
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
(BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR)

CARACTERIZAÇÃO DO CICLO DA VITELOGÊNESE
DO CAMARÃO DE ÁGUA DOCE *Macrobrachium olfersi*
(WIEGMANN, 1836) (CRUSTACEA, DECAPODA,
PALAEMONIDAE).

NATALIA GIOVANNETTI

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências do Campus de Rio Claro, Universidade Estadual Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas (Biologia Celular e Molecular).

Rio Claro
Estado de São Paulo - Brasil
Julho – 2010

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
(BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR)

CARACTERIZAÇÃO DO CICLO DA VITELOGÊNESE
DO CAMARÃO DE ÁGUA DOCE *Macrobrachium olfersi*
(WIEGMANN, 1836) (CRUSTACEA, DECAPODA,
PALAEMONIDAE).

NATALIA GIOVANNETTI

Orientador: Prof. Dr. Osmar Malaspina

Co-orientadora: Profa. Dra. Giovana Bertini

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências do Campus de Rio Claro, Universidade Estadual Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas (Biologia Celular e Molecular).

Rio Claro
Estado de São Paulo - Brasil
Julho – 2010

SUMÁRIO

RESUMO	2
ABSTRACT.....	4
I. INTRODUÇÃO	6
II. OBJETIVOS	14
III. MATERIAL E MÉTODOS.....	17
III.1. CARACTERIZAÇÃO DA REGIÃO	18
III.2. DESCRIÇÃO DA ESPÉCIE EM ESTUDO.....	18
III.2.1. Diagnose	18
III.2.2. Distribuição Geográfica	19
III.2. 3. Habitat	19
III.3. MÉTODO DE COLETA	19
III.4. PROCEDIMENTOS LABORATORIAIS	20
IV. RESULTADOS.....	24
V. DISCUSSÃO.....	35
VI. CONCLUSÕES	43
VII. REFERÊNCIAS.....	46
ANEXO.....	55

Resumo

RESUMO

O presente trabalho teve como objetivo investigar as variações que ocorrem nos ovários do camarão *Macrobrachium olfersi* durante a época reprodutiva, por meio de análises morfohistológicas em nível macro e microscópico. As fêmeas em período reprodutivo foram capturadas no Rio Ribeira de Iguape, litoral sul do estado de São Paulo, Brasil. As observações macroscópicas permitiram a determinação de três fases de maturação gonadal: a) em desenvolvimento (ED), onde os ovários apresentaram coloração variando de verde claro à verde oliva, estando apoiados na parte posterior do estômago encobrendo toda esta região, b) desenvolvido (DE), com coloração verde escura e preenchendo toda a cavidade cefalotorácica dorsal e c) desovado (DV), com coloração pardo-amarelada e tamanho menor em relação as demais fases, estando apoiado somente sobre o hepatopâncreas. A análise histológica permitiu classificar os ovócitos em estágios que variam de I a V de acordo com o tamanho, o aspecto citoplasmático, a observação da vesícula germinal e a granulação do vitelo. Verificou-se que na fase de maturação dos ovários designada como ED, observou-se a presença de ovócitos do estágio I ao IV, na fase DE encontraram-se, somente, ovócitos do estágio V e na fase DV, foi observado ovócitos dos estágios I a III. Os resultados do presente estudo demonstraram todas as fases do ciclo vitelogênico de *M. olfersi* durante a época reprodutiva. Sendo detectados cinco estágios celulares durante as três fases de desenvolvimento gonadal, porém em quantidades variadas.

Abstract

ABSTRACT

The present study had the objective to investigate the modifications in *Macrobrachium olfersi* prawns ovaries during reproductive season through macro and microscopic morphological analysis. The females were captured in Ribeira de Iguape River (south coast of São Paulo, Brazil). By macroscopic observation three gonadal maturation phases could be determined: a) in maturation/in development (ID), ovaries that present a coloration that varies from light green to olive green; b) developed/mature (DE), presenting dark green color and c) totally spawned (SP), presenting yellowish brown color and smaller than in the other phases, being located on the hepatopancreas. By histological analysis oocytes could be classified in stages I to V according to the size; the cytoplasmatic aspect; the germinal vesicle and the yolk granulation. It was found that on the maturation phase of the ovaries known as ID, was observed the presence of oocytes from stage I to IV, at the DE phase, was found only oocytes of stage V and at the DV phase, was observed oocytes of stages I to III. The results of this study showed all phases of the vitellogenic cycle of *M. olfersi* during the reproductive season. Being detected five cellular stages during the three phases of gonadal development, but in varying amounts.

Introdução

I. INTRODUÇÃO

Caracterização Geral dos Caridea

Os crustáceos representam um grupo bem conhecido de invertebrados, com mais de 67.000 espécies descritas, sendo encontrados em todas as profundidades de ambientes aquáticos, tais como, marinhos, salobros e de água doce, além de alguns poucos no ambiente terrestre (BRUSCA; BRUSCA, 2007).

Os Decapoda representam uma das ordens de maior sucesso adaptativo dentre os crustáceos, com mais de 14.700 espécies viventes, distribuídas em mais de 2.700 gêneros e com ampla distribuição mundial (DE GRAVE et al., 2009). Segundo Martin e Davis (2001), os decápodos estão reunidos em duas subordens: Dendrobranchiata: que compreende a infraordem Penaeidea; e Pleocyemata: representados pelas infraordens: Stenopodidea, Caridea, Astacidea, Thalassinidea, Palinura, Anomura e Brachyura.

De acordo com Fiedler (2000), existem três grupos de decápodos conhecidos como camarões: os Penaeidea, os Stenopodidea e os Caridea. Os Penaeidea possuem brânquias dendrobranchiadas e os três primeiros pares de pereiópodos quelados. As fêmeas não carregam os ovos no abdômen e as larvas eclodem como nauplius. Os camarões Stenopodidea também apresentam os três primeiros pares de pereiópodos quelados, porém suas brânquias são tricobranquiadas. Nos camarões Caridea, somente os dois primeiros pares de pereiópodos são quelados e as brânquias são filobranquiadas. Além disso, se distinguem também morfológicamente dos outros camarões por apresentarem o segundo somito abdominal expandido, recobrimdo, parcialmente, o primeiro e o terceiro somitos, a escama antenal mais alargada, o segundo par de pereiópodos geralmente mais espesso e desenvolvido que os demais e o corpo, geralmente, curvado (BLISS, 1990; BAUER, 2004).

Por ocasião da reprodução, em ambos os grupos (Stenopodidea e Caridea) as fêmeas incubam os ovos no abdômen, os quais ficam aderidos aos seus pleópodos. Após o desenvolvimento embrionário, as larvas eclodem na forma de zoea (PINHEIRO; HEBLING, 1998).

A infraordem Caridea compreende um grupo de importância relevante, com representantes nos ambientes marinho, estuarino e dulcícola, sendo representada por mais de 3.260 espécies, agrupadas em 18 superfamílias e 39 famílias (DE GRAVE et al., 2009). Entre os Caridea, encontram-se os camarões da família Palaemonidae Samouelle, 1819, que são conhecidos popularmente como camarões de água doce. De acordo com Tiwari (1955), admite-se que os palemonídeos tenham se originado, de ancestrais marinhos no começo do Pleistoceno, conquistando, posteriormente, a água doce. A partir desta hipótese, acredita-se que ocorreu uma adaptação de

algumas espécies para ambientes totalmente dulcícolas, enquanto que a maioria depende de água salobra para o desenvolvimento larval (JALIHAL et al., 1981; NEW; SINGHOLKA, 1982).

A família Palaemonidae é uma das mais representativas no mundo, em relação ao número de espécies, pois somente o gênero *Macrobrachium* possui cerca de 240 espécies (DE GRAVE et al., 2009), muitas delas de grande importância econômica. No Brasil, esta família está representada pelas subfamílias Euryrhynchinae com o gênero *Euryrhynchus* e a subfamília Palaemoninae com os gêneros *Cryphiops*, *Macrobrachium*, *Palaemon*, *Palaemonetes* e *Pseudopalaemon*, totalizando 32 espécies (MELO, 2003).

O gênero *Macrobrachium* possui 18 espécies: *M. acanthurus* (Wiegmann, 1836); *M. amazonicum* (Heller, 1862); *M. birai* (Lobão, Melo & Fernandes, 1986); *M. borellii* (Nobili, 1896); *M. brasiliense* (Heller, 1862); *M. carcinus* (Linnaeus, 1758); *M. denticulatum* (Ostrovski, Fonseca & Silva-Ferreira, 1996); *M. ferreirai* (Kensley & Walker, 1982); *M. heterochirus* (Wiegmann, 1836); *M. holthuisi* (Genofre & Lobão, 1978); *M. iheringi* (Ortmann, 1897); *M. inpa* (Kensley & Walker, 1982); *M. jelskii* (Miers, 1877); *M. nattereri* (Heller, 1862); *M. olfersi* (Wiegmann, 1836); *M. petronioi* (Lobão, Melo & Fernandes, 1986); *M. potiuna* (Müller, 1880); *M. surinamicum* (Holthuis, 1948), que se distribuem em todas as grandes bacias hidrográficas do país (MELO, 2003).

Os camarões do gênero *Macrobrachium* apresentam características que comprovam que eles foram se modificando gradativamente durante o processo de conquista do ambiente de água doce, ou ainda que estejam passando por modificações, em decorrência da exploração deste habitat (JALIHAL et al., 1993).

Entre tais características, estão a redução no tamanho dos adultos e a perda do dimorfismo sexual; o aumento no tamanho dos ovos, com proporcional redução de sua quantidade; a eclosão de larvas grandes e com pereiópodos e pleópodos funcionais; a independência da salinidade para a metamorfose; a redução tanto do número de estágios larvais como a duração desses períodos e o aumento da porcentagem de sobrevivência larval (JALIHAL et al., 1993).

De acordo com Hancock (1998), as espécies de camarões que habitam ambientes marinhos e estuarinos produzem grande número de ovos, porém de tamanhos reduzidos. Isto se explica pela alta concentração de sais presentes nestes ambientes, que reduz a quantidade de água dos ovos em decorrência do processo osmótico. As espécies que habitam ambientes límnicos lânticos produzem ovos de tamanho e número intermediário e as espécies que vivem próximas às cabeceiras de riachos produzem um reduzido número de volumosos ovos.

De modo geral, os camarões do gênero *Macrobrachium* exibem vários tipos de desenvolvimento. Jalihal et al. (1993), baseando-se no número de estágios larvais de várias espécies de *Macrobrachium*, definiram três tipos básicos de desenvolvimento:

- Tipo I: Prolongado ou Tipo Normal - com 8 a 20 estágios larvais. Representado, principalmente, por espécies geralmente encontradas em estuários e rios. As espécies migram dos rios para os estuários durante a época de reprodução, buscando uma alta salinidade para o sucesso de sua metamorfose. Este grupo inclui espécies de tamanhos médios e grandes (50 a 320 mm) e, geralmente, exibem dimorfismo sexual, onde os machos são maiores e providos de segundos quelípodos maiores e/ou robustos. Exemplos: *M. acanthurus*, *M. carcinus* e *M. olfersi*.

- Tipo II: Parcialmente Abreviado - com 2 ou 3 estágios. Geralmente, os indivíduos habitam rios, córregos e águas represadas. São geralmente camarões de tamanho médio (25 a 70 mm) e não exibem características de dimorfismo sexual. Exemplos: *M. borellii*, *M. nattereri* e *M. potiuna*.

- Tipo III: Completamente Abreviado - com somente 1 estágio, tipo representado por duas espécies da Índia, que apresentam tamanho médio (30 a 65 mm) e a espécie não exibe dimorfismo sexual (*M. hendersonianum* e *M. dayanum*).

Sendo assim, o ciclo de vida das espécies do gênero *Macrobrachium* que dependem de águas salobras é similar, podendo ser resumido da seguinte forma: o cruzamento ocorre logo após a muda pré-nupcial das fêmeas. Após um comportamento de corte, os machos depositam um espermatóforo próximo ao poro genital feminino e os óvulos são fertilizados à medida que vão sendo eliminados para a câmara incubadora abdominal, formada pelas pleuras dos somitos que compõem o abdômen. Nestas espécies, após o período de incubação, as larvas eclodem, sendo geralmente planctônicas, passando por uma série de metamorfoses, até atingirem forma semelhante à do adulto, quando são chamadas de pós-larvas (VALENTI, 1984). Já as espécies que são totalmente dulcícolas, apresentam período de desenvolvimento embrionário mais lento e prolongado, viabilizado pela riqueza de material nutritivo presente nos ovos. A eclosão das larvas ocorre de forma mais gradual, sendo essas bentônicas e lecitotróficas (BOND; BUCKUP, 1982; MELO; BROSSI-GARCIA, 1999).

As fêmeas de *M. olfersi* produzem numerosos ovos pequenos, e a larva planctotrófica passa por 12 estágios de zoea, antes de atingir a fase de pós-larva (DUGGER; DOBKIN, 1975).

Macrobrachium olfersi não é uma espécie de interesse comercial, porém exerce um importante papel ecológico como integrante da cadeia trófica, servindo de alimento para várias espécies de invertebrados e de peixes. Alguns estudos foram desenvolvidos com essa espécie, destacando-se os de Dugger e Dobkin (1975) que investigaram o desenvolvimento larval; McNamara et al. (1980) analisaram o metabolismo respiratório durante o ciclo de muda da fase larval; Freire e McNamara (1995), realizaram a microanatomia e ultraestrutura das brânquias. Outros estudos estão relacionados com a biologia populacional e reprodutiva, tais como os de Barros (1995), que apresentou dados biológicos; Ammar et al. (2001), que caracterizaram os aspectos reprodutivos; Mossolin e Bueno (2002 e 2003), investigaram respectivamente, a biologia reprodutiva na qual incluíram alguns aspectos histológicos das gônadas, e o crescimento relativo do segundo pereiópodo; Müller et al. (2003), definiram os estádios de desenvolvimento embrionário; Nazari et al. (2003), compararam a fecundidade, tamanho dos ovos e volume da massa de ovos de *M. potiuna* e *M. olfersi*; Müller et al. (2004), analisaram várias características embrionárias em condições controladas de laboratório; e Simões-Costa et al. (2005), analisaram as características morfológicas do embrião e o período de desenvolvimento embrionário.

