

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
CENTRO DE AQUICULTURA DA UNESP
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

*“Aspectos estruturais do hepatopâncreas,
desenvolvimento ovocitário e caracterização hormonal
de fêmeas de *Macrobrachium amazonicum* durante as
fases de maturação gonadal”.*

M.Sc. Karina Ribeiro
Bióloga

Jaboticabal-SP
outubro/2006

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
CENTRO DE AQUICULTURA DA UNESP
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

*“Aspectos estruturais do hepatopâncreas,
desenvolvimento ovocitário e caracterização hormonal
de fêmeas de *Macrobrachium amazonicum* durante as
fases de maturação gonadal”.*

Tese de Doutorado apresentada ao
Centro de Aqüicultura da Unesp,
como parte das exigências para
aquisição do Título de Doutor em
Aqüicultura.

**Pós-graduanda: Karina Ribeiro
Orientadora: Profa. Dra. Irene B. Franceschini Vicentini**

**Jaboticabal-SP
outubro/2006**

Dedico este trabalho à minha eterna ORIENTADORA

Profa. Dra. Irene Bastos Franceschini Vicentini

**Professora, orientadora, "mãe científica", colega de profissão e
principalmente AMIGA.**

Com ela aprendi muito mais que CIÊNCIA.

**À você professora sou grata pelos conselhos que auxiliaram no meu
crescimento profissional, científico e muitas vezes pessoal.**

"Mestre é aquele que caminha com o tempo, propondo paz, fazendo comunhão, despertando sabedoria. Mestre é aquele que estende a mão, inicia o diálogo e encaminha para a aventura da vida. Não é só aquele que ensina fórmulas, regras, raciocínios, mas aquele que também questiona e desperta para a realidade. Não é aquele que dá de seu saber, mas aquele que faz germinar o saber do discípulo. Feliz é aquele que tranfere o saber e aprende o que ensina!"

Cora Coralina

Homenagem

Aos meus pais por serem o maior motivo da minha persistência, pela educação, apoio e confiança em mim investidos.

Ao meu pai Carlos pelo exemplo de amor, honestidade e força;

À minha mãe Marina pelo exemplo de mulher, inteligência, capacidade e coragem.

Obrigada pelos ensinamentos, pelos sermões, pelas palmadas e, principalmente pelos exemplos.

Obrigada pelos agrados e principalmente pelos desagradados.

Assim, eu pude ver que na vida nem tudo é como a gente quer.

Aprendi a ter limites a ser mais "gente".

Obrigada pelas preocupações sei que muitas vezes fui (e ainda sou) causa de inapetência e insônia.

Obrigada pela caminhada, pela luta, pela lida.

Aprendi com vocês:

a ter coragem e a não desanimar.

Obrigada pelas mãos entrelaçadas na minha,

doando-me confiança,

na certeza de estar indo por caminhos seguros

e na certeza de que terei sempre onde amparar

caso eu tropece.

(Mena Moreira)

À minha irmã Katia pela fidelidade, confiança e principalmente pela AMIZADE!

Agradecimentos Especiais

Eduardo Makoto Onaka, Mariana Cutolo Araujo e Fabiana Rizzi Bozzo, por serem muito mais que amigos. Pelo carinho e companherismo durante toda a pós-graduação e pela amizade que com certeza será ETERNA!

"O valor das coisas não está no tempo em que elas duram, mas na intensidade com que acontecem.

Por isso existem momentos inesquecíveis, coisas inexplicáveis e pessoas incomparáveis".

(Fernando Pessoa)

Luciene Patrici Papa

Pela Ajuda, companherismo e auxílio, pelo exemplo de competência, mas principalmente pela amizade.

Julio Marques Junior, Mariana Santos Silva

Por serem os "irmãos caçulas" que compartilharam momentos maravilhosos e que me ensinaram muito.

"Amigo é coisa para se guardar. No lado esquerdo do peito, mesmo que o tempo e a distância digam não".

(Fernando Brant e Milton Nascimento)

Tiago Tobias Freitas

Pelo carinho, paciência, amor e principalmente pelo respeito.

É incrível, nada desvia o Destino.

Hoje tudo faz sentido.

E ainda há tanto a aprender

(Jorge Vercilo)

AGRADECIMENTOS

A Deus e a todas as minhas proteções, por me darem a força necessária para enfrentar os obstáculos do dia a dia.

Aos membros da Banca do Exame Geral de Qualificação: Profa. Dra. Silvana B. Antoni, Profa. Dra. Laura Satiko Okada Nakaghi e Profa. Dra. Maria Teresinha Siqueira Bombonato, pelas preciosas contribuições para melhoras deste trabalho.

Aos membros da Banca examinadora: Prof. Dr. Antonio Marcos Orsi, Profa. Dra. Máira Aparecida Stefanini, Profa. Dra. Margarida Barros, Profa. Dra. Maria Teresinha Siqueira Bombonato, pelas oportunas sugestões e contribuições para melhoras deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Wagner Cotroni Valenti, por contribuir para minha formação com suas experiências e por ser exemplo de determinação.

Aos amigos que me auxiliaram na execução deste trabalho: José Roberto Polachini, Mariana C. Araújo, Eduardo M. Onaka, Luciene P. Papa, Alessandra Guerra Messias e Julio Marques Junior. Muito obrigada pela preciosa ajuda!

A Maria Helena, técnica do Centro de Microscopia Eletrônica do Instituto de Biociência da UNESP/Botucatu, pelo processamento do material destinado à Microscopia Eletrônica de Transmissão.

Aos Professores da Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro (UTAD)/Portugal: Prof. José Julio Gonçalves Barros Martins, Profa. Dra. Anabela

Gouveia Antunes Alves, Prof. Dr. Paulo José Azevedo Pinto Rema, pela maravilhosa recepção e por estarem sempre acessíveis.

A Técnica do Laboratório de Fisiologia Animal da Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro (UTAD), Carla Alexandre F. Coutinho pela valiosa ajuda na extração hormonal.

À professora do departamento de patologia clínica Profa. Dra. Anabela Gouveia Antunes Alves por disponibilizar-se a nos auxiliar nas análises de imunohistoquímica.

Às sempre amigas Luciene Patrici Papa e Kátia Ribeiro, pelo auxílio nos processos finais das correções da tese.

Aos Professores do Laboratório de Morfologia de Organismos Aquáticos da UNESP/Campus de Bauru:

Prof. Dr. Carlos Alberto Vicentini por ser além de um eterno mestre, um exemplo de dignidade e profissionalismo;

Profa. Dra. Maria Terezinha Siqueira Bombonato, por se tornar uma amiga e ser exemplo de força e coragem.

Aos amigos do Laboratório de Morfologia de Organismos Aquáticos da UNESP/Campus de Bauru pela amizade, convívio e espírito de equipe!

Aos amigos do Setor de Carcinicultura de Jaboticabal/SP por compartilharem todos os momentos em que estive presente.

Aos funcionários do CAUNESP pelo convívio prontidão e amizade.

Aos meus ETERNOS amigos do CAUNESP: Veralice (Veroka), Valdecir (Vardeça), Marcio (Perereca) e Roberto (Robert) por serem muito mais que amigos.

Aos amigos de Pós-Graduação: Mariana, Eduardo (Twin), Fabiana R. Bozzo, Jaime, Camilo, Fabio, Ana, Peter, Luciana, Leo "Bacarin", Ana Elisa, Cris, Fabiana B., Fabiana P., Fabiana Garcia, Leo Taschibana, Nilton (Paraca), Laurindo, Michele, Daniela, Vanessa, ,,,entre tantos, pela gratificante convivência!

Em especial ao "irmão" conquistado: José Julio Martins por ser minha família em Portugal, e pelo apoio e exemplo de honestidade e coragem.

À todos os que passaram pelo CAUNESP e que deixaram saudades;

A todos aquele que direta ou indiretamente me auxiliaram na conclusão deste trabalho o meu Muito obrigada!

**"TALVEZ NÃO TENHAMOS CONSEGUIDO FAZER O
MELHOR, MAS LUTAMOS PARA QUE O MELHOR FOSSE
FEITO.
NÃO SOMOS O QUE DEVERÍAMOS SER; NÃO SOMOS O
QUE IREMOS SER. MAS, GRAÇAS A DEUS, NÃO
SOMOS O QUE ÉRAMOS".**

MARTIN LUTHER KING

SUMÁRIO

Resumo	01
Abstract	02
Introdução Geral	04
Objetivo	07
Literatura	
<i>Aparelho Reprodutor Feminino</i>	08
<i>Hepatopâncreas</i>	14
<i>Sistema Hormonal</i>	20
Material e Métodos	
<i>Animais</i>	26
<i>Índices Gonadossomáticos (IGS) e Hepatossomáticos (IHS):</i>	26
<i>Análise de microscopia de luz e eletrônica</i>	26
<i>Caracterização hormonal</i>	28
<i>Extração de esteróides</i>	29
<i>Determinação de esteróides por rádio imuno-ensaio</i>	29
Resultados	
<i>Valores dos Índices Gonadossomáticos (IGS) e Hepatossomáticos (IHS):</i>	31
Estrutura ovariana	31
Estrutura do hepatopâncreas	35
Quantificação hormonal	38
Documentação fotográfica	42
Discussão	75
Conclusões	89
Referências Bibliográficas	90

Aspectos estruturais do hepatopâncreas, desenvolvimento ovocitário e caracterização hormonal de fêmeas de *Macrobrachium amazonicum* durante as fases de maturação gonadal

RESUMO

O presente trabalho realizou o estudo dos aspectos estruturais do hepatopâncreas, ovários e da caracterização hormonal de fêmeas de *Macrobrachium amazonicum*, nos diferentes estágios de maturação gonadal. Para tanto utilizaram-se 150 fêmeas adultas subdivididas entre os cinco diferentes estágios de maturação ovariana. Após serem capturados os animais foram pesados e mortos por choque térmico. Ovários e hepatopâncreas foram coletados e pesados individualmente para obtenção dos índices gonadossomático (IGS) e hepatossomático (IHS). Para as análises de microscopia de luz e eletrônica de transmissão, ovários e hepatopâncreas foram fixados em solução de Karnovsky e seguiram os procedimentos de rotina de inclusão. Os ovários, hepatopâncreas e hemolinfa destinados à quantificação hormonal foram armazenados em ependorfes e preservados em nitrogênio líquido a -70°C , para posterior processamento de radioimunoensaio visando avaliação das concentrações de estradiol, progesterona e testosterona. Os resultados relacionados ao IGS e IHS demonstram uma correlação inversa entre os ovários e o hepatopâncreas nos diferentes estágios de maturação gonadal. Em relação ao desenvolvimento ovariano, observa-se a distribuição de cinco tipos celulares ao longo dos cinco estágios de maturação gonadal. Desta forma encontram-se as ovogônias ou células germinativas mais jovens no estágio I de maturação ovariana. As células pré-vitelogênicas, observadas a partir do estágio II, apresentam vesículas de retículo endoplasmático rugoso. Essas vesículas são importantes nas fases de vitelogênese endógena e exógena. Os ovócitos em vitelogênese inicial, característicos do estágio III, apresentam a deposição de vitelo endógeno. As células em vitelogênese avançada, próprias do estágio IV de maturação gonadal, são o alvo principal da vitelogênese exógena. No estágio V de maturação observa-se a formação do córion no ovócito maduro. Em relação ao hepatopâncreas, observa-se que este órgão é formado por um conjunto de túbulos hepatopancreáticos, revestidos por epitélio pseudo-estratificado composto por cinco

tipos celulares, sendo eles, célula E (indiferenciada), célula F (fibrilar), célula B (vesicular), célula R (reabsortiva) e célula M (basal). Estas células apresentam características morfológicas relacionadas às funções de digestão e assimilação de nutrientes, assim como a de reserva energética, fundamental para os processos reprodutivos. A quantificação hormonal em fêmeas de *Macrobrachium amazonicum* teve o propósito de investigar a correlação entre os diferentes estágios de maturação ovariana e os níveis de hormônios esteróides (estradiol, progesterona e testosterona) presentes nos ovários, hepatopâncreas e hemolinfa. Com relação ao estradiol e a progesterona nota-se alta concentração nos estágios I e II, coincidindo com a fase de preparo para a vitelogênese, e queda progressiva no decorrer dos estágios seguintes de maturação gonadal, atingindo sua menor concentração no momento da desova. Já a testosterona não demonstra grandes alterações durante o ciclo reprodutivo.

Palavras-chave: *Macrobrachium amazonicum*, estrutura, ovário, hepatopâncreas, esteróides, ciclo reprodutivo

Structural features of the hepatopancreas, oocytes development and hormonal characteristics of females of the freshwater prawn, *Macrobrachium amazonicum*, during gonadal maturation

ABSTRACT

This study described the structural aspects of the hepatopancreas and ovaries, and the hormonal features of females of the freshwater prawn *Macrobrachium amazonicum*, during the reproductive cycle. The specimens were captured and killed by thermic shock. The gonadosomatic (GSI) and hepatosomatic (HSI) indices were calculated as the percentage of the weight of the gonad and hepatopancreas to total body weight, respectively. Ovaries and hepatopancreas were fixed in Karnovsky solution and destined to light and ultrastructural microscopy

studies. Small portions of the ovary, hepatopancreas and hemolymph were frozen in liquid nitrogen, for later steroid quantification (estradiol, progesterone and testosterone). The relationships between GSI and HSI demonstrate an inverse correlation between ovary and hepatopancreas during the maturation cycle. The oocytes distribution is variable depending on the ovarian maturation degree. The ovary in stage I consists of oogonia. The ovary in stage II consists mainly by previtellogenic oocytes that possess vesicles of the endoplasmic reticulum. These vesicles are important to endogenous and exogenous vitellogenesis. Initial vitellogenic oocytes are mainly observed in the ovary in stage III and possess vitelline reserve, called as endogenous vitellogenesis. Ovary in stage IV is composed of late vitellogenic oocytes that uptake exogenous vitellogenin. Mature oocytes present a corion formation. The hepatopancreas is composed by tubules that are lined by a pseudostratified epithelium, which consists of five cell types, identified as E (embryonic), F (fibrillar), B (blisterlike), R (resorptive) and M (basal). These cells present relationships with digestion and nutrient storage, which are very important for the reproductive processes. The involvement of steroids (estradiol, progesterone and testosterone) in the ovarian maturation in *Macrobrachium amazonicum* shows that the levels of estradiol and progesterone increase steadily during stages I and II, which coincides with the previtellogenic phases. Estradiol and progesterone start a progressive decrease throughout the remaining ovarian maturation stages. The lowest levels of these hormones are observed at stage V. Testosterone shows relatively constant concentration throughout the five stages of ovarian maturation.

Key words: *Macrobrachium amazonicum*, structure, ovary, hepatopancreas, steroids, reproductive cycle

INTRODUÇÃO

A carcinicultura de água doce tem sido reconhecida como forma de produção de crustáceos com baixo impacto ambiental (New et al., 2000). Além disso, este é um dos setores que mais cresce no mundo (Valenti, 2002). Os dados da FAO (2002) indicam que o volume de *Macrobrachium rosenbergii* cultivado aumentou de 21.000 para 118.500 toneladas no período de 1990 a 2000. A produção de *Macrobrachium nipponense* alcançou 100.000 toneladas na China em 2000 (Miao e Ge, 2002). Estes dados indicam que o setor cresceu mais de 1000% na última década do último milênio (Valenti, 2002). Em 2001, a produção mundial de camarões de água doce ultrapassou 300.000 toneladas, movimentando mais de US\$ 1 bilhão (Valenti, 2002). Já em 2002, somente a produção mundial de *Macrobrachium rosenbergii* foi estimada em 195.000 toneladas e movimentou aproximadamente US\$ 617 milhões (FAO, 2004).

Embora os camarões de água doce ainda ocupem posição inferior aos marinhos na produção mundial, eles apresentam várias vantagens tais como maior resistência a doenças, maturação e larvicultura mais simples, independência da água salgada na fase de crescimento (engorda), sistema de produção compatível com pequenas propriedades e menor impacto ambiental (New, 1995; Valenti, 1996; New, 2000). Além disso, o cultivo de camarões de água doce apresenta características que favorecem o cultivo sustentável em empresas que usam mão-de-obra familiar (Valenti, 1998; New et al., 2000).

Até o presente, *Macrobrachium rosenbergii* é a única espécie cultivada no Brasil em escala comercial. O cultivo é realizado em pequenas propriedades, distribuídas em 16 estados brasileiros, tendo o Espírito Santo como o principal produtor. Este estado detem 1/3 de toda a produção brasileira (Moraes-Riodades, 2004). Atualmente, essa produção encontra-se estabilizada em 400 toneladas anuais (Valenti, 2004).

A carcinicultura de água doce no Brasil está embasada em uma única espécie exótica, e portanto, ela corre riscos com o surgimento de problemas como doenças. Este problema ao afetar a espécie pode causar colapso no setor produtivo. Além disso, *Macrobrachium rosenbergii* é uma espécie de origem asiática e não há estudos referentes ao impacto da liberação dessa espécie em ambientes naturais brasileiros. O escape de espécies exóticas cultivadas tem sido responsável por vários problemas ambientais, tais como a competição e/ou predação em relação às espécies nativas, alterações de habitats e disseminação de patógenos (Bridger e Garber, 2002; Myrick, 2002). O grande desenvolvimento da produção de *Macrobrachium nipponense* na China mostra a importância e a viabilidade do uso das espécies nativas para o cultivo. No Brasil encontra-se naturalmente três espécies de camarões de água doce com grande potencial para cultivo: *Macrobrachium acanthurus*, *Macrobrachium amazonicum* e *Macrobrachium carcinus* (Valenti, 1993). Embora alguns aspectos da biologia dessas espécies já tenham sido estudados, faltam pesquisas direcionadas para o desenvolvimento de tecnologia de produção.

Entre os camarões nativos, a espécie *Macrobrachium amazonicum* merece destaque. Esta espécie é conhecida como camarão regional no estado do Pará (Moraes-Riodades et al., 1999), camarão canela e camarão sossego (Valenti, 1985) e, atualmente vem sendo chamado de camarão-da-amazônia. Esse camarão apresenta ampla distribuição geográfica, ocorrendo desde a Venezuela até o estado do Paraná e habitam as bacias Amazônica, do Orenoco, do São Francisco, do Paraná, rios do Nordeste e do Centro-Oeste (Holthuis, 1952; Davant, 1963; Bialetzki et al., 1997). Supõe-se que esta espécie possa ter sido introduzida em algumas dessas regiões, mas está totalmente adaptada (Gurgel e Matos, 1984; Magalhães, 1999).

O *Macrobrachium amazonicum* é um camarão pequeno, que pode alcançar até 16 cm e 30 g (Valenti et al., 2003). Sua carne apresenta textura mais firme e sabor mais acentuado em relação à carne da espécie *Macrobrachium rosenbergii* e, por isso, é bem mais aceita nos mercados consumidores (Moraes-Riodades et al., 1999). Essa espécie é amplamente consumida pelas populações de rendas baixa, média e alta da região amazônica (Moraes-Riodades e Valenti, 2001) e pela

população rural da região Nordeste (Gurgel e Matos, 1984). Esta espécie é encontrada em quase todo o território nacional e, portanto, o seu cultivo na maior parte do país, não oferece riscos de introdução de espécies exóticas na natureza por escape de viveiros de aquicultura. Apresentando assim características importantes de espécies com potencial para a Aquicultura. No entanto o *Macrobrachium amazonicum* vem sendo largamente utilizado em pesca artesanal na região Nordeste (Gurgel e Matos, 1984) e nos estados do Pará e Amapá (Odinetz-Collart, 1987; Odinetz-Collart e Moreira, 1993). Desta forma, faz-se necessários estudos que gerem informações para subsidiar técnicas de produção, seja através dos sistemas de cultivo comercial, ou através de exploração racional dos estoques naturais, evitando-se os riscos do seu esgotamento. No entanto, alguns testes de larvicultura e engorda desta espécie foram realizados no estado do Pará em 1996, mas não tiveram continuidade devida à falta de tecnologia adequada (Moraes-Riudades et al., 1999).

Com o intuito de ampliar a produção da espécie *Macrobrachium amazonicum*, muitos estudos vem sendo realizado, principalmente em relação à ecologia e biologia pesqueira de populações naturais (Odinetz-Collart, 1987; 1991a; 1991b; Odinetz-Collart e Moreira, 1993; Odinetz-Collart e Magalhães, 1994). Foram investigados outros aspectos, tais como a fecundidade (Lobão et al., 1986; Scaico, 1992; Odinetz-Collart e Rabelo, 1996), o desenvolvimento gonadal (Bragagnoli e Grotta, 1995), o desenvolvimento larval (Guest, 1979; Romero, 1982; Barreto e Soares, 1982; Magalhães, 1985; Lobão et al., 1987; Rojas et al., 1990), e a alimentação e manutenção dos animais em laboratório (Alves, 1986; Roverso et al., 1990; Lobão et al., 1994).

Nos últimos anos, outros fatores vêm sendo investigados sobre a biologia do camarão *Macrobrachium amazonicum*, como por exemplo: testes de laboratório sobre técnicas de estocagem, alimentação, manutenção e crescimento de pós-larvas (Barreto e Soares, 1982; 1982b; Lobão et al., 1987; 1994; 1996; Rojas et al., 1990; Roverso et al., 1990) e adultos (Alves, 1986). Portanto, a avaliação do potencial das espécies de crustáceos para a produção, assim como, os aprimoramentos de técnicas que melhorem seu cultivo estão embasados na ampliação dos conhecimentos sobre ecologia e biologia das espécies. Estes dados

referem-se a estudos envolvendo o crescimento e a reprodução dos animais. Entretanto no ano de 2000 desenvolveu-se um programa multi-institucional e multidisciplinar iniciado sob a liderança do Centro de Aqüicultura da UNESP – CAUNESP. Este projeto esta inserido neste programa multi-institucional que visa desenvolver um pacote tecnológico de produção sustentável para o cultivo de *Macrobrachium amazonicum* (Valenti et al., 2003)

OBJETIVOS

- ❖ Caracterizar por meio de microscopias de luz e eletrônica de transmissão a maturação ovocitária nos diferentes estágios de maturação em fêmeas de *Macrobrachium amazonicum*;
- ❖ Caracterizar por meio de microscopias de luz e eletrônica de transmissão a organização celular do hepatopâncreas em fêmeas de *Macrobrachium amazonicum*;
- ❖ Determinar a presença e as concentrações dos esteróides estradiol, progesterona e testosterona nos ovários, hepatopâncreas e hemolinfa de fêmeas de *Macrobrachium amazonicum* em diferentes estágios de maturação gonadal utilizando técnicas de Rádio Imuno Ensaio (RIA).

LITERATURA

Aparelho reprodutor feminino

Nos decápodos, o aparelho reprodutor das fêmeas é constituído por um par de ovários associados aos ovidutos que se abrem nos gonóporos localizados na base do terceiro par de pereiópodos (Kroll et al., 1992). Algumas fêmeas apresentam estruturas especializadas para receber o esperma, como a espermateca em decápodos (Kroll et al., 1992). A espermateca pode ser caracterizada como invaginação do exoesqueleto, modificação do oviduto ou ainda, simplesmente um canal para armazenar ou receber o espermátóforo (Adiyod e Subramoniam, 1983). Em *Inachus falangeus* a espermateca é conectada ao oviduto e está ligada ao ovário e à camada externa do corpo (Diesel, 1990). Os carídeos retêm seus ovos nos pleópodos, localizados abaixo do abdômem onde serão mantidos por longo período de incubação até a sua eclosão (Choy, 1986). Desta forma, fêmeas maduras de *Macrobrachium rosenbergii* apresentam uma câmara de ovos formada pela primeira, segunda e terceira pleuras abdominais. Camarões do gênero *Macrobrachium* apresentam cerdas reprodutivas, no tórax e nos pleópodos, funcionalmente distintas e denominadas cerdas de ovoposição e ovígeras, respectivamente. As cerdas de ovoposição são permanentes e são encontradas nos últimos pares de pereiópodos. Essas cerdas apresentam a função de guiar e fixar os ovos em direção à câmara ovígera nos pleópodos, durante a desova. Estas cerdas são encontradas nos pleópodos após a muda de pré-desova e, assim retêm os ovos durante o desenvolvimento embrionário das larvas (Nagamine e Knight, 1980). Cabe destacar, que essas características não existem nos peneídeos, pois estes liberam seus ovos diretamente na água (Ismael e New, 2000).

Com especial ênfase aos ovários dos decápodos, estes órgãos estão localizados na região dorsal do intestino. Eles são parcialmente fusionados na região cefalotorácica, consistindo de um par de cornos e vários lobos laterais. Em peneídeos, os lobos se estendem no cefalotórax ao longo do comprimento do abdômen até o telson (Kroll et al., 1992). Em espécies do gênero *Macrobrachium*, como por exemplo em *Macrobrachium rosenbergii*, ovários totalmente desenvolvidos

se encontram apoiados dorsalmente no estômago e hepatopâncreas, logo atrás dos olhos, podendo adentrar até o primeiro segmento abdominal (Ling, 1969). Assim, os ovários desta espécie se desenvolvem em direção à parte posterior do cefalotórax, e quando maduros tornam-se facilmente identificáveis por transparência da carapaça, como uma grande massa alaranjada (Sagi e Ra'Anan, 1985). O tamanho, cor e textura dos ovários modificam-se conforme seu grau de amadurecimento (O'Donovan et al., 1984). A coloração dos ovários resulta do acúmulo de vitelogenina contendo pigmentos do tipo carotenóides (Charniaux-Cotton, 1980).

Os ovários dos decápodos estão envoltos por uma cápsula de tecido conjuntivo que se invagina formando septos, os quais suportam o epitélio germinativo. O epitélio germinativo origina as ovogônias e as células foliculares (Adiyodi e Subramoniam, 1983; Bell e Lightner, 1988). Em peneídeos, os septos de tecido conjuntivo separam o ovário em subunidades, sendo que cada uma está constituída de epitélio germinativo e células foliculares (Johnson, 1980; Bell e Lightner, 1988). Na espécie *Homarus americanus* uma espessa lâmina basal de tecido conjuntivo fibroso sustenta o epitélio germinativo, circundando os folículos e as células musculares na parede do ovário (Talbot, 1981). Essa característica foi identificada na espécie *Homarus americanus* (Talbot, 1981), porém esta camada muscular está geralmente ausente em ovários de crustáceos (Adiyodi e Subramoniam, 1983). Ainda, no tecido conjuntivo presente nos ovários de crustáceos, observam-se sinusóides e vasos hemolinfáticos (Johnson, 1980; Bell e Lightner, 1988).

