

Fernando José Martins de Oliveira Carvalho

REPRODUÇÃO DE CRUSTÁCEOS PENEÍDEOS

Endocrinologia e Ultraestrutura da Ovogénese

Dissertação de candidatura ao grau de Doutor em
Ciências Biomédicas apresentada ao Instituto de Ciências
Biomédicas de Abel Salazar da Universidade do Porto

Laboratório de Fisiologia

Dep. Imuno-Fisiologia e Farmacologia

ICBAS - UP

Porto, 1997

À minha família,
à Madalena e Isabel

Agradecimentos

Esta prova foi realizada, quase na totalidade, no ICBAS. Tendo iniciado os meus estudos universitários no primeiro curso deste Instituto, e fazendo parte também dos primeiros licenciados do curso de Ciências do Meio Aquático, não posso deixar de lembrar dois nomes que para mim serão para sempre sinónimo de ICBAS: o Prof. Corino de Andrade e o Prof. Nuno Grande. Por constituírem referências de humanismo e tenacidade que moldaram esta Escola, o meu reconhecimento.

Desde o início da minha carreira académica no ICBAS em 1982, como monitor no Laboratório de Fisiologia e até à conclusão das Provas de Aptidão Pedagógica e Actividade Científica em 1989, trabalhei sob a responsabilidade do Prof. João Coimbra. Recordo com saudade este período, ainda marcado pela instabilidade e indefinição que faziam apelo à capacidade de improvisação de cada um. Ficou a lembrança de um tempo de "carolice", de "desenrascanço" mas também de amizade, de trabalho de grupo, de entusiasmo e de determinação na defesa dos valores em que acreditamos. Embora "os tempos sejam outros" obrigado Prof. Coimbra pela amizade ao longo de todos estes anos.

Acabadas as referidas provas em 1989, e depois de uma breve mas muito positiva experiência como membro do Conselho Directivo do ICBAS, assisto à divisão do laboratório de Fisiologia em dois: de um lado a Fisiologia Aplicada e de outro a Fisiologia Geral. A chefiar este último laboratório, o Prof. Luís Baldaia, recém chegado de Paris onde realizou a sua tese de doutoramento, aceitou, a meu pedido, ser o responsável pela minha tese de doutoramento, no âmbito de um projecto de investigação financiado pela JNICT, que deu início em 1991. Agradeço-lhe ter assumido esse compromisso e ao longo destes anos o seu apoio solidário e a sua crítica inteligente, e principalmente a sua sólida amizade. Durante estes anos que tenho trabalhado no Laboratório de Fisiologia Geral, o apoio profissional (quer na docência quer na investigação), o carinho constante e o espírito de

equipa demonstrados pelos técnicos Sr José Andrade e M^a do Natal tornaram possível e agradável a realização deste trabalho. Como em todos os laboratórios, a pessoa responsável pela limpeza dos materiais, merece uma palavra de reconhecimento: o meu obrigado D. Dores. Ao elemento mais "novo" no nosso laboratório, o Prof. António Rocha, estou muito grato pelas ajudas nas traduções que normalmente resultavam em discussões científicas profundas que muito me ajudaram na "leitura" dos resultados experimentais.

Como referi, este trabalho foi realizado no âmbito de um projecto de investigação (Reprodução de Crustáceos Peneídeos) sob a responsabilidade do Prof. Luís Baldaia. Este projecto contou com a participação dos elementos do laboratório de Química, Prof. Magalhães Cardoso e Eng^a Amélia Cortez. Sob a responsabilidade e orientação do Prof. Magalhães Cardoso, partilhei com a Eng^a Amélia um longo percurso de desenvolvimento de técnicas de extracção, purificação, separação e quantificação de hormonas esteróides desde a montagem do aparelho de HPLC até à validação das técnicas por nós desenvolvidas. O exemplo de profissionalismo, de método, de rigor sempre acompanhados por um profundo e sentido humanismo, demonstrado ao longo destes anos pela Eng^a Amélia Cortez, permitiu-me de facto a realização deste trabalho com o elevado bônus da sua querida amizade. Para sempre obrigado, Amélia. A importância do apoio moral e a amizade pessoal que faz suportar os momentos "menos bons", senti-a muitas vezes no laboratório de Química: Luís, Júlia e Augusta obrigado pelas "descompressões".

Ainda como aluno finalista do curso de Ciências do Meio Aquático iniciei os primeiros passos na investigação no laboratório de Biologia Celular, dirigido pelo Prof. Carlos Azevedo. O valor da organização e rigor, ligado à elevada produção científica, tornaram-se, para mim, exemplos sólidos essenciais à carreira académica. Reconheço, agradecidamente, as facilidades e a atenção que desde esse tempo até hoje mereci do Prof. Carlos Azevedo. Mais recentemente, agradeço-lhe a autorização para, sob a orientação do Prof. Mário Sousa, executar no seu laboratório a parte desta tese relativa aos estudos

ultraestruturais. Ao Prof. Mário Sousa estou profundamente agradecido pela orientação, participação, discussão e crítica com que sempre acompanhou o trabalho (sobre a ultraestrutura da ovogénese) e a forma entusiástica com que encara o processo investigativo em curso. As perspectivas de investigação abertas pelos resultados neste trabalho são o reflexo desta dinâmica criada pelo trabalho em equipa com a já referida liderança: à Elsa Oliveira e ao João Carvalheiro a minha gratidão pelo vosso trabalho, pela vossa dedicação e interesse e acima de tudo pela vossa amizade. Agradeço também ao Prof. Alexandre Cunha por me ter demonstrado sempre a sua disponibilidade para, na sua área de especialidade, resolver qualquer dúvida.

No laboratório de Anatomia, para além da grande amizade que me une a todos sem excepção, realço e agradeço a participação "mais activa" neste trabalho do meu amigo e compadre Joaquim Duarte (pelas "linhas de força" na estética da capa) e ao José Aurélio nas várias tentativas de melhorar fotograficamente as peças "menos fotogénicas". Neste trabalho, de fotografia e artes gráficas, contei igualmente com a "mão profissional" do Dr. Abel Roldão, Sr. Gonçalves, na Iconografia, do Sr. Anselmo Carraça e D. Teresa no Desenho, e do Dr. Bento Sousa, Dr. Rui Claro e da Cristina Abreu na Informática.

Como referi no início desta secção, este trabalho foi realizado quase na totalidade no ICBAS. No entanto, o acolhimento e apoio recebido no Instituto de Acuicultura Torre de la Sal, superiormente dirigida pelo Doutor Francisco Amat (a quem estou agradecido), permitiu-me conhecer e trabalhar com o investigador espanhol que há mais anos trabalha com peneídeos: o Dr. José Maria San Feliú Lozano. Autor de várias dezenas de trabalhos científicos (incluindo o livro "La Acuicultura Marine en la Comunidad Valenciana", 1987), o Dr. San Feliú representa, para mim, um exemplo do biólogo romântico que descreve a vida com paixão, do biólogo expedicionário, do biólogo humanista e do homem de fé, que para além da crença tem compreendido o mundo. A grande admiração que tenho por este cientista resultou numa profunda amizade aumentada a cada encontro.

Através do Dr. San Feliú e do seu colaborador Dr. Manuel Rédon foi possível estudar a espécie *Penaeus kerathurus*: nos últimos três anos, durante a época reprodutiva dos camarões, permaneci cerca de duas semanas no Instituto de Acuicultura Torre de la Sal onde, para além da aquisição de animais e o início da preparação das amostras, encontrei os interlocutores adequados para frutuosas discussões sobre o tema que nos unia, a reprodução de crustáceos. A participação pontual de vários elementos daquele Instituto no meu trabalho, bem como a simpatia e amizade ali sentida, nunca será esquecida. Obrigado a todos pela vossa amizade.

Os animais da espécie *Penaeus japonicus* utilizados neste trabalho foram fornecidos pela empresa algarvia Eurodáqua, através da Dra. Isabel Arrobas, investigadora do IPIMAR, e uma das maiores especialistas de camarões em Portugal. Pela sua disponibilidade, pelos seus conselhos e, principalmente, pela sua simpatia e amizade, os meus agradecimentos.

O sentido de gratidão que acompanha este momento é potenciado pela recordação de uma vivência que transcende o trabalho restrito desta tese. Ela é também fruto de uma experiência anterior, que no meu caso teve os mesmos intervenientes: fui aqui no ICBAS o estudante universitário, o monitor recompensado, o assistente estagiário, o doutorando no percurso da carreira académica. Coincidente com esta experiência pessoal, o próprio percurso de uma Escola nova, com cursos novos e de características inéditas no panorama do ensino universitário. Neste contexto, sinto dever mostrar a minha gratidão a todos quantos comigo fizeram esta caminhada e com ela fomos alicerçando as amizades que são a "alma" desta nossa Escola.

Uma palavra de especial apreço pelo carinho e amizade demonstrado pelos Professores Arala Chaves e Arnaldo Videira, que em tertúlias informais muito me estimularam na finalização deste trabalho.

A todos os meus amigos "não-biomédicos", pelos bons momentos que juntos passamos, pelo apoio e carinho constante, e a todos aqueles cuja amizade ultrapassa ausências, o meu agradecimento. Uma palavra especial para o meu amigo Gaspar, ilustre artista gaiense, pelas tertúlias, pelas calorosas discussões, pelo apoio sempre presente e pelos conselhos estruturais e estéticos na linguagem e na forma.

Finalizo com um agradecimento profundo às "bases": ao imutável pano de fundo familiar (pais, irmãos e avó), pelo sentimento de protecção e apoio, e à minha filha Madalena pela recompensa do amor mágico que faz de mim pai (e mais filho). À minha companheira Isabel, as palavras para exprimir a gratidão que sinto esgotam-se num turbilhão de sentimentos profundos que deixam na sua passagem uma admiração inabalável e um amor crescente. Para sempre obrigado.

ÍNDICE

	página
INTRODUÇÃO GERAL	5
MATERIAL BIOLÓGICO	51
PARTE I – MORFOLOGIA	59
CAPÍTULO 1 – <i>Identificação das Fases de Desenvolvimento do Ovário das</i> <i>Espécies de <u>Penaeus japonicus</u> e <u>P. kerathurus</u></i>	61
Introdução	63
Material e Métodos	70
Resultados e Discussão	76
CAPÍTULO 2 – <i>Ultraestrutura do Ovócito. Estudo dos Aspectos Ultraestruturais</i> <i>da Ovocénese em <u>Penaeus kerathurus</u></i>	113
Introdução	115
Material e Métodos	120
Resultados	122
Discussão	129
PARTE II – ENDOCRINOLOGIA	179
CAPÍTULO 3 – <i>Extração e Purificação Simultânea de Ecdisteróides</i> <i>e Esteróides Sexuais. Validação do Método</i>	181
Introdução	183
Material e Métodos	184
Resultados	196
Discussão	209

CAPÍTULO 4 – <i>Perfil de Ecdisteróides ao Longo das Fases de Desenvolvimento do Ovário das Espécies <u>Penaeus japonicus</u> e <u>P. kerathurus</u>.....</i>	213
Introdução	215
Material e Métodos	219
Resultados	225
Discussão	237

CAPÍTULO 5 – <i>Hormonas Esteróides no Ovário de <u>Penaeus japonicus</u>. Perfil de Progesterona ao Longo das Fases de Desenvolvimento do Ovário das Espécies <u>Penaeus japonicus</u> e <u>P. kerathurus</u>.....</i>	245
Introdução	247
Material e Métodos	248
Resultados	251
Discussão	258

PARTE III – DIETA VIVA DE MATURAÇÃO	261
--	------------

CAPÍTULO 6 – <i>Presença de Ecdisteróides e Esteróides Sexuais em Poliquetas Utilizadas em Aquacultura para a Indução da Maturação Ovárica de Fêmeas em Cativeiro.....</i>	263
Introdução	265
Materiais e Métodos	266
Resultados	267
Discussão	270

DISCUSSÃO GERAL E PERSPECTIVAS FUTURAS	275
---	------------

RESUMO	281
---------------	------------

RESUME	285
---------------	------------

ABSTRACT	289
-----------------	------------

Introdução Geral

Importância Económica dos Crustáceos em Aquacultura

Em 1984 o volume dos productos extraídos do meio aquático foi de cerca de 83 milhões de Ton., dos quais 3/4 correspondem a peixes (Laubier, 1987). Dez anos depois, este valor aumentou para 110 milhões de Ton., sendo 77 milhões de Ton. destinados directamente ao consumo humano. Este valor, que triplicou nos últimos 35 anos (em 1960 foi de 26 milhões de Ton.), conta actualmente com 25% proveniente da aquacultura. Esta actividade é também responsável pelo aumento de 2 milhões de Ton. verificado entre 1993 e 1994 (FAO, Fisheries Department, 1997).

Projecções para a produção pesqueira mundial efectuadas pela FAO, para o ano 2010 apontam para uma produção total de de 107 a 144 milhões de Ton., das quais 30 a 33 milhões de Ton. se destinam a farinhas e óleos, ficando para consumo humano entre 74 a 114 milhões de Ton., dos quais 27 a 39 milhões de Ton. serão provenientes da aquacultura.

Entre os invertebrados, os crustáceos e os moluscos constituem os dois principais recursos. A maior parte dos crustáceos explorados pertencem à sub-classe Malacostraca, com duas excepções principais, de produção negligível- Brachiopoda (*Artemia*) e Cirripídea (o percebe, *Pollicipes cornucopia*) (figura1).

Das três ordens de Malacostraca exploradas - Estomatopoda, Eufausiácea e Decápoda, esta última contribui, só por si, com mais de 90% das capturas mundiais de crustáceos. Os camarões, representando cerca de 65% das capturas totais de decápodes, englobam dois grupos muito distantes, filogenética e sistematicamente: Caridea e Penaeidea (figura 2) (Laubier, 1987; Laubier e Laubier, 1993).

Os valores de captura de crustáceos mostram ter sido alcançado o seu nível óptimo de exploração (e algumas mesmo em sobre-exploração) o que juntamente com o aumento da sua procura por parte de países industrializados e de alto nível da vida (U.S.A. e Japão) explica a importância actual da produção em aquacultura destas espécies (Laubier, 1987; Lee e Wickins, 1992).

PHYLUM	CLASSE	SUB-CLASSE	ORDEM	
Arthropoda	Crustacea	Malacostraca —	Decapoda	
		Chelicerata	Bathynellacea	
		Uniramia	Anaspidacea	
		Pentastomida	Ostracoda	Stomatopoda
			Mystacocarida	Thermosbaenacea
			Copepoda	Spelaeogriphacea
			Branchiura	Mysidacea
			Cirripedia	Cumacea
			Tanaidacea	
			Isopoda	
			Amphipoda	
			Euphausiacea	
			Amphionidacea	
Nebaliaceae				

Figura 1. Divisão sistemática da classe Crustacea, segundo Parker (1992).

Ordem	Sub-ordem	Secção	Família	Género	Nome vulgar
Decapoda	Natantia —	Penaeidea —	Penaeidae —	Penaeus	camarão
		Caridea —	Palaemonidae —	Metapenaeus	lagostins
	Pandalidae —			Pandalus	
	Reptantia —	Macrura —	Astacidae —	Astacus	lagostins
			Cambaridae —	Cherax	
			Parastacidae —	Pacifastacus	
		Nephropidae —	Homarus	lavagante	
			Palinuridae —		Panulirus
	Braquiura —	Portunidae —	Portunus	caranguejo	

Figura 2. Classificação dos crustáceos utilizados em aquacultura. (Adaptado de Adiyodi e Adiyodi, 1970; Parker, 1982; Lee e Wickins, 1992).

A cultura de crustáceos aumentou cerca de 7 vezes entre 1975 e 1983 (Lumare, 1986). A aquacultura de peneídeos atingiu em 1983 entre 75 a 120 mil toneladas, repartidas essencialmente pela Ásia e América do Sul e com uma pequena contribuição da América Central. Uma previsão realizada em 1987 no Equador, um país com elevada potencialidade neste domínio, apontava para o ano de 1990 uma produção mundial de 150 a 300 mil toneladas de peneídeos (Laubier, 1987). De facto, em 1990, mais de 20% do consumo mundial de crustáceos (2,8 milhões de Ton.), ou seja cerca de 600 mil Ton., foi proveniente da produção em aquacultura (Lee e Wickins, 1992), sendo a maioria camarões marinhos e de águas salobras na região do sudoeste asiático e Equador (tabela 1). Em 1991, a produção em aquacultura de crustáceos foi de cerca de 700 mil Ton., das quais mais de 600 mil foram de camarões peneídeos (Laubier e Laubier, 1993). Em 1995, a produção em aquacultura atingiu 27% do mercado de consumo, produzindo mais de 700 mil toneladas cultivadas numa área de cerca de 1,14 milhões de hectares, o que representa uma produtividade média de 625Kg/ha/ano (World Shrimp Farming, 1995). O estado actual da produção mundial de crustáceos e as perspectivas para o futuro desta actividade estão detalhadamente expostas numa revisão de Laubier e Laubier (1993).

Tabela 1. Estimativas de produção de crustáceos (Ton. x 1000) de pesca e de aquacultura. (Adaptado de Lee e Wickins, 1992).

Grupo/Espécie	Pesca (1988)	Aquacultura (1988-90)
Camarões marinhos (ex. <i>Penaeus japonicus</i>)	2500	663
Lagostins de água doce (ex. <i>Macrobrachium rosenbergii</i>)	48.5	19.4
Lagostins de água doce (ex. <i>Astacus astacus</i>)	100	32.3
Lavagantes (ex. <i>Homarus gammarus</i>)	64.5	0
Lagostas (ex. <i>Panulirus spp.</i>)	78.6	0.049
Outras "Lagostas" (ex. <i>Nephrops</i> , Scyllaridae)	80.7	0
Caranguejos (ex. <i>Portunus triturbiculatus</i>)	1048	7
<i>Artemia</i>	4	0.35

Principais Países Produtores e Níveis de Produção Actual

Os crustáceos mais utilizados em aquacultura são o palaemonídeo *Macrobrachium rosenbergii*, que é um camarão de água doce (embora a reprodução e fases larvares se realizem em água salobra), de grandes dimensões, originário da região Indo-Pacífica (em 1991, produção de 25.970 Ton.), e os peneídeos (em 1991, produção de 690.100 Ton.). Com particular incidência no Sudoeste Asiático, o cultivo de crustáceos de água doce como o *M. rosenbergii* constitui apenas 5% da produção global de crustáceos (New, 1990).

Desenvolvendo-se nas regiões tropicais e sub-tropicais, o peneídeo *Penaeus monodon*, conhecido por camarão tigre, é produzido na Formosa, Filipinas e outros países do Sudeste Asiático. Na Ásia, a produção total de peneídeos em 1991 foi de 556.500 Ton., sendo os principais países produtores a China, Indonésia e Tailândia e de 558.000 Ton. em 1995, tendo curiosamente sido invertida a ordem dos principais países produtores. Na América (principalmente América Central), com uma produção de 133.600 Ton. em 1991 e de 154.000 Ton. em 1995, as principais espécies cultivadas são os peneídeos *P. vannamei* e *P. stylirostris*, com realce para o Equador (100.000 Ton. em 1991 e 1995) e a Colômbia. O México, de uma produção de 5.000 Ton. em 1991 passou para 12.000 Ton. em 1995, ficando em 2º lugar, entre o Equador e a Colômbia (World Shrimp Farming, 1991, 1995; Laubier e Laubier, 1993).

Na Europa, essencialmente na região mediterrânica, a importância da espécie autóctone *P. kerathurus* motivou vários investigadores ao seu estudo em Espanha (San Feliú, 1964, 1969; Rodriguez, 1981), Portugal (Figueiredo, 1972; Luís, 1988), Itália (Lumare, 1983), e França (Laubier, 1987), o que aprofundou o conhecimento biológico da espécie mas também conduziu à conclusão de que se trata de uma espécie de difícil aclimação às condições de cultivo, face à espécie *P. japonicus*, importada do Japão para produção em aquacultura (Arrobas e Ruano, 1986).

Em Portugal, foram realizados vários trabalhos de investigação sobre adaptação e crescimento de larvas importadas de *Penaeus japonicus* (Arrobas, 1989; Arrobas *et al.*, 1989 e Sobral *et al.*, 1991), e sobre reprodução e desenvolvimento larvar e pós-larvar (Arrobas e Sampayo, 1989). Finalmente a partir de 1988, o ciclo biológico da espécie estava controlado e dispunha-se da tecnologia necessária à produção a nível industrial de pós-larvas (Arrobas *et al.*, 1990) com rendimentos da ordem de 1.200 Kg/ha em 3 meses (Arrobas *et al.*, 1992).

Em 1990, a produção global foi de 5 Ton. o que juntamente com uma área de 230 hectares projectada para a cultura do camarão fazia prever um aumento significativo daquela produção. No entanto, o desenvolvimento da cultura de *P. japonicus* em Portugal foi rapidamente travada por dificuldades de vária ordem, dificilmente contornáveis, como as directivas da Secretaria de Estado do Ambiente quanto à cultura desta espécie exótica em zonas protegidas e a complexidade dos circuitos de comercialização no nosso país, às quais se juntaram alguns fracassos de produção (falta de rigor na aplicação das técnicas de maneo). Desta conjuntura resultou que, em 1995, existisse uma só empresa no estuário do Guadiana a manter a produção em ciclo completo desta espécie (Arrobas, comunicação pessoal).

Técnicas de Cultivo

A deslocação das pós-larvas para as zonas estuarinas, nomeadamente da espécie *Penaeus monodon*, acrescida da sua alta capacidade de adaptação à variação de temperatura e salinidade, características das zonas lagunares costeiras, permitiu o desenvolvimento na Indonésia de uma forma de aquacultura tradicional, na qual as pós-larvas são confinadas por redes nas lagunas durante o seu crescimento e os adultos pescados à saída no seu movimento natural para o mar. Actualmente, para além deste tipo de aquacultura primitiva, podemos descrever três tipos de técnicas de cultivo de camarões (Laubier, 1987; Laubier e Laubier, 1993):

- As pós-larvas são pescadas em zonas adequadas, normalmente por pescadores especializados (no Equador são chamados “larveros”) e introduzidas em tanques de terra construídos junto à costa e para onde a água é bombeada.
- As pós-larvas não são obtidas do meio da natural mas em “maternidades”, após desova controlada, de fêmeas selvagens sexualmente maduras, capturadas pela pesca comercial. Esta técnica foi iniciada por nos anos 40 por Fujinaga (=Hudinaga), com a espécie *Penaeus japonicus*.
- Finalmente, a técnica pela qual o ciclo biológico da espécie (a qual pode não existir naturalmente na região de cultivo) é totalmente controlado em cativeiro, com especial atenção para o processo reprodutivo.

Uma revisão detalhada e bem documentada sobre as técnicas de cultivo para várias espécies de crustáceos, abordando desde a biologia das espécies até à implementação de projectos e aspectos económicos, pode ser encontrada em Lee e Wickins (1992). Especialmente dedicada à produção de crustáceos de água doce, nomeadamente de *M. rosenbergii*, uma revisão de New (1990) desenvolve as questões ligadas à investigação actual, às tecnologias de criação e ao mercado e economia.

Ecologia e Ciclo de Vida dos Peneídeos

Os Peneídeos são animais bentónicos de fundos móveis (arenosos ou vasosos), que, na sua grande maioria, frequentam as águas da plataforma continental até algumas dezenas de metros de profundidade. Geograficamente encontram-se nas águas equatoriais e sub-tropicais de todo o mundo, sendo limitadas a norte e sul, pelas isotérmicas de superfície, dos 20°C. No mediterrâneo, a espécie autóctone mais importante é o *Penaeus kerathurus*, sendo no entanto também encontrada a espécie *Penaeus japonicus* depois de ter sido introduzida para produção em aquacultura (Rodríguez, 1989).

São animais de sexos separados em que, na cópula, o macho transfere um par de espermatóforos, através do órgão copulador, o petasma, para o receptáculo da fêmea, o téllico (revisão por Ogle, 1992). Segundo a conformação do téllico são distinguidos dois grupos de peneídeos, ditos de téllico aberto e de téllico fechado, no primeiro dos quais a cópula é realizada antes da desova e no segundo logo após a muda antes do endurecimento da nova carapaça, sendo a desova realizada após algumas semanas. A grande diversidade de ciclos de vida nos crustáceos é demonstrada pelos vários padrões de reprodução conhecidos (revistos por Quackenbush, 1991), entre os quais os peneídeos constituem um exemplo pouco comum ao libertar para o meio ovos fecundados, sem qualquer cuidado parental.

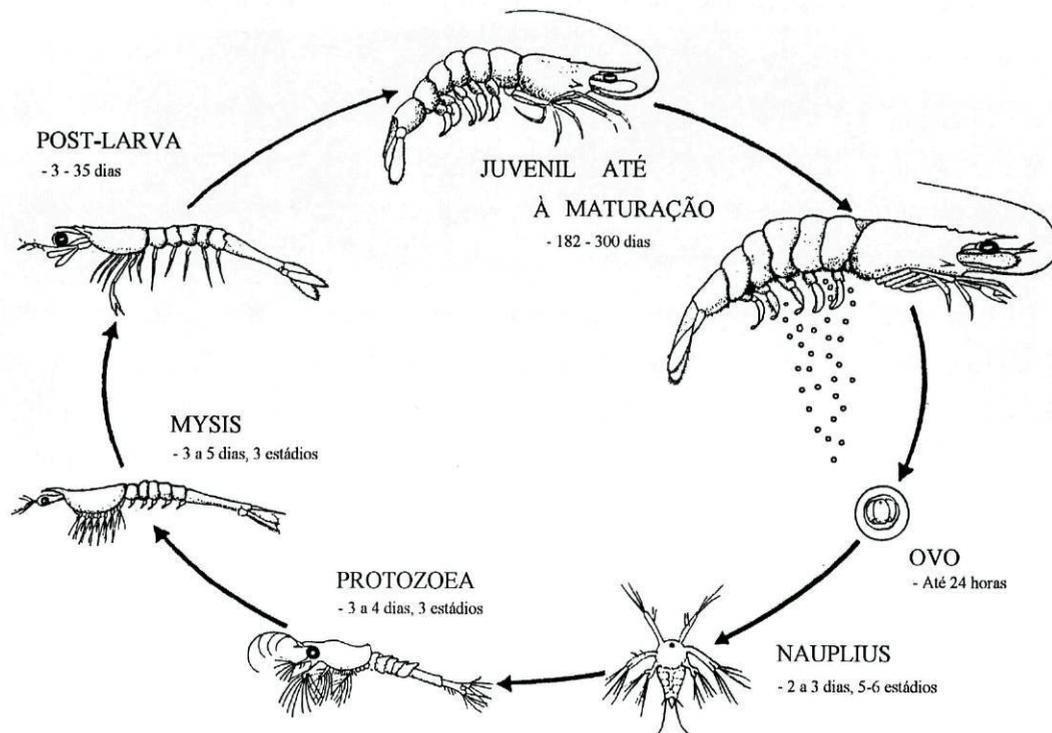


Figura 3. Ciclo de vida dos Peneídeos (Adaptado de Lee e Wickins, 1992)

Na desova são libertados cerca de 100.000 a 1.000.000 de ovos (de cerca de 220 micra), dependendo da espécie e peso da fêmea, podendo esta efectuar mais do que uma desova em cada época de reprodução. Os ovos eclodem cerca de 12 a 18 horas depois, consoante a temperatura da água, dando origem a um nauplius (figura 3), estágio considerado como a larva primitiva de todos os crustáceos, caracterizada por possuir três pares de apêndices - as antenulas, as antenas e as mandíbulas. A fase de nauplius desenrola-se no ovo para todas as espécies com excepção única para os *Peneídeos*. Depois de 5 a 6 estádios de nauplius e consequentes mudas, o nauplius dá origem a uma larva capaz de se alimentar de pequenas microalgas, a zoea I (ou protozoea pois já possui um par de olhos pedunculados) e logo a zoea II e III, estádios que duram pouco mais de um dia cada. A larva seguinte, a mysis, com três estádios de cerca de 30 horas cada, é já semelhante a um pequeno camarão embora de patas torácicas birramadas e sem pinças. A mysis come vorazmente rotíferos, *Artemia* e nauplius (Lee e Wickins, 1992). Depois de uma metamorfose profunda a larva mysis III dá lugar a uma pós-larva

semelhante ao adulto possuindo pleiópodes natatórios que não existiam na mysis (figura 3).

Os estádios das pós-larvas distinguem-se pelo número e disposição das espinhas que ornamentam o rostro. São reconhecidos 22 estádios de pós-larvas de *P. japonicus*, cuja duração vai aumentando de cerca de 30 para 40 horas. Depois de 3 a 4 dias os jovens camarões adquirem um comportamento bentónico, dirigindo-se para os fundos e, em certas espécies, enterrando-se activamente na areia durante o dia. Apresentam além disso, um certo tropismo de actividade em função de flutuações de salinidade, que as aproxima das zonas estuarinas e lagunas costeiras salobras (zonas de produtividade elevada), onde vivem 3 a 4 meses e de onde saem para o mar com uma dezena de centímetros de comprimento, onde completam o seu crescimento e finalmente se reproduzem, num ciclo que pode durar 3 anos. Em condições de exploração intensiva, este ciclo reduz-se a 18 meses ou mesmo 1 ano (Laubier, 1987)(figura 3).

Eco-Fisiologia da Reprodução

Sincronismo do Crescimento e Reprodução

Os factores externos como a luz, temperatura, salinidade, alimentação, funcionando como relógios biológicos externos permitem, por um lado, o sincronismo de vários ciclos internos independentes (crescimento, reprodução, etc.) no indivíduo, e por outro, o sincronismo de comportamentos (p.ex., migração) e ritmos endócrinos (p.ex., sincronismo de reprodução entre machos e fêmeas) entre vários indivíduos da mesma espécie. A reprodução das espécies que vivem em latitudes médias, é realizada geralmente na época estival local, ocorrendo a desova durante a noite. De uma forma geral, o estímulo para o início da fase reprodutiva é o aumento da duração do dia (Laubier, 1987: *Penaeus japonicus* e *P. kerathurus*; Ogle, 1992: *P. vannamei*). Desta forma, o controlo do fotoperíodo tornou-se prática corrente em aquacultura quer para o desencadear da maturação ovárica fora da época normal, quer inclusivé, para a inversão do ciclo de fotoperíodo de forma a obter as desovas durante o dia, com as óbvias vantagens do método.

A técnica de reprodução em cativeiro, elaborada por Fujinaga e colaboradores entre 1933 e 1960 (Laubier, 1987) para a espécie *Penaeus japonicus*, e posteriormente

aplicada com sucesso a outras espécies, parte da captura e triagem de fêmeas selvagens com as gónadas desenvolvidas (visíveis através da carapaça), que são colocadas em tanques e submetidas a um choque térmico: vindas do meio natural com uma temperatura entre 18 e 25°C, esta é aumentada para 28-29°C no tanque. Após o início da desova, que ocorre durante a 2ª ou 3ª noite, as fêmeas são retiradas do tanque, onde irão eclodir as larvas. As taxas de eclosão são normalmente inferiores a 50% e muitas fêmeas maduras podem sofrer uma involução rápida no desenvolvimento do ovário, também chamada "regressão" do ovário, resultante do "stress" provocado quer pela captura quer pelo choque térmico.

Uma segunda técnica utilizada para a obtenção da maturação e desova nos peneídeos é a ablação de um dos pedúnculos oculares (Meusy e Payen, 1988; Lee e Wickins, 1992). Depois do trabalho de Panouse (1943) (*in* Laubier, 1987), no camarão *Leander serratus* (*Palaemon serratus*), ficou provada a existência no pedúnculo ocular de um complexo sistema glandular - a glândula do seio - que acumula e liberta neuro-hormonas entre as quais a hormona inibidora da gónada. A ablação unilateral do pedúnculo ocular traduz-se na diminuição da hormona inibidora circulante, permitindo a actuação de uma hormona estimuladora da gónada produzida pelo cérebro e pelos gânglios torácicos (Ogle, 1992; Van Herp e Payen, 1991). A ablação é normalmente unilateral uma vez que não existe compensação pelo outro pedúnculo e os resultados são praticamente os mesmos com o corte dos dois pedúnculos, com o inconveniente neste último caso da morte do animal no final da intermuda (Laubier, 1987). Esta manipulação pode ocasionar porém uma ruptura do sincronismo dos diversos mecanismos endócrinos, provocando um desequilíbrio fisiológico generalizado e nomeadamente dos que intervêm na vitelogénese, responsáveis pela acumulação das substâncias vitelinas dentro do ovo (Lee e Wickins, 1992). Estas falhas dão frequentemente origem a ovos não viáveis por incompleta formação das vesículas corticais, a larvas que não conseguem romper a membrana ovocitária e finalmente a zoeas pouco activas e que acabam por morrer. Devido a estes problemas revela-se necessário aprofundar a investigação sobre a regulação endócrina da reprodução, com o objectivo de otimizar a técnica reprodutiva de forma a atingir uma verdadeira domesticação das populações em cativeiro, sem o recurso obrigatório aos animais selvagens.

O estudo dos factores internos e externos que regulam a reprodução, passa também por outro fenómeno com a qual está estreitamente relacionada, o crescimento.

De facto, existe um perfeito sincronismo entre a muda do exoesqueleto e a reprodução, tendo a desova lugar antes da exuviação, não só porque ambos requerem um grande consumo energético, mas também porque a exuviação de uma fêmea fertilizada resultaria numa perda dos ovos ou do espermatozóide.

Só a libertação de forma cíclica do exoesqueleto calcificado (exuviação ou ecdysis) e o crescimento em tamanho, pela entrada de água através do intestino (e brânquias) logo após a exuviação, permite o crescimento dos crustáceos (figura 4).

Em quase todos os decápodes a muda continua para além da puberdade, variando a sua frequência segundo as espécies, tamanho e idade. Normalmente a reprodução (desova) realiza-se durante a intermuda, estágio C₄ do ciclo da muda, ou na pré-muda. O ciclo da muda é normalmente dividido nas fases (ou estádios) de pós-muda (Estádio A, sub-dividido em A₁ e A₂; Estádio B, sub-dividido em B₁ e B₂), intermuda (Estádio C, sub-dividido em C₁, C₂ e C₃) e pré-muda (Estádio D, sub-dividido de D₁ a D₄) (Adiyodi e Adiyodi, 1970).