Caracterização Estrutural das Gônadas

Nos decápodos, o aparelho reprodutor das fêmeas é constituído por um par de ovários associado aos ovidutos, que se abrem nos gonóporos localizados na base do terceiro par de pereiópodos (KROLL et al., 1992).

Atualmente, sabe-se que em crustáceos decápodos, o amadurecimento das gônadas e a desova não são fenômenos controlados apenas por mecanismos endógenos, sendo bastante dependentes de fatores ambientais como temperatura, regime pluviométrico e fotoperíodo (CARVALHO, 1978; VALENTI, 1984).

Os ovários dos crustáceos apresentam diferentes fases de maturação, constituindo o seu ciclo reprodutivo (CHANG; SHIH, 1995). O estudo desse ciclo é fundamental para que haja melhor controle do crescimento e da reprodução de animais mantidos em cativeiro ou ainda, para estoque de reprodutores (KROLL et al., 1992; MEDINA et al., 1996). Apesar das observações macroscópicas auxiliarem na classificação dos estágios da maturação ovariana, o conhecimento morfológico do desenvolvimento gonadal, auxilia na aplicação prática do manejo de reprodutores nas larviculturas de camarões (SAGI; RA'ANAN, 1985).

Durante a maturação, as gônadas dos crustáceos apresentam várias modificações de tamanho e de coloração, que são macroscopicamente detectáveis, de acordo com os estágios de maturação gonadal (PÉREZ, 1984). A coloração dos ovários resulta do acúmulo de vitelogenina, que contém pigmentos do tipo carotenóides (CHARNIAUX-COTTON, 1980).

Em espécies do gênero *Macrobrachium*, os ovários, quando totalmente desenvolvidos, se encontram apoiados dorsalmente no estômago e no hepatopâncreas, logo atrás dos olhos, podendo adentrar até o primeiro segmento abdominal (LING, 1969).

Em decápodos, a ovogênese foi amplamente estudada por microscopia de luz (YANO, 1988; MEDINA et al., 1996). Entretanto, estudos das estruturas reprodutivas dos decápodos vêm sendo realizados com auxílio da microscopia Em

eletrônica de varredura e de transmissão, o que tem auxiliado para o melhor entendimento do ciclo reprodutivo das espécies (KROLL et al., 1992). Neste sentido, destacam-se os trabalhos de O'Donovan et al. (1984), que estabeleceram por meio de microscopia de luz e eletrônica uma relação entre o crescimento dos ovócitos e as células foliculares de *M. rosenbergii*; o de Felgenhauer et al. (1988), que investigaram a morfologia dos órgãos reprodutores do camarão *Procaris ascensionis*, utilizando as microscopias eletrônicas de varredura e de transmissão; e o de Tóth e Bauer (2008), que utilizaram a microscopia eletrônica de varredura para realizar a determinação do sexo dos camarões carídeos *Synalpheus paraneptunus*.

Pouco se conhece sobre a atividade gonadal dos palemonídeos, podendo-se destacar alguns estudos morfológicos referentes aos estágios ovarianos de *M. acanthurus* (GOMES et al., 1979; CARVALHO, 1980; CARVALHO; PEREIRA, 1981); sobre o desenvolvimento ovariano de *M. amazonicum* (CHAVES; MAGALHÃES, 1993; RIBEIRO, 2006), e a biologia reprodutiva de *M. olfersi*, onde as gônadas de ambos os sexos foram examinadas histologicamente (MOSSOLIN; BUENO, 2002).

Sendo assim, o presente trabalho com as gônadas femininas de *M. olfersi* utilizando análises morfohistológicas, trouxe informações que, certamente, permitiram acompanhar, com maior precisão, as modificações ovarianas durante o seu desenvolvimento e vitologênese, permitindo, inclusive, a caracterização dos seus diferentes estágios.

Objetivos

II. OBJETIVOS

O objetivo do presente estudo foi caracterizar morfolologicamente e histologicamente os estágios pelos quais passam as gônadas femininas do camarão de água doce *Macrobrachium olfersi* durante a época reprodutiva. Além disso, as células germinativas foram descritas e caracterizadas de acordo com as fases de desenvolvimento, fornecendo assim, dados sobre o processo reprodutivo dessa espécie.

Material e Métodos

III. MATERIAL E MÉTODOS

III.1. Caracterização da Região:

O Rio Ribeira de Iguape é formado pela confluência dos rios Ribeirinha e Assungui, no Estado do Paraná e termina na região do mar Pequeno em São Paulo. Sua bacia hidrográfica abrange uma área de 23.930 km² distribuídos nos Estados de São Paulo (60%) e Paraná (40%) (CAMARGO et al., 1972).

A extensão do Rio Ribeira de Iguape é cerca de 500 km, sendo 340 km em território paulista atravessando terrenos graníticos e sedimentares (CAMARGO et al., 1972; TAKINO; TREVISAN, 1979). No alto e médio curso ocorrem corredeiras, enquanto que a porção baixa da bacia apresenta um fluxo mais lento e grande sinuosidade, sendo comum a ocorrência de enchentes anuais no verão e a formação de terrenos pantanosos ao redor de seu curso (CAMARGO et al., 1972).

De acordo com a classificação proposta por Troppmair (1975), o trecho do rio estudado pertence à região ecológica Litoral Sul, que abrange uma área de 7.000 km² entre a escarpa da Serra do Mar e o Oceano Atlântico. A topografia é quase plana e a altitude raramente atinge os 50m, grande parte da vegetação primitiva foi substituída por culturas de banana, arroz e chá (TROPMAIR, 1975).

III.2. Descrição da Espécie em Estudo

III.2.1. Diagnose:

Segundo Melo (2003) *Macrobrachium olfersi* (Figura 1C) possui as seguintes características morfológicas:

Rostro reto ou dirigido um pouco para baixo, alcançando o fim do pedúnculo antenular; margem superior com 12-15 dentes, 4 ou 5 colocados atrás da órbita, todos regularmente divididos; margem inferior com 3-4 dentes. Espinho hepático menor do que o antenal. Telso com margem posterior aguda que é ultrapassada pelo par interno de espinhos superiores, com muitas setas entre estes. Segundos pereiópodos dos machos adultos fortemente desiguais na forma e tamanho; o maior alcança com todo o carpo ou parte do mero além do escafoerito; dedos com hiato e mais longos do que a palma, face cortante com largo dente proximal e face externa com linhas de pequenos espínulos longitudinais, fortes espinhos na margem inferior do dedo fixo; dentro da face cortante, grande número de setas; palma alongada, um pouco comprimida e com forte pubescência aveludada; carpo pouco menor do que a palma nos adultos e tão longo quanto o mero; carpo e mero com linhas de espinhos,

menores e mais densos dorsalmente; quelípodo menor alcança apenas com parte do carpo além do escafoцерito.

III.2.2. Distribuição Geográfica:

M. olfersi apresenta a seguinte distribuição geográfica: Carolina do Norte, Flórida e Texas (introduzida), América Central, Colômbia, Venezuela, Guiana, Suriname e Brasil (Pará, Piauí, Ceará, Rio Grande do Norte, Pernambuco, Alagoas, Sergipe, Bahia, Minas Gerais, Espírito Santo, Rio de Janeiro, São Paulo, Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul) (MELO, 2003).

III.2.3. Hábitat:

M. olfersi ocorre em águas transparentes, com vegetação marginal e substrato de areia. Requer altas salinidades para completar o ciclo de vida e alcançarem o estado adulto. São animais crepusculares (MELO, 2003).

III.3. Método de Coleta:

Os espécimes de *M. olfersi* foram coletados no Rio Ribeira de Iguape, na cidade de Registro, SP, Brasil, no ano de 2009 (Figura 1A).

As coletas foram efetuadas utilizando-se peneiras com malha de 2 mm com o objetivo de capturar os indivíduos associados à vegetação marginal parcialmente submersa (Figura 1B).

Os exemplares coletados foram levados ainda vivos em recipientes com água do local de coleta para o LABCRUST (Laboratório de Biologia e Cultivo de Crustáceos) na UNESP – Registro, SP, Brasil.

III.4. Procedimentos Laboratoriais:

A determinação do sexo foi efetuada com base no exame dos caracteres sexuais secundários. As fêmeas foram reconhecidas pela ausência do apêndice masculino, pela visualização dos ovários por transparência e pela presença de ovos quando ovígera.

As gônadas foram observadas macroscopicamente por transparência, para a detecção dos estágios do desenvolvimento gonadal, de acordo com Mossolin e Bueno (2002).

Posteriormente, as fêmeas foram previamente anestesiadas por choque térmico, utilizando-se de um recipiente com água e gelo. Logo em seguida, a carapaça foi cortada com uma tesoura para a exposição dos ovários. Estes foram retirados em sua totalidade sob um estereomicroscópio e fixados em paraformaldeído 4% durante 24 horas.

Após a fixação, o material permaneceu durante 2 horas em tampão fosfato de sódio, em seguida foi desidratado em banhos de 15 minutos em cada série de álcoois em concentrações de 70-95%. Após esse procedimento, o material foi transferido para resina de embebição onde permaneceu por 24 horas. A inclusão foi realizada em resina Leica e os blocos, depois de polimerizados em estufa (37°C), foram

seccionados com 5 µm, em micrótomo Leica RM 2145. As secções foram recolhidas em lâminas de vidro, colocadas em estufa a 37°C e submetidas à coloração.

Técnica da Hematoxilina de Harris - Eosina Aquosa (Segundo JUNQUEIRA; JUNQUEIRA, 1983):

As lâminas, contendo as secções histológicas, foram coradas com hematoxilina de Harris durante 10 minutos, lavadas em água corrente por 5 minutos, para retirada do excesso e reação do corante e, a seguir, foram coradas com eosina durante 5 minutos. Após nova lavagem em água corrente, as lâminas foram secas à temperatura ambiente e montadas em Bálsamo do Canadá, para posterior observação e documentação fotográfica em fotomicroscópio Motic BA 300 acoplado a microcomputador.

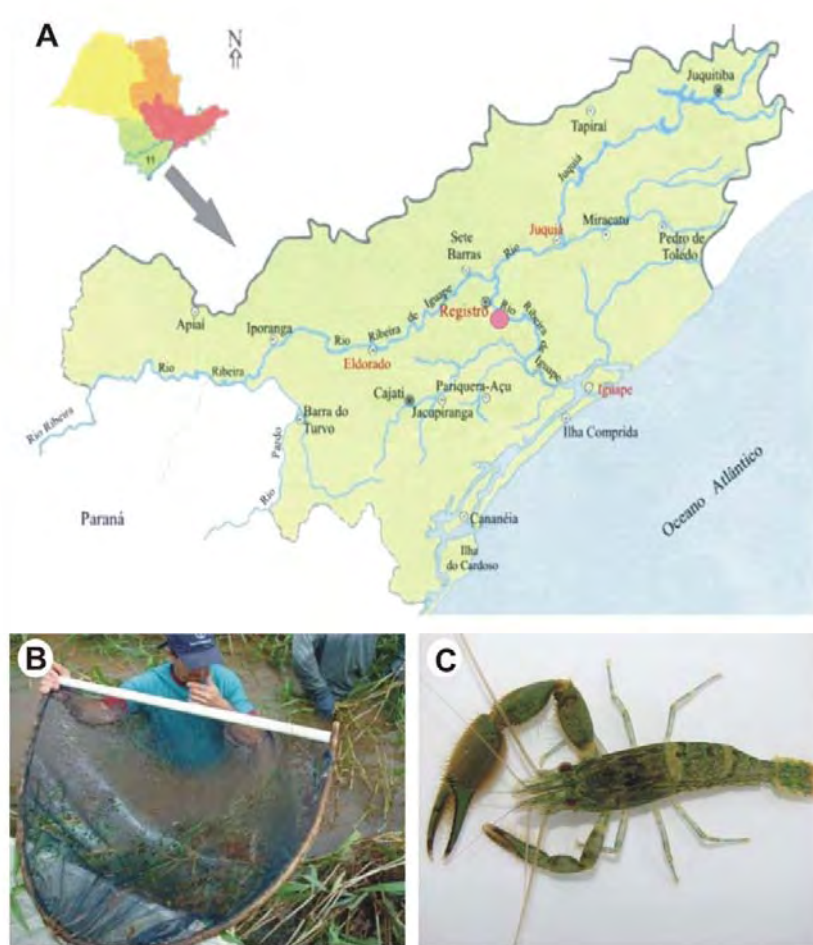


FIGURA 1. A. Mapa da região do Vale do Ribeira com a localização dos pontos de coleta no município de Registro. B. Procedimento de coleta para a amostragem com peneira. C. Exemplar macho de *Macrobrachium olfersi* com comprimento de carapaça de 18,3mm.

Resultados

IV. RESULTADOS

O sistema reprodutor feminino de *Macrobrachium olfersi* apresenta características comuns aos carídeos, sendo composto por um ovário bilobado e por dois ovidutos. O ovário encontra-se apoiado dorsalmente sobre o hepatopâncreas e quando totalmente desenvolvido, cobre o estômago; os ovidutos (Figura 3B) são estruturas transparentes, revestidas por um epitélio simples cúbico, localizados dorsoventralmente na porção posteromediana do cefalotórax, e fazem a conexão entre as gônadas e a abertura dos gonóporos. Estas aberturas situam-se na base das coxas do terceiro par de pereiópodos.

Os ovários, quando desenvolvidos, constituem a porção interna mais desenvolvida do sistema reprodutor. Sofrendo alterações de coloração, volume e consistência à medida que os ovócitos avançam o processo de maturação.