O epitélio germinativo, também denominado de zona de proliferação pode ser observado tanto na periferia como no centro dos ovários da maioria das espécies de decápodos. As faixas de zona de proliferação constituem a camada germinal das ovogônias (Kroll et al., 1992). Estas zonas de proliferação podem variar em relação às espécies, devido à pressão exercida pela produção e crescimento dos ovócitos. Esta pressão pode causar translocação da zona germinativa, como ocorre em *Carcinus maenas*, no qual essa zona se desloca da região periférica para a central (Laulier, 1974). Em *Penaeus setiferus*, a zona germinativa se encontra na posição médio-ventral da parede dos lobos (Bell e Lightner, 1988). Quando ocorre a maturação, os ovócitos se movem para a periferia do ovário e os lobos se expandem

no espaço hemocélico. Já em *Penaeus vannamei* as ovogônias da zona germinativa se dividem tornando-se ovócitos pré-vitelogênicos e se movem da região periférica para a região central do ovário (Bell e Lightner, 1988).

As células foliculares são as únicas células não germinativas que estão presentes no ovário dos crustáceos (Kroll et al., 1992). Durante o desenvolvimento ovocitário e a vitelogênese, as células foliculares se movem, juntamente com os ovócitos do epitélio germinativo para a zona de crescimento folicular. Essas células permanecem aderidas à periferia dos ovócitos (Laulier e Demeusy, 1974). Esse processo é denominado de foliculogênese (Adiyodi e Subramoniam, 1983). As células foliculares parecem ter importante papel nos processos de vitelogênese nos decápodos. Observações realizadas por Adiyodi e Subramoniam (1983) descrevem que a foliculogênese é um pré-requisito para a captação de proteínas de vitelo no ovócito e é provavelmente estimulada pelos altos índices hormonais. Em *Penaeus japonicus* o vitelo sintetizado pelas células foliculares é secretado na hemolinfa e captado pelo ovócito (Yano e Chinzei, 1987). A passagem do vitelo para o interior dos ovócitos é facilitada por espaços intercelulares localizados entre as células foliculares (Adiyodi e Subramoniam, 1983). Em *Penaeus monodon* as células foliculares estão sempre presentes e se renovam após cada ovulação (Charniaux-Cotton, 1980; Tan-Fermin e Pudadera, 1989).

Os ovários de crustáceos apresentam diferentes fases de maturação constituindo um ciclo reprodutivo (Chang e Shih, 1995). O estudo deste ciclo reprodutivo 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 de maturação ovariana, faz-se necessário o conhecimento morfológico do desenvolvimento gonadal, uma vez que auxiliará na aplicação prática tanto no manejo dos reprodutores, como nas larviculturas de camarões (Sagi e Ra'Anan, 1985).

Meusy e Payen (1988) separaram os estágios de desenvolvimento ovariano em pré-vitelogênese, vitelogênese, crescimento e maturação ovocitária. Estudos realizados sobre a maturação gonadal em fêmeas de *Macrobrachium acanthurus*,

estabeleceram quatro estágios de maturação ovariana, de acordo com características macro e microscópicas dos ovários (Carvalho e Pereira, 1981). Os estágios descritos por esses autores são estágio I ou imaturo; estágio II ou em maturação, sendo que este compreende três sub-estágios; estágio III ou maduro; e estágio IV ou pós-eliminação total, compreendendo dois sub-estágios. Os sub-estágios só puderam ser estabelecidos a partir de análises das características histológicas ovarianas. Estudos comparativos dos processos de maturação ovocitária de *Macrobrachium amazonicum* e *Macrobrachium acanthurus* revelaram que a maturação ovocitária é semelhante em ambas as espécies, no que diz respeito à multiplicação das células foliculares, ao aumento do volume ovocitário e à proliferação do tecido conjuntivo frouxo (Chaves e Magalhães, 1993).

As mudanças histológicas ocorridas no ovário do camarão de água doce *Macrobrachium borelli*, revelaram que a época de reprodução abrange o período de outubro a janeiro (Verdi, 1996). Este autor enfatiza ainda, que os ovários são do tipo senerônico, ou seja, apresenta somente uma camada de ovócitos que se desenvolve em cada ciclo. Em outras espécies os ovócitos permanecem em estado latente até que ocorra a desova das camadas maduras, o que indica o início de um novo ciclo. Este fato sugere que em *Macrobrachium borelli*, haja desovas sucessivas a partir da recuperação do período pós-desova, mas não uma segunda desova no mesmo período reprodutivo.

Chang e Shih (1995) analisaram o ciclo reprodutivo da maturação ovariana em *Macrobrachium rosenbergii* e constataram cinco estágios reprodutivos. Os estágios II, III e IV apresentaram o maior crescimento ovariano, confirmado pelo índice gonadossomático (IGS). O diâmetro dos ovócitos também foi analisado e demonstrou aumento correspondente ao IGS. A classificação da maturação ovariana foi baseada em características externas correlacionadas aos tamanhos de ovócitos, ao crescimento ovariano e à histologia ovariana. Os ovários foram preparados para muda e desova após atingirem o estágio V (Chang e Shih, 1995).

Em relação às características celulares Adiyodi e Subramoniam (1983) dividiram a ovogênese em fase de proliferação, na qual as ovogônias são produzidas e fase de diferenciação que ocorre a partir da fase pré-vitelogênica, na

qual as ovogônias se desenvolvem. Na fase proliferativa, as ovogônias são produzidas por mitose na zona germinativa durante toda a vida reprodutiva das fêmeas e assim permanecem até ser iniciada a gametogênese (Kroll et al., 1992). Este processo tem sido descrito em espécies de carídeos como *Lysmata seticaudata* e *Pandalus borealis* (Charniaux-Cotton, 1980). Na fase de diferenciação, os ovócitos primários, derivados das ovogônias secundárias, passam para a zona de crescimento, onde imediatamente passam para a fase de prófase I da meiose. No estágio paquíteno da prófase I da meiose, os ovócitos cessam sua divisão e atividade metabólica. Nesta fase, ocorrem mudanças nuclear e citoplasmática, aumento de tamanho celular e organização dos ovócitos na porção distal dos ovários (Adiyodi e Subramoniam, 1983). Quando os ovócitos maduros estão prontos para a ovulação ocorre a continuidade da divisão meiótica (Yano, 1988). Em *Penaeus aztecus*, durante primeira fase meiótica ocorre a formação de vesículas corticais na periferia do citoplasma do ovócito maduro (Clark et al., 1980).

Em decápodos, a ovogênese foi frequentemente estudada com o uso da microscopia de luz (Yano, 1988; Medina et al., 1996). Entretanto, estudos das estruturas reprodutivas dos decápodos vêm sendo realizados com auxílio da microscopia eletrônica de varredura e transmissão, para auxiliar num melhor entendimento do ciclo reprodutivo (Kroll et al., 1992). Estudos determinaram que o crescimento dos ovócitos envolvem as células germinativas e vitelogênicas. As ovogônias quando presentes na zona germinativa se desenvolvem em ovócitos imaturos, apresentando núcleo grande e arredondado contendo cromatina granular. Essas células posteriormente se desenvolvem em ovócitos pré-vitelogênicos que apresentam núcleo central e nucléolos (Browdy, 1989). Os ovócitos pré-vitelogênicos, dos decápodos, são caracterizados pelo aumento de atividade das organelas citoplasmáticas. O acúmulo dos ribossomos e o desenvolvimento de retículo endoplasmático promovem o aumento dos elementos vesiculares no citoplasma (Charniaux-Cotton, 1980). Em *Penaeus keraturus*, o retículo endoplasmático é originado a partir de expansões do envelope nuclear e contém pequenos grânulos densos. Pequenas vesículas de lipídios são formadas pelo retículo endoplasmático liso, que posteriormente recebem material do complexo de Golgi. Os ovócitos estão envoltos por uma única camada de células foliculares achatadas, exceto na região onde ovócitos vizinhos formam pontes intercelulares

(Carvalho et al., 1998a). Essas observações sugerem a formação endógena de vitelo, que é decorrente de atividades do envelope nuclear, retículo endoplasmático e complexo de Golgi. Quanto à ultraestrutura, a maior parte dos estudos foram realizados apenas com relação à produção de vitelo, e formação e função dos grânulos corticais (Zerbib, 1979). Recentemente foram descritas as células pré-vitelogênicas e vitelogênicas presentes nos ovários de *Penaeus keraturus* (Carvalho et al., 1998b). Em *Callinectes sapidus*, grande inclusão de corpúsculos de gordura é denominado de complexo núcleo-vitelo, e é predominante nas fases finais dos ovócitos pré-vitelogênicos. Este complexo desaparece quando é iniciado o estágio de vitelogênese (Johnson, 1980). Esta fase é primeiramente chamada de vitelogênese primária, ou vitelogênese endógena, na qual o ovócito passa a acumular vitelo endógeno e termina quando o ovócito atinge o diâmetro característico de cada espécie.

A vitelogênese secundária, ou vitelogênese exógena, acontece quando o crescimento dos ovócitos se torne sincronizado. A vitelogenina, que é a precursora do vitelo, está presente na hemolinfa e é captada pelo ovário por endocitose (Kroll et al., 1992). A origem da vitelogenina não está bem estabelecida e pode variar entre as espécies. Assim, a vitelogênese reúne componentes orgânicos e inorgânicos para a formação de vitelo, os quais são encontrados nos ovócitos. Durante a vitelogênese endógena ocorrem muitas mudanças citoplasmáticas nos ovócitos, como o acúmulo de material granular denso em vesículas do retículo endoplasmático rugoso (Charniaux-Cotton, 1980). No final da fase de pré-vitelogênese dos ovócitos de algumas espécies de decápodos, ocorre a saída de material nucleolar para o citoplasma, provavelmente dando início à síntese de vitelo (Adiyodi e Subramoniam, 1983; Rankin e Davis, 1990). A transferência desse material nucleolar ocorre por meio da formação de vesículas a partir da fusão da membrana nuclear mais externa. Ressalta-se que o material nucleolar da vesícula encontra-se entre a dupla membrana nuclear. A transferência do material nucleolar também pode ocorrer através dos poros da membrana do núcleo (Adiyodi e Subramoniam, 1983). Este movimento pode representar a transferência de RNA ou RNAm do núcleo para o citoplasma da célula (Adiyodi e Subramoniam, 1983). Assim sendo, pode-se inferir que a vitelogênese é um período importante no ciclo reprodutivo de fêmeas de crustáceos, sendo caracterizado por aumento massivo da

concentração de vitelogenina na hemolinfa havendo um conseqüente desenvolvimento ovocitário (Wallace et al., 1967; Kerr, 1969; Fyffe e O'Connor, 1974; Meusy, 1980; Charniaux-Cotton, 1985; Lee e Puppione, 1988; Nelson et al., 1988). Porém, a produção de vitelo ainda é muito discutida, uma vez que não se sabe se sua origem é endógena, exógena ou ainda, se seria uma combinação de ambos os processos (Zerbib, 1979; Charniaux-Cotton, 1980; Schade e Shivers, 1980).

Estudos realizados em *Penaeus japonicus* demonstraram a presença de microvilos na membrana plasmática apical dos ovócitos suportando a hipótese de produção exógena de vitelo (Schade e Shivers, 1980). Ainda na espécie *Penaeus japonicus*, com o emprego de estudos imunológicos, foi determinada presença de vitelo e vitelogenina no tecido adiposo sub epidermico (Yano e Chinzei, 1987) caracterizando-se uma possível produção exógena. No entanto, nesta espécie ainda foi observada produção de vitelo pelas células foliculares as quais o liberam na hemolinfa, sendo depois capturadas pelos ovócitos (Yano e Chinzei, 1987).

Hepatopâncreas

O hepatopâncreas recebe diferentes denominações como fígado, pâncreas, glândula do intestino médio, glândula gástrica, glândula digestiva, cecos anteriores, divertículo digestivo, órgão digestivo, glândula intestinal média e hepatopâncreas (Gibson e Barker, 1979). Este órgão, na maioria dos crustáceos, está associado ao intestino médio e apresenta diferentes níveis de complexidade dentre as espécies estudadas. Dentre os decápodas, o hepatopâncreas é particularmente bem desenvolvido e forma uma rede complexa de ductos e túbulos em fundo cego que ocupa a maior parte da cavidade cefalotorácica (Gibson e Barker, 1979).

Esta glândula consiste de duas metades que se dispõem uma de cada lado da linha horizontal média do corpo animal. Cada metade apresenta três lobos que são conectados separadamente ao estômago e intestino médio por um ducto primário, que se divide em ductos secundários em cada lóbulo. Os ductos secundários se ramificam amplamente em dúctulos, sendo que cada um termina em um complexo de túbulos em fundo cego (Factor, 1981; Franceschini-Vicentini et al.,

2006). O hepatopâncreas é morfologicamente similar na maioria dos decápodos (Gibson e Barker, 1979), apesar do número de lobos poder variar nas diferentes espécies (Icely e Nott, 1992). As espécies *Penaeus* ssp (Vogt, 1985; Lovett e Felder, 1989) e *Caridina laevis* (Pillai, 1960) apresentam apenas um lobo em cada metade do hepatopâncreas. Entretanto o hepatopâncreas do *Astacus astacus* não é um órgão compacto como nos demais decápodos. Este órgão está dividido em duas metades, que não se conectam (Vogt et al., 1989).

Os túbulos digestivos estão imersos e suportados em tecido conjuntivo constituído por fibras colágenas bem definidas, que apresentam uma variedade de estruturas características incluindo-se sinusóides hemolinfáticos, células circulantes da hemolinfa e fibroblastos (Factor e Naar, 1985; 1990; Franceschini-Vicentini et al., 2006). Células contráteis contendo feixes de miofilamentos ocupam o espaço entre a membrana basal e a lâmina própria do túbulo hepatopancreático. Essas células contráteis apresentam processos em disposição circular e longitudinal ao túbulo formando uma malha de tecido contrátil ao redor da lâmina basal do tubo (Factor e Naar, 1985; Icely e Nott, 1992).

Os túbulos hepatopancreáticos com fundo cego podem estar divididos em regiões distal, média e proximal, relativamente ao trato digestório principal (Vogt et al., 1989; Franceschini-Vicentini et al., 2006). Internamente esses túbulos são revestidos por epitélio colunar simples (Factor e Naar, 1985; Icely e Nott, 1992; Brunet et al., 1994; Corrêa Jr. et al., 2002). Quatro tipos celulares têm sido identificados no epitélio de revestimento dos túbulos do hepatopâncreas em decápodos. Os tipos celulares são classificados como células E (embrionária), R (reabsortiva), F (fibrilar) e B (vesicular), de acordo com o esquema proposto por Jacobs (1928) e Hirsch e Jacobs (1928).

A localização daqueles tipos celulares citados varia ao longo do comprimento do túbulo hepatopancreático (Icely e Nott, 1992; Corrêa Jr. et al., 2002). As células E estão restritas à região distal em fundo cego. Já as células R ocorrem ao longo de todo o comprimento do tubo. As células F ocorrem principalmente na região distal, enquanto as células B localizam-se na região proximal do túbulo hepatopancreático. Apenas as células R revestem os dúctulos e os ductos secundários do

hepatopâncreas (Icely e Nott, 1992). Em alguns decápodos foi identificado um quinto tipo celular denominado de célula M (basal) (Al-Mohanna et al., 1985b; Franceschini-Vicentini et al., 2006). Este tipo celular está disperso em todo o comprimento do túbulo e apóia-se na membrana basal do epitélio, porém não mantém contato com o lúmen do hepatopâncreas (Icely e Nott, 1992; Franceschini-Vicentini et al., 2006).

As células E são indiferenciadas e apresentam núcleo grande que ocupa a maior parte do volume citoplasmático (Al-Mohanna et al., 1985b; Icely e Nott, 1992). O citoplasma apresenta pouco retículo endoplasmático rugoso e liso, mitocôndrias, vesículas limitadas por membranas e muito complexo de Golgi (Icely e Nott, 1992). Esse tipo celular é responsável pela renovação celular do epitélio dos túbulos hepatopancreáticos (Icely e Nott, 1992). Durante os estágios de pós-muda, o núcleo celular é proeminente, e não apresenta sinais de divisão mitótica. Porém, no estágio de intermuda, estas células apresentam alta atividade mitótica após a alimentação (Al-Mohanna et al., 1985a). Durante estágios iniciais da pré-muda, as células E apresentam mitose sendo esta a principal característica dessas células nesse período. A atividade mitótica diminui progressivamente e cessa antes da ecdise (Al-Mohanna e Nott, 1989). A divisão contínua da célula E parece estar relacionada com a extrusão da célula B do epitélio de revestimento do túbulo hepatopancreático e, desta forma, provavelmente poderia prover células adicionais uma vez que os túbulos crescem em comprimento a cada muda (Al-Mohanna e Nott, 1989).

As células F apresentam núcleo localizado próximo à região basal da célula. O citoplasma apresenta retículo endoplasmático rugoso extenso com numerosos ribossomos tanto aderidos à membrana quanto dispersos no citoplasma, e numerosas mitocôndrias distribuídas por todo o citoplasma das células. Os complexos de Golgi apresentam cisternas dilatadas e são comumente encontrados (Icely e Nott, 1992; Vogt, 1992). A parte luminal dessas células apresenta microvilos que estão banhados por uma camada entérica. Estas células são especializadas em sintetizar e secretar enzimas digestivas durante algumas fases do ciclo alimentar (Icely e Nott, 1992). Após a ingestão de alimento estas células apresentam numerosos grânulos de zimogênio. Esses grânulos estão localizados na região apical do citoplasma e são aparentemente sintetizados pelo retículo endoplasmático rugoso e empacotados pelo complexo de Golgi (Al-Mohanna et al., 1985a). Desta

forma, as células F sintetizam e secretam zimogênio para realizar digestão extracelular. Subseqüentemente, estas células captam material para a digestão intracelular e se diferenciam em células B (Al-Mohanna et al., 1985a).

As células F apresentam ainda um grande vacúolo supranuclear, podendo formar um reservatório de atividade digestiva latente antes da alimentação (Al-Mohanna et al., 1985a). Quando se inicia o estágio de intermuda, a freqüência das células F é marcadamente reduzida, particularmente nas regiões média e proximal dos túbulos hepatopancreáticos. Isso ocorre devido à diferenciação das células F em B (Al-Mohanna et al., 1989). A freqüência das células F permanece reduzida ao longo do período de intermuda, e presumivelmente continuarão a se diferenciar em células B. Além disso, no início do estágio de pré-muda essas células apresentam freqüência mínima dentre as células epiteliais e estão restritas à região imediatamente proximal à zona de divisão celular (Al-Mohanna et al., 1989).

As células B são diferenciadas a partir das células F e estão envolvidas com a digestão intracelular (Al-Mohanna e Nott, 1986). São as maiores dentre os tipos celulares do hepatopâncreas e apresentam um grande vacúolo envolto por uma fina camada de citoplasma. O núcleo está restrito à região basal da célula. O citoplasma apresenta retículo endoplasmático rugoso, mitocôndrias e complexo de Golgi (Icely e Nott, 1992). Logo após a alimentação, a porção apical da membrana das células B desenvolve invaginações, as quais se estendem como canais para dentro das células, produzindo as vesículas pinocíticas. Próximo a este complexo pinocitótico está localizado um sistema de vacúolos subapicais que apresenta material granular intravascular. Esses vacúolos coalescem com os corpos digestivos, sendo que estes ocupam quase todo o volume celular. Com o progresso da pinocitose, a camada entérica sobre os microvilos torna-se menos conspícua e o citoplasma é reduzido a uma fina camada marginal na célula. O núcleo está comprimido e localizado na região basal junto com o retículo endoplasmático rugoso e poucas mitocôndrias (Al-Mohanna e Nott, 1986).

Com o avanço do processo de digestão intracelular, pequenas regiões translúcidas aparecem na matriz dos corpos digestivos. Essas regiões aumentam em volume e são completamente substituídas por um material condensado nas

inclusões digestivas. Essas inclusões formam grandes vacúolos contendo material amorfo envolto por corpos circulares e estruturas membranosas. As regiões translúcidas fundem-se para formar grandes vacúolos digestivos. No final do processo de digestão intracelular as células B estão caracterizadas por grande vacuolização. Há uma tendência dos vacúolos aumentarem progressivamente de tamanho e se movem basalmente. Eventualmente há um único vacúolo grande contendo esferas densas (Al-Mohanna e Nott, 1986).

Após a digestão celular, as células B iniciam a fase de extrusão. Nessa fase as microvilosidades são reduzidas em número e o citoplasma apical está muito reduzido. Um único vacúolo é formado ocupando grande parte do volume celular. O citoplasma contém na região basal poucas mitocôndrias envoltas por retículo endoplasmático rugoso e núcleo achatado (Al-Mohanna e Nott, 1986).

As células mais abundantes nos túbulos hepatopancreáticos dos decápodos são as células R. O núcleo dessas células localiza-se na região basal, tendendo a ser pequeno e conter menos cromatina que os núcleos dos demais tipos celulares. O citoplasma apresenta retículo endoplasmático liso associado às invaginações da membrana basal celular, mas também pode ocorrer no citoplasma apical em um estágio específico do ciclo digestivo. Apresenta ainda pouco retículo endoplasmático rugoso, ribossomos livres e numerosas mitocôndrias localizadas principalmente na região apical do citoplasma. O complexo de Golgi está ativo na região medial da célula e apresenta-se associado ao retículo endoplasmático liso na região basal da célula. Esse complexo apresenta cisternas achatadas e produz vesículas elétrondensa, as quais coalescem em corpos multivesiculares e são acumuladas em vacúolos supranucleares (Icely e Nott, 1992).

As células R absorvem nutrientes solúveis do lúmen do intestino e os estocam sob a forma de lipídios e glicogênio (Al-Mohanna e Nott, 1989). Desta forma, as células R constituem o principal local de estocagem de lipídios e glicogênio (Icely e Nott, 1992). Essencialmente, a função das células R é absorver metabólitos difusíveis do lúmen hepatopancreático, e ainda metabólitos difusíveis e pequenas partículas da hemolinfa. Esses metabólitos e partículas são estocados como lipídios e glicogênio no citoplasma (Al-Mohanna e Nott, 1987a).

As células M são conhecidas pelo acúmulo contínuo de material orgânico denso, o qual ocupa todo o volume celular. Os precursores da síntese desse material orgânico são provavelmente derivados da hemolinfa ou das células B e R vizinhas, uma vez que não há associação direta das células M com o lúmen hepatopancreático. Desta forma não há evidências de atividade pinocítica na membrana celular e o transporte deve ocorrer por difusão (Al-Mohanna et al., 1985b). Essas células, ainda, não apresentam borda em microvilos (Al-Mohanna e Nott, 1987b).

As células M também são responsáveis pelo material de origem protéica estocado no hepatopâncreas (Al-Mohanna et al., 1985b). Essas células sofrem mudanças na frequência e na estrutura, durante o ciclo de muda do animal (Al-Mohanna e Nott, 1987a). Cada célula acumula material de origem protéica dentro de um vacúolo maciço, durante o período de intermuda, sendo esse material utilizado durante os períodos de pré-muda e pós-muda (Al-Mohanna e Nott, 1989). Esse corpo denso acumulado não é derivado de um sistema de digestão intracelular, uma vez que não há evidências de material membranoso ou particulado remanescente de um processo digestivo (Al-Mohanna et al., 1985b).

As células M tendem a ser arredondadas, permanecendo em contato com a lâmina basal e, ocasionalmente, podem produzir extensões citoplasmáticas com ramificações entre as células vizinhas, exibindo características de células em estágios iniciais de atividade celular (Al-Mohanna et al., 1985b). Nessas células jovens, o núcleo está rodeado por uma fina camada de citoplasma, que apresenta retículo endoplasmático reduzido e complexo de Golgi com pequenas cisternas, contendo material elétron-denso, e apenas alguns ribossomos, mitocôndrias e partículas semelhantes à glicogênio (Al-Mohanna et al., 1985b).

As células localizadas na região medio-distal dos túbulos hepatopancreáticos apresentam complexo de Golgi proeminente e bem desenvolvido, com numerosas vesículas. Essas vesículas aparentemente representam estágios para a formação de grânulos grandes e densos, com acúmulo progressivo e formação de um aspecto diferenciado das células nesse estágio de desenvolvimento. Os grânulos densos

também parecem emergir envoltos de membrana, com inclusões semi-densas, contendo material granular. Esses grânulos parecem estar em estágio intermediário para a formação de corpos densos grandes e imaturos. O retículo endoplasmático rugoso torna-se mais evidente do que nos estágios iniciais de atividade das células M. Ribossomos livres estão presentes no citoplasma, ocorrendo sozinhos ou como poliossomos (Al-Mohanna et al., 1985b). O complexo de Golgi produz vesículas, que estão aderidas diretamente aos corpos elétron-densos imaturos. Esses aspectos parecem ser um processo contínuo de “amalgamação” de todas as inclusões, visando formar características de um único corpo denso no citoplasma, durante a migração da célula M através dos túbulos hepatopancreáticos (Al-Mohanna et al., 1985b). Com o aumento do tamanho do corpo denso, o citoplasma é reduzido a uma fina camada e o núcleo vai se tornando comprimido em um lado da célula. Ao mesmo tempo, longas lamelas de retículo endoplasmático rugoso desenvolvem-se e tornam-se mais conspícuas (Al-Mohanna et al., 1985b).

Células M com corpo denso único e maturo são sempre encontradas na região apical do túbulo hepatopancreático. Esses corpos densos estão envoltos por endomembrana e contém matriz homogênea com alta elétron-densidade. O citoplasma circundante contém retículo endoplasmático rugoso e um único e proeminente complexo de Golgi, com poucas mitocôndrias e partículas semelhantes a glicogênio. O complexo de Golgi apresenta cisternas achatadas que contém material de baixa elétron-densidade (Al-Mohanna et al., 1985b).

Sistema hormonal

Apesar do importante crescimento de cultivo de camarão de água doce no contexto mundial, estudos específicos sobre o sistema endócrino de decápodos vem sendo realizados principalmente em lagostins, caranguejos e lagostas (Huberman, 2000). Embora esses estudos possam ser utilizados como referência, existe a necessidade de se aprofundar os conhecimentos da fisiologia e, especialmente, da endocrinologia em diferentes espécies de camarões (Huberman, 2000). Assim sendo, os avanços nos estudos relacionados à fisiologia, bioquímica, endocrinologia, nutrição, patologia e genética têm resultado em que novas e avançadas tecnologias

as quais vem contribuir para o desenvolvimento tecnológico e consequente aumento de lucratividade na produção de camarão (Huberman, 2000).

O descobrimento do sistema endócrino de crustáceos foi realizado por meio de estudos sobre o papel da glândula androgênica, utilizando-se crustáceos não decápodas (Charniaux-Cotton, 1954). Porém, a grande maioria dos estudos desse sistema, em crustáceos, têm sido com decápodas (Fingerman, 1987). O sistema endócrino de decápodas é formado por epitélio não neural e por epitélio neural. O epitélio não neural apresenta estruturas endócrinas típicas, como as glândulas androgênicas. Já o epitélio neural apresenta componentes neuroendócrinos, como a glândula do seio (Fingerman, 1992). Os decápodas apresentam glândulas neuroendócrinas bem definidas, que atuam como órgãos neurohemais (Fingerman, 1992). Um órgão neurohemal consiste principalmente de terminações axoniais de células neuroendócrinas e estruturas de produção e estocagem de neurohormônios localizadas próximas ao sistema vascular (Carlisle e Knowles, 1953).