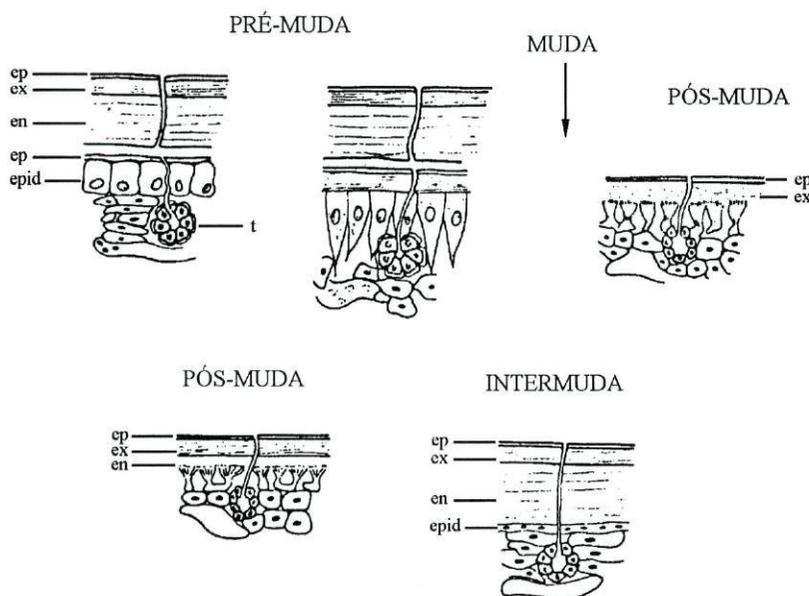


Figura 4. Estrutura do tegumento de um crustáceo nas diferentes fases do ciclo da muda. Na pré-muda as células da epiderme aumentam de tamanho, separam-se da velha carapaça (apólise) e secretam a nova epicutícula. Depois da muda (exuviação) está completa a exocutícula e é iniciada a produção da endocutícula que fica completa no início da intermuda. En, endocutícula; ep, epicutícula; ex, exocutícula; epid, epiderme; t, glândula do tegumento. (Adaptado de Highnam e Hill, 1977).

Este processo engloba ao longo das referidas fases (ou estádios) os seguintes acontecimentos (Lee e Wickins, 1992): 1) acumulação de reservas minerais e orgânicas, 2) remoção de material da velha carapaça e formação de um novo exosqueleto, 3) exuviação acompanhada por entrada de água no organismo, 4) reforço molecular do exosqueleto por rearranjo da matrix orgânica e deposição de sais inorgânicos, 5) substituição de fluído por tecido.

Uma vez completa a formação do esqueleto e o crescimento tecidual, a intermuda (fase C₄) constitui a fase de deposição de reservas principalmente a nível do hepatopâncreas. A muda e a reprodução são os maiores acontecimentos metabólicos que envolvem a mobilização cíclica das reservas orgânicas para a epiderme e ovário respectivamente, constituindo duas importantes funções que, embora de certa forma separadas no tempo, estão integradas através da acção hormonal (Adiyodi e Adiyodi, 1970).

Anatomia e Endocrinologia Geral

A maior parte dos conhecimentos relativos ao sistema endócrino dos crustáceos foi adquirido através do estudo de decápodes, assim como de outros dois grupos de malacostracas, os anfípodes e os isópodes. Na figura 5 está representada a anatomia interna e externa de um decápode tipo.

Orgãos Neuro-Endócrinos

O sistema endócrino dos decápodes consiste em estruturas epiteliais do tipo endócrino não-neuronal, como a glândula androgénica, e células neuro-secretoras com componentes do tipo neuronal (neuro-endócrino), como a glândula do seio (figura 6).

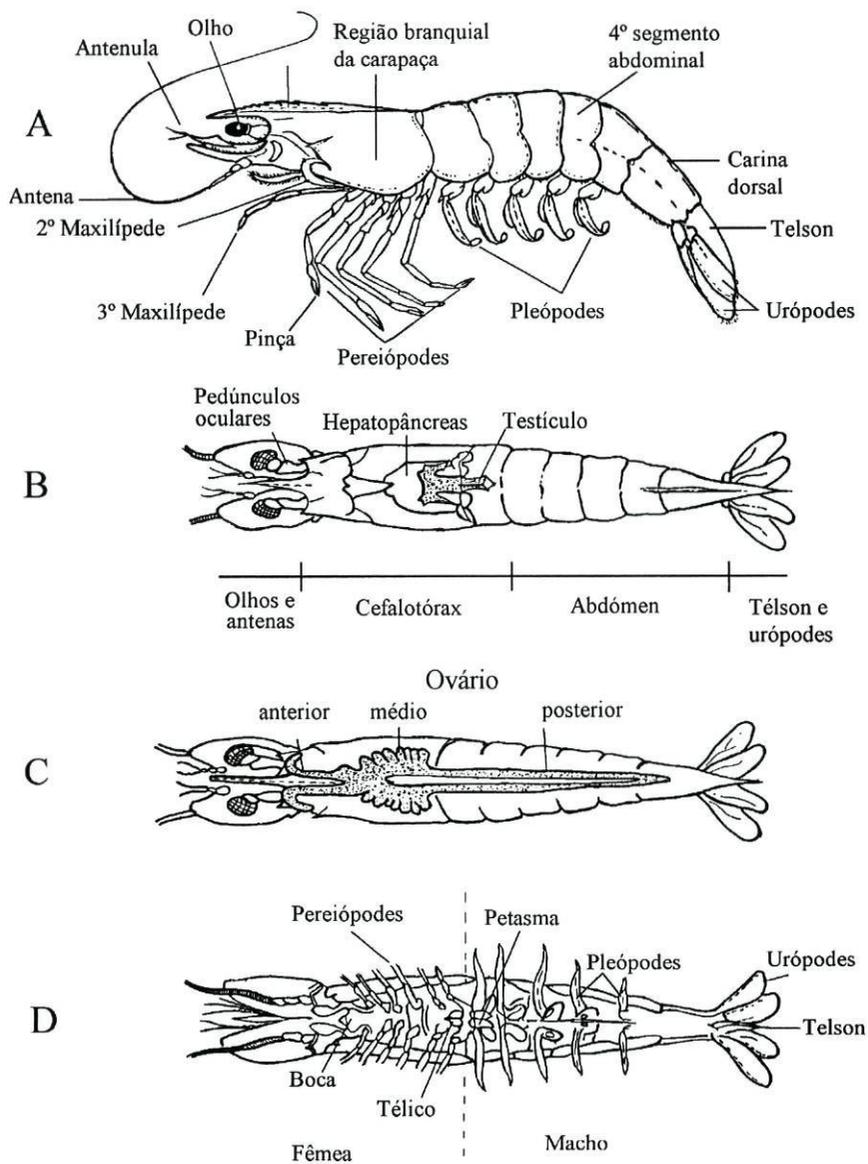


Figura 5. Anatomia interna e externa de um decápode tipo. A- plano lateral, B e C- plano dorsal, D- plano ventral (Adaptado de Lee e Wickins, 1992).

As glândulas neuro-endócrinas dos decápodes são formadas pelas terminações de axônios de células neuro-endócrinas e são estruturas de acumulação e libertação de neuro-hormonas, situadas junto do sistema vascular e daí a designação de órgãos

neuro-hormais (Fingerman, 1992). Contrariamente aos vertebrados, o número de neuro-hormonas nos decápodes é superior ao das não-neuronais (Fingerman, 1987), tendo sido já descritos mais de 20 possíveis factores neuro-hormonais (Van Herp e Payen, 1991).

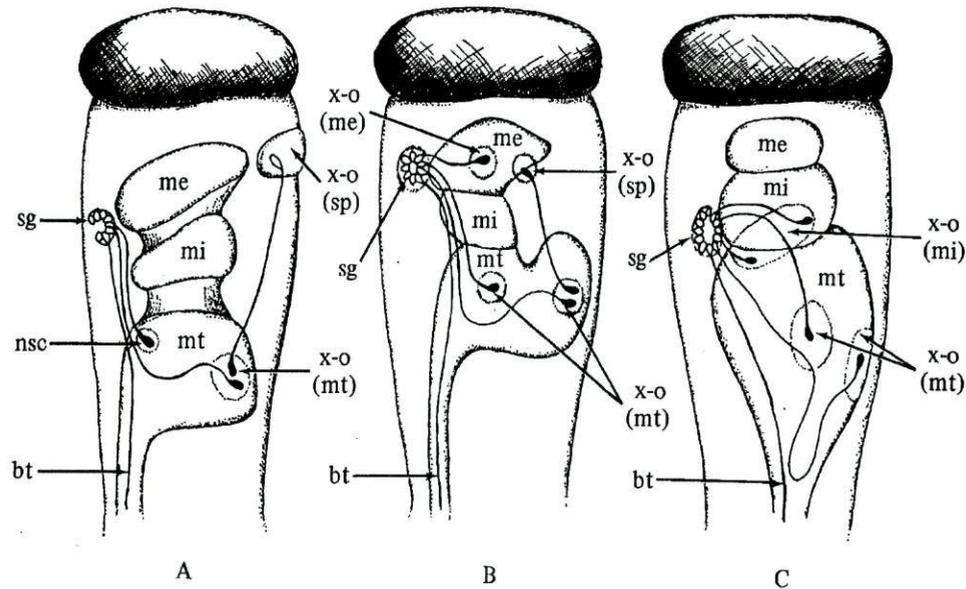


Figura 6. Diagramas de exemplos do sistema neuro-secretor do pedúnculo ocular dos crustáceos. A negro estão representados os núcleos e a claro os terminais neuro-secretores. A. camarão *Lysmata seticaudata*, B. camarão *Palaemon serratus* e C. caranguejo *Geocarcinus lateralis*. bt, axónios vindos do cérebro e de outras partes do SNC; me, mi, mt, medula externa, interna e terminal do gânglio do pedúnculo ocular, respectivamente; nsc, células neuro-secretoras isoladas; sg, glândula do seio; sp, poro sensitivo (orgão de Bellonci); x-o, orgão x (Adaptado de Tombes 1970).

Glândula do Seio- Orgão X - (MTGX)

O complexo neuro-hemal glândula do seio é o maior componente dos centros neuro-endócrinos dos crustáceos assim como a maior estrutura endócrina nos decápodes. Este órgão, ao qual se atribui o controlo de 18 funções (Ogle, 1992), constitui o local de libertação e armazenagem de uma ampla variedade de hormonas como a hormona inibidora da muda (MIH), a hormona inibidora da gónada/ hormona inibidora da vitelogénese (GIH/VIH), a hormona hiper-glicémica (CHH), as hormonas que controlam os cromatóferos (PDH, RPCH) e pigmentos da retina (DRPH) e a hormona depressora neuronal (NDH).

A designação de “glândula do seio” deve-se à sua localização, no pedúnculo ocular, onde o seio dorso-lateral interno abre para um largo seio externo. A glândula do seio é composta de células da glia e de terminais de axónios de células neuro-secretoras (Bressac, 1988a; Fingerman, 1987). Estas células estão situadas principalmente na zona próximo-ventral da *medula terminalis*, dos lóbulos ópticos (protocérebro) também conhecido como “órgão X” e minoritariamente (até cerca de 10%) do cérebro e gânglios torácicos (Fingerman, 1987, 1992). Os produtos de neuro-secreção acumulados nas terminações nervosas são libertados essencialmente por exocitose, registando-se no entanto a presença de vesículas sinápticas ligadas a este fenómeno (Bressac, 1988a) (figura6).

Através de estudos imuno-citoquímicos para a localização dos locais de síntese das hormonas inibidora da vitelogénese (VIH) e hiper-glicemiante dos crustáceos (CHH), Van Herp e Payen (1991) concluíram que ambas as hormonas poderiam ser sintetizadas nos mesmos “perikaria” mas por vias biossintéticas distintas, transcritas pelo mesmo RNA e com origem num precursor comum. A hormona hiperglicemiante dos crustáceos (CHH), cuja libertação é afectada pela 5-hidroxi-triptamina, é um péptido com 6000 a 7000 daltons de peso molecular, sendo a sua acção mediada por nucleótidos cíclicos, cAMP e cGMP (Fingerman, 1987). Na espécie *Homarus americanus*, Chang *et al.*, (1993) encontraram 96% de similaridade nas sequências das hormonas CHH e MIH.

A revisão dos vários trabalhos sobre a CHH, realizada por Van Herp e Payen, (1991), permitiu tirar algumas conclusões que poderão ajudar nos futuros estudos sobre a dinâmica do sistema celular produtor da VIH: 1) a secreção da CHH apresenta um ritmo circadiano, controlada pelo fotoperíodo, cujo foto-receptor se encontra no

gânglio óptico do pedúnculo ocular. 2) durante o período de muda a actividade secretora é reduzida ficando ausente o pico normal de actividade nocturna. 3) o sistema desenvolve-se logo após a eclosão e apresenta-se activo já nas fases larvares. 4) as sinapses dos axónios CHH são serotoninérgicas e os neuro-moduladores poderão ser a dopamina e meta-enkefalina.

O facto da hormona inibidora da muda (MIH) ser também produzida no complexo órgão X - glândula do seio (MTGX) pode ser significativa da relação que existe nos crustáceos entre as actividades da reprodução e da muda. A caracterização da hormona inibidora da muda (MIH), o seu efeito no órgão-alvo (órgão Y que sintetiza a hormona da muda, MH) e o seu modo de acção, estão descritos na revisão de Lachaise *et al.*, (1993)(ver também Mattson, 1986 e Spaziani *et al.*, 1994).

Finalmente, as hormonas CHH/MIH/VIH, parecem constituir uma nova família de hormonas neuropeptídicas de crustáceos decápodes. Dadas as múltiplas actividades biológicas demonstradas (p. ex. a MIH ter uma actividade CHH), parece ser ainda prematuro designar qualquer destes péptidos como “a” hormona inibidora da muda ou “a” hormona hiperglicemiante dos crustáceos de uma espécie particular (Chang *et al.*, 1993).

Para além dos factores inibidores já descritos, a presença de factores estimuladores da vitelogénese (VSH) foi descrita por vários autores (revistos por Van Herp e Payen, 1991) em extratos hidro-solúveis do cérebro e gânglios torácicos. Tratando-se possivelmente da mesma hormona, o trabalho de revisão de Ogle (1992) refere-se à hormona estimuladora do ovário (OSH), com origem no cérebro, gânglios torácicos, ovário ou órgão mandibular, como responsável pela estimulação da vitelogénese secundária. O efeito estimulador no crescimento de ovócitos não-vitelogénicos observado após injeção de CHH poderá não ser um efeito directo mas uma consequência de um aumento da taxa do metabolismo dos hidratos de carbono (Van Herp e Payen, 1991).

Desta forma, o sistema neuro-endócrino e principalmente o complexo órgão X - glândula do seio no pedúnculo ocular, têm uma função integradora na regulação da reprodução, coordenando a resposta dos órgãos endócrinos e reprodutivos (órgão Y, órgão mandibular, glândula androgénica e testículos ou ovário) às variações do meio como a temperatura e fotoperíodo (Van Herp e Payen, 1991).

Também na glândula do seio foi isolado um péptido (1200 daltons), que deprime a actividade dos neurónios motores e sensitivos, denominado hormona neuro-depressora (NDH), cuja libertação é estimulada pela 5-hidroxi-triptamina e inibida pelo ácido gama-amino-butírico, e que tem como função modular a actividade circadiana durante o dia nas espécies de maior actividade noturna (Fingerman, 1987).

Orgãos Post-Comissurais (PCO), Orgãos Pericárdicos (PO) e Ramificações Anteriores (AR)

Fibras derivadas do cérebro (região do tritocérebro), com terminação em forma achatada de prato ou lâmina nos músculos, num seio venoso, constituem os denominados orgãos post-comissurais (PCO), cujo produto de síntese exhibe actividade de concentração de vários pigmentos cromatóferos (branco, vermelho, preto) (figura 7).

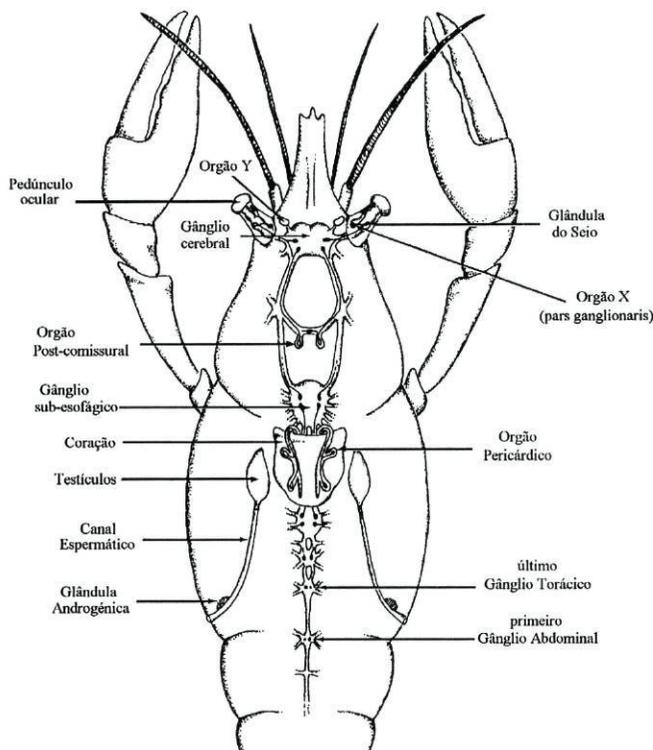


Figura 7. Esquema geral do sistema endócrino de um decápode (macho) (Adaptado de Tombes, 1970).

O único papel descrito para este órgão é o de acumulação e libertação de hormonas relacionadas com mudanças de cor (Fingerman, 1987). A estrutura química assim como a relação estrutura-actividade destas hormonas neuropeptídicas de dispersão e concentração de pigmentos (PDHs e PCHs) foi recentemente revista no trabalho de Rao e Riehm, (1991). Vários neuro-transmissores como a serotonina (5-hidroxi-triptamina, 5-HT), norepinefrina e dopamina, existentes nos crustáceos, mostraram-se selectivamente activas na estimulação da libertação das hormonas cromatóforas e dos pigmentos da retina (Fingerman, 1987).

Na cavidade pericárdica, e separados da hemolinfa por uma lâmina basal característica (Bressac, 1988a), estão localizados os chamados “órgãos pericárdicos” (PO) (figura 7), formados pelos axónios e suas terminações, de células neuro-secretoras dos gânglios torácicos, cuja função é a regulação do ritmo cardíaco (Bressac, 1988a; Fingerman, 1987, 1992). A distribuição neuronal e os efeitos do péptido cardioactivo dos crustáceos (CCAP) nos artrópodes foi revisto recentemente por Dirksen, (1994).

Também com características de órgão neuro-hemal (mas apenas descrito no grupo Brachiura) e próximo dos PO, foram descritas as denominadas “ramificações anteriores” (AR), que têm origem no primeiro segmento nervoso do gânglio torácico, o qual se ramifica perto dos musculos que movem a maxila, dando origem às AR. Nestes dois órgãos neuro-hemais, PO e AR foram encontradas evidências da presença de monoaminas (catecolaminas e 5-hidroxitriptamina) (revisto por Fingerman, 1987, 1992).

Glândulas Endócrinas Não-Neuronais

Órgão Y

O órgão Y, órgão endócrino par, situado na região cefálica dos crustáceos superiores (Malacostraca, pois nos inferiores como os Entomostraca estão ausentes), é uma glândula endócrina ectodérmica (não-neuronal) e que sintetiza a hormona da muda, a ecdisona (também conhecida como α -ecdisona). Esta glândula tem origem na epiderme (embriologicamente na ectoderme), à qual pode ficar ligada (lagostins) ou tornar-se independente (Lachaise *et al.*, 1993). O órgão Y, é constituído por um par de estruturas compactas de forma ovóide, situadas geralmente numa posição ventral à

inserção da porção lateral do músculo adutor externo da mandíbula, por cima do ponto onde o branquiostegito se liga à cutícula no extremo anterior da câmara branquial (figura 7). Tem normalmente uma estrutura lobada, não inervada, composta de apenas um tipo celular (Fingerman, 1987, 1992). A situação anatômica exacta, as diferentes formas do órgão Y assim como a estrutura histológica e ultraestrutura, em distintos grupos de crustáceos, são descritas detalhadamente numa revisão recente de Lachaise *et al.*, (1993).

Este órgão tem como função mais importante o controlo da muda, cujo processo é inibido por um neuropeptido, a hormona inibidora da muda (MIH) produzida nos neurónios do órgão X dos pedúnculos oculares e acumulada na glândula do seio, igualmente nos pedúnculos oculares. Detalhes sobre a função e controlo deste importante órgão endócrino, assim como das hormonas ecdisteróides a que dá origem serão apresentados em capítulo próprio (capítulo 4).

Orgãos Mandibulares (MO)

Os órgãos mandibulares (MO), situados anteriormente aos órgãos Y, na base e lado posterior do músculo adutor mandibular posterior, em posição dorsal aos músculos maxilares, dão origem aos compostos terpenóides, fernezoato de metilo (MF) e ácido farnesóico. Estes compostos estão estruturalmente relacionados com a hormona juvenil dos insectos (Laufer e Landau, 1991). Os órgãos mandibulares, com características ultraestruturais típicas de esteroidogénese, foram também comparados com a glândula "corpora allata" dos insectos (Bressac, 1988b).

Embora a sua função nos crustáceos ainda não esteja completamente estabelecida, parecem ter um papel estimulador no desenvolvimento do ovário e na promoção da vitelogénese (revisões por Borst *et al.*, 1987, Fingerman, 1987, Van Herp e Payen, 1991 e Fingerman, 1992).

Na espécie *Libinia emarginata* foi verificada uma flutuação do nível do MF durante o ciclo vitelogénico, coincidindo os níveis mais elevados com o máximo de síntese de vitelogenina (Borst *et al.*, 1987), o que juntamente com os resultados dos implantes de MO em fêmeas não-reprodutivas, estimulando o desenvolvimento ovárico, indicam uma intervenção directa do MF na reprodução (Laufer e Landau, 1991).

Em algumas espécies foram verificadas alterações ultraestruturais nas suas células ao longo do ciclo da muda (revisto por Fingerman, 1987). Recentemente, foram caracterizadas as proteínas da hemolinfa transportadoras de MF, as quais apresentam variações (aumento de quantidade e/ou afinidade) ao longo do ciclo da muda. Novos dados indicam uma possível acção estimuladora do MF sobre a síntese de ecdisteróides (Chang *et al.*, 1993).

A produção de MF pelos órgãos mandibulares (MO) parece ser estimulada pela RPCH e inibida pela PDH (hormonas pigmentares) sendo também influenciada por aminas biogénicas (serotonina) (Laufer e Landau, 1991).

Glândula Androgénica (AG)

A glândula androgénica, apenas presente no grupo Malacostraca (Fingerman, 1987), controla a diferenciação sexual dos machos, determinando o aparecimento dos testículos, contrastando com a auto-diferenciação do ovário na ausência da hormona androgénica (Adiyodi e Adiyodi, 1970).

Fazendo lembrar o gene do cromossoma Y que determina o aparecimento dos testículos nos mamíferos, os primórdios da glândula androgénica são determinados geneticamente (Hasegawa *et al.*, 1993).

Em todos os decápodes esta glândula está situada na região ejacutória sub-terminal dos canais deferentes (figura 7). Nos isópodes a sua localização é mais variável, podendo estar completamente separada do canal deferente (Payen, 1980). Apresentando um arranjo celular variável, nos peneídeos formam cordões que se dobram sobre si mesmo e por vezes se anastomosam. Ultraestruturalmente ricos em retículo endoplásmico rugoso (RER), mitocôndrias e complexos de Golgi, sugerem um tipo celular secretor de proteínas mais que de esteróides, embora a não identificação dos produtos de secreção retire consistência a esta hipótese.

Ovário

Os ovários, provavelmente as células foliculares primárias, são a fonte de uma hormona que induz a formação das características sexuais secundárias nas fêmeas

(Fingerman, 1987, 1992). Embora tenha sido demonstrado apenas nos anfípoda, as células foliculares secundárias produzem uma hormona estimuladora da vitelogenina (VSOH) (Payen, 1980) e, como parece representar um papel semelhante ao 17 β -estradiol nos vertebrados ovíparos, a sua natureza química poderá ser esteróide (Van Herp e Payen, 1991).

Orgão de Bellonci

Inicialmente confundido com o órgão X - foi denominado “pars-distalis-órgão X para o distinguir da medula *terminalis* (= *pars ganglionaris*)- órgão X (MTGX)-, ou ainda "Papila sensitiva-órgão X" (Adiyodi e Adiyodi, 1970), o órgão de Bellonci é, nos decápodes, uma estrutura compacta composta de um conjunto de algumas dezenas de lóbulos. Nas espécies que possuem um poro ou uma papila sensitiva, o órgão de Bellonci aparece intimamente a ela ligado. Um nervo liga o órgão de Bellonci à medula *terminalis* nos casos em que ambos estão separados (figura 7). Este órgão parece ter uma função dupla, sensitiva e secretora, pela qual as células respondem a um estímulo fotónico libertando um produto de secreção. Poderá ainda funcionar como órgão quimiorreceptor ou baroreceptor, constituindo assim um órgão sensitivo que secreta substâncias fisiologicamente activas em resposta a estímulos do ambiente, como se fora uma reminescência da glândula pineal da maior parte dos animais ectotérmicos, glândula não só sensitiva mas que também secreta melatonina (Fingerman, 1992).

Glândulas Exócrinas

Glândulas exócrinas são encontradas em vários pontos do corpo dos crustáceos decápodes e fazem parte normalmente de outros sistemas, como por exemplo, o hepatopâncreas que desempenha na digestão uma função importante. Os canais deferentes dos testículos, através de células epiteliais cubóides que revestem as suas paredes, secretam o espermatóforo, invólucro que encerra um grupo de espermatozóides. Poderão estar ainda na origem de uma feromona que estimula o ovário (Takayanagi *et al.*, 1986, *in* Van Herp e Payen, 1991).

As glândulas do tegumento são constituídas por células secretoras, situadas debaixo da epiderme e possuem um ducto que atravessa a cutícula. A sua função dividem-nas em dois tipos: um envolvido na osmorregulação e outro no endurecimento da nova carapaça. As que existem no aparelho digestivo secretam um muco, que no esófago têm como função a lubrificação, para facilitar a passagem dos alimentos, e, na sua parte terminal funciona como ligante para formar as “peletes” fecais (Fingerman, 1992).

As glândulas antenais, um par de estruturas que abrem para o exterior através de um “nefróporo” na base da segunda antena, constituem os órgãos excretores dos crustáceos decápodes. Estruturalmente são constituídos na sua parte mais interna por um saco de fundo cego, o saco coelómico, o qual abre para um labirinto de canais que depois se juntam para desembocar numa bexiga urinária, que finalmente abre no nefróporo. Porém, em alguns decápodes existe um túbulo contornado, o canal nefrídio, que nos animais de água doce é o local de absorção de sais, de forma a que a urina formada é hipotónica em relação à hemolinfa (Fingerman, 1992). Enquanto que a entrada massiva de água aquando da exuviação deverá ser controlada por ecdisteróides, a regulação dos fluxos de água durante a intermuda parece ser controlada por um “factor diurético” proveniente da glândula do seio, ou ainda por dois factores de acções osmorregulatórias antagónicas existentes no cérebro e gânglios torácicos (Fingerman, 1987).

Ovogénese e Vitelogénese

A ovogénese, caracterizada principalmente pela actividade mitótica e meiótica das ovogónias, e a vitelogénese, processo pelo qual o ovócito produz e acumula as reservas vitalinas, são os aspectos mais importantes e daí mais estudados na reprodução das fêmeas de crustáceos.

Os aspectos citológicos e ultraestruturais da ovogénese e vitelogénese serão discutidos detalhadamente nos capítulos 2 e 3, sendo aqui apenas abordados de forma a introduzir os conhecimentos actuais do controlo hormonal destes processos.

Na zona germinativa do ovário e durante toda a vida reprodutiva das fêmeas, as gónias, separadas por células mesodérmicas que as inibem de entrar em gametogénese, multiplicam-se por mitoses sucessivas (Charniaux-Cotton, 1980; Meusy e Payen, 1988). Por auto-diferenciação (a presença da hormona androgénica determina a diferenciação espermatogénica das gónias) saem desta zona em profase meiótica tornando-se ovogónias (Adiyodi e Adiyodi, 1970; Payen, 1980). A ovogénese só tem início quando as ovogónias primárias deixam o tecido mesodérmico, com a sua saída da zona germinativa. A actividade mitótica e ovogenética das ovogónias primárias, parece efectuar-se durante todo o ano, de forma contínua e sem regulação hormonal. Depois da condensação dos cromossomas, as células mesodérmicas começam a envolver os ovócitos, dando origem à formação de folículos primários (Payen, 1980, Meusy e Payen, 1988). É então iniciada a previtelogénese, uma fase de crescimento do ovócito através da produção endógena de glicoproteínas. Os ovócitos apresentam uma importante acumulação de ribossomas e desenvolve-se o retículo endoplásmico rugoso. Na continuação do seu crescimento, o ovócito aumenta a sua superfície através de numerosas microvilosidades que atravessam a camada vitelina e tomam contacto com as células foliculares, as quais envolvem os ovócitos em várias camadas. No ooplasma formam-se numerosas vesículas com material glicoproteico. Estes fenómenos caracterizam a previtelogénese (vitelogénese primária ou vitelogénese endógena) (Van Herp e Payen, 1991; Meusy e Payen, 1988). Esta fase mantém-se estacionária, quando o ovócito atinge um determinado tamanho, típico para cada espécie, por longos períodos nas fêmeas jovens ou até à época de reprodução para as fêmeas puberes. Como regra geral, a puberdade feminina é atingida quando uma camada de epitélio rodeia pela primeira vez cada ovócito previtelogénico que alcançou o seu máximo crescimento (Meusy e Payen, 1988). A fase de vitelogénese primária é pois caracterizada pela grande actividade de síntese do ovócito (grande quantidade de ribossomas e um desenvolvimento do retículo endoplásmico rugoso) de vitelo endógeno e no seu final pelo desenvolvimento de microvilosidades e aumento da actividade das células foliculares.

Seguindo a terminologia mais frequentemente utilizada na literatura sobre a fisiologia reprodutiva de animais ovíparos, Meusy e Payen (1988) e Van Herp e Payen (1991), consideraram a vitelogénese primária ou endógena como fazendo parte da previtelogénese e assim a denominação de vitelogénese refere-se apenas à vitelogénese secundária ou exógena (figura 8).

Vitelogénese

Com o início da época de reprodução, nas fêmeas puberes, os ovócitos que se encontram no fim da previtelogénese (vitelogénese primária) entram em vitelogénese (vitelogénese secundária ou vitelogénese exógena) (Van Herp e Payen, 1991).

A vitelogénese constitui a etapa da reprodução dos crustáceos, comum a outros grupos (insectos, anfíbios, peixes e aves), durante a qual os ovócitos no final da previtelogénese, acumulam grandes quantidades de vitelo, principalmente (mas não exclusivamente), por inclusão de um precursor extra-ovário, a vitelogenina (Meusy e Payen, 1988).

Nesta fase, cada ovócito, com as microvilosidades bem desenvolvidas e a atravessar a camada vitelina, fica envolvido por uma única camada de células foliculares. Através de endocitose, o ovócito introduz e acumula a vitelina, proteína maioritária das reservas vitelinas, a qual lhe é fornecida pela hemolinfa como um precursor, a vitelogenina. É assim característica desta fase a formação no ooplasma cortical de numerosas microvesículas de pinocitose, compostas de lipoglicocarotenoproteínas, e o aparecimento de uma rede de microcanículas que as conduzem em direcção aos glóbulos vitelinos (figura 8). A par desta "vitelogénese exógena", o ovócito continua a produção de glicoproteínas que, quando associadas a pigmentos carotenóides, dão a cor viva característica dos ovários vitelogénicos. A formação e acumulação de glóbulos lipídicos (essencialmente triglicérides), cuja origem ainda não foi determinada (Meusy e Payen, 1988), é também uma característica da vitelogénese. A vitelogénese secundária, é iniciada com a foliculogénese secundária (Charniaux-Cotton, 1980), fenómeno que prepara uma camada folicular a partir do tecido mesodérmico e que, através da modificação da superfície do ovócito, com a aquisição de vilosidades, torna possível a entrada da vitelogenina por micropinocitose (Payen, 1980).

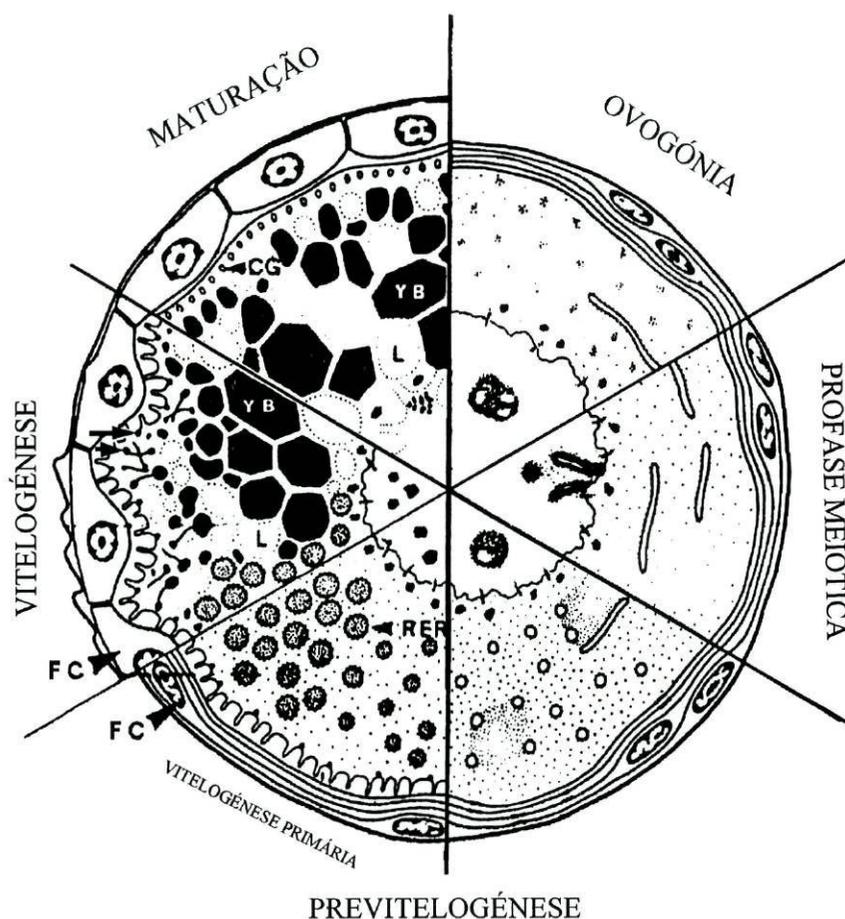


Figura 8. Esquema sumário (sem escala) do desenvolvimento do ovócito (de Van Herp e Payen, 1991).