Pela análise macroscópica dos ovários durante a época reprodutiva foi possível detectar três fases de maturação gonadal, designados por:

a) Em desenvolvimento (ED): os ovários apresentam coloração variando de verde claro a verde oliva, dependendo do grau de desenvolvimento dessa fase e com a presença de cromatóforos em sua região dorsal, sendo possível sua visualização por transparência através da carapaça. São túrgidos e encontram-se apoiados na parte posterior do estômago, encobrendo toda a região do hepatopâncreas (Figura 3A);

b) Desenvolvido (DE): ovários com coloração verde escuro, com a superfície dorsal rica em cromatóforos. Estão mais túrgidos e volumosos que o estágio anterior, preenchendo toda a região cefalotorácica dorsal e se estendendo da base do rostro até o início do primeiro segmento abdominal, sendo facilmente observado por transparência através da carapaça (Figura 4A);

c) Desovado (DV): caracteriza-se por ovários de coloração pardo-amarelada com presença de muitos cromatóforos em toda superfície. O tamanho é menor em relação as demais fases estando apoiado somente sobre o hepatopâncreas, não alcançando a região do estômago. Esta fase é encontrada, somente, nas fêmeas ovígeras e refere-se a pós-eliminação total dos ovócitos (Figura 5A).

Histologia

As células germinativas encontradas em *M. olfersi* foram classificadas em estágios de desenvolvimento que variaram do I ao V, levando-se em consideração o seu tamanho, aspecto citoplasmático, a observação da vesícula germinal e a presença de grânulos de vitelo (Figura 2), onde:

Estágio I – caracterizado pela presença de ovogônias (Figuras 3C e 5C), pequenas células germinativas, arredondadas e com citoplasma homogêneo, escasso, basófilo e agranular.

A vesícula germinal (núcleo) mostrou-se evidente e ocupando quase todo o volume da célula. Não são observados nucléolos (Figura 3C).

As células foliculares estão arrançadas sob a forma de epitélio simples, e variam de escamosas a cúbicas. Este epitélio envolveu agrupamentos de ovogônias (3 ou 4) (Figura 2).

Ovogônias no estágio I foram encontradas em fêmeas nas fases de maturação gonadal ED e DV (Tabela 1).

Estágio II – esses ovócitos (Figuras 3C e 5C) apresentam tamanho maior quando comparados aos do estágio I, tendo ainda a forma arredondada.

O citoplasma, nesse estágio encontra-se mais volumoso, quando comparado ao estágio anterior, apresentando pouca granulação, mas mesmo assim ainda com aspecto homogêneo e intensa basofilia (Figura 5C).

A vesícula germinal apresenta-se esférica, localizada no centro da célula e com cromatina dispersa, sendo possível a observação de um ou mais nucléolos (Figura 3C).

Ao redor de cada ovócito, ao contrário do que observa-se nos de estágio I existe um epitélio folicular simples com células semelhantes aquelas descritas no estágio I (Figuras 2, 3C e 5 C), ou seja variando de escamosa a cúbica, envolvendo o ovócito individualmente.

Os ovócitos deste estágio foram observados em fêmeas nas fases ED e DV (Tabela 1).

Estágio III – os ovócitos estão em vitelogênese inicial indicada pelo ligeiro aumento da quantidade de grânulos de vitelo no citoplasma e apresentando crescimento gradativo e diminuição da basofilia (Figura 5D).

A vesícula germinal ainda é observada na região central, apresentando nucléolo evidente.

Nesse estágio de desenvolvimento, cada ovócito está envolvido por um epitélio folicular simples cúbico (Figuras 2 e 5D).

Este estágio foi pouco observado, sendo encontrado apenas em fêmeas nas fases ED e DV (Tabela 1).

Estágio IV – nesse estágio os ovócitos apresentam-se grandes, com citoplasma repleto de grânulos de vitelo predominantemente localizados na região periférica e com diversos tamanhos e intensidade de coloração, resultando numa acidofilia citoplasmática (Figura 3D).

Nesse estágio ainda é observada a vesícula germinal em torno a um citoplasma basófilo (Figura 3D). Os nucléolos não são mais evidentes.

As células foliculares estão presentes formando um epitélio simples escamoso.

Ovócitos IV foram encontrados apenas em fêmeas da fase ED (Tabela 1).

Estágio V – são ovócitos (Figura 4B) já maduros, e que já atingiram o tamanho máximo deste estudo, com citoplasma repleto de grandes e densos grânulos de vitelo (Figura 4D) preenchendo-o e não sendo mais visualizada a vesícula germinal (Figura 4C).

As células foliculares formam um epitélio simples escamoso ao redor de cada ovócito.

Este estágio foi encontrado somente nas fêmeas com gônadas na fase DE (Tabela 1).

Figuras

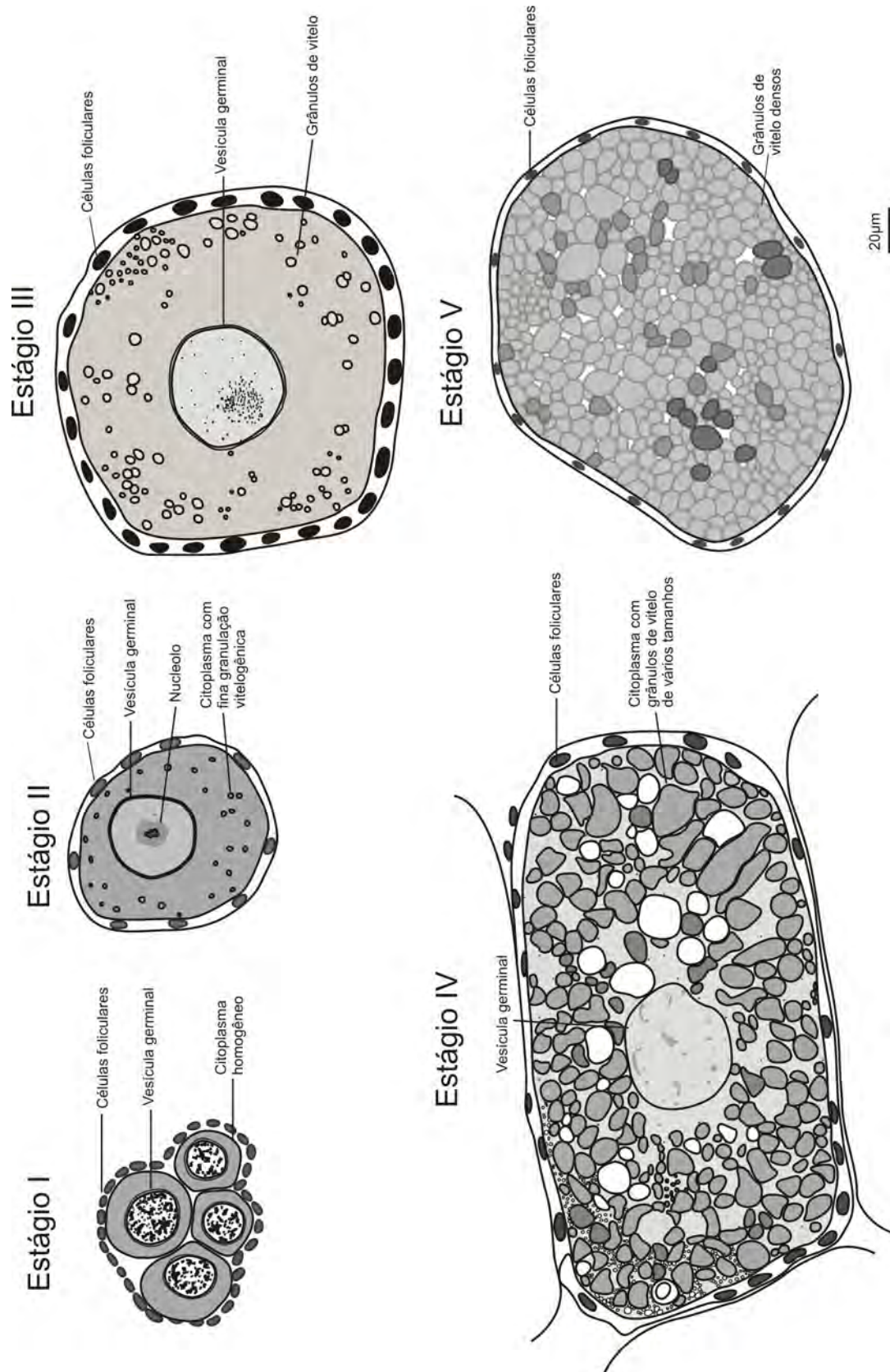


FIGURA 2. Desenvolvimento das células germinativas dos ovários de *Macrobrachium olfersi*.

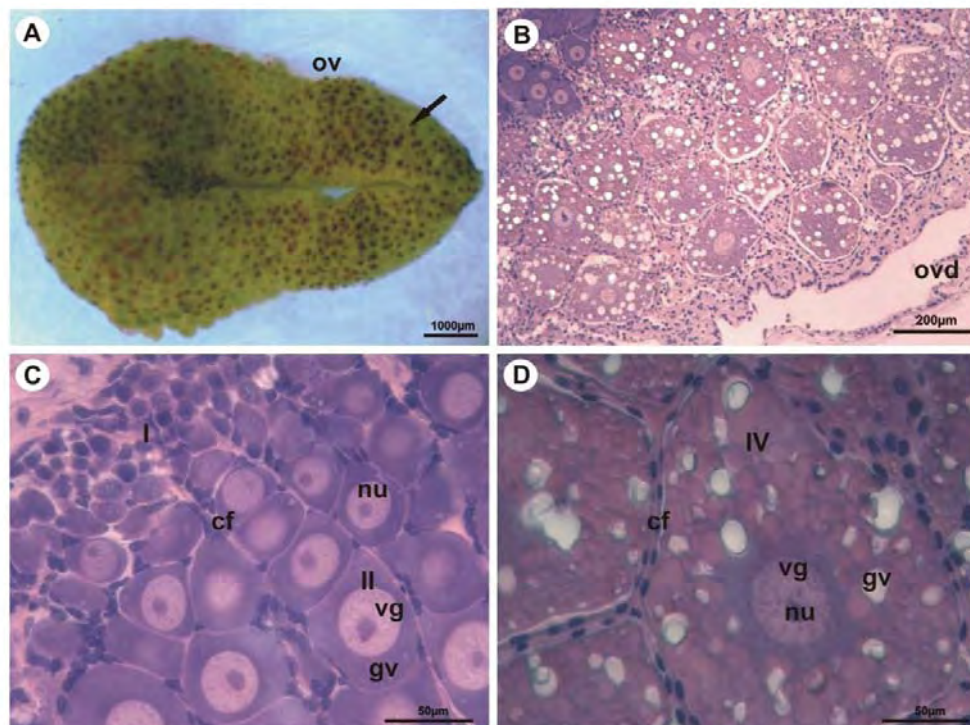


FIGURA 3. *Macrobrachium olfersi*. (A) Vista macroscópica do ovário na fase de maturação “Em Desenvolvimento”, mostrando os cromatóforos = **seta** e ovário = **ov**; (B-D) Secções histológicas coradas com hematoxilina e eosina evidenciando os ovócitos nos diferentes estágios de desenvolvimento (**I**, **II** e **IV**). **B**. Ovócitos e oviducto = **ovd**. **C**. Ovócitos **I** e **II**, vesícula germinal = **vg**, células foliculares = **cf**, nucléolo = **nu** e grânulos de vitelo = **gv** dentro do citoplasma dos ovócitos. **D**. Detalhes dos ovócitos **IV**, células foliculares = **cf**, nucléolo = **nu**, vesícula germinal = **vg** e grânulos de vitelo = **gv**.

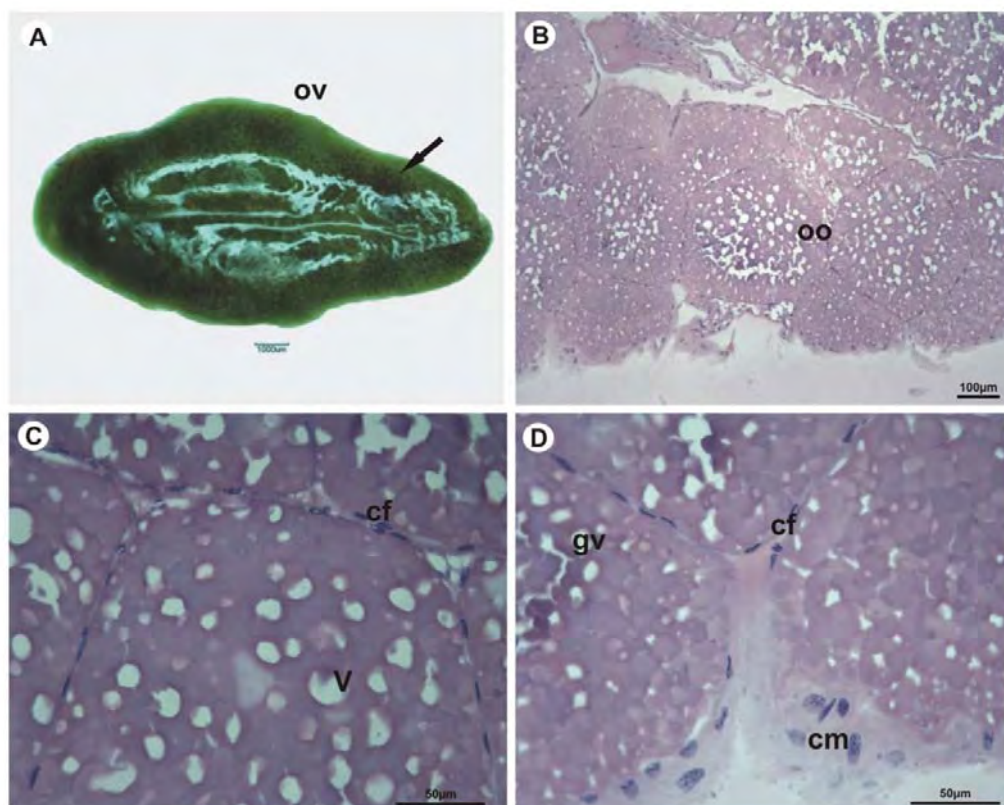


FIGURA 4. *Macrobrachium olfersi*. (A) Vista macroscópica do ovário na fase de maturação “Desenvolvido”, mostrando os cromatóforos = **seta** e ovário = **ov**; (B-D) Secções histológicas coradas com hematoxilina e eosina evidenciando os ovócitos **V**. **B.** Ovócitos = **oo**. **C.** Ovócitos **V** e células foliculares = **cf**. **D.** Detalhes dos ovócitos **V**, células foliculares = **cf**, grânulos de vitelo = **gv** e células musculares = **cm**.

