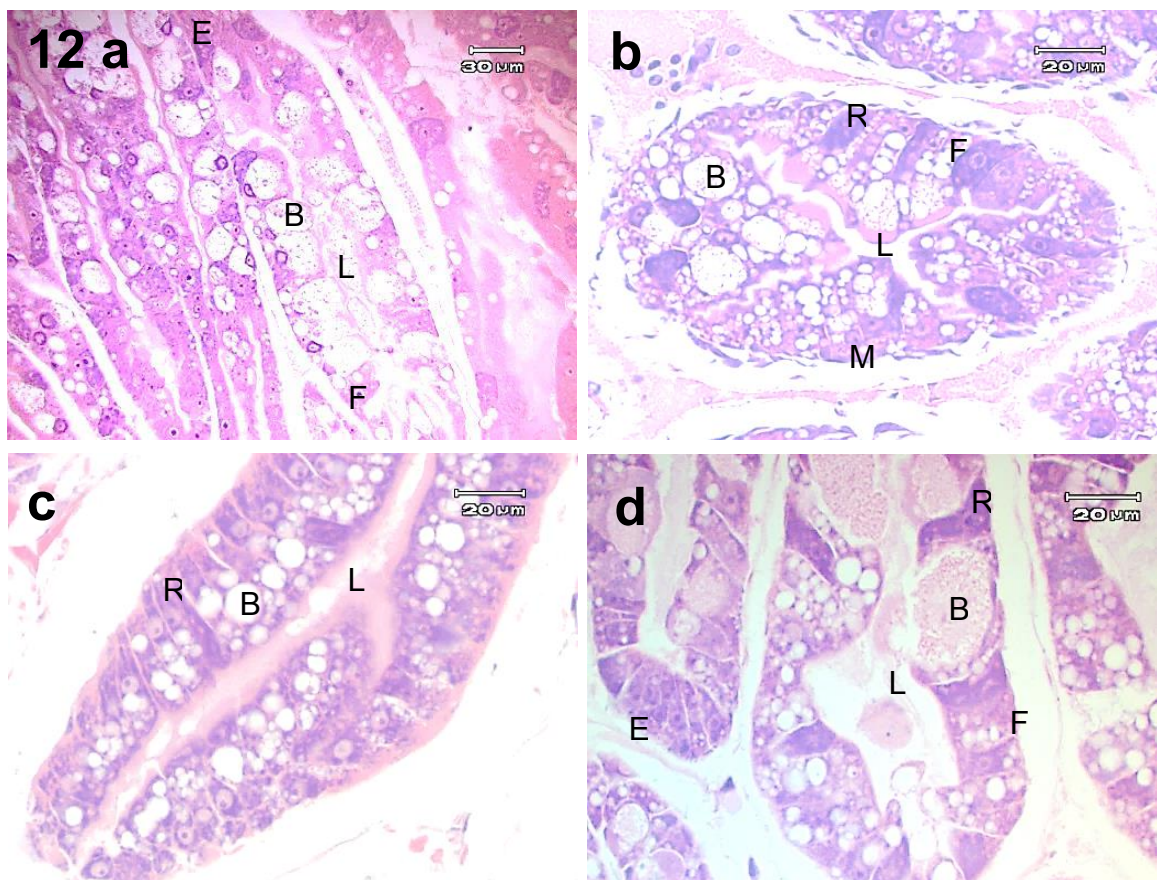
As células M apresentam formato triangular de ápice arredondado, núcleo central e arredondado com vários nucléolos, e o citoplasma apresenta intensa basofilia. Essa célula apresenta sua base apoiada na membrana basal e seu ápice não alcança o lúmen do túbulo hepatopancreático, portanto, não apresenta região

apical de borda em escova. Essa é o tipo celular menos frequentes no epitélio hepatopancreático (Figs. 12b; 13b)

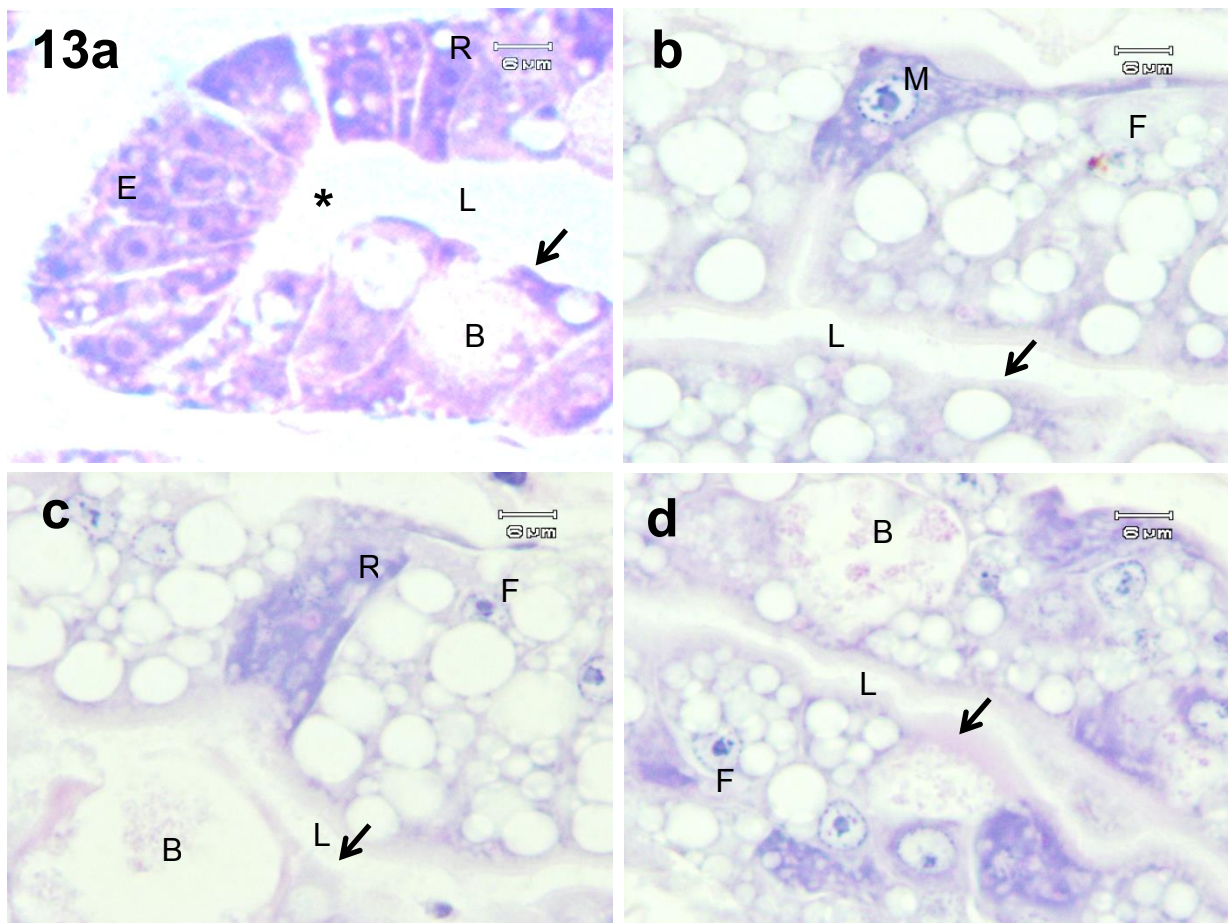
As células F são cilíndricas ou triangulares com ápice arredondado. Esta célula apresenta região conspícua de borda em escova e núcleo grande e arredondado, além do citoplasma com intensa basofilia quando comparado aos demais tipos celulares (Figs. 12 e 13)

As células R são cilíndricas e apresentam uma conspícua borda em escova. Essas células apresentam núcleo arredondado predominantemente basal. O citoplasma dessas células apresenta muitos vacúolos subapicais característicos. Esse tipo celular é o mais numeroso (Figs. 12 e 13)

As células B apresentam formato globular com núcleo basal oval ou achatado. Seu citoplasma apresenta vários vacúolos apicais pinocíticos e um grande vacúolo subapical. O vacúolo subapical ocupa a maior parte do citoplasma e é característico deste tipo celular. Essas células B são abundantes por toda a extensão dos túbulos secretores (Figs. 12 e 13).



Figs. 12 a, b, c, d: Células do epitélio do Hepatopâncreas: células R – reabsortiva (R), Lúmen (L), células B – vesiculares (B), células F – fibrilares (F), células embrionárias (E) e célula M (M). Hematoxilina/Eosina.



Figs. 13 a, b, c, d: Células do epitélio do Hepatopâncreas: células R – reabsortiva (R), Lúmen (L), células B – vesiculares (B), células F – fibrilares (F), células embrionárias (E), célula M (M) região da borda em escova (setas) e região distal do tubo (*). Hematoxilina/Eosina.

4.2.2. Morfologia do hepatopâncreas nos diferentes estágios de maturação ovariana

O epitélio dos túbulos hepatopancreáticos em *X. kroyeri* consiste em cinco tipos celulares (células R, M, E, F e B) conforme descrição anterior, porém o presente estudo analisou apenas as células R (reabsortivas), células B (vesiculares) e células F (fibrilares), nos diferentes estágios de maturação ovariana, pois são as células do hepatopâncreas diretamente relacionadas com aspectos da reprodução em crustáceos.

A maturação ovariana em *X. kroyeri* foi avaliada considerando os estágios relatados anteriormente: imaturo, quando os animais ainda não atingiram a maturidade sexual; pré-maturo; maturação inicial; maturação avançado; e maduro. Com relação ao lúmen do tubo hepatopancreático, ressalta-se que a borda em escova apresenta reação forte ao PAS + AB (2,5) em todos os

estágios de maturação ovariana exceto nos indivíduos em estágio imaturo (Tabela 2).

Tabela 2. Reação das células hepatopancreáticas de fêmeas de *Xiphopenaeus kroyeri* ao teste histoquímico, PAS+AB (2,5). Intensidade da reação: reação negativa ---; reação fraca +/-; reação moderada ++; reação intensa +++.

Estágio	imaturo	pré-maturo	maturação inicial	maturação avançada	maduro
Células R	---	+++	++	+/-	+++
Células F	---	---	---	---	---
Células B	---	+++	++	+/-	+++
Borda em Escova	---	+++	+++	+++	+++

O ovário no estágio imaturo, apresenta as células epiteliais do hepatopâncreas justapostas. As células B apresentam-se em maior quantidade do que os outros tipos celulares, além disso, essas células possuem volume celular variável, o que confere tamanhos diferentes entre elas (Fig. 14). Essas células apresentam marcação para polissacarídeos neutros (PAS negativa) nos vacúolos apicais (Fig. 14c e Tabela 2). As células R são encontradas ao longo dos túbulos hepatopancreáticos e apresentam-se de formas colunares preenchendo a altura total do epitélio e, portanto, todas as células mantêm contato com o lúmen do túbulo (Fig. 14). Essas células apresentam marcação negativa para o PAS + AB (2,5) por todo o citoplasma (Fig. 14c e Tabela 2). As células F são de difícil visualização e também são encontradas ao longo dos túbulos hepatopancreáticos (Fig. 14), porém não são frequentes e não apresentam marcação para glicoconjugados ácidos e polissacarídeos neutros (Fig. 14c e Tabela 2). Ao contrário das células R, as células F, na maioria das vezes, não atingem o lúmen.

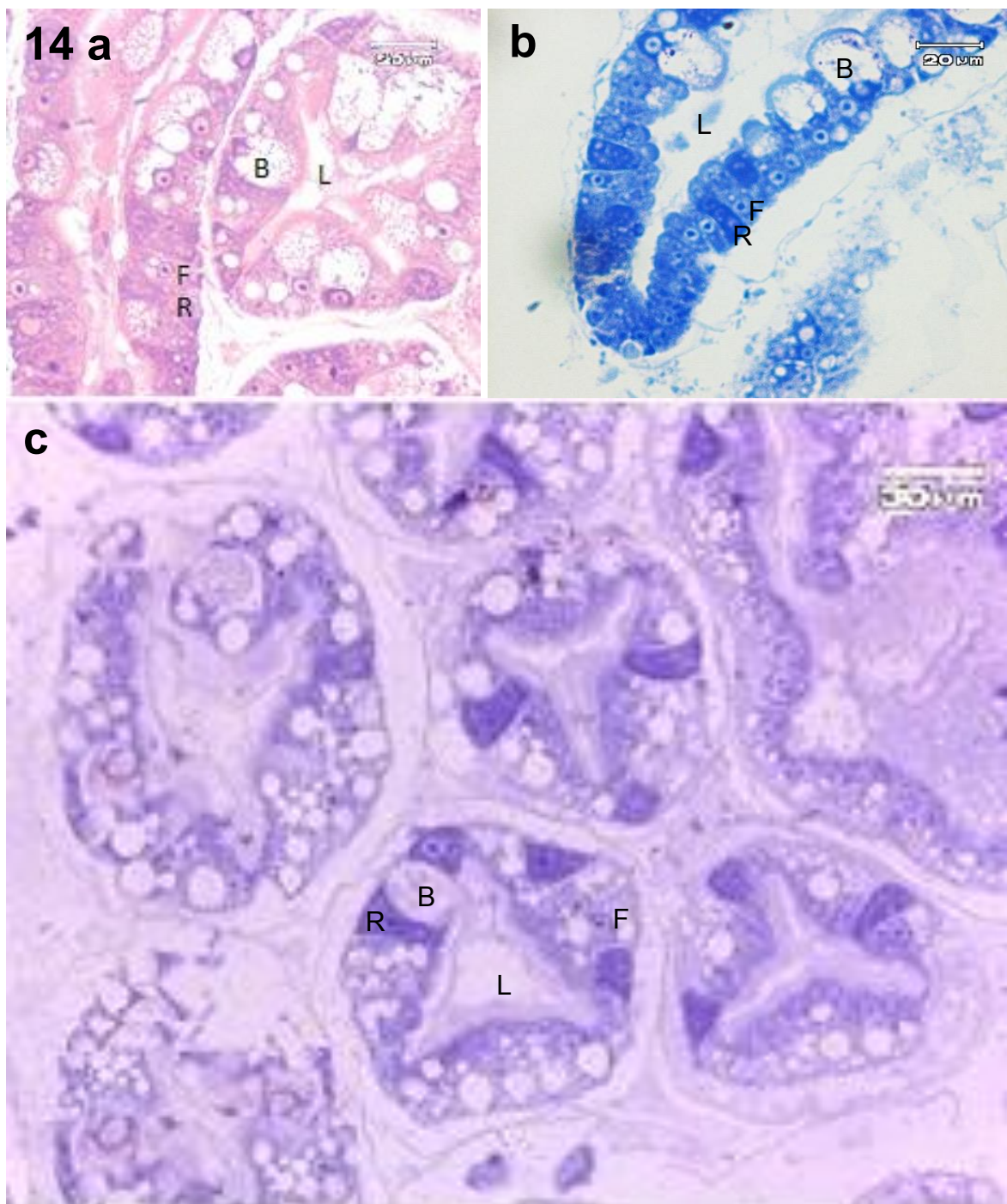


Fig. 14: Células do hepatopâncreas (ovário imaturo). a: H/E; b: Azul de Toluidina; c: Reação histoquímica PAS + AB (2,5). Células B – vesiculares (B), Células R – reabsortivas (R), Células Células F – fibrilares (F), e Lúmen (L).

Nas fêmeas adultas, o estágio inicial do ciclo ovariano é o pré-maturo. Nesse estágio, o hepatopâncreas apresenta células B em grande número, com diferentes graus de vacuolização no citoplasma (Fig. 15). Esses vacúolos apresentam reação positiva para o PAS + AB (2,5) (Fig. 15 e tabela 2). As células R estão sempre em contato com o lúmen e se apresentam ao longo de todo o túbulo hepatopancreático e, apresentam reação positiva para o PAS + AB (2,5) (Fig. 15). As células F são de difícil visualização e algumas já apresentam características de células B, em início de vacuolização, não ocorreu reação para o PAS + AB (2,5) (Fig. 15c). As células F não apresentam reação aos glicoconjugados ácidos e polissacarídeos neutros (Fig. 15 e Tabela 2).