Ainda antes do final da vitelogénese, as microvilosidades e os processos endocitóticos desaparecem e os ovócitos apresentam-se repletos de vesículas de vitelo e gotículas lipídicas, excepto na região peri-nuclear e na sua região cortical. Nesta última região, formam-se as vesículas corticais, provavelmente originadas do “vitelo endógeno” (Clark *et al.*, 1984; Goudeau e Lachaise, 1980), e que estão relacionadas com a formação da camada vitelina (Anderson *et al.*, 1984; Meusy e Payen, 1988). Esta camada vitelina parece ter a mesma função do denominado *corion* dos ovócitos no final da vitelogénese da lagosta *Homarus americanus*, o qual é formado pelas células foliculares (Talbot, 1981b).

Origem da Vitelogenina

Vários locais de síntese da vitelogenina, nome dado à proteína circulante na hemolinfa de fêmeas vitelogénicas e que constitui o maior precursor proteico do vitelo, têm sido apontados por vários autores em diferentes ordens de crustáceos: hemócitos, hepatopâncreas, ovários e tecido adiposo sub-epidermal (revisões por Charniaux-Cotton, 1980; Meusy e Payen, 1988; Quackenbush, 1991). Embora em alguns trabalhos a hipótese de origem única intra-ovocítica (Beams e Kessel, 1963; Ganion e Kessel, 1972) ou essencialmente intra-ovocítica (Fainzilber *et al.*, 1992) ou extra-ovocítica (Wolin *et al.*, 1973) seja defendida, a possibilidade de uma dupla origem, extra e intra-ovocítica é uma das hipóteses mais apontadas, reforçada por vários estudos ultraestruturais, aspecto que será abordado com maior detalhe no capítulo 2.

Devido à grande quantidade de proteína acumulada no ovócito durante a vitelogénese, difícil será acreditar que seja apenas um só tecido responsável pela sua produção, e assim, contribuições de vários tecidos deverão ser necessárias, variando a sua importância ou momento de intervenção de espécie para espécie. A sua coordenação e o controlo, desencadeado pelas variações ambientais, de forma a resultar no sucesso do desenvolvimento larvar, parece variar também de espécie para espécie. Nos peneídeos, obtiveram-se resultados tão diversos quanto as espécies utilizadas, responsabilizando unicamente um tecido (ovário ou mais concretamente as células foliculares) ou vários (ovário, hepatopâncreas, tecido adiposo sub-epidermal) de forma que apenas possibilitam a conclusão de que os ovócitos recebem proteínas vitelinas extra-ovárias de origem muito variável (Quackenbush, 1991). Além disso, neste grupo de crustáceos, os já referidos bastonetes (ou vesículas) corticais que irão formar a camada de geleia proteica após a activação do ovócito (Clark *et al.*, 1984), deverão exigir uma elevada síntese proteica no ovócito, que junto com a proteína necessária para constituir o vitelo, tornam obrigatória a existência de síntese proteica extra-ovária.

Entrada e Processamento da Vitelogenina

No início da vitelogénese, pode ser observada nas células foliculares que rodeiam os ovócitos, uma rede tubular (túbulos com diâmetro de 0.15 micra), unida por uma membrana unitária e encerrando material electrónico-denso, e que faz a conexão

com todos os compartimentos extra-celulares: hemolinfa, espaço inter-celular e espaço entre os ovócitos e as células foliculares. Esta estrutura, que regride no final da vitelogenese, facilita a passagem de material da hemolinfa para o ovócito vitelogénico. Também as numerosas microvilosidades, que nesta fase se desenvolvem na superfície dos ovócitos aumentando-a e que se dirigem para as células foliculares (penetrando mesmo nos já referidos túbulos), parecem estar envolvidas na captura de material extra-ovocítico. Este processo parece ser mediado por receptores com alta afinidade para a vitelogenina. Finalmente, as vesículas de endocitose (100-140 nm de diâmetro) formam-se no ooplasma cortical e algumas drenam o seu conteúdo para as vesículas de vitelo através de uma rede de micro-canículas (45-60 nm de diâmetro). Estas vesículas de vitelo vão-se fundindo e sendo “empurradas” para o ooplasma medular pelas novas que se formam, tomando no final da vitelogenese uma forma poliédrica e um tamanho de cerca de 40 micra (Meusy e Payen, 1988).

Se a captura de vitelogenina constitui uma característica específica da vitelogenese, também é certo que o retículo endoplásmico rugoso, ainda presente nesta fase, continua a síntese intra-ovocítica de vitelo proteico, assim como subsiste a passagem de material nuclear para o citoplasma. De facto, parece haver uma grande variação, entre espécies, da importância de cada uma das fracções, intra e extra-ovocítica do vitelo. Se por um lado se dá muita importância à captura pelo ovócito da vitelogenina durante a vitelogenese secundária, é de realçar que o nível máximo de vitelogenina circulante na hemolinfa antecede sempre a máxima acumulação pelo ovócito, e durante a queda rápida deste nível circulante e quando os ovócitos já não apresentam endocitose, o seu conteúdo vitelino continua a aumentar até à ovulação, argumentos que favorecem a produção endógena de vitelo.

A denominação de vitelina é normalmente atribuída à vitelogenina (“proteína específica feminina”) depois de esta entrar no ovócito e como ainda é pouco conhecida a estrutura química de ambas, os dois termos referem-se mais aos compartimentos onde são encontradas, ovócito e hemolinfa, respectivamente. De facto, vários estudos mostram que não existem diferenças de resposta imunológica entre a vitelogenina e a vitelina (revisto por Meusy e Payen, 1988). No entanto, sendo ou não a mesma substância, o “processamento” da vitelogenina aquando da sua entrada no ovócito ou dentro do ovócito não deixa de ser uma possibilidade, nomeadamente quanto à sua porção proteica.

Maturação do Ovócito

Embora para muitos autores, o termo maturação seja aplicado como sinónimo de desenvolvimento ovárico ou de vitelogénese, a maturação do ovócito ocorre apenas no final da vitelogénese e é também designada de maturação meiótica, pois trata-se da reiniciação meiótica dos ovócitos que se encontram bloqueados em profase I da primeira meiose. A maturação ocorre no ovário e antecede a fertilização. Inicialmente as células foliculares retraem-se, as microvilosidades ovocitárias assim como as vesículas de pinocitose e as microcanículas desaparecem, depois tornam-se visíveis as vesículas corticais na periferia do ooplasma e, por último, desaparece o invólucro nuclear (Payen, 1980), após o que se dá a reiniciação meiótica do ovócito, precedendo a desova (Adiyodi e Adiyodi, 1970; Van Herp e Payen, 1991).

Só recentemente foi descrita cronologicamente a evolução dos aspectos citológicos da maturação em decápodes (*Palaemon serratus*) e a sua estreita relação com a preparação para a muda (Clédon, 1986). Nesta pré-muda, em D₀, a membrana nuclear invagina-se, os nucléolos dissociam-se, dá-se a condensação dos cromossomas e o início da cisão da membrana nuclear. A cisão da vesícula germinal (“germinal vesicle breakdown”, GVBD) ocorre no final da fase D₁ ou início da D₂, quando a vesícula germinal ocupa uma posição central no ovócito. Assim, ovócitos imobilizados na profase I retomam a meiose na pré-muda, isto é, no final da fase D₁ (4 a 5 dias antes da muda). Seguidamente, no final da fase D₂, cerca de 4 horas antes da exuviação, verifica-se a migração da vesícula germinal com os cromossomas. Cerca de 1 a 2 horas antes da muda, os cromossomas divalentes, que ainda não estão organizados equatorialmente em metafase, tornam-se visíveis à superfície do ovócito, numa região nucleoplásmica desprovida de membrana nuclear. O primeiro fuso cromático meiótico pode ser observado aquando da exuviação, ficando os ovócitos bloqueados em metafase I até à desova.

Ovulação

Nas espécies *Palaemon serratus* e *Macrobrachium rosenbergii*, em que a maturação se desenrola em sincronia com a pré-muda, a ovulação, a retração do epitélio folicular e a separação da camada folicular dos ovócitos, ocorrem após a muda.

Com esta retração do epitélio folicular, que normalmente se inicia na zona do ovário junto dos oviductos, formam-se cristas de tecido mesodérmico folicular entre os ovócitos ovulados, depois no espaço deixado livre pelos ovócitos desovados e finalmente é concentrado na periferia do ovário para ser usado numa seguinte foliculogénese (Meusy e Payen, 1988). Nos peneídeos, pelo contrário, as células foliculares degeneram após a ovulação (Anderson *et al.*, 1984).

Activação do Ovócito

A activação do ovócito ovulado (bloqueado na primeira metafase meiótica) consiste em:

- 1) libertação do precursor da geleia contido nas criptas corticais.
- 2) transformação deste precursor numa camada homogénea de geleia à volta do ovo.
- 3) reiniciação e finalização da maturação meiótica.
- 4) elaboração de um invólucro extracelular de desova.

Embora a interacção ovo-espermatozóide seja necessária para o desenvolvimento embriónico normal, o processo de activação do ovócito é normalmente desencadeado pela exposição à água do mar, não requerendo a fertilização (Lynn *et al.*, 1991). Enquanto nos ovos fertilizados, a sua activação requer apenas a presença externa de Mg^{2+} , nos ovos não fertilizados, além deste catião divalente é também necessário o Ca^{2+} .

Segunda Reiniciação Meiótica (Metafase I)

Nos anfípodes e em vários decápodes (Meusy e Payen, 1988), os ovócitos no momento da desova encontram-se na primeira metafase meiótica, processo que é recomeçado pouco tempo depois, isto é, o estágio de anafase tem lugar nos ovos desovados. Se inicialmente foi sugerido que a fertilização desencadeava esta reiniciação da metafase, trabalhos posteriores (Lynn *et al.*, 1991, entre outros)

demonstraram que o contacto com a água do mar, ou mais especificamente, a presença externa de iões Mg^{2+} (mas não o Ca^{2+} , sendo este necessário apenas nos ovos não fertilizados) independentemente da fertilização, eram os directos responsáveis pela activação do ovócito. De facto, o aumento de Mg^{2+} no meio externo aquando da desova, vai aumentar a permeabilidade da membrana do ovócito ao K^+ , provocando uma hiperpolarização no ovócito (Goudeau e Goudeau, 1986). O aparecimento do primeiro corpo polar segue-se à formação da camada homogénea de geleia e constitui uma indicação de que a primeira divisão meiótica está completa. Durante a elevação ou afastamento do invólucro de desova o primeiro corpo polar é afastado da superfície do ovo e pouco tempo depois é formado o segundo corpo polar indicando o final da maturação meiótica (Lynn *et al.*, 1991).

Electro-Fisiologia da Fertilização

A resposta eléctrica à fertilização, já conhecida em muitos animais só recentemente foi descrita nos malacostraca (Goudeau e Goudeau, 1986), evidenciando o potencial de fertilização, que consiste numa hiperpolarização constante da membrana do ovócito, desta vez desencadeada pelo espermatozóide. Novamente, é através de uma permeabilidade selectiva ao K^+ (antes da fertilização era para o Cl^-), promovida por um aumento do Ca^{2+} livre intracelular, que é criada uma hiperpolarização no ovócito e se inicia a segunda reiniciação meiótica dos ovócitos bloqueados em metafase I.

Comparando o caso anterior com a resposta eléctrica dos ovócitos que não requerem fertilização para a sua activação, e que passa também por uma hiperpolarização com aumento interno do K^+ , poderemos supôr a existência de duas estratégias diferentes de fertilização sendo a primeira típica dos decápodes reptantia, com uma fecundação interna, e esta última dos natantia com fecundação externa.

Reacção Cortical

Embora este fenómeno, à semelhança da activação, possa ser iniciado com o contacto com a água do mar, a reacção cortical é uma resposta do ovócito em hiperpolarização depois da fertilização.

Nos peneídeos, a reacção cortical apresenta alguns aspectos peculiares como a dimensão dos bastonetes corticais (40 micra de comprimento para um diâmetro do ovo de cerca de 270 micra), a sua rápida expulsão e dissipação após contacto com a água do mar e a diminuição do volume do ovo após esta reacção (Meusy e Payen, 1988). Os bastonetes, situados perpendicularmente à superfície em criptas da membrana plasmática e separados do meio externo por um fino revestimento que envolve todo o ovo (camada vitelina), são compostos de estruturas fibrilares compactadas. À medida que os bastonetes corticais são expulsos na água do mar, forma-se uma coroa à volta do ovo que rapidamente se dissipa e associada às criptas aparece uma extensa vesiculação membranar que rodeia o ovo formando finalmente uma camada homogénea de geleia.

Controlo Hormonal do Processo Reprodutivo

O controlo hormonal da reprodução de crustáceos (ovogénese/vitelogénese) foi detalhadamente revisto, entre outros, por Adiyodi e Adiyodi (1970), Meusy e Payen (1988), Van Herp e Payen (1991), Quackenbush, (1991), Laufer e Landau, (1991) e Hasegawa *et al.*, (1993).

Controlo do Início da Ovogénese e Previtelogénese

Diferenciação do Ovócito

A diferenciação sexual é controlada nos machos pela glândula androgénica, determinando o aparecimento dos testículos, em contraste com a auto-diferenciação do ovário na ausência da hormona androgénica (Adiyodi e Adiyodi, 1970). Assim, a diferenciação da gónada em ovário é um processo de auto-diferenciação (Meusy e Payen, 1988; Van Herp e Payen, 1991), e contrariamente à espermatogénese, cuja iniciação é regulada por neuro-hormonas do pedúnculo ocular através da glândula

androgénica (AG) (Hasegawa *et al.*, 1993), a iniciação da ovogénese parece não ser controlada por qualquer neuro-hormona (Meusy e Payen, 1988).

Manutenção da Zona Germinativa

A hormona androgénica (AH) para além de necessária para a manutenção da zona germinativa (Hasegawa *et al.*, 1993) e para o desenrolar da espermatogénese, determina o desenvolvimento das características sexuais secundárias (mesmo comportamentais), a diferenciação dos testículos (para a qual é também essencial a hormona da muda - MH) e o primórdio do ducto espermático (Adiyodi e Adiyodi, 1970; Fingerman, 1987; Meusy e Payen, 1988). Em contraste, nas fêmeas a manutenção da zona germinativa do ovário não necessita da presença de qualquer hormona (Meusy e Payen, 1988; Van Herp e Payen, 1991).

Crescimento do Ovócito até à Puberdade

O aumento do número de mitoses nas ovogónias e o número de ovócitos que entram em profase meiótica parece ser controlada por factores neuro-hormonais (Van Herp e Payen, 1991).

A hormona da muda (MH) parece ser necessária, particularmente nas fases pré-pubertais, para a multiplicação mitótica nas gónadas (Adiyodi e Adiyodi, 1970), ainda que os níveis envolvidos sejam diminutos (Meusy e Payen, 1988).

Os ecdisteróides parecem ser assim essenciais para as fases iniciais do desenvolvimento da gónada, especificamente nas mitoses das ovogónias e no crescimento previtelogénico (Meusy e Payen, 1988). No entanto, o efeito destas hormonas sobre a gónada, poderá ser apenas parte do efeito geral, em todos os tecidos organizados (Adiyodi e Adiyodi, 1970).

Controlo da Vitelogénese

Controlo por Inibição

Hormona Inibidora da Vitelogénese (VIH) e Modo de Acção

Não sendo claro até ao momento, se constituem um conjunto complexo de hormonas que interactuam em conjunto na vitelogénese, ou se hormonas de forma isolada são responsáveis pelo processo, o fotoperíodo tem sido apontado como o

estímulo externo que desencadeia a redução da hormona inibidora da gónada, GIH, permitindo a expressão da hormona estimuladora do ovário, VSH, promovendo esta a vitelogenese (Ogle, 1992). A hormona inibidora da gónada (GIH), proveniente da glândula do seio, não é específica de sexo nem de espécie, é termoestável e tem um peso molecular entre 2000 e 5000 daltons (Fingerman, 1987). Recentemente, foi isolada uma hormona inibidora da vitelogenese (VIH) na lagosta *Homarus americanus*, que corresponde a um péptido de 9.135 Da e determinada a sua estrutura primária, tendo sido reveladas algumas analogias com a hormona inibidora da muda (MIH) e a hormona hiperglicemiante dos crustáceos (CHH) (Soyez *et al.*, 1991 *in* Hasegawa *et al.*, 1993).

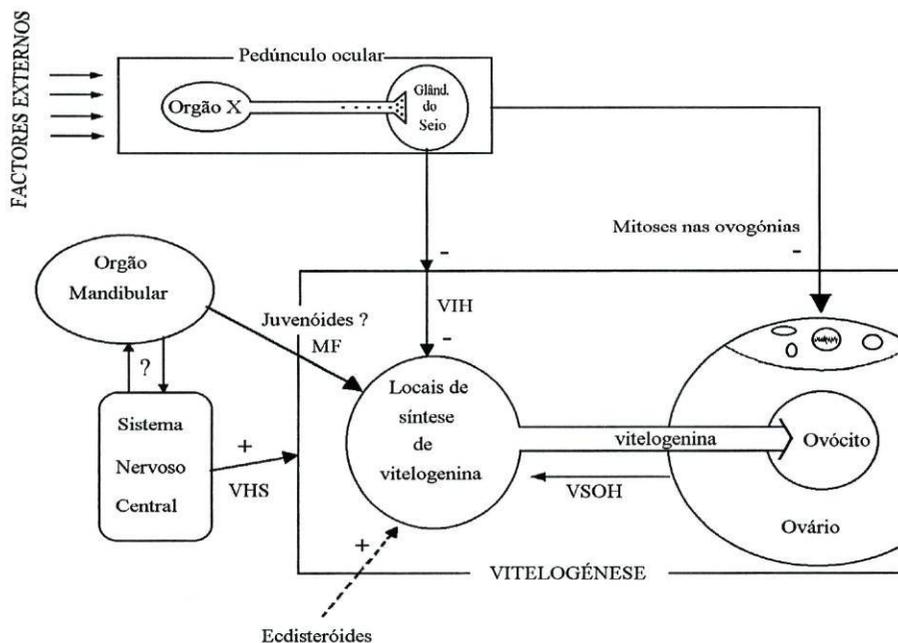


Figura 9. Esquema do controlo da ovogénese nas fêmeas de crustáceos (Van Herp e Payen, 1991)

Uma vez estabelecida que a hormona inibidora da gónada (GIH) actua principalmente na vitelogenese, a designação de hormona inibidora da vitelogenese (VIH) tem sido preferencialmente usada por vários autores (Meusy e Payen, 1988).

O efeito inibidor da GIH nos testículos é indirectamente mediado através da glândula androgénica (AG). A hormona estimuladora da gónada (GSH) pode estimular a actividade da AG. Nos animais hermafroditas protândricos, o normal funcionamento

da AG parece depender de um nível óptimo de concentração da hormona GIH, e a sua manutenção poderá ser dependente da GSH: a atrofia da AG, no final da fase em que o animal é macho, está provavelmente relacionada com o distúrbio na relação GIH/GSH (Adiyodi e Adiyodi, 1970).

A hormona inibidora da vitelogénese (VIH) pode exercer o seu controlo directamente na síntese de vitelogenina (Hasegawa *et al.*, 1993), ou na sua entrada no ovócito por endocitose (Van Herp e Payen, 1991; Hasegawa *et al.*, 1993). Neste caso competirá com uma maior afinidade para os já referidos receptores na membrana do ovócito (Meusy e Payen, 1988).

A inibição da vitelogénese secundária pela neuro-secreção do protocérebro e possivelmente do gânglio torácico (VIH), poderá ainda resultar duma inibição da actividade do tecido folicular secundário (Payen, 1980).

Antagonismo e Sinergismo entre a Hormona Inibidora da Muda (MIH) e a Hormona Inibidora da Gónada (GIH)

Os vários exemplos de sincronismo entre o ciclo da muda e a reprodução, sugerem a possibilidade de que os mecanismos hormonais neles envolvidos sejam os mesmos (em que a MIH e a GIH representam a mesma hormona ou “princípio inibidor do crescimento”) ou que, sendo diferentes, actuam sinergeticamente (Adiyodi e Adiyodi, 1970). De facto, o ciclo da muda é mais longo durante a época reprodutiva do que durante a época de repouso, uma vez que a vitelogénese prolonga o ciclo (Meusy e Payen, 1988).

Entre os decápodes, podem ser distinguidos dois tipos de ciclo de muda: um denominado “diecdísico”, caracterizado pela existência de várias mudas ao longo do ano ou de uma época e no qual a fase de intermuda, C₄, é muito curta, e o outro “anecdísico”, no qual a muda é anual e logo com um período de intermuda bastante mais longo. Alguns decápodes cessam, de forma permanente, o ciclo de muda a partir de um determinado estado adulto - anecdísico terminal ou permanente (estádio C₄ T). A continuação do processo reprodutivo nestas espécies em C₄ T, ou de várias desovas durante a mesma intermuda que é nesse caso prolongada, constituem um forte argumento para a distinção das duas hormonas, as quais podem, consoante a fase do ciclo da muda, agir antagónica ou sinergeticamente. O sinergismo aparente da MIH e

da GIH, característico durante a pós-muda, é transformado num antagonismo durante a intermuda, dada a necessária mobilização das reservas metabólicas para o ovário, que se sobrepõe temporariamente ao crescimento tecidular, (figura 10). De facto, um elevado nível de MIH é essencial para a reprodução, inibindo o funcionamento do órgão Y. Nos decápodes, as células β do órgão X, sob a influência de diferentes sinais, poderão dar origem à MIH ou à GIH, hormonas estas que estarão quimicamente relacionadas. Considerando o crescimento dos ovócitos em duas fases, em que na primeira o ovócito cresce até ser capaz de acumular o vitelo e na segunda o vitelo é depositado, o controlo por inibição da GIH parece exercer-se apenas na segunda fase, sendo a primeira controlada positivamente pela hormona da muda (MH) (Adiyodi e Adiyodi, 1970). Deste modo, os baixos níveis de 20- hidroxiecdisona observados no início do ciclo da muda, poderão sincronizar a vitelogenese secundária e o ciclo da muda (Payen, 1980).

Em conclusão, o crescimento somático e a reprodução, como processos inseparáveis e integrados, necessitam de um mecanismo de controlo estreitamente interligado: o desenvolvimento da gónada é possível através de uma transformação de sinergismo entre a MIH e a GIH, como acontece na pós-muda, para um antagonismo durante a intermuda e que possibilita o desenrolar do processo reprodutivo. A muda é desencadeada quando os níveis das hormonas MIH e GSH são baixos e os níveis das hormonas GIH e MH são elevados; por outro lado, o processo reprodutivo é iniciado quando os níveis das hormonas MIH e GSH são elevados e os níveis das hormonas GIH e MH são baixos. Nos animais ablacionados, a muda acontece se a actividade da hormona GSH estiver suprimida pelo sistema nervoso central (SNC) ou/e pela MH, e a reprodução pode ocorrer se a GSH, por estimulação do SNC, suprimir a acção da MH (Adiyodi e Adiyodi, 1970).

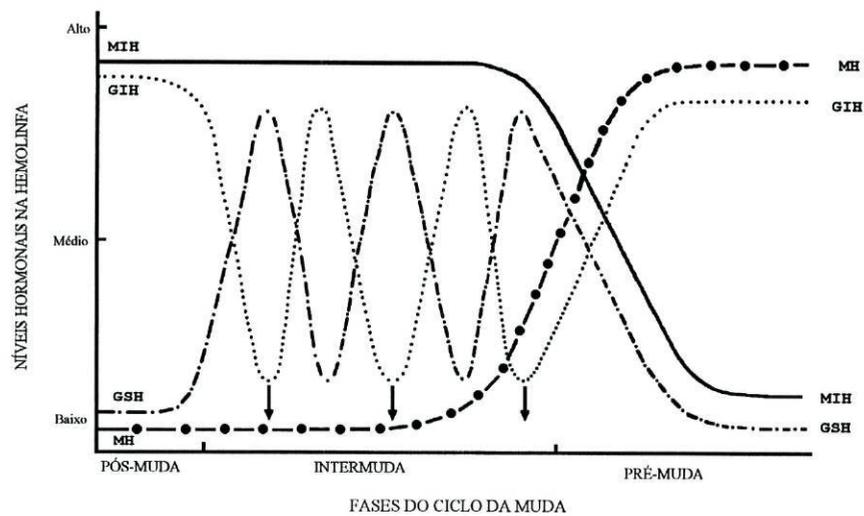


Figura 10. Gráfico simplificado sobre as variações das hormonas MIH, GIH, MH, GSH ao longo do ciclo da muda durante a fase reprodutiva (Adiyodi e Adiyodi, 1970).

Controlo por Estimulação

Hormona Estimuladora da Gónada (GSH) ou Hormona Estimuladora da Vitelogénese (VSH)

Se é certo que nos crustáceos, os principais factores conhecidos do controlo da reprodução se traduzem por uma acção de inibição, foi desde logo pressuposto um mecanismo antagónico, por estimulação, o qual explicaria diferentes respostas na ausência dos factores inibidores.

Sob a influência de neuro-hormonas reprodutivas é iniciada, antes mesmo da fase de intermuda, a síntese selectiva e acumulação na hemolinfa de lipoproteínas específicas das fêmeas utilizadas durante a vitelogénese. O gânglio torácico e o cérebro parecem ser a fonte de uma hormona de estimulação da gónada (GSH), que não é específica nem de sexo nem de espécie (Adiyodi e Adiyodi, 1970). Dado que, actua nas fêmeas a nível da vitelogénese, esta hormona é muitas vezes denominada de hormona estimuladora da vitelogénese (VSH). A hormona estimuladora da vitelogénese (VSH), um neuropéptido antagonista da hormona inibidora da vitelogénese (VIH), é

responsável pela estimulação da incorporação de vitelo e tem um efeito positivo na síntese proteica no ovário (Van Herp e Payen, 1991).

A presença de uma hormona estimuladora da vitelogénese, que deverá ter ainda um papel na inibição da muda, parece explicar a situação dos decápodes aos quais lhes foi retirado o pedúnculo ocular e que manifestam, por um lado, uma vitelogénese precoce e por outro, uma ausência de resposta do órgão Y a qual sem a fonte de MIH dos extirpados pedúnculos, pressupõe a existência de outro mecanismo de inibição. Desta forma, a acção da GSH (VSH) parece ser dupla, promovendo o crescimento do ovócito e inibindo a actividade do órgão Y de uma forma directa, ou então indirectamente aumentando a MIH e/ou diminuindo o nível de GIH (VIH).

Nos machos, a hormona GSH pode estimular a actividade da AG (Adiyodi e Adiyodi, 1970).

Hormona Ovárica Estimuladora da Vitelogenina (VSOH)

Uma hormona ovárica estimuladora da vitelogenina (VSOH), secretada pelas células foliculares secundárias poderá, a exemplo do que acontece nos anfípodes (Payen, 1980), contribuir para a estimulação da síntese de vitelogenina nos crustáceos decápodes (Charniaux-Cotton, 1980; Hasegawa *et al.*, 1993). A sua natureza química é provavelmente um esteróide (Van Herp e Payen, 1991) com uma função semelhante ao 17 β -estradiol nos vertebrados ovíparos (Meusy e Payen, 1988).

Ecdisteróides

Para além da estimulação da muda, tem sido demonstrado que os ecdisteróides circulantes podem ter um papel no endurecimento da carapaça, nas modificações de cor, na regeneração e na maturação da gónada (Adiyodi e Adiyodi, 1970), assim como um papel na estimulação do ovário, na síntese proteica e na produção de vitelogenina (Fingerman, 1987; Van Herp e Payen, 1991; Hasegawa *et al.*, 1993). Finalmente a entrada da vitelogenina no ovócito parece ser também controlada pelos ecdisteróides (Van Herp e Payen, 1991).

A síntese de vitelogenina, que no crustáceo *Orchestia gammarela*, tem lugar no tecido adiposo sub-epidérmico (Junera e Croisille, 1980), é iniciada com uma taxa baixa de 20-OH-Ecdisona e parece ser mantida também com um nível baixo, mas suficiente, desta hormona (Charniaux-Cotton, 1980; Payen, 1980).

Não obstante vários autores terem demonstrado que não é possível a vitelogénese em animais aos quais foram retirados os órgãos Y (produtores de ecdisteróides), continua difícil de definir a relação entre a hormona activa 20-OH-ecdisona e a vitelogénese não havendo ainda hoje provas da sua acção directa na síntese de vitelogenina ou na vitelogénese, nem tão pouco da função e destino dos ecdisteróides (especialmente a ponasterona A) acumulados no ovário no fim da vitelogénese (Meusy e Payen, 1988). Uma das hipóteses poderá ser a sua utilização pelo embrião para a coordenação de vários processos do seu desenvolvimento (Chang, 1991).

O papel dos ecdisteróides na reprodução parece ter sido encontrado como o de estímulo exacto para a reiniciação meiótica na maturação (Lanot e Clédon, 1989). No capítulo 4 será apresentada e discutida, de forma mais completa, a possível intervenção dos ecdisteróides na reprodução dos crustáceos.

Hormonas Esteróides Sexuais do Tipo de Vertebrados

De forma idêntica a vários péptidos originalmente descobertos em vertebrados e posteriormente identificados em invertebrados (endorfinas como a metionina-enkefalina e a leucina-enkefalina e outros opióides, serotonina, norepinefrina e dopamina, somatostatina, vasopresina, gastrina/colecistoquinina, etc.), e devido principalmente, à evolução de várias técnicas de identificação e quantificação (cromatografia, radio e enzimoimunoensaio, imunocitoquímica), diversos esteróides (progesterona, testosterona, estradiol, etc.) têm sido encontrados em vários invertebrados, nomeadamente nos crustáceos.

Além dos esteróides, outras substâncias derivadas dos ácidos gordos, os eicosanóides e especialmente as prostaglandinas, constituem um grupo de hormonas autócrinas que têm sido encontradas em crustáceos e relacionadas com diversas funções, tais como o transporte iónico através da brânquia, vitelogénese ou comportamentos sexuais dos machos (Fingerman *et al.*, 1993).

Juvenóides

Os órgãos mandibulares (MO) dão origem aos compostos terpenóides, farnesoato de metilo e ácido farnesóico, compostos estes estruturalmente relacionados com a hormona juvenil dos insectos. Embora a sua função nos crustáceos ainda não esteja completamente estabelecida, nas fêmeas parece ter um papel estimulador do desenvolvimento do ovário (revisões por Van Herp e Payen, 1991, Fingerman, 1987, 1992 e Borst *et al.*, 1987) e na promoção da vitelogénese, nomeadamente na produção das substâncias vitelinas (Van Herp e Payen, 1991). Curiosamente, os órgãos mandibulares, implicados na secreção dos chamados juvenóides (farnesoato de metilo), contêm 17β -estradiol e progesterona (Couch *et al.*, 1987).

Hormona Androgénica

Foram várias as substâncias implicadas nas secreções desta glândula (de natureza polipeptídica a factores lipídicos), não havendo no momento acordo quer quanto à natureza química, quer quanto ao modo de secreção da hormona androgénica, a qual no entanto, não parece ser específica de espécie (Adiyodi e Adiyodi, 1970; Fingerman, 1987, 1992; Payen, 1980).

Como já foi referido, esta hormona controla a diferenciação dos testículos, o primórdio do ducto espermático, a manutenção do tecido germinativo e conseqüente espermatogénese, assim como determina as características sexuais secundárias e comportamentais (Adiyodi e Adiyodi, 1970; Fingerman, 1987).

O efeito inibidor da hormona GIH nos testículos é indirectamente mediada através da glândula androgénica (AG). A hormona estimuladora da gónada (GSH) pode estimular a actividade da AG (Adiyodi e Adiyodi, 1970).

A hormona androgénica, embora evidentemente não possa ser considerada um factor normal para o controlo da vitelogénese, quando administrada em fêmeas produz um efeito inibidor (directa ou indirectamente) na síntese da vitelogenina (Meusy e Payen, 1988).

Factores dos Machos Estimuladores do Ovário e Feromonas Sexuais

Sinais de natureza diversa (química, visual, acústica, olfactiva e táctil) são exibidos pelos crustáceos, de forma a serem reconhecidos e atraídos os possíveis parceiros sexuais resultando na cópula, sem a qual todos os processos do desenvolvimento reprodutivo até aqui descritos não teriam qualquer sentido. Várias feromonas, enquanto substâncias libertadas por um organismo que influencia o comportamento de outros organismos da mesma espécie, foram já detectadas nos crustáceos e induzem comportamentos pré-copulatórios nos machos (revisão por Dunham, 1978).

Constituindo as condições climáticas locais um factor restritivo que condiciona e limita a época reprodutiva, o período de cópula é ainda mais restrito, sendo determinado pela receptividade das fêmeas e respectiva resposta comportamental dos machos, ambas dependendo do respectivo estado fisiológico (muda e desenvolvimento ovárico). Enquanto em algumas espécies as fêmeas são impregnadas (deposição do espermatóforo) apenas imediatamente após a muda, noutras isso acontece durante a intermuda, com a carapaça rígida (Meusy e Payen, 1988). É interessante realçar que, normalmente, o fluído da muda, composto por aminoácidos, enzimas e outros componentes orgânicos derivados da digestão parcial da velha carapaça, constitui um atractivo e estimulante do apetite nestes animais (Chang, 1991), e daí que na época reprodutora seja fundamental, para as fêmeas, a existência de uma “mensagem” que promova um comportamento protector pela parte de um macho.

Neste tipo de comunicação química, as poucas evidências disponíveis dizem respeito à sua origem (nas glândulas antenais) e à sua detecção, por receptores antenulares. Não só ainda não foi identificada nenhuma substância particular com função de feromona, como também as evidências na implicação dos ecdisteróides como feromonas são inconclusivas (Dunham, 1978; Meusy e Payen, 1988).