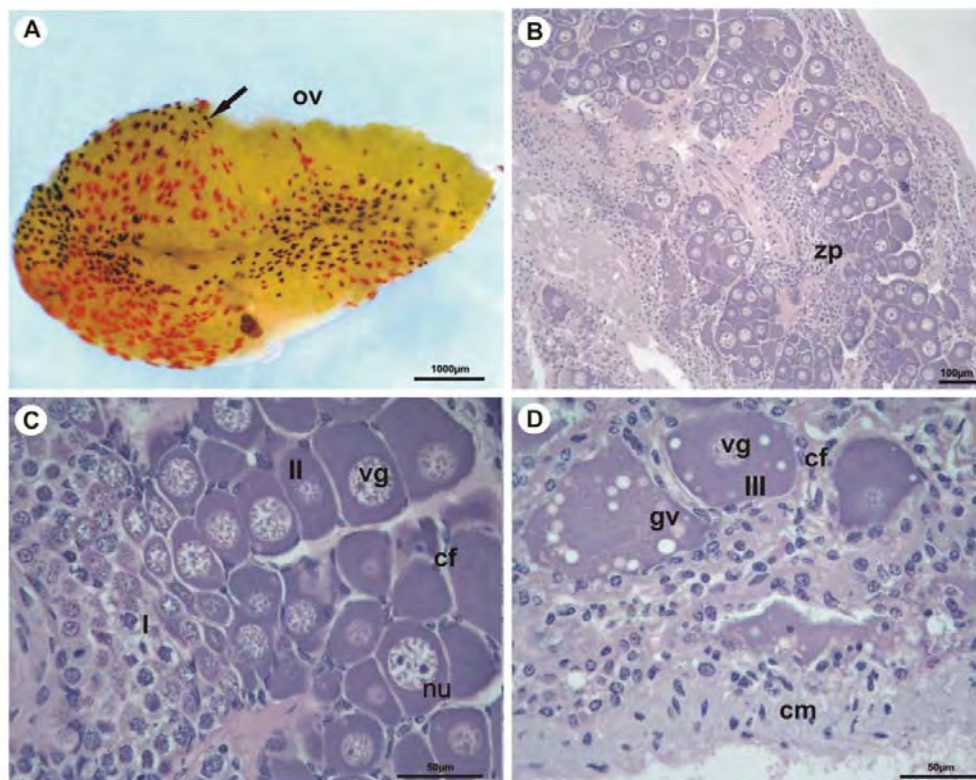


FIGURA 5. *Macrobrachium olfersi*. (A) Vista macroscópica do ovário na fase de maturação “Desovado”, mostrando os cromatóforos = **seta** e ovário = **ov**; (B-D) Secções histológicas coradas com hematoxilina e eosina evidenciando os ovócitos nos diferentes estágios de desenvolvimento (**I**, **II** e **III**). **B.** Secção histológica mostrando a zona proliferativa = **zp**. **C.** Ovócitos **I** e **II**, vesícula germinal = **vg**, células foliculares = **cf**, nucléolo = **nu**. **D.** Detalhes dos ovócitos **III**, células foliculares = **cf**, vesícula germinal = **vg** e grânulos de vitelo = **gv** e células musculares = **cm**.

Discussão

V. DISCUSSÃO

A análise macroscópica externa das gônadas é um critério utilizado por alguns autores como recurso para selecionar fêmeas em período reprodutivo de espécies de paleomonídeos capturados em ambiente natural (CARVALHO; PEREIRA 1981; MEDINA et al., 1996). No entanto, esses autores acreditam que esse critério possa causar confusões quanto às análises, já que o mesmo pode identificar diferentes tons de cores na gônada estando o ovário no mesmo estágio de maturação.

A análise histológica das gônadas e ductos genitais também pode ser utilizada para se reconhecer a maturidade sexual fisiológica das espécies, onde pode ser revelado um desenvolvimento heterogêneo das células, passando por vários estágios de diferenciação durante o desenvolvimento (MANTELATTO; FRANZOZO, 1997).

O desenvolvimento das gônadas, em crustáceos decápodos, pode ser acompanhado pelas modificações que ocorrem nos ovários durante o ciclo reprodutivo, em que há multiplicação de células gonadais e crescimento dos gametas para a maturação, ovulação e oviposição (GRASSÉ, 1996). Durante essas fases, a

gônada feminina dos crustáceos, sofre modificações como alteração da cor, tamanho e textura dos ovários, conforme seu grau de amadurecimento (O'DONOVAN et al., 1984) sendo que essa coloração é resultado do acúmulo de vitelogenina e da presença de conteúdo de pigmentos carotenóides (CHARNIAX-COTTON, 1980). Em *M. olfersi*, assim como em *M. amazonicum* (RIBEIRO, 2006) e em *M. acanthurus* (CAVALHO; PEREIRA, 1981), os ovários, à medida que amadurecem, apresentam coloração esverdeada. Já em *M. rosenbergii*, os ovários maduros têm coloração alaranjada (CHANG; SHINH, 1995; MARTINS et al., 2007). Esta diferença de cor se deve, ao tipo de pigmento que é assimilado pelo animal, os quais devem possivelmente ser espécie específicos (RIBEIRO, 2006).

A variação da coloração tem sido utilizada para elaborar diferentes escalas do desenvolvimento ovariano (CAVALHO; PEREIRA, 1981; PINHEIRO; FRANSOZO, 1998; MARTINS et al., 2007). Para *M. olfersi* foi possível determinar por meio da análise macroscópica três padrões de coloração e tamanho durante as fases de maturação gonadal. Mossolin & Bueno (2002) determinaram cinco estágios (fases) de desenvolvimento gonadal para essa espécie, sendo que o primeiro estágio foi referente às fêmeas adultas com ovários em repouso e com coloração transparente. Este estágio não foi descrito no presente estudo pelo fato de serem fêmeas que não estão aptas à reprodução. Já os estágios II e III, se referem à fase ED e os estágios IV e V à fase DE do presente estudo.

As observações microscópicas demonstraram a existência de cinco tipos celulares (estágios I a V) presentes nos ovários nas três fases de maturação de *M. olfersi*. Nos estudos realizados por Chaves e Magalhães (1993) e Ribeiro (2006) com *M. amazonicum* e Meeratana e Sobhon (2007) para *M. rosenbergii*, esses estágios

foram classificados como: ovogônias, ovócitos pré-vitelogênicos, ovócitos em vitelogênese inicial, ovócitos em vitelogênese avançada e ovócitos maduros. A análise histológica efetuada por Mossolin e Bueno (2002) nos ovários de *M. olfersi* não revelou todas as fases de desenvolvimento dos ovócitos, sendo detectado somente as ovogônias e os ovócitos pré-vitelogênicos. Além disso, os autores não efetuaram a descrição desses ovócitos o que impede uma comparação morfológica.

Kroll et al. (1992), consideraram a vitelogênese como um processo que reúne compostos orgânicos e inorgânicos do vitelo para o desenvolvimento do ovócito e afirmaram que tal substância consiste de água, proteínas, lipídios e nutrientes necessários ao desenvolvimento do embrião e material estrutural para os tecidos.

O desenvolvimento dos ovócitos e sua distribuição na gônada foram caracterizados por seu progressivo amadurecimento do centro para a periferia. Tal fato mostrou-se essencialmente similar ao descrito por Carvalho e Pereira (1981) em *M. acanthurus* e Chaves e Magalhães (1993) em *M. amazonicum*.

No estágio I, as ovogônias foram encontradas na região central do ovário que segundo Browdy (1989) é chamada de zona germinativa ou zona de proliferação do ovário. A localização central dessa zona também foi observada em outras espécies de *Macrobrachium* (CARVALHO; PEREIRA 1981, CHAVES; MAGALHÃES 1993, VERDI, 1995), mas pode variar entre as espécies de decápodos, como observado nos camarões peneídeos *Penaeus setiferus* por King (1948) e *Penaeus stylirostris* por Bell e Lightner (1988), nos quais mencionaram que a zona germinativa se localiza na região medial e ventral de cada lóbulo ovariano.

As mudanças observadas nas células do estágio I para o estágio II foram muito bem marcadas. Segundo Quackenbush (1991), as células aumentam

drasticamente em tamanho e peso, pois indicam a produção de vitelo. Como consequência desta produção, ocorre uma gradativa substituição da basofilia pela acidofilia que pode ser explicada pela natureza do vitelo que se deposita, concomitante à redução das organelas citoplasmáticas da fase pré-vitelogênica (estágio II) (CHAVES; MAGALHÃES 1993). Barreto et al. (2008) também observaram que as ovogônias e os ovócitos I de *Panulirus echinatus* apresentaram citoplasma fortemente positivo a hematoxilina, e com o desenvolvimento das gônadas, o citoplasma apresentou redução da sua característica positiva a hematoxilina, tornando-se eosinófilo no estágio de ovócito II. Já na fase madura os ovócitos apresentaram citoplasma fortemente reativo a eosina, apresentando ovócitos completamente repletos de grânulos de vitelo em todo o folículo ovariano.

No estágio II, observaram-se ovócitos com núcleos contendo um ou mais nucléolos em fêmeas com gônadas na fase em desenvolvimento e desovada. Tal fato também foi verificado por Ribeiro (2006) para *M. amazonicum*, no qual os ovários no estágio II de maturação apresentaram ovócitos pré-vitelogênicos com núcleo apresentando mais de um nucléolo. No entanto, Chaves e Magalhães (1993), analisando essa mesma espécie, descreveram a existência de um único nucléolo presente nos ovócitos pré-vitelogênicos.

No presente estudo observou-se que ocorreu uma multiplicação das células foliculares em torno do ovócito no estágio II, atendendo ao aumento do volume ovocitário, similar ao constatado em *M. amazonicum* por Chaves e Magalhães (1993). Quanto à forma que adquirem durante a maturação, elas se mantêm planas, assim como verificado em *M. acanthurus* por Carvalho e Pereira (1981) e em *M. amazonicum* por Chaves e Magalhães (1993).

Os ovócitos no estágio III foram comumente encontrados em duas fases de maturação (em desenvolvimento e desovada) de *M. olfersi*. Essas células apresentam vesículas corticais incolores e dispersas pelo citoplasma, semelhantemente ao que fora descrito para os ovócitos de *Pandalus kessleri* por Quintio et al. (1989), para *M. rosenbergii* por Chang e Shih (1995) e para *M. amazonicum* por Ribeiro (2006).

Ainda no estágio III, os ovócitos de *M. olfersi* se apresentaram envoltos por células foliculares, descritas também em diversas espécies de decápodos como *Penaeus japonicus* (YANO; CHINZEI, 1987), *M. rosenbergii* (CHANG; SHIH, 1995) e *M. amazonicum* (RIBEIRO, 2006). O papel das células foliculares ainda é discutido e de acordo com Chang e Shih (1995), o formato e o tamanho destas células estariam intimamente relacionados com a sua atividade biossintética. Segundo Adiyodi e Subramoniam (1983) as células foliculares nos crustáceos são fundamentais na captação de proteínas de vitelo para dentro dos ovócitos. No peneídeo *P. japonicus* foi demonstrado por Yano e Chinzei (1987) que a vitelogenina pode ser sintetizada nas células foliculares que são secretadas na hemolinfa e captadas pelos ovócitos. Pelo fato das células foliculares que rodeiam os ovócitos de *M. olfersi* apresentarem uma alteração na forma e no tamanho durante as diferentes fases de maturação, pode-se sugerir que ocorra uma atividade de síntese semelhante à encontrada por Yano e Chinzei (1987) em *P. japonicus*.

Na fase de maturação dos ovários de *M. olfersi* designada como ED (em desenvolvimento) observou-se a presença de ovócitos do estágio I ao IV, sendo o IV (ovócitos em vitelogênese avançada) predominante. Tal característica também foi observada para *M. rosenbergii* (CHANG; SHIH, 1995) e para *M. amazonicum* (RIBEIRO, 2006). Carvalho e Pereira (1981) também detectaram esse fato para *M.*

acanthurus, no entanto, estes autores subdividiram essa fase de maturação em três estágios, referidos como estágio II.1, II.2 e II.3 os quais apresentaram aspectos característicos do crescimento e amadurecimento dos ovócitos, sendo distintas microscopicamente as fases de pré-vitelogênese, vitelogênese inicial e vitelogênese avançada o que justificou a divisão em subestágios.

Na fase mais avançada de maturação gonadal (desenvolvida) de *M. olfersi*, encontraram-se, somente, ovócitos do estágio V, estes com grande deposição de vitelo no citoplasma. Essa deposição de vitelo distribuída por todo o citoplasma dos ovócitos maduros também fora descrita para *M. acanthurus* (CARVALHO; PEREIRA, 1981), *P. kessleri* (QUINITIO et al., 1989), *M. rosenbergii* (CHANG; SHIH, 1995) e *M. amazonicum* (RIBEIRO, 2006).

Na fase de pós-eliminação total dos ovócitos (desovada) de *M. olfersi*, foi observado ovócitos dos estágios I a III, sendo os ovócitos III pouco observado nessa fase, enquanto os ovócitos II foram bastante observados. De acordo com Meeratana e Sobhon (2007), durante essa fase, em *M. rosenbergii*, o ovário fica com aspecto livre e vazio com muitas células foliculares e restos de tecidos conectivos. Além disso, aparecem grupos de ovogônias no centro do ovário e a maioria das células foliculares retorna à forma original ovóide. Tais eventos também foram observados em *M. olfersi*.