Estudos pioneiros sobre a endocrinologia de crustáceos foram realizados por Koller (1925; 1927). O autor demonstrou que mudanças de coloração do camarão *Crangon crangon* eram realizadas por substâncias circulantes do tecido hemal. Utilizando o camarão de água doce *Palaemonetes vulgaris*, Perkins (1928) determinou que o pedúnculo ocular é a fonte de substâncias de concentração de pigmento. Atualmente, essas substâncias foram reconhecidas como sendo de natureza hormonal (Fingerman, 1992). Hanström (1933) estudando o sistema nervoso central de crustáceos descreveu a glândula do seio. Em estudos posteriores observou-se que este órgão é o local de estocagem de hormônios cromatoforotrópico (Hanström, 1933). Já a natureza neurohemal da glândula do seio foi demonstrada por Bliss (1951) e Passano (1951). Estudos subseqüentes realizados por vários autores revelaram que o complexo neurohemal da glândula do seio é o maior centro neuroendócrino dos crustáceos (Fingerman, 1992).

O controle endócrino da reprodução tem sido investigado em vários crustáceos (Fingerman, 1987). Entretanto, a manipulação hormonal para a reprodução de camarões está limitada à ablação do pedúnculo ocular para a indução do desenvolvimento ovariano e da ovoposição. Isso se deve ao fato de que

a função individual e a grande diversidade dos hormônios que envolvem a reprodução de camarão, ainda não foi suficientemente elucidada (Okumura, 2004). O progresso para o desenvolvimento de novas tecnologias da manipulação hormonal depende do entendimento da endocrinologia dos camarões (Okumura, 2004).

O complexo órgão X/glândula do seio é o centro produtor do hormônio inibidor da gônada (HIG) em fêmeas de decápodos. Este complexo é encontrado na região do pedúnculo ocular e após a sua extirpação observa-se o desenvolvimento precoce das gônadas (Fingerman, 1987). Esse complexo foi primeiramente demonstrado para *Palaemon serratus* por Panouse (1943, 1944) e confirmado em muitos outros decápodos (Quackenbush e Hernkind, 1981; Chim et al., 1983; Anilkumar e Adiyodi, 1985). O hormônio (HIG) não é nem sexo-específico e nem espécie-específico (Fingerman, 1987).

Outro neurohormônio que influencia a atividade reprodutiva dos crustáceos é o hormônio estimulador da gônada (HEG) que aumenta a atividade reprodutiva das fêmeas (Fingerman, 1987; 1992). Este é produzido pelo órgão Y, uma glândula localizada no segmento maxilar, sendo formado por apenas um tipo celular com característica de secreção de esteróides (Fingerman, 1992). Os esteróides são sintetizados a partir do colesterol (Lehninger, 1995). Entretanto os crustáceos não sintetizam colesterol, e sua fonte se dá por meio da dieta. Kanazawa e Teshima (1971) demonstraram que o camarão *Penaeus japonicus* é capaz de produzir esteróides a partir do colesterol sintetizado no próprio organismo, sugerindo que deva ocorrer biossíntese funcional de colesterol em alguns crustáceos.

O efeito dos hormônios de vertebrados na reprodução dos crustáceos vem sendo cada vez mais estudado (Fingerman, 1987). O controle hormonal da síntese de vitelogenina e a maturação ovocitária já foram bem descritos em vertebrados ovíparos (Tata e Smith, 1979; Wallace e Selman, 1981). Em decápodos, a maturação gonadal de fêmeas é influenciada por fatores hormonais e neurais (Subramoniam, 2000). Estes fatores incluem hormônios de neuropeptídeos, como o hormônio estimulador do desenvolvimento da gônada e o hormônio inibidor da

vitelogenina, que determinam efeitos agonísticos e antagonísticos, respectivamente, durante a vitelogênese (Warrier et al., 2001).

Vários hormônios esteróides de vertebrados têm sido encontrados no hepatopâncreas, ovário e hemolinfa de várias espécies de crustáceos (Couch et al., 1987; Van Beek e De Loof, 1988; Fairs et al., 1989; Quinitio et al., 1991). Porém, a função biológica desses hormônios ainda não foi totalmente esclarecida, embora sua presença em fluídos biológicos e no ovário tenha sido documentada (Couch et al., 1987; Jeng et al., 1978; Fairs et al., 1989). No camarão de água doce *Macrobrachium rosenbergii*, o estradiol induz a biossíntese do 17 β -hidroxiesteróide desidrogenase, sendo esta a principal enzima envolvida no metabolismo de esteróide. Estudos também indicaram a capacidade de resposta do ovário à adição exógena da 17 β -progesterona e 17 β -estradiol (Yano, 1987). No camarão *Penaeus monodon*, tanto os níveis de vitelogenina sérica quanto os níveis de 17 β -estradiol e progesterona na hemolinfa não diferiram quantitativamente durante os diferentes estágios de maturação ovariana (Quinitio et al., 1994).

Dentre os vários hormônios responsáveis pela ovogênese e vitelogênese, podem-se destacar os esteróides, como a progesterona e o estradiol, encontrados nos ovários, hepatopâncreas e hemolinfa dos crustáceos (Couch et al., 1987; Van Beek e De Loof, 1988; Fairs et al., 1989; Quinitio et al., 1991). Estudos realizados por Yano e Itakura (1998) descreveram a síntese de vitelogenina "in vitro" em ovários incubados com 17 β -estradiol. Em *Penaeus monodon*, amostras de hemolinfa nos diferentes estágios de maturação ovariana demonstraram oscilações nos níveis séricos de vitelogenina juntamente com os níveis de estradiol e progesterona (Quinitio et al., 1994).

Trabalhos indicaram que os esteróides apresentam oscilações em seus níveis de acordo com os estágios de maturação dos ovócitos e, conseqüentemente, dos ovários (Couch et al., 1987; Quinitio et al., 1994). Em fêmeas de *Scylla serrata* foi encontrado grande aumento de estradiol durante o estágio de vitelogênese nos ovários e no hepatopâncreas (Warrier et al., 2001). Quando a síntese de vitelogenina alcançou o seu pico, o hepatopâncreas apresentou concentração máxima de estradiol. Estudos anteriores têm reportado a habilidade do estradiol em

estimular enzimas de lipogênese e de transporte de íons no camarão de água doce *Macrobrachium rosenbergii* (Gosh e Ray, 1993). Embora haja discordância quanto ao local de síntese de vitelogenina em crustáceos, Rani e Subramoniam (1997) demonstraram que o hepatopâncreas de *Scylla serrata* é o local principal de síntese de vitelogenina. Esses autores demonstraram que o hepatopâncreas apresenta o máximo da capacidade de síntese de vitelogenina no estágio I da vitelogênese. Warriar et al. (2001) estudando a mesma espécie, sugeriram que o alto nível de estradiol encontrado no hepatopâncreas está relacionado com os processos vitelogênicos e, assim como nos vertebrados, participa da regulação da síntese de vitelogenina.

Na espécie *Crassostrea gigas*, foi demonstrado que a vitelogênese é controlada pelo 17 β -estradiol (Li et al., 1998). O estradiol também induz o aumento do crescimento de ovócitos em peixes (Takanashi e Kanatani, 1981). Em crustáceos, assim como em vertebrados, a vitelogênese parece estar sob a influência de vários hormônios (Warriar et al., 2001). O 17 β -estradiol pode funcionar como parte do sistema multihormonal, por meio da ativação da síntese de vitelogenina e da ativação também de outros caminhos metabólicos. Adicionalmente, o estradiol também pode ter efeito cumulativo com outros hormônios influenciando a vitelogênese.

A regulação da vitelogênese também ocorre quando os neuropeptídeos, os ecdisteróides e os esteróides de vertebrados são ativados em diferentes estágios da vitelogênese (Warriar et al., 2001). Altos índices de progesterona também foram observados em animais no estágio de vitelogênese em *Scylla serrata* (Warriar et al., 2001). Entretanto, em contraste ao caminho do estradiol, o maior nível de progesterona foi encontrado no ovário e na hemolinfa, os quais eram muito maiores que as concentrações de estradiol. Estas observações sugerem a possibilidade de que o hepatopâncreas possa ser o local de biossíntese do hormônio progesterona, o qual poderia ser transportado através da hemolinfa para o ovário (Warriar et al., 2001).

Estudos anteriores tinham demonstrado que a progesterona estimula a maturação ovariana no camarão *Parapanaeopss hardwickii* (Kulkarni et al., 1979) e

que a 17α -progesterona facilita a liberação de vitelogenina na hemolinfa de *Penaeus japonicus* (Yano, 1987). Assim, como nos vertebrados, a progesterona ovariana no *Scylla serrata* possivelmente proporcione a estimulação da maturação ovocitária possivelmente pelo desencadeamento do rompimento da vesícula germinativa (Warrier et al., 2001). Durante o pico de vitelogênese, o hepatopâncreas apresentou a maior concentração de estradiol, enquanto o ovário mostrou o nível máximo de progesterona em *Scylla serrata*. Isso pode indicar duas possibilidades, onde o estradiol e a progesterona possam apresentar diferentes locais de origem ou esses hormônios são sintetizados no mesmo tecido (hepatopâncreas) e posteriormente transportados para o ovário pela hemolinfa (Warrier et al., 2001).

MATERIAL E MÉTODOS

Animais

Fêmeas de *Macrobrachium amazonicum* foram capturadas nos viveiros de reprodutores existentes no setor de Carcinicultura do Centro de Aqüicultura da UNESP, Campus de Jaboticabal. Os viveiros mostravam parâmetros da qualidade de água adequados para o cultivo dos animais. A temperatura permaneceu em $28,5 \pm 0,5$ °C, o nível de oxigênio determinado foi de $6,5 \pm 0,5$ mg/L com saturação equivalente a $80 \pm 0,5$ %, e o pH estava em faixas medias de $8,2 \pm 0,1$. Referente ao nível de compostos nitrogenados obteve-se média de $2,5 \pm 1,5$ mg/L para amônia e $15 \pm 1,0$ mg/L de nitrito.

As fêmeas capturadas foram separadas em diferentes grupos de acordo com os estágios de maturação ovariana. Para tanto realizaram-se observações macroscópicas do ovário, seguindo os métodos de Chang e Shih (1995), adaptados para *Macrobrachium amazonicum*. Para o desenvolvimento da tese foram utilizados um total de 150 exemplares de fêmeas.

Índice Gonadossomático (IGS) e Índice Hepatossomático (IHS)

No momento das coletas, os animais foram individualmente pesados e posteriormente mortos por choque térmico. Coletaram-se os ovários e o hepatopâncreas. A determinação dos IGS e IHS foi realizada com base na seguinte relação:

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

Análises em microscopias de luz e eletrônica

Para as realizações das análises em microscopias de luz e eletrônica de transmissão das células ovarianas e hepatopancreáticas, utilizaram-se 15 animais em diferentes estágios de maturação gonadal. Destes, 10 animais foram destinados

às análises em microscopia de luz e 5 para análises em microscopia eletrônica. Para tanto, as fêmeas capturadas foram mortas por choque térmico e posteriormente dissecadas.

Os ovários e hepatopâncreas, utilizados para as análises em microscopia de luz foram individualmente coletados e fixados em solução de Karnovsky (1965) durante 24 horas. Após esse período o material recebeu banhos de tampão fosfato e posteriormente de álcool 70%, sendo mantido neste meio até sua inclusão em historesina. Depois das rotinas de inclusão, obtiveram-se cortes de 2 μm que foram corados com Hematoxilina e Eosina e solução de Azul de toluidina. Análises e fotodocumentação foram realizadas em fotomicroscópio Olympus B Max-50. O processamento do material em historesina e sua análise foram feitas no Laboratório de Morfologia de Organismos Aquáticos da Faculdade de Ciências da UNESP/Bauru.

Os materiais obtidos para as análises ultraestruturais das células ovarianas e hepatopancreáticas foram individualmente coletados e cortados em fragmentos de aproximadamente 1mm de aresta. Os fragmentos foram fixados em solução de Karnovsky (1965) durante 12 horas. Posteriormente os materiais foram pós fixados, por 12 horas, em solução de tetróxido de ósmio a 2% em tampão fosfato (0,1M e pH 7,3) e após esse período ocorreu nova troca de tampão fosfato e o material permaneceu por mais 2 horas. Seguindo as técnicas preconizadas para microscopia eletrônica de transmissão, o material tissular foi desidratado em banhos gradativos de Acetona (50%, 70%, 90% e 100%). A seguir passou pelo processo de infiltração em solução 1:1 de araldite e acetona e pré-inclusão em solução de araldite. Ambos os procedimentos foram executados em estufa a 37°C, durante 1 hora. A inclusão se fez em solução nova de araldite mantida em estufa a 58°C, durante 48 horas.

Para a determinação dos campos de estudo fizeram-se cortes de 0,5 μm corados com Azul de toluidina obtidos com o uso de micrótomo equipado com navalha de vidro. Cabe destacar que os cortes semi finos assim como os campos foram observados em microscopia de luz. Após escolha dos campos, obtiveram-se cortes ultrafinos (50 a 70nm) do material feitos em ultramicrótomo Ultratome III, LKB equipado com navalha de diamante. Os cortes ultrafinos foram distendidos com

vapor de xilol, coletados em telas de cobre sem filme de suporte e contrastados duas vezes. A primeira contrastação ocorreu no escuro durante 20 minutos com o uso de acetato de uranila em solução de álcool 50%. Posteriormente os cortes foram lavados em álcool 50% e novamente contrastados com citrato de chumbo durante 10 minutos, seguida de várias lavagens em água destilada (Reynolds, 1963). Os cortes foram levados ao microscópio de transmissão Philips EM 301 e fotografados com filme preto e branco de 35 mm. O processamento e a análise dos materiais foram realizados no Centro de Microscopia Eletrônica do Instituto de Biociências da UNESP /Botucatu.

Caracterização hormonal:

Para a determinação do perfil hormonal utilizaram-se 15 fêmeas para cada estágio de maturação gonadal perfazendo um total de 75 animais. Todos os materiais coletados ou seja, hemolinfa, hepatopâncreas e ovários, foram utilizados para a extração e quantificação de esteróides.

Após choque térmico, com auxílio de seringa e agulha rinsadas em EDTA, coletou-se hemolinfa, na região da cavidade pericárdica, que foi transferida para ependorfes. Coletaram-se os ovários e o hepatopâncreas que individualmente foram também acondicionados em ependorfes. Em seguida, os ependorfes devidamente identificados foram acondicionados em galões de nitrogênio líquido até o término de cada coleta. Posteriormente, estes ependorfes foram transferidos para Freezer a -70°C no qual permaneceram até processamento.

Todo o material coletado para a extração de esteróides foi adequadamente embalado, identificado e enviado para o Laboratório de Fisiologia do Departamento de Zootecnia da Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro – Portugal, onde foram processados. Após ser entregue ao Laboratório de Fisiologia avaliaram-se as condições dos materiais que foram imediatamente rearmazenado em freezers a -80°C, permanecendo até as análises.

Para a realização das técnicas de extração hormonal os ependorfes foram retirados dos Freezers, por alguns minutos, e tanto as amostras tissulares dos

ovários como as de hepatopâncreas foram homogeneizadas no interior dos seus respectivos ependorfes. Retirou-se uma pequena amostra de cada material que, após ser pesada, foi acondicionada em tubos de centrífuga. A hemolinfa, com o uso de micropipetas, foi quantificada e transferida para outro ependorfe.

Extração de Esteróides:

Para a extração de esteróides, os tubos de centrífuga receberam 3 mL de éter etílico e foram levados ao vortex por 30 segundos visando homogeneização do material. Posteriormente os tubos foram transferidos para centrífugas de alta rotatividade sendo mantidos a 4000 rpm durante 5 minutos. Estes tubos foram acondicionados em Freezer a -70°C permitindo a separação das fases orgânica e inorgânica, a partir do congelamento da fase inorgânica (líquida). Desta forma, a fase orgânica (não congelada) foi transferida para um outro tubo. Esse tubo foi acondicionado em decantador sob fluxo de azoto a 35°C para secagem do material. Estes procedimentos foram repetidos mais de três vezes. Após isso, os tubos secos foram tampados e mantido em Freezer a -20°C .

Determinação de Esteróides por Radio Imuno-Ensaio (RIA):

Os tubos secos contendo os extratos de hemolinfa, ovário e hepatopâncreas foram utilizados para se estimar a presença de estradiol, testosterona e 17β progesterona imuno-reativos. Os “kits” hormonais continham os reagentes e tubos apropriados para a leitura de absorbância do material. As técnicas utilizadas para a leitura estiveram de acordo com o protocolo de Oreczyk et al. (1974).

Assim, para a ressuspensão do material adicionaram-se nos tubos secos, provindos da extração hormonal, tampão gelatina (GPBS) (tampão fosfato de sódio 0,1M e pH 7.2, contendo 0,15M de NaCl e 0,1% de gelatina) e metanol. Os tubos foram agitados em vortex e, de acordo com as especificações de cada “kit”, pequenas porções do material foram transferidas para os tubos de leitura. Adicionou-se aos tubos o material radioativo e então, os tubos para a leitura de estradiol e progesterona foram incubados em temperatura ambiente por 3 horas. Já os tubos

para leitura de testosterona foram incubados em banho maria a 40°C. Desta forma, com emprego de um leitor de raios gama LKB Wallac acoplado a um computador dotado de “software” próprio, obtiveram-se as curvas padrão individuais para cada hormônio dando-se início a leitura do material. Ressata-se que os resultados foram expressados em função do peso inicial das amostras depositadas nos tubos. Os dados obtidos foram calculados e as unidades das amostras foram padronizadas. Destaca-se que a leitura do material ocorreu nas dependências da Escola Técnica Agrônômica da cidade de Bragança – Portugal. Para análise e conformação final dos dados aplicou-se o teste “t” de Tukey e utilizou-se o programa “Statistical Analyses System (SAS) Versão 9.1 for Windows (USA)”.

RESULTADOS

Valores dos Índices gonadossomático e hepatossomático

Os pesos relativos dos ovários e do hepatopâncreas nos diferentes estágios de maturação foram calculados como porcentagens do peso total do corpo dos animais, determinando-se o índice gonadossomático (IGS) e o índice hepatossomático (IHS), respectivamente (Tabela 1). Fêmeas de *Macrobrachium amazonicum* com ovários em estágio final de maturação, em estágio V, apresentaram os maiores IGS quando comparadas às fêmeas em estágio I, II, III e IV ($p < 0,01$) (Tabela 1). Os IHS das fêmeas de *Macrobrachium amazonicum* não apresentaram diferença significativa entre os estágios II, III e IV de maturação gonadal. O mesmo ocorre entre os estágios I e V. Assim, fêmeas em estágios II, III e IV de maturação ovariana apresentaram os maiores IHS quando comparados aos IHS de fêmeas em estágio I e V ($p < 0,01$) (Tabela 1).

Tabela 1. Determinação percentual dos índices gonadossomático (IGS) e hepatossomático (IHS) de fêmeas de *Macrobrachium amazonicum* nos diferentes estágios de maturação ovariana.

Índices	Estágios de maturação				
	I	II	III	IV	V
IGS	0,51 ± 0,07 D	0,67 ± 0,07 D	1,92 ± 0,68 C	4,85 ± 0,71 B	9,05 ± 0,65 A
IHS	2,63 ± 0,84 B	3,71 ± 0,69 A	4,33 ± 0,67 A	3,63 ± 0,58 A	2,41 ± 0,72 B

Médias na mesma linha seguidas de letras iguais não diferem entre si ($p < 0,01$).

Estrutura ovariana

Estudos macroscópicos e microscópicos dos ovários de fêmeas de *Macrobrachium amazonicum* permitiram a determinação de cinco estágios de maturação gonadal. Esses estágios são classificados como I, II, III, IV e V (Fig. 1). Dentre esses estágios observam-se diferentes tipos celulares, que são denominados de ovogônia, ovócito pré-vitelogênico, ovócito em vitelogênese inicial, ovócito em vitelogênese avançada e ovócito maduro. Em *Macrobrachium amazonicum*, a

distribuição desses diferentes tipos celulares nos ovários varia dependendo do grau de maturação em que essas células se encontram. Desta forma, as células mais jovens são comumente observadas na região central e as células maduras na periferia do órgão (Fig. 2).

No estágio I de maturação ovariana, os ovários são pequenos, incolores e apresentam consistência gelatinosa. Os ovários são pares, fusionados na região cranial, estão localizados no cefalotórax sobre o hepatopâncreas, e não são visíveis através da carapaça por transparência. Neste estágio ovariano observa-se a zona proliferativa na região central do órgão, onde se encontram as ovogônias. Estas células apresentam citoplasma pouco evidente e núcleo esférico com grande acúmulo de granulações e nucléolo evidente. Observam-se ainda ovogônias em divisão celular (Fig. 3). As observações ultraestruturais revelam que o núcleo das ovogônias possui cromatina dispersa, e o citoplasma apresenta mitocôndrias e acúmulo de material elétron-denso disposto próximo à membrana nuclear (Fig. 4).

Os ovários em estágio II de maturação apresentam coloração esbranquiçada. Nesse estágio observam-se aumentos no tamanho e no volume do ovário, e sua visualização ainda é difícil por transparência através da carapaça. Nesta fase de maturação ovariana encontram-se principalmente os ovócitos pré-vitelogênicos próximos à região central do ovário. Estas células apresentam formato poliédrico com citoplasma basófilo, e núcleo com granulações discretas e presença de um a dois nucléolos (Fig. 5). Esse tipo celular está localizado próximo às ovogônias e pode ser também encontrado no estágio I de maturação ovariana.

Ultraestruturalmente, os ovócitos pré-vitelogênicos apresentam concentração de organelas na região perinuclear (Fig. 6), enquanto na região periférica do citoplasma esse acúmulo se torna menos comum. O núcleo dessas células é excêntrico, grande e oval. Os nucléolos estão próximos à membrana nuclear e são compostos por uma massa de grânulos fibrilares grande e densa (Fig. 6). No nucleoplasma pode ser observado também grande quantidade de material fibrilar disperso (Fig. 7). O envelope nuclear apresenta numerosos poros (Fig. 6 e Fig. 8). Ainda na região perinuclear podem-se observar nuages formadas por material granuloso e fibrilar (Fig. 9). A maioria das organelas observada no citoplasma

apresenta aspecto membranoso (Fig. 8). O retículo endoplasmático está formado por expansões finas e longas da membrana externa do núcleo e contínuo à cisterna perinuclear. Tanto o envelope nuclear quanto o retículo endoplasmático não apresentam ribossomos aderidos à sua membrana (Fig. 7). Observam-se ainda os dictiossomos (Fig. 8), que são vesículas formadas por membrana, e vários corpos multivesiculares (Fig. 9) localizados na região perinuclear.

No estágio III de maturação ovariana, os ovários apresentam coloração esverdeada e cromatóforos em sua região dorsal. Esses órgãos são túrgidos e encontram-se apoiados na parte posterior do estômago. Neste estágio de maturação é possível a visualização do ovário por transparência através da carapaça. Ovócitos em vitelogênese inicial são frequentemente observados e exibem citoplasma com basofilia menos acentuada, aumento do volume celular e presença de vesículas incolores (Fig. 10), e o núcleo possui de um a dois nucléolos evidentes. No início da fase de vitelogênese inicial as vesículas incolores estão dispersas no citoplasma, e em seguida se organizam e formam as vesículas corticais dispersas na periferia do citoplasma deste ovócito (Fig. 11). Estas vesículas incolores caracterizam os ovócitos em vitelogênese inicial. Nessa fase de maturação celular os ovócitos apresentam-se envoltos por células foliculares (Fig. 10). Essas células foliculares apresentam núcleo central e citoplasma evidente com discreta basofilia (Fig. 11). A ultraestrutura dos ovócitos em vitelogênese inicial evidencia o retículo endoplasmático rugoso em formato vesicular contendo matriz fibrilar granulosa (Fig. 12). Essas vesículas localizam-se na região cortical do citoplasma (Fig. 13), assim como, mitocôndrias (Fig. 14) e gotas lipídicas.

No estágio IV de maturação ovariana os ovários apresentam-se túrgidos, volumosos e de coloração esverdeada mais intensa quando comparada ao estágio III. Os ovários ocupam grande parte da cavidade do celoma ao nível do cefalotórax e são facilmente observados por transparência através da carapaça. Nesse estágio os ovários ultrapassam os dentes epigástricos do rostrum (Fig. 1) e recobrem mais da metade do estômago. Ainda nesse estágio observam-se principalmente os ovócitos em vitelogênese avançada (Fig. 15). Estas células apresentam núcleo basófilo e citoplasma acidófilo contendo vesículas incolores e vesículas vitelínicas (Fig. 15). Os ovócitos em vitelogênese avançada são caracterizados, sob microscopia de luz, pela

presença de vesículas vitelínicas na região central do citoplasma. Essas vesículas apresentam-se arredondadas e exibem diferentes intensidades de acidofilia, isto é, exibem conteúdo claro e escuro (Fig. 15). Os ovócitos em vitelogênese avançada apresentam envoltório folicular composto por células mais achatadas que as observadas ao redor dos ovócitos em vitelogênese inicial. As células foliculares que envolvem os ovócitos em vitelogênese avançada apresentam, ainda, núcleo alongado e citoplasma basófilo (Fig. 16).

A ultraestrutura dos ovócitos em vitelogênese avançada evidencia núcleo com um a dois nucléolos grandes localizados na região perinuclear. O citoplasma apresenta abundância de retículo endoplasmático rugoso com aspecto vesicular contendo material fibrilar (Fig. 17), e mitocôndrias com cristas de formato alongado. Observa-se ainda que as vesículas de retículo endoplasmático se fundem freqüentemente formando vesículas maiores (Fig. 17). As vesículas de retículo endoplasmático fundidas estão preenchidas por material com diferentes elétrondensidades (Fig. 18).

No estágio V de maturação ovariana, os ovários são mais volumosos e túrgidos, e de coloração verde intenso. Estes órgãos preenchem toda a cavidade cefalotorácica e se estendem da região entre os olhos pedunculados até o primeiro segmento abdominal, sendo facilmente observado por transparência através da carapaça (Fig. 1). A cápsula ovariana é muito tênue e rompe-se com leve compressão. A zona germinativa aparece em pontos dispersos da gônada, sendo comprimida pelos ovócitos maduros. O citoplasma dos ovócitos maduros é acidófilo e apresenta vesículas lipídicas e vitelínicas distribuídas por todo o citoplasma (Fig. 19). O aumento destas vesículas vitelínicas desloca algumas vesículas lipídicas para a periferia celular (Fig. 20). Nesta fase as células foliculares se restringem a um cordão de células pavimentosas pouco evidentes e com núcleos achatados (Fig. 20). Entre o ovócito maduro e as células foliculares, evidencia-se uma fina camada basófila definida como córion (Fig. 20).