Várias aminas biogénicas, como a serotonina (5-HT), conhecidas pelo seu papel nos mecanismos de libertação de várias neuro-hormonas (Fingerman, 1987; 1992), parecem envolvidas em respostas comportamentais específicas que precedem a cópula (Laufer e Landau, 1991).

Foi ainda verificada, ainda que de forma indirecta, a existência de uma feromona, nos testículos e canais deferentes de uma espécie de camarão de água doce,

que estimula o ovário (Takayanagi *et al.*, 1986, *in* Van Herp e Payen, 1991), assim como a presença dos machos de um isópode parece acelerar o desenvolvimento do ovário nas fêmeas (Jassen *et al.*, 1982 *in* Meusy e Payen, 1988).

Factores Ambientais (Luz e Temperatura)

De uma forma geral, o estímulo para o início da fase reprodutiva é o aumento da duração do dia (Laubier, 1987: *Penaeus japonicus* e *P. kerathurus*; Ogle, 1992: *P. vannamei*). No entanto, a temperatura parece ter também um efeito na reprodução, ainda que de forma indirecta (Meusy e Payen, 1988). Embora não haja dúvidas de que os factores ambientais actuam *via* hormona inibidora da vitelogénese (VIH), possivelmente em conjunto com outras neuro-hormonas, a relação entre os receptores dos factores ambientais e o sistema neuro-secretor continua por estabelecer.

Controlo da Maturação e Ovulação

Embora a existência de um controlo hormonal específico para o final da vitelogénese ou para a maturação não tenha ainda sido demonstrada (Charniaux-Cotton, 1980; Payen, 1980), os últimos trabalhos sobre o papel dos ecdisteróides na reprodução indicam uma acção específica destas hormonas na primeira reiniciação meiótica (profase I) (Lanot e Clédon, 1989), característica principal da maturação do ovócito.

Papel da Nutrição na Reprodução

A importância da nutrição, como factor na maturação ovárica dos crustáceos, sejam selvagens ou cultivados, está detalhadamente avaliada na recente revisão de Harrison (1990). Este autor revela a inexistência de dietas completas adequadas às necessidades da reprodução nestes animais, e daí o actual recorrer à suplementação com alimentos naturais, frescos ou por vezes congelados (lulas, bivalves, poliquetas, etc.), no sentido de proporcionar uma dieta adequada aos progenitores e promover a maturação.

Este aspecto será abordado em pormenor no capítulo 6, no qual são apresentados resultados do teor hormonal (ecdisteróides e esteróides sexuais) em poliquetas, utilizadas em aquacultura para provocar a desova de crustáceos peneídeos.

Objectivos da Linha de Investigação

De uma forma geral, a investigação sobre a reprodução nas fêmeas de crustáceos reparte-se em cinco áreas principais (Meusy e Payen, 1988):

- 1. Mecanismo da diferenciação do ovário.
- 2. Sequência morfológica das etapas que conduzem e constituem a vitelogénese, a maturação do ovócito e a sua activação.
- 3. Regulação endócrina do início, manutenção e finalização das diferentes etapas da ovogénese.
- 4. Influência dos factores externos como o fotoperíodo, temperatura, concentração iónica da água do mar na gametogénese.
- 5. Resposta específica da superfície do ovócito ao espermatozóide que conduz à fertilização.

Neste trabalho foram focados principalmente dois destes aspectos:

A) Sequência morfológica das etapas que conduzem e constituem a vitelogénese, a maturação do ovócito e a sua activação:

Procedemos por um lado, ao estudo do desenvolvimento do ovário durante a época reprodutiva, através da microscopia óptica, com o objectivo do estabelecimento das distintas fases da vitelogénese (capítulo 1), e por outro, através da microscopia electrónica de transmissão, ao estudo ultraestrutural da ovogénese e foliculogénese, com particular interesse pela origem e acumulação do vitelo, pela formação das especializações corticais (criptas e vesículas corticais) que na activação do ovócito originam o invólucro de fertilização (capítulo 2).

B) Regulação endócrina do início, manutenção e finalização das diferentes etapas da ovogénese:

Relativamente a esta importante área de investigação, que nos crustáceos apresenta enormes lacunas, a atenção foi centrada num tipo de hormonas, os esteróides. Estes, quer através do frequente paralelismo com os dados já estabelecidos nos insectos (ecdisteróides) (capítulo 4), quer por analogia com o seu papel nos vertebrados (esteróides sexuais do tipo de vertebrados) (capítulo 5), parecem estar envolvidos na reprodução. Com o objectivo de quantificar estes dois tipos de hormonas, em pequenas quantidades de amostra (estudos individuais e não em “pools”), foi desenvolvida uma técnica de extração, purificação e separação simultânea de ecdisteróides e esteróides sexuais (capítulo 3).

Finalmente, e considerando a nutrição como um factor externo que influencia a reprodução, são apresentados resultados preliminares da possível transferência de hormonas esteróides *via* alimentação, uma vez que estas foram quantificadas em níveis consideráveis em poliquetas (*Nereis diversicolor* e *Americanuphis magna*). Estas poliquetas são frequentemente utilizadas na dieta de fêmeas em cativeiro, com o resultado final de uma rápida indução da maturação ovárica (capítulo 6).

Constitui um objectivo deste trabalho o estabelecimento de parâmetros normais de evolução de dois aspectos, sempre intimamente ligados, morfologia/função, do ovário, ao longo do seu desenvolvimento. Para tal foram utilizando animais selvagens capturados no meio natural e de importância económica nas nossas pescas (a espécie autóctone *Penaeus kerathurus*) assim como de outra espécie utilizada em aquacultura (*Penaeus japonicus*) e cujos exemplares de estudo foram capturados em tanques de terra batida utilizados para a sua produção (Material e Métodos). Pensamos que desta forma, os resultados de futuros trabalhos utilizando uma metodologia mais interventiva (manipulações de factores externos e internos), poderão ser comparados com os presentemente obtidos em situações o mais próximas da normalidade dos processos no ambiente natural.

Realçamos o interesse, a nosso ver, do estudo dos fenómenos primordiais que caracterizam a ovogénese e a sua regulação nestes animais não apenas pela importância no aspecto de conhecimentos básicos e de investigação fundamental mas principalmente tendo em vista a sua aplicação em aquacultura. De facto, sem os conhecimentos que permitam o completo controlo da reprodução em cativeiro dos

crustáceos de interesse económico (principalmente os decápodes) a sua produção industrial será sempre limitada.

Em resumo, os estudos sobre o controlo neuro-endócrino da reprodução de crustáceos são importantes em nosso entender, quer pelo interesse fundamental dos mecanismos envolvidos quer principalmente pela sua aplicação na produção em aquacultura destes organismos de elevado interesse económico. Dada a especificidade entre diferentes grupos sistemáticos e mesmo entre espécies, os estudos sobre a reprodução nos crustáceos, nomeadamente do perfil das hormonas intervenientes neste processo, nos tecidos produtores, na hemolinfa e nos tecidos-alvo, em diferentes ciclos biológicos (crescimento e reprodução), terá vantagens na escolha, para modelo experimental, de espécies com potencial para a aquacultura ou de espécies autóctones de importância pesqueira.

Material Biológico

Espécies estudadas: Penaeus japonicus e P. kerathurus

As espécies escolhidas para este estudo, foram os peneídeos *Penaeus japonicus* e *P. kerathurus*, cuja posição sistemática é indicada na Tabela 2. A ordem decápoda é ainda dividida, segundo Zariquiey (1968), em duas super-seções, Natantia e Reptantia, pertencendo a família dos Penaeidae aos Natantia (Lumare, 1988).

Tabela 2. Classificação sistemática das espécies estudadas, segundo Waterman e Chace, 1960 (in Parker, 1992).

Phylum	Arthropoda
(Sub-phyla) Classe	Crustacea
Sub-classe	Malacostraca
Ordem	Decapoda
Sub-ordem	Dendrobranchiata
Superfamília	<i>Penaeoidea</i>
Família	<i>Penaeidae</i>
Género	<i>Penaeus</i>
Espécie	<i>Penaeus japonicus</i> <i>P. kerathurus</i>

***Penaeus japonicus* Bate, 1888**

Esta espécie foi escolhida como material experimental dada a sua utilização em aquacultura. É uma espécie de ampla distribuição geográfica, para a qual conta com a sua resistência a baixas temperaturas e adaptação a um amplo intervalo de salinidade (5-

50‰). Originária do Japão, esta espécie pode ser encontrada hoje em dia no Mediterrâneo, tendo passado possivelmente o Canal do Suez. Vive nas zonas costeiras e estuarinas, em fundos arenosos, é carnívora e tem uma longevidade média de cerca de 2 anos. Possui uma carapaça lisa e brilhante. Apresenta dez listas castanhas ao longo do cefalotórax e do abdómen. O telson é azul, amarelo e castanho. O cefalotórax termina num forte rostro com 8 a 10 dentes dorsais e 1 a 2 no bordo ventral.

Na fêmea, o téllico é fechado e de forma tubular. No macho, o petasma apresenta no vértice dos seus lobos medianos protuberâncias bem desenvolvidas. A carena rostral divide-se em duas carenas pós-rostrais com um marcado sulco pós-rostral, que não atinge completamente a margem posterior da carapaça. O abdómen é dorsalmente carenado desde a metade superior do quarto segmento até ao fim do sexto segmento. O telson tem um sulco mediano e apresenta três pares de espinhas laterais.

***Penaeus kerathurus* (Forskål, 1775)**

Espécie autóctone do Mediterrâneo e do Atlântico Oriental, desde Portugal a Angola, vive nas zonas costeiras, em fundos arenosos, entre 5 e 50 metros. A sua morfologia é muito semelhante à do *P. japonicus*. O rostro, robusto, apresenta 9 a 11 dentes dorsais e 1 ventral.

Nesta espécie, e constituindo um elemento que permite a distinção entre as duas espécies, a carena cervical aproxima-se muito à carena rostral. O duplo sulco pós-rostral, o qual atinge a margem posterior da carapaça, também constitui um elemento diferenciador da espécie *P. japonicus*. A espécie *P. kerathurus* possui também bandas transversais mais escuras e colorações vivas nas margens posteriores dos urópodes e no telson. Na fêmea, o téllico é fechado e formado por duas peças.

Material biológico. Processamento dos tecidos

Neste trabalho foram utilizadas apenas fêmeas das espécies *Penaeus japonicus* e *P. kerathurus*. Os espécimens de *P. japonicus*, provenientes quer de uma empresa do sul de Espanha, quer da empresa algarvia Eurodáqua, foram transportados vivos até ao laboratório. Numa fase inicial este transporte foi efectuado em sacos de plástico com água do mar, dentro de malas isotérmicas, nas quais era colocada previamente uma mistura de gelo e serrim (ou aparas de madeira). A água do mar, contendo os animais, foi continuamente oxigenada através de pedras difusoras ligadas a uma garrafa de ar comprimido (ou mesmo oxigénio clínico).

Numa fase posterior foram tentados com êxito transportes "a seco". Os animais foram colocados em caixas de "esferovite", lado a lado, e em várias camadas alternadas com uma mistura de gelo, sal e serrim (com o objectivo de atrasar a descongelação). Desta forma, o transporte foi facilitado (ausência de água do mar, garrafas de oxigénio, tubos e pedras difusoras), assim como alguns riscos eliminados (em alguns transportes faltou oxigenação ou a água aqueceu demais, ocasionando mortalidades de quase 100%) e, como consequência, a sobrevivência foi superior. No entanto, e salvo alguns transportes de animais em água mal sucedidos, a mortalidade foi sempre inferior a 10%.

Em Portugal, a espécie autóctone *P. kerathurus* é pescada na costa algarvia sobretudo através da pesca artesanal (barcos de pequeno porte). No entanto, a sua pesca está proibida durante a época de reprodução. Daí termos optado por uma solução alternativa: a aquisição desta espécie em Espanha, país no qual não há época de defeso para estes animais. Os exemplares de fêmeas necessárias ao nosso trabalho foram adquiridos através de uma colaboração com a equipa do Dr. José Maria San Feliú do Instituto de Acuicultura de Torre la Sal, Castellón, Espanha.

A pesca de arrasto ao camarão só é iniciada, depois de haver indícios de que os animais estão nos bancos de pesca tradicionais, a caminho da sua migração em direcção

às zonas estuarinas para a desova. Durante a pesca, que é nocturna, à medida que eram levantadas as redes os animais foram retirados das malhas e colocados em bacias com água do mar. Só assim foi possível obter animais vivos até à sua recolha (normalmente cerca das 9 horas da manhã) na lota. Os animais foram transportados até ao laboratório do Instituto de Acuicultura de Torre la Sal (que dista cerca de 15 km da lota de Castellón) em tanques de plástico com água do mar com arejamento.

No laboratório os animais de ambas as espécies foram recolhidos um a um, envolvidos em papel de estanho e colocados em gelo durante 2 a 3 minutos, de forma a reduzir a sua actividade.

Em seguida foi retirada uma amostra de hemolinfa: utilizando uma seringa descartável de 2.5 cc, com cerca de 400 µl de NEM (N-Etilmaleimida, 0.2 M em 3% de NaCl) como anticoagulante, a hemolinfa foi retirada quer do coração, localizado ventralmente à cutícula dorsal cefalotorácica e dorso-posteriormente ao hepatopâncreas, quer da aorta ventral abdominal. Esta última opção, mostrou-se mais eficaz dado a localização do hepatopâncreas ventralmente ao coração com riscos de contaminação da hemolinfa e o facto de que nos animais cuja gónada se encontrava bem desenvolvida o ovário cobrir completamente o coração dificultando o procedimento. As amostras de hemolinfa, com um volume de cerca de 1000 a 1500 µl, foram guardadas em tubos ependorfes e congeladas imediatamente.

De seguida, os animais foram medidos: comprimento total (do início do rostro ao final do telson), comprimento do cefalotórax (do início do rostro ao bordo dorsal posterior do cefalotórax), comprimento total pós-orbitário (da espinha pós-orbital ao final do telson) e comprimento pós-orbitário do cefalotórax (da espinha pós-orbital ao bordo dorsal posterior do cefalotórax). As medidas pós-orbitárias são utilizadas quando os rostra estão partidos, situação frequente nos animais pescados por redes de arrasto.

Depois de medidos, os animais foram pesados. Em seguida foram retirados vários órgãos que depois de secos com papel absorvente foram pesados. Dos ovários,

depois de pesados, foi retirada uma pequena porção para histologia óptica e em alguns casos outra mais pequena para microscopia electrónica.

Os órgãos assim obtidos foram congelados e posteriormente liofilizados. As amostras liofilizadas foram guardadas em frascos de vidro num excicador até serem analisadas.

Parte I - Morfologia

*Identificação das Fases de Desenvolvimento do Ovário
das Espécies Penaeus japonicus e P. kerathurus*

Introdução

O aparelho reprodutivo da fêmea de um crustáceo decápode típico consiste num par de ovários e seus oviductos associados, terminando num par de gonadoporos situados na base do terceiro par de pereiópodes. Os crustáceos peneídeos possuem uma estrutura especializada para a recepção de esperma, o téllico. Esta modificação externa das placas esternais torácicas posteriores, que em algumas espécies é aberta ventralmente, tem como função receber o espermatófero (estrutura para transporte e armazenagem de esperma). Noutras espécies o téllico é fechado e cobre um espaço, o receptáculo seminal ou espermateca, no qual o esperma é armazenado desde a cópula até à fecundação (Krol *et al.*, 1992).

Nos decápodes, os ovários situam-se dorsalmente ao intestino. Nos decápodes peneídeos, o ovário estende-se desde o cefalotórax ao longo de todo o abdómen até ao telso. Nestas espécies o ovário está parcialmente fundido na região cefalotorácica e consiste num par de extensões (cornos) antero-laterais e vários lóbulos laterais (Talbot, 1981a). Um par de lóbulos estende-se ao longo do todo o comprimento do abdómen (ver figura 5c da Introdução Geral).

Uma cápsula (ou parede) de uma ou mais camadas de tecido conjuntivo envolve o ovário dos decápodes (nos lagostins de água doce dos géneros *Cambarus* sp., *Orconectes* sp. e *Procambarus* sp.: Beams e Kessel, 1963; *Astacus astacus* e *A. leptodactylus*: Zerbib, 1979; *Procambarus clarkii*: Kulkarni *et al.*, 1991; na lagosta *Homarus americanus*: Talbot, 1981a; no caranguejo *Ranina ranina*: Minagawa *et al.*, 1993). Nesta parede podem ser também observados vasos, seios hemais e hemócitos livres (Talbot, 1981a). Muito embora não exista geralmente nos crustáceos, de uma forma geral, uma camada de tecido muscular a envolver o ovário (revisão de Krol *et al.*, 1992) na lagosta *Homarus americanus*, a parede do ovário possui células musculares não estriadas, mas contendo microtúbulos, que poderão ter como função a expulsão dos ovócitos maduros para o lúmen durante a desova, ou a circulação da hemolinfa através

dos vasos e seios hemais do ovário (Talbot, 1981a). Encerrado por esta parede encontra-se o epitélio germinativo do qual se originam as oogónias e as células foliculares.

Na face luminal do ovário, junto a uma delgada lâmina basal, situa-se uma fina camada de células epiteliais aplanadas que se projectam em direcção à parede. Estas células epiteliais são contínuas (assim como lhes podem dar origem) com as células foliculares que rodeiam o ovócito (Talbot, 1981a).

Nos peneídeos, o ovário é ainda separado por extensões de tecido conjuntivo em sub-unidades - nódulos ou cistos - constituídos por células foliculares e germinais em desenvolvimento. Entre estas sub-unidades de ovócitos rodeados de células foliculares encontram-se vasos e seios hemais assim como hemócitos livres. No caso da lagosta *Homarus americanus* esta divisão é produzida por extensões da parede do ovário compostas por vasos e células musculares que se projectam na região folicular e se inserem na parede e epitélio do folículo (Talbot, 1981a).

Na maior parte dos crustáceos decápodes, o epitélio germinal está situado periférica ou centralmente no ovário. Esta camada germinal de oogónias que constitui a zona de proliferação, pode ter diferentes localizações em diferentes espécies devido à pressão exercida pelo crescimento dos ovócitos em desenvolvimento vitelogénico. A localização periférica desta zona germinativa pode ser deslocada para uma posição central no ovário numa fêmea adulta pelo crescimento e diferenciação dos ovócitos (Charniaux-Cotton, 1980). As oogónias e os ovócitos previtelogénicos dos braquiúros (caranguejos), situam-se na região central dos ovários e à medida que se diferenciam, os ovócitos e as células foliculares que os rodeiam tomam uma localização mais periférica (*Libinia emarginata*: Hinsch e Cone, 1969; *Ranina ranina*: Minagawa *et al.*, 1993). Na lagosta, *Homarus americanus*, os folículos maduros situam-se junto à parede do ovário (extendendo-se em direcção ao lúmen), adjacente a estes localizam-se os folículos de desenvolvimento intermédio e os folículos mais pequenos junto ao lúmen (Talbot, 1981a).

As células foliculares, de origem mesodérmica, são as únicas células não-germinativas dentro do limite das paredes do ovário. Com o desenrolar da vitelogénese

e o crescimento dos ovócitos, as células foliculares deslocam-se do epitélio germinativo para a zona de crescimento e reúnem-se finalmente na periferia de cada ovócito - foliculogénese secundária (Favel, 1981). A vitelogénese secundária é iniciada com a foliculogénese secundária (Charniaux-Cotton, 1980). Estas células, durante a vitelogénese, tornam-se aplanadas e formam uma camada unicelular a rodear cada ovócito (Rankin e Davis, 1990).

Ovogénese

Durante toda a vida reprodutiva da fêmea, grupos de oogónias secundárias são produzidas por mitose na zona germinal onde são mantidas até que a desova ou uma resposta sexual desencadeie a gametogénese.

Quando as oogónias deixam a zona germinativa entram imediatamente em profase I da primeira meiose e evoluem desde oogónias imaturas, com grandes núcleos redondos contendo cromatina granular, até ovócitos previtelogénicos com núcleos centrais e com grandes nucléolos (Rankin e Davis, 1990). Assim, a divisão celular interrompe-se no estágio de paquíteno da profase I e a actividade metabólica do ovócito primário sobrepõe-se à actividade de divisão meiótica. Neste ponto ocorrem várias modificações citoplasmáticas e nucleares, os ovócitos aumentam de tamanho e tomam a sua posição final dentro do ovário – é a fase da ovogénese denominada de vitelogénese e que consiste na acumulação e síntese de grandes quantidades de vitelo no ovócito.

Quando os ovócitos maduram ocorre a ovulação que é definida como a separação entre o ovócito e as células (Yano, 1988; Chow *et al.*, 1993). Um comportamento de pré-desova, uma natação persistente ao longo da coluna de água, que é iniciada pela obscuridade, foi altamente correlacionada no decápode peneídeo, *Sicyonia ingentis*, com a ovulação (Pillai *et al.*, 1988). Os ovócitos são ovulados no início da fase de maturação e após a ovulação a divisão meiotica progride até à metafase da primeira divisão de maturação (Yano, 1988). Na espécie *Homarus americanus*, a ovulação parece ser iniciada pelo efeito da colagenase na fina lâmina basal de tecido conjuntivo que rodeia as células foliculares (Talbot, 1981b).

A cisão da vesícula germinal (GBVD), que é iniciada na fase final da pré-maturação e que continua até à última fase da maturação imediatamente antes da desova, pode durar 5 a 11 horas, mas o tempo desde a ovulação até à metafase meiótica e desova pode ser extremamente curto na espécie *Penaeus japonicus* (Yano, 1988). De forma idêntica, na espécie *Penaeus setiferus*, a fase de cisão da vesícula germinal dura menos de 12 horas e a ovulação pode ocorrer em poucos minutos ou mesmo simultânea com a desova (Chow *et al.*, 1993).

A desova nas fêmeas do peneídeo *Sicyonia ingentis*, que apresentam um comportamento de natação activa (dito de pré-desova) e com os oviductos de cor verde, indicando ter ovulado e possuir ovócitos livres no oviducto, pode ser induzida através da abertura, forçada fisicamente, de apenas um dos gonadoporos ("probing"), não afectando esta manipulação a qualidade dos ovos nem a percentagem de fertilização (Pillai *et al.*, 1988).

Os ovócitos maduros que não são libertados na desova são reabsorvidos. No camarão peneídeo *Penaeus japonicus*, em condições de cultivo em tanques, esta reabsorção assim como a reparação do ovário ocorrem durante o processo de rematuração que rapidamente se segue à desova, o qual compreende três fases (Yano, 1984): 1- absorção dos ovos maduros remanescentes e reparação do ovário, 2- aparecimento de ovócitos no estágio I de globulo de lípido, aumento do número e rápido crescimento das células foliculares e 3- acumulação de grânulos de vitelo no citoplasma dos ovócitos.

No caranguejo *Ranina ranina* os jovens ovócitos, junto ao parênquima iniciam o seu crescimento após os ovócitos remanescentes da desova terem sido reabsorvidos, processo que nesta espécie ocorre quer por autólise quer por acção de células foliculares hipertróficas (Minagawa *et al.*, 1993).

No entanto, parece haver uma diferença, após a desova, nos ovários de animais não manipulados e de animais aos quais foi ablacionado o pedúnculo ocular, técnica usada na cultura de peneídeos para acelerar a maturação e desova (Tan-Fermin, 1991). Nestes últimos são encontrados ovócitos em todos os estádios de maturação 2 horas

após a desova, facto que pode ser explicado quer pela existência de um certo número de ovócitos ainda não maduros quer pelo início de um novo ciclo de maturação antes do anterior ter finalizado (Vougt *et al.*, 1989: *Penaeus monodon*). Estes resultados foram confirmados, também em fêmeas de *Penaeus monodon*, selvagens não-manipuladas, selvagens ablacionadas e de cultura, nas quais as ablacionadas a rematuração é significativamente mais rápida e logo as sucessivas desovas mais frequentes mas com menor número de ovos, não tendo sido encontradas diferenças no tipo e aparência entre ovócitos nos mesmos estádios de desenvolvimento do ovário (Tan-Fermin, 1991).

Igualmente, não foi encontrada em fêmeas de *Penaeus notialis*, diferenças na morfologia dos ovócitos maduros procedentes de desenvolvimento ovárico natural ou induzido por ablação ocular, salvo uma maior regularidade na disposição das vesículas corticais (Trujillo e Gómez, 1986).

Crítérios de divisão do desenvolvimento do ovário

O desenvolvimento do ovário pode ser dividido numa fase proliferativa, na qual as oogónias são produzidas continuamente na zona germinativa, e numa fase diferenciativa que corresponde ao abandono da zona germinativa, dando lugar às oogónias (bloqueadas na profase meiótica) e ao seu desenvolvimento desde um estádio previtelogénico até à maturação (Charniaux-Cotton, 1980).

Meusy e Payen (1988) dividem a fase diferenciativa em quatro estádios: 1. previtelogénese, 2. vitelogénese, 3. crescimento do ovócito e 4. maturação.

Tan-Fermin e Pudera (1989), baseando-se em critérios qualitativos (histologia e histoquímica) e quantitativos (morfometria) propuseram quatro estádios de maturação do ovário no *Penaeus monodon*: previtelogénico (P), vitelogénico (V), bastonetes corticais (C) e desova (S).

As classificações do estado de desenvolvimento ovárico, utilizando características de escala macroscópica, como por exemplo, côr e tamanho do ovário

visto através da carapaça, tem tido uma importância fundamental, quer para a aquacultura quer para a pesca. Relacionando o resultado de examinações microscópicas, diâmetro médio dos ovócitos, índice gónado-somático e côr da gónada fresca logo após a disseção, com o aspecto e côr do ovário através do exoesqueleto, Levi e Vacchi (1988) propuseram uma divisão de I a IV para o desenvolvimento ovárico da espécie *Aristaeomorpha foliacea*, um decápode peneido de grande importância económica na pesca profissional. A distribuição de frequências de classes de diâmetros de ovócitos encontrados em ovários, de fêmeas de *Penaeus notialis*, previamente classificados de I a IV e a resultante bimodal, permitiu a Trujillo e Gómez (1986) encontrar o diâmetro mínimo de 110 μ m para o ovócito maduro.

Numa revisão de 1980, Charniaux-Cotton descreve a ovogénese em seis fases:

1. Ovogónia; 2. Profase meiótica; 3. Previtelogénese; 4. Vitelogénese primária ou endógena; 5. Vitelogénese secundária e 6. Maturação.

Utilizando a espécie *Penaeus japonicus*, Yano (1988) propôs a seguinte classificação do desenvolvimento do ovário, tendo em conta os vários estádios de desenvolvimento dos ovócitos, assim como das características das células foliculares envolventes:

A) Ovários não desenvolvidos- Fase de multiplicação:

1. Estádio sináptico- formação dos característicos nucléolos em forma de meia-lua.

B) Ovários no início de desenvolvimento- Fase de previtelogénese:

2. Estádio de cromatina nucleolar - aparecimento no núcleo de um nucléolo redondo.
3. Estádio inicial perinucleolar - aumento de nucléolos no núcleo.
4. Estádio tardio perinucleolar - células foliculares envolvem o ovócito.

C) Ovários em desenvolvimento- Fase de vitelogénese primária:

5. Estádio I de glóbulo lipídico - rápida expansão das células foliculares, retração do núcleo e aparecimento de globulos lipídicos.
6. Estádio II de glóbulo lipídico - ligeiro achatamento das células foliculares e re-expansão do retraído núcleo.
7. Estádio de ausência de vitelo (yolkless stage) - maior achatamento das células foliculares, aparecimento de vesículas e continuação da expansão nuclear.

D) Ovários quase maduros- Fase de vitelogénese secundária:

8. Estádio de granulo de vitelo - acumulação de vesículas de vitelo e continuação da expansão nuclear.
9. Estádio de pré-maturação - aparecimento e alongamento em forma de bastonete das vesículas corticais, aplanamento das células foliculares, retração e migração do núcleo.

E) Ovários maduros- Fase de maturação:

10. Estádio de maturação - ovulação e aparecimento da camada vitelina, continuação da migração do núcleo e progressão da divisão meiótica até à metafase da primeira divisão de maturação.

No caranguejo da espécie *Ranina ranina* a ovógenese foi também dividida, de forma muito semelhante, em 5 fases subdivididas em 10 estádios, com base fundamentalmente nas alterações no núcleo, grau de formação de vitelo e sua afinidade a diferentes corantes (Minagawa *et al.*, 1993): I - Proliferação (1. oogónias), II - previtelogénese (2. "bouquet "-cromatina em forma de "meia lua"; 3. cromatina nucleolar inicial; 4. cromatina nucleolar tardia), III - vitelogénese primária (5. glóbulo lipídico; 6. granulo de vitelo); IV - vitelogénese secundária (7. disco (platelet) de vitelo

primário; 8. disco de vitelo secundário; 9. prematuração) e V - maturação (10. maturação).

No lagostim de água doce, *Procambarus clarkii*, foram caracterizadas 7 fases morfológicamente distintas durante a ovogénese (Kulkarni *et al.*, 1991): 1. ovogonial, 2. imaturo, 3. avitelogénico, 4. vitelogénico inicial, 5. vitelogénico intermédio, 6. vitelogénico tardio, e 7. post-vitelogénico e em reabsorção.

O objectivo do nosso trabalho consistiu no estudo do desenvolvimento do ovário de duas espécies de peneídeos (*Penaeus japonicus* e *P. kerathurus*) na época de reprodução destes animais, daí que o estudo da ovogénese é particularmente centrado no crescimento (vitelogénese) e maturação dos ovócitos. O estudo do desenvolvimento do ovário através da histologia deste órgão tem como finalidade a identificação da fase vitelogénica, de forma a ser relacionada com os níveis de várias hormonas ecdisteróides e esteróides. Dada a relativa diversidade de critérios utilizados por vários autores anteriormente descrita e conseqüentemente do número e significado das fases vitelogénicas, estabelecemos e caracterizamos (comparativamente com os resultados de outros autores) cinco fases vitelogénicas. Dos grupos assim formados foram seleccionados para o estudo endocrinológico apenas os animais com características muito semelhantes, quer relativamente ao principal critério que foi o desenvolvimento dos ovócitos, quer ao seu tamanho/peso e conseqüentemente o seu índice gonado-somático (peso do ovário/peso do animal \times 100).

Material e Métodos

Segundo o material utilizado para a inclusão, foram desenvolvidas basicamente duas técnicas histológicas para a microscopia óptica:

A - Blocos em parafina

B - Blocos em plástico

A - Blocos em parafina

As amostras de ovário, para identificação da fase vitelogénica das fêmeas das duas espécies estudadas, foram fixadas em Bouin ou DFA durante 24 horas.

Bouin

Solução saturada de Ácido Pírico	15 cc
Formol	4 cc
Ácido Acético	1 cc

DFA (Davidson's A.F.A.)

Álcool Etilico	300 ml
Formol	220 "
Ácido Acético Glacial	115 "
Água Destilada	335 "

Depois de fixadas, as amostras foram desidratadas por uma série ascendente de alcoóis (álcool 75° - 1 hora; 90° - 30 minutos; 95° - 90 minutos e álcool absoluto- 90 minutos (onde foram efectuadas 2 renovações). A impregnação foi realizada com parafina (ponto de fusão 56-58°C), durante 30 minutos, num primeiro banho seguida de 3 horas num segundo banho. A inclusão foi feita em moldes SHANDON. Os cortes histológicos foram realizados com um micrótomo manual (Minot), tendo sido obtida a espessura de cerca de 5 a 7 µm. Posteriormente os cortes foram colados com água albuminada seguindo-se a secagem numa estufa a 37°C durante a noite. Para se proceder à coloração das lâminas, estas foram previamente desparafinadas através de um banho de xilol durante 15 minutos (ou na estufa a 37°C para desparafinar mais rapidamente), e rehidratadas com uma série descendente de alcoóis (álcool absoluto - 2

min.; álcool a 95° - 2 min.; álcool a 90° - 2 min.; água corrente (até a peça ficar branca) e finalmente água destilada durante 4 minutos.

Para a coloração das lâminas foram utilizadas 3 técnicas distintas:

- a) coloração hemalúmen-eosina (Hemalúmen Mayer-Merk)
- b) coloração de Cleveland-Wolfe
- c) coloração mista de Azul de Alciano e Schiff-PAS.

a) Coloração Hemalúmen-Eosina

Foi a coloração mais utilizada, dada a sua simplicidade aliada à distinção de células basófilas e células eosinófilas.

As lâminas foram mergulhadas numa tina com hemalúmen (hematoxilina Mc Gill) durante cerca de 2 minutos, lavada com água corrente durante 10 minutos. De forma a retirar o excesso de hemalúmen, foram colocadas umas gotas de uma solução de HCl a 1% em álcool a 70° sobre as preparações. Depois foram lavadas em água destilada durante 5 minutos. Seguiu-se um banho numa tina com eosina (em solução aquosa a 1% e com uma gota de ácido acético glacial na tina de coloração) durante 2 minutos. Depois procedeu-se à lavagem em água destilada durante 5 minutos (mudando a água até deixar de ter cor). Depois deste passo segue-se a desidratação, montagem, secagem e rotulagem.

Hemalúmen

Hemateína	0.2 g
Alumínio Potássico	5.0 g
Água Destilada	100 ml

ferver, filtrar e juntar 2 ml de ácido acético.

b) Coloração de Cleveland-Wolfe

É um tipo de coloração tricrômica. Um dos resultados desta coloração é a diferenciação das duas variedades de células acidófilas: umas aparecem em rosa e outras em laranja.

Após a série descendente de alcoóis (desidratação), as lâminas passaram por Lugol (2 g de iodo e 3 g de iodeto de potássio em 100 ml de água destilada) durante 3 minutos seguidas de um banho de hidrogeno sulfito de sódio (NaHSO₃ -5% em H₂O) até descolorar. Seguiu-se uma lavagem em água corrente durante 5 minutos. Coloração com Hemalúmen durante 5 minutos seguindo-se nova lavagem em água corrente (5 min. mínimo) até ao aparecimento de uma coloração azul. As lâminas passaram por água destilada sendo posteriormente colocadas numa tina com Eritrosina a 1% durante 5 a 10 minutos. Seguiu-se nova lavagem em água destilada. Os cortes foram diferenciados rapidamente (2 minutos) em Orange G (2 g em 100 cc. de ácido fosfotúngstico a 1%) e lavados em água destilada. Seguidamente foram tratados com Azul de Anilina 1% (1 g de azul de anilina em 100 ml de água destilada- aquecer até à ebulição, filtrar e juntar 2 gotas de ácido acético) durante 3 minutos e finalmente lavados 3 a 4 vezes com água destilada. Por fim seguiram-se as etapas da desidratação, montagem, secagem e rotulagem.

c) Coloração mista de Azul de Alcião e Schiff-PAS.