Os resultados do presente estudo demonstraram todas as fases do ciclo vitelogênico de *M. olfersi* durante a época reprodutiva. Sendo detectados cinco estágios celulares durante as três fases de desenvolvimento gonadal, porém em quantidades variadas. Na fase de maturação em desenvolvimento, as células do estágio IV (ovócitos em vitelogênese avançada) apareceram em grandes quantidades,

seguidas das células dos estágios I (ovogônias), II (ovócitos pré-vitelogênicos) e III (ovócitos em vitelogênese inicial) em menores quantidades e com ausência de células do estágio V (ovócitos maduros). Nas gônadas desenvolvidas, ocorreram apenas células do estágio V. Na fase desovada, foi observada grande quantidade de células no estágio II, seguida das células no estágio I, poucas no estágio III e ausência do estágio V.

Conclusões

VI. CONCLUSÕES

1) Por meio da análise macroscópica foi possível determinar três padrões de coloração para os ovários de *Macrobrachium olfersi*. Tais padrões estão relacionados com o grau de desenvolvimento do ovário (fases de maturação), sendo ED (em desenvolvimento) de coloração verde claro, DE (desenvolvido) verde oliva e DV (desovado) de coloração pardo-amarelada.

2) As observações microscópicas das gônadas femininas de *M. olfersi* demonstraram a existência de células germinativas em cinco estágios celulares (estágios I a V) presentes nos ovários durante as três fases de maturação.

3) As mudanças observadas nas células do estágio I para o estágio II foram bem distintas, as células aumentam drasticamente em tamanho e peso, indicando a produção de vitelo, e conseqüentemente, ocorrendo uma gradativa substituição da basofilia pela acidofilia.

4) A multiplicação das células foliculares em torno do ovócito a partir do estágio II, está relacionada com o aumento do volume ovocitário e com a alteração na forma e no tamanho dessas células que passam da forma arredondada para a achatada.

5) Na fase “em desenvolvimento” observaram-se ovócitos nos estágios I a IV, na fase mais avançada de maturação gonadal (desenvolvida), encontraram-se, principalmente, ovócitos do estágio V e na fase desovada, foram observados os ovócitos dos estágios I a III. Tais eventos estão relacionados com o ciclo da vitelogênese, na qual após a desova o ovário inicia novamente a produção dos ovócitos para uma nova postura.

Referências

VII. REFERÊNCIAS

ADIYOD, R. G.; SUBRAMONIAM, T. Arthropoda – Crustácea. In: **Reproductive Biology of Invertebrates: Oogenesis, Oviposition and Oosorption** (eds. ADIYOD, K. G.; ADIYOD, R. G.), v. 1. London: John Wiley e Sons, p. 443-495, 1983.

AMMAR, D.; MÜLLER, Y. M. R.; NAZARI, E. M. Biologia reprodutiva de *Macrobrachium olfersii* (Wiegman) (Crustacea, Decapoda, Palaemonidae) coletados na Ilha de Santa Catarina, Brasil. **Revista Brasileira de Zoologia**, Curitiba, v. 18, n. 2, p. 529-537, 2001.

BARRETO, A. V.; SILVA, J. R. F.; KATSURAGAWA, M.; RAPOSO, M. C. F. Desenvolvimento dos ovários da lagosta *Panulirus echinatus* (Crustacea: Palinuridae) baseado nas análises macroscópicas, microscópicas e relação gonadossomática (RGS). **Revista Brasileira de Zoologia**, v. 25, n. 4, p. 689-695, 2008.

BARROS, M. P. Dados biológicos sobre *Macrobrachium olfersii* (Wiegmann, 1836) (Decapoda, Palaemonidae) da praia da Vigia, Garopaba, Santa Catarina, Brasil. **Biociências**, v. 3, n. 2, p. 239-252, 1995.

BAUER, R. T. **Remarkable shrimps: adaptations and natural history of the carideans**. University of Oklahoma Press, Norman. Marine Resources Library, 2004. 282p.

BELL, T. A.; LIGHTNER, D. V. **A handbook of normal penaeid shrimp histology**. Baton Rouge, L.A. World Aquaculture Society, 1988. 107p.

BLISS, D. E. **Shrimps, lobster and crabs. Their fascinating life story**. New York, Columbia University Press, 1990. 242p.

BOND-BUCKUP, G.; BUCKUP, L. O ciclo reprodutor de *Macrobrachium borellii* (Nobili, 1896) e de *Macrobrachium potiana* (Müller, 1880) (Crustacea, Decapoda, Palaemonidae) e suas relações com a temperatura. **Revista Brasileira de Biologia**, Rio de Janeiro, v. 42, n. 3, p. 473-483, 1982.

BROWDY, C. L. **Aspects of the reproductive biology of *Penaeus semisulcatus* de Haan (Crustacea; Decapoda, Penaeidae)**. 1989, 138f. Ph.D. Thesis, Tel Aviv University, Israel, 1989.

BRUSCA, R. C.; BRUSCA, G. J. (Ed.), **Invertebrados**. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2007. 968p.

CAMARGO, J. C.; PINTO, S. A. F.; TROPPIAIR, H. **Estudo fitogeográfico ecológico da Bacia Hidrográfica Paulista do Rio da Ribeira**. São Paulo, Instituto de Geografia da USP. (Séria Biogeografia nº 5), 1972.

CARVALHO, H. A., **Ciclo sexual de *Macrobrachium acanthurus* (Wiegmann, 1836) (Crustacea: Decapoda): relações com fatores abióticos e ciclo de intermudas**. 1978. 199 f. Tese de Doutorado – Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1978.

CARVALHO, H. A. Morfologia do aparelho reprodutor de *Macrobrachium acanthurus* (Wiegmann, 1836) (Crustacea, Decapoda, Palaemonidae) Parte I – Masculino. **Ciência e Cultura**. v. 32. n 7. p. 941-945, 1980.

CARVALHO, H. A.; PEREIRA, M. C. G. Descrição dos estádios ovarianos de *Macrobrachium acanthurus* (Wiegmann, 1836) (Crustacea, Palaemonidae) durante o ciclo reprodutivo. **Ciência e Cultura**. v. 33, n. 10, p. 1353-1358, 1981.

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.; PAYEN, G. Reproduction in malacostraca crustacean. In: **Endocrinology of Selected Invertebrate Types** (eds. Laufer, H.; Downer, R. G. H.), p. 177-186. Invertebrate Endocrinology, v. 2, New York: Elsevier. 1980.

CHAVES, P. T.; MAGALHÃES, C. O desenvolvimento ovocitário em *Macrobrachium amazonicum* (Heller, 1862) (Crustácea: Decapoda: Palaemonidae), camarão dulcícola da região amazônica. **Acta Amazônica**. v. 23, n. 1, p. 17-23, 1993.

DE GRAVE, S.; PENTCHEFF, N. D.; AHYONG, S. T.; CHAN, T. Y.; CRANDALL, K. A.; DWORSCHAK, P. C.; FELDER, D. L.; FELDMANN, R. M.; FRANSEN, C. H. J. M.; GOULDING, L. Y. D.; LEMAITRE, R.; LOW, M. E. Y.; MARTIN, J. W.; NG, P. K. L.; SCHWEITZER, C. E.; TAN, S. H.; TSHUDY, D.; WETZER, R. A classification of living and fossil genera of decapod crustaceans. **The Raffles Bulletin of Zoology**, Singapore, v. 21, p. 1-109, 2009.

DUGGER, D. M.; DOBKIN, S. A contribution to knowledge of the larval development of *Macrobrachium olfersii* (Wiegmann, 1836) (Decapoda, Palaemonidae). **Crustaceana**, Lieden, v. 29, p. 1-30, 1975.

FELGENHAUER, B. E.; ABELE, L. G.; KIM, W. Reproductive morphology of the anchialine shrimp *Procaris ascensionis* (Decapoda: Procarididae). **Journal of Crustacean Biology**, v. 8, p. 333-339, 1988.

FIEDLER, G. C. **Sex determination and reproductive biology of two Caridean shrimp genera: *Hymenocera* and *Lysmata***. 2000. 220 f. PhD. Dissertation - University of Hawaii, 2000.

FREIRE, C. A.; McNAMARA, J. C. Fine structure of the gills of the fresh-water shrimp *Macrobrachium olfersii* (Decapoda): effect of acclimation to high salinity medium and evidence for involvement of the lamellar septum in ion uptake. **Journal of Crustacean Biology**, v. 5, n. 1, p. 103-116, 1995.

GOMES, M. G.; MACHA, N.; SAWAYA, P.; CARVALHO, H. A. Histoquímica dos ovários de *Macrobrachium acanthurus* (Wiegmann, 1836), nos diferentes estádios de desenvolvimento gonadal. II Lipídeos. **Boletim de Fisiologia Animal**, Univ. S. Paulo, v. 3, p. 23-31, 1979.

GRASSÉ, P. P. **Traité de Zoologie: Anatomie, Systématique, Biologie**. Tome VII. Crustacés; fascicule I: Morphologie, Physiologie, Reproduction, Systématique. Paris: Masson, 1996. 917p.

HANCOCK, M. A. The relationship between egg size and embryonic and larval development in the fresh shrimp *Paratya australiensis* (Kemp) (Decapoda: Atyidae). **Freshwater Biology**, Oxford, v. 39, p. 715-723, 1998.

JALIHAI, D. R.; SHENOY S. & SANKOLLI, K. N. **Adaptational significance of salinity tolerance in some freshwater prawns**. In: Director, ZSI, Ecology of animal population (Proc. Symp. Ecol. Anim. Popul. Zool. Surv. India, 1978), v. 2, p. 175-187, 1981.

JALIHAI, D. R.; SANKOLLI, K. N. & SHENOY S. Evolution of larval development patterns and the process of freshwaterization in the pawn genus *Macrobrachium* Bate, 1868 (Decapoda, Palaemonidae). **Crustaceana**, v. 65, p. 365-376, 1993.

JUNQUEIRA, L. C. U.; JUNQUEIRA, L. M. M. S. **Técnicas básicas de citologia e histologia**. São Paulo: Santos, 1983. 123p.

KING, J. E. A study of the reproductive organs of the common marine shrimp *Penaeus setiferus* (Linnaeus). **Biological Bulletin**, v. 94, p. 244-262, 1948.

KROLL, R. M.; HAWKINS, W. E.; OVERSTREET, R. M. Reproductive components. In: Harrison, F. W.; Humes, A. G. **Microscopic Anatomy of Invertebrates**, Volume 10: Decapod Crustacea. New York: Wley-Liss Inc, 1992. p. 295-343.

LING, S. W. The general biology and development of *Macrobrachium rosenbergii* (De Man). FAO. **Fisheries Report**, v. 57, n. 3, p. 589-606, 1969.

MANTELATTO, F. L.; FRANSOZO, A. Fecundity of the crab *Callinectes ornatus* Ordway, 1863 (Decapoda Brachyura, Portunidae) from the Ubatuba region, São Paulo, Brazil. **Crustaceana**, v. 70, n. 2, p. 214-226, 1997.

MARTINS, J.; RIBEIRO, K.; RANGEL-FIGUEIREDO, T.; COIMBRA, J. Reproductive cycle, ovarian development, and vertebrate-type steroids profile in the

freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii*. **Journal of Crustacean Biology**, v. 27, n. 2, p. 220-228, 2007.

MARTIN, J. W.; DAVIS, G. E. **An update classification of the recent Crustacea**. Natural History of Los Angeles County. Science Series, 2001. 124p.

McNAMARA, J. C.; MOREIRA, G. S.; MOREIRA, P. S. Respiratory metabolism of *Macrobrachium olfersii* (Wiegmann) zoeae during the moulting cycle from eclosion to first ecdysis. **Biological Bulletin**, v. 159, p. 692-699, 1980.

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

MEERATANA, P.; SOBHON, P. Classification of differentiating oocytes during ovarian cycle in the giant freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii* de man. **Aquaculture**, v. 270, p. 249-258, 2007.

MELO, S. G.; BROSSI-GARCIA, A. L. Postembryonic development of *Macrobrachium petronioi* (Caridea: Palaemonidae) in the laboratory. **Journal of Crustacean Biology**, v. 19, n. 3, p. 622-642, 1999.

MELO, G. A. S. **Manual de identificação dos Crustacea Decapoda de água doce do Brasil**. Edições Loyola: Centro Universitário São Camilo: Museu de Zoologia, Universidade de São Paulo, 2003. 429p.

MOSSOLIN, E. C.; BUENO, S. L. S. Reproductive biology of *Macrobrachium olfersi* (Decapoda, Palaemonidae) in São Sebastião, Brazil. **Journal of Crustacean Biology**, v. 22, n. 2, p. 367-376, 2002.

MOSSOLIN, E. C.; BUENO, S. L. S. Relative growth of the second pereopod in *Macrobrachium olfersi* (Wiegmann, 1836) (Decapoda, Palaemonidae). **Crustaceana**, v. 76, n. 3, p. 363-376, 2003.

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

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

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

NEW, M. B.; SINGHOLKA, S. Freshwater prawn farming. A manual for the culture of *Macrobrachium rosenbergii*. **FAO Fisheries Technical Paper**, v. 225, p.116, 1982.

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

PÉREZ, L. A. V. **Desenvolvimento larval de *Macrobrachium heterochirus* (Wiegmann, 1836), *Macrobrachium amazonicum* (Heller, 1862), *Macrobrachium brasiliense* (Heller, 1862) (Crustacea, Decapoda, Palaemonidae) em laboratório.** 1984. 150 f. Tese de Doutorado. Instituto Oceanográfico, USP, 1984.

PINHEIRO, M. A. A.; FRANSOZO, A. Sexual maturity of speckled swimming crab *Arenaeus cribrarius* (Lamarck, 1818) (Crustacea, Brachyura, Portunidae) in the Ubatuba Littoral, São Paulo State, Brazil. **Crustaceana**, Leiden, v. 71, n. 4, p. 434-452, 1998.