A ultraestrutura do citoplasma dos ovócitos maduros evidencia vesículas de vitelo em maturação e maduras (Fig. 21), além de retículo endoplasmático liso com grande quantidade de material elétron-denso no interior (Fig. 21). Ainda no

citoplasma, observam-se túbulos concêntricos de retículo endoplasmático liso que não apresentam material elétron-denso em seu interior (Fig. 21). A superfície do ovócito maduro apresenta microvilosidades (Fig. 22). Observa-se ainda a deposição de material elétron-denso no espaço entre as microvilosidades (Fig. 22) e os prolongamentos das células foliculares (Fig. 22 e Fig. 23). Nessa região elétron-densa forma-se uma camada amorfa e espessa, denominada de córion. O córion é resultado da deposição de material na superfície externa da membrana plasmática do ovócito maduro onde permanecem as microvilosidades dessa célula (Fig. 24 e Fig. 25). Nota-se que a membrana plasmática da célula folicular perde seus prolongamentos tornando-se regular no momento em que o córion é estabelecido (Fig. 25).

Estrutura do hepatopâncreas

O hepatopâncreas de *Macrobrachium amazonicum* é um órgão maciço, friável, de coloração amarelo-acastanhada, e está revestido por uma cápsula de tecido conjuntivo. Este órgão ocupa grande parte da cavidade cefalotorácica e está organizado em lobos direito e esquerdo. Cada lobo é constituído por uma série de túbulos secretores ou lóbulos hepatopancreáticos que se iniciam em fundo cego, cujos lúmens correm em direção à abertura do hepatopâncreas no estômago, denominada túbulo principal. Cada túbulo secretor está revestido por epitélio pseudo-estratificado que se apóia na membrana basal respectiva (Fig. 26). Dois túbulos secretores adjacentes apresentam entre si discreto tecido conjuntivo frouxo com células mioepiteliais, que delimitam o espaço hemolinfático por onde corre hemolinfa (Fig. 26). Cada túbulo pode ser diferenciado em três regiões: proximal (próxima do túbulo principal), média e distal (região do fundo cego) (Fig. 27). O epitélio dos túbulos hepatopancreáticos consiste de cinco tipos celulares, sendo eles, célula E (indiferenciada), célula F (fibrilar), células B (vesicular), célula R (reabsortiva) e célula M (basal).

À microscopia de luz as células E são cúbicas e apresentam citoplasma basófilo, núcleo arredondado e proeminente, com vários nucléolos (Fig. 28). Esse tipo celular apresenta região livre com borda em escova (Fig. 29) e está localizado na região distal do túbulo hepatopancreático. Por se tratar de uma célula

indiferenciada, é frequente a observação de divisão mitótica para renovação do epitélio tubular (Fig. 28). Essas células E quando analisadas sob aspecto ultraestrutural, apresentam núcleo grande que ocupa a maior parte do volume citoplasmático (Fig. 30). A cromatina nuclear é granulosa havendo nucléolos bem evidentes (Fig. 31). O citoplasma apresenta retículo endoplasmático rugoso (Fig. 32), retículo endoplasmático liso e mitocôndrias (Fig. 33).

Outro tipo celular observado são as células F, que se apresentam cilíndricas e com região conspícua de borda em escova (Fig. 34) núcleo da célula F é grande e arredondado, e o citoplasma apresenta intensa basofilia quando comparado aos demais tipos celulares (Fig. 34). Células F podem ser encontradas em toda a extensão do túbulo hepatopancreático, sendo mais facilmente observadas próximas às células E. Ultraestruturalmente as células F apresentam microvilos no ápice celular (Fig. 35). Na região apical do citoplasma observam-se pequenos vacúolos com diferentes elétrons-densidades e logo abaixo grandes vacúolos supranucleares (Fig. 35). O citoplasma apresenta retículo endoplasmático rugoso, mitocôndrias e proeminente complexo de Golgi (Fig. 36). O núcleo está localizado próximo à região basal da célula e mostra contorno irregular e contém cromatina granulosa (Fig. 37).

Os túbulos hepatopancreáticos apresentam ainda célula do tipo B que exibem formato globular com núcleo basal achatado (Fig. 38). Seu citoplasma apresenta vários vacúolos apicais pinocíticos e um grande vacúolo subapical que ocupa a maior parte do citoplasma (Fig. 38). As células B são abundantes na região distal e média dos túbulos, diminuindo sua frequência à medida que o túbulo secretor se aproxima do túbulo principal, ou seja, na região proximal. Ultraestruturalmente as células B apresentam um grande vacúolo envolto por uma fina camada de citoplasma. O núcleo está restrito à região basal da célula e apresenta cromatina granulosa e nucléolos evidentes (Fig. 39). Na região apical do citoplasma das células B observam-se numerosas vesículas pinocíticas (Fig. 40). Próximo a estas vesículas pinocíticas evidenciam-se grandes vacúolos supranucleares (Fig. 40). O citoplasma apresenta retículo endoplasmático rugoso, mitocôndrias e complexo de Golgi (Fig. 41). As células B liberam vesículas juntamente com parte do citoplasma apical para o lúmen do ducto hepatopancreático (Fig. 42).

As células R observadas no hepatopâncreas são cilíndricas e apresentam uma conspícua região livre com borda em escova (Fig. 43). Essas células apresentam núcleo arredondado predominantemente basal (Fig. 43 e Fig. 44). O citoplasma das células R apresenta vacúolos subapicais característicos (Fig. 43). Esse tipo celular é o mais numeroso e está localizado nas regiões proximal e média dos túbulos hepatopancreáticos. A ultraestrutura das células R revela numerosos microvilos no ápice celular mostrando características de célula absorptiva (Fig. 44). O núcleo está localizado na região basal e exibe tamanho menor e cromatina menos granulosa quando comparado aos núcleos dos demais tipos celulares (Fig. 45). Com referência ao núcleo, observa-se que os nucléolos presentes ocupam a região perinuclear (Fig. 45). O citoplasma apresenta retículo endoplasmático liso freqüentemente observado na região basal da célula (Fig. 45), mas também pode ser ocasionalmente visualizado no ápice celular (Fig. 46). Esse tipo celular apresenta ainda retículo endoplasmático rugoso, ribossomos livres e numerosas mitocôndrias localizadas principalmente na região apical do citoplasma (Fig. 46). O complexo de Golgi apresenta cisternas achatadas e pode ser visualizado nas regiões média e basal da célula R.

As células M apresentam formato triangular com ápice arredondado (Fig. 47). Seu núcleo é basal e arredondado com vários nucléolos, e o citoplasma apresenta intensa basofilia (Fig. 47). Essa célula apresenta-se apoiada na membrana basal e seu ápice não alcança o lúmen do túbulo hepatopancreático, e não apresenta portanto região livre com borda em escova (Fig. 47). Estudos ultraestruturais revelaram que as células M apresentam núcleo arredondado com contorno irregular ocupando quase todo o volume celular. A cromatina nuclear apresenta grandes grumos localizados próximos à região da carioteca e há nucléolo evidente (Fig. 48). Outro padrão nuclear observado nas células M evidencia núcleo alongado, com contorno regular, sendo deslocado do centro celular (Fig. 49). Nas células onde o núcleo encontra-se deslocado para a periferia celular verifica-se a presença de uma vesícula grande e pouco elétron-densa (Fig. 49). No citoplasma das células M observam-se retículo endoplasmático, ribossomos livres e mitocôndrias (Fig. 49).

Quantificação hormonal

A quantificação hormonal em fêmeas de *Macrobrachium amazonicum* teve o propósito de estabelecer correlação entre os diferentes estágios de maturação ovariana e os níveis de hormônios esteróides (estradiol, progesterona e testosterona), presentes nos ovários, hepatopâncreas e hemolinfa. Com relação às concentrações de estradiol nos ovários, nota-se queda progressiva no nível de estradiol a partir do estágio I de maturação ovariana. Desde o estágio II até o estágio IV observa-se queda acentuada diferindo dos demais estágios de maturação ovariana ($p < 0,01$) (Tabela 2). Quanto ao hepatopâncreas de *Macrobrachium amazonicum*, o comportamento das concentrações de estradiol nos estágios I, IV e V de maturação ovariana não apresentou diferença entre si, porém diferem dos estágios II e III ($p < 0,01$) (Tabela 2). A hemolinfa apresenta concentração de estradiol crescente entre os estágios I e II de maturação gonadal. O maior valor para a concentração de estradiol é encontrado no estágio II de maturação ovariana. A partir do estágio II, o estradiol apresenta queda acentuada até o estágio III ($p < 0,01$) (Tabela 2). O estágio III apresenta concentração de estradiol diferente dos demais estágios de maturação ovariana ($p < 0,01$) (Tabela 2). A partir do estágio IV, esta concentração diminui discretamente até atingir o estágio V de maturação ovariana (Tabela 2).

Tabela 2. Níveis médios das concentrações de estradiol nos ovários (pg/g), hepatopâncreas (pg/g) e hemolinfa (pg/mL) de fêmeas de *Macrobrachium amazonicum* nos diferentes estágios de maturação ovariana.

Estágios de maturação	Órgãos		
	Ovário	Hepatopâncreas	Hemolinfa
I	1144,38 ± 120,55 A	443,99 ± 39,96 B	881,47 ± 41,77 B
II	1181,36 ± 45,89 A	619,18 ± 69,11 A	1612,37 ± 140,35A
III	548,19 ± 28,26 B	286,40 ± 24,69 C	608,39 ± 24,64 C
IV	440,74 ± 30,85 B	392,92 ± 32,72 B	453,62 ± 16,59 D
V	185,27 ± 22,40 C	465,63 ± 17,41 B	409,31 ± 31,25 D

Médias na mesma coluna seguidas de letras iguais não diferem entre si ($p < 0,01$).

Ovários e hepatopâncreas de fêmeas de *Macrobrachium amazonicum* nos diferentes estágios de maturação ovariana, apresentam características semelhantes às concentrações de progesterona. Estas concentrações apresentam queda progressiva de acordo com os estágios de maturação ovariana. Ressalta-se que, entre os estágios I e III de maturação ovariana, a queda é mais acentuada quando comparada com o intervalo entre os estágios III e V de maturação ovariana ($p < 0,01$) (Tabela 3). Entretanto, na hemolinfa a concentração de progesterona demonstrou aumento ($p < 0,01$) entre os estágios I e II de maturação, quando atinge seu valor máximo. Entre os estágios II e III vê-se queda brusca na concentração de progesterona ($p < 0,01$). A partir do estágio III de maturação ovariana observa-se queda suave na concentração de progesterona até o estágio IV, atingindo sua menor concentração no estágio V ($p < 0,01$) (Tabela 3).

Tabela 3. Níveis médios das concentrações de progesterona nos ovários (pg/g), hepatopâncreas (pg/g) e hemolinfa (pg/mL) de fêmeas de *Macrobrachium amazonicum* nos diferentes estágios de maturação ovariana.

Estágios de Maturação	Órgãos		
	Ovário	Hepatopâncreas	Hemolinfa
I	9601,48 ± 1051,25 A	12542,70 ± 544,37 A	5340,30 ± 428,19 B
II	9108,48 ± 1110,45 A	10209,48 ± 766,72 B	8398,75 ± 609,34 A
III	4579,16 ± 439,35 B	3358,80 ± 170,52 C	3528,00 ± 261,36 C
IV	3929,44 ± 82,13 B	2326,62 ± 105,71 D	2967,29 ± 210,85 C
V	1598,98 ± 119,50 C	1371,93 ± 73,98 E	2176,25 ± 53,11 D

Médias na mesma coluna seguidas de letras iguais não diferem entre si ($p < 0,01$).

As concentrações de testosterona, tanto nos ovários quanto no hepatopâncreas de fêmeas de *Macrobrachium amazonicum* apresentam seus maiores valores no estágio I de maturação (Tabela 4). A partir deste estágio a concentração deste hormônio inicia queda progressiva até o estágio V de maturação ($p < 0,01$) (Tabela 4). Ressalta-se que apesar da concentração de testosterona ser semelhante no estágio V de maturação ovariana para ovários e hepatopâncreas, os valores iniciais da concentração deste hormônio são diferentes para ambos os órgãos, estando em maior concentração no ovário (Tabela 4). Já na hemolinfa as concentrações de testosterona aumentam entre os estágios I e II de maturação ovariana ($p < 0,01$). A partir do estágio II a concentração deste hormônio diminui progressivamente no decorrer do amadurecimento ovariano ($p < 0,01$) (Tabela 4).

Tabela 4. Níveis médios das concentrações de testosterona nos ovários (pg/g), hepatopâncreas (pg/g) e hemolinfa (pg/mL) de fêmeas de *Macrobrachium amazonicum* nos diferentes estágios de maturação ovariana.

Estágios de Maturação	Órgãos		
	Ovário	Hepatopâncreas	Hemolinfa
I	31565,59 ± 4640,99 A	16790,81 ± 1471,93A	11842,37 ± 69,77 B
II	22307,94 ± 2515,63 B	12185,04 ± 1386,03 B	24952,35 ± 894,00 A
III	10493,74 ± 1057,66 C	5928,47 ± 220,02 C	10666,68 ± 596,84 B
IV	14143,16 ± 1096,62 C	3428,44 ± 135,54 D	8405,09 ± 774,70 C
V	3461,43 ± 612,95 D	2327,80 ± 167,21 D	7686,55 ± 603,09 C

Médias na mesma coluna seguidas de letras iguais não diferem entre si ($p < 0,01$).

Figura 1: Esquema evidenciando os estágios I a V, respectivamente, de maturação ovariana de *Macrobrachium amazonicum*. Sendo as observações realizadas sob transparência de carapaça (C). Destacam-se a localização do dente epigástrico (DE), olhos pedunculados (Cabeça de seta) e ovários (OV) em desenvolvimento. (4X)

Figura 2: Vista panorâmica do ovário de *Macrobrachium amazonicum*, evidenciando-se as regiões central (C) e periférica (P) do órgão. Azul de toluidina (100X).

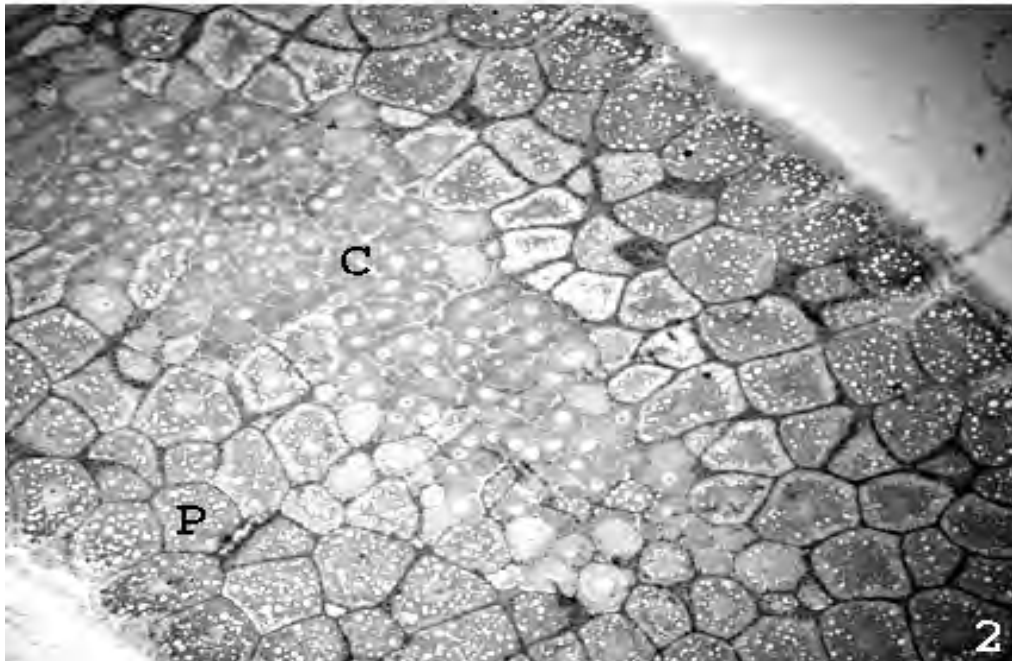
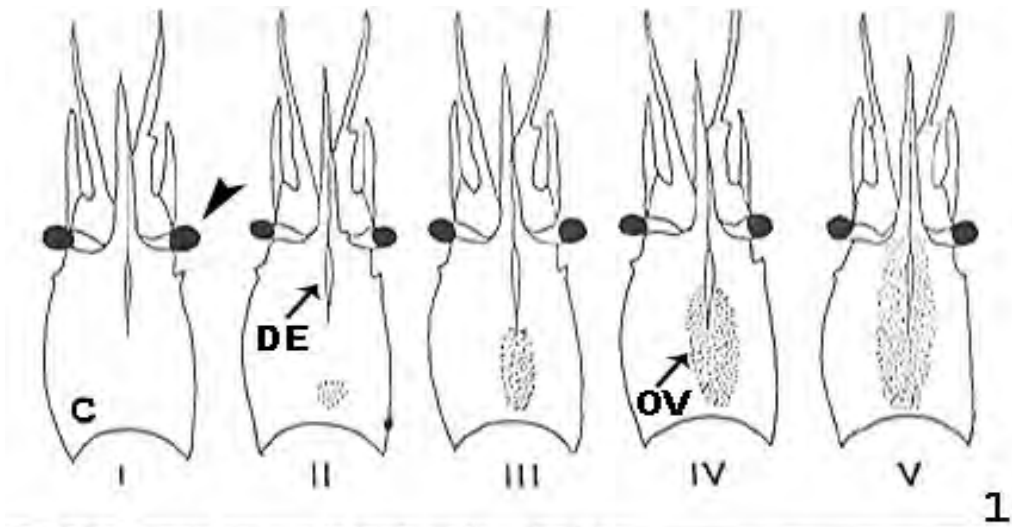


Figura 3. Fotomicrografia do ovário de *Macrobrachium amazonicum*, evidenciando região central do ovário destacando ovogônias (cabeça de seta) que apresentam núcleo esférico com grande acúmulo de material granular (→). Observam-se ainda ovogônias em divisão (*). Azul de toluidina (500X).

Figura 4. Ultraestrutura de ovogônias de *Macrobrachium amazonicum*, evidenciando núcleo (N) e material fibrilar (*) aderido à membrana nuclear (entre cabeça de setas). Destaca-se a presença de mitocôndrias (m) no citoplasma. (7.650X).

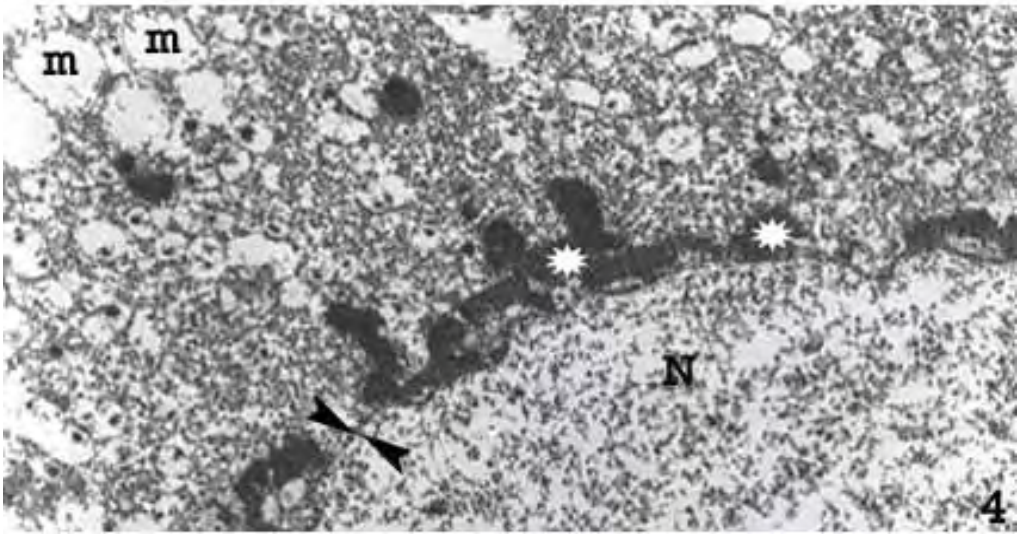
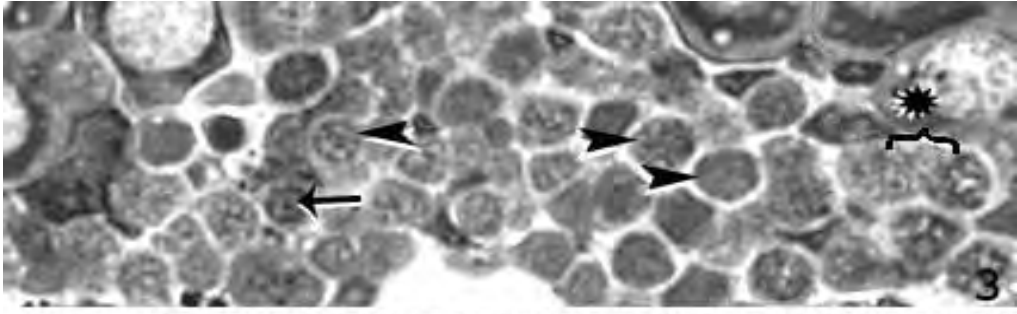


Figura 5: Fotomicrografia do ovário de *Macrobrachium amazonicum*, evidenciando ovócitos pré-vitelogênicos de formato poliédrico citoplasma basófilo (*), núcleos arredondados (n) e presença de 1 a 2 nucléolos (→). Azul de toluidina (500X).

Figura 6: Ultraestrutura de ovócitos pré-vitelogênicos de *Macrobrachium amazonicum* evidenciando organelas na região perinuclear (*) e nucléolo (nl) próximo a membrana nuclear (entre cabeças de setas). Destaca-se ainda a presença de poros (→) na membrana nuclear dos ovócitos. (22.650X).

Figura 7: Ultraestrutura de ovócitos pré-vitelogênicos de *Macrobrachium amazonicum* evidenciando a formação de retículo endoplasmático liso (*) a partir da membrana externa do núcleo (cabeça de seta). Destaca-se a presença de material fibrilar disperso no nucleoplasma dessas células (estrela). (37.350X).

Figura 8: Ultraestrutura de ovócitos pré-vitelogênicos de *Macrobrachium amazonicum* evidenciando poros no envoltório nuclear (seta) e organelas com aspecto membranoso (*). Destaca-se ainda a presença dos dictiossomas (cabeça de seta). (42.000X).

Figura 9: Ultraestrutura de ovócitos pré-vitelogênicos de *Macrobrachium amazonicum* com presença de nuages (ng) e corpos multivesiculares (→). (42.000X).

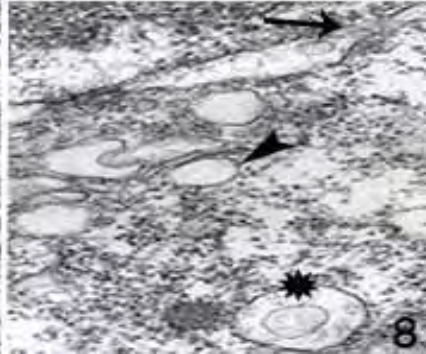
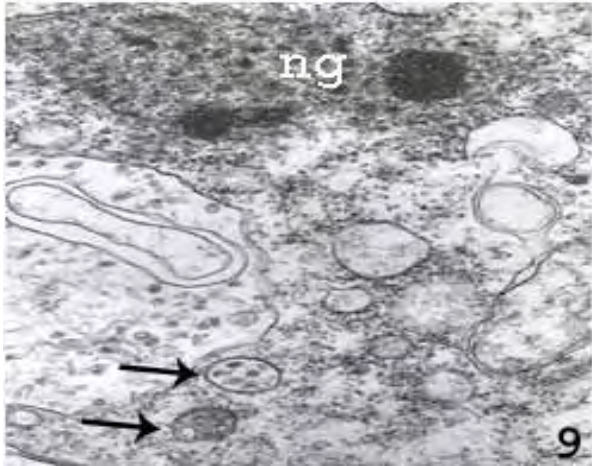
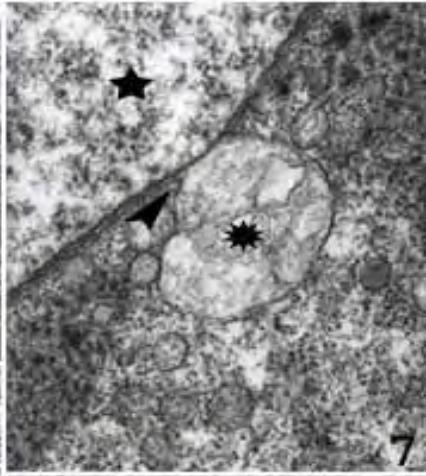
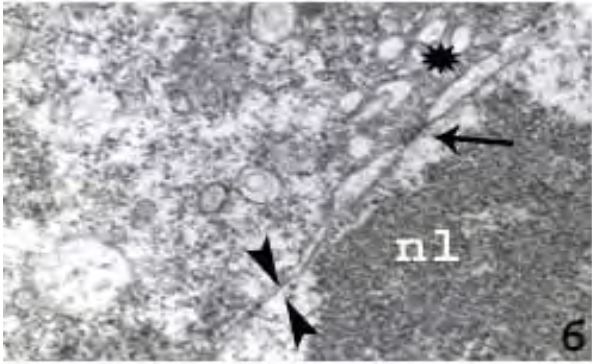
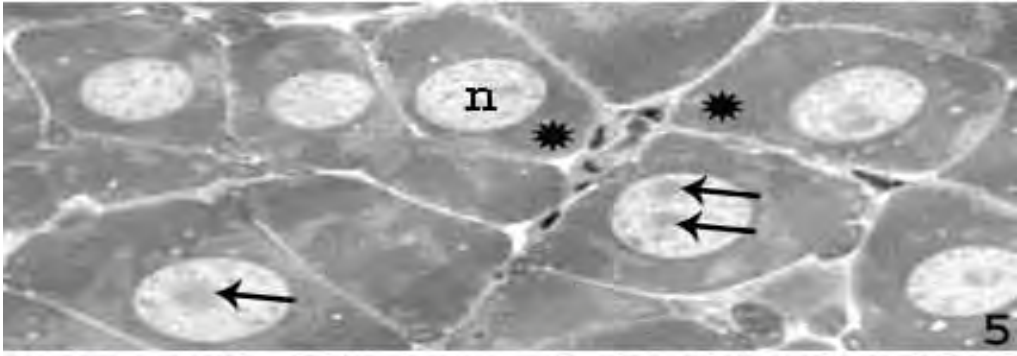


Figura 10: Fotomicrografia do ovário de *Macrobrachium amazonicum* evidenciando vesículas corticais incolores (→) na periferia celular dos ovócitos em vitelogênese inicial envoltos por células foliculares (*). Azul de toluidina (200X).

Figura 11: Fotomicrografia do ovário de *Macrobrachium amazonicum* evidenciando células foliculares envolvendo os ovócitos em vitelogênese inicial. As células foliculares apresentam citoplasma pouco basófilo (*) e núcleo arredondado (n). Destaca-se ainda a presença de vesículas corticais (→) na periferia do citoplasma do ovócito em vitelogênese inicial. Azul de toluidina (500X).