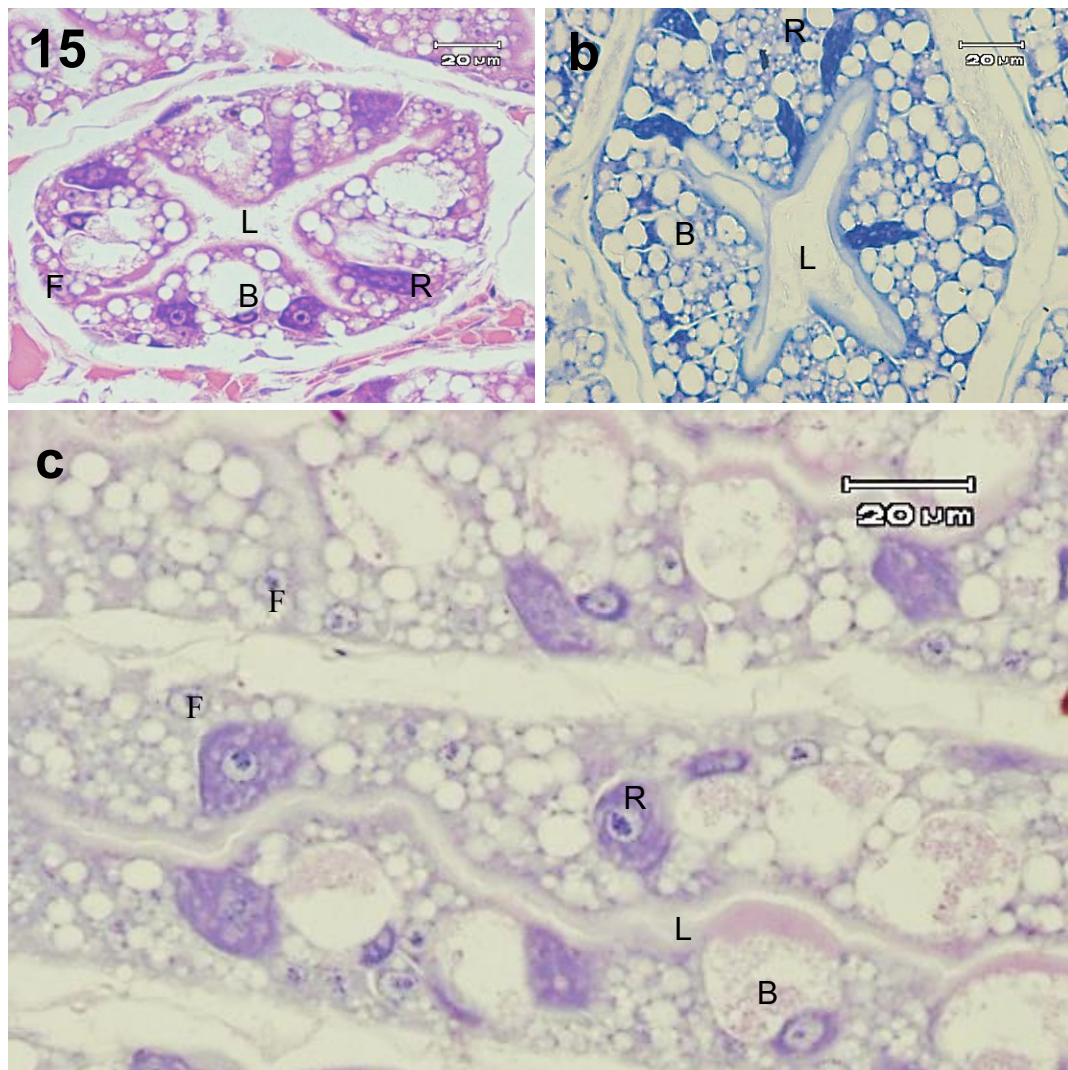


Fig. 15: Células do Hepatopâncreas (ovário pré-maturo). a: H/E; b: Azul de Toluidina; c: Reação histoquímica PAS + AB (2,5). Células B – vesiculares (B), Células R – reabsortivas (R), Células F – fibrilares (F), e Lúmen (L).

Em animais com ovários em maturação inicial e avançada, as células do túbulo hepatopancreático apresentam características próprias destas fases de maturação ovariana. As células B são frequentemente observadas quando comparadas aos outros tipos celulares. Essas células apresentam diferentes graus de vacuolização, permitindo a identificação de células com muitos vacúolos e células com apenas um grande vacúolo no citoplasma (Figs. 16 e 17). Ainda, essas células quando observadas em animais nos estágios de maturação inicial e avançada apresentam reação fraca para PAS+AB (2,5) (Figs. 16 e 17; Tabela 2). As células R apresentam formato poliédrico e o citoplasma se divide em duas regiões. A região basal basófila e a região apical que apresenta vacúolos muito pequenos (Figs. 16 e 17). À medida que a maturação progride, a região apical da célula é de difícil visualização (Figs. 16 e 17). Nos animais em maturação inicial a célula R apresenta reação moderada para o PAS+AB (2,5) (Figs. 16 e 17; Tabela 2) e na maturação avançada apresenta-se fraca (Figs. 16 e 17; Tabela 2). As células F apresentam citoplasma apical com muitas vesículas de diferentes tamanhos, o que lembra o início da diferenciação desta célula em célula B (Figs. 16 e 17). Nestes estágios de maturação ovariana, as células F se distribuem ao longo de toda a extensão dos túbulos hepatopancreáticos e apresentam reação negativa para os gliconjugados ácidos e polissacarídios neutros (Figs. 16 e 17; Tabela 2).

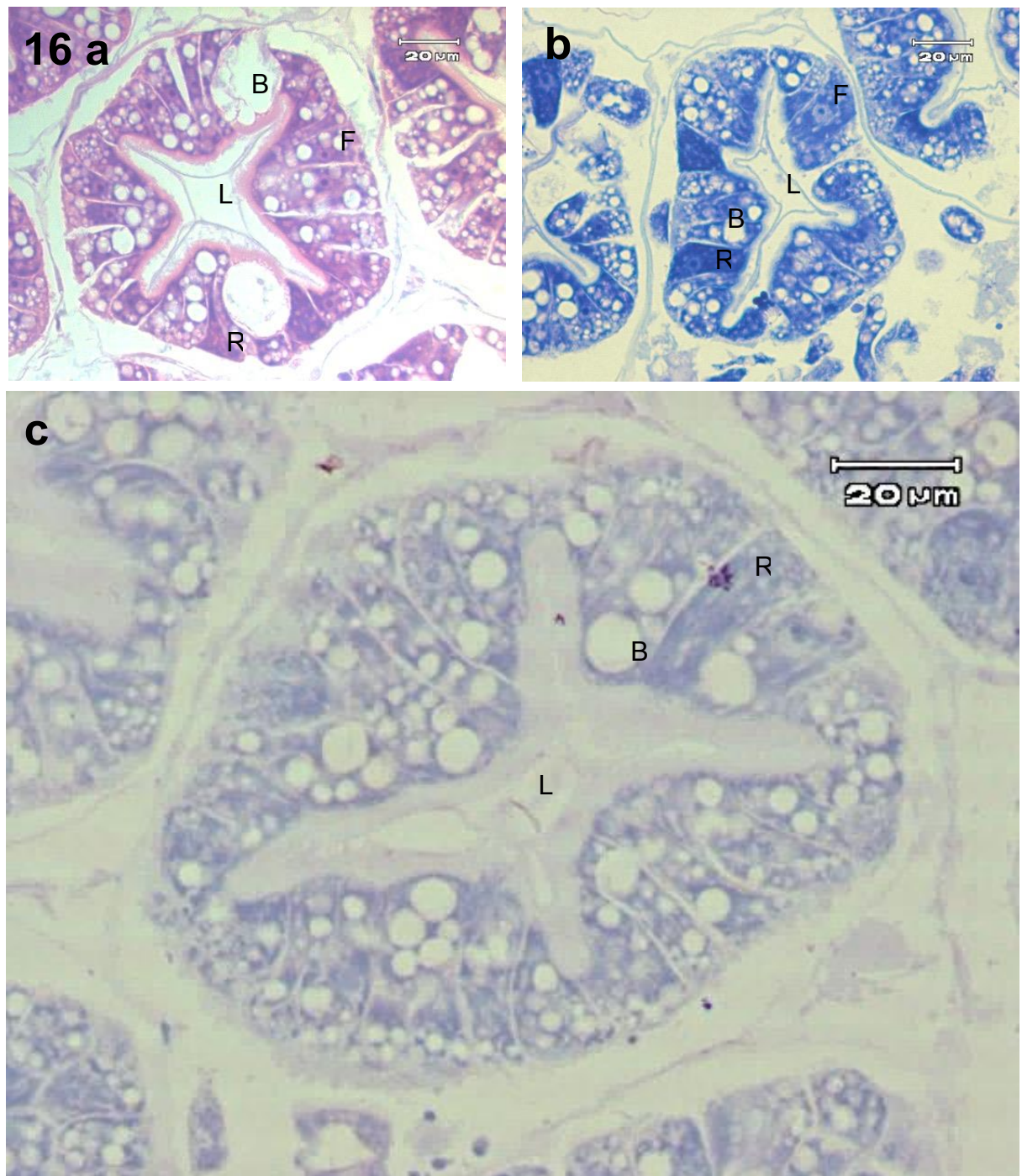


Fig. 16: Células do hepatopâncreas (ovário em maturação inicial). a: H/E; b: Azul de Toluidina; c: Reação histoquímica PAS + AB (2,5). Células F – fibrilares (F), Células R – reabsortivas (R), e Células B – vesiculares (B), e Lúmen (L).

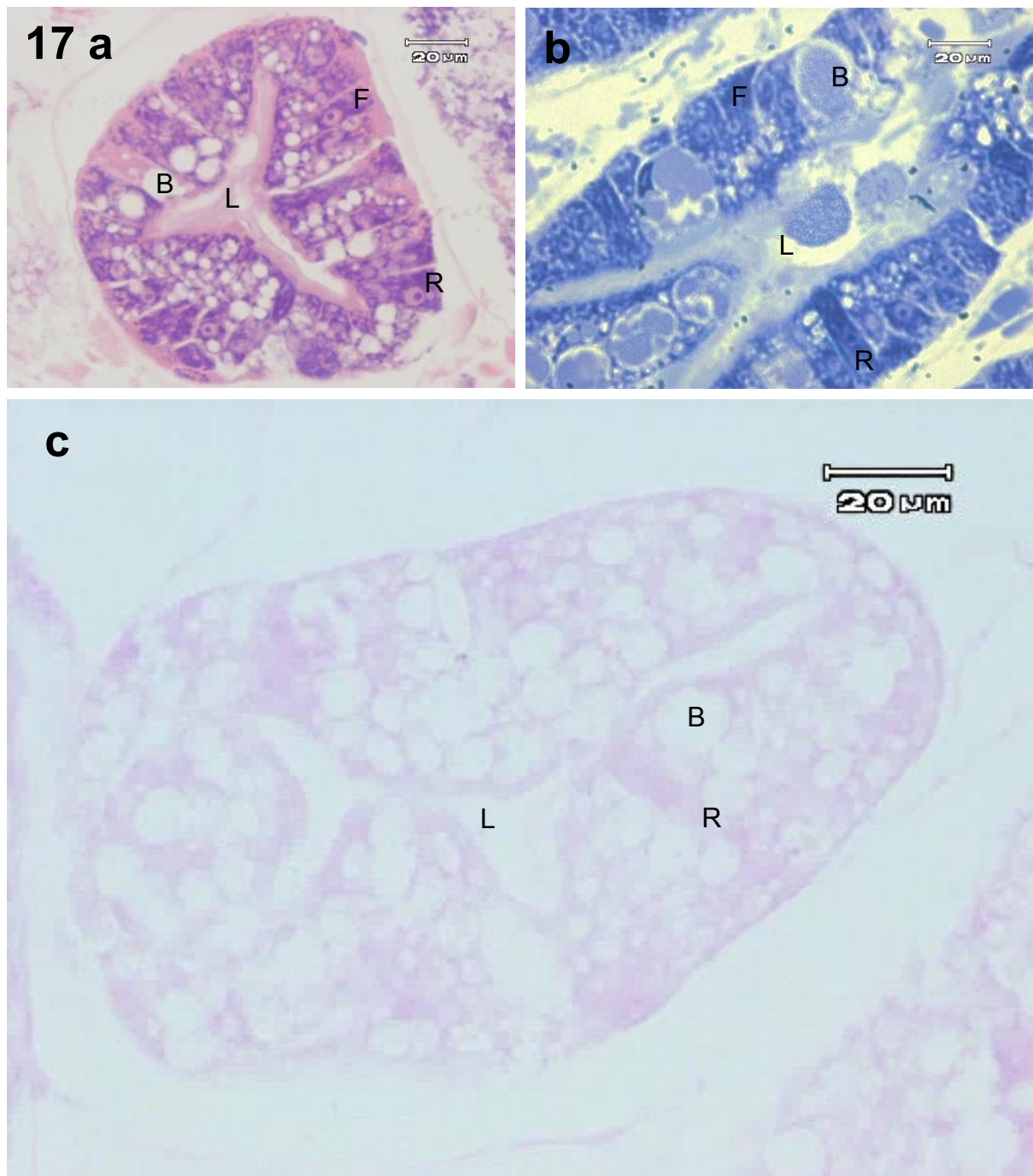


Fig. 17: Células do Hepatopâncreas (ovário em maturação avançada). a: H/E; b: Azul de Toluidina; c: Reação histoquímica PAS + AB (2,5). Células B – vesiculares (B), Células R – reabsortivas (R), Células F – fibrilares (F), e Lúmen (L).

Em animais com ovário maduro, as células B, F e R do hepatopâncreas encontram-se dispersas por todo o comprimento dos túbulos hepatopancreáticos (Fig. 18). As células B apresentam volume citoplasmático variável, na medida em que apresentam diferentes graus de vacuolização. Muitas células B exibem apenas um grande vacúolo apical (Fig. 18). As células R apresentam-se colunares e atingem toda a altura do epitélio (Fig. 18). As células R e B apresentam forte marcação para PAS + AB (2,5) (Fig. 18 e Tabela 2). As células F apresentam-se delgadas e algumas mostram diferenciação para células B, apresentando aumento da vacuolização apical (Fig. 18b). Essas células não apresentam reação ao PAS + AB (2,5) à semelhança dos demais estágios de maturação ovariana (Fig. 18 e Tabela 2).

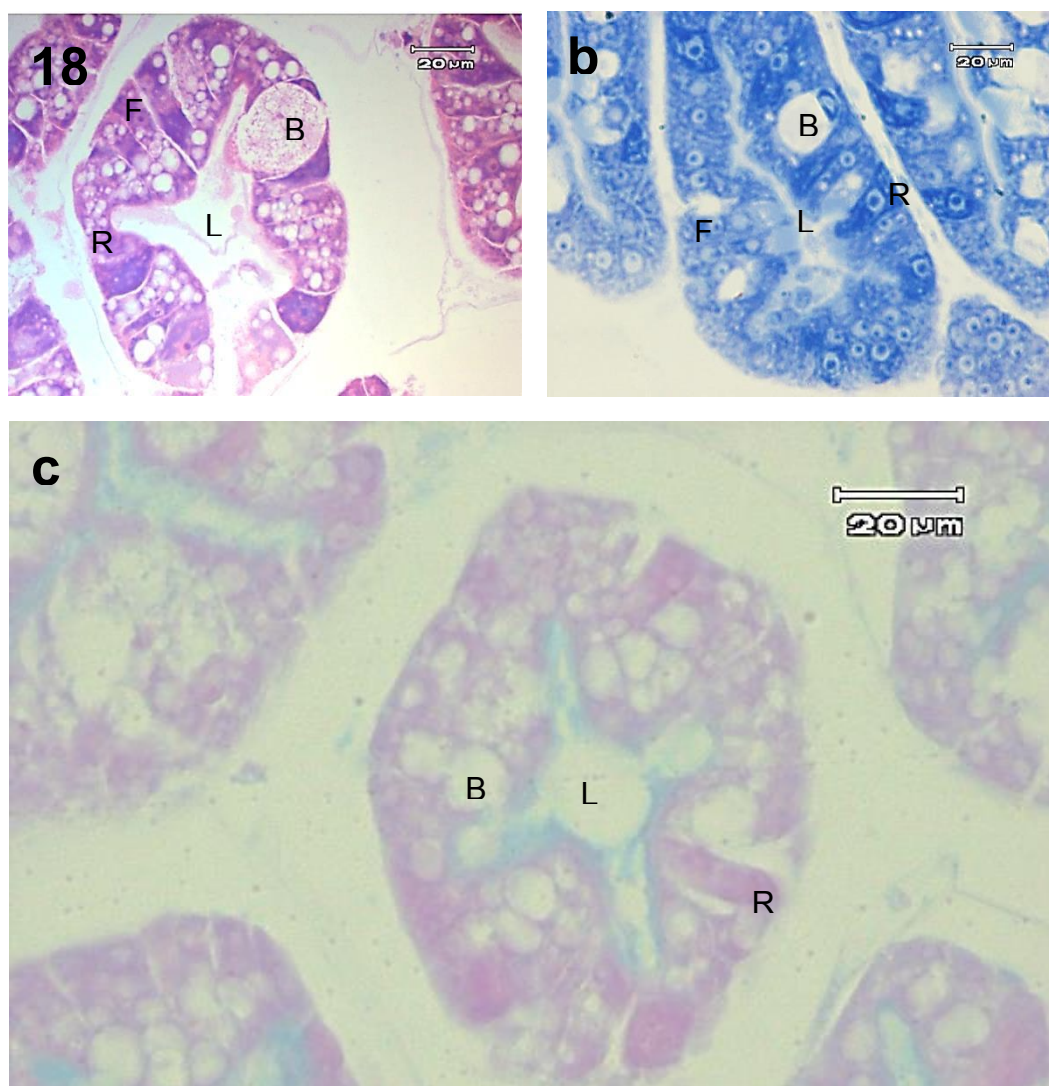


Fig. 18: Células do hepatopâncreas (ovário maduro). a: H/E; b: Azul de Toluidina; c: Reação histoquímica PAS + AB (2,5). Células R – reabsortivas (R), células F-fibrilares (F), células B – vesiculares (B), e Lúmen (L).

4.3. Imuno-histoquímica

4.3.1. Ovário

Durante a maturação ovariana de espécimes de *X. kroyeri* é possível observar a localização da vitelogenina (Vg) no ovário e no hepatopâncreas. Essa observação é demonstrada através de marcação imuno-histoquímica da vitelogenina em todos os estágios de maturação ovariana (IM, PM, MI, MA, M).

No ovário é possível identificar diferenças significativas entre as células que caracterizam este órgão: oogônias Tipo 1 e 2 (OOG 1 e OOG 2), oócitos pré-vitelogênico (PV), oócitos em vitelogênese inicial (VI), oócitos em vitelogênese avançada (VA), oócitos maduros (MA) e células foliculares. Todas estas células são sempre encontradas nos ovários, em maior ou menor quantidade, de acordo com o estágio de maturação em que a fêmea se encontra. Apesar desta distinta distribuição oocitária, o mesmo tipo celular apresenta as mesmas características morfológicas e imuno-histoquímicas para Vg, independente do estágio de maturação do ovário (Fig. 19), e as células foliculares apresentam as mesmas características.

O ovário IM, não apresenta marcação imuno-histoquímica nas oogônias tipo 1 e tipo 2, e as células foliculares também não reagem. Entretanto, os ovários PM apresentam oogônias tipo 2 com fraca marcação no citoplasma (Fig. 19). As células foliculares cúbicas ao redor da zona proliferativa e próximas às oogônias, não apresentam marcação imuno-histoquímica. Ainda nesse estágio PM, observam-se os oócitos pré-vitelogênicos, os quais apresentaram maior intensidade de marcação no citoplasma celular, bem como as células foliculares cúbicas, que estão justapostas à membrana plasmática dos oócitos PV, também apresentaram marcação imuno-histoquímica na região citoplasmática (Figs. 19 e 20).