PINHEIRO, M. A. A.; HEBLING, N. J. Biologia de *Macrobrachium rosenbergii* (De Man, 1879). In: **Carcinicultura de água doce** (ed. Valenti, W. C.), p. 21-46, IBAMA/FAPESP, Brasília, 1998.

QUACKENBUSH, L. S. Regulation of vitellogenesis in penaeid shrimps. In: **Frontiers of shrimp research** (eds. DE LOACH, P. F.; DOUGHERTY, W. J.; DAVIDSON, M. A.), p. 125-149. Amsterdam, Elsevier, v. 22, 1991.

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**, v. 94B, p. 445-451, 1989.

RIBEIRO, K. Aspectos estruturais do hepatopâncreas, desenvolvimento ovocitário e caracterização hormonal de fêmeas de *Macrobrachium amazonicum* durante as fases de maturação gonadal. 2006. 87 f. Tese de Doutorado. Centro de Aquicultura, UNESP, 2006.

SAGI, A.; RA'ANAN, Z. Rapid identification of reproductive stat and the receptive period of female in pond populations of *Macrobrachium rosenbergii*. A new technique. **Aquaculture**, v. 48, p. 361-367, 1985.

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

TAKINO, M.; TREVISAN, R. J. Estudo ecológico do Rio Ribeira de Iguape (São Paulo). I. Características Físicas. **Ciência e Cultura**, v. 31, n. 7, p. 697, 1979.

TIWARI, K. K. Distribution of Indo-Burmese freshwater prawns of the genus *Palaemon* Fabr., and its bearing on the Satpura hypothesis. **Bull. Natn. Inst. Sci. Índia**, v. 7, p. 230-239, 1955.

TÓTH, E.; BAUER, R. T. *Synalpheus paraneptunus* (Crustacea: Decapoda: Caridea) populations with intersex gonopores: a sexual enigma among sponge-dwelling snapping shrimps. **Invertebrate Reproduction and Development**, v. 51, n. 1, p. 49-59, 2008.

TROPMAIR, H. Regiões ecológicas do Estado de São Paulo. São Paulo, Instituto de geografia da USP. (Série Biogeografia, 10). 1975. 24p.

VALENTI, W. C. Estudo populacional dos camarões de água doce *Macrobrachium acanthurus* (Wiegmann, 1836) e *Macrobrachium carcinus* (Linnaeus, 1758) do Rio Ribeira de Iguape (Crustacea, Palaemonidae). 1984. 149 f. Dissertação de Mestrado, Universidade de São Paulo, Instituto de Biociências, 1984.

VERDI, A. C. La estructura ovárica de *Macrobrachium borellii* (Nobili, 1896) (Crustacea, Caridea, Palaemonidae). **Revista Brasileira de Biologia**, v. 55, n. 2, p. 193-199, 1995.

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

YANO, I. Induced ovarian maturation and spawning in greasyback shrimp, *Metapenaeus ensis*, by progesterone. **Aquaculture**, v.47, p. 223-229, 1988.

Anexo

TÍTULO: “Histological characterization of the ovary and vitellogenesis dynamics of the shrimp *Macrobrachium olfersi* (Caridea, Palaemonide).”

AUTORES: Natalia Giovannetti^{1*} e Giovana Bertini²

¹*UNESP – Departamento de Biologia, Instituto de Biociências, UNESP, Rio Claro, Avenida 24-A, nº 1515, Caixa Postal 199 cep:13506-900 - Rio Claro, São Paulo – Brazil.*

²*UNESP – Unidade de Registro – Rua Nelson Brihi Badur, 430. CEP 11900-000 - Registro, São Paulo, Brazil.*

**Corresponding author: natbio@rc.unesp.br*

Artigo a ser submetido ao periódico Micron.

ABSTRACT

The present study had the objective to investigate the modifications in *Macrobrachium olfersi* prawns ovaries during reproductive season through macro and microscopic morphological analysis. The females were captured in Ribeira de Iguape river (south coast of Sao Paulo, Brazil). By macroscopic observation three gonadal maturation phases could be determined: a) in development (ID), ovaries that present a coloration that varies from light green to olive green; b) developed/mature (DE), presenting dark green color and c) totally spawned (SP), presenting yellowish brown color and smaler than in the other phases, being located on the hepatopancreas. By histological analysis oocytes could be classified in stages I to V according to the size; the cytoplasmatic aspect; the germinal vesicle and the yolk granulation. Stages I, II and III were observed in females SP, stage IV and V only in females in DE phase.

KEY WORDS: reproductive system, germ cells, gonadal maturation, oocytes, *Macrobrachium olfersi*.

INTRODUCTION

In decapods, the female reproductive system is constituted by one pair of ovaries associated to the oviducts, which open onto gonophores in the base of the third pair of pereopods (KROLL *et al.*, 1992).

Currently, it is known that within this animal group, the gonad maturation and spawning phenomena are not only controlled by endogenous mechanisms, which are deeply dependent of favorable environmental factors such as temperature, pluviometric rate and photoperiod (CARVALHO, 1978; VALENTI, 1984).

According the literature data in decapods life cycle they have different maturation stages constituting the reproductive cycle (CHANG & SHIH, 1995). The knowledge about this cycle is imperative for a better control of growth and/or reproduction of animals kept in captive or even for the reproductive stock (KROLL *et al.*, 1992; MEDINA *et al.*, 1996). Although the macroscopic observations may help distinguish and performed the classification of ovarian maturation stages, it is necessary the use of morphological tools to understand the gonadal development, considering that it helps on the practical application both in the reproductive management, as in the shrimp larvicultures (SAGI & RA'ANAN, 1985).

During the maturation process, the crustacean gonads show several macroscopic modifications, either in size or color of their ovaries (PÉREZ, 1984).

In decapods, the oogenesis has been often studied by light microscopy techniques (YANO, 1988; MEDINA *et al.*, 1996; BARRETO *et al.*, 2008). Little is known about the gonadal activity of the palaemonids, highlighting the morphological studies performed with the stages of ovarian of *M. acanthurus* (GOMES *et al.*, 1979;

CARVALHO, 1980; CARVALHO & PEREIRA, 1981), about the ovary development in *M. amazonicum* (CHAVES & MAGALHÃES, 1993; MARTINS *et al.* 2007) and oocyte classification of *M. rosenbergii* (MEERATANA e SOBHON, 2007).

Concerning the species *M. olfersi*, studies carried out by some investigators must have special attention. Dugger & Dobkin (1975) investigated their larval development; McNamara *et al.* (1980) analyzed the respiratory metabolism during the cycle of molt in the larval stage; Freire & McNamara (1995) performed the macro anatomy and ultrastructure of gills; Mossolin & Bueno (2002, 2003) investigated, respectively, the reproductive biology including some histological aspects of the gonads and the relative growth of the second pereopod; and finally, Simões-Costa *et al.* (2005) analyzed the morphological characteristics of the embryo and the embryonary developmental period.

The aim of this study was to characterize morphologically and histologically the stages through which the female gonads of the freshwater prawns *Macrobrachium olfersi* pass during the reproductive period. Furthermore, the germ cells will be described and characterized during the development stages, thus providing data on the reproductive process of this specie.

MATERIAL AND METHODS

Specimens of *Macrobrachium olfersi* were collected in Ribeira de Iguape river, located in the city of Registro (24°26'15"LS; 47°48'45" LW), SP, Brazil, and were brought still alive within bowls containing water from the site of collecting directly to the Crustaceans Biology and Cultivation Laboratory, which belongs to UNESP and is located in Registro, SP – Brazil – where they were identified according to Melo (2003). In the macroscopic analysis, ovaries were observed by transparence on live animals, followed by removal of the organs, and detected modifications of colors and size, according to the work of Mossolin & Bueno (2002). Subsequently, females were separated and anesthetized with a chilling treatment in a bowl with cold water, and after they were dissected for the removing the ovaries, which were immediately fixed in 4% paraformaldehyde and were subjected to the histological analyses at the Histology Laboratory of the Biology Department UNESP, located in Rio Claro, SP – Brazil.

For ovaries analysis they were dehydrated in a series of several ethanol concentrations, embedding into a resin during 24 h, and transferred to plastic molds previously filled with the catalyst Leica resin. After the resin polymerization, the material was sectioned in a Leica RM 2145 microtome, and the sections were placed in glass slides, followed by the staining with hematoxilin and eosin, according to the procedures of histological routine techniques (JUNQUEIRA & JUNQUEIRA, 1983).

RESULTS

The female *Macrobrachium olfersi* reproductive system presents caridean characteristics, being composed by a bilobed ovary and two oviducts. The ovary is dorsally located on the hepatopancreas and covers the stomach when completely developed. The oviducts are transparent structures, covered by a simple cubic epithelium, dorsoventrally located in the postmeridian compartment of the cephalotorax and connect the gonads and the gonophores opening located in the basis of third pair of pereopod thighs.

The ovaries constitute the most developed internal part of the reproductive system presenting color, size and consistency alterations as the oocytes advance in the maturation process.

Macroscopic analysis of the ovaries during the reproductive phase enabled us to detect three gonadal maturation phases named as follows: a) In development (ID): ovaries show light green to olive green coloration, depending on the development stage of this phase and show chromatophores in the dorsal region, which can be seen through carapace transparency. They are turgid and are found in the posterior part of the stomach, covering the entire hepatopancreas region; b) Developed / mature (DE): present dark green color and dorsal surface rich in chromatophores. They are more turgid and voluminous than in the previous stage filling the entire dorsal cephalotoracic region and extending from the region between the eyes to the first abdominal segment, being easily observed by carapace transparency; and c) Spawned (SP): characterized by yellowish brown ovaries containing several chromatophores all over the surface. Smaller in comparison to the other phases laying on the

hepatopancreas and not reaching the stomach region. This stage corresponds to the total post-elimination of the oocytes.

Histology

The oocytes found in *M. olfersi* were classified in different stages of development which vary from I to V according to the size; the cytoplasmatic aspect; the germinal vesicle and the yolk granulation.

Stage I: characterized by the presence of oogonia: small round-shaped cells, and homogeneous, scant, little-basophilic and agranular cytoplasm.

The germinal vesicle (nucleus) was evident, occupying almost the entire cell volume. No nucleoli were found.

Follicular cells were arranged as simple epithelium varying from squamous to cubic and covering oogonia groupments (Fig. 1). Stage 1 cells were found in females those were in gonadal maturation phases referred to as “in development” and “spawned” (Table 1).

Stage II: Oocytes (Fig. 2C, 4C) are bigger than in Stage I and are still round-shaped.

The cytoplasm, now more voluminous, has a fine granulation, a more homogeneous aspect and intense basophily (Fig. 4C).

The germinal vesicle is spherical, located the cell center and showing disperse chromatin; one or more nucleoli can be found. Follicular cells with similar stage I morphology can be found around each oocyte (Fig. 1, 2C). Oocytes in this stage could be found in females which have gonads in “in development / in maturation” and “spawned” stages. (Table 1)

Stage III: Due to slight increase in the number of yolk granules disperse in the cytoplasm, these germ cells, now in initial vitellogenesis, present a gradate growth and decrease in basophily (Fig. 4D). The germinal vesicle is still in the central region presenting evident nucleolus.

Oocytes in this stage are surrounded by a follicular cell layer with oval nuclei (Fig. 1, 4D). This stage was found in females in “in development / in maturation” and “spawned” maturation phases (Table 1).

Stage IV– In this stage the oocytes are big, with the cytoplasm full of yolk granules predominantly located in the peripheric region and with different sizes and intensities of color, resulting in cytoplasmatic acidophily (Fig. 2D). A germinal vesicle surrounded by a still basophilic cytoplasm is found in this stage (Fig. 2D) and the nucleoli are not evident anymore. Follicular cells are present, forming an epithelium than those observed in the previous stages. Stage IV oocytes were only found in females in “in development/in maturation” phase (Table 1).

Stage V in this stage the oocytes are mature, reaching their maximum size due to the presence of big and dense yolk granules which fill all the cytoplasm preventing the visualization of the germinal vesicle (Fig 3C). Follicular cells have more condensed and very flat nuclei. This stage was found exclusively in females with developed/mature gonads (Table 1).

DISCUSSION

The size, color and texture of crustacean ovaries vary according to the level of maturation (O'DONOVAN *et al.*, 1984) and the coloration result from the accumulation of vitellogenin containing carotenoid pigments (CHARNIAX-COTTON, 1980). In *Macrobrachium olfersi*, as well as in *Macrobrachium amazonicum* (RIBEIRO, 2006) and *Macrobrachium acanthurus* (CAVALHO & PEREIRA, 1981), the ovaries show greenish color as they become more mature. For *Macrobrachium rosenbergii* mature ovaries present orangish color (CHANG & SHINH, 1995; MARTINS *et al.*, 2007). This difference in color is due to the type of pigment that is ingested by the animal, which might be species-specific. (RIBEIRO, 2006).

The variation in color has been used in the elaboration of different scales of the ovarian development (CARVALHO & PEREIRA, 1981; PINHEIRO & FRANSOZO, 1998; MARTINS *et al.*, 2007). For *M. olfersi* it was possible to determine by macroscopic analysis three patterns of coloration and size during gonadal maturation phases. Mossolin & Bueno (2002) determined five stages (phases) of gonadal development for this species, the first stage relating to adult females with ovaries at rest with transparent color, which was not described in this study because they are females who do not are suitable for reproduction. Already the stages II and III, refer to the ID phase and the stages IV and V to the DE phase of this study.

This study brought microscopic observations of *M. olfersi* ovaries in three gonadal maturation phases, where the oocytes were classified in five development

stages, I to V, according to morphological parameters, the size; the cytoplasmatic aspect; the germinal vesicle and the yolk granulation.

The development of oocytes and their distribution in the gonads were characterized by their progressive maturing from the center to the periphery. Such fact is essentially similar to the one described by Carvalho & Pereira (1981) in *M. acanthurus* and Chaves & Magalhães (1993) in *M. amazonicum*.