A utilização deste tipo de coloração teve como objectivo diagnosticar o início da vitelogénese através do aparecimento de material positivo ao Schiff-PAS, e a diferenciação de polissacarídeos ácidos (cor azul celeste) e polissacarídeos neutros (cor avermelhada).

As lâminas foram primeiramente coradas numa solução de Azul de Alcião a 1% em ácido acético a 3% durante 30 minutos. Depois de lavadas em água corrente durante 3 minutos e passadas por água destilada foram mergulhadas numa tina com Ácido Periódico a 1% durante 5 minutos. Foram novamente lavadas em água corrente durante 3 minutos e passadas por água destilada. Seguiu-se um banho com o Reagente de Schiff

durante 15 minutos, e no soluto sulfuroso (6 ml de metabissulfito de potássio a 10 %, 0.5 ml de HCl normal, 100 ml água dest.) durante 2 minutos. Este soluto sulfuroso é feito diariamente e actua para avivar o Reagente de Schiff.

As preparações foram depois lavadas em água corrente (entre 10 a 15 minutos) e coradas rapidamente (metade do tempo usual) em hematoxilina seguindo-se uma lavagem. Por fim, foram executadas as etapas da desidratação, montagem, secagem e rotulagem.

Para a desidratação recorreu-se a uma série ascendente de alcoóis: álcool a 90° álcool a 95°, álcool absoluto I, álcool absoluto II, Xilol I, Xilol II. Estes passos tiveram a duração de cerca de 3 minutos.

Seguiu-se a montagem em D.P.X. ou ENTELAN à temperatura ambiente. As lâminas depois de secas (um dia à temperatura ambiente) foram rotuladas com etiquetas próprias, contendo a seguinte informação: espécie, órgão, nº do bloco (que corresponde ao nº do animal no livro de registo e no qual constam as características do mesmo) e tipo de coloração.

B - Blocos em plástico

Já largamente utilizadas na microscopia electrónica, as resinas mais conhecidas são as epoxidas e os poliésteres. Os acrilatos agora utilizados em M.O. são derivados esteris do ácido metacrílico, e segundo o radical livre da molécula tomam diferentes denominações. O que utilizamos é conhecido por Metacrilato de metilo. O radical livre deste acrilato actua como um grupo alcoólico e é o responsável pelo carácter hidrosolúvel deste tipo de plástico.

São várias as vantagens da utilização deste material para inclusão, que fazem desta técnica a ponte entre a M.O. e a M.E.: Melhor conservação da estrutura celular, a possibilidade de obtenção de cortes muito mais finos ($\pm 1\mu\text{m}$) com uma maior resolução óptica e finalmente não necessita dos demorados passos de desidratação e

desparafinação da técnica usual de parafina - de facto não é necessário "desplastificar".
Como inconveniente

Esquema geral da inclusão em plástico:

- Álcool 70°
- " 96°
- monómero
- Bloco

A inclusão em plástico pode-se realizar a partir de peças não desidratadas de todo ou mesmo hidratadas e a temperatura de reacção de polimerização do monomero é relativamente baixa, não superando os 40°C. Os moldes utilizados para a realização dos blocos (Kulzer) são em teflon os quais permitem uma temperatura uniforme em todo o bloco em polimerização.

Técnica de Inclusão com Tecnovit 7100 (KULZER)

1. Inicia-se uma desidratação parcial com álcool 70° e 96° durante 30 minutos cada.
2. A impregnação realiza-se com uma solução de monomero recém preparada:
Monomero (Tecnovit 7100-plástico de polimerização em frio) - 100 ml
Endurecedor I- uma embalagem de 1g
As peças ficam nesta solução durante a noite.
3. Inclusão - Como meio de inclusão utiliza-se a mesma solução de impregnação à qual se adiciona (agitando), na proporção de 15:1, 1ml de endurecedor II.
4. Fixação do bloco ao suporte: introduzir o Histobloc (suporte especial para fixação do bloco) na cavidade da base de teflon (molde). Juntar Tecnovit 3040 (-plástico de endurecimento rápido) numa proporção de 2 partes de pó e 1 parte de liquido. Encher cerca de 2mm o fundo do bloco.

Os cortes deverão ser executados com um micrótomo de alta qualidade com facas especiais podendo ser obtidos cortes de 1 μ m de espessura. São estirados fácil e rapidamente num banho a 25°C e colados à lâmina numa placa de aquecimento a 45°C. A coloração é realizada imediatamente sem necessidade de eliminar a matriz plástica, assim como rehidratar as peças ou desidratar antes da montagem com bálsamo, DPX ou outro.

Resultados e Discussão

I. Relações biométricas

O estudo biométrico efectuado nos animais amostrados teve como objectivo principal a escolha de um grupo homogénio (tamanho e peso) para as análises posteriores. Os animais foram assim seleccionados após a determinação da fase vitelogénica do ovário por histologia (capítulo 1), tendo sido excluídos os espécimes cujos parâmetros biométricos se afastavam da média.

Desta forma foi obtida uma boa relação entre o tamanho do ovário (g), o índice gonado-somático (relação entre o peso do ovário e o peso do animal) e a identificação histológica do desenvolvimento dos ovócitos e consequente distribuição dos animais por 5 fases de desenvolvimento da gónada, quer para a espécie *P. japonicus* (figura 1.) quer para a espécie *P. kerathurus* (figura 2.).

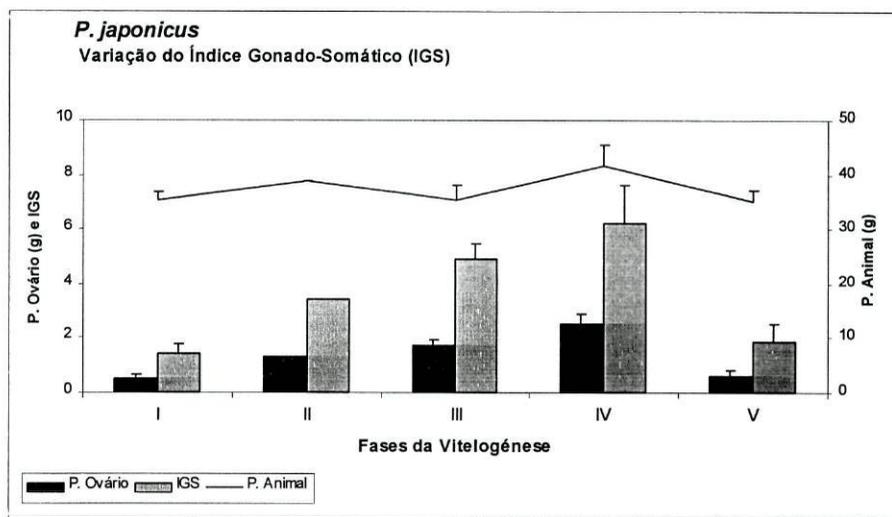


Figura 1.1. Representação gráfica do peso dos animais da espécie *P. japonicus* utilizada nos capítulos 4 e 5 assim como a variação do peso do ovário e IGS e sua relação com a classificação dos mesmos animais segundo 5 fases de desenvolvimento do ovário (nº total de animais = 21). As barras verticais indicam o erro padrão.

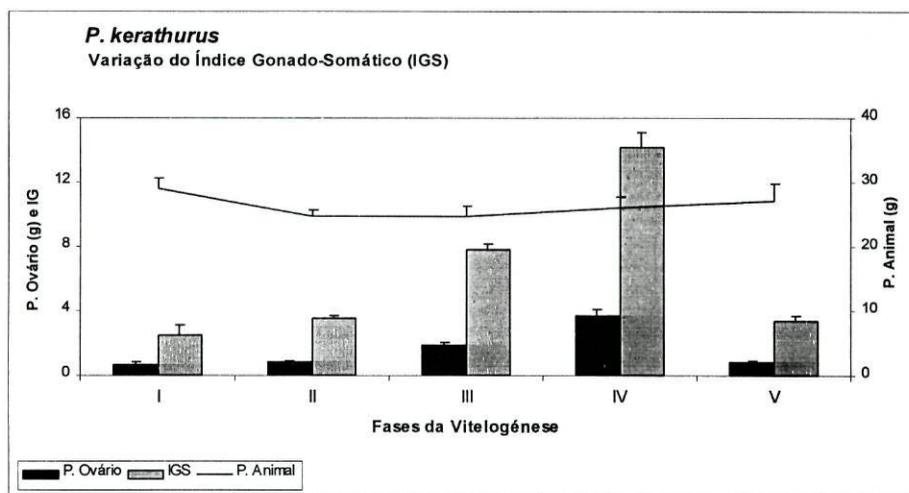


Figura 1.2. Representação gráfica do peso dos animais da espécie *P. kerathurus* utilizada nos capítulos 4 e 5 assim como a variação do peso do ovário e IGS e sua relação com a classificação dos mesmos animais segundo 5 fases de desenvolvimento do ovário (nº total de animais = 31). As barras verticais indicam o erro padrão.

II. Fases vitelogénicas

Os resultados obtidos dos cortes histológicos de ovário das duas espécies estudadas permitiu estabelecer cinco fases vitelogénicas (I, II, III, IV e V) que seguidamente iremos descrever, relacionando-os com os critérios já descritos por outros autores e apresentados na Introdução.

Fase I

Previtelogénese

Na espécie *P. japonicus*, as fêmeas cujos ovários foram classificados nesta fase, apresentaram um índice gonado-somático inferior a 2, enquanto para a espécie *P. kerathurus* foi de cerca de 3.

O aspecto da gónada fresca é a de um fino cordão translúcido que não é visível através da carapaça. A fase I, corresponde à fase estacionária de multiplicação e crescimento dos ovócitos típica da época não-reprodutiva. As oogónias, situadas na zona proliferativa junto à parede ventral do ovário, têm cerca de 10 μm de diâmetro. Com uma relação núcleo/citoplasma muito elevada, as oogónias apresentam um citoplasma estreito e fortemente basófilo, e um grande núcleo com um nucléolo principal com a forma típica de meia-lua. À medida que as oogónias se deslocam para fora da zona de proliferação, iniciam o seu crescimento apresentando os ovócitos, nesta fase, vários graus de desenvolvimento. Para além do aumento do tamanho dos ovócitos (cujas médias no *P. japonicus* foi de cerca de 79 μm de diâmetro), a cromatina organiza-se num grande e basófilo nucléolo central com outros mais pequenos perifericamente e as células foliculares começam a rodear os ovócitos mais desenvolvidos situados à periferia dos folículos (figuras 1-4).

Esta fase corresponde já ao início da denominada “fase de crescimento” por Figueiredo (1972) ao descrever o ciclo maturativo do ovário de *P. kerathurus*. A “fase de repouso”, período fisiológico que ocorre normalmente durante o inverno, não foi

encontrada nos animais estudados uma vez que as amostragens foram realizadas já na época de reprodução ou seja na primavera.

Os ovócitos presentes nesta fase, para além das oogónias situadas na zona de proliferação, encontram-se nos estádios de cromatina nucleolar e de cromatina perinucleolar inicial e avançada. Estes estádios de desenvolvimento dos ovócitos estão também na base da classificação da fase de previtelogénese do *Penaeus japonicus*, proposta por Yano (1988).

Fase II

Previtelogénese avançada ou vitelogénese primária

Os animais de ambas as espécies classificados nesta fase apresentaram índices gonado-somáticos inferiores a 4. Os ovários, mais volumosos e de coloração creme, são já visíveis através do exosqueleto. Os ovócitos, com um diâmetro médio de 117 μm (*P. japonicus*), encontram-se numa fase previtelogénica que pode ser caracterizada por uma diminuição do tamanho do núcleo e pelo aparecimento no citoplasma basófilo de glóbulos acidófilos constituídos por gotículas lipídicas. A estes ovócitos que progressivamente se vão tornando acidófilos, Figueiredo (1972) dá o nome de “ovócitos de transição”, pelo que esta fase (II) continua a corresponder à fase de crescimento na classificação daquela autora. As células foliculares rapidamente se expandem para, na periferia do folículo primário, rodearem os ovócitos mais desenvolvidos. Nesta fase de previtelogénese, está incluída a vitelogénese primária ou seja a síntese de substâncias vitelinas pelo ovócito (*P. japonicus*: figuras 5, 6; *P. kerathurus*: figuras 13, 14). Na espécie *P. monodon*, esta fase juntamente com a fase por nós denominada de fase I, foi classificada de fase P (de previtelogénese) por Tan-Fermin e Pudera (1989), o que numa classificação em 4 fases (P, previtelogénese; V, vitelogénese; C, vesículas corticais e S, desova) parece correcto juntar a previtelogénese inicial com a avançada isto é vitelogénese primária ou endógena separando da vitelogénese propriamente dita quando são visíveis as vesículas de vitelo. As diferenças encontrada nas frequências e nos

diâmetros médios e máximos apresentados pelos ovócitos nestas 4 fases, mostram ser estas características indicadores fiáveis do estado de maturação do *P. monodon*. De forma idêntica para a espécie *Penaeus notialis*, Trujillo e Gómez (1986) referem o diâmetro do ovócito de 110 micra como indicador do estado de maturação. Esta fase, designada por “vitelogénese primária” por Yano (1988) no *P. japonicus* é caracterizada pelo aparecimento de gotículas lipídicas no citoplasma dos ovócitos e aumento das células foliculares que os rodeiam. Este autor apresenta 3 estádios de desenvolvimento dos ovócitos nesta fase fazendo corresponder à primeira delas, (“gotícula lipídica I”), o aparecimento da vitelogenina na hemolinfa. A origem da vitelogenina nesta espécie foi encontrada nas células foliculares que rodeavam os ovócitos no estádio de “gotícula lipídica I” (Yano e Chinzei, 1987).

Fase III

Vitelogénese (vitelogénese secundária)

Está compreendida nesta fase a vitelogénese dos ovócitos, denominada por alguns autores de vitelogénese secundária, período muito importante da ovogénese e na qual são acumulados no ovócito as reservas vitelinas tanto de origem endógena como exógena. Os índices gonado-somáticos das fêmeas nesta fase foram de cerca de 5 para a espécie *P. japonicus* e 8 para a espécie *P. kerathurus*. Os ovários, bem visíveis à transparência do tegumento como uma mancha escura ao longo do abdómen, ocupam nesta fase cerca de 1/3 a 1/2 do aspecto dorsal do 2º segmento abdominal. Têm uma cor alaranjada (*P. japonicus*) ou levemente esverdeada (*P. kerathurus*). Na espécie *P. kerathurus* os ovócitos atingem, segundo Figueiredo (1972) nesta fase denominada de “vitelogénese”, dimensões normalmente compreendidas entre 160 e 230 micra.

Na espécie *P. japonicus*, o diâmetro médio dos ovócitos nesta fase foi de cerca de 230 µm. Os grânulos de vitelo são fortemente acidófilos e concentram-se inicialmente perto do núcleo e daqui dispersam-se para a periferia do ovócito até o preencherem por completo. O núcleo diminui de tamanho e o seu limite torna-se

irregular (*P. japonicus*: figuras 7, 8; *P. kerathurus*: figuras 15, 16). Esta fase, denominada de fase V (de vitelogénese) no *P. monodon*, é facilmente reconhecida pela presença de vesículas vitelinas (que pela reacção PAS indicam a presença de glicoproteínas) e de gotículas lipídicas, nos ovócitos que atingem cerca de 250 micra (Tan-Fermin e Pudera, 1989). Esta fase III no *P. japonicus* foi designada de “vitelogénese secundária” por Yano (1988) que inclui no entanto, um estágio posterior ao aparecimento das vesículas de vitelo (“Yolk granule stage”) denominado “estádio de prematuração”. Este estágio, que corresponde ao aparecimento das vesículas corticais foi por nós incluído na fase IV (maturação).

Fase IV

Maturação (formação de vesículas corticais)

Caracterizamos esta fase com o início da formação das vesículas (também denominados bastonetes) corticais na periferia dos ovócitos. É uma fase de pré-maturação, na qual os ovócitos atingem o seu maior diâmetro (230 µm na espécie *P. japonicus*). Nos animais vivos os ovários são visíveis através da carapaça e ocupam cerca de 3/4 a 4/5 do aspecto dorsal do 2º segmento abdominal. Os ovários frescos têm uma cor laranja-esverdeada (mais acentuada na espécie *P. kerathurus*). As vesículas corticais começam por ser esféricas e acidófilas, sendo visíveis à periferia do ovócito. Aumentando de tamanho e acidofilia durante esta fase, estas vesículas estão separadas do citoplasma pela membrana citoplásmica do ovócito, e das células foliculares pelo envelope vitelino que rodeia todo o ovócito. No final desta fase, que constitui a fase de maturação propriamente dita, para além das vesículas corticais que atingem o seu tamanho máximo, verifica-se a ovulação isto é, a retração das células foliculares que deixam de envolver os ovócitos, e a migração para a periferia do núcleo e a sua cisão (cisão da vesícula germinal-GVBD) (*P. japonicus*: figuras 9, 10; *P. kerathurus*: figuras 17-20). Esta fase é denominada de “amadurecimento” por Figueiredo (1972) e é igualmente caracterizada pelo aparecimento das vesículas corticais na periferia do

ovócito. Trabalhando com a espécie *P. kerathurus* esta investigadora determinou um diâmetro médio de cerca de 200-250 micra no início desta fase e de 250-300 micra para o final, quando o ovário é considerado maduro: os “ovócitos maturantes” passam ao estado de “óvulos” quando os bastonetes periféricos (vesículas corticais periféricas) atingem um comprimento de cerca de 45 micra. Constituindo a presença das vesículas corticais na fase de maturação dos ovócitos, pouco tempo antes da desova, uma característica morfológica tão evidente, ela foi utilizada para descrever a fase C (de “cortical rods”) na espécie *P. monodon* (Tan-Fermin e Pudera, 1989). Como dissemos anteriormente, este estágio de vesículas corticais é incluído na fase III- vitelogénese secundária, na classificação de Yano (1988), sendo para este autor a fase de maturação constituída pelo processo de ovulação, migração do núcleo e sua cisão (GVBD) até à desova.

Fase V

Desova

Esta fase corresponde à desova. Foram, no entanto, utilizados dois critérios distintos para o agrupamento de vários animais nesta fase:

- a) pelo aspecto histológico do ovário
- b) por sacrifício no dia seguinte à desova

No primeiro caso, é reconhecida uma certa desorganização do ovário, com a presença de inúmeras vesículas corticais “soltas” e ovos maduros em reabsorção, assim como espaços na periferia do ovário em reorganização após a saída dos ovos. Possivelmente relacionado com o tempo decorrido desde a desova até ao sacrifício do animal, os ovários nesta fase apresentam-se sinais de rematuração podendo ser considerados em fase I, II ou mesmo III.

No segundo caso, com a espécie *P. kerathurus*, foram vários os animais que estando maduros foram colocados em tanques para desovar e sacrificados no dia seguinte uma vez observada a desova. Se nos cortes histológicos do ovário destes animais muitos apresentaram as características de pós-desova atrás referidas (desorganização, restos de vesículas corticais), outros houve que apresentavam aspectos normais de previtelogénese (fases I e II).

O índice gónado-somático dos animais nesta fase foi de cerca de 2 para a espécie *P. japonicus* e de 3 para o *P. kerathurus*. O aspecto da gónada é semelhante à descrita para as fases I e II, embora um pouco mais heterogénia principalmente nos animais em que a desova foi parcial (*P. japonicus*: figuras 11, 12; *P. kerathurus*: figuras 21-24).

Este aspecto de reorganização muito rápida dos ovários em situação de post-desova, sugerindo a possibilidade de várias (duas ou mais) desovas na mesma época foi já detalhadamente descrita por Figueiredo (1972) em *P. kerathurus*: ovócitos basófilos da nova geração entram imediatamente em crescimento (60 a 120 micra) apenas se notando a existência de alguns espaços vazios, deixados pelos óvulos expulsos.

O processo de rematuração em *P. japonicus* parece proceder-se em três etapas (Yano, 1984): 1. Absorção de ovócitos maduros não desovados e reorganização do ovário; 2. Aparecimento de ovócitos no “estádio I de gotículas lipídicas” (vitelogénese primária) e aumento do número e tamanho das células foliculares (biosíntese de vitelogenina); 3. Acumulação intensiva de vesículas vitelinas no citoplasma do ovócito. Os resultados com esta espécie, e em condições de cultura, demonstraram que é possível num curto espaço de tempo após a desova obter animais com ovários maduros (Yano, 1984). Na espécie *Penaeus monodon*, Tan-Fermin e Pudera (1989) denominou a fase de desova de fase S (spent), correspondendo às características já referidas referindo-se ainda à presença de alguns ovócitos primários de forma irregular e fortemente corados (células atrésicas) e camadas compactas de células foliculares) formadas por retração após a ovulação. Dada a presença, após a desova, de apenas pequenos ovócitos primários imaturos, levou os autores à conclusão de que esta espécie necessita de várias semanas para rematurar e desovar novamente na mesma época de reprodução.

A divisão das fases vitelogénicas por nós utilizada neste trabalho pode ser comparada com a apresentada nos trabalhos de Trujillo e Gómez (1986) e de Medina *et al.*, (1996) apresentada no quadro seguinte:

Fase	Estádio	Trujillo & Gómez, 1986	Medina <i>et al.</i> , 1996
I	Previtelogénese	Imaturo	Previtelogénese
II	Previtelogénese avançada	Início de maturação	Início da Vitelogénese
III	Vitelogénese	Maturação avançada	Vitelogénese avançada
IV	Maturação	Maturo	Maturo
V	Desova	Desovado	Desova

A designação que utilizamos de “previtelogénese avançada” para a fase II, corresponde à vitelogénese primária (ou também tradicionalmente dita de endógena) na qual se verifica um aumento de tamanho e acidofilia do citoplasma dos ovócitos e o aparecimento de gotículas lipídicas. No entanto, nesta fase ainda não são reconhecidas as vesículas vitelinas característica da vitelogénese, pelo que preferimos esta designação à de “vitelogénese inicial” dada por Medina *et al.*, (1996). Uma classificação idêntica em quatro fases (não inclui a desova) tinha sido já utilizada por Rodriguez (1977) em *Penaeus kerathurus*.

A maioria dos trabalhos sobre a ovogénese em crustáceos não inclui a importante fase de desova e suas consequências, ou seja a reorganização do ovário e possível rematuração que nestes animais é muito frequente e rápida. Desta forma, ela constitui a fase mais difícil de classificar e que, conseqüentemente, poderá conter algumas imprecisões. Para se entender as possíveis diferenças nos estados fisiológicos dos animais classificados na fase V- desova (e por consequência nas fases I e II de animais selvagens amostrados em plena época de reprodução), descreveremos algumas

situações observadas nos peneídeos estudados (*P. japonicus* e *P. kerathurus*) quando, uma vez maduros, foram colocados em tanques de desova. Os diversos resultados obtidos podem ser resumidos nas seguintes respostas:

- a) ausência de desova e regressão (absorção) quase total do ovário (em 1 a 2 dias) com ou sem muda do exosqueleto.
- b) Desova imediatamente seguida de muda. Neste caso após a muda alguns animais retomam a vitelogénese secundária.
- c) Desova e recuperação rápida do ovário (sem muda do exosqueleto) podendo no curto espaço de tempo de 5 a 6 dias voltar a desovar.
- d) Desova e recuperação lenta do ovário (sem muda do exosqueleto) podendo voltar a desovar após algumas semanas.

Em conclusão, durante a época de reprodução destes animais as fases iniciais da vitelogénese (fases I e II) podem corresponder à 1ª vitelogénese dessa época reprodutiva ou à recuperação rápida e rematuração da gónada, situações que provavelmente traduzem estados fisiológicos distintos. Nos animais selvagens, não sendo possível discriminar a relação do ciclo reprodutivo com o ciclo da muda bem como o tempo decorrido após a desova, esta situação poderá conduzir à inclusão de animais em estados fisiológicos distintos na mesma fase do ciclo reprodutivo.

*Estampas de fotografias de microscopia óptica das
diferentes fases de desenvolvimento do ovário das espécies*

P. japonicus e P. kerathurus

Figura 1. *P. japonicus*. Ovário em Fase I. Coloração hematoxilina-eosina. (Ampliação 108 ×).

Figura 2. *P. japonicus*. Ovário em Fase I. Coloração hematoxilina-eosina. (Ampliação 217 ×).

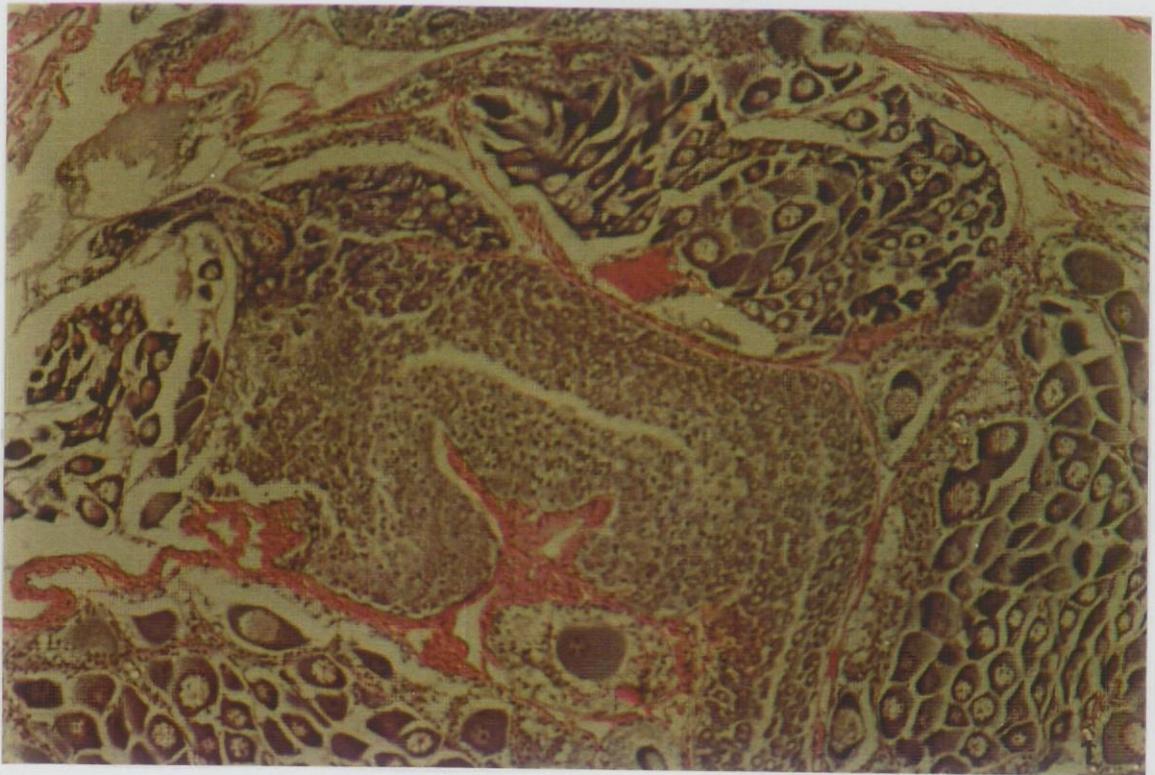
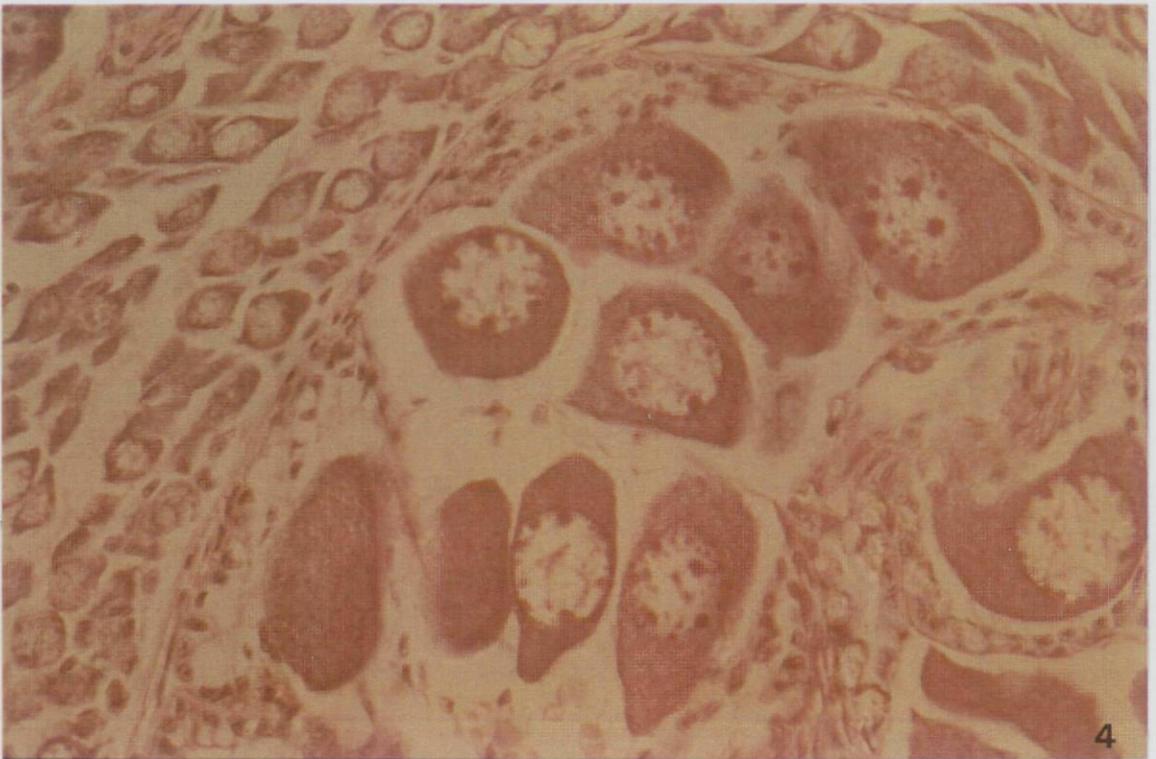


Figura 3. *P. japonicus*. Ovário em Fase I. Coloração hematoxilina-eosina. (Ampliação 434 ×).

Figura 4. *P. japonicus*. Ovário em Fase I. Coloração hematoxilina-eosina. (Ampliação 434 ×).



3



4

Figura 5. *P. japonicus*. Ovário em Fase II. Coloração hematoxilina-eosina. (Ampliação 217 ×).

Figura 6. *P. japonicus*. Ovário em Fase II. Coloração hematoxilina-eosina. (Ampliação 217 ×).

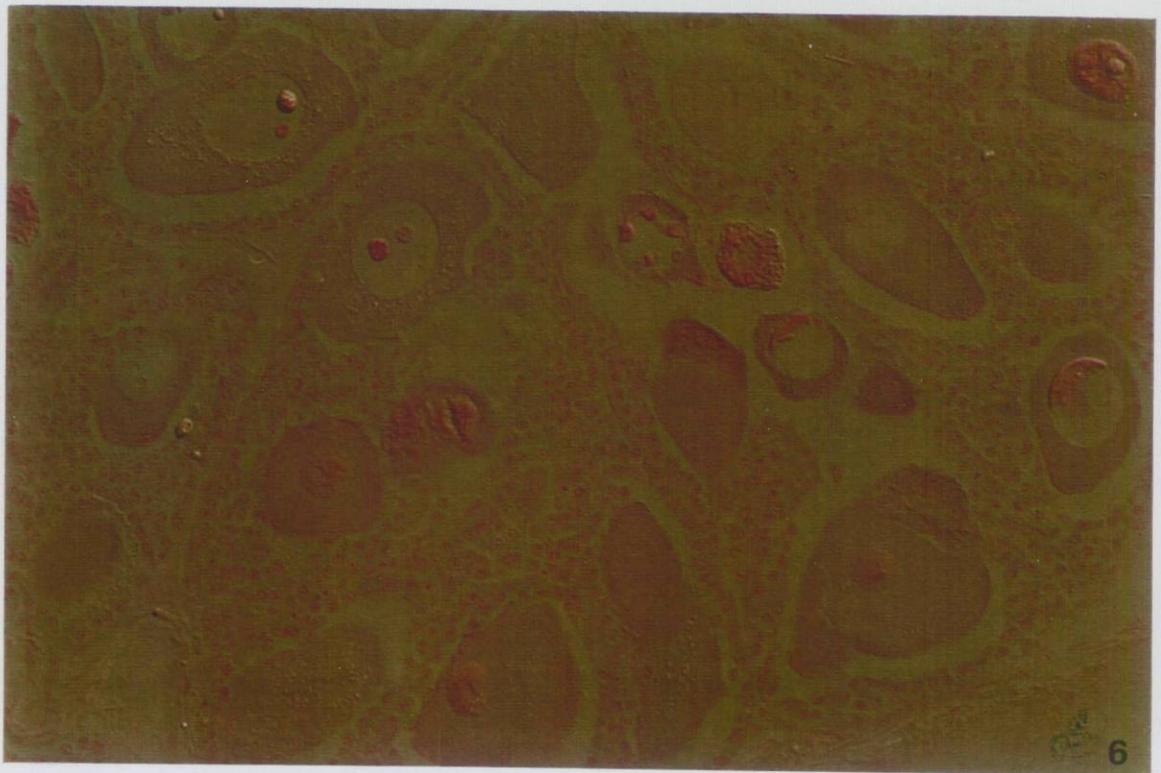


Figura 7. *P. japonicus*. Ovário em Fase III. Coloração hematoxilina-eosina. (Ampliação 100 ×).

Figura 8. *P. japonicus*. Ovário em Fase III. Coloração hematoxilina-eosina. (Ampliação 200 ×).