Nos ovários MI e MA, como descrito anteriormente, apresentam distinções a respeito do tamanho da gônada e a distribuição/quantidade de oócitos no parênquima do órgão, assim as oogônias e oócitos PV possuem a mesma característica do estágio anterior. Os oócitos VI, comumente encontrados no estágio MI, apresentam forte marcação imuno-histoquímica citoplasmática com aspecto granular e com a aparência mais intensa quando comparada aos oócitos PV (Fig. 19). As células foliculares ao redor dos oócitos VI estão em processo de

pavimentação e possuem marcação imuno-histoquímica em seu citoplasma (Figs. 19 e 20).

Quando os ovários alcançam o estágio mais avançados de maturação, a quantidade de oogônias é reduzida e as poucas células observadas apresentam fraca marcação perinuclear. Poucas células em transição de oogônias para oócitos PV são observadas. Os oócitos PV e VI continuam a apresentar as mesmas características dos estágios anteriores e o ovário é tomado praticamente de oócitos VA e oócitos MA. Os oócitos VA também são comumente observados no ovário em maturação avançada apresentam moderada marcação imuno-histoquímica perinuclear e a marcação pelo citoplasma é granular e cada vez mais dispersa, com uma intensidade mais concentrada na região da membrana plasmática. As células foliculares pavimentosas ao redor destas células apresentam marcação no citoplasma e formam um cordão delimitando o oócito VA (Fig. 19). No estágio de ovário maduro, observa-se com mais frequência os oócitos MA, os quais apresentam cada vez menos marcação perinuclear. O citoplasma extenso apresenta fraca marcação imuno-histoquímica, restringindo-se apenas na região de membrana plasmática. As células foliculares estão mais pavimentosas e em marcação imuno-histoquímica menos intensa quando comparado com as células foliculares dos oócitos VA (Figs. 19 e 20).

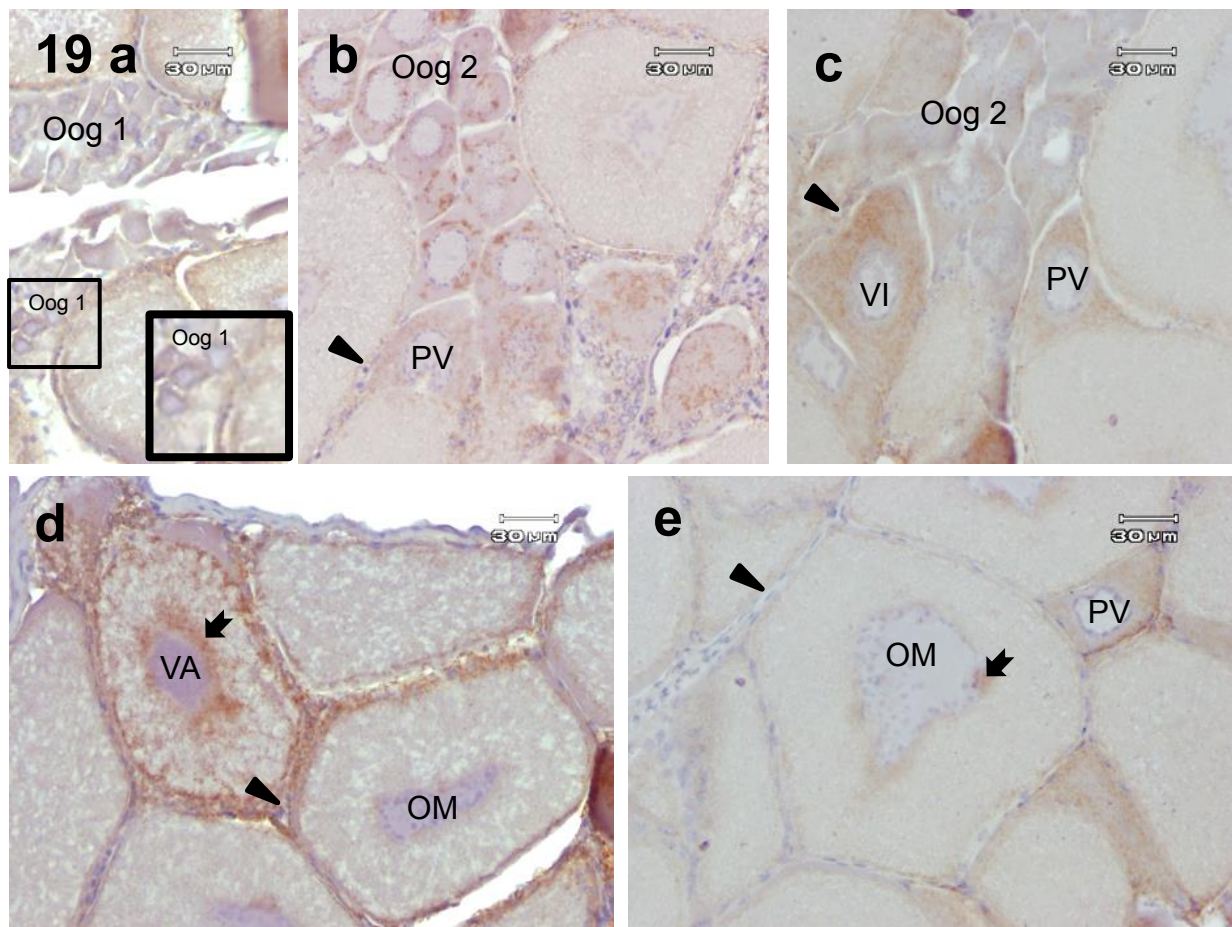


Fig. 19: Imuno-histoquímica no ovário durante maturação ovariana em *Xiphopenaeus kroyeri*. a: imaturo; b: pré-maturo; c: maturação inicial; d: maturação avançada; e: maduro: Oogônias tipo 1 (Oog 1); oogônias tipo 2 (Oog 2); oócito pré-vitelogênico (PV); oócito em vitelogênese inicial (VI); oócito em vitelogênese avançada (VA); oócito maduro (OM); células foliculares (▲); e marcação imuno-histoquímica perinuclear; (↩).

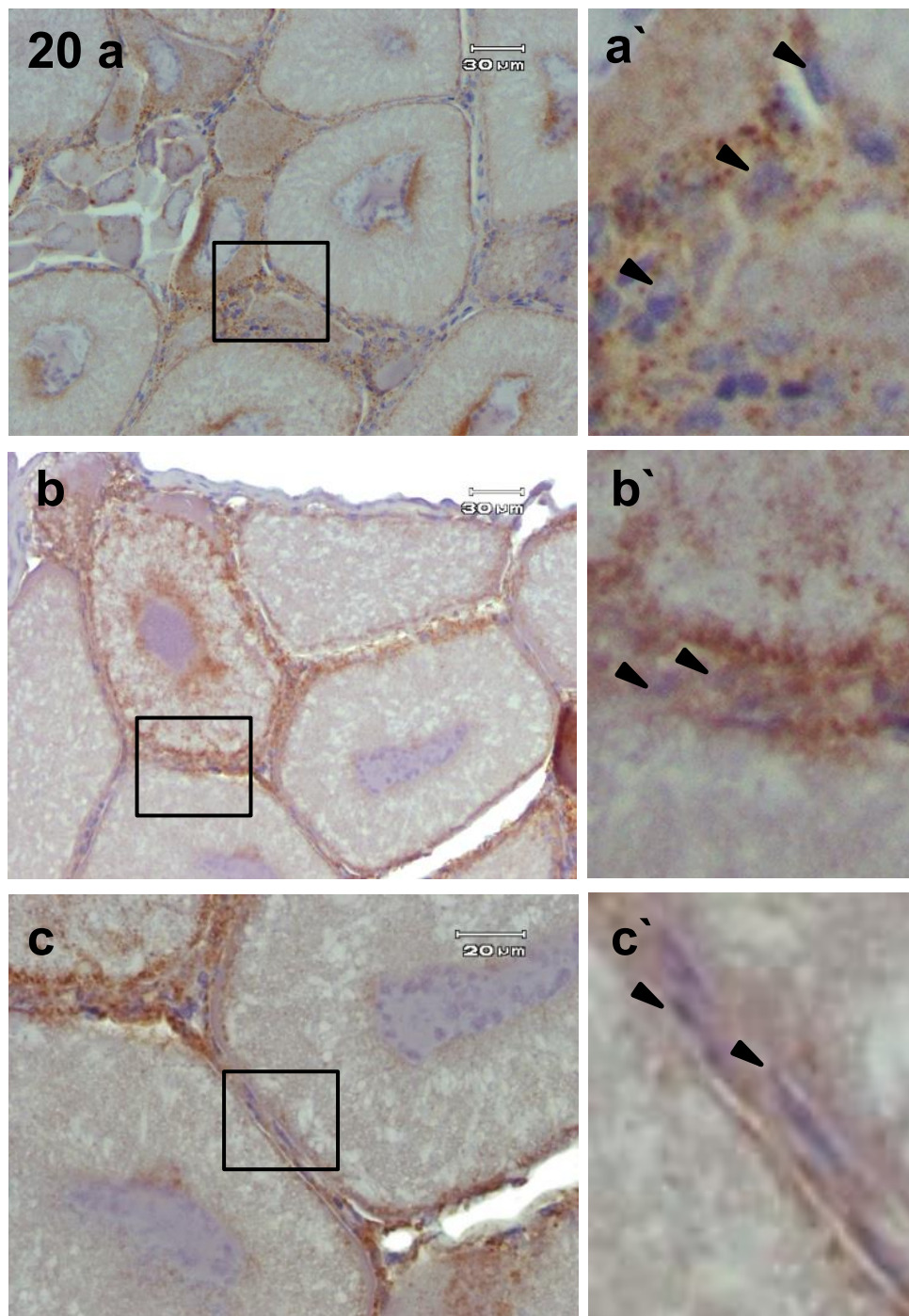


Fig. 20: Imuno-histoquímica no ovário durante maturação ovariana em *Xiphopenaeus kroyeri*, evidenciando o processo de pavimentação das células foliculares (▲.) a: células foliculares cúbicas; b: células foliculares em processo de pavimentação; c: células foliculares pavimentosas

4.3.2 Hepatopâncreas

No hepatopâncreas de fêmeas de *X. kroyeri*, durante todos os estágios de maturação ovariana, incluindo os espécimes imaturos, foi observada marcação imuno-histoquímica para Vg no epitélio pseudoestratificado colunar dos túbulos hepatopancreáticos (Figs. 21, 22, 23, 24 e 25). Dentre as células que compõem o epitélio hepatopancreático, as células R apresentam marcação imuno-histoquímica em quase todos os estágios de maturação ovarianos, exceto no estágio de maturação inicial (Fig. 23). As demais células do epitélio hepatopancreático, células E, F e B, apresentam marcação imuno-histoquímica durante a maturação ovariana (Figs. 21, 22, 23, 24 e 25). A região próxima ao final dos túbulos “cegos”, que apresenta células E, em geral, foi a que apresentou marcação imuno-histoquímica mais intensa (Figs. 21, 22, 23, 24 e 25).

Em animais com ovário imaturo, o hepatopâncreas apresenta forte marcação imuno-histoquímica nas regiões apicais das células F e B dos túbulos hepatopancreáticos, próxima ao lúmen (Fig. 21). As células R apresentam pouca marcação na região basal do túbulo próximo a hemolinfa (Fig. 21). As células da região próxima ao final do túbulo apresentam marcações mais intensas no citoplasma (Fig. 21).

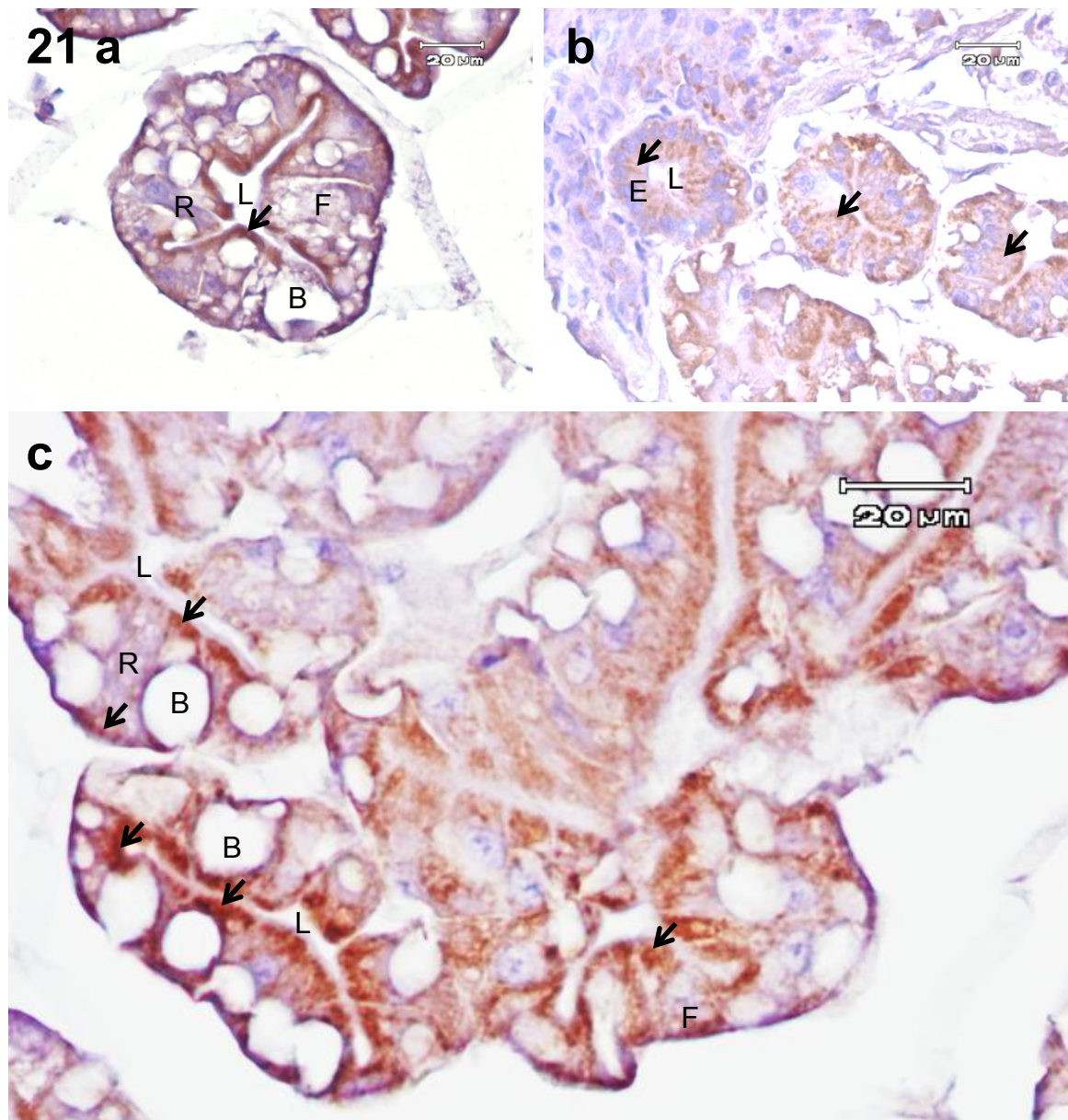
Nas fêmeas adultas, o estágio PM se caracteriza como o início da ciclo ovariano. Neste estágio o hepatopâncreas apresenta marcação imuno-histoquímica nas regiões apicais das células F e B, com menos intensidade em relação ao estágio imaturo (Fig. 22). As células R e M apresentam poucas marcações para Vg dispersas pelos respectivos citoplasmas (Fig. 22). Semelhante ao estágio imaturo, as células da região próxima ao final do túbulo apresentam marcações mais intensas no citoplasma (Fig. 22b).

Em animais com ovários em maturação inicial, o hepatopâncreas apresenta, em geral, marcação menos intensa por todo o epitélio. Entretanto, equivalente aos estágios anteriores, às células da região próxima ao final do túbulo apresentam marcações citoplasmáticas mais intensas (Fig. 23).

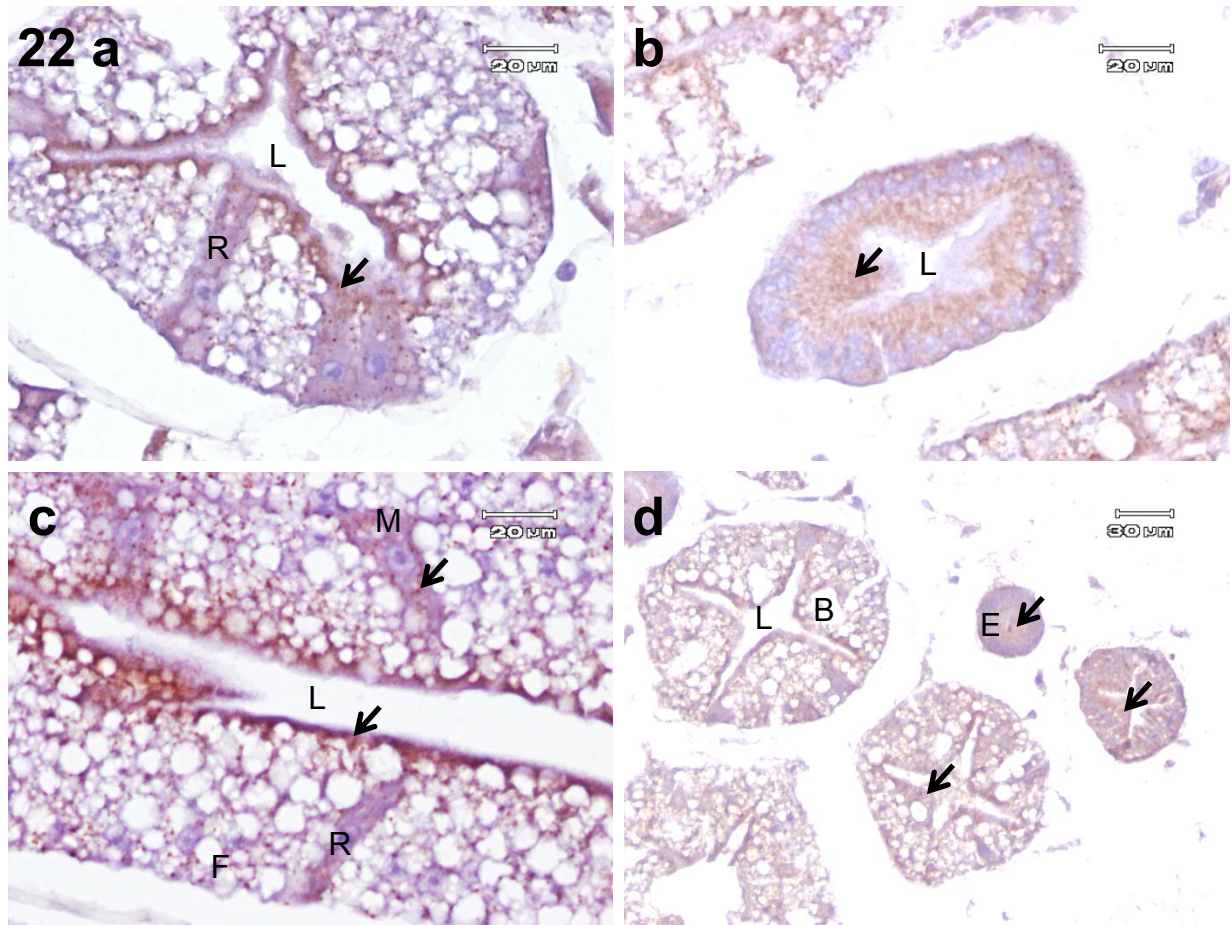
Em animais com ovários em maturação avançada, o epitélio hepatopancreático apresenta marcação imuno-histoquímica Vg mais intensa em relação ao estágio de maturação inicial, com destaque para as células R, as quais observam-se marcações na região basal (Fig. 24). Conforme evidenciado

nos estágios anteriores, às células da região próxima ao final do túbulo apresentam marcações mais intensas por todos os citoplasmas (Fig. 24).