In *M. olfersi*, oocytes in stage I there were oogonia in the central region of the ovary that, according to Browdy (1989), is called germinative or proliferation zone. The central localization of this zone was also observed in other *Macrobrachium* species (CARVALHO & PEREIRA 1981, CHAVES & MAGALHÃES 1993, VERDI, 1995), varying among the different species of decapods, as it could be seen in *Penaeus setiferus* penaeidae shrimps by King (1948) and *Penaeus stylirostris* by Bell & Lightner (1988), that according to some authors would also be the germinative zone located in the medial region ventral region of each ovarian lobule.

There were significant morpho-histological changes in oocytes I comparing to oocytes II mainly regarding follicular epithelium, which became individualized, involving each oocyte II separately, unlike oocytes I, which were always involved in groups (3 or 4) by follicular epithelium. As they advance in maturation, oocytes increase in size and as a consequence the basophile was substituted by cytoplasmatic acidophily, due to the greater number of yolk components deposited (lipids, proteins and carbohydrates).

Data obtained in this study show that there was an increase in the number of follicular cells involving each oocytes in stage II due to the increase of oocytes volume similarly to what has been found in *M. amazonicum* by Chaves & Magalhães

(1993). As for the shape these formerly cubic cells became plainer during maturation and the same happened to *M. olfersi* as verified in *M. acanthurus* by Carvalho & Pereira (1981) and in *M. amazonicum* by Chaves & Magalhães (1993).

The role of follicular cells as well as their mitotic potential in decapods has been discussed and according to Chang & Shih (1995), the shape and size of these cells would be closely related to their biosynthetic activity. According to Adiyodi & Subramoniam (1983) crustacean follicular cells are critical in the captation of yolk proteins to the interior of the oocytes. In *P. japonicus* penaeidae Yano & Chinzei (1987) showed that vitellogenin (yolk protein) could be synthesized in the follicular cells, in addition top being secreted in hemolinphe. The fact that the follicular cells which surround *M. olfersi* oocytes present alterations in shape and size during different oocytes maturation phases suggests that these divide only in the initial vitellogenesis period and after that go through morphological changes, which explains the change form cubic to scaly due to the increase of oocytes. These cells can also be involved in the synthesis of yolk elements, as well as corium (oocyte proteic membrane) similarly to what has been found by Yano & Chinzei (1987) in *P. japonicus*.

In oocytes II there were germinal cells containing one or more nucleoli in the females with gonads in phase ID and SP confirming Ribeiro (2006) that studing *M. amazonicum* verified oocytes II with germinative cells presenting more than one nucleoli. However, Chaves & Magalhães (1993), analyzing the same species, described only one nucleoli in oocytes II germinal vesicle (pre-vitellogenic).

Oocytes in stage III were frequently found in two phases of maturation (“in development” and “spawned”) of *M. olfersi* females in phases ID and SP and

presented bigger yolk granules disperse in the oocytes cortex and negative to the stainers used in the test similarly to what had been described for *Pandalus kessleri* oocytes by Quintio *et al.* (1989), for *M. rosenbergii* by Chang & Shih (1995) and for *M. amazonicum* by Ribeiro (2006).

In stage III the oocytes were individually covered by follicular epithelium also found in several decapod species such as *Penaeus japonicus* (YANO & CHINZEL, 1987), *M. rosenbergii* (CHANG & SHIH, 1995) e *M. amazonicum* (RIBEIRO, 2006).

At the stage of ovarian maturation of *M. olfersi* designated as ID (in development) revealed the presence of oocytes from stage I to IV, and IV (oocytes in advanced vitellogenesis) predominant. This characteristic was also observed for *M. rosenbergii* (CHANG & SHIH, 1995) and *M. amazonicum* (RIBEIRO, 2006). Carvalho & Pereira (1981) also found that fact to *M. acanthurus*, however, these authors subdivided this phase of maturation in three stages, referred to as stage II.1, II.2 and II.3, which showed the characteristic features of growth and maturation of oocytes, being microscopically distinct phases of pre-vitellogenesis, early vitellogenesis and vitellogenesis advanced so as to justify the division into substages.

In the DE phase, most advanced in gonadal maturation of *M. olfersi*, was found, mainly, oocytes in stage V, with the cytoplasm filled by yolk granules confirming findings by other authors who studied other species as *M. acanthurus* (CARVALHO & PEREIRA, 1981), *P. kessleri* (QUINITIO *et al.*, 1989), *M. rosenbergii* (CHANG & SHIH, 1995) and *M. amazonicum* (RIBEIRO, 2006).

In the phase of post-elimination total of oocytes (spawn) of *M. olfersi*, was observed oocytes of stages I to III, the oocytes III were little observed at this stage,

while oocytes II were widely observed. According Meeratana & Sobhon (2007), the ovary of *M. rosenbergii* right after spawning appears loose and empty. It contains collapsed ovarian pouches with only strands of follicular cells and connective tissue remaining and the most of the follicular cells return to their original ovoid shape. In addition, groups of oogonia at the central ovarian core are frequently seen. Such all events were also observed in *M. olfersi*.

The results of this study showed all phases of the vitellogenic cycle of *M. olfersi* during the reproductive season. Being detected five cellular stages during the three phases of gonadal development, but in varying amounts. In the maturation phase in development, cells of stage IV (oocytes in advanced vitellogenesis) appeared in large quantities, followed by cells of stages I (oocytes), II (pre-vitellogenic oocytes) and III (oocytes in initial vitellogenesis) in a few quantities and with no cells of stage V (mature oocytes). In the developed gonads, occurred only cells of stage V. In the spawn phase, we observed large number of cells in stage II, then cells in stage I, few in the stage III and absence of the stage V. Data also showed that the five stages happened during the three gonadal maturation phases, however in different amounts: in ID phase oocytes IV were more abundant, followed by I, II and III in smaller number; in phase ID, stage IV cells were found in great numbers, followed by stage I, II e III and where V were not present. In DE gonads only oocytes V were present and in SP phase there were great numbers of oocytes II, followed by I and a few III, V were not present.

FIGURES

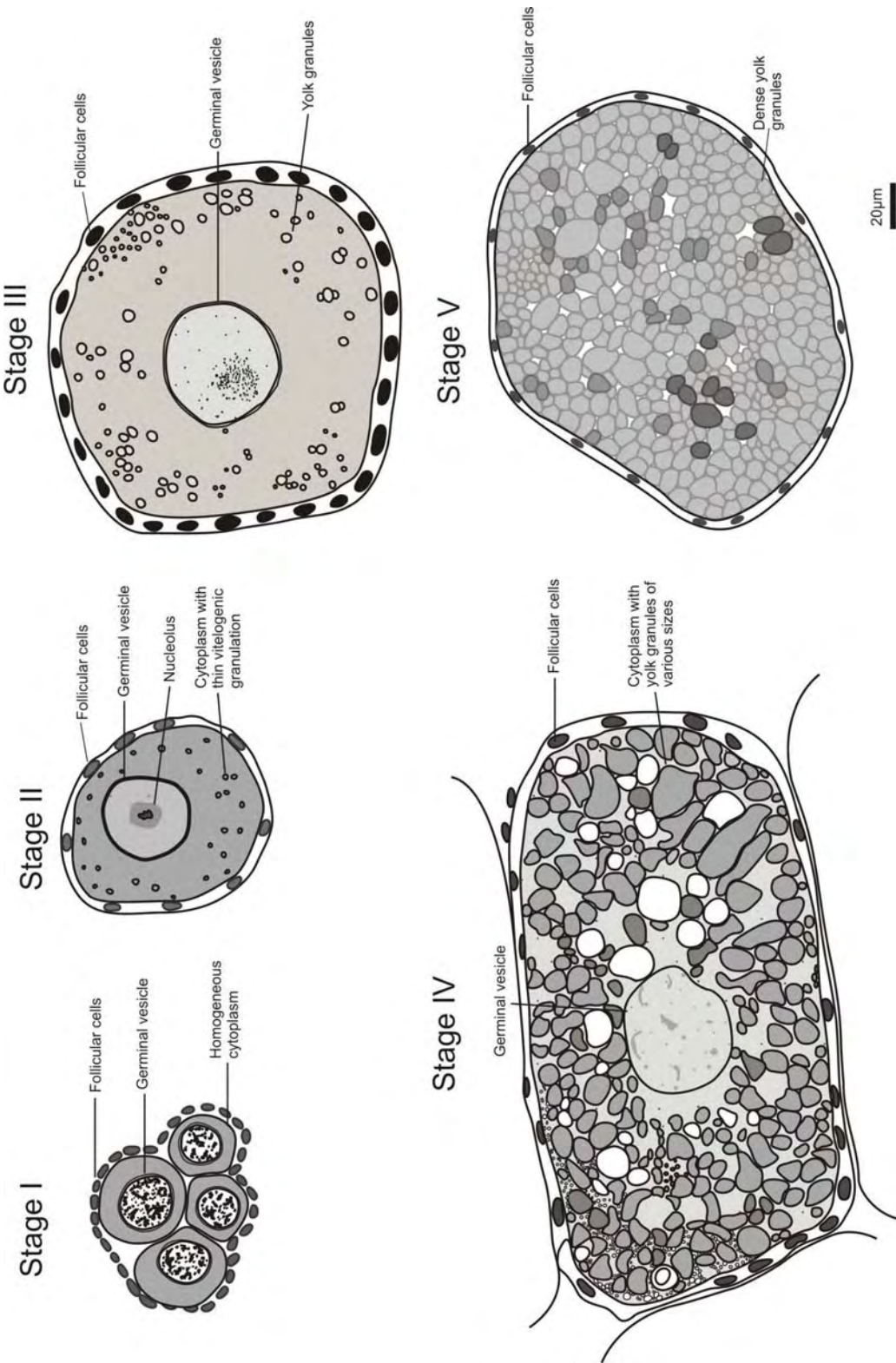


FIGURE 1. Development of germ cells from the ovaries of the prawn *Macrobrachium olfersi*.

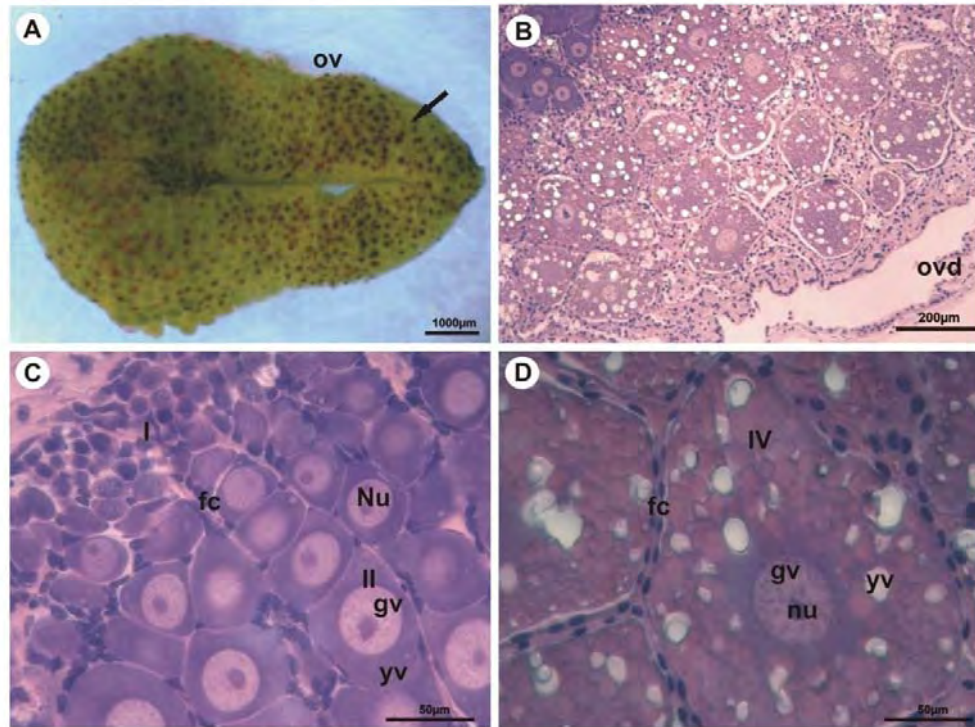


Figure 2. *Macrobrachium olfersi* general view of the ovary at the developing stage (macroscopic view and histological sections stained with hematoxylin and eosin) showing oocytes at different developmental stages (**I**, **II** and **IV**). **A.** Macroscopic view: chromatophores= **arrow**, ovary= **ov**. **B.** Histological section showing oocytes and oviduct= **ovd**. **C.** Histological section showing oocytes **I** and **II**, germinal vesicle= **gv**, follicular cells= **fc**, nucleoli= **nu** and yolk granules= **yg** inside the oocytes cytoplasm. **D.** Detail of oocytes **IV**, follicular cells= **fc**, nucleoli= **nu** and yolk granules= **yg**.