Figura 12: Ultraestrutura do ovócito em vitelogênese inicial de *Macrobrachium amazonicum* evidenciando retículo endoplasmático em aspecto vesicular (cabeça de seta) contendo matriz fibrilar. (41.500X).

Figura 13: Ultraestrutura do ovócito em vitelogênese inicial de *Macrobrachium amazonicum* evidenciando vesículas presentes na região cortical do citoplasma (*). (6.500X).

Figura 14: Ultraestrutura do ovócito em vitelogênese inicial de *Macrobrachium amazonicum* evidenciando mitocôndrias (m) presentes no citoplasma. (107.500X).

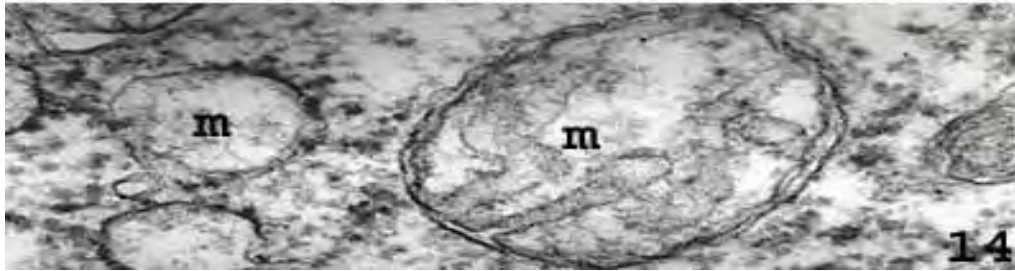
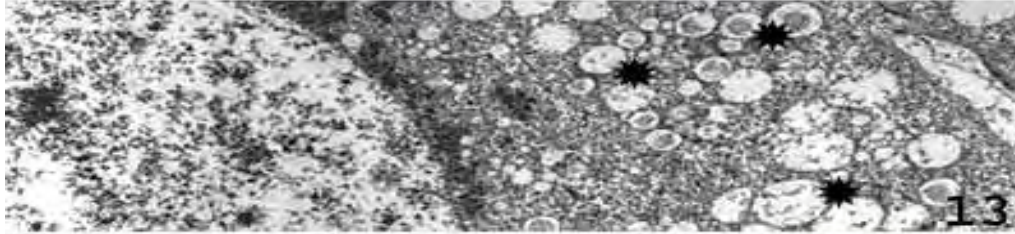
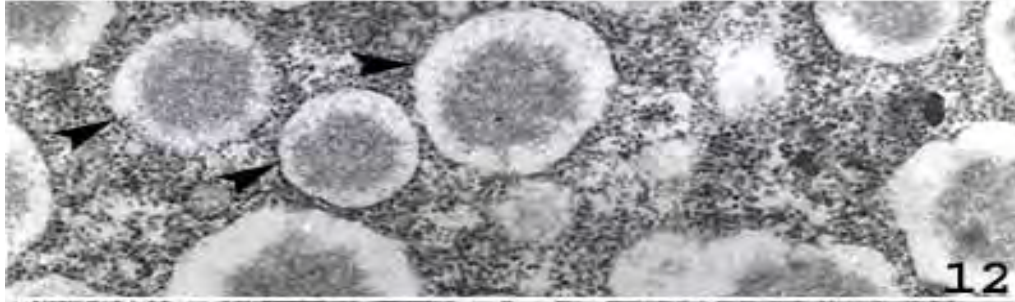
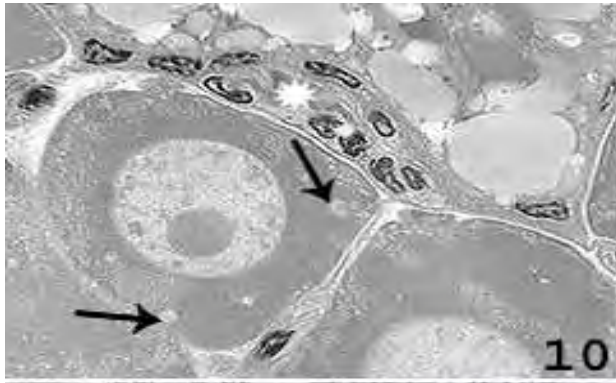


Figura 15: Fotomicrografia do ovário de *Macrobrachium amazonicum* evidenciando ovócitos em vitelogênese avançada com vesículas lipídicas (cabeça seta) e inclusões de vitelo na região central da célula (→). Azul de toluidina (350X).

Figura 16: Fotomicrografia do ovário de *Macrobrachium amazonicum* evidenciando o envoltório folicular dos ovócitos em vitelogênese avançada. As células foliculares apresentam citoplasma basófilo (*) e núcleos alongados (→). Azul de toluidina (500X).

Figura 17: Ultraestrutura do ovócito em vitelogênese inicial de *Macrobrachium amazonicum* evidenciando fusão das vesículas formadas por retículo endoplasmático rugoso (cabeça de seta) contendo material fibrilar (*). (62.000X).

Figura 18: Ultraestrutura do ovócito em vitelogênese inicial de *Macrobrachium amazonicum* evidenciando vesículas de vitelo com diferentes elétrondensidade. (3.800X).

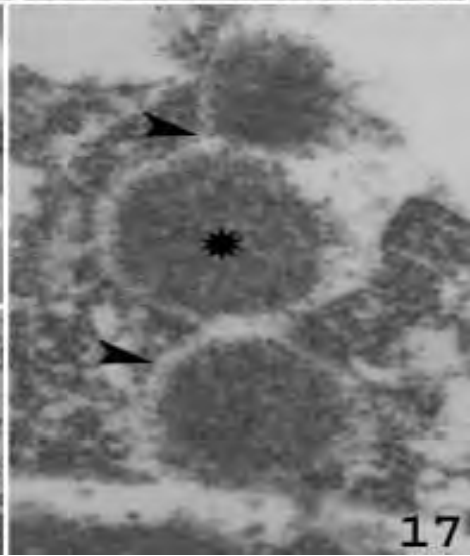
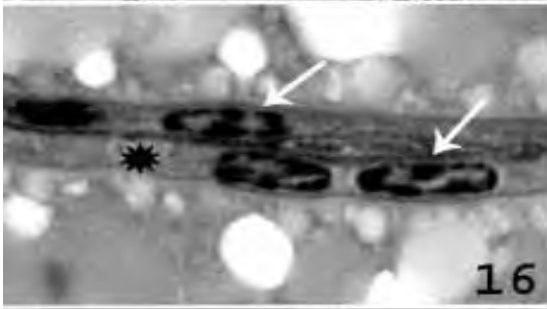
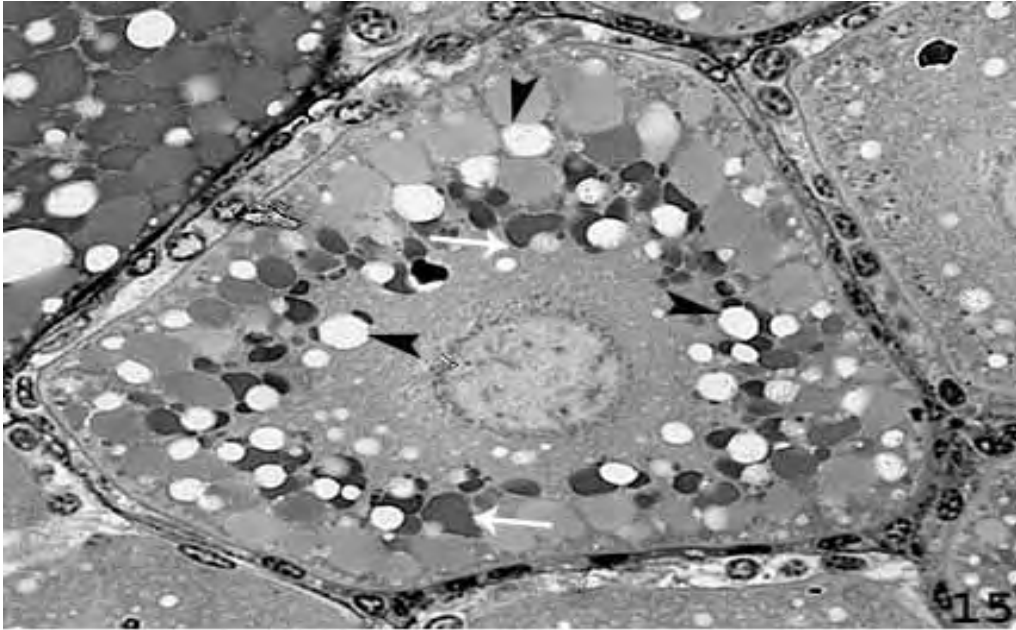


Figura 19: Fotomicrografia do ovário de *Macrobrachium amazonicum* evidenciando ovócitos maduros com vesículas lipídicas (→) e inclusões vitelínicas (*). Azul de toluidina (150X).

Figura 20: Fotomicrografia do ovário de *Macrobrachium amazonicum* evidenciando camada de alvéolo cortical (*) dos ovócitos maduros. Observa-se ainda células foliculares (seta) e córion (entre cabeças de setas). Azul de toluidina (300X).

Figura 21: Ultraestrutura de ovócito maduro de *Macrobrachium amazonicum* evidenciando retículo endoplasmático contendo material elétron-denso (estrela), vesículas de vitelo em maturação (→) e maduras (*). (4.900X).

Figura 22; Ultraestrutura de ovócito maduro de *Macrobrachium amazonicum* evidenciando local de microvilosidades entre o ovócito (cabeças de setas) e as células foliculares (→). (42.000X).

Figura 23: Ultraestrutura de ovócito maduro de *Macrobrachium amazonicum* evidenciando formação do córion (*). (22.500X).

Figura 24: Ultraestrutura de ovócito maduro de *Macrobrachium amazonicum* evidenciando o córion (}). Destaca-se as microvilosidades da membrana do ovócito maduro (entre cabeças de setas). (7.750X).

Figura 25: Ultraestrutura de ovócito maduro de *Macrobrachium amazonicum* evidenciando a membrana plasmática (entre cabeças de setas) da célula folicular (CF) sem interdigitações. (42.000X).

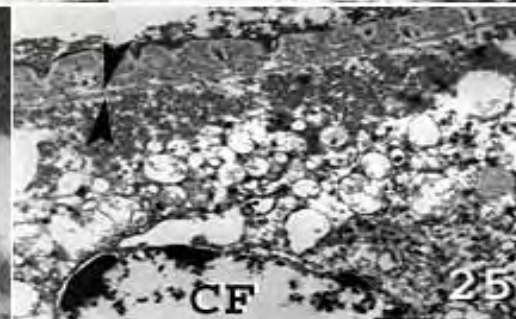
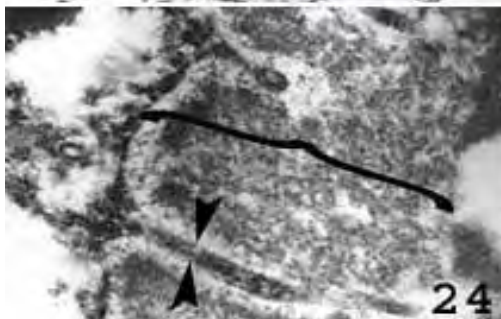
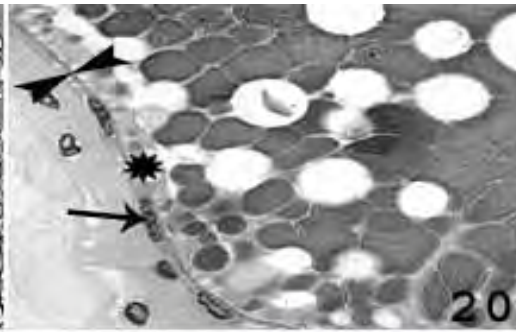
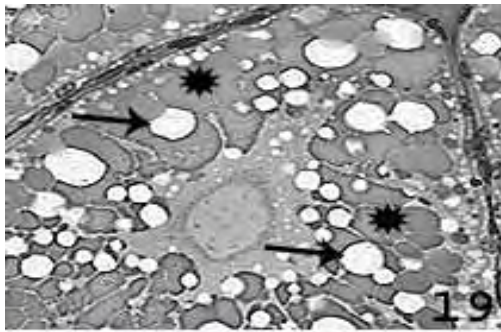


Figura 26: Fotomicrografia do hepatopâncreas de *Macrobrachium amazonicum*, evidenciando túbulo secretor revestido por epitélio pseudo-estratificado ({} se apoiando à membrana basal (→) e espaço hemolinfático (*). Azul de toluidina (100X).

Figura 27: Fotomicrografia do hepatopâncreas de *Macrobrachium amazonicum*, observando-se a região proximal (P), média (M) e distal (D) dos túbulos secretores. Azul de toluidina (100X).

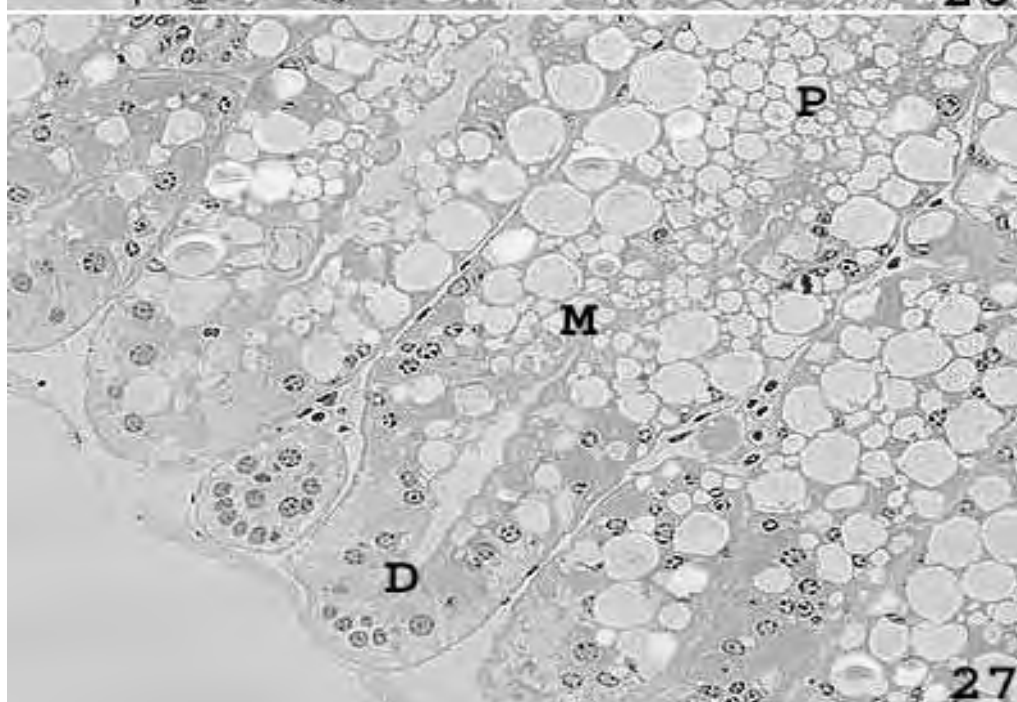
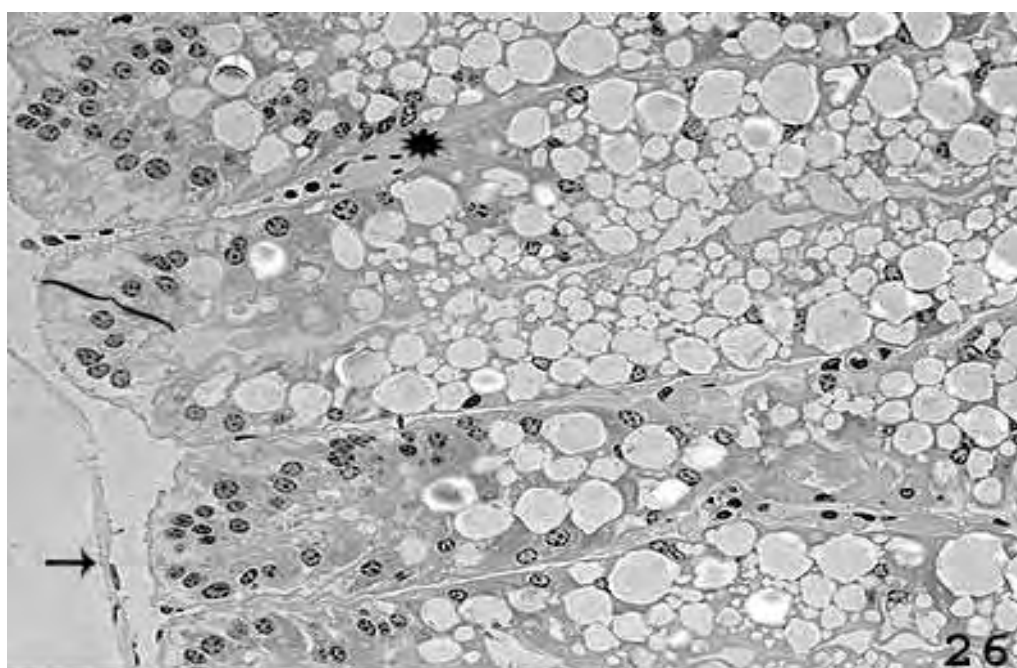


Figura 28: Fotomicrografia do hepatopâncreas de fêmeas de *Macrobrachium amazonicum*, mostrando núcleos arredondados das células E (→). Observa-se ainda célula E em metáfase (cabeça de seta). Azul de toluidina (400X).

Figura 29: Fotomicrografia do hepatopâncreas de *Macrobrachium amazonicum*, destacando a região distal do túbulo hepatopancreático com células E (estrela). Destaca-se a região de borda em escova presentes neste tipo celular (cabeça de seta). Azul de toluidina (200X).

Figura 30: Ultraestrutura da célula E, presente no hepatopâncreas de fêmeas de *Macrobrachium amazonicum*, destacando-se o núcleo (N) e citoplasma (C). (3.160X).

Figura 31: Ultraestrutura da célula E, presente no hepatopâncreas de fêmeas de *Macrobrachium amazonicum*, destacando-se cromatina nuclear (*) e nucléolos (cabeças de setas). (3.280X).

Figura 32: Ultraestrutura da célula E, presente no hepatopâncreas de fêmeas de *Macrobrachium amazonicum*, destacando-se a presença de retículo endoplasmático rugoso (*) no citoplasma. (57.500X).

Figura 33: Ultraestrutura da célula E, presente no hepatopâncreas de fêmeas de *Macrobrachium amazonicum*, destacando-se a presença de retículo endoplasmático liso (cabeça de seta) e mitocôndrias (m) no citoplasma. (47.900X).

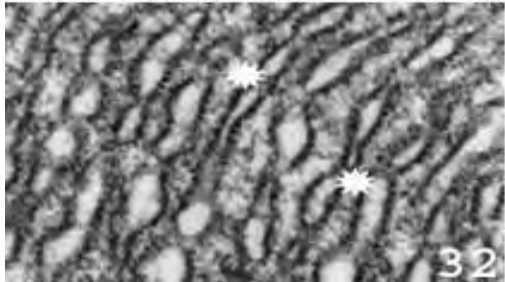
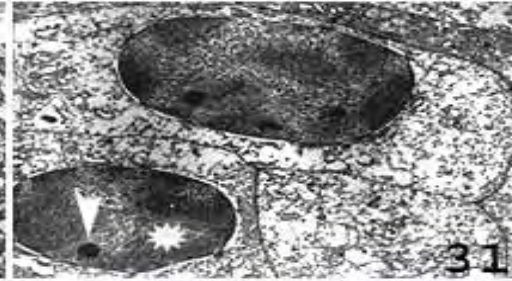
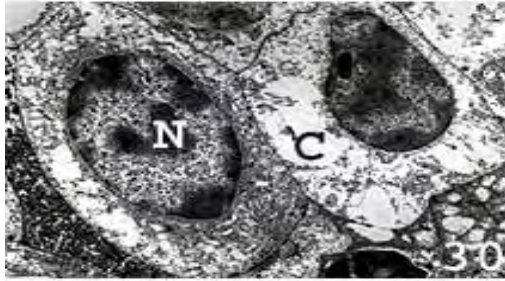
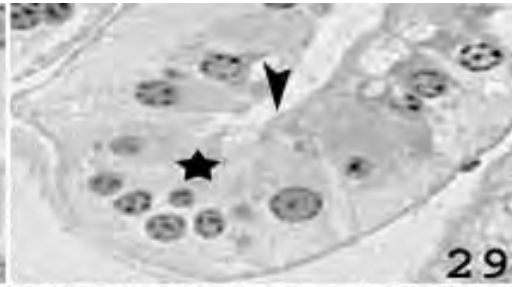
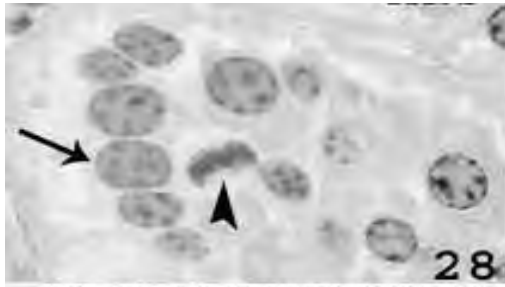


Figura 34: Fotomicrografia do hepatopâncreas de *Macrobrachium amazonicum*, evidenciando células F com núcleo arredondado (cabeça de seta), citoplasma basófilo (*) e a presença de região de borda em escova (estrela). Azul de toluidina (1000X).

Figura 35: Ultraestrutura da célula F, presente no hepatopâncreas de fêmeas de *Macrobrachium amazonicum*, evidenciando microvilos apicais (cabeças de setas), pequenos vacúolos apicais (→) e grandes vacúolos supranucleares (*). (4.650X).

Figura 36: Ultraestrutura da célula F, presente no hepatopâncreas de fêmeas de *Macrobrachium amazonicum*, destacando-se mitocôndrias (M), cisternas achatadas do complexo de Golgi (*) e retículo endoplasmático rugoso (cabeça de seta). (13.250X).

Figura 37: Ultraestrutura da célula E, presente no hepatopâncreas de fêmeas de *Macrobrachium amazonicum*, evidenciando membrana irregular do núcleo (→), cromatina granular (cg). (23.000X).

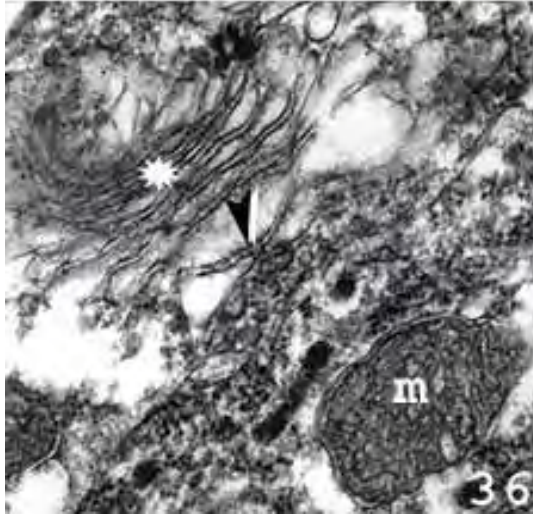


Figura 38: Fotomicrografia do hepatopâncreas de *Macrobrachium amazonicum*, evidenciando célula B com núcleo basal achatado (cabeça de seta), vacúolos apicais pinocíticos (*) e grande vacúolo subapical (v). Azul de toluidina (500X).

Figura 39: Ultraestrutura da célula B, presente no hepatopâncreas de fêmeas de *Macrobrachium amazonicum*, destacando-se núcleo ovalado com cromatina granulosa (*) e nucléolos evidentes (cabeças de setas). (5.950X).

Figura 40: Ultraestrutura da célula B, presente no hepatopâncreas de fêmeas de *Macrobrachium amazonicum*, destacando complexo apical de vesículas pinocíticas (→), e grandes vacúolos supranucleares (*). (45.350X).

Figura 41: Ultraestrutura da célula E, presente no hepatopâncreas de fêmeas de *Macrobrachium amazonicum*, destacando-se o complexo de Golgi (CG). (9.750X).

Figura 42: Ultraestrutura da célula B, presente no hepatopâncreas de fêmeas de *Macrobrachium amazonicum*, evidenciando liberação de vesículas (→) e parte do citoplasma apical (*) no lúmen hepatopancreático. (7.750X).

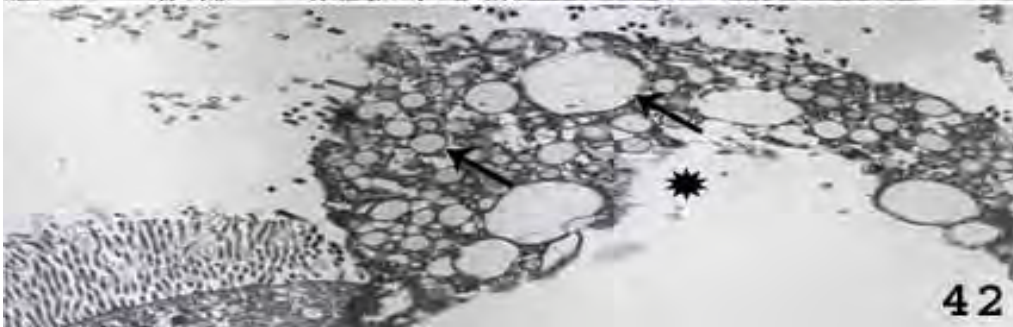
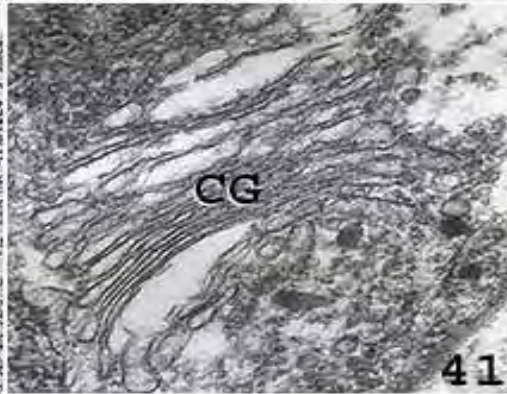
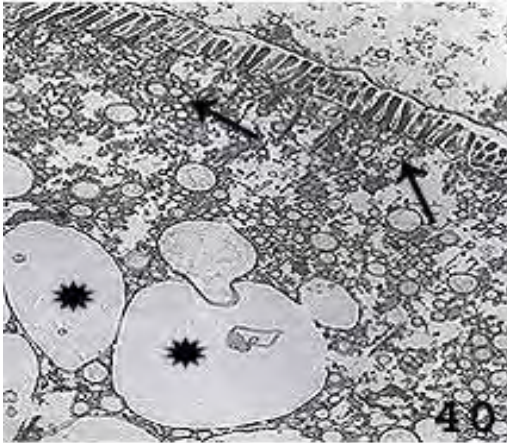
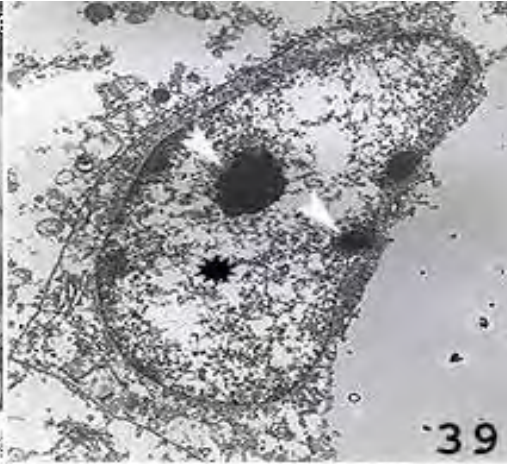
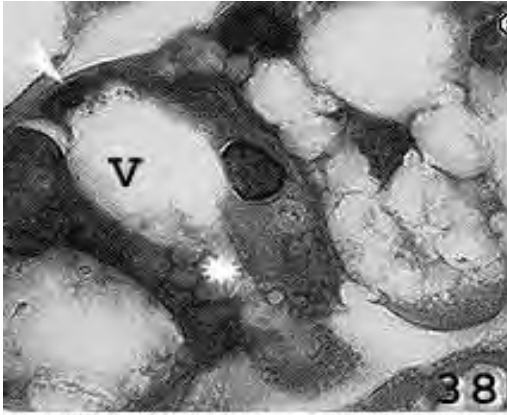


Figura 43: Fotomicrografia do hepatopâncreas de *Macrobrachium amazonicum*, evidenciando célula R com núcleo basal (cabeça de seta), vacúolos supranucleares (*). Destaca-se ainda a presença da região de borda em escova (estrela). Azul de toluidina (1.000X).