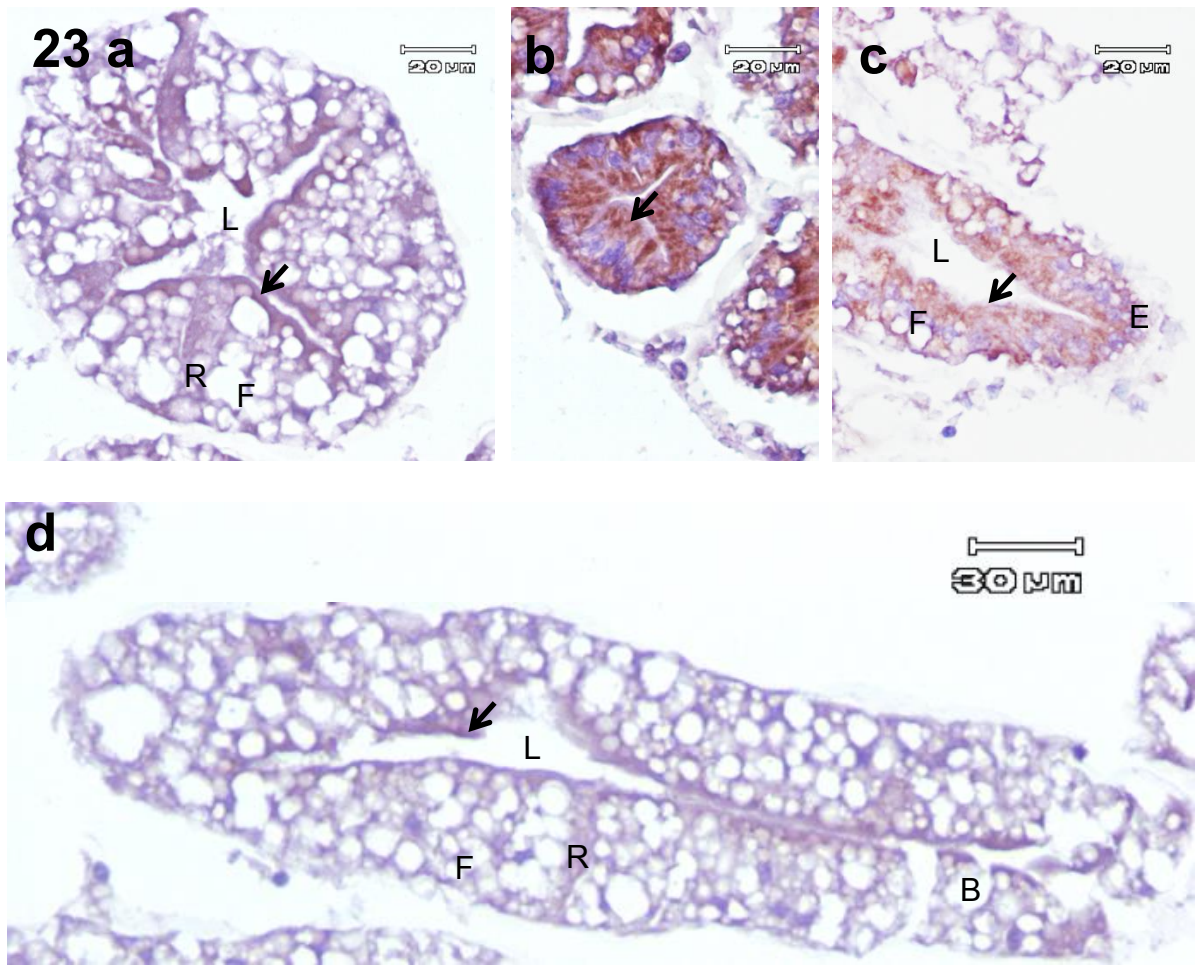
Em animais com ovário maduro, é observado aumento na marcação imuno-histoquímica de Vg na região basal do epitélio hepatopancreático (Fig. 25).



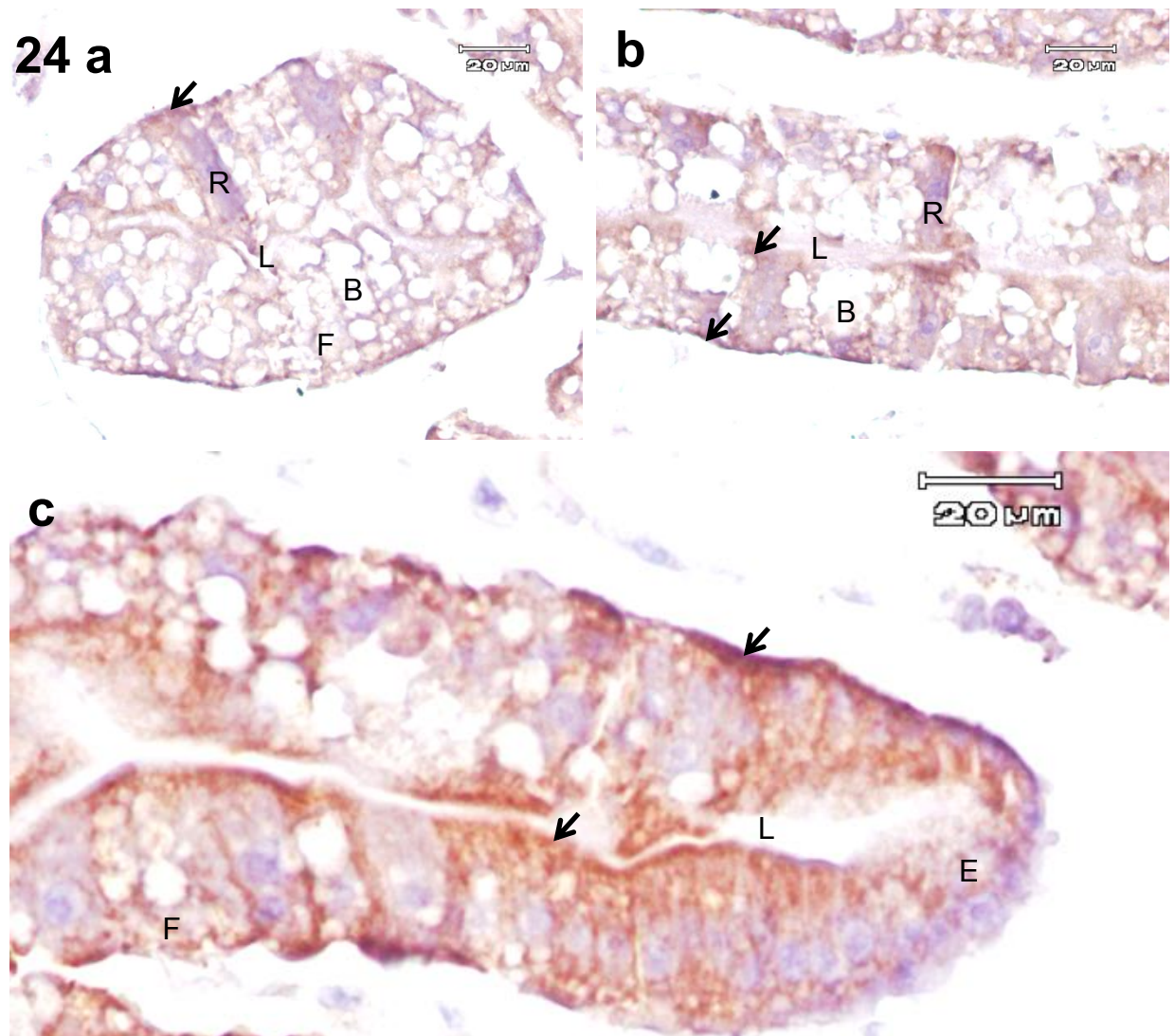
Figs. 21 a, b, c: Imuno-histoquímica no hepatopâncreas de fêmeas de *Xiphopenaeus kroyeri* (ovário imaturo). Células B – vesiculares (B), Células R – reabsortivas (R), Células F – fibrilares (F), Lúmen (L), células embrionárias (E), e marcação de Vitelogenina (setas).



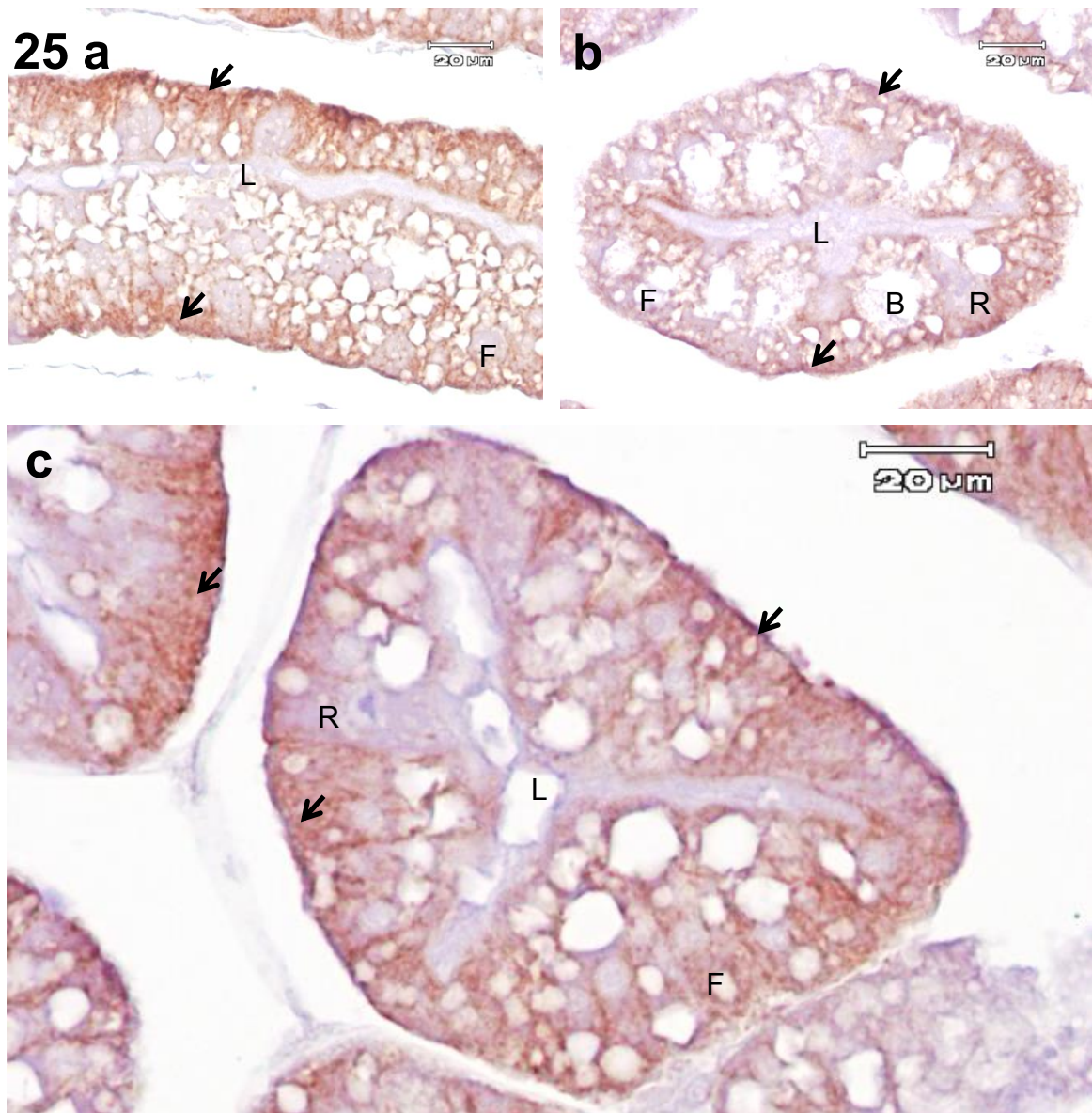
Figs. 22 a, b, c, d: Imuno-histoquímica no hepatopâncreas de fêmeas de *Xiphopenaeus kroyeri* (ovário pré-maturo). Células B – vesiculares (B), Células R – reabsortivas (R), Células F – fibrilares (F), célula M (M), células embrionárias (E), lúmen (L), e marcação de Vitelogenina (setas).



Figs. 23 a, b, c, d: Imuno-histoquímica no hepatopâncreas de fêmeas de *Xiphopenaeus kroyeri* (ovário em maturação inicial). Células B – vesiculares (B), Células R – reabsortivas (R), Células F – fibrilares (F), Lúmen (L), células embrionárias (E), e marcação de Vitelogenina (setas).



Figs. 24 a, b, c: Imuno-histoquímica no hepatopâncreas de fêmeas de *Xiphopenaeus kroyeri* (ovário em maturação avançada). Células B – vesiculares (B), Células R – reabsortivas (R), Células F – fibrilares (F), Lúmen (L), células embrionárias (E), e marcação de Vitelogenina (setas).



Figs. 25 a, b, c: Imuno-histoquímica no hepatopâncreas de fêmeas de *Xiphopenaeus kroyeri* (ovário maduro). Células B – vesiculares (B), Células R – reabsortivas (R), Células F – fibrilares (F), Lúmen (L), e marcação de Vitelogenina (setas).

4.4. Índices gonadosomático (IGS) e hepatossomático (IHS)

Os índices gonadosomáticos e hepatossomáticos que representam os pesos relativos dos ovários e hepatopâncreas nos diferentes estágios de maturação ovariana foram calculados como porcentagens do peso total do corpo dos animais ($\text{Índice} = ((P \text{ órgão}/P \text{ total}) * 100)$), determinando-se os (IGS) e os (IHS), respectivamente (Figs. 26 e 27). As fêmeas de *X. kroyeri* antes de iniciar a vida reprodutiva, ou seja, no estágio imaturo, o hepatopâncreas apresenta o maior IHS e, opostamente o ovário o menor IGS (Figs. 26 e 27).

As fêmeas adultas de *X. kroyeri* iniciam o ciclo reprodutivo (estágio pré-maturo) com o IHS maior que o IGS e, no decorrer da maturação ovariana, o IGS ultrapassa o IHS. Durante o processo da vitelogênese o IHS não apresenta diferença significativa em todos os estágios de maturação ovariana, todavia, o IGS apresenta diferenças significativas nos estágios de maturação ovariana, sendo que, no estágio maduro o ovário atinge o maior IGS (Figs. 26 e 27).

Quando comparados os IGS e IHS não apresentam valores inversamente proporcionais. No estágio pré-maturo nota-se que o IHS é maior que o IGS. No entanto, à medida que ocorre a maturação ovariana, esta relação de tamanho se inverte. Nos estágios de maturação inicial, avançado e maduro o IGS torna-se superior ao IHS. Ainda, notam-se diferenças significativas entre os IGS e IHS nos estágios de maturação avançada e maduro ($p < 0,01$) (Figs 26 e 27).