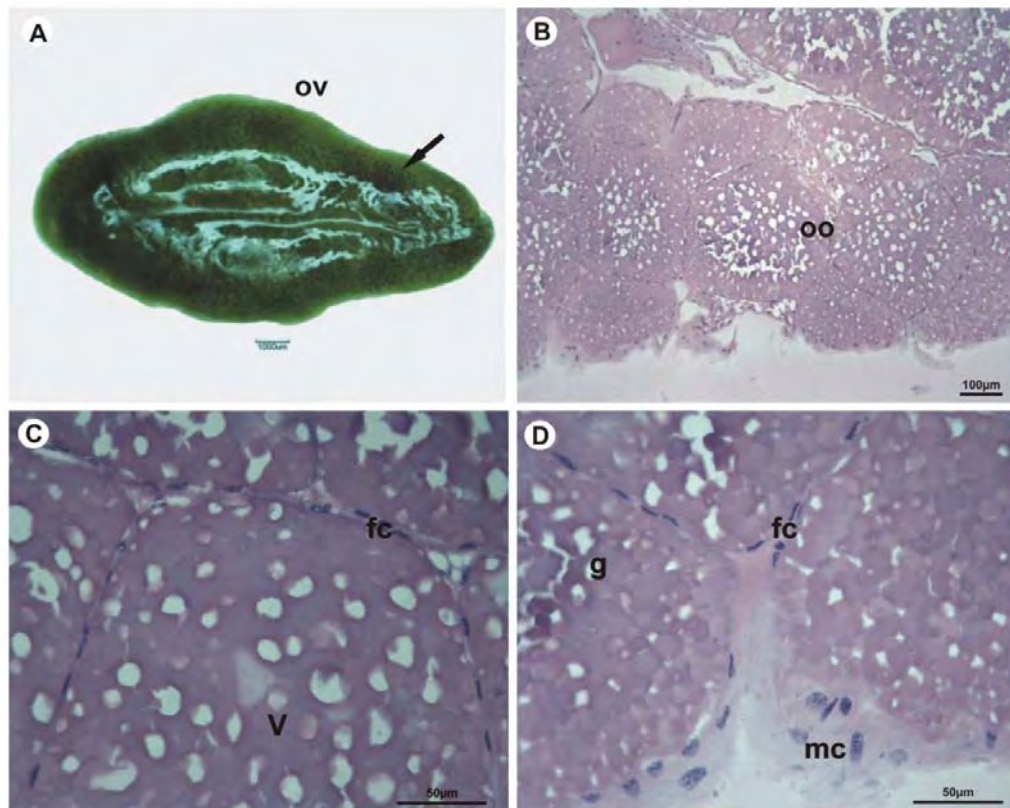


Figure 3. *Macrobrachium olfersi* general view of the ovary at the developed stage (macroscopic view and histological sections stained with hematoxylin and eosin) showing oocytes at the developmental stage V. **A.** Macroscopic view: chromatophores = **arrow**, ovary= **ov**. **B.** Histological section showing oocytes= **oo**. **C.** Histological section showing oocytes **V**, follicular cells= **fc**. **D.** Detail of oocytes **V**, follicular cells= **fc**, yolk granules= **yg** and muscle cells= **mc**.

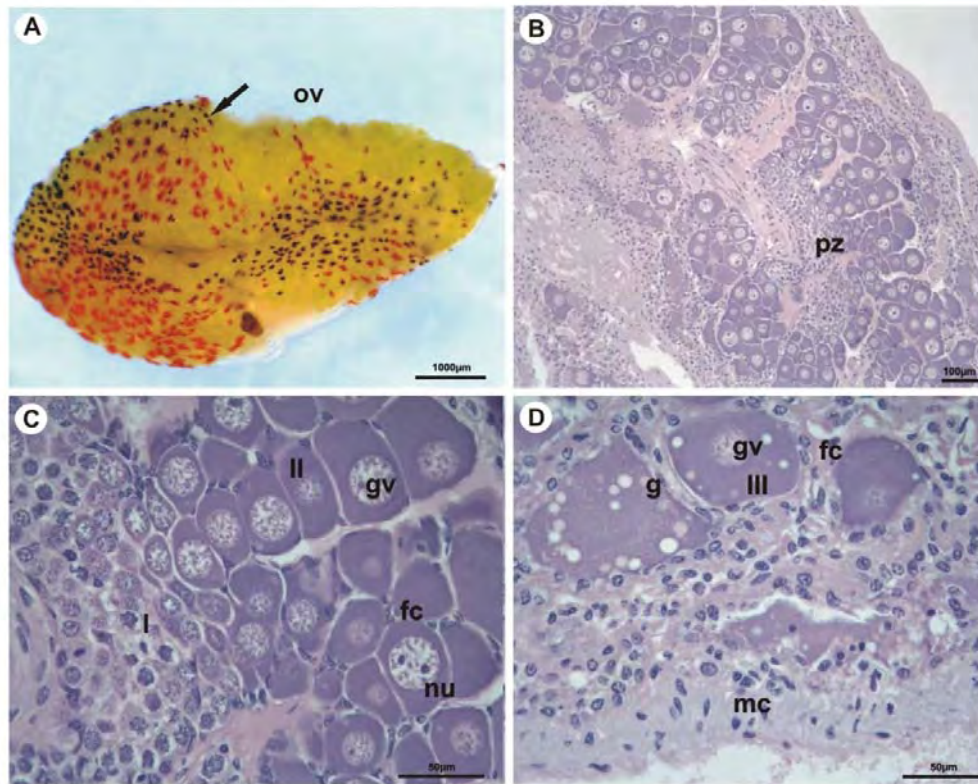


Figure 4. *Macrobrachium olfersi* general view of the ovary at the spawned stage (macroscopic view and histological sections stained with hematoxylin and eosin) showing oocytes at different developmental stages (**I-III**). **A.** Macroscopic view: chromatophores = **arrow**, ovary= **ov**. **B.** Histological section showing the proliferative zone= **pz**. **C.** Histological section showing oocytes **I** and **II**, follicular cells= **fc**, germinal vesicle= **gv** and nucleoli= **nu**. **D.** Detail of oocytes **III**, follicular cells= **fc**, yolk granules= **yg**, germinal vesicle= **gv** and muscle cells= **mc**.

Table 1: Characterization of gonadal development phases and their relation to *Macrobrachium olfersi* females germ cells.

GONADS	MACROSCOPIC CHARACTERIZATION OF GONADS (COLORING/LOCALIZATION)	STAGES				
		I	II	III	IV	V
ID	Light Green to Olive Green color Occupy great part of the dorsal cephalotoracic cavity	+	++	+	+++	-
DE	Dark Green Occupy the entire dorsal cephalotoracic cavity	-	-	-	-	+++
SP	Yellowish-brown Occupy the dorsal region of the hepatopaneas	++	+++	+	-	-

(+++) Very observed, (+ +) mean observed; (+) little observed and (-) was not observed.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico). The authors wish to thanks Gerson Mello Souza and Cristiane Márcia Mileo for their technical support.

REFERENCES

ADIYOD, R. G.; SUBRAMONIAM, T. Arthropoda – Crustácea. In: **Reproductive Biology of Invertebrates: Oogenesis, Oviposition and Oosorption** (eds. ADIYOD, K. G.; ADIYOD, R. G.), v. 1. London: John Wiley e Sons, p. 443-495, 1983.

BARRETO, A. V.; SILVA, J. R. F.; KATSURAGAWA, M.; RAPOSO, M. C. F. Desenvolvimento dos ovários da lagosta *Panulirus echinatus* (Crustacea: Palinuridae) baseado nas análises macroscópicas, microscópicas e relação gonadossomática (RGS). **Revista Brasileira de Zoologia**, v. 25, n. 4, p. 689-695, 2008.

BELL, T. A., LIGHTNER, D. V. **A handbook of normal penaeid shrimp histology**. Baton Rouge, L.A. World Aquaculture Society, 1988. 107p.

BROWDY, C. L. **Aspects of the reproductive biology of *Penaeus semisulcatus* de Haan (Crustacea; Decapoda, Penaeidae)**. 1989, 138f. Ph.D. Thesis, Tel Aviv University, Israel, 1989.

CARVALHO, H. A., **Ciclo sexual de *Macrobrachium acanthurus* (Wiegmann, 1836) (Crustacea: Decapoda): relações com fatores abióticos e ciclo de intermudas**. 1978. 199 f. Tese de Doutorado – Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1978.

CARVALHO, H. A. Morfologia do aparelho reprodutor de *Macrobrachium acanthurus* (Wiegmann, 1836) (Crustacea, Decapoda, Palaemonidae) Parte I – Masculino. **Ciência e Cultura**. v. 32. n 7. p. 941-945, 1980.

CARVALHO, H. A.; PEREIRA, M. C. G. Descrição dos estádios ovarianos de *Macrobrachium acanthurus* (Wiegmann, 1836) (Crustacea, Palaemonidae) durante o ciclo reprodutivo. **Ciência e Cultura**. v. 33, n. 10, p. 1353-1358, 1981.

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.; PAYEN, G. Reproduction in malacostraca crustacean. In: **Endocrinology of Selected Invertebrate Types** (eds. Laufer, H.; Downer, R. G. H.), p. 177-186. Invertebrate Endocrinology, v. 2, New York: Elsevier. 1980.

CHAVES, P. T.; MAGALHÃES, C. O desenvolvimento ovocitário em *Macrobrachium amazonicum* (Heller, 1862) (Crustácea: Decapoda: Palaemonidae), camarão dulcícola da região amazônica. **Acta Amazônica**. v. 23, n. 1, p. 17-23, 1993.

DUGGER, D. M.; DOBKIN, S. A contribution to knowledge of the larval development of *Macrobrachium olfersii* (Wiegmann, 1836) (Decapoda, Palaemonidae). **Crustaceana**, Lieden, v. 29, p. 1-30, 1975.

FREIRE, C. A.; McNAMARA, J. C. Fine structure of the gills of the fresh-water shrimp *Macrobrachium olfersii* (Decapoda): effect of acclimation to high salinity medium and evidence for involvement of the lamellar septum in ion uptake. **Journal of Crustacean Biology**, v. 5, n. 1, p. 103-116, 1995.

GOMES, M. G.; MACHA, N.; SAWAYA, P.; CARVALHO, H. A. Histoquímica dos ovários de *Macrobrachium acanthurus* (Wiegmann, 1836), nos diferentes estádios de desenvolvimento gonadal. II Lipídeos. **Boletim de Fisiologia Animal**, Univ. S. Paulo, v. 3, p. 23-31, 1979.

JUNQUEIRA, L. C. U.; JUNQUEIRA, L. M. M. S. **Técnicas básicas de citologia e histologia**. São Paulo: Santos, 1983. 123p.

KING, J. E. A study of the reproductive organs of the common marine shrimp *Penaeus setiferus* (Linnaeus). **Biological Bulletin**, v. 94, p. 244-262, 1948.

KROLL, R. M.; HAWKINS, W. E.; OVERSTREET, R. M. Reproductive components. In: Harrison, F. W.; Humes, A. G. **Microscopic Anatomy of Invertebrates**, Volume 10: Decapod Crustacea. New York: Wley-Liss Inc, 1992. p. 295-343.

MARTINS, J.; RIBEIRO, K.; RANGEL-FIGUEIREDO, T.; COIMBRA, J. Reproductive cycle, ovarian development, and vertebrate-type steroids profile in the freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii*. **Journal of Crustacean Biology**, v. 27, n. 2, p. 220-228, 2007.

McNAMARA, J. C.; MOREIRA, G. S.; MOREIRA, P. S. Respiratory metabolism of *Macrobrachium olfersii* (Wiegmann) zoeae during the moulting cycle from eclosion to first ecdysis. **Biological Bulletin**, v. 159, p. 692-699, 1980.

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

MEERATANA, P., SOBHON, P. Classification of differentiating oocytes during ovarian cycle in the giant freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii* de man. **Aquaculture**, v. 270, p. 249-258, 2007.

MELO, G. A. S. **Manual de identificação dos Crustacea Decapoda de água doce do Brasil**. Edições Loyola: Centro Universitário São Camilo: Museu de Zoologia, Universidade de São Paulo, 2003. 429p.

MOSSOLIN, E. C.; BUENO, S. L. S. Reproductive biology of *Macrobrachium olfersi* (Decapoda, Palaemonidae) in São Sebastião, Brazil. **Journal of Crustacean Biology**, v. 22, n. 2, p. 367-376, 2002.

MOSSOLIN, E. C.; BUENO, S. L. S. Relative growth of the second pereopod in *Macrobrachium olfersi* (Wiegmann, 1836) (Decapoda, Palaemonidae). **Crustaceana**, v. 76, n. 3, p. 363-376, 2003.

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

PÉREZ, L. A. V. **Desenvolvimento larval de *Macrobrachium heterochirus* (Wiegmann, 1836), *Macrobrachium amazonicum* (Heller, 1862), *Macrobrachium brasiliense* (Heller, 1862) (Crustacea, Decapoda, Palaemonidae) em laboratório**. 1984. 150 f. Tese de Doutorado. Instituto Oceanográfico, USP, 1984.

PINHEIRO, M. A. A.; FRANSOZO, A. Sexual maturity of speckled swimming crab *Arenaeus cribrarius* (Lamarck, 1818) (Crustacea, Brachyura, Portunidae) in the Ubatuba Littoral, São Paulo State, Brazil. **Crustaceana**, Leiden, v. 71, n. 4, p. 434-452, 1998.

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**, v. 94B, p. 445-451, 1989.

RIBEIRO, K. **Aspectos estruturais do hepatopâncreas, desenvolvimento ovocitário e caracterização hormonal de fêmeas de *Macrobrachium amazonicum* durante as fases de maturação gonadal**. 2006. 87 f. Tese de Doutorado. Centro de Aquicultura, UNESP, 2006.

SAGI, A.; RA'ANAN, Z. Rapid identification of reproductive stat and the receptive period of female in pond populations of *Macrobrachium rosenbergii*. A new technique. **Aquaculture**, v. 48, p. 361-367, 1985.

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

VALENTI, W. C. **Estudo populacional dos camarões de água doce *Macrobrachium acanthurus* (Wiegmann, 1836) e *Macrobrachium carcinus* (Linnaeus, 1758) do Rio Ribeira de Iguape (Crustacea, Palaemonidae)**. 1984. 149 f. Dissertação de Mestrado, Universidade de São Paulo, Instituto de Biociências, 1984.

VERDI, A. C. La estructura ovárica de *Macrobrachium borellii* (Nobili, 1896) (Crustacea, Caridea, Palaemonidae). **Revista Brasileira de Biologia**, v. 55, n. 2, p. 193-199, 1995.

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

YANO, I. Induced ovarian maturation and spawning in greasyback shrimp, *Metapenaeus ensis*, by progesterone. **Aquaculture**, v.47, p. 223-229, 1988.

Rio Claro, 13 de julho de 2010.

Orientada:

Natalia Giovannetti

Orientador:

Prof. Dr. Osmar Malaspina

Co-orientadora:

Profa. Dra. Giovana Bertini