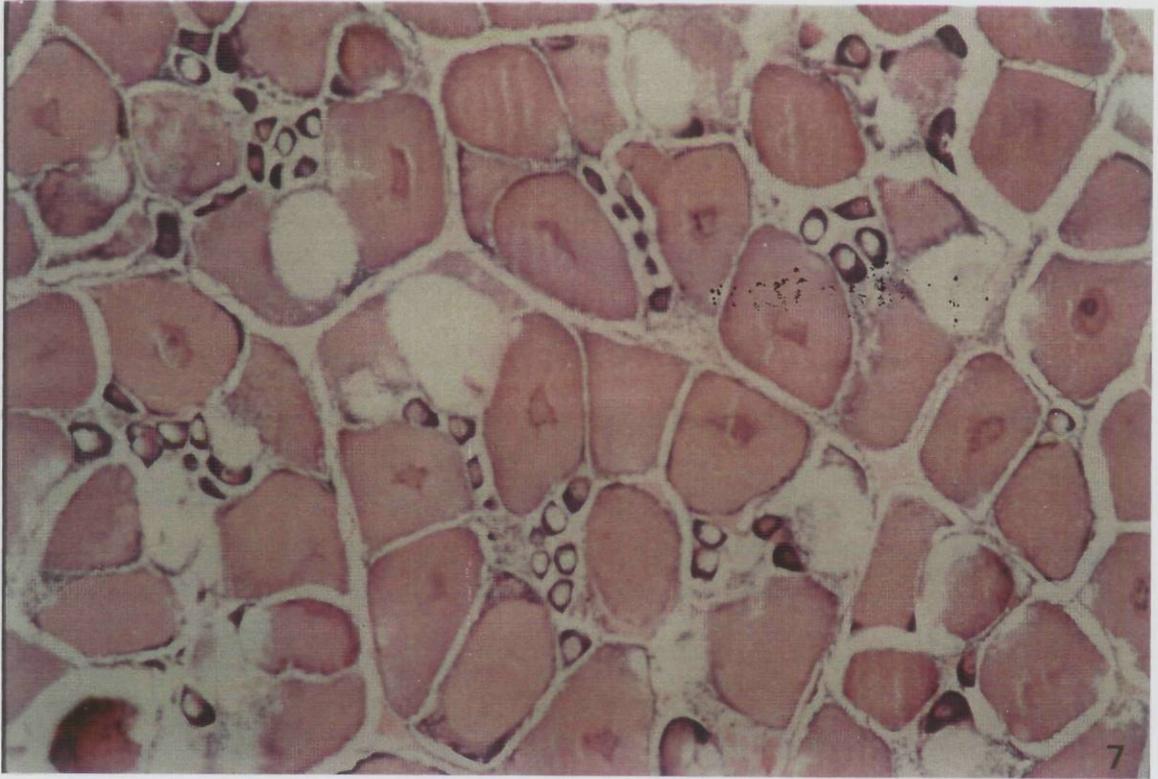


Figura 9. *P. japonicus*. Ovário em Fase IV. Coloração Cleveland-Wolfe. (Ampliação 217 ×).

Figura 10. *P. japonicus*. Ovário em Fase IV. Coloração Cleveland-Wolfe. (Ampliação 434 ×).



Figura 11. *P. japonicus*. Ovário em Fase V. Coloração Cleveland-Wolfe. (Ampliação 100 ×).

Figura 12. *P. japonicus*. Ovário em Fase V. Coloração Cleveland-Wolfe. (Ampliação 217 ×).

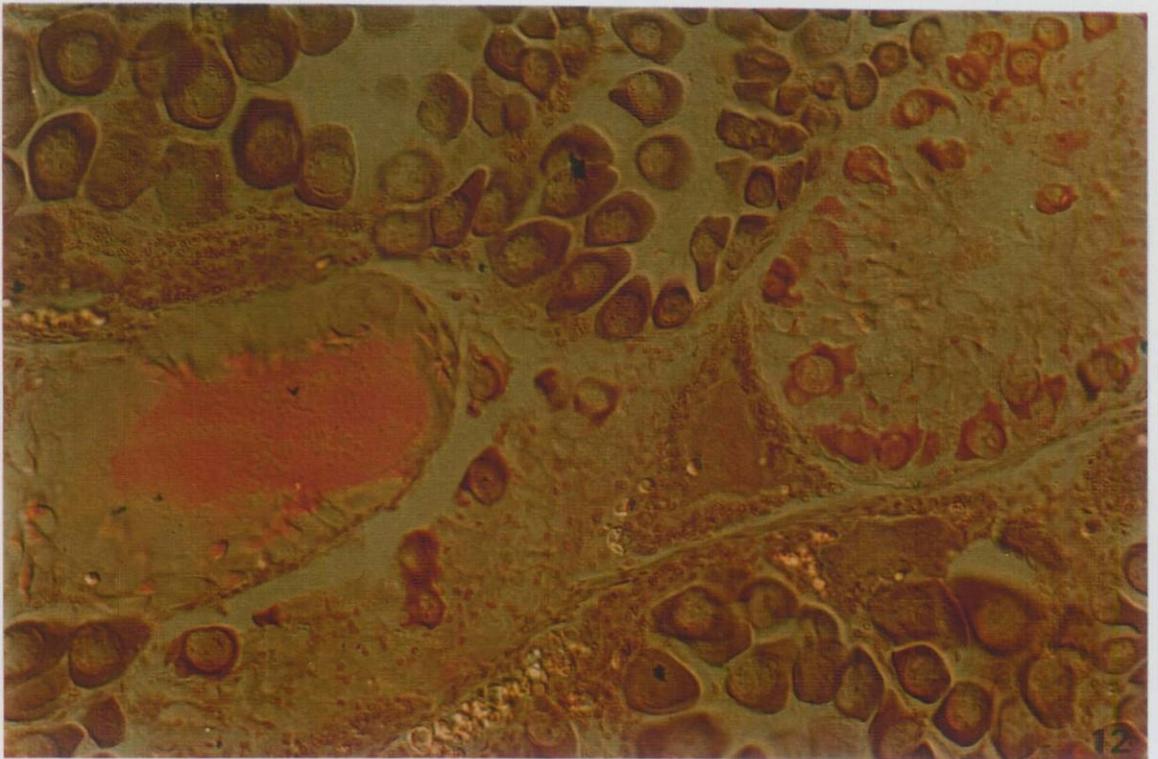
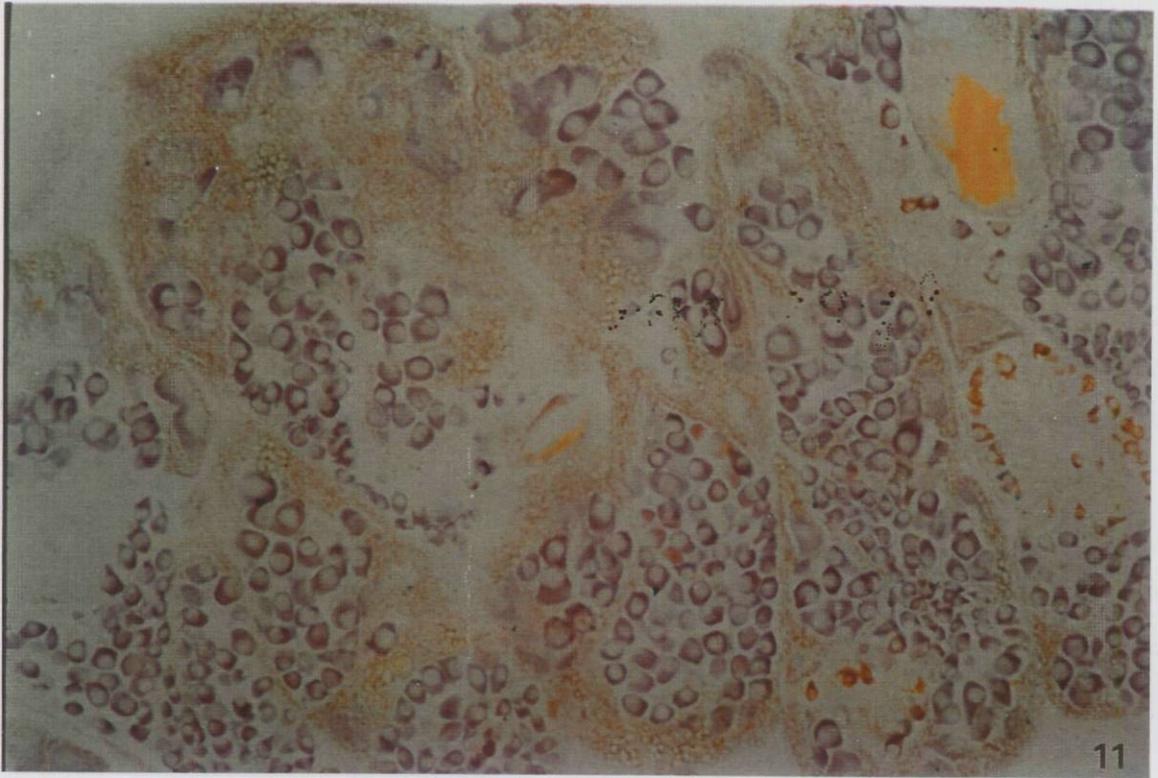


Figura 13. *P. kerathurus*. Ovário em Fase II. Coloração hematoxilina-eosina.
(Ampliação 200 ×).

Figura 14. *P. kerathurus*. Ovário em Fase II. Coloração hematoxilina-eosina.
(Ampliação 217 ×).

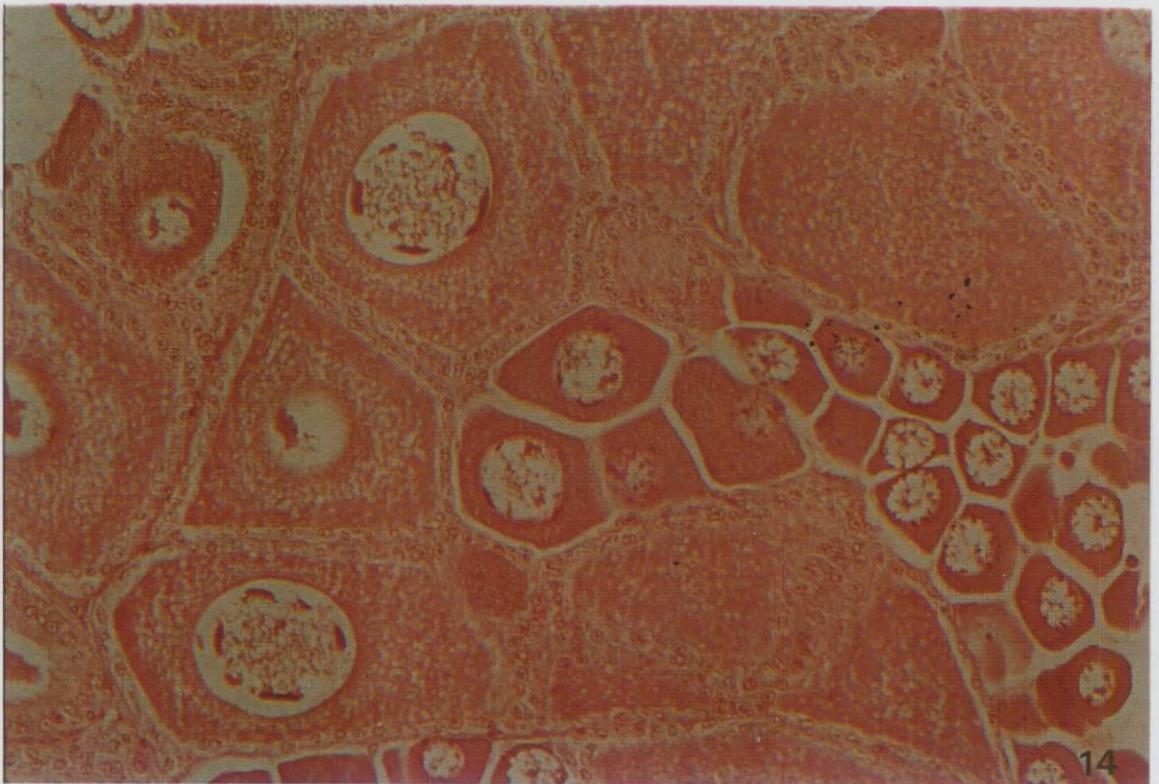
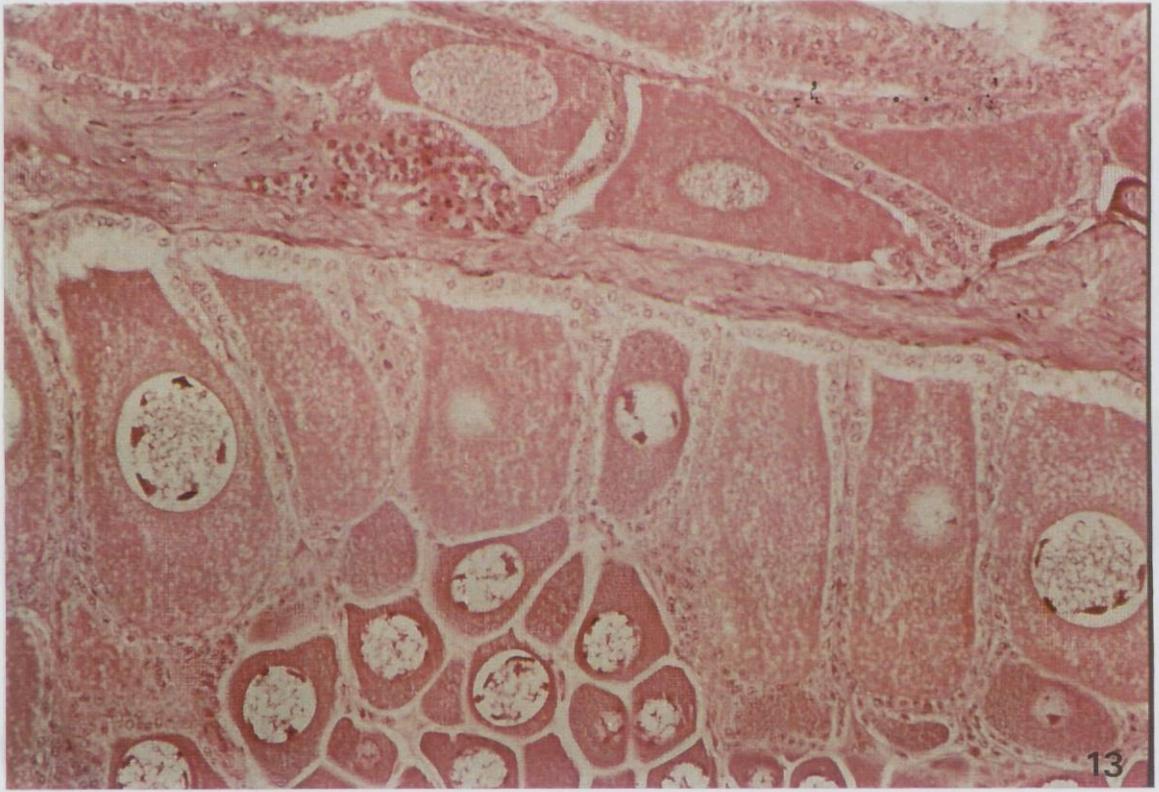
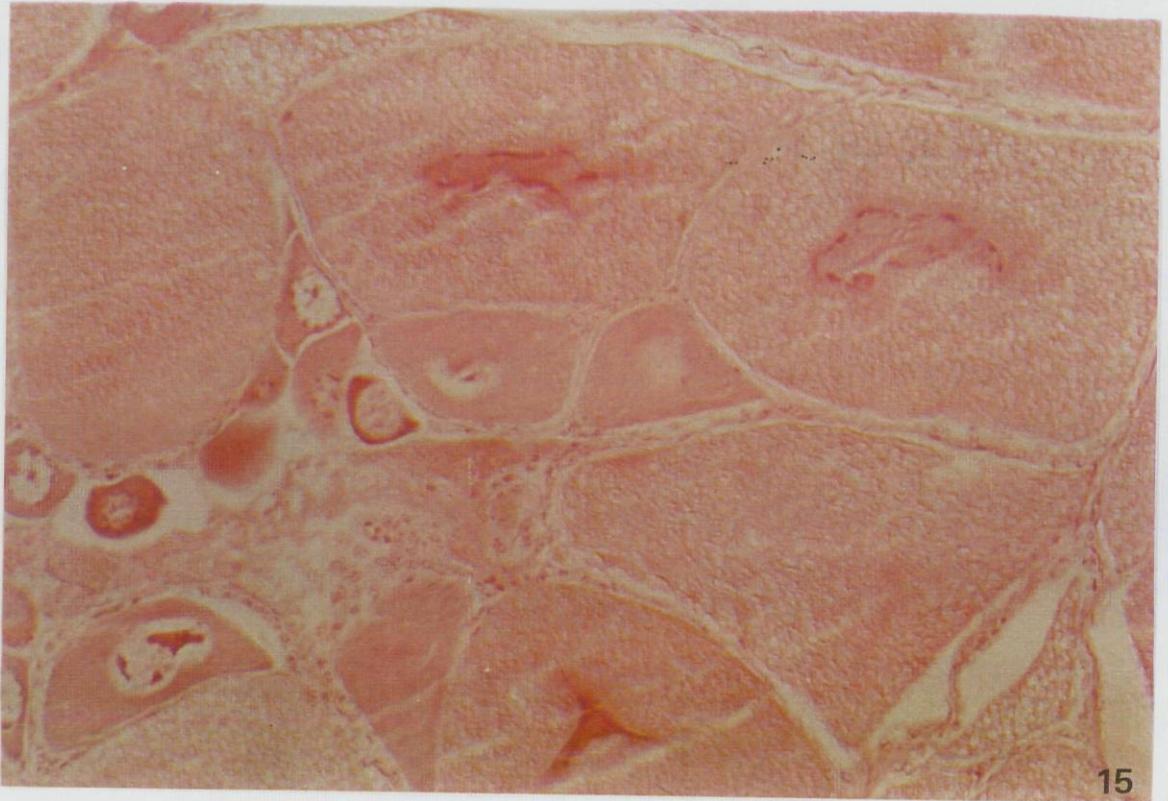
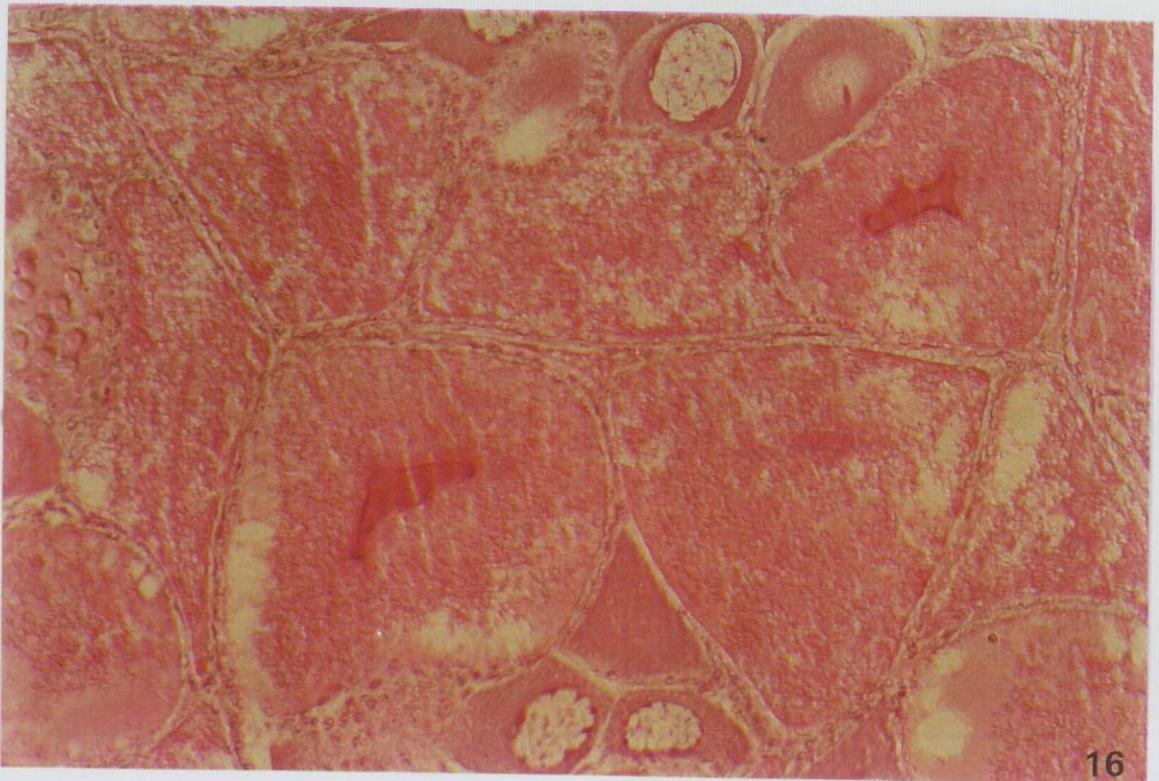


Figura 15. *P. kerathurus*. Ovário em Fase IV (inicial). Coloração hematoxilina-eosina.
(Ampliação 217 ×).

Figura 16. *P. kerathurus*. Ovário em Fase IV (inicial). Coloração hematoxilina-eosina.
(Ampliação 434 ×).



15



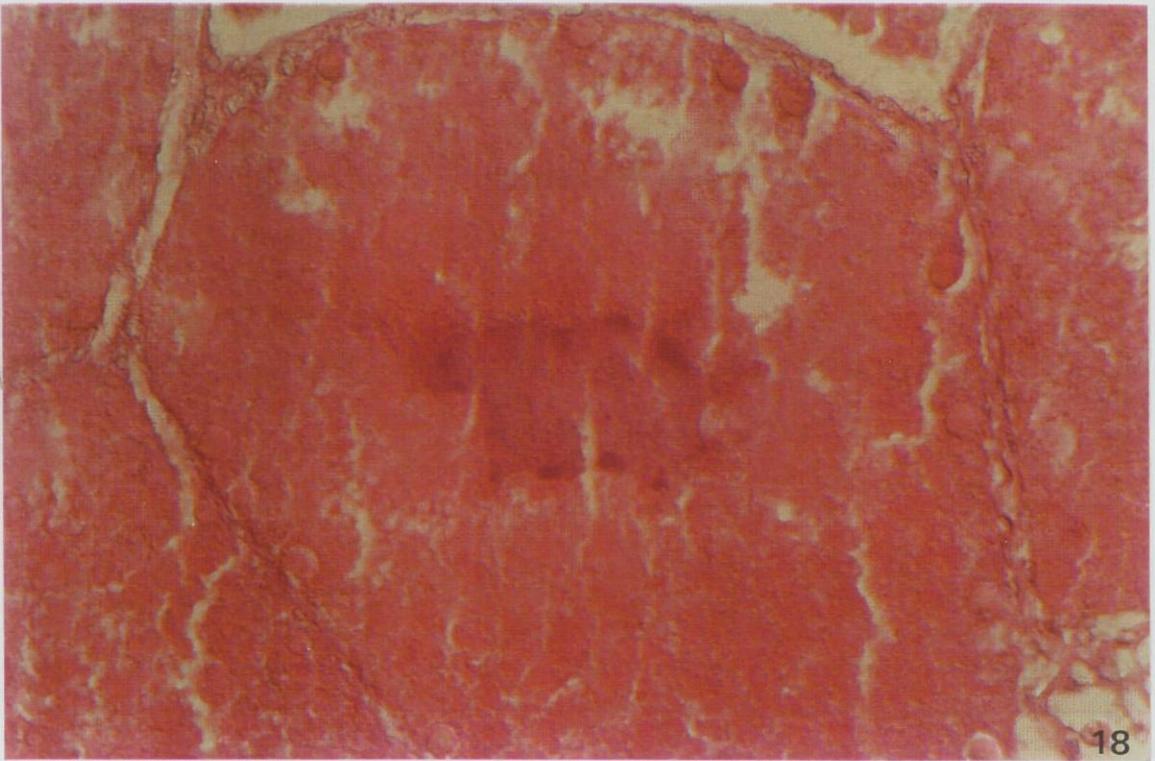
16

Figura 17. *P. kerathurus*. Ovário em Fase IV (inicial). Coloração hematoxilina-eosina.
(Ampliação 217 ×).

Figura 18. *P. kerathurus*. Ovário em Fase IV (inicial). Coloração hematoxilina-eosina.
(Ampliação 434 ×).



17



18

Figura 19. *P. kerathurus*. Ovário em Fase IV (adiantada). Coloração hematoxilina-eosina. (Ampliação 108 ×).

Figura 20. *P. kerathurus*. Ovário em Fase IV (adiantada). Coloração hematoxilina-eosina. (Ampliação 217 ×).

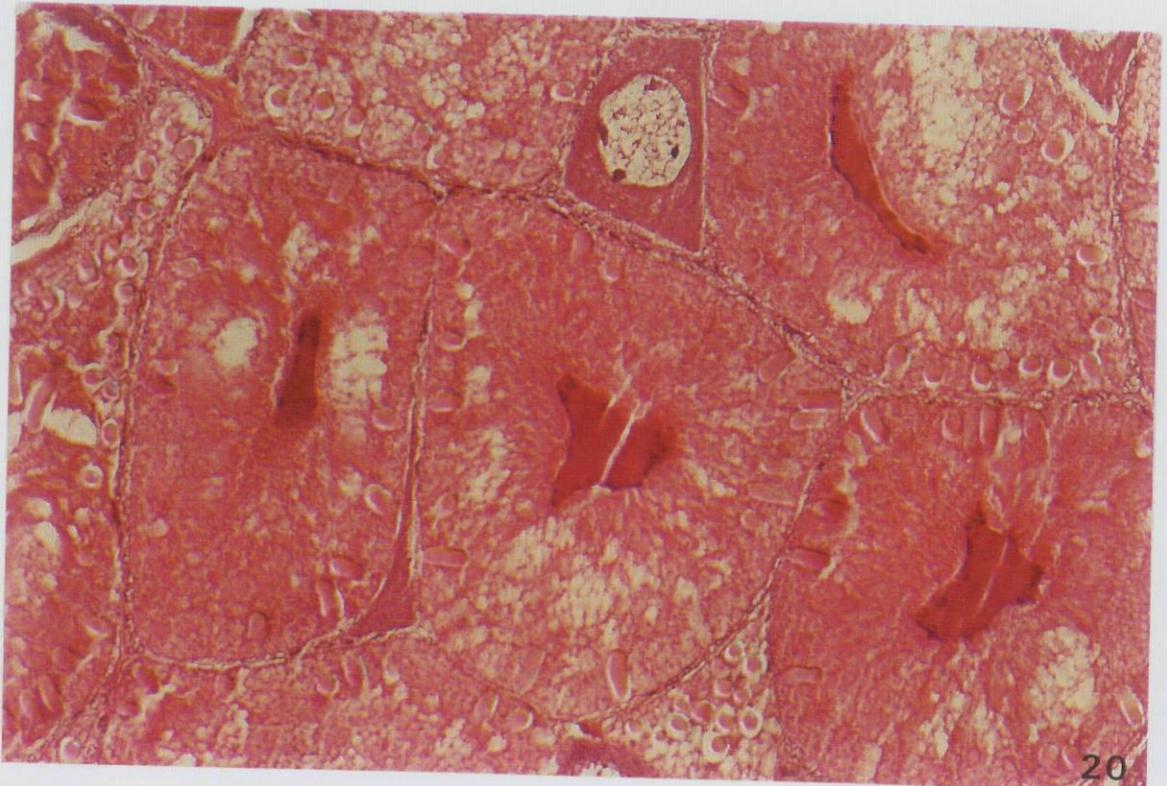
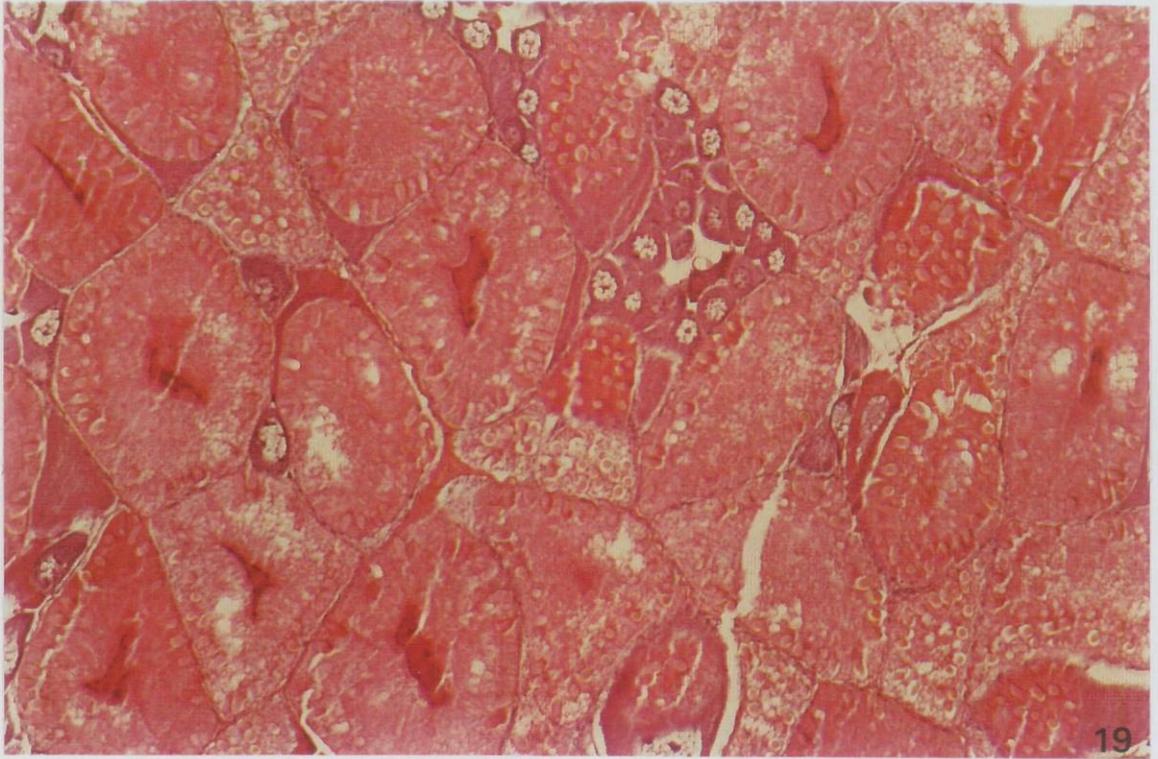


Figura 21. *P. kerathurus*. Ovário em Fase V. Coloração hematoxilina-eosina.
(Ampliação 108 ×).

Figura 22. *P. kerathurus*. Ovário em Fase V. Coloração hematoxilina-eosina.
(Ampliação 217 ×).