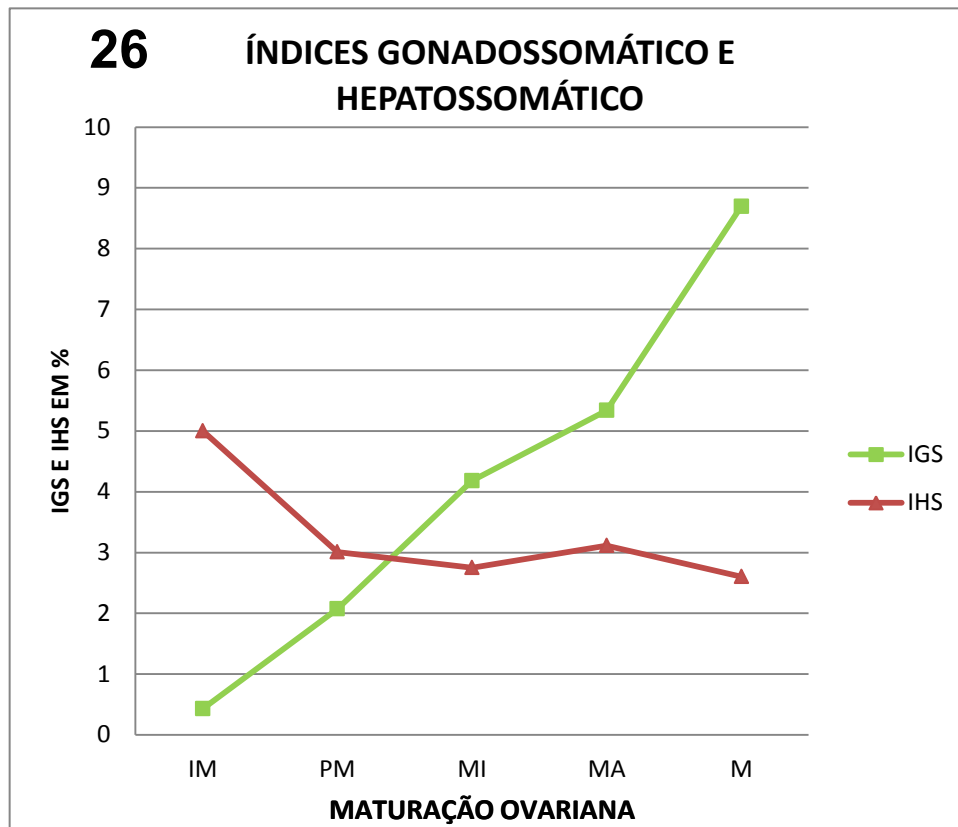


Fig. 26: Comparação entre os Índices Gonadosômicos (IGS) e Índices Hepatosômico (IHS) em fêmeas de *Xiphopenaeus kroyeri* durante maturação ovariana.

27

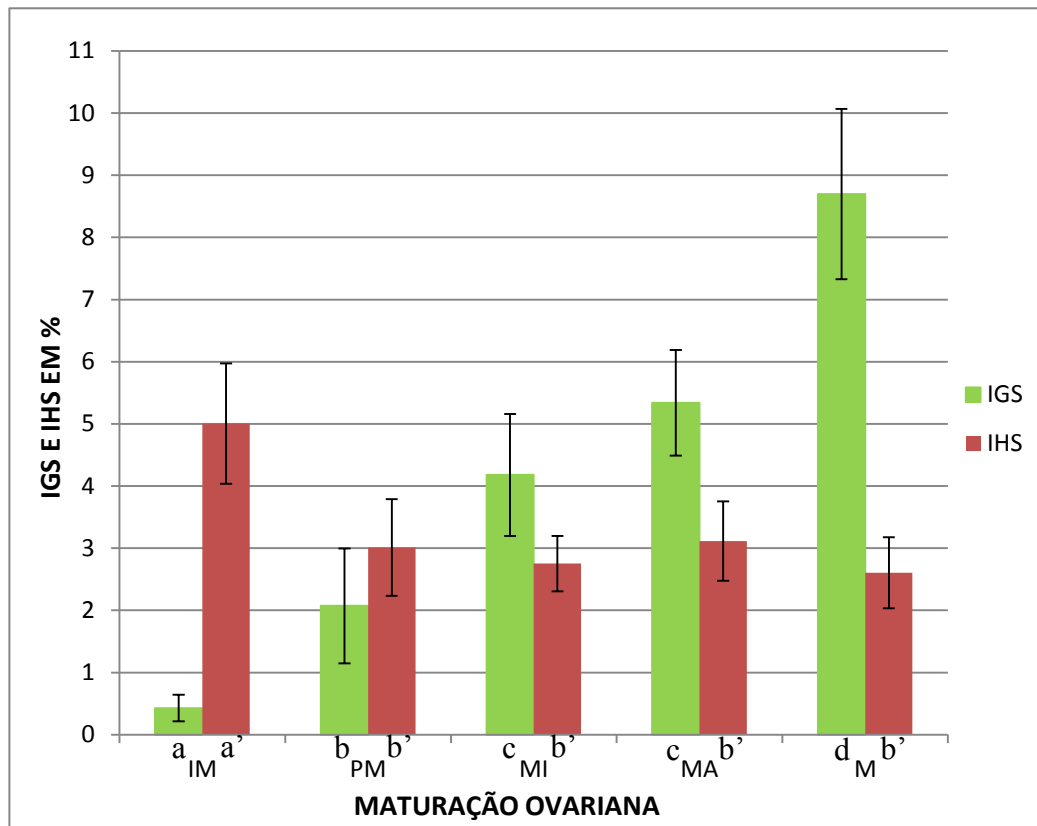


Fig. 27: Comparação entre os Índices Gonadosomáticos (IGS) e Hepatosomático (IHS) em fêmeas de *Xiphopenaeus kroyeri* durante maturação ovariana ($p < 0,01$) (IGS – $a < b < c = c < d$; IHS – $a' > b' = b' = b' = b'$).

Discussão

5. DISCUSSÃO

5.1. Análise da estrutura ovariana

Durante o ciclo reprodutivo nos crustáceos, as fêmeas apresentam diferentes estágios de maturação ovariana (CHANG e SHIH, 1995). O estudo do ciclo reprodutivo é fundamental para que haja melhor controle no crescimento e na reprodução dos animais mantidos em cativeiro e, ainda, para manutenção do estoque de reprodutores (KROLL et al., 1992; MEDINA et al., 1996). De acordo com Campos et al. (2009) a espécie *X. kroyeri* apresenta três estágios de maturação ovariana, além de um quarto estágio, o desovado. Os autores consideram como critério de classificação o tamanho e a coloração dos ovários durante o seu amadurecimento. Esse modelo também foi proposto por Dumont e D'Incao (2004) para a espécie *Artemesia longinaris* com três estágios de maturação ovariana. Por outro lado, outras espécies de camarão, como os da infraordem caridea, *Macrobrachium amazonicum* (RIBEIRO, 2006) e *Macrobrachium rosenbergii* (CHANG e SHIH, 1995) apresentam cinco estágios de maturação ovariana, e o *Macrobrachium acanthurus* (CARVALHO e PEREIRA, 1981) apresenta quatro estágios de maturação. A espécie da infraordem Penaeidea, *Metapenaeus monoceros* (ABRAHAN e MANISSERI, 2012) apresenta quatro estágios.

Assim, fica evidente que a classificação proposta por Campos et al (2009) é puramente macroscópica, carecendo de uma análise mais detalhada, para uma possível divisão do período “estágio II (vitelogênico)” de maturação ovariana em duas ou mais fases. A partir das observações macroscópicas realizadas no presente estudo foi possível sugerir a divisão do período “estágio II” de maturação ovariana em duas fases denominadas por nós: “maturação inicial” e “maturação avançada”. A análise deste período mostrou que o tempo de maturação é longo e apresenta características diversas em relação à cor e, principalmente, à disposição dos ovários ao longo do abdome. Assim, a fase “avançada” refere-se apenas à fase quando o ovário se distribui ao longo da metade caudal do abdome. Essa nova proposta foi fundamentada não apenas nas observações e descrição macroscópica, mas também, na classificação encontrada na literatura acima mencionada de outras espécies de camarões, que apresentam características semelhantes à espécie *X. kroyeri*, como proposto por Siebert (2013) para *A. longinaris*. O autor discute a

classificação proposta por Dumont e D'Incao (2004) e propõem uma nova classificação morfológica embasada nas análises macroscópicas e microscópicas para os estágios de maturação ovariana. Além disso, o presente estudo apresentou um estágio macroscópico que não foi citado por Campos et al. (2009), o estágio imaturo, referente aos animais que não atingiram a maturidade sexual, conhecidos como juvenis. Em suma, para Campos et al. (2009) a espécie *X. kroyeri* apresenta quatro estágios macroscópicos de maturação ovariana, entretanto nossa proposta considera seis estágios.

O tamanho, cor e textura dos ovários de crustáceos modificam-se conforme seu grau de amadurecimento (O'DONOVAN et al., 1984) e sua coloração resulta do acúmulo de vitelogenina contendo pigmentos carotenoides (CHARNIAUX-COTTON, 1980). Em *X. kroyeri* (CAMPOS et al., 2009), assim como, em *Artemesia longinaris* (DUMONT e D'INCAO, 2004), em *Macrobrachium amazonicum* (RIBEIRO, 2006) e em *Macrobrachium acanthurus* (CARVALHO e PEREIRA, 1981), os ovários, à medida que amadurecem, apresentam coloração esverdeada. Já em *Macrobrachium rosenbergii* os ovários maduros apresentam coloração alaranjada (CHANG e SHIH, 1995). A diferença de cor apresentada pelas espécies citadas se deve ao tipo de carotenoide assimilado que, possivelmente, represente uma característica espécie-específico (RIBEIRO, 2006), sendo importante para futuros estudos filogenéticos.

Com relação às características microscópicas do ovário, estudos relacionados à maturação das células germinativas determinaram que as oogônias encontram-se na zona germinativa, ou zona de proliferação do ovário (BROWDY, 1989). Esta zona germinativa em *X. kroyeri* é observada na região centro-lateral do ovário. Estas observações diferem das características encontradas em *Artemesia longinaris* com a zona de proliferação na região medular ou central do ovário (SIEBERT, 2013). Em *Penaeus setiferus* (KING, 1948) e *Penaeus stylirostris* (BELL e LIGHTNER, 1988), observou-se a zona germinativa na região médio-ventral de cada lobo ovariano; e em *Penaeus indicus* notou-se a zona germinativa na região ventro-lateral dos ovários (SUBRAHMANYAM, 1963). Desta forma, a localização da zona germinativa pode variar entre as espécies de crustáceos decápodes. Em *X. kroyeri*, é possível observar que, a partir a zona germinativa, são produzidas as oogônias por mitoses. Observações semelhantes foram feitas em *P. stylirostris* (SHAIKMAHMUD e TEMBE, 1958), em *M. dobsoni* (VASUDEVAPPA, 1992), em *M. monoceros*

(ABRAHAN e MANISSERI, 2012), e em *A. longinaris* (SIEBERT, 2013). O movimento gradual das oogônias da medula em direção ao córtex do ovário, durante o seu desenvolvimento é claramente demonstrado neste estudo. Fato semelhante foi descrito pelos autores anteriormente citados, com relação à migração celular da zona germinativa em direção às demais áreas do ovário, independente da localização da zona germinativa. Assim, na medida em que as oogônias crescem, elas originam os oócitos, os quais passam por um processo de desenvolvimento, também conhecido com vitelogênese, até atingir o nível de oócito maduro.

Em relação às características celulares, Adiyodi e Subramoniam (1983) e Yano (1988) dividiram a oogênese em duas fases: proliferação e diferenciação. A fase de proliferação é responsável pela produção de oogônias, que por sucessivas divisões celulares, originam as oogônias. A fase de diferenciação ocorre a partir dos oócitos pré-vitelogênicos, que iniciam o processo de vitelogênese, até o completo desenvolvimento dos oócitos. De acordo com a proposta de maturação ovariana de Adiyodi e Subramoniam (1983) e Yano (1988), o camarão *X. kroyeri* apresenta a fase de proliferação no ovário em estágio pré-maturo de maturação e, a fase de diferenciação é observado no ovário nos estágios em maturação inicial e avançado e maduro, semelhante ao observado em *A. longinaris* (SIEBERT, 2013).

As observações histológicas do ovário de *X. kroyeri* nos diferentes estágios de maturação feitas por Campos et al. (2009) (Estágios segundo Campos et al. (2009): I, II, III e IV), resultaram em uma descrição pouco detalhada dos oócitos presentes nestes estágios. Os autores apresentam quatro fases de desenvolvimento oocitário, que são: oogônias, oócitos I, oócitos II e oócitos III. Entretanto, no presente trabalho, foram observadas seis fases de crescimento dos oócitos presentes nos ovários, nos diferentes estágios de maturação (IM, PM, MI, MA e M) do camarão *X. kroyeri*. Os tipos celulares propostos neste estudo, quando comparados com os tipos propostos por Campos et al. (2009), apresentam algumas divergências. A primeira é em relação à oogônia, nossa proposta divide essa categoria em duas: oogônia tipo I e oogônia tipo II. O primeiro tipo celular está localizado na zona proliferativa do ovário e é responsável pela manutenção das células germinativas. O segundo tipo celular, oogônia II, está na periferia da zona proliferativa e/ou na zona de crescimento Morfologicamente esse tipo celular é diferente em relação ao primeiro, como apresentado nos resultados desta tese e semelhante à descrição feita em

outros camarões penaeídeos como em *Penaeus penicillatus* (OLIVEIRA et al., 1999), e em *Metapenaeus monoceros* (ABRAHAM e MANISSERI, 2012). Os oócitos pré-vitelogênicos semelhantes aos oócitos I, os oócitos em vitelogênese inicial e avançada correspondem aos oócitos II, e os oócitos maduros assemelham-se aos oócitos III. A segunda diferença é em relação aos oócitos II descritos por Campos et al. (2009). Os oócitos II apresentam características microscópicas pouco específicas, que mediante a análise mais criteriosa neste estudo, revelaram características celulares que levam a separação desta categoria de células em duas novas categorias, por nós, denominadas de oócito em vitelogênese inicial (VI) e oócito em vitelogênese avançada (VA), e por fim o oócito III assemelha-se ao oócito maduro. Classificação semelhante de oócito em VI e VA também foram descritas para outras espécies de camarão, como em *Macrobrachium acanthurus* (CARVALHO e PEREIRA, 1981), em *Penaeus kerathurus* (MEDINA et al., 1996) em *Macrobrachium amazonicum* (RIBEIRO, 2006), em *Metapenaeus monoceros* (ABRAHAM e MANISSERI, 2012) e em *Artemesia longinaris* (SIEBERT, 2013). Nesse estudo propusemos que o ovário de *X. kroyeri* apresenta seis estágios de maturação: imaturo, pré-maturo, maturação inicial, maturação avançada, maduro e desovado, esse ultimo não foi observado no presente estudo, mas foi considerado pois há descrição no estudo realizado por Campos et al. (2009).

O ovário do *X. kroyeri* no estágio imaturo apresenta apenas oogônias tipo I e tipo II. São raros os trabalhos que descrevem esse estágio ovariano em decapoda, foi observado em *Parastacus defossus* (NORO et al., 2008) e em *A. longinaris* por (SIEBERT, 2013). A maioria dos estudos em decápodos (QUINTERO e GRACIA, 1998; OLIVEIRA et al., 1999; HUANG et al., 2010; ABRAHAM e MANISSERI, 2012) incluindo o realizado por Campos et al. (2009) em *X. kroyeri*, usam o termo “imaturo” para ovários no começo do ciclo de maturação, esse estágio para nós, corresponde ao pré-maturo, e os animais considerados imaturos são aqueles que não atingiram a maturidade sexual, conhecidos com juvenis. Portanto, as fêmeas imaturas possuem ovários, mas ainda não entraram em atividade reprodutiva.

O ovário pré-maturo de *X. kroyeri* apresenta os tipos celulares denominados de oogônias tipo I e tipo II e oócitos pré-vitelogênicos, assemelhando-se as observações feitas por Campos et al. (2009), porém com a distinção das oogônias, como citado anteriormente. Essas células apresentam características muito

semelhantes às observadas em outros Peneideos: *Penaeus penicillatus* (OLIVEIRA et al., 1999) e *Metapenaeus monóceros* (ABRAHAN e MANISSERI, 2012), mas em outras espécies de camarões como na infra-ordem Caridea: *Macrobrachium amazonicum* (RIBEIRO, 2006), *Macrobrachium rosenbergii* (CHANG e SHIH, 1995) e *Macrobrachium acanthurus* (CARVALHO e PEREIRA, 1981), no estágio pré-vitelogênico apenas as oogônias estão presentes e os oócitos pré-vitelogênicos são observados a partir dos estágios vitelogênicos (VI e VA), quando o ovário já entrou no período de maturação.

O ovário de *X. kroyeri*, no estágio de maturação inicial e avançada, de uma forma geral apresenta: as oogônias tipo I e tipo II, oócitos pré-vitelogênicos, oócitos em vitelogênese inicial e oócitos em vitelogênese avançada. E à medida que o ovário amadurece, ocorre um visível aumento gradual no número das células mais desenvolvidas e diminuição das células nas fases iniciais. No entanto, Campos et al. (2009) não diferem os oócitos em vitelogênese inicial dos oócitos em vitelogênese avançada para *X. kroyeri*, conforme já mencionado anteriormente. Os autores descrevem os oócitos II com características semelhantes às descritas para as células em vitelogênese inicial. Este procedimento generaliza a categoria de oócito II e não descreve o segundo tipo de célula em vitelogênese observado no ovário, e que apresenta características diferentes dos oócitos II. Desta forma, o presente estudo, possibilitou identificar a presença de duas fases diferentes para oócitos em vitelogênese, sendo um, oócito em vitelogênese inicial, e outro em vitelogênese avançada, como descrito para outras espécies de camarões (CHANG e SHIH, 1995; MEDINA et. al., 1996; RIBEIRO, 2006; ABRAHAN e MANISSERI, 2012; SIEBERT, 2013).

O ovário maduro de *X. kroyeri* apresenta todas as células de desenvolvimento oocitário, ou seja, as oogônias tipo I e tipo II, os oócitos em diferentes fases de maturação e as células foliculares. Entretanto, o tipo de oócito mais comum encontrado no ovário maduro são os oócitos maduros. Estes oócitos apresentam muitos grânulos de vitelo distribuídos aleatoriamente por todo o citoplasma. Corroborando com as descrições para *Macrobrachium amazonicum* (RIBEIRO, 2006), *Macrobrachium rosenbergii* (CHANG e SHIH, 1995), *Macrobrachium acanthurus* (CARVALHO e PEREIRA, 1981) e *Pandalus kessleri* (QUINITIO et al., 1989). Outra característica dos oócitos maduros de diferentes espécies de

crustáceos é a presença as vesículas corticais, localizadas na periferia do citoplasma, constituindo a camada de vesícula cortical (GOUDEAU e LACHAISE, 1980; GOUDEAU, 1984; BELL e LIGHTNER, 1988). Este tipo de deposição lipídica foi encontrado por Campos et. al. (2009) e confirmado neste estudo nos oócitos maduros do *X. kroyeri*. Entretanto, essa característica morfológica não é comum a todas as espécies de camarões, assim, as vesículas corticais não foram encontrados em *Metapenaeus monóceros* (ABRAHAN e MANISSERI, 2012), em *Macrobrachium amazonicum* (RIBEIRO, 2006), em *Macrobrachium rosenbergii* (CHANG e SHIH, 1995), em *Macrobrachium acanthurus* (CARVALHO E PEREIRA, 1981) e em *Artemesia longinaris* (SIEBERT, 2013). A literatura sugere que as vesículas corticais, geralmente encontrados em algumas espécies de Peneídeos, e possuem a função de proteção oocitária, quando os ovos são lançados no ambiente marinho (CLARK et al., 1980; CLARK et al., 1990). Aparentemente o *X. kroyeri* necessita desta proteção para garantir o desenvolvimento embrionário e consequente sucesso reprodutivo.