Figura 44: Ultraestrutura da célula R, presente no hepatopâncreas de fêmeas de *Macrobrachium amazonicum*, destacando-se borda em escova (*) e vacúolos subapicais (v). (17.000X).

Figura 45: Ultraestrutura da célula R, presente no hepatopâncreas de fêmeas de *Macrobrachium amazonicum*, destacando a presença de núcleo (n) com nucléolo evidente (estrela) e retículo endoplasmático liso (*) na região basal. (5.750X).

Figura 46: Ultraestrutura da célula R, presente no hepatopâncreas de fêmeas de *Macrobrachium amazonicum*, destacando as mitocôndrias (m), retículo endoplasmático liso (cabeça de seta) e rugoso (seta). (62.000X).

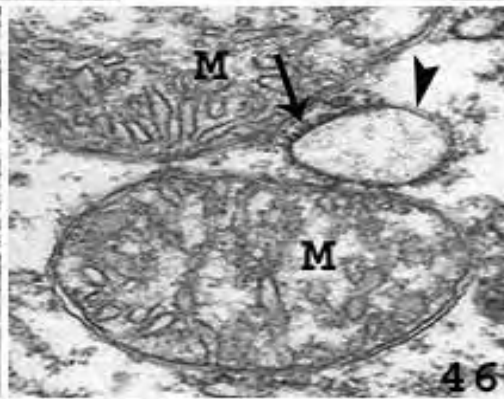
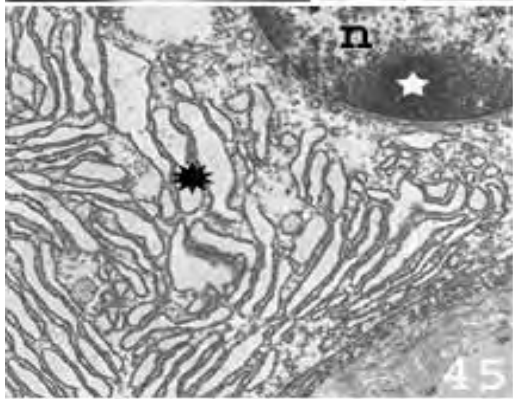
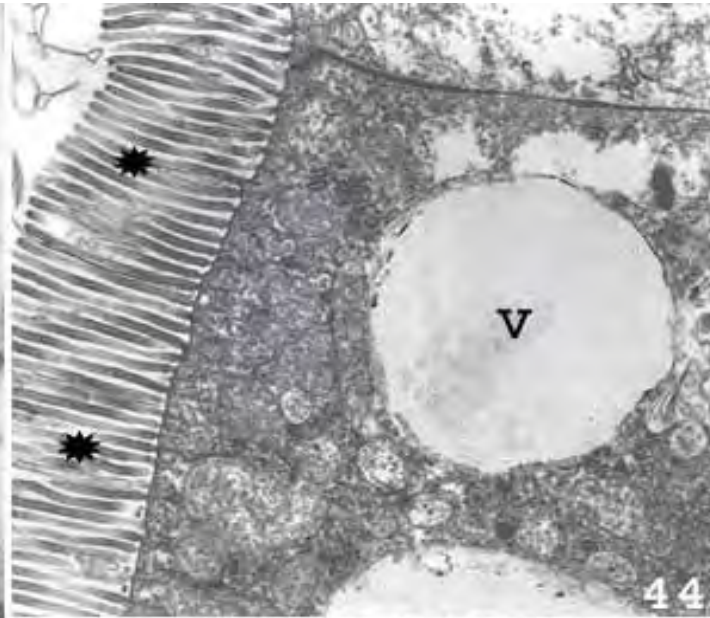
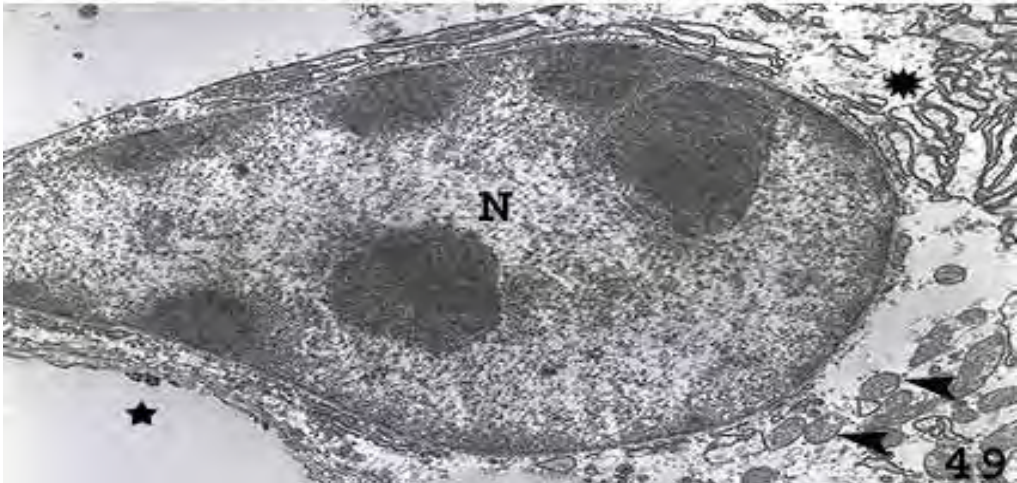
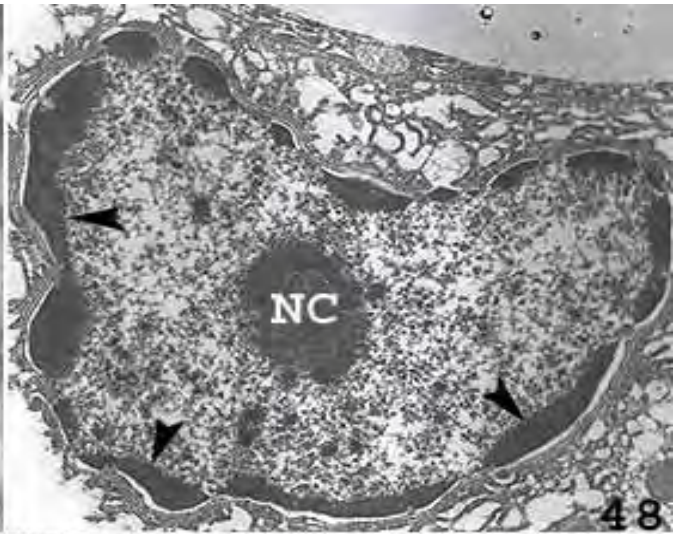
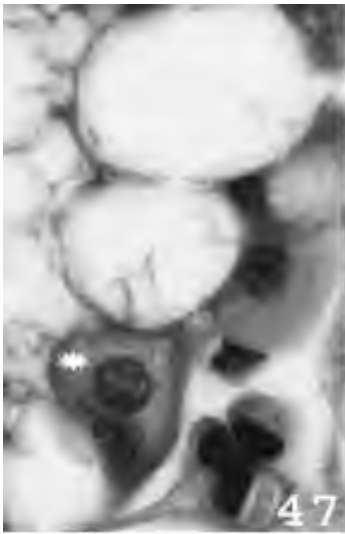


Figura 47: Fotomicrografia do hepatopâncreas de *Macrobrachium amazonicum*, evidenciando célula M com citoplasma intensamente basófilo (*). Azul de toluidina (500X).

Figura 48: Ultraestrutura da célula M, presente no hepatopâncreas de fêmeas de *Macrobrachium amazonicum*, destacando-se cromatina nuclear (cabeças de setas) aderida à membrana do núcleo e nucléolo (NC). (9.750X).

Figura 49 Ultraestrutura da célula M, presente no hepatopâncreas de fêmeas de *Macrobrachium amazonicum*, destacando-se núcleo alongado (N), retículo endoplasmático liso (*) e mitocôndrias (cabeça de seta). Destaca-se ainda a presença de vacúolo grande e pouco elétron-denso (estrela). (10.750X).



DISCUSSÃO

Fêmeas de *M. amazonicum* apresentam os maiores índices gonadosomáticos em espécimens com ovários no estágio V de maturação. Trabalhos realizados com fêmeas de *Macrobrachium rosenbergii* capturados na natureza, demonstraram que, o ovário durante a maturação, aumenta de peso devido ao acúmulo de lipídio e proteínas de vitelo no interior das células ovocitárias (Lee e Chang, 1997; Cavalli et al., 2000; 2001). O vitelo é utilizado como alimento endógeno para as larvas recém-eclodidas, proporcionando a sua sobrevivência nos primeiros estágios de desenvolvimento (Lee e Chang, 1997). Nos estágios IV e V de maturação ovariana de *Macrobrachium rosenbergii* observou-se o maior acúmulo de vitelo no órgão (Lee e Chang, 1997). Essas observações corroboraram o encontrado em *Macrobrachium amazonicum*, onde, o maior valor de IGS foi observado em fêmeas no estágio V de maturação gonadal, indicando um maior acúmulo de vitelo nos ovócitos maduros. Cavalli et al. (2001) sugerem que os lipídios depositados nos ovócitos são transferidos diretamente do hepatopâncreas para os ovários durante a maturação gonadal. Em fêmeas de *Macrobrachium amazonicum* as análises referentes ao IHS revelaram a influência dos estágios de maturação ovariana nos valores médios do peso do hepatopâncreas.

Os hepatopâncreas de *Macrobrachium amazonicum* com ovários nos estágios II, III e IV de maturação apresentaram médias de IHS maiores do que nos animais com ovários em estágios de maturação I e V. Isto ocorreu devido ao fato que fêmeas nos estágios II, III e IV de maturação ovariana estavam acumulando reserva energética ao nível do hepatopâncreas. Esta reserva seria possivelmente mobilizada para as células ovocitárias, em desenvolvimento no ovário, semelhantemente ao que fora encontrado para *Macrobrachium rosenbergii* (Cavalli et al., 2001). Caberia ressaltar que os IHS das fêmeas em estágio II, III e IV de maturação ovariana não apresentaram diferenças significativas, muito embora o estágio III de maturação ovariana indicasse o período no qual existiu o maior acúmulo de reserva energética no hepatopâncreas. Esta reserva seria posteriormente transferida para células ovocitárias em maturação a partir do estágio IV de maturação gonadal. Estudos

realizados com fêmeas maduras de *Penaeus monodon* demonstraram que boa parte da reserva de energia acumulada no hepatopâncreas é utilizada para o metabolismo do animal, principalmente durante a desova (Millamena e Pascual, 1990). Da mesma forma, Cavalli et al. (2001) relataram que em fêmeas de *Macrobrachium rosenbergii* houve diminuição da atividade alimentar relacionada com a muda pré-desova contribuindo para o declínio de lipídios estocados no hepatopâncreas nos estágios I e V de maturação ovocitária. Trabalhos realizados com diversas espécies marinhas como *Metapenaeus affinis* (Teshima e Kanazawa, 1983), *Penaeus indicus* (Galois, 1984) e *Penaeus monodon* (Millamena e Pascual, 1990), demonstraram que boa parte das reservas lipídicas presentes no hepatopâncreas foram utilizadas durante a maturação gonadal. Desta forma, acredita-se que a reserva energética que vem sendo acumulada no hepatopâncreas de fêmeas de *Macrobrachium amazonicum* seja importante para a conclusão da ovogênese, uma vez que essa reserva está diretamente relacionada com o metabolismo animal e com a atividade de maturação gonadal.

Os ovários de crustáceos apresentaram 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, para estoque de reprodutores (Kroll et al., 1992; Medina et al., 1996). As observações macroscópicas realizadas em *Macrobrachium amazonicum* demonstraram a existência de cinco estágios ovarianos sendo eles os estágios de I a V considerando-se primeiramente o tamanho e a coloração dos ovários durante o seu amadurecimento. Características semelhantes foram relatadas por Chang e Shih (1995) para a espécie *Macrobrachium rosenbergii*, já para fêmeas de *Macrobrachium acanthurus* foram descritos quatro estágios de maturação ovariana (Carvalho e Pereira, 1981).

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 carotenóides (Charniaux-Cotton, 1980). Em *Macrobrachium amazonicum*, assim como em *Macrobrachium acanthurus* (Carvalho e Pereira, 1981), os ovários, a medida que amadurecem, apresentaram

coloração esverdeada. Já em *Macrobrachium rosenbergii* os ovários maduros apresentaram coloração alaranjada (Chang e Shih, 1995). A diferença de cor apresentada pelas espécies citadas se deve, ao tipo de carotenóide assimilado ser possivelmente espécie específico.

As observações microscópicas demonstraram a existência de cinco tipos celulares presentes nos ovários em diferentes estágios de maturação, em *Macrobrachium amazonicum*. Esses tipos celulares são: ovogônias, ovócitos pré-vitelogênicos, ovócitos em vitelogênese inicial, ovócitos em vitelogênese avançada e ovócitos maduros; também observadas por Chaves e Magalhães (1993) em *Macrobrachium amazonicum* coletados na natureza, e por Carvalho e Pereira (1981), em *Macrobrachium acanthurus*.

No estágio I do desenvolvimento ovariano de *Macrobrachium amazonicum* foram encontradas as ovogônias. Essas células apresentam características muito semelhantes às observadas em outras espécies de *Macrobrachium* como em *Macrobrachium rosenbergii* (Chang e Shih, 1995) e *Macrobrachium acanthurus* (Carvalho e Pereira, 1981). Estudos relacionados à maturação das células germinativas determinaram que as ovogônias se encontram na zona germinativa, ou zona de proliferação, do ovário (Browdy, 1989). Esta zona germinativa em *Macrobrachium amazonicum* foi observada na região central de cada metade ovariana. Estas observações diferem das características encontradas em *Penaeus setiferus* (King, 1948) e *Penaeus stylirostris* (Bell e Lightner, 1988) nos quais se observou a zona germinativa na região medial e ventral da cada lobo ovariano. Porém em *Penaeus indicus* notou-se a zona germinativa na região ventral e lateral dos ovários (Subrahmanyam, 1963). Desta forma, a localização da zona germinativa pode variar entre as espécies de Decápodos. Cumpre destacar que em ovários maduros de *Macrobrachium amazonicum* a zona germinativa não foi principalmente observada na região central do órgão mas sim em pontos dispersos do parênquima gonadal. Isso ocorreu provavelmente devido à pressão exercida pelo crescimento das células germinativas e pelo aumento do número de ovócitos maduros, proporcionando a dispersão da zona germinativa durante a maturação ovariana.

Em ovários de *Macrobrachium amazonicum* no estágio II de maturação observaram-se ovócitos pré-vitelogênicos com núcleo apresentando mais de um nucléolo. No entanto, Chaves e Magalhães (1993) descreveram a existência de um único nucléolo presente nos ovócitos pré-vitelogênicos desta mesma espécie. Estudos sobre a microscopia eletrônica de ovócitos pré-vitelogênicos de *Macrobrachium amazonicum* demonstraram características semelhantes às observadas em ovócitos de *Orchestia gammarella* (Charniaux-Cotton, 1980) e *Penaeus kerathurus* (Carvalho et al., 1998a). Nestas células de *Macrobrachium amazonicum* observou-se o desenvolvimento do retículo endoplasmático que, de acordo com Charniaux-Cotton (1980), promove o aumento dos elementos vesiculares no citoplasma. Em *Penaeus keraturus*, verificou-se que o retículo endoplasmático origina-se a partir de expansões do envelope nuclear e que contém pequenos grânulos em seu interior (Carvalho et al., 1998a). Esses grânulos também foram encontrados em peneídeos (Rankim e Davis, 1990) e para *Homarus americanus* (Schade e Schivers, 1980). Em *Macrobrachium amazonicum* observou-se padrão semelhante, onde os grânulos estavam presentes no interior de expansões do envelope nuclear sendo depois transferidos ao retículo endoplasmático. Desta forma, observa-se o início da vitelogênese endógena e o preparo do ovócito para a vitelogênese exógena a qual ocorrerá durante o amadurecimento celular. Observações semelhantes foram descritas para *Penaeus keraturus* em que os ovócitos pré-vitelogênicos iniciaram a vitelogênese endógena a partir da formação de um sistema de endomembranas composto pelo retículo endoplasmático associado ao complexo de Golgi (Carvalho et al., 1998a).

Os ovócitos em vitelogênese inicial foram comumente encontrados em ovários no estágio III de maturação de *Macrobrachium amazonicum*. Essas células apresentam vesículas corticais incolores e dispersas pelo citoplasma, semelhantemente ao que fora descrito para os ovócitos de *Macrobrachium rosenbergii* (Chang e Shih, 1995) e de *Pandalus kessleri* (Quinitio et al., 1989). Porém, o mesmo não ocorreu naquelas células ovocitárias de *Penaeus monodon* (Bell e Lingther, 1988), que exibiram hastes corticais ao invés de vesículas corticais. As vesículas corticais incolores de *Macrobrachium acanthurus* são consideradas de natureza fosfolipídica e apresentam grande importância após a fecundação devido ao seu envolvimento com a síntese de membranas celulares (Gomes et al., 1979).

Ainda no estágio III de maturação ovariana os ovócitos em vitelogenese inicial de *Macrobrachium amazonicum* se apresentaram envoltos por células foliculares. A presença de células foliculares também foi descrita em diversas espécies de Decápodos como *Macrobrachium rosenbergii* (Chang e Shih, 1995), *Penaeus Japonicus* (Yano e Chinzei, 1987) e *Callinectes sapidus* (Johnson, 1980). O papel das células foliculares ainda é discutido. O formato e o tamanho destas células estariam intimamente relacionados com a sua atividade biossintética (Chang e Shih, 1995). As células foliculares são fundamentais na captação de proteínas de vitelo para dentro dos ovócitos, nos crustáceos (Adiyodi e Subramoniam, 1983). Em *Penaeus japonicus* foi demonstrado que a vitelogenina pôde ser sintetizada nas células foliculares, secretadas na hemolinfa e captadas pelos ovócitos (Yano e Chinzei, 1987). Assim, pode-se sugerir que em *Macrobrachium amazonicum* as células foliculares apresentem atividade de síntese semelhante à encontrada em *Penaeus japonicus* (Yano e Chinzei, 1987). Isso ao fato de apresentarem alteração na forma e no tamanho, quando rodeiam ovócitos em diferentes estágios de maturação.

Ovócitos em vitelogenese inicial de *Macrobrachium amazonicum* exibiram células foliculares de aspecto cúbico e com alta atividade biossintética. Desta forma, a síntese de vitelogenina nas células foliculares (Yano e Chinzei, 1987) provavelmente esteja contribuindo para o acúmulo de vitelo no ovócito, uma vez que neste estágio de maturação ovariana observou-se o início da vitelogenese exógena de modo semelhante ao proposto para *Penaeus japonicus* (Yano e Chinzei, 1987). A vitelogenese exógena representa a mobilização de vitelogenina encontrada nas células foliculares e hepatopâncreas para os grânulos vitelínicos presentes no citoplasma dos ovócitos (Yano e Chinzei, 1987). Em *Macrobrachium amazonicum* a primeira fonte de vitelogenina exógena a ser disponibilizada para o ovócito originou-se das células foliculares. Neste estágio de maturação ovariana a participação do hepatopâncreas na vitelogenese exógena ainda não foi significativa, tendo em vista que neste momento encontrou-se o maior índice hepatossomático (IHS), o qual apresentava queda drástica apenas nos próximos estágio de maturação.

Ainda em relação aos ovócitos em vitelogenese inicial de *Macrobrachium amazonicum*, observou-se que essas células apresentaram grande número de

vesículas formadas por retículo endoplasmático rugoso contendo grânulos e material fibrilar. Em *Penaeus aztecus* e *Penaeus setiferus* não foram observadas vesículas oriundas do retículo endoplasmático rugoso (Duronslet et al., 1975). Já em *Penaeus kerathurus* (Carvalho et al., 1998b) e em outras espécies de peneídeos (Papathanassiou e King, 1984; Rankin e Davis, 1990; Yano et al., 1996) observou-se a presença de muitas vesículas de retículo endoplasmático rugoso no citoplasma dos ovócitos em vitelogênese inicial. Em *Penaeus kerathurus* o retículo endoplasmático rugoso apresentou padrão morfológico característico da espécie. Neste caso o retículo apresentava cisternas dilatadas que se anastomosavam por pontes denominadas “lamellae annulate” (Carvalho et al., 1998b). Entretanto, esse tipo de estrutura e mudanças morfológicas no retículo endoplasmático rugoso não foram observadas em *Macrobrachium amazonicum*. Nesta espécie foi frequente a coalescência de vesículas do retículo endoplasmático rugoso sem a formação das lamelas anulares nos ovócitos em vitelogênese avançada, característicos dos ovários em estágio IV de maturação gonadal ao invés de aparecer nos ovócitos em vitelogênese inicial.

Os ovários de *Macrobrachium amazonicum* em estágio IV de maturação apresentaram além das células citadas, ovócitos em vitelogênese avançada. Esta característica também é observada em *Macrobrachium rosenbergii* (Chang e Shih, 1995). Contudo em *Macrobrachium acanthurus*, observaram-se ovócitos em vitelogênese avançada a partir do estágio II de maturação ovariana (Carvalho e Pereira, 1981). Esta diferença na organização ovariana se deveu ao fato de *Macrobrachium acanthurus* apresentar desovas parceladas, ou seja, as desovas que ocorrem independente do estágio de maturação ovariana. Logo, *Macrobrachium acanthurus* apresenta várias desovas em um mesmo ciclo reprodutivo enquanto que *Macrobrachium amazonicum* (Chaves e Magalhães, 1993) e *Macrobrachium rosenbergii* (Chang e Shih, 1995) apresentam uma única desova, ou seja, uma desova total ocorrendo no mesmo ciclo reprodutivo.

Os ovócitos em vitelogênese avançada de *Macrobrachium amazonicum* foram caracterizados pela coalescência e vesículas do retículo endoplasmático rugoso, e pela deposição de vitelo em vesículas vitelínicas de diferentes elétrons-densidades, observadas na região central do citoplasma. Em *Penaeus kerathurus* as diferentes

elétron-densidades exibidas pelo conteúdo das vesículas vitelínicas estavam relacionadas ao grau de maturação do vitelo. As vesículas claras costumamente estão em início de maturação, enquanto as escuras contém vitelo maduro (Carvalho et al., 1998b).

Outro fato importante a ser considerado quanto às diferentes elétrondensidade das vesículas vitelínicas é a origem da vitelogenina, a qual é precursora do vitelo (Avarre et al., 2003; Lee e Chang, 1997). Essa origem pode ser endógena, quando ocorre a produção de vitelogenina no ovócito; exógena, quando essa produção é extra-ovocitária; ou ainda ocorrem ambas as origens (Kroll et al., 1992; Avarre et al., 2003). Quando a vitelogenina for de origem exógena provavelmente a sua maior produção ocorreria no hepatopâncreas (Tseng et al., 2001; Kung e tal., 2004). Neste caso a vitelogenina é secretada na hemolinfa e alcançará a superfície do ovócito, sendo estocada em vesículas citoplasmáticas (Avarre et al., 2003). Estas vesículas se fundirão com vesículas contendo vitelo de origem endógena, produzindo assim vesículas com diferentes elétrondensidades (Carvalho et al., 1998b). Tendo em vista os ovócitos em vitelogênese avançada de *Macrobrachium amazonicum* encontraram-se vesículas coalescidas do retículo endoplasmático rugoso e vesículas vitelínicas com diferentes elétrondensidades, sugerindo que a produção das vesículas vitelínicas de *Macrobrachium amazonicum* pudesse ser semelhante àquelas produzidas em ovócitos de *Penaeus kerathurus*.

No estágio V de maturação gonadal de *Macrobrachium amazonicum* encontraram-se principalmente ovócitos maduros com grande deposição de vitelo no citoplasma. Essa deposição de vitelo distribuída por todo o citoplasma dos ovócitos maduros também fora descrita para *Macrobrachium rosenbergii* (Chang e Shih, 1995), *Macrobrachium acanthurus* (Carvalho e Pereira, 1981) e *Pandalus kessleri* (Quinitio et al., 1989). Outra característica que os ovócitos maduros de diferentes espécies de crustáceos apresentam é a presença as vesículas lipídicas localizadas na periferia do citoplasma, constituindo a camada de alvéolo cortical (Goudeau e Lachaise, 1980; Goudeau, 1984; Bell e Lightner, 1988). Este tipo de deposição lipídica não foi encontrada aqui em *Macrobrachium amazonicum*, em *Macrobrachium rosenbergii* (Chang e Shih, 1995) e nem em *Macrobrachium acanthurus* (Carvalho e Pereira, 1981). Sugere-se que os alvéolos corticais, geralmente encontrados em

peneídeos, possuem a função de proteção ovocitária quando os ovos são lançados em ambiente marinho (Clark et al., 1980; Clark et al., 1990).

Em ovócitos maduros de *Macrobrachium amazonicum* observou-se a formação do córion como resultado da deposição de material amorfo na superfície externa da membrana plasmática. Esta estrutura é formada nos momentos finais da vitelogênese nos decápodos (Talbot, 1981). De acordo com Papathanassiou e King (1984) o córion ao ser formado torna-se uma camada contínua que separa o ovócito das células foliculares. Desta forma, no momento da ovulação, as células foliculares de *Penaeus monodon* e *Penaeus vannamei* (Kroll et al., 1992) se mantêm no ovário e participam do próximo ciclo reprodutivo. Assim, em *Macrobrachium amazonicum* provavelmente o córion desempenhe a função de manutenção das células foliculares no ovário tendo em vista o curto período de tempo observado entre um ciclo reprodutivo e outro. Cabe destacar que no estágio IV de maturação ovariana de *Macrobrachium amazonicum* foi observada uma queda drástica do IHS e o aumento significativo do IGS indicando a mobilização de reserva do hepatopâncreas para os ovários confirmando a significativa contribuição do hepatopâncreas para a vitelogênese exógena.