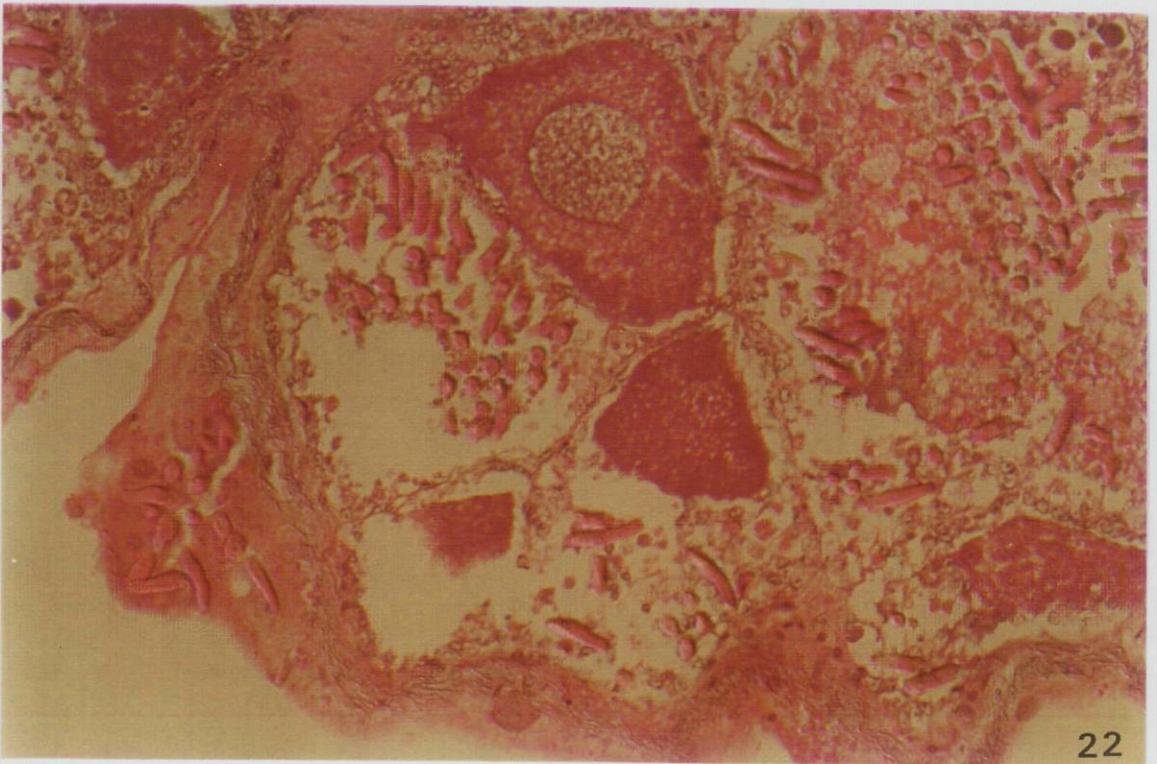
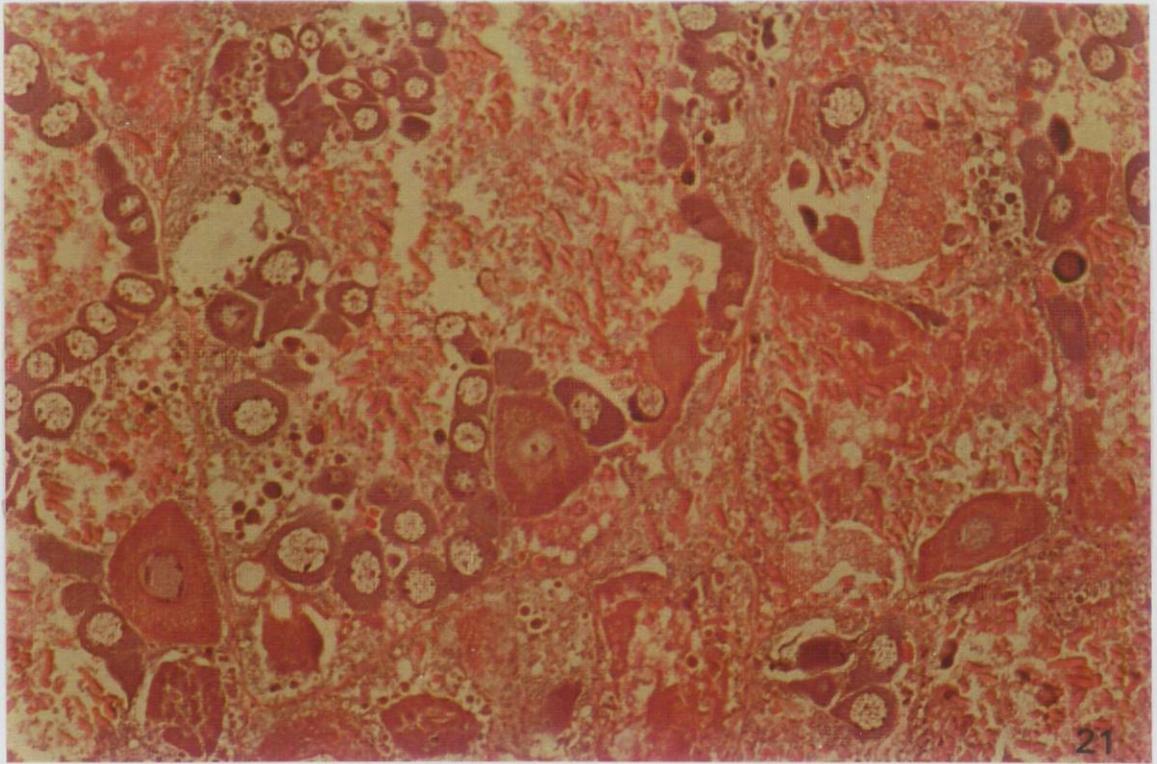
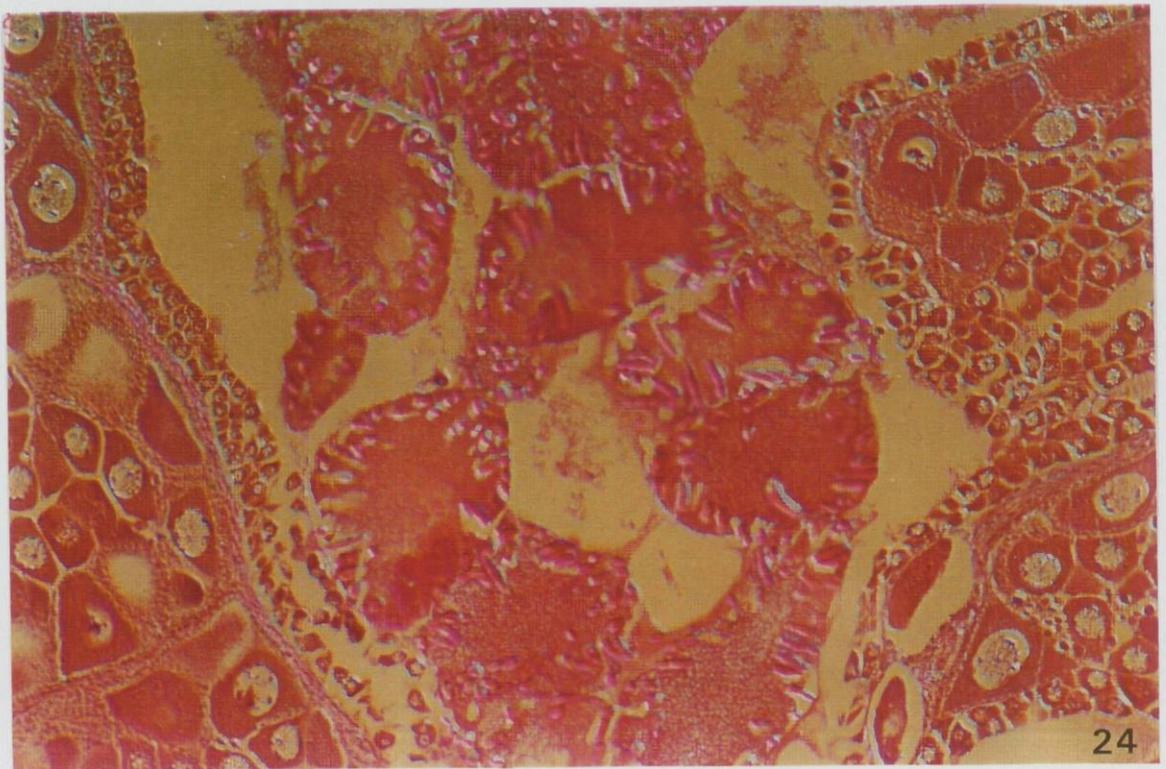
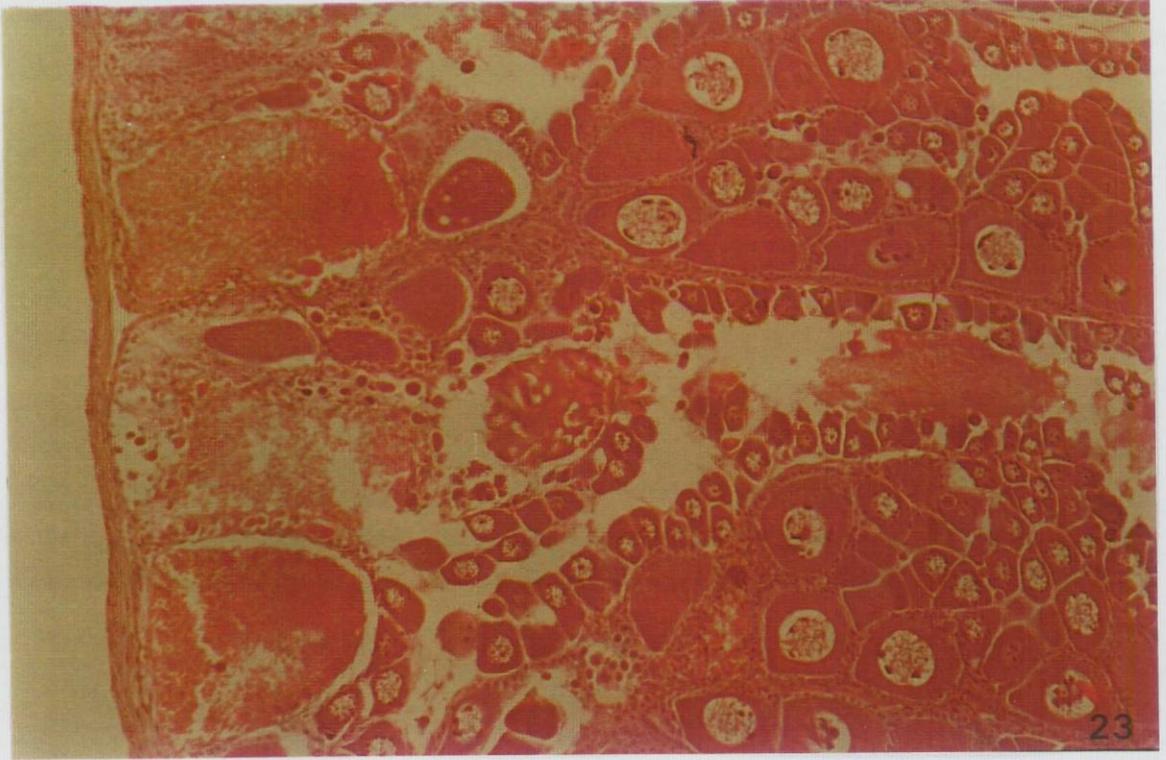


Figura 23. *P. kerathurus*. Ovário em Fase V (adiantada). Coloração hematoxilina-eosina. (Ampliação 108 ×).

Figura 24. *P. kerathurus*. Ovário em Fase V (adiantada). Coloração hematoxilina-eosina. (Ampliação 108 ×).



*Ultraestrutura do Ovócito. Estudo dos Aspectos
Ultraestruturais da Ovogénese em Penaeus
kerathurus.*

Introdução

A ovogénese nos Malacostraca consiste em várias etapas que se desenrolam quer de forma contínua, quer ciclicamente. A saída das ovogónias da zona germinativa, o início e desenrolar da profase meiótica até à condensação dos cromossomas e a previtelogénese, que inclui a vitelogénese primária (formação do vitelo endógeno), constituem fenómenos contínuos da ovogénese. Apenas a vitelogénese secundária (captação de vitelo exógeno) constitui um processo cíclico que se desenrola nas fêmeas puberes, durante o período de reprodução (Payen, 1980).

A característica ultrastrutural mais notória dos ovócitos em previtelogénese é o desenvolvimento de vários organelos citoplasmáticos, na região perinuclear e que posteriormente se dispersam para a periferia (Papathanassiou e King, 1984; Komm e Hinsch, 1985). Outra característica desta fase da ovogénese é a passagem de material do núcleo para o citoplasma através dos numerosos poros nucleares (Beams e Kessel, 1963; Hinsch e Cone, 1969; Zeni e Zaffagnini, 1989; Rankin e Davis, 1990). Com o início da vitelogénese são observadas no ovócito várias alterações citoplasmáticas entre as quais o desenvolvimento do retículo endoplasmático rugoso, com material granular denso no interior das suas cisternas (Krol *et al.*, 1992), do aparelho de Golgi (Hinsch e Cone, 1969; Papathanassiou e King, 1984; Komm e Hinsch, 1987), o aparecimento de mitocôndrias (Beams e Kessel, 1963) e de gotículas lipídicas (Beams e Kessel, 1963; Papathanassiou e King, 1984; Zerbib, 1979; Yano, 1988).

A vitelogénese consiste na reunião dos componentes orgânicos e inorgânicos do vitelo no ovócito em desenvolvimento. O vitelo é composto de água, proteínas e lípidos sendo essencial para o desenvolvimento do embrião, quer como material estrutural para a formação de tecidos quer como energia. A vitelina é a proteína (lipoglicocarotenoproteína) maioritária identificada na maioria dos ovócitos (revisão por Charniaux-Cotton, 1980; Meusy e Payen, 1988; Shafir *et al.* 1992) constituindo a vitelogenina a molécula precursora. A fracção proteica do vitelo está muitas vezes associada a pigmentos carotenoides, que possivelmente servirá de protector do embrião contra as radiações solares.

O processo de formação e acumulação de vitelo nos ovócitos de crustáceos, como produção intraovocítica, extra-ovocítica ou a combinação das duas, tem sido

debatida por vários autores (Beams e Kessel, 1963; Hinsch e Cone, 1969; Wolin *et al.*, 1973; Zerbib, 1979; Komm e Hinsch, 1987; Papathanassiou e King, 1984; Lepore *et al.*, 1993, entre outros)

Um dos principais argumentos a favor da origem extra-ovocítica é a existência na hemolinfa de uma proteína específica-de-fêmeas vitelogénicas serologicamente idêntica à contida nas vesículas de vitelo (lipovitelina), entrando no ovócito por um processo de pinocitose, o qual ocorre apenas quando os ovócitos acumulam reservas de vitelo (Wolin *et al.*, 1973: *Uca pugilator*, *Cambarus clarkii* e *Libinia emarginata*).

A hipótese de produção extra-ovocítica de vitelo é ainda suportada pela observação ultrastrutural de numerosas microvilosidades e vesículas de micropinocitose na membrana plasmática de ovócitos em vitelogénese que sugerem uma produção exógena de componentes do vitelo que desta forma entram no ovócito (Hinsch e Cone, 1969; Charniaux-Cotton, 1980; Lepore *et al.*, 1993). Vários estudos utilizando marcadores demonstraram a captura de material exógeno pelo ovócito (Komm e Hinsch, 1987; Schade e Shivers, 1980; Wolin *et al.*, 1973). Estudos imunológicos em vários decápodes identificaram locais extra-ovários de síntese da vitelina e da vitelogenina (molécula precursora da vitelina): hemócitos, hemolinfa (Krol *et al.*, 1992), tecido adiposo subepidermal (Junéra e Croisille, 1980), e hepatopâncreas (Wolin *et al.*, 1973; Vogt *et al.*, 1989). A vitelogenina poderia ainda ser sintetizada pelas células foliculares, secretada para a hemolinfa e daqui captada pelos ovócitos em desenvolvimento (Yano e Chinzei, 1987).

Segundo Zerbib (1979), o início da vitelogénese secundária nos ovócitos de duas espécies de lagostim de água doce (*Astacus astacus* e *A. leptodactylus*) é caracterizada por um considerável desenvolvimento da membrana plasmática ovocitária e um acentuado aumento de endocitose: o ooplasma cortical e as macrovilosidades são o local de importante actividade pinocitótica, acentuada pela existência de inúmeras "micro-canaliculas" as quais encerram um material equivalente às vesículas de pinocitose.

O facto do processo pinocitótico aparecer, nas espécies de cirrípedes, *Balanus amphitrite* e *B. perforatus*, de forma semelhante a outros crustáceos, apenas durante a vitelogénese secundária, parece indicar, segundo os autores, uma menor importância da componente exógena do vitelo (Lepore *et al.* 1993). Os resultados obtidos por Fainzilber *et al.*, (1992), no camarão peneídeo *Penaeus semisulcatus*, indicam também uma contribuição extra-ovária diminuta na vitelogénese, concluindo os autores ser o

ovário o principal local de síntese da vitelina nestes camarões. No mesmo sentido, e tendo em conta o aumento simultâneo da concentração de vitelogenina e de vitelina no ovário de *P. semisulcatus*, parece chegar-se à mesma conclusão de que a contribuição da vitelogenina para a formação de vitelina no ovário é quantitativamente insignificante, podendo a vitelogenina ter um papel no transporte de lípidos de tecidos extra-ovários (por exemplo do hepatopâncreas) até ao ovário (Shafir *et al.*, 1992).

A produção intraovocítica de vitelo, sugerida por vários autores, é apoiada por estudos ultraestruturais que apontam para um significativo aumento do retículo endoplásmico em ovócitos vitelogénicos indicando actividade de síntese proteica (Beams e Kessel, 1963). Idênticas características do retículo endoplásmico (liso e rugoso) foram observadas no caranguejo *Libinia emarginata* (Hinsch e Cone, 1969) e no anfípode *Orchestia gammarela* (Charniaux-Cotton, 1980). A capacidade de síntese proteica dos ovócitos vitelogénicos do lagostim de água doce *Procambarus clarkii*, foi comprovada, *in vitro*, pela técnica de incorporação de ^{14}C -leucina (Kulkarni *et al.*, 1991).

Finalmente a combinação dos dois processos de formação do vitelo, intraovocítica e extra-ovocítica, é descrita no caranguejo *Libinia emarginata* (Hinsch e Cone, 1969), nos lagostins de água doce, *Astacus astacus* e *A. leptodactylus* (Zerbib, 1979), do caranguejo-ermita *Coenobita clypeatus* (Komm e Hinsch, 1985; 1987), no camarão *Palaemon serratus* (Papathanassiou e King, 1984), estando implicados organelos citoplasmáticos (retículo endoplásmico, aparelho de Golgi) na sua síntese assim como a incorporação de material através de microvilosidades e formação de vesículas micropinocitóticas. Da mesma forma, Schade e Shivers (1980) comprovaram a hipótese da dupla origem do vitelo proteico nos ovócitos vitelogénicos da lagosta americana, *Homarus americanus*, uma vez que a actividade pinocitótica da membrana plasmática é aumentada apenas no momento de máximo desenvolvimento do ovário (vitelogénese) e é praticamente indetectável quer nos ovócitos imaturos, quer nos que atingiram a maturação. No camarão *Palaemon serratus*, a produção de vitelo é principalmente intra-ovocítica, possuindo no entanto um oolema bastante interdigitado. Nas fases mais adiantadas, depois do início da formação da camada vitelina, as microvilosidades permitem o contacto com as células foliculares, e as vesículas micropinocitóticas formadas fundem-se no retículo endoplasmático, contribuindo assim para o material vitelino do ovócito (Papathanassiou e King, 1984).

Os estudos ultraestruturais de ovócitos das espécies de cirripedes *Balanus amphitrite* e *B. perforatus* realizados por Lepore *et al.* (1993), demonstraram a existência, em ambas as espécies, de uma vitelogénese primária caracterizada pela formação de numerosas vesículas ergastoplasmáticas com material electrono-denso em várias fases de desenvolvimento (vitelo endógeno), e uma vitelogénese secundária na qual, a par da presença das vesículas ergastoplasmáticas, são formadas grandes vesículas de vitelo e gotículas lipídicas, assim como a presença de microvilosidades que se projectam pela camada vitelina e vesículas de micropinocitose: a vitelogénese secundária nestas espécies parece ser também um processo simultaneamente endógeno e exógeno.

A descrição da ovógenese no anfípode *Orchestia gammarela* indica igualmente a existência de uma vitelogénese primária ou endógena, na qual a síntese de proteínas e glicoproteínas é realizada no retículo endoplasmático rugoso, e uma vitelogénese secundária durante a qual, e a par da síntese endógena, através de processos pinocitóticos e de uma rede de micro-canículas, é introduzido material extra-ovário (vitelogenina) e acumulado em vesículas de vitelo (Charniaux-Cotton, 1980).

Nas espécies *Penaeus japonicus* (Yano, 1988) e *Palaemon serratus* (Papathanassiou e King, 1984), as vesículas de vitelo aparecem inicialmente concentrados perto do núcleo dispersando-se posteriormente para a periferia do ovócito. No entanto, em lagostins de água doce (gen. *Cambarus* e *Orconectes* sp.: Beams e Kessel, 1963; *Astacus astacus* e *A. leptodactylus*: Zerbib, 1979) a concentração de vitelo faz-se primeiro na periferia do citoplasma, sugerindo diferentes mecanismos de síntese e/ou deposição de substâncias vitelinas no ovócito.

Os resultados obtidos por Zeni e Zaffagnini (1989) com a espécie não-malacostraca, *Leptestheria dahalacencis*, em cuja vitelogénese a fracção proteica do vitelo tem origem mista, mas de maior proporção endógena (que a aproxima mais dos malacostraca do que aos não-malacostraca) levou estes autores a pôr a hipótese de que a quantidade exógena de vitelo não depende da posição sistemática da espécie mas de outros factores como o *habitat*, rapidez do processo ovogénico ou do número de ovos produzidos.

Nos decápodes, é depositado no espaço perivitelino, ao longo do oolema e entre as microvilosidades, um material electrono-denso o qual em estádios posteriores dá

lugar à camada vitelina ou corion. A camada vitelina torna-se depois uma camada contínua que separa o ovócito das células foliculares (Papathanassiou e King, 1984).

No final da vitelogénese as microvilosidades desaparecem, a membrana citoplasmática torna-se lisa e aparecem no citoplasma do ovócito as especializações corticais (Charniaux-Cotton, 1980). Um dos aspectos mais notórios, nos peneídeos, é o abundante número de grandes criptas corticais em forma de bastonetes, contendo as estruturas do tipo "escova de garrafas", e que se situam claramente fora da membrana celular que limita o ovócito (Rankin e Davis, 1990; Clark Jr. *et al.*, 1980, 1990). Nas espécies *Penaeus japonicus* e *P. vannamei* estas vesículas ou bastonetes corticais aparecem inicialmente como corpos esféricos na periferia do citoplasma do ovócito, tornando-se alongados em direcção ao núcleo à medida que o ovócito se aproxima da maturação. Na espécie *Penaeus monodon* a coloração histoquímica das vesículas corticais indica a ausência de lípidos e a presença de glicoproteínas (Tan-Fermin e Pudera, 1989).

A origem dos componentes das criptas (bastonetes) corticais não está ainda de todo elucidada, embora as informações preliminares sugerem a sua proveniência no próprio ovócito (Clark Jr. *et al.*, 1990). A utilização de anticorpos mono-específicos contra um polipéptido existente nos bastonetes permitiram Rankin e Davis (1990) demonstrar a sua síntese intraovocítica, no retículo endoplásmico, desconhecendo no entanto o mecanismo da sua entrada no bastonete cortical o qual, na espécie estudada, *Penaeus vannamei*, é claramente extra-ovocítico. No mesmo trabalho, estes autores encontraram por imuno-reactividade, outro componente dos bastonetes (um polipéptido vitelino de 175 kDa) comum em vesículas moderadamente densas, provavelmente vesículas de vitelo e no espaço perivitelino.

Os bastonetes corticais do ovócito de *P. japonicus* ocupam as criptas extra-ovocíticas formadas pela membrana plasmática do ovócito (Yano, 1988), de forma idêntica ao descrito por Clark Jr. *et al.*, (1990) para a espécie *Sicyonia ingentis*. Estas criptas, que parecem ser formadas fora do ovócito pela fusão de materiais (provavelmente vesículas de pinocitose) secretados pelo ovócito, são cobertas pela camada vitelina a qual é aparentemente formada pelas células foliculares que lhe ficam adjacentes (Yano, 1988).

Nos ovócitos da lagosta americana, *Homarus americanus*, foram referenciadas umas estruturas igualmente em forma de "escova de garrafas" (Talbot, 1981b), situadas

no endocorion (porção interna da camada vitelino) e que podem ser análogas às bastonetes corticais dos camarões peneídeos. Na espécie *Penaeus japonicus* a pré-maturação, caracterizada pela formação das criptas corticais e da camada vitelina e durante a qual os ovócitos ainda acumulam grânulos vitelinos, é uma fase relativamente longa (Yano, 1988).

Nos decápodes, o final da maturação do ovócito é acompanhado de vários acontecimentos: a membrana nuclear desaparece e, algumas horas antes da desova, dá-se a cisão da vesícula germinal (GVBD) como prelúdio à nova divisão meiótica. A cisão da vesícula germinal é iniciada no final da pré-maturação e continua até à última fase de maturação imediatamente antes da desova (Yano, 1988).

O objectivo deste trabalho foi a caracterização ultraestrutural da ovogénese em *Penaeus kerathurus*, com particular atenção na vitelogénese, isto é na origem das vesículas vitelinas, e na maturação especialmente na origem das especializações corticais.

Material e Métodos

O estudo ultraestrutural da vitelogénese foi realizado em ovários da espécie *Penaeus kerathurus* (ver Material e Métodos Gerais).

As peças para microscopia electrónica (M.E.) foram fixadas imediatamente após a colheita em 2.5% glutaraldeído em tampão de Cacodilato de Sódio 0.15 M (pH 7.2) durante 2 horas, a 4° C. Seguiu-se uma lavagem de 2 horas no mesmo tampão a 4°C.

Depois da lavagem, procedeu-se a uma pós-fixação com 2% Tetróxido de Ósmio no mesmo tampão com 0,8% de Ferrocianeto de Potássio ($K_4[Fe(Cn)_6] \cdot 3H_2O$), durante 2 horas a 4°C. Algumas peças foram somente fixadas em glutaraldeído.

Seguiu-se a desidratação recorrendo a uma série ascendente de alcoóis: 50°, 75°, 90°, 95°, 100°(I), 100°(II) (em banhos de 30 minutos cada), e finalmente Óxido de Propileno (em dois banhos de 15 minutos cada), à temperatura ambiente.

A impregnação foi realizada com diferentes misturas de Óxido de Propileno e Epon (3:1, 1:1 e 1:3) durante 1 hora em cada mistura, à temperatura ambiente.

Finalmente, as peças foram colocadas em Epon puro durante 1 hora, à temperatura ambiente e depois na estufa a 60°C durante 30 minutos.

A inclusão, também em Epon, foi executada em moldes de inclusão de silicone. Foram feitos 8 blocos (duplos) por animal. Os blocos permaneceram na estufa a 60°C durante 3 dias.

Foram realizados cortes semi-finos e ultra-finos num ultramicrotomo LKB, com facas de vidro.

Os cortes semi-finos foram corados com uma solução de Azul de Metileno e Azur II (1:1) durante aproximadamente 1 minuto e observados ao microscópio óptico para localização na peça do local para a realização dos cortes ultra-finos.

Posteriormente as grelhas contendo os cortes ultra-finos foram sequencialmente contrastadas, no escuro, com Acetato de Uranilo em solução aquosa a 3% durante 20 minutos, seguida de lavagem em água destilada e Citrato de Chumbo (Reynolds) durante 10 minutos, seguida de lavagem em água destilada. Foram colocados junto com este banho algumas "lentilhas" de hidróxido de sódio para absorção do CO₂.

Os cortes ultrafinos assim obtidos foram observados num microscópio electrónico de transmissão JEOL 100CX II, a operado a 60 kV.

Para estudos citoquímicos, os cortes ultrafinos, de material fixado apenas com glutaraldeído, foram recolhidos em grelhas de ouro e executou-se a técnica de Thiéry (1967), para detecção ultraestrutural do glicogénio e de glicoproteínas. Esta técnica conta dos seguintes passos:

- a) Ácido Periódico aquoso 1%, durante 30 minutos
- b) Lavagem em água destilada durante 3 x 10 minutos
- c) 0.2% Tiocarbhidrazida em 20% de ácido acético aquoso, durante 2 horas
- d) 20% ácido acético aquoso - duas vezes uma passagem rápida
 - 10% ácido acético aquoso - três vezes 20 minutos
 - 5% ácido acético aquoso - 10 minutos

2% ácido acético aquoso - 5 minutos

Água destilada- duas vezes uma passagem rápida e três vezes 20 minutos

e) 1% Proteinato de Prata aquoso, durante 30 minutos, ao abrigo da luz

f) Água destilada- duas vezes uma passagem rápida e mais 30 minutos

Resultados

Previtelogénese

Na espécie *Penaeus kerathurus*, os ovócitos previtelogénicos apresentam um núcleo eucromático grande e oval, o qual contém vários nucléolos periféricos ligados ao invólucro nuclear e compostos por grandes massas globulares densas interligadas por uma rede de finos cordões (figuras 1, 2). O nucleoplasma, que contém também grandes agregados de grânulos intercromatínicos (figura 3), está rodeado por um invólucro nuclear perfurado por numerosos poros nucleares, através dos quais um fino material fibrilo-granular é exportado para formar massas densas fibrilo-granulares ("nuages") (figuras 1, 2).

A aglomeração de organelos na região perinuclear contrasta com a sua escassez no citoplasma periférico. Exceptuando as mitocôndrias, que são pleomórficas e ramificadas (figura 5), e os microtúbulos, todos os organelos parecem ter origem directa a partir do invólucro nuclear.

O retículo endoplásmico é formado a partir de expansões da membrana externa e do espaço intermembranar do invólucro nuclear (figuras 1, 2). Pequenos grânulos electrono-densos, de natureza glicoproteica, contidos neste espaço intermembranar, são também exportados para as cisternas do retículo endoplásmico em formação (figuras 1, 2, 4). Quer o invólucro nuclear, quer o retículo endoplásmico, parecem não ter ribosomas ligados à sua superfície.

O aparelho de Golgi é originado pela fusão de pequenas vesículas vesiculadas a partir de pequenas e grandes expansões do invólucro nuclear. As grandes expansões,

contendo também pequenos grânulos densos, circundam a área de formação do Golgi, constituindo assim a cisterna transicional do retículo endoplásmico que, por vesiculação, origina o aparelho de Golgi (figuras 6-8).

O lado da cisterna transicional do retículo endoplásmico que fica oposto à área de formação do Golgi, bem como algumas cisternas livres do retículo endoplásmico, dão origem a pequenas vesículas de densidade intermédia. Estas vesículas incorporam o fino material fibrilar que está contido no lúmen do retículo endoplásmico (figuras 7, 8).

Alguns vacúolos autofágicos foram também observados na região perinuclear, frequentemente envolvidos no material das massas densas fibrilo-granulares ("nuages") (figura 9). A origem dos vacúolos autofágicos é múltipla, integrando: 1) pequenas estruturas vesiculares densas que inicialmente aparecem no espaço intermembranar do invólucro nuclear (figura 10), que são posteriormente exportadas para as cisternas do retículo endoplásmico (figura 11) e finalmente vesiculadas deste organelo (figura 12); 2) figuras de mielina directamente libertadas do invólucro nuclear (figura 13); e 3) pequenas vesículas provenientes directamente do aparelho de Golgi (figura 14).

À medida que estes organelos são formados, difundem para a periferia do citoplasma do ovócito (figura 15). Nesta fase da ovogénese observaram-se também pontes intercelulares que interligam ovócitos adjacentes, não se notando quaisquer diferenças ultraestruturais entre as células (figura 16).

As células foliculares que rodeiam os ovócitos previtelogénicos são estreitas e possuem um núcleo eucromático em forma de S. No seu citoplasma apenas se observam mitocôndrias de maior dimensão e de matriz clara, e numerosos feixes de microtúbulos (figura 15).

Vitelogénese

Vitelogénese Inicial

Nesta fase, cada ovócito aparece rodeado por dois tipos de células foliculares. Uma é estreita e apresenta um núcleo e o citoplasma muito densos. A outra, de grande dimensão, exhibe um núcleo e o citoplasma pouco densos (figuras 17-19). Ambos os tipos de células apresentam cisternas de retículo endoplásmico rugoso (RER) e aparelho de Golgi bem desenvolvido, mas apenas as células foliculares claras parecem secretar

um material fibrilar que é exocitado para o espaço perivitelino, onde parece participar na formação da camada vitelina (figura 20).

O citoplasma do ovócito é preenchido por grandes vesículas redondas de RER, as quais contêm pequenos grânulos densos numa matriz fibrilar (figuras 21-24). Além deste organelo, podem também ser observados vários pequenos aparelhos de Golgi, grandes agregados de gotículas lipídicas e agregados periféricos de cisternas de RER (figuras 21-24).

Esta fase inicial da vitelogénese é caracterizada pela formação de vesículas vitelinas, as quais têm uma origem simultaneamente exógena e endógena. Parece também coexistirem dois tipos principais de vesículas vitelinas, uma de conteúdo denso e outra de conteúdo de densidade média. As vesículas vitelinas densas são formadas pela fusão de vesículas revestidas resultantes de endocitose e por vesículas claras de origem Golgiana (figuras 21-24). Pelo contrário, as vesículas vitelinas de densidade intermédia formam-se a partir de expansões de vesículas do retículo endoplásmico rugoso, parecendo, no entanto, também incorporar os mesmos materiais que dão origem às vesículas vitelinas densas (figuras 24-26). Não foi possível encontrar uma fase de transição entre os ovócitos previtelogénicos e os ovócitos em vitelogénese inicial, o que sugere uma passagem rápida para a fase de crescimento. Como não foi observada qualquer evidência de exocitose, é pois provável que as vesículas de densidade intermédia dos ovócitos previtelogénicos possam estar envolvidos na formação das vesículas vitelinas. Outra alternativa poderá ser a sua contribuição, por exocitose, na formação da camada vitelina.

Durante esta fase, as vesículas do RER dão também origem, por vesiculação, a algumas vesículas que contêm estruturas em forma de cordão (figuras 27, 28).

Os núcleos dos ovócitos em vitelogénese inicial são muito grandes e eucromáticos, exibindo nucléolos que são compostos de uma grande região central densa rodeada por uma periferia reticulada (figura 29).

Vitelogénese intermédia e tardia

A vitelogénese intermédia é um curto período caracterizado pela formação de um extenso retículo endoplásmico tubular rico num material finamente fibrilar, mas sem

os pequenos grânulos densos (figuras 30-33), seguido pela confluência e alargamento das vesículas de RER pré-existentes (figuras 34-37).

Estas modificações da conformação do retículo endoplásmico estão directamente dirigidas para a formação de grandes quantidades de vesículas vitelinas de densidade intermédia na fase de vitelogénese avançada. A confluência das vesículas do RER origina um retículo endoplásmico anastomosado que rodeia e suporta a formação das vesículas vitelinas (figuras 38-41), enquanto que o retículo endoplásmico tubular é directamente incorporado nesse vitelo. A confluência de RER parece ser mediada por múltiplas finas expansões que interligam as vesículas de RER, apresentando uma aparência de lamelas aneladas (figuras 37-41). Durante esta fase, o RER anastomosado sintetiza um grande número de estruturas em cordão, já referenciadas no início da vitelogénese, as quais são finalmente vesiculadas (figuras 34-37). Embora os pequenos grânulos densos do RER corem positivamente para glicoproteínas, o mesmo não se passa com os elementos em cordão (figura 53).

As gotículas lipídicas, antes observadas apenas em grandes agregados, aparecem, nesta fase, isoladas e intimamente ligadas às vesículas do RER e às vesículas vitelinas em formação (figuras 35, 37, 38).

Os aparelhos de Golgi mantêm-se pequenos mas parecem muito mais activos, tornando-se também intimamente associados com as vesículas do RER e com as vesículas vitelinas em formação (figuras 33, 40).

As mitocôndrias são numerosas, mostrando, nesta fase, uma aparência frequentemente anelada (figura 40).

Embora esta fase seja caracterizada pela formação intensa de vitelo endógeno, a via exógena inicial continua presente, mas em menor escala (figuras 38-40).

O núcleo dos ovócitos em vitelogénese intermédia e avançada é grande e eucromático, apresentando uma forma irregular. Contém vários nucléolos, os quais são compostos por grandes massas, densas e irregulares, interligadas por um retículo de finos cordões (figura 42).

Os ovócitos em vitelogénese intermédia e avançada são rodeados não só por células foliculares, umas claras e outras densas (figuras 38-41), mas também por

ovócitos aplanados. Estes ovócitos também apresentam características de crescimento mas a um ritmo menor, o que sugere um papel de células nutritivas ("nurse-cells").

Maturação do vitelo

Apesar de no início da vitelogénese serem já observadas vesículas vitelinas de densidade intermédia, com provável origem nas vesículas do RER, é durante a vitelogénese intermédia e avançada que o retículo endoplásmico tubular se apresenta como evidente precursor directo deste vitelo. Este processo é bastante intenso e inclui a fusão e posterior absorção dos túbulos pelas vesículas vitelinas em formação (figuras 43, 44).

A maturação das vesículas vitelinas continua no micro-ambiente especial criado pelo RER anastomosado que as circunda. O aparelho de Golgi, que continuamente recebe pequenas vesículas do RER, produz pequenas e grandes vesículas, contendo estas últimas um fino material grânulo-fibrilar, que se funde com o vitelo (figuras 45, 47, 48). Os grânulos, mas não as fibrilas, das grandes vesículas do Golgi, também coram positivamente para glicoproteínas (figura 54).