Além das células germinativas (oogônias e oócitos), estão presentes no ovário as células foliculares, encontradas nos diferentes estágios de maturação do *X. kroyeri*. Estas células envolvem os oócitos na forma de epitélio, formando um cordão folicular. Esse envoltório folicular desempenha uma função fundamental para o desenvolvimento dos oócitos, ou seja, são essenciais na captação de vitelogenina e proteínas de vitelo para dentro dos oócitos nos crustáceos (ADIYODI e SUBRAMONIAM, 1983). Em *Penaeus japonicus* foi demonstrado que a vitelogenina pode ser sintetizada nas células foliculares, secretadas na hemolinfa e captadas pelos oócitos (YANO e CHINZEI, 1987). Segundo Chang e Shih (1995), o formato e o tamanho destas células estariam intimamente relacionados com a sua atividade biossintética. Com isso, a mudança morfológica pode levar a uma alteração fisiológica, proporcionando uma diminuição da atividade sintética, o que leva as células foliculares a desempenharem uma função mais relacionada com o revestimento dos oócitos, do que suas atividades biossintéticas. À medida que os oócitos se tornam maduros as células foliculares de *X. kroyeri* mudam de cúbicas para pavimentosas, também diminuem a síntese de vitelogenina, o que coincide com o comportamento desta célula descrito na literatura, como para *A. longinaris* (NUNES-SILVA, 2014). Deste modo, os oócitos completam seu amadurecimento

com o vitelo sintetizado pelo hepatopâncreas, como descrito para *M. amazonicum* (RIBEIRO, 2006). A presença e a plasticidade das células foliculares também foram descritas em outras espécies de decápodes como *Macrobrachium rosenbergii* (CHANG e SHIH, 1995), *Penaeus japonicus* (YANO e CHINZEI, 1987), *Callinectes sapidus* (JOHNSON, 1980) e *Artemesia longinaris* (SIEBERT, 2013; NUNES-SILVA, 2014).

As análises histoquímicas confirmaram as observações histológicas dos oócitos do camarão *X. kroyeri*. Através da reação com o ácido periódico de Shiff (PAS) confirmou-se a presença de seis tipos celulares observados no ovário. Esta técnica também foi utilizada para descrever e caracterizar as fases oocitária durante os estágios de maturação ovariana em outras espécies de camarões, como em *Aristaemorphia foliácea* (DESANTIS et al., 2001) e *Artemesia longinaris* (SIEBERT, 2013).

Além de evidenciar a presença de polissacarídios neutros, a reação com o PAS permite descrever algumas diferenças entre os tipos celulares presentes nos tecidos como observado no ovário de *X. kroyeri*. As oogônias não reagiram ao PAS, portanto, são consideradas PAS negativas. Os oócitos pré-vitelogênicos reagiram ao PAS, no entanto, essa reação foi fraca. Os oócitos em vitelogênese inicial apresentam uma intensa reatividade com o PAS, evidenciando que seu citoplasma contém uma grande quantidade de muco-substâncias, apresentando reação PAS positivas. Na medida em que os oócitos em vitelogênese inicial crescem e entram na fase de vitelogênese avançada ocorre um acúmulo de grânulos de vitelo. Esse vitelo fica armazenado em vesículas que não reagem ao PAS. Entretanto, o material citoplasmático nas proximidades dos grânulos de vitelo também apresenta muco-substâncias, que reagem ao PAS. Essa característica não é padrão nos camarões; pois em *A. longinaris*, o oócito em vitelogênese avançada apresenta uma reação PAS positiva mais intensa na região citoplasmática próxima ao núcleo (SIEBERT, 2013). Em *X. kroyeri* a reação ao PAS ocorre de forma diferente nos oócitos em vitelogênese avançada. Os oócitos maduros reagem ao PAS, essa reação fica menos intensa e se restringe a muco-substâncias PAS positivos dispersos pelo citoplasma.

A reação histoquímica do ovário de *X. kroyeri* permite relacionar à conversão de polissacarídios neutros em grânulos de vitelo durante as fases do desenvolvimento

dos oócitos. O oócito ao entrar na fase de vitelogênese inicial possui uma grande quantidade de polissacarídios neutros no citoplasma (PAS positivo). Este açúcar é fonte primária na produção de energia. Ao longo do desenvolvimento oocitário, ocorre à diminuição dos polissacarídios neutros (diminui a intensidade da reação PAS positivo), em contrapartida, a energia é utilizada para a síntese e armazenamento de vitelo. A vitelogênese endógena ocorre no citoplasma do oócito e é decorrente de atividades do envelope nuclear, retículo endoplasmático e complexo de Golgi (CARVALHO et al., 1998). Portanto, ao final do desenvolvimento dos oócitos percebe-se um crescimento do volume celular, juntamente com um aumento na quantidade de grânulos de vitelo e a diminuição dos polissacarídios neutros distribuídos pelo citoplasma.

Os resultados histoquímicos reforçam a nossa proposta de uma reclassificação celular, principalmente das oogônias tipo I e tipo II, e dos oócitos em vitelogênese inicial e em vitelogênese avançada, divergindo da classificação proposta por Campos et al. (2009) a respeito da oogônia e do oócito II. Com os resultados obtidos no presente estudo resumimos nossa discussão com uma tabela (3) comparando a classificação proposta pelos autores supracitados e nossa proposta em uma reclassificação sobre as características macroscópicas e microscópicas da maturação ovariana de *X. kroyeri*.

Tabela 3: Comparação entre a classificação realizada por Campos et. al. (2009) e a reclassificação realizados no presente estudo dos estágios de maturação macroscópicos e os tipos de células germinativas presentes no ovário de *X. kroyeri* -: reação PAS negativo; ± reação PAS fraco; +: reação PAS moderado; ++ reação PAS intensa, +++ reação PAS muito intensa.

Ovário	Campos et al. (2009)	Siebert et al. (2015)	Reação ao PAS
Características Macroscópicas (maturação)	---	Imaturo	
	Estágio I (PV- Imaturo)	Pré-maturação	
	Estágio II (vitelogênico)	Maturação inicial	
	---	Maturação avançada	
	Estágio III (ripe/maduro)	Maduro	
	Estágio IV (desovado)	Desovado	
Características Microscópicas (Tipos celulares)	Oogônias,	Oogônia 1	-
	---	Oogônia 2	-
	Oócitos pre-vitelogênicos, (OVI)	Oócito pré-vitelogênico	+/-
	Oócito II, (OVII)	Oócito em vitelogênese inicial	+++
	---	Oócito em vitelogênese avançada	++
	Oócitos maduros, (OVIII)	Oócito maduro	+

5.2. Hepatopâncreas

O hepatopâncreas participa da síntese exógena de vitelogenina, contribuindo diretamente no processo de maturação ovariana em *X. kroyeri*, além da importância deste órgão para o processo digestivo dos crustáceos, contudo, analisamos o perfil celular do epitélio hepatopancreático desta espécie durante a maturação ovariana. Diferenças nos padrões de mobilização de nutrientes no hepatopâncreas podem ser reflexos de diferenças nutricionais, reprodutivas ou do ambiente em que se encontram (CASTILLE e LAWRENCE, 1989). Sabe-se, portanto, que a ingestão de alimentos é um fator importante para a reprodução e pode afetar a composição do tecido hepatopancreático (CASTILLE e LAWRENCE, 1989). Dessa forma, observamos que o padrão no perfil celular hepatopancreático durante o ciclo reprodutivo de fêmeas de *X. kroyeri* assemelha-se a um ciclo celular digestório; já descrito para o hepatopâncreas de outras espécies de camarões (AL-MOHANNA e NOTT, 1989; RIBEIRO et al., 2014).

A estrutura morfológica do hepatopâncreas de *X. kroyeri* revela a presença de cinco tipos celulares no epitélio de revestimento dos túbulos hepatopancreáticos. Cada célula apresenta características inerentes à sua função de acordo com o proposto em outras espécies de decápodos (AL-MOHANNA et al., 1985a; AL-MOHANNA et al., 1985b; AL MOHANNA E NOTT, 1989; ICELY E NOTT, 1992; JOHNSTON et al., 1998; SOUZA E PETRIELLA, 2000; CORREA et al., 2002; FRANCESCHINI-VICENTINI et al., 2009; RIBEIRO et al., 2014; NUNES-SILVA, 2014).

Durante a maturação ovariana, observamos um comportamento inverso dos índices hepatossomático e gonadossomático. Morfologicamente, o padrão celular dos túbulos hepatopancreáticos durante o ciclo reprodutivo mostra o envolvimento das células durante os estágios de amadurecimento do ovário, semelhante ao descrito para o camarão *A. longinarius* (NUNES-SILVA, 2014), entretanto, segundo o IHS, o hepatopâncreas não apresenta participação principal no processo vitelogênico.

Nos animais imaturos, onde não se iniciou a maturação ovariana, os índices de IHS e IGS são opostos (elevado IHS e baixo IGS). Nesta fase, o hepatopâncreas tem como função principal, prover nutrientes para o crescimento do animal e não direcionar nutrientes para a maturação gonadal. Com isso, as células F e B são

responsáveis pela síntese de enzimas e digestão intracelular, respectivamente. Essas células são facilmente visualizadas, pois o hepatopâncreas está provendo nutrientes para o crescimento do animal. As células R apresentam-se da altura do epitélio o que sugere a captação de nutrientes diretamente do lúmen. Neste estágio, as células R não utilizam seus metabólitos para a maturação gonadal, mas para a muda e crescimento do animal, assim como as demais células.

No momento que os animais entram na fase adulta e inicia a maturação ovariana, o IHS começa a diminuir e o IGS começa a aumentar. Este fato está relacionado à mobilização inicial dos nutrientes das células do hepatopâncreas para as gônadas como proposto em *Artemesia longinaris* por Nunes-Silva (2014). Com isso, as células R começam a modificar seu comportamento. Quando a maturação ovariana está em seu início (estágio pré-maturo), as células R são cilíndricas e, em contato ao lúmen, pois captam nutrientes para, provavelmente, transportá-las para as gônadas. As células B contribuem para o fornecimento de energia que é derivado da digestão intracelular característica dessas células. Desta forma, como proposto em outros crustáceos por Dall (1975), as células B são mais abundantes no epitélio hepatopancreático e são derivadas das células F nos primeiros estágios do ciclo da digestão celular (AL-MOHANNA et al., 1985a), assim as células B são acumuladoras de nutrientes de reserva. As células F são difíceis de visualizar, e participam intensamente da produção e secreção de enzimas digestivas para o ciclo digestório do animal durante todos os estágios de maturação ovariana.

Nos estágios seguintes de maturação, ou seja, durante os estágios iniciais e finais de maturação ovariana, o IHS e o IGS começam a se inverter, principalmente com o aumento do IGS, uma vez que as gônadas avançam sua maturação e o hepatopâncreas mobiliza suas reservas para a maturação ovariana. Nesse processo, as células R começam a diminuir seu contato com o lúmen e, provavelmente, enviam seus estoques de lipídios e proteínas para as gônadas, conforme descrito por Nunes-Silva (2014). Esses estoques de nutrientes serão provavelmente utilizados para a conversão da vitelogenina em vitelo durante a maturação ovariana. As células B, que continuam presentes em maior número, participam desse processo convertendo energia para a maturação ovariana. Ao final da maturação ovariana, o IGS apresenta seu valor máximo, pois a gônada está pronta para reprodução, o IHS também apresenta elevação uma vez que a célula R

volta à aumentar seu contato com o lúmen e a captar novamente os metabólitos difusíveis do lúmen. As células B continuam em maior número, e passam a converter energia para o desenvolvimento do animal e para a desova, uma vez que não há mais necessidade para transferência de energia para a maturação ovariana. As características histoquímicas das células B e R indicam seus envolvimento com acúmulo de reservas durante toda a maturação ovariana, porém com mais intensidade nos estágios pré-maturo e maduro, quando o animal se prepara para o próximo ciclo ovariano.

5.3. Vitelogênese

Considerando a participação do ovário e hepatopâncreas na vitelogênese de *X. kroyeri*, avaliamos os índices hepatossomático (IHS) e gonadossomático (IGS) desta espécie nos diferentes estágios de maturação ovariana. Observamos o IGS aumenta consideravelmente, enquanto o IHS não apresenta uma variação significativa durante a maturação ovariana. Nos animais imaturos observamos o maior valor do IHS; nesse estágio, o hepatopâncreas tem a função de fornecer nutrientes para o crescimento e desenvolvimento do animal, até o momento do início da atividade reprodutiva.

Ao iniciar a atividade reprodutiva, observamos aumentar significativamente o valor do IGS do estágio imaturo para o estágio pré-maturo e diminuir significativamente o IHS do imaturo para o pré-maturo, além disso, observamos a presença da vitelogenina através da imuno-histoquímica, no ovário pré-maturo e sua ausência no ovário imaturo. Assim, o hepatopâncreas nos indivíduos pré-maturos tem a função de armazenar nutrientes e convertê-los à reprodução, que segundo CAHU et al. (1994), os lipídios ingeridos, principalmente em forma de triglicerídios, são convertidos no hepatopâncreas em lipídios polares e glicolipoproteínas, como no caso da vitelina e lipovitelina. Durante o ciclo reprodutivo, essas proteínas são transportadas aos ovários através da hemolinfa (CAHU et al., 1994; FATIMA et al., 2013; REVATHI et al., 2012).

Durante a maturação ovariana, o estágio de maturação inicial, apresenta o valor do IGS significativamente maior que no estágio pré-maturo, além disso, nesse estágio as células em vitelogênese inicial são mais frequentes e é o tipo celular que

apresenta a marcação imuno-histoquímica mais intensa para vitelogenina, característica semelhante ao encontrado em *Artemesia longinaris* (NUNES-SILVA, 2014).

Com o avanço no processo vitelogênico, observamos o aumento do IGS no estágio de maturação avançada em relação ao estágio de maturação inicial, também, os oócitos em vitelogênese avançada mais frequentemente que aos oócitos em vitelogênese inicial. Nos oócitos em vitelogênese avançada a marcação imuno-histoquímica é menos intensa para vitelogenina e o volume celular é maior, apresentando mais grânulos de vitelo distribuídos pelo citoplasma, desta forma, indica uma mobilização nutricional para a formação do vitelo. Destacamos que, os IHSs nos estágio supracitados não apresentam alterações significativas, indicando pouca participação hepatopancreática no processo vitelogênico desta espécie, sendo antagônico aos resultados encontrados em *A. longinaris* por Nunes-Silva (2014), no qual a autora observou maior participação do hepatopâncreas na maturação ovariana, e uma inversão significativa do IGS em relação ao IHS durante a maturação ovariana, assim, mostrando que o hepatopâncreas contribui significativamente com a vitelogênese exógena em *A. longinaris*. Entretanto, em *X. kroyeri* é pífia a participação do hepatopâncreas no processo de vitelogênese exógena, uma vez que este não demonstra alterações do IHS e, desta forma, consideramos que este órgão participe de forma secundária durante a vitelogênese.

Quando os ovários alcançam o estágio maduro apresentam a maior concentração de vitelo e o maior IGS, e em contrapartida o IHS no hepatopâncreas continua não apresentando alteração significativa, indicando pouca mobilização de nutrientes do hepatopâncreas à gônada. Em outras espécies como *Macrobrachium rosenbergii*, *Fenneropenaeus merguensis*, *Fenneropenaeus penicillatus*, *Litopenaeus vannamei*, *Litopenaeus setiferus*, *Farfantepenaeus aztecus*, *Artemesia longinaris*, foram observadas participações maiores dos hepatopâncreas durante os finais dos amadurecimentos dos respectivos ovários (CASTILLE e LAWRENCE, 1989; CAVALLI et al., 2001; WOUTERS et al., 2001; REVATHI et al., 2012; FATIMA et al., 2013; NUNES-SILVA, 2014).

Quanto a presença da vitelogenina em *X. kroyeri*, observamos marcação imuno-histoquímica positiva para vitelogenina nas células foliculares. Estas células, como discutido anteriormente, envolve os oócitos na forma de epitélio, formando um

cordão folicular. Esse envoltório folicular desempenha uma função fundamental para o desenvolvimento dos oócitos, ou seja, são essenciais na captação de vitelogenina, proteína que formará o vitelo no interior dos oócitos nos crustáceos (ADIYODI e SUBRAMONIAM, 1983). Entretanto, além de participarem da captação de Vg foi observado em *M. japonicus* (TSUTSUI et al., 2000) e *P. monodon* (HIRANSUCHALERT et al., 2013) expressão de mRNA de Vg nas células foliculares ao redor dos oócitos a partir da hibridização *in situ*. Esses achados comprovam que as células foliculares são as responsáveis pela síntese endógena de Vg nas espécies de camarões citadas e estão de acordo com a marcação imuno-histoquímica encontrada no citoplasma das células foliculares em *X. kroyeri*, indicando uma provável participação na síntese e/ou captação da vitelogenina visto pela marcação imuno-histoquímica positiva.