O ciclo reprodutivo de *Macrobrachium amazonicum* envolve as atividades inerentes ao ovário e ao hepatopâncreas. Estes dois órgãos trabalham de forma sincronizada estabelecendo o período de cada ciclo reprodutivo. O comprometimento do hepatopâncreas com a reprodução é melhor visualizado em animais a partir do estágio III de maturação ovariana.

O hepatopâncreas é uma glândula pertencente ao intestino médio que apresenta a função de metabolizar produtos de reserva energética (Garcia et al., 2002). Essa reserva é utilizada durante a maturação ovariana (Millamena e Pascual, 1990; Cavalli et al., 2001). Desta forma o conhecimento das células hepatopancreáticas é importante para o entendimento do processo reprodutivo em camarões. Existem cinco tipos celulares que compõem o epitélio secretor do túbulo hepatopancreático, as quais se distribuem ao longo do comprimento destes túbulos, conforme foi descrito para os demais decápodos (Al-Mohanna et al., 1985; Al-

Mohanna e Nott, 1989; Johnston et al., 1998; Souza e Petriella, 2000; Correa et al., 2002), e para *Macrobrachium amazonicum* (Franceschini-Vicentini et al., 2006).

Dentre os diferentes tipos de células estudadas no epitélio do hepatopâncreas de *Macrobrachium amazonicum* as células E são observadas somente na porção distal de cada túbulo secretor, de acordo com o proposto para alguns decápodos (Icely e Nott, 1992; Franceschini-Vicentini et al., 2006). As células E de *Macrobrachium amazonicum* mostravam núcleo grande, ocupando a maior parte do volume citoplasmático, e cromatina granulosa com alguns nucléolos bem evidentes. Essas características são típicas de células embrionárias (Vogt et al., 1985) e sugerem o envolvimento das células E na renovação de todos os tipos celulares que compõem o epitélio tubular (Icely e Nott, 1992). Isso de acordo com o que foi proposto para *Penaeus vannamei* (Caceci et al., 1988) e para *Homarus americanus* (Icely e Nott, 1992). Neste estudo, além das características morfológicas, observaram-se algumas figuras de mitose nas células E de *Macrobrachium amazonicum* indicando o seu provável envolvimento com a renovação do epitélio secretor do túbulo hepatopancreático, concordantemente com o proposto por Icely e Nott (1992).

Em *Macrobrachium amazonicum* as células F foram observadas em toda a extensão dos túbulos do hepatopâncreas, entretanto foram mais facilmente identificadas na porção distal, próximas às células E. Esta característica difere do que foi observado em *Penaeus semisulcatus* (Al-Mohanna e Nott, 1989) e em *Penaeus vannamei* (Caceci et al., 1988), que apresentaram células F apenas nas regiões proximal e medial dos túbulos hepatopancreáticos. Quanto a função desempenhada pelas células F de *Macrobrachium amazonicum*, o retículo endoplasmático rugoso e o complexo de Golgi observados com cisternas dilatadas justificavam a presença de intensa síntese de substâncias. Ademais, os vacúolos supranucleares observados em *Macrobrachium amazonicum* poderiam estar associados à liberação destas substâncias no lúmen do hepatopâncreas. Características semelhantes foram propostas para *Penaeus* sp. (Icely e Nott, 1992).

As células F de *Penaeus semisulcatus* (Al-Mohanna e Nott, 1989) e de *Astacus* sp. (Vogt et al., 1989) são responsáveis pela síntese de enzimas, e, as

cisternas dilatadas do complexo de Golgi estão intimamente relacionadas com a produção de vacúolos enzimáticos, utilizados durante as fases de digestão (Icely e Nott, 1992). Ressalta-se que em *Macrobrachium amazonicum* as células F apresentaram vesículas pinocitóticas no citoplasma apical. O acúmulo destas vesículas pinocitóticas altera a característica da célula F que passa a ser chamada de célula B. Esta transformação da célula F em célula B foi proposta também para *Penaeus semisulcatus* (Al-Mohanna e Nott, 1989). Acreditando-se ser o mesmo “modelo” válido para *Macrobrachium amazonicum*, aqui estudado.

Assim sendo, as células B observadas em *Macrobrachium amazonicum* principalmente nas regiões média e distal dos túbulos, diminuem a sua freqüência à medida que o túbulo secretor se aproxima do túbulo principal. Entretanto, Al-Mohanna e Nott (1989) verificaram a presença destas células na região média e proximal dos túbulos em *Penaeus semisulcatus*. As observações das células B em *Macrobrachium amazonicum* demonstraram núcleo adistrito à região basal e presença de grandes vacúolos supranucleares, além de inúmeras vesículas pinocitóticas encontradas na região apical das células. O conjunto das vesículas pinocitóticas foi denominado de complexo apical por Loizzi (1971). Este complexo apical é encontrado em *Penaeus vannamei* (Caceci et al., 1988) e em *Penaeus monodon* (Vogt et al., 1985). A presença de vesículas pinocíticas na região apical do citoplasma das células B de *Macrobrachium amazonicum* suporta a hipótese de que estas células possam absorver substâncias do lúmen hepatopancreático. Desta forma se propõem que as células B de *Macrobrachium amazonicum* sejam responsáveis pela digestão intracelular e conseqüente secreção apócrina de acordo com o proposto para *Penaeus semisulcatus* (Al-Mohanna e Nott, 1985a; Al-Mohanna e Nott, 1989). Uma vez que o produto dessa digestão soma-se ao produto da digestão extracelular ocorrida no lúmen do túbulo hepatopancreático, a assimilação destes nutrientes é realizada por outro tipo celular denominado de célula R (Al-Mohanna e Nott, 1987a).

A célula R, presente nos túbulos hepatopancreáticos de *Macrobrachium amazonicum* é o tipo celular mais observado, sendo facilmente visualizado nas regiões média e proximal dos túbulos. Fato semelhante também foi observado em *Penaeus semisulcatus* (Al-Mohanna e Nott, 1989) e em *Penaeus vannamei* (Caceci

et al., 1988). Análises referentes à microscopia eletrônica de transmissão revelam que a célula R de *Macrobrachium amazonicum* apresenta características absorptivas e de reserva. As características absorptivas são atribuídas à presença de microvilosidades na borda apical, associadas às mitocôndrias, e às características de reserva de nutrientes, sendo referentes ainda à presença de vacúolos supranucleares, similar ao observado em *Penaeus semisulcatus* (Al-Mohanna e Nott, 1987a). A reserva de nutrientes nas células R de *Macrobrachium amazonicum* pode ser a responsável pelo elevado índice hepatossomático (IHS) observado em animais com ovário no estágio III de maturação. Neste estágio, as células R provavelmente alcancem o nível máximo de acúmulo de reserva energética, e a partir desse estágio este material de reserva se mobiliza para os ovócitos em maturação. Este fato é justificado pela queda progressiva do IHS em fêmeas com ovários em estágio IV e em estágio V de maturação ovariana. O menor IHS encontrado em fêmeas com estágio V de maturação ovariana ocorre provavelmente quando a célula R já transferiu sua reserva para os ovócitos que se encontravam maduros. Atividade semelhante das células R foi proposta em *Penaeus semisulcatus* no qual estas reservas foram metabolizadas durante o ciclo reprodutivo (Al-Mohanna e Nott, 1987a).

O quinto tipo celular observado ao longo do túbulo hepatopancreático de *Macrobrachium amazonicum* é a célula M. Este tipo celular também foi observado em *Penaeus semisulcatus* (Al-Mohanna et al., 1985b; Al-Mohanna e Nott, 1987b; 1989) e em *Homarus americanus* (Icely e Nott, 1992). Entretanto não foi observado em *Penaeus vannamei* (Caceci et al., 1988), *Astacus astacus* (Vogt et al., 1989) e em *Palaemonetes argentinus* (Sousa e Petriella, 2000).

A célula M de *Macrobrachium amazonicum* apresentou acúmulo de substâncias, porém o seu ápice não atingiu o lúmen tubular e conseqüentemente não apresentou microvilosidades apicais e nem vesículas de pinocitose. Assim, o material acumulado poderia ser consequência da síntese intracelular ou ainda uma difusão a partir da hemolinfa, como foi proposto para *Penaeus semisulcatus* (Al-Mohanna et al., 1985b; Al-Mohanna e Nott, 1987b). O acúmulo de material provocou deformação no núcleo das células M de *Macrobrachium amazonicum*, que passa do tamanho grande e localizado no centro da célula para a forma alongada estando

deslocado para a periferia celular. Este comportamento também foi observado em *Penaeus semisulcatus* (Al-Mohanna et al., 1985b; Al-Mohanna e Nott, 1987b; Icely e Nott, 1992).

O material acumulado pela célula M pode estar envolvido com o processo do ciclo de muda do animal, conforme proposto em *Penaeus semisulcatus* (Al-Mohanna e Nott, 1987b). Nesta espécie o material acumulado é mobilizado para a hemolinfa e, conseqüentemente é transportado até os locais de síntese e desenvolvimento de novos tecidos, durante o período de muda. No entanto, a função da célula M permanece obscura e se tornam imperativas outras observações que esclareçam o seu envolvimento no ciclo de vida de *Macrobrachium amazonicum*.

Associando a correlação entre o ovário e o hepatopâncreas, a concentração de esteróides em *Macrobrachium amazonicum* é importante para o entendimento das mudanças ocorridas no animal durante o ciclo reprodutivo. Sabe-se que os hormônios esteróides participam do controle dos mecanismos de reprodução dos crustáceos (Quinitio et al., 1991; Subramoniam, 2000). A produção e a presença de esteróides na hemolinfa, hepatopâncreas e ovários de crustáceos tem sido alvo de muitos estudos devido a sua resposta fisiológica quanto à maturação ovariana (Yano, 1987; Couch et al., 1987; Quackenbush, 1994; Shih, 1997). Entretanto, muitos trabalhos demonstraram a capacidade dos crustáceos em produzir uma variedade de esteróides típicos dos vertebrados (Subramoniam, 2000). O autor descreveu que os esteróides apresentam características instáveis em suas concentrações durante os processos de maturação gonadal. Fêmeas de *Macrobrachium amazonicum* apresentaram variação na concentração dos esteróides estradiol, progesterona e testosterona nos ovários, hepatopâncreas e hemolinfa nos diferentes estágios de maturação gonadal.

O estradiol e a progesterona estão intimamente relacionados aos estágios de maturação ovariana de *Macrobrachium amazonicum*, enquanto a testosterona não mostra grande alteração durante o ciclo reprodutivo. Esta correlação hormonal também foi encontrada em *Penaeus monodon* (Quinitio et al., 1994) e em *Pandalus kessleri* (Quinitio et al., 1991). Com relação a testosterona, o seu envolvimento no ciclo reprodutivo provavelmente se deva ao fato de ser um hormônio precursor do estradiol na síntese bioquímica (Kanazawa e Teshima, 1971; Summavielle et al.,

2003; Martins et al, 2007). O estradiol e a progesterona apresentaram aumento significativo na sua concentração nos estágios I e II do ciclo de maturação ovariana que coincidiu com o início do período pré-vitelogênico. A partir desta fase, de acordo com as características morfológicas exibidas pelos ovócitos pré-vitelogênicos, iniciou-se a vitelogênese endógena, ou seja, observaram-se síntese e conseqüente acúmulo de vitelo no retículo endoplasmático rugoso. Processo semelhante também foi a descrita em Malacostracas (Chaniaux-Cotton, 1985; Chaniaux-Cotton e Payen, 1988) e em *Homarus americanus* (Couch et al., 1987). Desta forma, em *Macrobrachium amazonicum* faz-se necessária alta concentração de estradiol, tanto para o preparo dos ovócitos para as vitelogêneses endógena e exógena quanto para estimular a produção de vitelo no hepatopâncreas.

O estágio III de maturação ovariana de *Macrobrachium amazonicum* coincidiu com o início da vitelogênese exógena. Esta vitelogênese envolve a transferência de vitelo do hepatopâncreas para o ovário e conseqüentemente para dentro do ovócito. Neste estágio notou-se uma queda brusca na concentração de estradiol no ovário, hepatopâncreas e hemolinfa, coincidindo com o início da transferência de material de reserva do hepatopâncreas para os ovócitos em crescimento. O nível de estradiol cai progressivamente até o estágio V de maturação ovariana, enquanto o índice gonadossomático alcança os seus níveis mais altos. Assim, se sugere que o estradiol é fundamental durante as fases de síntese e armazenamento de vitelo, tanto nos ovócitos como no hepatopâncreas, não sendo necessário no momento da transferência de reserva do hepatopâncreas para o interior dos ovócitos.

Com relação à vitelogênese ainda foi observado que a progesterona em *Macrobrachium amazonicum* mostrou queda progressiva a partir do início da vitelogênese no estágio II de maturação ovariana. Ocorrência semelhante foi descrita em *Pandalus kessleri* (Quinitio et al., 1991). Segundo a literatura especializada a progesterona estimula o desenvolvimento do ovário no camarão de água doce *Parapenaeopsis hardwickii* (Kulkarni et al., 1979) e nos camarões marinhos *Metapenaeus ensis* (Yano, 1985) e *Penaeus stylifera* (Nagabhushanam et al., 1990). No entanto ainda não está bem estabelecido se a progesterona age no animal como promotor direto dos eventos reprodutivos, ou se seria convertida em

outro esteróide correlato necessário para o desenvolvimento ovocitário (Quinitio et al. (1991).

Caberia ressaltar que em crustáceos segundo Gunamalai et al. (2006), a síntese de estradiol e progesterona poderia estar ocorrendo nas células foliculares ovarianas sendo os hormônios liberados na hemolinfa visando alcançar o hepatopâncreas, e então estimular a síntese de vitelo e o metabolismo de lipídios. Todavia, em *Macrobrachium amazonicum* as células foliculares apresentaram características morfológicas de síntese somente a partir do estágio III de maturação ovariana, coincidindo com o momento de queda abrupta na concentração destes hormônios. Logo se sugere que a síntese de progesterona e estradiol em *Macrobrachium amazonicum* possa ser realizada por outro grupo celular, que apresente características tipicamente endócrinas. Não se descarta a hipótese do envolvimento das células R e B, presentes no hepatopâncreas, com a síntese desses hormônios durante o ciclo reprodutivo, face aos resultados aqui obtidos.

No momento da desova em *Macrobrachium amazonicum* os hormônios progesterona, testosterona e estradiol atingiriam os seus níveis mais baixos. Desta forma a desova poderia ser estimulada pela baixa concentração destes hormônios ou ainda por algum outro fator hormonal derivado do metabolismo destes esteróides, sendo desencadeante desse processo. É certo que sistema endócrino de crustáceos necessita de maiores investigações no sentido de se esclarecer a origem, natureza o mecanismo de ação dos hormônios esteróides atuantes durante o ciclo de vida do animal.

CONCLUSÕES

- ❖ As características morfológicas da distribuição das células germinativas em fêmeas de *Macrobrachium amazonicum* ao longo do ciclo reprodutivo comprovam o fato dos animais apresentarem uma única desova a cada ciclo reprodutivo;
- ❖ A presença do córion nos ovócitos maduros contribui para a manutenção das células foliculares nos ovários durante as desovas, devido ao rápido intervalo observado entre uma desova e o início de um novo ciclo reprodutivo;
- ❖ As características morfológicas dos ovócitos e a correlação entre os índices gonadossomáticos e hepatossomáticos ao longo do ciclo reprodutivo de *Macrobrachium amazonicum* indicam a presença de vitelogênese endógena e exógena;
- ❖ As células que constituem o túbulo hepatopancreático apresentam características morfológicas relacionadas às funções de digestão e assimilação de nutrientes, assim como a de reserva energética fundamental para os processos reprodutivos;
- ❖ O processo reprodutivo em *Macrobrachium amazonicum* é regulado por hormônios esteróides e necessita de altas concentrações de estradiol e progesterona no início do ciclo de maturação ovariana, e a necessidade de baixas concentrações desses hormônios para desencadear o mecanismo de desova.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Adiyod, R.G. e 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, p. 443-495.1983.
- Al-Mohanna, S.Y. e Nott, J.D. B-cells and ingestion in the hepatopancreas of *Penaeus semisulcatus* (Crustacea:Decapoda). *Journal of Marine Biological Association of the United Kingdon*, 66:403-414. 1986.
- Al-Mohanna, S.Y. e Nott, J.D. Function citology of the hepatopancreas of *Penaeus semisulcatus* (Crustacea: Decapoda) during the moult cycle. *Marine Biological*, 101:535-544. 1989.
- Al-Mohanna, S.Y. e Nott, J.D. M-“midget” cells and the moult cycle in *Penaeus semisulcatus* (Crustacea: Decapoda). *Journal of Marine Biological Association of the United Kingdon*, 67:803-813. 1987b.
- Al-Mohanna, S.Y. e Nott, J.D. R-cells and the digestion cycle in *Penaeus semisulcatus* (Crustacea: Decapoda). *Marine Biological*, 95:129-137. 1987a.
- Al-Mohanna, S.Y.; Nott, J.A.; Lane, D.J.W. M-“midget” cells in the hepatopancreas of the shrimp *Penaeus semisulcatus* de Haan 1844 (Crustacea:Natantia). *Crustaceana*, 48:260-268. 1985b.
- Al-Mohanna, S.Y.; Nott, J.A.; Lane, D.J.W. Mitotic E- and secretory F-cells in the hepatopancreas of the shrimp *Penaeus semisulcatus* (Crustacea:Decapoda). *Journal of Marine Biological Association of the United Kingdon*, 65:901-910. 1985a.
- Alves, M.I.M. Alimentação de *Macrobrachium amazonicum* (HELLER) em condições de laboratório. *Ciência Agrônômica*, Fortaleza.17(2):19-23. 1986.

Anilkumar, G. e Adiyodi, K.G. The role of eyestalk hormones in vitellogenesis during the breeding season in the crab *Paratelphusa hydrodromus* (Herbst). *Biological Bulletin*, 169:689-695. 1985.

Avarre, J.C.; Michelis, R.; Tietz, A.; Lubzens, E. Relationships between vitellogenin and vitellin in a marine shrimp (*Penaeus semisulcatus*) and molecular characterization of vitellogenin. *Biology of Reproduction*, 69:355-364. 2003.

Barreto, A. and A.M.C. Soares. Produção de pós-larvas de *Macrobrachium amazonicum* (Heller, 1962) (Decapoda: Palaemonidae), sob condições controladas de laboratório. *Rev. Brasil. Zool.* 1(1):51-53. 1982.

Bell, T.A. e Lightner, D.V. A handbook of normal penaeid shrimp histology. Baton Rouge, L.A. *World Aquaculture Society*. 1988.

Bialetzki, A.; Nakatani, K.; Baumgartner, G.; Bond, B. Occurrence of *Macrobrachium amazonicum* (Heller) (Decapoda, Palaemonidae). In: Leopoldo's inlet (Ressaco do Leopoldo), upper Paraná river, Porto Rico, Paraná, Brazil. *Revista Brasileira de Zoologia*, Curitiba, 14 (2): 379-390. 1997.

Bliss, D.E. Metabolic effects of sinus gland or eyestalk removal in the land crab, *Gecarcinus lateralis*. *Anatomical Record*, 111:502-503. 1951.

Bragagnoli, G. and M. Grotta. Reprodução do camarão de água doce *M. Amazonicum* (1862) nos açudes públicos do nordeste brasileiro. *Revista Nordestina de Biologia* 10(2):141-154. 1995.

Bridger, C.J. e Garber, A.F. Aquaculture escapement, implications and mitigation: the salmonid case study. In: COSTA-PIERCE, B. A. (ed) *Ecological Aquaculture The Evolution of The Blue Revolution*. Oxford, Blackwell Science Ltd., p. 77-102. 2002.

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*, p. 295-343, 1992.

Brunet, M.; Arnaud, J.; Mazza, J. Gut structure and digestive cellular processes in marine crustacea. *Oceanography and Marine Biology*, 32:335-367. 1994.

Caceci, T.; Neck, K.F.; Lewis D.H.; Sis, R.F. Ultrastructure of the hepatopancreas of the pacific white shrimp *Penaeus vannamei* (Crustacea:Decapoda). *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, 68:323-337. 1988.

Carlisle, D.B. e Knowles, F.G.W. Neurohaemal organs in crustaceans. *Nature*, 172:404-405. 1953.

Carvalho, F.; Souza, M.; Oliveira, E.; Cavalheiro, J.; Baldaia, L. Ultrastructure of oogenesis in *Penaeus kerathurus* (Crustacea, Decapoda). I Previtellogenic oocytes. *Journal of Submicroscopic Cytologic and Pathology*, 30(3):409-416. 1998a.

Carvalho, F.; Souza, M.; Oliveira, E.; Cavalheiro, J.; Baldaia, L. Ultrastructure of oogenesis in *Penaeus kerathurus* (Crustacea, Decapoda). II Vitellogenesis. *Journal of Submicroscopic Cytologic and Pathology*, 30(4):527-535. 1998b.

Carvalho, H.A e Pereira, M.C. Descrição dos estádios ovarianos de *Macrobrachium acanthurus* (WIEGMANN,1836) (CRUSTACEA, PALAEMONIDAE) durante o ciclo reprodutivo. *Ciência e Cultura*, 33(10):1353-1359. 1981.

Cavalli, R.O.; Menchaert, G.; Lavens, P.; Sorgeloos, P. Maturation performance, offspring quality and lipid composition of *Macrobrachium rosenbergii* females fed increasing level of dietary phospholipids. *Aquaculture*, 8:41-58. 2000.

Cavalli, R.O.; Montakan, T.; Lavens, P.; Sorgeloos, P. Variatons in lipid classes and fatty acid content in tissues of wild *Macrobrachium rosenbergii* (de Man) females during maturation. *Aquaculture*, 193:311-324. 2001.

Chang, C.F. e Shih, T.W. Productive cycle of ovarian development and vitellogenin profiles in the freshwater prawns, *Macrobrachium rosenbergii*. *Invertebrate Reproduction and Development*, 27(1):11-20. 1995.

Charneaux-Cotton, H. Découverte chez un Crustacé Amphipode (*Orchestia gammarella*) d'une glande endocrine responsable de la différenciation de caracteres sexuels primaires et secondaires mâles. *C. R. Acade. Sci.*, Paris, 239:780-782. 1954.

Charniaux-Cotton, H. e Payen, G. Reproduction in malacostraca crustacean. In: H. Laufer e R.G.H. Downer (eds), *Endocrinology of Selected Invertebrate Types. Invertebrate Endocrinology*, vol.2. A.R. Liss, New York, (NY) p. 279-303. 1988.

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. p. 177-186. 1980.

Charniaux-Cotton, H. Vitellogenesis and its control in malacostracan. *Crustacean Zoology*, 25: 197-206. 1985.

Chaves, P.T.C. e Magalhães, C.O. O desenvolvimento ovocitário em *Macrobrachium amazonicum* (Heller,1862) (Crustacea: Decapoda: Palaemonidae), camarão dulcícula da região amazônica. *Acta Amazonica*, 23:17-23. 1993.

Chim, L.; Kleinholz, L.H.; Payen, G.; Laubier-Bonichon, A. Effet inhibiteur d'un extrait de pédoncles oculaires de la Crevette mâle *Penaeus vannamei* Boone sur ler développement précoce de l'appareil genital du male épédonculé de *P. japonicus* Bate. *Compte Rendus Hebdomadaires de l'Académides Science*, 296, Ser. III:185-190. 1983.

Choy, S.C. Natural diet feeding habits of the crabs *Leocarcinus puber* and *L. hosatus* (Decapoda, Brachiura, portunidae). *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 31:87-99. 1986.

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*, 158:175-186. 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*, 178:295-299. 1990.

Corrêa Jr., 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*, 34(5):315-325. 2002.

Couch, E.R.; Hagino, N.; Lee, J.W. Changes in estradiol and progesterone immunoreactivity in tissues of the lobster, *Homarus americanus*, with developing and immature ovaries. *Comp. Biochem. and Physiol.(ParteA)*, 85:765-770. 1987.

Davant, P. Clave para la identificación de los camarones marinos y de río con importancia económica en el oriente de Venezuela. Cumana: Instituto Oceanografico/Universidade de Oriente. 113p. 1963.

Diesel, R. Sperm competition and reproductive success in the decapod *Inachus phalangium* (Majidae): A male ghost spider crab that seals off rival's sperm. *Journal of Zoology*, 220: 213-223. 1990.

Duronslet, M.J.; Yudin, A. I.; Wheeler, R.S.; Clark, W.H. Light and fine structure studies of natural and artificial induced egg growth of Penaeid shrimp. *Proc. World Maricult. Soc.*6, 105-122. 1975.

Factor, J.R. Development and metamorphosis of the digestive system of larval lobsters, *Homarus americanus* (Decapoda:Nephropidae). *Journal of Morphology*, 169:225-242. 1981.

Factor, J.R. e Naar, M. The digestive system of the lobsters, *Homarus americanus*: 1. Connective tissue of the digestive gland. *Journal of Morphology*, 184:311-321. 1985.

Factor, J.R. e Naar, M. The digestive system of the lobsters, *Homarus americanus*: 2. Terminal arterioles of the digestive gland. *Journal of Morphology*, 206:283-291. 1990.

Fairs, N.J.; Evershed, R.P.; Quinlan, P.T.; Goad, L.J. Detection of unconjugated and conjugated steroids in the ovary, hepatopancreas and hemolymph of the decapod crustacean, *Nephrops norvegicus*. *Gen. Comp. Endocrinol.* 4:199-208. 1989.

FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations). Yearbook of fishery statistics: summary tables. FAO, Roma (obtained by internet, <http://www.fao.org>). 2002.

FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations). Yearbook of fishery statistics: summary tables. FAO, Roma (obtained by internet, <http://www.fao.org>). 2004.

Fingerman, M. Glands and Secretion. *Microscopic Anatomy of Invertebrates Volume 10: Decapod Crustacea*, p. 345-394, 1992.

Fingerman, M. The endocrine mechanisms of crustaceans. *Journal of Crustacean Biology*, 7(1):1-24. 1987.

Franceschini-Vicentini, I.B.; Ribeiro, K.; Papa, L.P.; Marques Junior, J.; Vicentini, C.A. Histoarchitectural features of the hepatopancreas of the Amazon River prawn *Macrobrachium amazonicum*. *Anatomia, Histologia, Embryologia*, Alemanha (submetido). 2006.

Fyffe, W.E. e O'Connor, J.D. Characterization and quantification of a crustacean lipovitellin. *Comp. Biochem. Physiol.*, 48b:389-399. 1974.

Galois, R.G. Variations de la composition lipidique tissulaire au cours de la vitellogenese chez la crevette *Penaeus idicus* Milne Edwards. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 84:155-166. 1984.