Além das células foliculares, em *X. kroyeri*, a marcação de Vg foi observada no citoplasma dos oócitos. A marcação mostrou-se distribuída pelo citoplasma e acompanhou o desenvolvimento oocitário. Entretanto, as oogônias tipo I não foram marcadas com a presença de Vg, em todos os estágios de maturação. Cabe destacar que este é o tipo celular predominante nos ovários imaturos, e, portanto, não houve marcação positiva para Vg nesse estágio de maturação. Além disso, o estágio imaturo apresenta o menor IGS, indicando que o ovário nesse estágio não participa da síntese endógena de Vg e, tão pouco, absorve Vg exógena. As oogônias tipo II mostraram marcação fraca, e na medida em que os oócitos crescem e mudam de fase, ocorre um aumento gradual na marcação, ou seja, os oócitos pré-vitelogênicos exibiram marcação mais forte que as oogônias tipo II, posteriormente, os oócitos em vitelogênese inicial mostraram marcações mais fortes, todavia, os oócitos em vitelogênese avançada e maduros voltaram a exibir marcações fracas, com concentração de Vg na região perinuclear; já o oócito maduro exibe marcação mais fraca em relação ao oócito em vitelogênese avançada.

Outro aspecto observado foi em relação ao local do citoplasma dos oócitos que apresentam marcação para Vg. Em *P. monodon* (HIRANSUCHALERT et al., 2013; TIU et al., 2008), *M. rosenbergii* (JASMANI et al., 2004) e *M. amazonicum* (FERREIRA et al., 2012), a Vg foi encontrada na periferia celular ou espalhada pelo citoplasma da célula, diferente ao observado no presente trabalho em *X. kroyeri*, e semelhante ao apresentado em *A. longinaris*, onde a Vg concentra na região

perinuclear e, posteriormente, espalha-se pelo citoplasma (NUNES-SILVA, 2014). Dessa forma, a marcação de Vg no citoplasma dos oócitos dessas espécies supostamente corresponda a Vg sintetizada pelos próprios oócitos, e a outra parte incorporada pelas células oocitárias através da hemolinfa.

As análises em microscopia eletrônica identificaram que em algumas espécies de camarões existe atividade de síntese proteica nos oócitos vitelogênicos (YANO et al., 1996; RIBEIRO, 2006; FERREIRA et al., 2012; SOONKLANG et al., 2012;). Neste sentido, é possível pressupor que em *X. kroyeri* as oogônias possuam o aparato celular necessário à síntese de Vg. Esse aparato celular possivelmente seria utilizado quando as oogônias se desenvolvem para oócitos pré-vitelogênicos e oócitos em vitelogênese inicial. Portanto, esses oócitos participariam da síntese endógena de Vg. Este fato explicaria a forte marcação imuno-histoquímica encontrada nos oócitos pré-vitelogênicos e em vitelogênese inicial de *X. kroyeri*, fato semelhante observado em *A. longinaris* por Nunes-Silva (2014). Entretanto, há necessidade de investigar através de técnicas moleculares a presença de RNAm para síntese de Vg no ovário e, posteriormente, realizar a hibridização in situ nos oócitos, e somente assim podemos, de fato, assegurar a participação dos oócitos na síntese endógena de vitelogenina.

A marcação imuno-histoquímica no hepatopâncreas de fêmeas de *X. kroyeri* durante a maturação gonadal mostrou-se mais intensa nas células E em todos os estágios de maturação. As células R apresentam marcação imuno-histoquímica em quase todos os estágios de maturação ovariana, exceto no estágio de maturação inicial. As demais células do epitélio hepatopancreático, células F e B, apresentam marcação imuno-histoquímica durante a maturação ovariana. Apesar nas marcações imuno-histoquímicas nos diferentes tipos celulares e diferentes estágios de maturação ovariana, provavelmente ocorreram marcações inespecíficas nos respectivos hepatopâncreas, visto que este órgão não apresentou diferenças significativas do IHS durante toda a maturação ovariana, indicando pouca mobilização nutricional no processo da vitelogênese. Para confirmar de fato a participação deste órgão na síntese exógena de Vg, serão necessárias investigações com técnicas moleculares como sugerido anteriormente para o ovário.

Em 2011, foi publicado o livro “Proposta de Plano Nacional de Gestão para o uso sustentável de camarões marinhos no Brasil”, escrito por Neto (2011). Este livro

destaca a necessidade de pesquisas para o desenvolvimento de indicadores e formação de planos de gestão sustentáveis para a exploração das principais espécies de camarões, dentre elas a *X. kroyeri*. Deste modo, o presente estudo corrobora com as necessidades apontadas pelo autor supracitado, subsidiando informações valiosas acerca do ciclo reprodutivo desta espécie.

Conclusões

6. CONCLUSÕES

O desenvolvimento desta tese possibilitou as seguintes conclusões acerca do camarão *X. kroyeri*

- O ovário apresenta macroscopicamente seis estágios de maturação ovariana (imaturo, pré-maturo, maturação inicial, maturação avançada, maduro e desovado);
- Microscopicamente esta espécie apresenta seis fases de desenvolvimento oocitário (oogônia I, oogônia II, oócito pré-vitelogênico, oócito em vitelogênese inicial, oócito em vitelogênese avançada e oócito maduro);
- Percebemos a necessidade de padronização da nomenclatura de classificação utilizada para a maturação do ovário e desenvolvimento oocitário em camarões;
- O epitélio pseudoestratificado dos túbulos hepatopancreáticos está constituído por cinco tipos celulares: células E, F, B, R e M;
- As células hepatopancreáticas F, B e R apresentam diferenças estruturais durante os diferentes estágios de maturação ovariana, o que interfere nos IHS e IGS;
- O ovário é o principal órgão responsável pela vitelogênese nesta espécie, visto o aumento significativo do IGS durante todas as fases de maturação ovariana. O hepatopâncreas é responsável pelo aporte nutricional secundário, de acordo com o IHS que não apresenta alteração significativa nas fases de maturação ovariana;
- No ovário, as células foliculares, os oócitos pré-vitelogênicos e os oócitos em vitelogênese inicial são os tipos celulares que apresentam marcações imuno-histoquímicas para Vg mais intensas;
- Os oócitos em vitelogênese avançada e oócitos maduros apresentam marcações menos intensas para Vg, e são responsáveis pela absorção de Vg, exógena e/ou endógena;
- No hepatopâncreas, as células E apresenta a marcação mais intensa para Vg em todos os estágios de maturação ovariana; as células R, F e B apresentam marcações para Vg; e
- Os estágios de maturação ovariana interferem no IGS, que aumenta significativamente durante a maturação ovariana, atingindo o maior valor no estágio maduro, enquanto o IHS não sofre alterações significativas durante o processo da vitelogênese.

Referências Bibliográficas

7. Referências

- ABRAHAN, J.; MANISSERI, M. K. Histological and morphological changes associated with ovarian development of speckled shrimp *Metapenaeus monóceros* (Fabricius, 1798). **Indian Journal Fish**, Índia, v. 59, n. 1, p. 119-124, 2012.
- ADIYODI, R.G.; SUBRAMONIAM, T. Arthropoda – Crustácea. In: K.G. ADIYOD e R.G. ADIYOD (eds): **Reproductive Biology of Invertebrates: Oogenesis, Oviposition and Oosorption**. Vol.1. London: John Wiley e Sons, 1983. p. 443-495.
- AL-MOHANNA, S. Y.; NOTT, J. A., LANE, D. W. Mitotic E- and F-cells in the hepatopancreas of the shrimp *Penaeus semisulcatus* (Crustacea:Decapoda). **Journal of Marine Biological Association of the United Kingdom**, v. 65, n. 4, p. 901-910, 1985a.
- AL-MOHANNA, S. Y.; NOTT, J. A.; LANE, D. W. M-“midget” cells in the hepatopancreas of the shrimp *Penaeus semisulcatus* de Haan 1844 (Crustacea: Natantia). **Crustaceana**, v. 48, n. 1, p. 260-268, 1985b.
- AL-MOHANNA, S.Y.; NOTT, J.D. Function citology of the hepatopâncreas of *Penaeus semisulcatus* (Crustacea: Decapoda) during the moult cycle. **Marine Biological**, v. 101, n. 4, p. 535-544, 1989.
- AVARRE, J. C.; MICHELIS, R.; TIETZ, A.; LUBZENS, E. Relationship Between Vitellogenin and Vitellin in a Marine Shrimp (*Penaeus semisulcatus*) and Molecular Characterization of Vitellogenin Complementary DNAs. **Biology of Reproduction**, v. 69, n. 1, p. 355-364, 2003.
- BELL, T.A.; LIGHTNER, D.V. **A handbook of normal penaeid shrimp histology**. Baton Rouge, L.A. World Aquaculture Society. 1988.
- BRANCO, J. O. Biologia e pesca do camarão-sete-barbas *Xiphopenaeus kroyeri* (Heller) (Crustacea, Penaeidae), na Armação do Itapocoroy, Penha, SC. **Revista Brasileira de Zoologia**, v. 22, n. 4; p. 1050-1062, 2005.
- BRASIL. Ministério da Pesca e Aquicultura. **Cartilha-Balanco Pesca e Aquicultura 2013**. Brasília, 2013. 14p.
- BRASIL. Ministério da Pesca e Aquicultura. **Boletim Estatístico da Pesca e Aquicultura 2011**. Brasília, 2011. 60p.
- BRASIL. Ministério do Meio Ambiente. Instrução Normativa. **IN nº 189, de 23 de setembro de 2008**. Diário Oficial da União, Brasília, 2008.
- BRASIL. Ministério do Meio Ambiente. Instrução Normativa. **IN nº 005, de 21 de maio de 2004**. Diário Oficial da União, Brasília, 2004.
- BROWDY, C. L. Aspects of the reproductive biology of *Penaeus semisulcatus* de Haan (Crustacea; Decapoda, Penaeidae). Ph.D. Thesis, Tel Aviv University. 1989.

In: KROLL, R. M.; HAWKINS, W. E.; OVERSTREET, R. M. Reproductive Components. **Microscopic Anatomy of Invertebrates Volume 10: Decapod Crustacea**, 1992. p. 295-343.

CAHU, C.; GUILLAUME, J. C.; STEPHAN, G.; CHIM, L. Influence of phospholipid and highly unsaturated fatty acids on spawning rate and egg and tissue composition in *Penaeus vannamei* fed semi-purified diets. **Aquaculture**, v.126, n. 1, p.159-170, 1994.

CAMPOS, B. R. D.; DUMONT, L. F. C.; BRANCO, J. O. Ovarian development and length at first maturity of the sea-bob-shrimp *Xiphopenaeus kroyeri* (Heller) based on histological analysis. **Nauplius**, v. 17, n. 1, p. 9-12, 2009.

CAO, X.J.; WANG, W.M. Histology and mucin histochemistry of the digestive tract of yellow catfish, *Pelteobagrus fulvidraco*. **Anatomia Histologia Embryologia**, v.38, p.254-261, 2009.

CARVALHO, F.; SOUZA, M.; OLIVEIRA, E.; CAVALHEIRO, J.; BALDAIA, L. Ultrastructure of oogenesis in *Penaeus kerathurus* (Crustacea, Decapoda). I revitellogenic oocytes. **Journal of Submicroscopic Cytologic and Pathology**, v. 30, n. 3, p. 409-416, 1998.

CARVALHO, H. A.; PEREIRA, M. C. Descrição dos estádios ovarianos de *Macrobrachium acanthurus* (WIEGMANN,1836) (CRUSTACEA, PALAEMONIDAE) durante o ciclo reprodutivo. **Ciência e Cultura**, v. 33, n. 10, p.1353-1359, 1981.

CASTILLE, F. L.; LAWRENCE A. L. Relationship between maturations and biochemical composition of the gonads and digestive glands of the shrimps *Penaeus aztecus* Ives and *Penaeus setiferus* (L.). **Journal of Crustacean Biology**, v. 9, n. 2, p. 202-211, 1989.

CASTRO, R. H.; COSTA, R. C.; FRANSOZO, A.; MANTELATTO, F. L. M. Population structure of the seabob shrimp *Xiphopenaeus kroyeri* (Heller, 1862) (Crustacea, Penaeoidea) in the littoral of São Paulo, Brazil. **Scientia Marina**, v. 69, n. 1, p. 105-112, 2005.

CAVALLI, R. O.; TAMTIN, M.; LAVENS, P.; SORGELOOS, P. Variations in lipid classes and fatty acid content in tissues of wild *Macrobrachium rosenbergii* (de Man) females during maturation. **Aquaculture**, v. 193, n. 3, p. 311-324, 2001.

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

CHARNIAUX-COTTON, H. Experimental studies of reproduction in malacostraca crustaceans. Discription of vitellogenesis and of its endocrine. In: W. H. Jr. KLARK e ADAMS (eds): **Advances in Invertebrate Reproduction**. New York: Elsevier, 1980. p. 177- 186.

CLARK, W. H. JR.; LYNN, J. W.; YUDIN, A. I.; PERSYN, H. O. Morphology of the cortical reaction in the eggs of *Penaeus aztecus*. **Biological Bulletin**, v. 158, n. 2, p.175-186, 1980.

CLARK, W. H. JR.; YUDIN, A. I.; LYNN, J. W.; GRIFFIN, F. J.; PILLAI, M. C. Jelly layer formation in Penaeoidean shrimp eggs. **Biological Bulletin**, n. 178, p. 295-299, 1990.

CORRÊA J. D.; FARINA, M.; ALLODI, S. Cytoarchitectural features of *Ucides cordatus* (Crustacea: Decapoda) hepatopancreas: structure and elemental composition of electron-dense granules. **Tissue e Cell**, v. 34, n. 5, p.315-325, 2002.

DALL, W. Indices of nutritional state in western rock lobster, *Panulirus longipes* (Milne Edwards). II. Gastric fluid constituents. **Journal of experimental Marine Biology and ecology**, v. 18, n. 2, p. 1-18, 1975.

DALL, W.; HILL, B. J.; ROTH LISBERG, P. C.; SHARPLES, D. J. The biology of the Penaeidae. In: BLAXTER, J. H. SOUTHWARD, S; A. J. (eds.). **Advances in Marine Biology**. San Diego: Academic Press, 1990. p. 1-489.

DAVANSO, T. M. **Comparação da dinâmica populacional e identificação dos estoques pesqueiros do camarão sete-barbas *Xiphopenaeus kroyeri* (Heller, 1862) (Decapoda, Penaeidae) no litoral brasileiro**. 94f. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) - Universidade Estadual Paulista – Instituto de Biociências de Botucatu, Botucatu, 2015.

DESANTIS, S.; LABATE, M.; MAIORANO, P.; TURSI, A.; LABATE, G. M.; CICCARELLI, M. A histochemical and ultrastructural study of oogenesis in *Aristaeomorpha foliacea* (Risso, 1827). **Hydrobiologia**, n. 449, p. 253-259, 2001.

D'INCAO, F.; VALENTINI, H.; RODRIGUES, L. F. Avaliação da pesca de camarões nas regiões Sudeste e Sul do Brasil. 1965-1999. **Atlântica**, v. 24, n. 2, p. 49-62, 2002.

D'INCAO, F. Subordem DENDROBRANCHIATA (camarões marinhos). In: D'INCAO, F. (org.). **Os crustáceos do Rio Grande do Sul**. Editora Universidade/UFRGS, Porto Alegre, p. 275-299, 1999.

DUMONT, L. F. C.; D'INCAO, F. Estágios de desenvolvimento de fêmeas do camarão-barba-ruça (*Artemesia longinaris* – Decapoda: Penaeidae). **Iheringia**. Série zoologia. Porto Alegre, v. 4, n. 94, p. 389-393, dez. 2004.

FAO. **Organización De Las Naciones Unidas Para La Agricultura Y La Alimentación/FAO**. El estado mundial de la pesca y la acuicultura 2008. Roma/Itália, 2008. 196 p.

FAO **Organización De Las Naciones Unidas Para La Agricultura Y La Alimentación/FAO**. El estado mundial de la pesca y la acuicultura 2014. Roma/Itália, 2014. 253 p.

FATIMA, H.; AYUB, Z.; ALI, S. A.; SIDDIQUI, G. Biochemical composition of the hemolymph, hepatopancreas, ovary, and muscle during ovarian maturation in the penaeid shrimps *Fenneropenaeus merguensis* and *F. penicillatus* (Crustacea: Decapoda). **Turkish Journal of Zoology**, v. 37, n. 3, p. 334-347, 2013.

FERREIRA, M. A. P.; RESENDE, B. M.; LIMA, M. Y. S.; SANTOS, S. S. D.; ROCHA, R. M. The stage of ovarian development affects organ expression of vitellogenin as well as the morphometry and ultrastructure of germ cells in the freshwater prawn *Macrobrachium amazonicum* (Heller, 1862). **Theriogenology**, v. 78, n. 5, p. 981-990, 2012.

FRANCESCHINI-VICENTINI, I. B.; RIBEIRO, K.; PAPA, L. P.; MARQUES-JUNIOR, J.; VICENTINI, C. A.; Valenti, P. M. C. M. Histoarchitectural features of the hepatopancreas of the Amazon river prawn *Macrobrachium amazonicum*. **International Journal Morphology**, v. 27, n. 1, p.:121-128, 2009.

GARCIA, S; LE RESTE, L. Lyfe cycles, dynamics, explotation and anagement of coastal penaeid shrimp stocks. **FAO Fisheries Technical Paper**, v. 203 p. 1-215, 1981.

GOUDEAU, M.; LACHAISE, F. Endogenous yolk as the precursor of a possible fertilization envelop in a crab (*Carcinus maenas*). **Tissue Cell**, v.12, n. 3, p. 503-512, 1980.

GOUDEAU, M. Fertilization in a crab. III. Cytodifferentiation of vesicle enclosing ringshaped elements envolved in the cortical reaction. **Gamete Research**, v. 9, n. 4, p.409-424, 1984.

HIRANSUCHALERT, R.; THAMNIEMDEE, N.; KHAMNAMTONG, B.; YAMANO, K.; KLINBUNGA, S. Expression profiles and localization of vitellogenin mRNA and protein during ovarian development of the giant tiger shrimp *Penaeus monodon*. **Aquaculture**, v. 412-413, p. 193-201, 2013.

HUANG, K. H.; WU, J. P.; WANG, S. Y.; HUANG, D. J.; CHEN, H. C. Ovarian development in the freshwater prawn *Macrobrachium asperulum* (Decapoda: Palaemonidae). **Journal of Crustacean Biology**, v. 30, n. 4, p. 615-623, 2010.

ICELY, J. D.; NOTT, J. A. Digestion and Absorption: digestive system and associated organs. **Microscopic Anatomy of Invertebrates Volume 10**: Decapoda Crustacea, p. 147-201, 1992.

IWAI, M. **Pesca exploratória e estudo biológico sobre o camarão na costa Centro/Sul do Brasil com o Navio Oceanográfico “Prof. W. Besnard” em 1969-1971**. SUDELPA / IOUSP, São Paulo, 1973.

JASMANI, S.; OHIRA, T.; JAYASANKAR, V.; TSUTSUI, N.; AIDA, K.; WILDER, M. N. Localization of Vitellogenin mRNA Expression and Vitellogenin Uptake During

Ovarian Maturation in the Giant Freshwater Prawn *Macrobrachium rosenbergii*. **Journal of experimental zoology**, v. 301, n. 4, p. 334–343, 2004.

JASMANI, S.; KAWAZOE, I.; SHIH, T. W.; SUZUKI, Y.; AIDA, K. Hemolymph vitellogenin levels during ovarian development in the kuruma prawn *Penaeus japonicus*. **Fisheries science**, v. 66, n. 3, p. 535–539, 2000.

JOHNSTON, D. J.; C. G. ALEXANDER; D. YELLOWHEES. Epithelial cytology and function in the digestive gland of *Thenus orientalis* (Decapoda, Scyllaridae). **Journal of Crustacean Biology**, v. 18, p. 271-278, 1998.

JOHNSON, P. T. **Histology of the Blue Crab, *Callinectes sapidus***: A Model for the Decapoda. Praeger, New York, 1980.

JUNQUEIRA, L.C.U.; JUNQUEIRA, L.M.M.S. **Técnicas básicas de citologia e histologia**. Livraria Editora Santos, 122p, São Paulo, 1983.

KING, J. E. A study of the reproductive organs of the common marine shrimp *Penaeus setiferus* (Linnaeus). Biological Bulletin, 94:244-262. 1948. In: KROLL, R. M.; HAWKINS, W. E. e OVERSTREET, R. M. **Reproductive Components. Microscopic Anatomy of Invertebrates**: Volume 10: Decapod Crustacea, 1992. p. 295-343.

KROLL, R. M.; HAWKINS, W. E.; OVERSTREET, R. M. Reproductive Components. **Microscopic Anatomy of Invertebrates Volume 10**: Decapod Crustacea, p. 295-343. 1992.

LEE, F. Y; CHANG, C. F. The concentrations of vitellogenin (vitellin) and protein in hemolymph, ovary and hepatopancreas in different ovarian stages of the freshwater prawn, *Macrobrachium rosebergii*. **Comparative Biochemistry Physiology**, v. 147, n. 4, p. 433-439, 1997.

MEDINA, A.; VILA, Y.; MOURENTE, G.; RODRÍGUEZ, A. A comparative study of the ovarian development in wild and pond-reared shrimp, *Penaeus kerathurus* (Forskal, 1775). **Aquaculture**, v. 77, n. 1, p. 229-242, 1996.

NEIVA, G. S.; WISE, J. P. A biologia e pesca do “camarão-sete-barbas” da Baía de Santos, Brasil. **Revista Nacional de Pesca**, São Paulo, v. 1, n. 1, p. 12-19, 1967.

NETO, J. D. **Proposta de Plano Nacional de Gestão para o uso sustentável de Camarões Marinhos no Brasil**. Brasília: Instituto do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis – IBAMA, 2011. 242p.

NORO, C.; LÓPEZ-GRECO, L. S.; BUCKUP, L. Gonad morphology and type of sexuality in *Parastacus defossus* Faxon 1898, a burrowing, intersexed crayfish from Southern Brazil (Decapoda: Parastacidae). **Acta Zoologica (Stockholm)**. v. 89, n. 1, p. 59-67, 2008.

NUNES-SILVA, R. **Dinâmica da vitelogênese durante a maturação ovariana de *Artemesia longinaris***. Dissertação (Mestrado em Aquicultura) – Centro de Aquicultura da Unesp, UNESP, p. 71. 2014.

O'DONOVAN, P.; ABRAHAM, M.; COHEN, D. The ovarian cycle during the intermoult in ovigerous *Macrobrachium rosenbergii*. **Aquaculture**, v. 36, n. 4, p.347-358, 1984.

OKUMURA, T.; YAMANO, K.; SAKIYAMA, K. Vitellogenin gene expression and hemolymph vitellogenin during vitellogenesis, final maturation, and oviposition in female kuruma prawn, *Marsupenaeus japonicas*. **Comparative Biochemistry and Physiology**, Part A, v. 147, n. 4, p. 1028–1037, 2007.

OKUNO, A.; YANG, W. J.; JAYASANKAR, V.; SAIDO-SAKANAKA, H.; HUONG, D. T. T.; JASMANI, S.; ATMOMARSONO, M.; SUBRAMONIAM, T.; TSUTSUI, N.; OHIRA, T.; KAWAZOE, I.; AIDA, K.; WILDER, M. N. Deduced Primary Structure of Vitellogenin in the Giant Freshwater Prawn, *Macrobrachium rosenbergii*, and Yolk Processing During Ovarian Maturation. **Journal of Experimental Zoology**, v. 292, n. 5, p. 417-429, 2002.

OLIVEIRA, P. S. P.; SANTOS, G. V.; CORRÊA, A. M. A. O desenvolvimento ovocitário em *Penaeus penicillatus* (ALCOCK, 1905), submetido a monoablação do pedúnculo ocular. **Nauplius**, Rio Grande, v. 7, p 53-64, 1999.

PÉREZ-FARFANTE, I.; KENSLEY, B. **Penaeoid and Segestoid shrimps and Pawns of the World. Keys and diagnoses for the families and genera**. Éditions du Muséum national d histoire naturelle. Paris, 1997. 233p.

PHIRIYANGKUL, P.; PUENGYAM, P.; JAKOBSEN, I. B.; UTARABHAND, P. Dynamics of Vitellogenin mRNA Expression During Vitellogenesis in the Banana Shrimp *Penaeus* (*Fenneropenaeus*) *merguiensis* Using Real-Time PCR. **Molecular Reproduction and Development**, v. 74, n. 9, p. 1198-1207, 2007.

PHIRIYANGKUL P, UTARABHAND P: Molecular characterization of a cDNA encoding vitellogenin in the banana shrimp, *Penaeus* (*Litopenaeus*) *merguiensis* and sites of vitellogenin mRNA expression. **Molecular Reproduction And Development**, v. 73, n. 4, p. 410–423, 2006.

QUINITIO, E. T.; HARA, A.; YAMAUCHI, K.; MIZUSHIMA, T.; FUJI A. Identification and characterization of vitellin in a hermaphrodite shrimp, *Pandalus kessleri*. **Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry**, v. 94, n. 3, p.445-451, 1989.

QUINTERO, M. E. S.; GRACIA, A. Stages of gonadal development in the spotted pink shrimp *Penaeus Brasiliensis*. **Journal of Crustacean Biology**, v.18, n. 4, p. 680-685, 1998.

REVATHI, P.; IYAPPARAJ, P.; MUNUSWAMY, N.; KRISHNAN, M. Vitellogenesis during the ovarian development in freshwater female prawn *Macrobrachium*

rosenbergii (De Man). **International Journal of Aquatic Science**, v. 3, n. 2, p. 13-27, 2012.

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

RIBEIRO, K.; PAPA, L. P.; VICENTINI, C. A.; VICENTINI, Irene Bastos FRANCESCHINI-VICENTINI, I. B. The ultrastructural evaluation of digestive cells in the hepatopancreas of the Amazon River prawn, *Macrobrachium amazonicum*. **Aquaculture Research**, v. 45, p. 1-9, 2014.

SHAIKHAMAHMUD, F. S.; TEMBE, V. B. Study of prawns: the reproductive organs of *Parapenaeopsis stylifera* (M. Edw.). **J. Univ. Bombay**, v. 27, n. 3, p. 99-110, 1958.

SIEBERT, T. H. **Análise do período de defeso do camarão marinho *Artemesia longinaris* através da maturação ovariana anual**. 55f. Dissertação (Mestrado em Aquicultura e Biologia Aquática) – Universidade Estadual Paulista, Centro de Aquicultura, Jaboticabal, 2013.

SOONKLANG, N.; WANICHANON, C.; STEWART, M. J.; STEWART, P.; MEERATANA, P.; HANNA, P. J.; SOBHON, P. Ultrastructure of Differentiating Oocytes and Vitellogenesis In the Giant Freshwater Prawn, *Macrobrachium rosenbergii* (de Man). **Microscopy research and technique**, v. 75, n. 10, p.1402–1415, 2012.

SOUZA, L. G.; PETRIELLA, A. M. Functional morphology of the hepatopâncreas of *Palaemonetes argentinus* (Crustacea, Decapoda): influence of environmental pollution. **Revista de Biologia Tropical**, v. 55, n. 1, p. 79-86, 2007.

SOUZA, L. G.; PETRIELLA, A. M. Histology of the hepatopancreas of the freshwater prawn *Palaemonetes argentinus* (crustacean, caridea). **Biocell**, v. 24, n. 3, p. 189-195, 2000.

SUBRAHMANYAM, C. B. **Studies on the reproductive cycle of *Penaeus indicus* and development of a few fishes of Madras**. M. Sc.Dissertation, Madras University. 1963.

TIU, S. H. K.; BENZIE, J.; CHAN, S. M. From Hepatopancreas to ovary: molecular characterization of a shrimp vitellogenin receptor involved in the processing of vitellogenin. **Biology of reproduction**, v. 79, n. 1, p. 66-74, 2008.

TIU, S. H.; HUI, J. H.; MAK, A. S.; HE, J. G.; CHAN, S. M. Equal contribution of hepatopâncreas and ovary to the production of vitellogenin (PmVg1) transcripts in the tiger shrimp *Penaeus monodon*. **Aquaculture**, v. 254, n. 1, p. 666-674, 2006.

TSANG, W. S.; QUACKENBUSH, L. S.; CHOW, B. K.; TIU, S. H.; HE, J. G.; CHAN, S. M. Organization of the shrimp vitellogenin gene evidence of multiple genes and tissue specific expression by the ovary and hepatopancreas. **Gene**, v. 303, p. 99-109, 2003.

TSUTSUI, N.; KAWAZOE, I.; OHIRA, T.; JASMANI, S.; YANG, W. J.; WILDER, M. N.; AIDA, K. Molecular Characterization of a cDNA Encoding Vitellogenin and Its Expression in the Hepatopancreas and Ovary during Vitellogenesis in the Kuruma Prawn *Penaeus japonicus*. **Zoological Science**, v. 17, n. 5, p. 651-660, 2000.

VASUDEVAPPA, C. **Growth and reproduction of the penaeid prawn *Metapenaeus dobsoni* (Miers) in brackishwater environment**. Ph. D Thesis, Cochin University of Science and Technology. 1992.

WOUTERS, R., MOLINA, C., LAVENS, P., CALDERÓN, J. Lipid composition and vitamin content of wild female *Litopenaeus vannamei* in different stages of sexual maturation. **Aquaculture**, v. 198, n. 3, p. 307-323, 2001.

YANG, F.; XU, H. T.; DAI, Z. M.; YANG, W. J. Molecular characterization and expression analysis of vitellogenin in the marine crab *Portunus trituberculatus*. **Comparative Biochemistry and Physiology – Part B**, v. 142, n. 4, p. 456-464, 2005.

YANO, I.; CHINZEI, Y. Ovary is the site of vitellogenin synthesis in kuruma prawn, *Penaeus japonicus*. **Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry**, v. 86, n. 2, p. 213-218, 1987.

YANO, I. Oocyte development in the kuruma prawn *Penaeus japonicus*. **Marine Biology**, v. 99, n. 4, p. 547-553, 1988.

YANO, I.; KROL, R. M.; OVERSTREET, R. M.; HAWKINS, W. E. Route of egg yolk protein uptake in the oocytes of kuruma prawn, *Penaeus japonicus*. **Marine Biology**, v. 125, n. 4, p. 773-781, 1996.

Anexo



Licença permanente para coleta de material zoológico

Número: 23012-1

Data da Emissão: 08/02/2010 16:28

Dados do titular

Nome: Rogerio Caetano da Costa	CPF: 147.706.398-64
Nome da Instituição : Universidade Estadual Paulista - Fac de Ciências	CNPJ: 48.031.918/0028-44

Observações e ressalvas

1	As atividades de campo exercidas por pessoa natural ou jurídica estrangeira, em todo o território nacional, que impliquem o deslocamento de recursos humanos e materiais, tendo por objeto coletar dados, materiais, espécimes biológicos e minerais, peças integrantes da cultura nativa e cultura popular, presente e passa da, obtidos por meio de recursos e técnicas que se destinem ao estudo, à difusão ou à pesquisa, estão sujeitas a autorização do Ministério de Ciência e Tecnologia.
2	A licença permanente não é válida para: a) coleta ou transporte de espécies que constem nas listas oficiais de espécies ameaçadas de extinção; b) manutenção de espécimes de fauna silvestre em cativeiro; c) recebimento ou envio de material biológico ao exterior; e d) realização de pesquisa em unidade de conservação federal ou em caverna. A restrição prevista no item d não se aplica às categorias Reserva Particular do Patrimônio Natural, Área de Relevante Interesse Ecológico e Área de Proteção Ambiental constituídas por terras privadas.
3	O pesquisador titular da licença permanente, quando acompanhado, deverá registrar a expedição de campo no Sisbio e informar o nome e CPF dos membros da sua equipe, bem como dados da expedição, que constarão no comprovante de registro de expedição para eventual apresentação à fiscalização;
4	Esta licença permanente não exime o seu titular da necessidade de obter as anuências previstas em outros instrumentos legais, bem como do consentimento do responsável pela área, pública ou privada, onde será realizada a atividade.
5	Esta licença permanente não poderá ser utilizada para fins comerciais, industriais, esportivos ou para realização de atividades inerentes ao processo de licenciamento ambiental de empreendimentos.
6	Este documento NÃO exime o pesquisador titular da necessidade de atender ao disposto na Instrução Normativa Ibama nº 27/2002, que regulamenta o Sistema Nacional de Anilhamento de Aves Silvestres.
7	O pesquisador titular da licença permanente será responsável pelos atos dos membros da equipe (quando for o caso)
8	O órgão gestor de unidade de conservação estadual, distrital ou municipal poderá, a despeito da licença permanente e das autorizações concedidas pelo Ibama, estabelecer outras condições para a realização de pesquisa nessas unidades de conservação.
9	O titular de licença ou autorização e os membros da sua equipe deverão optar por métodos de coleta e instrumentos de captura direcionados, sempre que possível, ao grupo taxonômico de interesse, evitando a morte ou dano significativo a outros grupos; e empregar esforço de coleta ou captura que não comprometa a viabilidade de populações do grupo taxonômico de interesse em condição in situ.
10	O titular da licença permanente deverá apresentar, anualmente, relatório de atividades a ser enviado por meio do Sisbio no prazo de até 30 dias após o aniversário de emissão da licença permanente.
11	O titular de autorização ou de licença permanente, assim como os membros de sua equipe, quando da violação da legislação vigente, ou quando da inadequação, omissão ou falsa descrição de informações relevantes que subsidiaram a expedição do ato, poderá, mediante decisão motivada, ter a autorização ou licença suspensa ou revogada pelo Ibama e o material biológico coletado apreendido nos termos da legislação brasileira em vigor.
12	A licença permanente será válida enquanto durar o vínculo empregatício do pesquisador com a instituição científica a qual ele estava vinculado por ocasião da solicitação.
13	Este documento não dispensa o cumprimento da legislação que dispõe sobre acesso a componente do patrimônio genético existente no território nacional, na plataforma continental e na zona econômica exclusiva, ou ao conhecimento tradicional associado ao patrimônio genético, para fins de pesquisa científica, bioprospecção e desenvolvimento tecnológico.
14	As atividades contempladas nesta autorização NÃO abrangem espécies brasileiras constante de listas oficiais (de abrangência nacional, estadual ou municipal) de espécies ameaçadas de extinção, sobreexplotadas ou ameaçadas de sobreexploração.

Táxons autorizados

#	Nível taxonômico	Táxon(s)
1	ORDEM	Decapoda
2		

Destino do material biológico coletado

#	Nome local destino	Tipo Destino
1	Universidade Estadual Paulista - Fac de Ciências	os animais serão depositados no laboratório de pesquisa para análises pertinentes nesta FACULDADE

Este documento (Licença permanente para coleta de material zoológico) foi expedido com base na Instrução Normativa nº154/2007. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Sisbio/ICMBio na Internet (www.icmbio.gov.br/sisbio).

Código de autenticação: 77997594





Licença permanente para coleta de material zoológico

Número: 23012-1	Data da Emissão: 08/02/2010 16:28
Dados do titular	
Nome: Rogério Caetano da Costa	CPF: 147.706.398-64
Nome da Instituição : Universidade Estadual Paulista - Fac de Ciências	CNPJ: 48.031.918/0028-44

Registro de coleta imprevista de material biológico

De acordo com a Instrução Normativa nº154/2007, a coleta imprevista de material biológico ou de substrato não contemplado na autorização ou na licença permanente deverá ser anotada na mesma, em campo específico, por ocasião da coleta, devendo esta coleta imprevista ser comunicada por meio do relatório de atividades. O transporte do material biológico ou do substrato deverá ser acompanhado da autorização ou da licença permanente com a devida anotação. O material biológico coletado de forma imprevista, deverá ser destinado à instituição científica e, depositado, preferencialmente, em coleção biológica científica registrada no Cadastro Nacional de Coleções Biológicas (CCBIO).

Táxon*	Qtde.	Tipo de amostra	Qtde.	Data

* Identificar o espécime no nível taxonômico possível.

Este documento (Licença permanente para coleta de material zoológico) foi expedido com base na Instrução Normativa nº154/2007. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Sisbio/ICMBio na Internet (www.icmbio.gov.br/sisbio).

Código de autenticação: 77997594