Garcia, F.; González-Baró M.; Polero, R. Transfer of lipids between hemolymph and hepatopancreas in the shrimp *Macrobrachium borelli*. *Journal of General Physiology Online*, Lipids 37(6): 581-585. 2002.

Ghosh, D. e Ray, A.K. Subcellular action of estradiol-17 β in a freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii*. *General and Comp. Endocrinol.*, 90:274-281. 1993.

Gibson, R. e Barker, P.L. The decapod hepatopancreas. *Oceanografic Marine Biology Annual Revision*, 17:285-346. 1979.

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. *Bol. Fisiol. Animal*, Univ. S. Paulo, 3:23-31. 1979.

Goudeau, M. e Lachaise, F. Endogenous yolk as the precursor of a possible fertilization envelop in a crab (*Carcinus maenas*). *Tissue Cell*, 12: 503-512. 1980.

Goudeau, M. Fertilization in a crab. III. Cytodifferentiation of vesicle enclosing ring-shaped elements involved in the cortical reaction. *Gamete Res.*, 9:409-424. 1984.

Guest, W.C. Laboratory life history of the palaemonidae shrimp *Macrobrachium amazonicum* (Heller, 1962) (Decapoda: Palaemonidae). *Crustaceana* 37(32):141-152. 1979.

Gunamalai, V., Kirubagaran, R. and Subramoniam, T. Vertebrate steroids and the control of female reproduction in two decapod crustacean, *Emerita asiatica* and *Macrobrachium rosenbergii*. *Current Science* 90: 119-123. 2006.

Gurgel, J.J.S. e Matos, M.O.M. Sobre a criação extensiva do camarão-canela *M. amazonicum* (HELLER, 1862) nos açudes públicos do Nordeste brasileiro. In: 3^o SIMPÓSIO BRASILEIRO DE AQUICULTURA, São Carlos. *Anais...*p.295-311. 1984.

Hanström, B. Neue Untersuchungen über Ssinnesorgane und Nervensystem des Crustaceen. *II-Zoologische Jahrbücher Abteilung für Anatomie und Ontogenie der Tiere*, 56:387-520. 1933.

Hirsch, G.C. e Jacobs, W. Der Arbeitsrhythmus der Mitteldarmdrüse von *Astacus leptodactylus*. I. Teil: Methodik und Technik, 1928. In: Icely, J.D. e Nott, J.A. Digestion and Absorption: digestive system and associated organs. *Microscopic Anatomy of Invertebrates Volume 10: Decapod Crustacea*, p. 147-201, 1992.

Holthuis, L.B. A general revision of the Palemonidae (Crustacea, Decapoda, Natantia) of the America. II The subfamily palemonidae. *Occasional Papers, Allan Hancock Foundation*, 12: 1-396. 1952.

Huberman, A. Shrimp endocrinology. A review. *Aquaculture*, 191:191-208. 2000.

Icely, J.D. e Nott, J.A. Digestion and Absorption: digestive system and associated organs. *Microscopic Anatomy of Invertebrates Volume 10: Decapod Crustacea*, p. 147-201, 1992.

Ismael, D. e New, M.B. Biology. In: New, M.B. e Valenti, W.C. (eds). Freshwater Prawn Culture: The farming of *Macrobrachium rosenbergii*. *Blackwell Science*, Osney:Mead, Oxford, England, p. 18-39. 2000.

Jacobs, W. (1928) Untersuchungen über die Cytologie der Seretbildung in der mitteldarmdrüse von *Astacus leptodactylus*. In: Icely, J.D. e Nott, J.A. Digestion and Absorption: digestive system and associated organs. *Microscopic Anatomy of Invertebrates Volume 10: Decapod Crustacea*, p. 147-201, 1992.

Jeng, S.S.; Wan, W.C.; Chang, C.F. Existence of an estrogen-like compound in the ovary of the shrimp, *Parapenaeus fissures*. *Gen. Comp. Endocrinol.*, 36:211-214. 1978.

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

Johnston, D.S. e Alexander, C.G. Epithelial cytology and function in the digestive gland of *Thenus orientalis* (Decapoda, Scyllaridae). *Journal Crustacean Biology*, 18(12):271-278. 1998.

Kanazawa, A. e Teshima, S. In vivo conversion of cholesterol to esteróides hormones in the spiny lobster, *Panulirus japonicus*. *Bull. Japan Soc. Sci. Fish.*, 37:891-898. 1971.

Karnovsky, M.J. A formaldehyde glutaraldehyde fixative of high osmolarity for use in electron microscopy. *J. Cell. Biol.*, 27:137-152. 1965.

Kerr, M.S. The hemolymph proteins of the blue crab, *Callinectes sapidus*. II. A lipoprotein serologically identical to oocyte lipovitellin. *Dev. Biol.*, 20:1-17. 1969.

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*, p. 295-343, 1992.

Koller, G. Farbwechsel bei *Crangon vulgaris*. *Verh. Deutschen. Zool. Ges.*, 30:128-132. 1925. In: Kroll, R.M.; Hawkins, W.E. e Overstreet, R.M. Reproductive Components. *Microscopic Anatomy of Invertebrates Volume 10: Decapod Crustacea*, p. 295-343, 1992.

Koller, G. Überchromatophorensystem. Faarbensinn und Farabwechsel bei *Crangon vulgaris*. *Z. Vergl. Physiol.*, 5:191-246. 1927. In: Kroll, R.M.; Hawkins, W.E. e Overstreet, R.M. Reproductive Components. *Microscopic Anatomy of Invertebrates Volume 10: Decapod Crustacea*, p. 295-343, 1992.

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

Kulkarni, G.K.; Nagabhushanam, R.; Joshi, P.K. Effect of progesterone on ovarian maturation in a marine penaeid prawn, *Parapenaopsis hardwickii*. *Ind. J. Exp. Biol.*, 17:986-987. 1979.

Kung, S.Y.; Chan, S.M.; Hui, J.H.L.; Tsang, W.S.; Mak, A.; He, j.G. Vitellogenesis in the Sand Shrimp, *Metapenaeus ensis*: The Contribution from the Hepatopancreas-Specific Vitellogenin Gene (MeVg2). *Biology of Reproduction*, 71:863-870. 2004.

Laulier, M. Caracteres cytologiques the la cellule sexuelle femelle du crab *Carcinus maenas* L. au cours de la gametogênese. *Cah. Biol. Mar.*, 15:159-167. 1974.

Laulier, M. e Demeusy, N. Etude histologique du fonctionnement ovarien aucours d'une maturation de ponte chez le crab *Carcinus maenas* L. (Crustace, Decapode). *Cah. Biol. Mar.*, 15:343-350. 1974.

Lee , F.Y. e Chang, C.F. The concentrations of vitellogenin (vitellin) and protein in hemolinph, Ovary and Hepatopancreas in different ovarian stages of the freshwater prawn, *Macrobrachium rosebergii*. *Comp. Biochem physiology*, 147(4):433-439. 1997.

Lee, R.F. e Puppione, D.L. Lipoproteins I and II from the hemolimphy of the bleu crab *Callinectes sapidus*: Lipoprotein II associated with vitellogenesis. *J. Exp. Zool.*, 248:278-289. 1988.

Lehninger, A.L.; Nelson, D.L.; Cox, M.M. Princípios de Bioquímica. 2ªed. Sarvier, São Paulo, 905p. 1995.

Li, Q.; Osada, M.; Suzuki, T.; Mori, K. Changes in vitellin during oogenesis and effects of estradiol 17 β on vitellogenesis in the pacific oyster *Crassostrea gigas*. *Invertebr. Reprod. Dev.*, 33:87-93. 1998.

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

Lobão, V.L., E.A. Roverso and J.V. Lombardi. Influência da densidade inicial de estocagem no desenvolvimento de *Macrobrachium rosenbergii* (de man, 1879) e *Macrobrachium amazonicum* (Heller, 1962) (Decapoda: Palaemonidae) em laboratório. Bol. Inst. Pesca 21:11-17. 1994.

Lobão, V.L., N.E.T. Rojas, H.P. Barros, M. Lace, M.T. Horikawa and L.A.B.M Lula. Determinação da densidade adequada para larvicultura de *Macrobrachium amazonicum* (Heller, 1962) (Crustacea, Decapoda: Palaemonidae). Bol. Inst. Pesca 14:45-49. 1987.

Lobão, V.L., N.E.T. Rojas, M. Lace and M.F.S. Magalhães. Estudo populacional de *Macrobrachium iheringi* (Ortmann, 1897) (Decapoda, Palaemonidae) do Rio Buava – SP. Bol. Inst. Pesca 2(13):37-43. 1986.

Loizzi, R.F. Interpretation of crayfish hepatopancreatic function based on fine structural analysis of epithelial cell lines and muscle net works. *Z. Zellforsch. Mikrosk. Anat.*, 113:420-440. 1971.

Lovett, D.L. e Felder, D.L. Ontogeny of gut morphology in the white shrimp *Penaeus setiferus* (Decapoda, Penaeidae). *Journal of Morphology*, 201:253-272. 1989.

Magalhães, C. Filo Arthropoda, Subfilo Crustacea, Ordem Decapoda In: ISMAEL, D.; VALENTI, W.C.; ROCHA, O.; MATSUMURA-TUNDISI, T. (eds) Invertebrados Dulciaquícolas. São Paulo, FAPESP (volume 4 da coleção “Biodiversidade do Estado de São Paulo, Brasil: Síntese do conhecimento ao final do século XX”, organizada por Joly, C.A. e Bicudo, C.E.M.), p. 125-134. 1999.

Martins, J.J.; Ribeiro, K.; Rangel-Figueiredo, T.; e Coimbra, J. Reproductive cycle, ovarian development and vertebrate-type steroids profile in the freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii*. *Journal of Crustacean Biology*, 27(2): pp. à confirmar. 2007.

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*, 77:229-242. 1996.

Meusy, J.J. e Payen, G.G. Female reproduction in malacostracan crustácea. *Zool. Sci.*, 5:217-265. 1988.

Meusy, J.J. Vitellogenin, the extraovarian precursor of the protein yolk in Crustacean: A review . *Reprod. Nutr. Dev.*, 20:1-21. 1980.

Miao, W. e Ge, X. Freshwater prawn culture in China: an overview. *Aquaculture Asia*, 7:9-12. 2002.

Millamena, O.M. e Pascual, F.P. Tissue lipid content and fatty acid composition of *Peneaus monodon fabricus* broodstock from the wild . *Journal of the World Aquaculture Society*. 21:116-161. 1990.

Moraes-Riodades, P.M.C. e Valenti, W.C. Freshwater Prawn Farming in Brazilian Amazonia Shows Potential for Economic and Social Development. *Global Aquaculture Advocate*, Saint Louis, 4 (5):73-74. 2001.

Moraes-Riodades, P.M.C. Situação atual da criação de *M. amazonicum* no Brasil. In: *I CONGRESSO DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE AQUICULTURA E BIOLOGIA AQUÁTICA*, Vitória, *Anais...*p. 61. 2004.

Moraes-Riodades, P.M.C.; Valenti, W.C.; Peralta, A.S.; Amorim, M.D.L. Carcinicultura de água doce no estado do Pará: situação atual e perspectivas. In: *9º CONGRESSO BRASILEIRO DE ENGENHARIA DE PESCA e 1º CONGRESSO LATINO-AMERICANO DE ENGENHARIA DE PESCA*, 1999, Recife, *Anais*. Recife, AEP-PE, FAEP-BR. p. 598-604. 1999.

Myrick, C.A. Ecological impact of escaped organisms. In: Tomaso, J.R. (ed) *Aquaculture and the Environment in the United States*. Baton Rouge, U.S. Aquaculture Society, *A Chapter of the World Aquaculture Society*. p. 225-246. 2002.

Nagabhushanan, R.; Joshi, P.K.; Kulkarni, G.K. Induced spawning in the prawn *Parapenaeopsis stylifera* (H. Milne Edwards) using a steroid hormone 17 α -hydroxyprogesterone. *Ind. J. Mar. Sci.*, 9:227 1980.

Nagamine, C.M. e Knight, A.W. Development, maturation and function of some sexually dimorphic structures of the Malaysian prawn, *Macrobrachium rosenbergii* (De Man) (Decapod, Palaemonidae). *Crustaceana*, 39:141-152. 1980.

Nelson, K.; Heyer, B.; Johnson, E. Photoperiod-induced changes in female lobsters (*Homarus americanus*). *Comparative Biochemistry and Physiology*, 90b:809-821. 1988.

New, M.B. History and global status of freshwater prawn farming. In: New, M.B. e Valenti, W.C. (eds.) *Freshwater Prawn Farming: The Farming of *Macrobrachium rosenbergii**. Londres, *Blackwells*. p.1-11. 2000.

New, M.B. Status of freshwater prawn farming: a review. *Aquaculture Research*, Oxford, 26(1):1-54. 1995.

New, M.B.; D'Abramo, L.R.; Valenti, W.C.; Singholka, S. Sustainability of freshwater prawn culture. In: New, M.B. e Valenti, W.C. (eds.) *Freshwater Prawn Farming: The Farming of *M. rosenbergii**. Londres, *Blackwells*, p. 429-443. 2000.

Odinetz-Collart, O. and C. Magalhães. Ecological constraints and life history strategies of Palaemonid prawns in Amazonia. *Verh. Internat. Verein. Limnol.* 25:2460-2467. 1994.

Odinetz-Collart, O. and H. Rabelo. 1996. Variation in egg size of the freshwater prawn *Macrobrachium amazonicum* (Decapoda, Palaemonidae). *J. Crust. Biol.* 16(4):684-688.

Odinetz-Collart, O. e Moreira, L.C. Potencial pesqueiro do camarão *Macrobrachium amazonicum* na Amazônia Central (Ilha do Careiro). *Amazoniana*, Manaus, 12(3/4):399-413. 1993.

Odinetz-Collart, O. La pêche crevettière de *Macrobrachium amazonicum* (Palaemonidae) dans le Bas-Tocantins après la fermeture du barrage de Tucuruí. *Rev. Hydrobiol. Trop.*, 20(2):131-144. 1987.

Odinetz-Collart, O. Strategies de reproduction de *Macrobrachium amazonicum* en America central (Decapoda, Caridea, Palaemonidae). *J. Crust. Biol.* 14(2):280-288. 1991a.

Odinetz-Collart, O. Tucuruí dam and the populations of the prawn *Macrobrachium amazonicum* in the lower Tocantins (Pa-Brazil): a four year study. *Verh. Internat. Verein. Limnol.*, 25:2460-2467. 1991b.

O'Donovan, P.; Abraham, M.; Cohen, D. The ovarian cycle during the intermoult in ovigerous *Macrobrachium rosenbergii*. *Aquacultur*, 36:347-358. 1984.

Okumura, T. Perspectives on hormonal manipulation of shrimp reproduction. *Jarq.*, 38(1):49-54. 2004.

Oreczyk, G.P.; Caldwell, B.V.; Berman, H.R. In: Jaffe, B.M. e Behrman, H.R. (eds). *Methods of Hormone Radioimmunoassay*. Academic Press, New York, USA. 1974.

Panouse, J. Influence de l'ablation du pédoncle oculaire sur la croissance de l'ovarie chez la Crevette *Leander serratus*. *Comptes Rendus Hebdomadaires de L'Académie des Sciences*, 217:553-555. 1943. In: Kroll, R.M.; Hawkins, W.E. e Overstreet, R.M. Reproductive Components. *Microscopic Anatomy of Invertebrates Volume 10: Decapod Crustacea*, p. 295-343, 1992.

Panouse, J. L'action de la glande du sinus sur l'ovarie chez la Crevette *Leander*. *Comptes Rendus Hebdomadaires de L'Académie des Sciences*, 218:293-294. 1944. In: Kroll, R.M.; Hawkins, W.E. e Overstreet, R.M. Reproductive Components.

Microscopic Anatomy of Invertebrates Volume 10: Decapod Crustacea, p. 295-343, 1992.

Papathanassiou, E. e King, P.E. Effects of starvation on the fine structure of the hepatopancreas in the common prawn *Palaemon serratus* (Pennant). *Compendium of Biochemistry and Physiology*, 77A:243-249. 1984.

Passano, L.M. The X organ-sinus gland neurosecretory system in crabs. *Anatomical Record*, 111:502. 1951.

Perkins, E.B. Color changes in crustaceans, especially in *Palaemonetes*. *J. Exp. Zool.*, 50:71-105. 1928. In: Kroll, R.M.; Hawkins, W.E. e Overstreet, R.M. Reproductive Components. *Microscopic Anatomy of Invertebrates Volume 10: Decapod Crustacea*, p. 295-343, 1992.

Pillai, R.S. Studies on the shrimp *Caridina laevis* (Heller). 1. The digestive system. 1960. In: Icely, J.D. e Nott, J.A. Digestion and Absorption: digestive system and associated organs. *Microscopic Anatomy of Invertebrates Volume 10: Decapod Crustacea*, p.147-201, 1992.

Quackenbush, L.S. e Hernkind, W.F. Regulation of moult and gonadal development in the spyni lobster, *Panulirus argus* (Crustacean:Palinuridae): Effects of eyestalk ablation. *Comp. Biochim. Physiol.*, 69A:523-527. 1981.

Quackenbush, L.S. Lobster reproduction: a review. *Crustaceana*, 67:82-94. 1994.

Quinitio, E.T.; Hara, A.; Yamauchi, K.; Mizushima, T.; Fuji A. Identification and characterization of vitellin in a hermaphrodite shrimp, *Pandalus kessleri*. *Comp. Biochem. Physiol.*, 94B:445-451. 1989.

Quinitio, E.T.; Hara, A.; Yamauchi, K.; Nakero, S. Changes in the steroid hormone and vitellogenin levels during the gametogenic cycle of the giant tiger shrimp, *Penaeus monodon*. *Comp. Biochem. Physiol.*, 109C:21-26. 1994.

Quinitio, E.T.; Yamauchi, K.; Hara, A.; Fuji, A. Profiles of progesterone and estradiol like substances in the hemolymph of female *Pandalus kessleri* during an annual reproductive cycle. . *Gen. Comp. Endocrinol.*, 81:343-348. 1991.

Rani, K. e Subramoniam, T. Vitellogenesis in the mud crab *Scylla serrata*-an in vivo isotype study. *J. Crust. Biol.*, 17:659-665. 1997.

Rankin, S.M. e Davis, R.W. Ultrastructure of oocytes of the swrimp, *Penaeus vannamei*: Cortical specialization formation. *Tissue Cell.*, 22:879-893. 1990.

Reynolds, E.S. The use of lead citrate at high pH as an electron opaque stain in electron microscopy. *J. Cell. Biol.*, 17:208-212. 1963.

Rojas, N.E.T., V.L. Lobão and H.P. Barros. Métodos de manutenção de larvas de *Macrobrachium amazonicum* (Heller, 1962) (Crustacea, Decapoda: Palaemonidae). Bol. Inst. Pesca 17:15-26. 1990.

Romero, M.E. Preliminary observations on potential of culture of *Macrobrachium amazonicum* in Venezuela. Pages 411-416. In: NEW, M. B. (eds) Giant Prawn Farming. Amsterdam, Elsevier. 1982.

Sagi, A. e Ra'Anan, Z. Rapid identification of reproductive stat and the receptive period of female in pond populations of *Macrobrachium rosenbergii*. A new technique. *Aquaculture*, 48:361-367. 1985.

Scaico, M.A. Fecundidade e fertilidade de *Macrobrachium amazonicum* (Crustacea, Decapoda) de um açude do Nordeste brasileiro. Bol. Inst. Pesca 19:89-96. 1992.

Schade, M.L. e Shivers, R.R. Structural modulation of the surface and cytoplasm of oocytes during vitellogenesis in the lobster, *Homarus americanus*. An electron microscope-protein tracer study. *J. Morphol.*, 163:13-26. 1980.

Shih, J.T. Sex steroid-like substances in the ovaries, hepatopancreas and body fluids of female *Mictyres brevidactylus*. *Zoological Studies*, 36:136-145. 1997.

Souza, L.G. e Petriella, A.M. Histology of the hepatopancreas of the freshwater prawn *Palaemonetes argentinus* (crustacean, caridea). *Biocell*, 24(3):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.

Subramoniam, T. Crustacean ecdysteroids in reproduction embryogenesis. *Comp. Biochem. Physiol.*, 125C:135-156. 2000.

Summavielle, T.; Monteiro, P.R.R.; Reis-Henriques, M.A. e Coimbra, J. In vitro metabolism of steroid hormones by ovary and hepatopancreas of the crustacean penaeid shrimp *Marsupenaeus japonicus*. *Scientia Marina* 67: 299-306. 2003.

Takanashi, N. e Kanatani, H. Effect of 17β estradiol on growth of oocytes in cultured ovarian fragment of the starfish, *Asterina pectinifera*. *Dev. Growth Diff.*, 23:565-569. 1981.

Talbot, P. The ovary of the lobster. *Homarus americanus*. I. Architecture of the mature ovary. *J. Ultrastruct Res.*, 76:235-248. 1981.

Tan-Fermin, J.D. e Pudadera, R.A. Ovarian maturation stages of the wild giant tiger prawn, *Penaeus monodon* Fabricius. *Aquaculture*, 77:229-242. 1989.

Tata, J.R. e Smith, D.F. Vitellogenesis: A versatile model for hormonal regulations of gene expression. *Recent. Prog. Horm.*, 35:47-95. 1979.

Teshima, S. e Kanazawa, A. Variation in lipid composition during the ovarian maturation of the prawn. *Bull Jpn. Soc. Fish*, 49:957-962. 1983.

Tseng, D.Y.; Chen, Y.N.; Kou, G.H.; Lo, C.F.; Kuo, C.M. Hepatopancreas is the extraovarian site of vitellogenin synthesis in black tiger shrimp, *Penaeus monodon*. *Comp. Biochem. Physiol.*, 129A: 909-917. 2001.

Valenti, W.C. Carcinicultura de água doce como agronegócio. In: *I CONGRESSO DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE AQUICULTURA E BIOLOGIA AQUÁTICA*, Vitória, Anais... p. 52. 2004.

Valenti, W.C. Carcinicultura de água doce no Brasil: mitos, realidade e perspectivas. In: *CONGRESSO SUL-AMERICANO DE AQUICULTURA, 1º SIMPÓSIO BRASILEIRO DE AQUICULTURA, 10º SIMPÓSIO BRASILEIRO SOBRE CULTIVO DE CAMARÃO*, Recife, Recife, ABRAQ, Anais... p. 199-206. 1998.

Valenti, W.C. Criação de Camarões em Águas Interiores. São Paulo, FUNEP, 81p. 1996.

Valenti, W.C. Cultivo de Camarões em Água Doce. São Paulo, Nobel, 82p. 1985.

Valenti, W.C. Freshwater prawn culture in Brazil. *World Aquaculture Society*, Baton Rouge, 24 (1):29-34. 1993.

Valenti, W.C. Situação atual, perspectivas e novas tecnologias para a produção de camarões de água doce. In: *XII Simpósio Brasileiro de Aqüicultura*, Goiânia. Anais: Associação Brasileira de Aqüicultura. p.99-106. 2002.

Valenti, W.C.; Franceschini-Vicentini, I.B.; Pezzato, L.E. The potential for *Macrobrachium amazonicum* culture. In: *WORLD AQUACULTURE 2003 SALVADOR, BRAZIL, "REALIZING THE POTENTIAL: RESPONSABLE AQUACULTURE FOR A SECURE FUTURE"*, realizado no período de 19 a 23 de maio de 2003, na cidade Salvador, Bahia, Anais... p.804. 2003.

Van Beek, E. e De Loof, A. Radioimmunological determination of concentrations of six C₂₁, C₁₉ and C₁₈. Steroids during the reproductive cycle of female *Artemia* sp. (Crustacea:Anostraca). *Comp. Bioch. Physiol.*, 89A:595-599. 1988.

Verdi, A.C. Ciclo anual de reproducción del camarón dulceacuícola *Macrobrachium borelli* NOBILLI, 1896) (Crustacea, Caridea, Palaemonidae). *Revista Brasileira de Biologia*, 3(56):561-568. 1996.

Vogt, G. Histologie und Cytologie der Mitteldarmrüse von *Penaeus monodon* (Decapoda). 1985. In: Icely, J.D. e Nott, J.A. Digestion and Absorption: digestive system and associated organs. *Microscopic Anatomy of Invertebrates Volume 10: Decapod Crustacea*, p. 147-201, 1992.

Vogt, G. Transformation of the anterior midgut and hepatopancreas cells by Monodon baculovirus (MBV) in *Penaeus monodon* postlarvae. *Aquaculture*, 107:239-248. 1992.

Vogt, G.; Stocker, W.; Quintio, E.T.; Pascual, F.P. Midgut gland as monitor organ for nutritional value of diets in *Penaeus monodon* (Decapoda). *Aquaculture*, 48:1-12. 1985.

Vogt, G.; Stocker, W.; Zwillig, R. Biosynthesis of *Astacus* proteases: a digestive enzyme from crayfish. *Histochemistry*, 91:373-381. 1989.

Wallace, R.A.; Walker, S.L.; Hauschka, P.V. Crustacean lipovitellin isolation and characterization of major highly-density lipoprotein from the eggs of decapods. *Biochemistry*, 6:1582-1590. 1967.

Wallace, C.M. e Selman, K. Cellular and dynamic aspects of oocytes growth in teleost. *Am. Zool*, 21:335-343. 1981.

Warrier, S.R.; Tirumalai, R.; Subramoniam, T. Occurrence of vertebrate steroids, estradiol 17 β and progesterone in the reproducing females of the multi crab *Scylla serrata*. *Comp. Bioch. Physiol.*, Part A 130:283-294. 2001.

Yano, I. e Chinzei, Y. Ovary is the site of vitellogenin synthesis in kuruma prawn, *Penaeus japonicus*. *Comp. Biochem. Physiol.*, part B. 86:213-218. 1987.

Yano, I. e Itakura, N. In: Proceedings and Abstracts of Fourth International Crustacean Congress, Amsterdam, August, p. 81A. 1998.

Yano, I. Effect of 17-hydroxy progesterone on vitellogenin secretion in kuruma prawn *Penaeus japonicus*. *Aquaculture*, 61:49-57. 1987.

Yano, I. Induced ovarian maturation and spawning in greasyback shrimp, *Metapenaeus ensis*, by progesterone. *Aquaculture*, 47:223-229. 1985.

Yano, I. Oocyte development in the kuruma prawn *Peneaus japonicus*. *Mar Biol.*, 99:547-553. 1988.

Yano, I.; Krol, R.M.; Overstreet, R.M. e Hawkins, W.E. Route of egg yolk protein uptake in the oocytes of kuruma prawn, *Penaeus japonicus*. *Mar. Biol.*, 125:773-781. 1996.

Zerbib, C. Étude ultrastuctural de l'ovocyte en vitellogenèse chez les écrevisses. *Astacus astacus* et. *A. Leptodactylus*. *Int. J. Invert. Reprod.*, 1:289-295. 1979.