As gotículas lipídicas individualizadas, foram também observadas em contacto íntimo com as vesículas vitelinas (figuras 44, 54). Nesta fase, surgem grânulos de glicogénio, inicialmente formados em restritas áreas claras do citoplasma, delimitadas pelas ramificações do RER, mas que depois preenchem progressivamente o citoplasma do ovócito (figuras 41, 45, 46, 54). Estes grânulos de glicogénio são, posteriormente, também concentrados sob a forma de pequenos agregados, na periferia do vitelo (figuras 46, 54).

As vesículas de vitelo em maturação absorvem também três outros tipos de componentes: 1) as vesículas vitelinas densas (figura 49); 2) figuras mielínicas, originadas do retículo endoplásmico tubular (figuras 50, 51); e 3) as vesículas derivadas do RER contendo estruturas em cordão (figura 52).

Formação das Vesículas Corticais

Depois da formação das vesículas vitelinas ter terminado, o ovócito sofre novas e profundas alterações. O RER anastomosado da fase de vitelogénese avançada cinde-se em vesículas, contendo ainda os pequenos grânulos densos, confirmando assim que a fase anastomosada está directamente envolvida na formação intensiva das vesículas vitelinas (figuras 55, 56).

Nesta fase, todo o citoplasma aparece agora repleto de pequenas vesículas corticais, de forma irregular, e que contêm estruturas cujo aspecto morfológico é semelhante ao dos proteoglicanos (figuras 55, 56). Na periferia do ovócito existem mesmo algumas vesículas corticais de maior dimensão já fundidas com o oolema (figura 57). A origem das vesículas corticais pode ser claramente relacionada com o RER, embora recebam também contribuição dos aparelhos de Golgi. Por esta razão, são aqui denominadas de vesículas corticais em vez de criptas. A designação de criptas corticais foi a denominação dada às profundas invaginações do oolema encontradas nos ovócitos dos crustáceos, as quais, posteriormente, acumulavam o seu conteúdo por compactação de materiais extracelulares. Este não é o caso desta espécie, uma vez que não foi observada qualquer via endocitótica e, antes pelo contrário, foi claramente observada a sua origem a partir de precursores intracelulares bem como a sua posterior exocitose. As vesículas corticais formam-se a partir de expansões terminais do RER, cujo conteúdo se diferencia então em estruturas do tipo proteoglicano (figuras 58, 59, 61). Noutras espécies, estes elementos foram denominados estruturas do tipo "em escova de garrafa", mas a sua aparência morfológica é tão próxima da dos proteoglicanos que preferimos esta denominação. Na sua fase inicial de formação a partir do RER, as vesículas corticais exibem finas expansões que limitam áreas claras do citoplasma, de forma similar ao anteriormente ocorrido com o RER, as quais são progressivamente absorvidas no seu interior (figuras 58-60, 76, 77).

O núcleo do ovócito nesta fase já não exhibe grandes nucléolos mas sim múltiplos nucléolos de pequena dimensão e finamente reticulados (figura 55).

A actividade do Golgi parece bastante diminuída e as gotículas lipídicas estão reduzidas em número e ainda se encontram individualizadas.

Maturação das Vesículas Corticais

Nesta fase, o ovócito é caracterizado pela presença de grandes vesículas corticais já fundidas com o oolema. O núcleo, de grande dimensão e eucromático, mostra novamente nucléolos maiores, os quais são constituídos por pequenas regiões redondas e densas circundadas por uma ampla rede de cordões reticulares densos (figura 62).

A região perinuclear está repleta com algumas vesículas vitelinas e grandes quantidades de pequenas vesículas de RER, pequenas vesículas corticais e mitocôndrias aneladas (figuras 62, 63). Esta região continua-se com uma área que contém numerosas vesículas vitelinas com grandes agregados de grânulos de glicogénio na sua periferia (figuras 64, 77). Ainda nesta fase, grandes vesículas de Golgi, contendo glicoproteínas, foram observadas a fundir-se com as vesículas de vitelo, indicando assim um processo de maturação contínuo para além da vitelogénese avançada (figuras 75, 76).

Mais externamente, existe uma outra região também rica em vesículas vitelinas, as quais apresentam uma menor quantidade de glicogénio periférico e são rodeadas por RER anastomosado (figura 65).

Acima desta região, aparece o lado interno das grandes vesículas corticais periféricas. Nesta fase, diminui o número de vesículas vitelinas e torna-se evidente a ramificação do tipo “lamelas aneladas” do RER (figuras 66, 67). A parte interna, basal e lateral, das grandes vesículas corticais revela um processo de maturação contínua, o qual é caracterizado pela fusão com vesículas corticais de menor dimensão e com pequenas e grandes vesículas de Golgi e do RER (figuras 68, 69, 75, 78-81).

Embora as grandes vesículas corticais se fundam com o oolema, não foram observados sinais de extrusão do seu conteúdo, excepto na região apical do seu conteúdo exposto, a qual parece dispersar-se e fundir-se com a camada vitelina (figuras 70, 71, 82). Pelo contrário, na periferia do ovócito algumas vesículas corticais de pequena dimensão fundem-se com o oolema, sendo o seu conteúdo completamente excitado e fundido com a camada vitelina (figura 72).

Na periferia do ovócito são também observadas algumas vesículas vitelinas, mitocôndrias, gotículas lipídicas individualizadas, numerosas pequenas vesículas corticais, e grandes vesículas de RER. As células foliculares são estreitas mas não densas (figuras 70-73), e algumas regiões do ovócito mantêm-se rodeadas por ovócitos

aplanados, possivelmente representando células nutritivas ("nurse-cells"), por vezes com um núcleo cuja disposição da heterocromatina em barras densas periféricas faz lembrar o processo de apoptose (figuras 71, 74).

Discussão

O processo de formação e armazenamento das substâncias de reserva ou vitelinas nos ovócitos, a vitelogénese, constitui um dos aspectos mais investigados da ovogénese. Porém, a informação disponível sobre as poucas espécies de crustáceos estudadas é controversa com respeito à origem e formação das vesículas vitelinas. Igualmente, as especializações corticais que nos peneídeos são denominadas "criptas ou bastonetes corticais" e que no momento da desova são extrudidas para formar a camada de fertilização, têm uma origem desconhecida. O presente trabalho constitui o primeiro estudo ultraestrutural da vitelogénese na espécie *Penaeus kerathurus* e demonstra a presença permanente dos dois processos, intra e extraovocítico, na formação do vitelo, com o domínio de um deles caracterizando distintas fases da vitelogénese, bem como a origem intraovocítica das vesículas corticais e o seu desenvolvimento até à localização final extra-oolema.

Previtelogénese

O ovócito previtelogénico do *P. kerathurus* é caracterizado pela formação do retículo endoplásmico, a partir de expansões da membrana externa e do espaço intermembranar do invólucro nuclear, aparentemente sem ribossomas. Pequenos grânulos electrono-densos, de natureza glicoproteica, contidos no espaço intermembranar, são também exportados para as cisternas do retículo endoplásmico em formação. No camarão *Palaemon serratus*, também a membrana externa do invólucro nuclear produz pequenas vesículas que irão formar o retículo endoplásmico liso, enquanto outros organelos são observados junto ao núcleo e depois a dispersar pelo citoplasma (Papathanassiou e King, 1984). A origem do retículo endoplásmico a partir da membrana externa do invólucro nuclear foi posta em hipótese por Beams e Kessel (1963) em algumas espécies de lagostins de água doce, dada a relação morfológica próxima entre elas. Nos ovócitos previtelogénicos do caranguejo-ermita *Coenobita*

clypeatus, os grânulos densos estão já presentes em vesículas, cuja membrana só ocasionalmente parece estar em continuidade com o invólucro nuclear (Komm e Hinsch, 1985). De forma idêntica, os ovócitos previtelogénicos do conostraca *Leptestheria dahalacencis* apresentam todos os organelos desenvolvidos, sendo observados pequenos grânulos, de aspecto reticular, nas cisternas do retículo endoplásmico rugoso, mas com origem provável no aparelho de Golgi (Zeni e Zaffagnini, 1989). O presente trabalho demonstra pois, pela primeira vez nestas espécies, a formação do retículo endoplásmico a partir do invólucro nuclear, bem como que os grânulos presentes no retículo endoplásmico são sintetizados previamente no invólucro nuclear.

Nesta fase previtelogénica assiste-se também à transferência de material nuclear para o citoplasma através dos numerosos poros nucleares. Este fino material fibrilo-granular exportado forma no citoplasma massas densas fibrilo-granulares (nuages). Esta aparente passagem de material nuclear, bem como a presença de nuages, foi também observada no *Coenobita clypeatus* (Komm e Hinsch, 1985), no *Palaemon serratus* (Papathanassiou e King, 1984) enquanto no não-malacostraca (conostraca) *Leptestheria dahalacencis* o material extrudido aparece sob a forma de pequenos grânulos que se unem em massas granulares no citoplasma perinuclear (Zeni e Zaffagnini, 1989). Em três géneros de lagostins de água doce, *Cambarus* sp., *Orconectes* sp. e *Procambarus* sp. foi observada a passagem de partículas componentes do nucléolo, sendo reagrupadas posteriormente na região perinuclear (Beams e Kessel, 1963).

Para além da formação do retículo endoplásmico, foi ainda registada no *P. kerathurus* a formação do aparelho de Golgi directamente a partir do invólucro nuclear. Esta observação previamente não descrita constitui a primeira descrição do género nos crustáceos. O aparelho de Golgi tem origem na fusão de pequenas vesículas formadas por vesiculação de pequenas e grandes expansões da membrana externa do invólucro nuclear: as grandes expansões constituem a cisterna transicional do retículo endoplásmico. Na espécie *Palaemon serratus*, o aparelho de Golgi é também bastante activo, produzindo pequenas vesículas que se fundem com as cisternas do RER (Papathanassiou e King, 1984).

Em *P. kerathurus* o lado da cisterna transicional do retículo endoplásmico que fica oposto à área de formação do Golgi, bem como algumas cisternas livres do retículo

endoplásmico, dão origem a pequenas vesículas de densidade intermédia. Estas vesículas incorporam o fino material fibrilar que está contido no lúmen do retículo endoplásmico e poderão constituir o início da produção do vitelo endógeno que caracteriza a vitelogénese primária. Nos ovários imaturos (mas que a nosso ver possivelmente estão já em vitelogénese primária) da lagosta *Homarus americanus* são também já proeminentes no ooplasma vesículas consideradas como parte do RER, contendo material granular, e que são precursoras do vitelo (Schade e Shivers, 1980).

As vesículas autofágicas encontradas nesta fase no *P. kerathurus* integram: a) pequenas estruturas vesiculares densas, as quais estão presentes no espaço intermembranar do invólucro nuclear e são depois exportadas para as cisternas do retículo endoplásmico e finalmente vesiculadas; b) figuras de mielina provenientes directamente do invólucro nuclear e c) pequenas vesículas oriundas do aparelho de Golgi. Estruturas semelhantes às vesículas autofágicas do *P. kerathurus* foram descritas em lagostins de água doce por Beams e Kessel (1963) e denominadas “corpos membranares complexos”. São constituídos por grânulos densos e camadas de membranas dispostas concêntricamente, limitados por uma membrana, podendo esta estar incompleta. Os autores consideraram a possibilidade de se tratar de áreas localizadas de atrofia ou degeneração. Estes organelos foram também observados no camarão *Palaemon serratus*, apenas durante parte da vitelogénese, desaparecendo no final desta, sem que a sua função tenha sido determinada (Papathanassiou e King, 1984). A origem dos vacúolos autofágicos é pois neste trabalho demonstrada pela primeira vez nos crustáceos. A presença de uma membrana lábil, como observada também por Beams e Kessel (1963), sugere a integração activa de diversos elementos para a sua organização. Porém, tal como sucedeu com os referidos autores, não nos foi possível constatar a sua evolução.

Ainda durante a previtelogénese do *P. kerathurus*, foram observadas pontes intercelulares entre ovócitos, não se distinguindo diferenças ultraestruturais entre eles. As pontes intercelulares, indicando uma mesma origem para ambas as células, pressupõe estarmos em presença da formação de células nutritivas (nurse-cells). Estas, sendo comuns nos não-malacostraca não foram até agora descritas nos malacostraca (Zeni e Zaffagnini, 1989), pelo que as nossas observações são as primeiras a demonstrar a sua existência nesta sub-classe.

Vitelogénese

A vitelogénese, também referida como vitelogénese secundária ou exógena (Van Herp e Payen, 1991), é a fase durante a qual se formam as vesículas vitelinas com incorporação de material extraovocítico. Por isso, é muitas vezes determinada pela existência na hemolinfa da chamada “proteína específica da fêmea” (Schade e Shivers, 1980).

As distintas características ultraestruturais apresentada pelos ovócitos da espécie *P. kerathurus* permitiram a divisão desta fase em vitelogénese inicial, intermédia e final.

Vitelogénese inicial

A vitelogénese inicial caracteriza-se pelo predomínio dos fenómenos de endocitose mediada por receptores. A fusão das vesículas revestidas (resultado da endocitose mediada por receptores) com vesículas claras provenientes do aparelho de Golgi e provavelmente com as vesículas formadas na previtelogénese originam vesículas vitelinas que se fundem progressivamente entre si para formar grandes vesículas vitelinas densas. Vesículas revestidas foram também observadas em ovócitos vitelogénicos da lagosta *Homarus americanus* (Schade e Shivers, 1980) e no caranguejo *Libinia emarginata* (Hinsch e Cone, 1969). Na fase vitelogénica das espécies *P. japonicus* (Yano *et al.*, 1996), *Coenobita clypeatus* (Komm e Hinsch, 1987) e *Palaemon serratus* (Papathanassiou e King, 1984) não foram observadas endocitose mediada por vesículas revestidas mas apenas por vesículas lisas. A participação do aparelho de Golgi, por vezes em associação com o RER, na síntese de vitelo parece não ser comum a todos os crustáceos. Está presente no caranguejo *Libinia emarginata* (Hinsch e Cone, 1969), no caranguejo-ermita *Coenobita clypeatus* (Komm e Hinsch, 1987) e no camarão *Palaemon serratus* (Papathanassiou e King, 1984), mas parece não participar na vitelogénese de lagostins de água doce (Beams e Kessel, 1963; Zerbib, 1979) sendo inclusivé a sua presença escassa no peneídeo *Penaeus vannamei* (Rankin e Davis, 1990). A entrada de material extraovocítico no *Palaemon serratus* durante o início da vitelogénese apenas é possível na forma de baixo peso molecular, uma vez que não se observa actividade pinocitótica, existindo esta apenas no final da vitelogénese (Papathanassiou e King, 1984).

No citoplasma, o retículo endoplásmico é agora constituído por grandes vesículas (com grânulos densos no meio de uma matriz fibrilar), cuja membrana possui ribossomas (RER). A existência de cisternas do RER contendo grânulos densos (por vezes em forma de disco ou de anel) é uma das características mais comum na vitelogénese dos crustáceos (em lagostins de água doce: Beams e Kessel, 1963; no caranguejo *Libinia emarginata*: Hinsch e Cone, 1969; nos peneídeos *Penaeus aztecus* e *P. setiferus*: Duronslet *et al.*, 1975; na lagosta *Homarus americanus*: Shade e Shivers, 1980; no camarão *Palaemon serratus*: Papathanassiou e King, 1984; no caranguejo *Coenobita clypeatus*; no não-malacostraca *Leptestheria dahalacensis*: Zeni e Zaffagnini, 1989 e no peneídeo *P. vannamei*: Rankin e Davis, 1990).

Em *P. kerathurus* são ainda visíveis grandes agregados de gotículas lipídicas cuja origem não foi possível determinar. De forma idêntica, a denominada “fracção lipídica” do vitelo por Beams e Kessel (1963) em espécies de lagostins de água doce, parece surgir *de novo* no citoplasma sem qualquer ligação morfológica com qualquer organelo citoplasmático, o mesmo acontecendo com o camarão *Palaemon serratus* (Papathanassiou e King, 1984). Gotículas lipídicas, elementos esféricos não limitados por membrana, foram também encontradas por Zerbib (1979) em ovócitos de lagostins de água doce (*Astacus astacus* e *A. leptodactylus*) em vitelogénese secundária, a par da acumulação das reservas vitelinas de origem exógena e da síntese de vitelo a nível do retículo endoplasmático rugoso. Durante a vitelogénese secundária nos ovócitos das espécies de cirrípedes *Balanus amphitrite* e *B. perforatus*, são visíveis glóbulos lipídicos rodeados de mitocôndrias, as quais poderão estar implicadas na sua síntese (Lepore *et al.*, 1993). Nos peneídeos *Penaeus aztecus* e *P. setiferus* não foram observadas gotículas lipídicas (Duronslet *et al.*, 1975) e no não-malacostraca *Leptestheria dahalacensis* os lípidos estão presentes junto com polissacáridos (Zeni e Zaffagnini, 1989).

Durante a vitelogénese inicial, os ovócitos de *P. kerathurus* estão rodeados de dois tipos de células foliculares, uma estreita e densa e a outra grande e clara. Este último tipo parece ser responsável pela síntese de material fibrilar que é exocitado. Não foi possível averiguar neste trabalho se estes materiais exportados estavam relacionados com material a endocitar pelo ovócito ou se participavam na formação camada vitelina. A presença de dois tipos diferentes de células foliculares a rodear um mesmo ovócito constitui a primeira descrição do género em crustáceos. Uma vez que este trabalho se centrou fundamentalmente no ovócito, serão necessárias mais investigações para

determinar a função na ovogénese de cada um dos dois tipos de células foliculares encontrados.

Vitelogénese intermédia

A vitelogénese intermédia compreende um curto período caracterizado pela formação de retículo endoplásmico tubular a partir das vesículas do RER, contendo material fibrilar mas sem grânulos densos, seguido pela confluência e alargamento das vesículas do retículo endoplásmico rugoso (RER). A confluência das vesículas do RER parece ser mediada por expansões finas dos mesmos, expansões essas que apresentam uma morfologia similar à das lamelas aneladas. O RER anastomosado, sintetiza então um grande número de estruturas em cordão, as quais são vesiculadas. Embora os pequenos grânulos densos do RER corem positivamente para glicoproteínas, o mesmo não se passa com os elementos em cordão. Não tendo sido encontrada, na literatura revista, descrição semelhante para estas transformações do RER, esta fase constitui a descrição de um mecanismo novo de preparação para a fase final da vitelogénese.

Vitelogénese tardia

Na fase de vitelogénese tardia verifica-se a formação de um novo tipo de vesículas vitelinas, as quais irão constituir o vitelo definitivo do ovócito maduro. A formação destas vesículas vitelinas dá-se em espaços restritos do citoplasma delimitado pelo RER anastomosado. O precursor directo destas vesículas vitelinas é o retículo endoplásmico tubular (RET). A grande característica deste tipo de vesículas vitelinas é o carácter lábil da sua membrana limitante, mas que está relacionada com a forma pela qual estas vesículas vitelinas incorporam os seus precursores. Na realidade, tudo se passa como num processo de absorção activa de variadíssimos organelos pelas vesículas vitelinas, e que inclui o RET, pequenas e grandes vesículas golgianas, vesículas vitelinas densas e corpos mielínicos originados do retículo endoplásmico tubular. Às vesículas vitelinas associam-se também grânulos de glicogénio, gotículas lipídicas e vesículas com estruturas em cordão. A associação com as vesículas com estruturas em cordão possivelmente poderá resultar numa posterior absorção, uma vez que após a associação o número das vesículas com estruturas em cordão diminui drasticamente. A

participação do retículo endoplásmico e do aparelho de Golgi na formação das vesículas vitelinas, também foi descrita no caranguejo *Libinia emarginata* (Hinsch e Cone, 1969). Nos lagostins de água doce as vesículas vitelinas parecem apenas resultar da participação do RER (Beams e Kessel, 1963). Os nossos resultados constituem a primeira observação nos crustáceos da formação de vesículas vitelinas com tamanha capacidade de absorção de variadíssimas estruturas.

Em conclusão, na espécie *P. kerathurus* o vitelo tem uma origem mista, isto é, intraovocítica e extraovocítica. No início da vitelogénese predominam os fenómenos de endocitose mediada por receptores. No entanto, como as vesículas revestidas resultantes da endocitose logo se fundem com vesículas claras de origem golgiana, as vesículas vitelinas são de origem mista. Posteriormente, o processo vitelogénico neste crustáceo é fundamentalmente intraovocítico, exibindo apenas escassos fenómenos de endocitose.

Nos malacostraca o vitelo pode ter origem exclusivamente exógena (*P. japonicus*: Yano e Chinzei, 1987; Yano *et al.*, 1996), mista mas com predominância endógena (*Penaeus semisulcatus*: Fainzilber *et al.*, 1992; Shafir *et al.*, 1992; *Palaemon serratus*: Papathanassiou e King, 1984; *Balanus amphitrite* e *B. perforatus*: Lepore *et al.*, 1993), e exclusivamente endógena (gen. *Cambarus*, *Orconectes* e *Procambarus* sp.: Beams e Kessel, 1963).

A topografia da formação das vesículas vitelinas também varia com as espécies. Nos lagostins de água doce (gen. *Cambarus* e *Orconectes* sp.: Beams e Kessel, 1963; *Astacus astacus* e *A. leptodactylus*: Zerbib, 1979) a concentração de vitelo faz-se primeiro na periferia do citoplasma enquanto no peneídeo *Penaeus japonicus* (Yano, 1988) e no camarão *Palaemon serratus* (Papathanassiou e King, 1984) as vesículas de vitelo aparecem inicialmente concentradas perto do núcleo dispersando-se depois para a periferia do ovócito. Este é também o caso na espécie *P. kerathurus* tendo em conta o aparecimento na região perinuclear das primeiras vesículas de densidade intermédia durante a previtelogénese e a dispersão dos organelos para a periferia. Contudo, na vitelogénese inicial a formação mista das vesículas vitelinas densas processa-se na região periférica do citoplasma, deslocando-se depois para o interior da célula. Por último, na vitelogénese final a participação do RER anastomosado na formação das vesículas vitelinas e a incorporação dos túbulos, provenientes do retículo endoplásmico tubular (ambos formados na fase de vitelogénese intermédia), resulta numa distribuição generalizada, por todo o

citoplasma, das vesículas vitelinas agora num processo de maturação. Nesta fase da vitelogénese, a rodear os ovócitos encontram-se para além dos dois tipos de células foliculares já referidos, ovócitos aplanados e cuja possível função como células nutritivas necessita mais investigação.

Após a vitelogénese está descrito para os crustáceos a formação de organelos citoplasmáticos denominados especializações corticais, que são estruturas envolvidas por membrana e que se acumulam no cortex dos ovócitos. Estas especializações são extrudidas após a fertilização ou a desova para formar uma camada que protege o ovo. Entre os crustáceos existe uma grande variação no tamanho, número, tipo, composição e morfologia destas especializações corticais (Duronslet *et al.*, 1975; Goudeau, 1984; Rankin e Davis, 1990). No peneídeo *P. vannamei* estas especializações corticais, também denominadas “bastonetes corticais” ou “criptas corticais” são descritas como invaginações fundas do oolema e cujo desenvolvimento se processa no exterior do ovócito (Rankin e Davis, 1990). Porém, no mesmo trabalho, estes autores encontraram, por imunocitoquímica, o mesmo polipéptido no retículo endoplásmico rugoso anastomosado e nos bastonetes corticais e, embora não tenham encontrado explicação para o seu modo de entrada, concluíram ser intraovocítica a origem dos componentes extraovocíticos das especializações corticais. Diferentemente, nos peneídeos *P. aztecus* e *P. setiferus* são descritas “grandes inclusões” (bastonetes corticais) na periferia do ooplasma, encontrando-se nos ovócitos maduros fora do oolema, sendo extrudidas na desova (Duronslet *et al.*, 1975).

Na espécie *P. kerathurus*, a denominação de “criptas corticais” não é correcta, uma vez que o presente estudo demonstra, pela primeira vez nos crustáceos, que as “criptas” são resultado não de uma invaginação do oolema mas da fusão de vesículas corticais com o oolema. Pela primeira vez também se demonstra a origem directa destas vesículas corticais a partir do RER.

Após a vitelogénese, na espécie *P. kerathurus*, expansões terminais do retículo endoplásmico rugoso dão origem a pequenas vesículas, nas quais os grânulos densos do RER se diferenciam em estruturas do tipo “escova de garrafas”. Estas vesículas contendo as referidas estruturas são as precursoras das vesículas corticais. Dada a semelhança morfológica dos componentes das vesículas corticais com a dos proteoglicanos parece-nos mais correcta esta denominação do que o termo “escova de garrafas”. No seu crescimento as pequenas vesículas corticais fundem-se entre si para

originar grandes vesículas corticais que se fundem então com o oolema. Mesmo nesta fase, a região baso-lateral das grandes vesículas corticais continua a receber componentes do RER bem como vesículas golgianas, enquanto que na sua região basal se continuam a fundir outras vesículas corticais de menor dimensão. Apesar das grandes vesículas corticais ocuparem praticamente toda a periferia do ovócito, continua a existir uma enorme população de pequenas vesículas corticais por todo o citoplasma. Contrariamente ao descrito para a espécie *Penaeus monodon* (Tan-Fermin e Pudera, 1989), na qual a coloração histoquímica das vesículas corticais indica a ausência de lípidos e a presença de glicoproteínas, na espécie *P. kerathurus* a técnica citoquímica de Thiéry para glicoproteínas não marcou positivamente as vesículas corticais, apesar de incorporarem glicoproteínas com origem no retículo endoplásmico e no aparelho de Golgi.

Na espécie *Penaeus kerathurus* algumas pequenas vesículas corticais foram observadas a exportar totalmente o seu conteúdo para o espaço perivitelino, o qual parece incorporar-se de seguida na camada vitelina. Na lagosta da espécie *Homarus americanus*, a camada vitelina ou corion está dividida num componente externo e outro interno (Talbot, 1981b). O exocorion parece composto de glóbulos embebidos numa matriz amorfa ou fibrilar enquanto que o endocorion para além dos elementos globulares, contém estruturas de tipo proteoglicano. Nesta espécie, o corion tem a sua origem nas células foliculares, incluindo os elementos do endocorion em forma de proteoglicanos (Talbot, 1981b). Desta forma é possível a existência no *P. kerathurus* de uma camada vitelina com origem mista, ou seja a partir de material excitado quer pelas células foliculares quer pelas pequenas vesículas corticais.

A periferia dos ovócitos maduros é revestida por três tipos de células: células foliculares densas, células foliculares claras e ovócitos em processo limitado de desenvolvimento citoplasmático. Estes ovócitos aplanados parecem não representar uma estrutura celular abortiva mas sim uma transformação para funcionarem como células tróficas (nurse-cells). Os argumentos a este favor incluem, a inexistência de microvilosidades em direcção ao ovócito, o desenvolvimento de vitelo concomitante com o do ovócito e a manutenção da "nurse-cell" em torno da superfície do ovócito acompanhando as células foliculares. A constituírem células de específica função trófica, e não ovócitos abortivos, a sua existência em crustáceos malacostraca é pela primeira vez referida. De facto, as células nutritivas dos ovócitos constituem uma

característica primitiva dos crustáceos estando presentes em alguns não-malacostraca mas ausentes em todos os malacostraca (Zeni e Zaffagnini, 1989).

Abreviaturas genéricas utilizadas nas microfotografias (microscopia electrónica de transmissão)

AV - vesícula autofágica	Mf - microfilamentos
BL - lâmina basal	Mt - microtúbulos
C - agregados em cordão	Mv - microvilosidades
CV - vesícula cortical	N - núcleo
D-FC - célula folicular densa	n - "nuages"
D-YV - vesícula vitelina densa	Nc - nucléolo
ER - retículo endoplásmico	np - poros nucleares
FC - célula folicular	O - ovócito
G - aparelho de Golgi	O-NC - célula nutritiva do ovócito
g - grânulo denso	RER - retículo endoplásmico rugoso
Gg - glicogénio	T - retículo endoplásmico tubular
ICB - pontes inter-celulares	TER - cisterna transicional do retículo endoplásmico (associado à formação do aparelho de Golgi)
L - gotícula lipídica	VL - camada vitelina
L-FC - célula folicular clara	YV - vesícula vitelina
L-YV - vesícula vitelina clara	
M - mitocôndria	

Previtelogenese

Figura 1. Região perinuclear onde é visível a acumulação de mitocôndrias (M), retículo endoplasmico (ER), aparelho de Golgi (G) e massas densas fibrilo-granulares (n - "nuages"). No espaço intermembranar do invólucro nuclear podem ser observados pequenos grânulos electronodensos que são exportados para as cisternas do retículo endoplasmico em formação (setas). No núcleo (N), e ligados ao seu invólucro, vêem-se alguns nucléolos periféricos (Nc) compostos por massas globulares densas interligadas por uma rede de finos cordões. $\times 16.000$

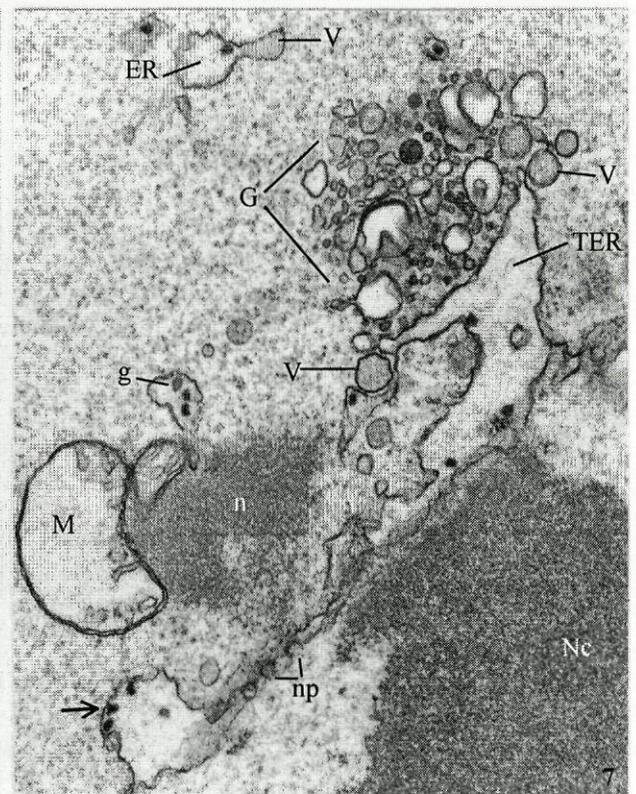
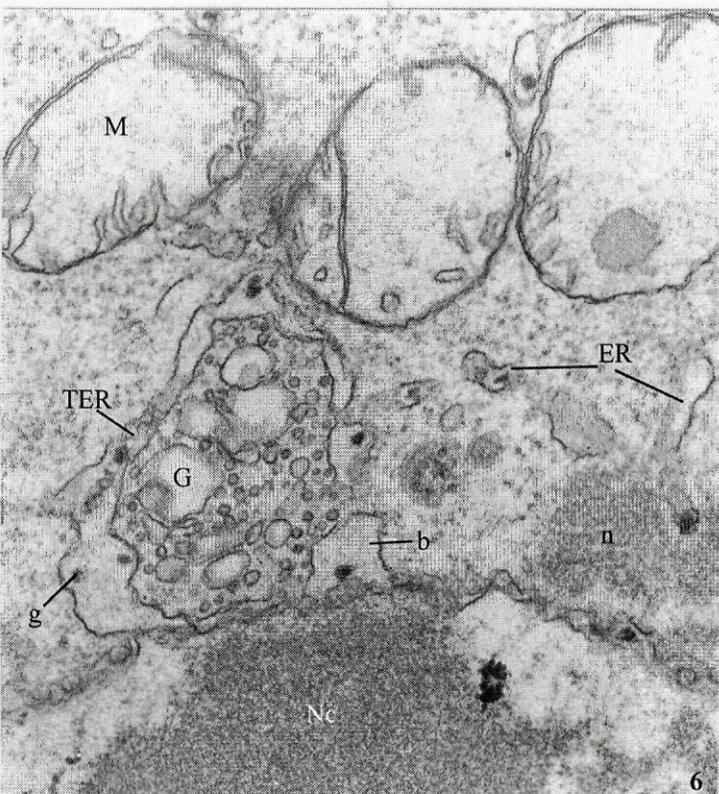
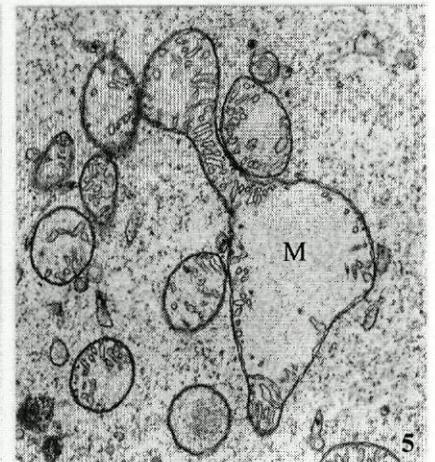
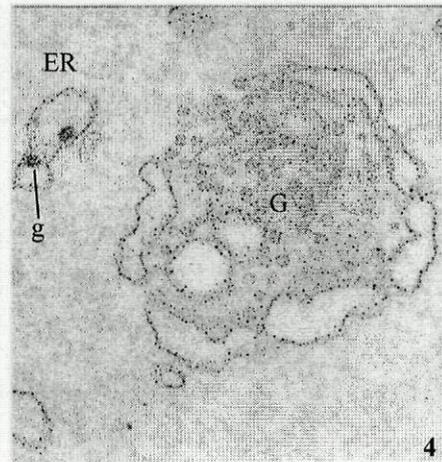
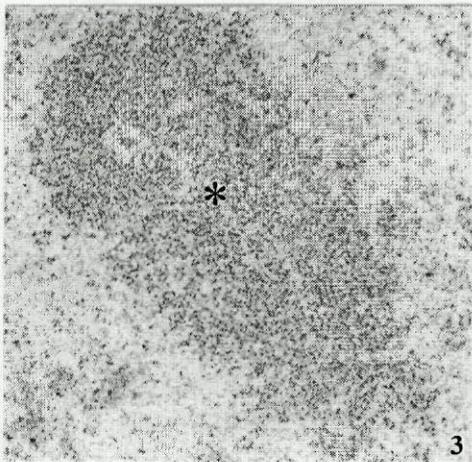
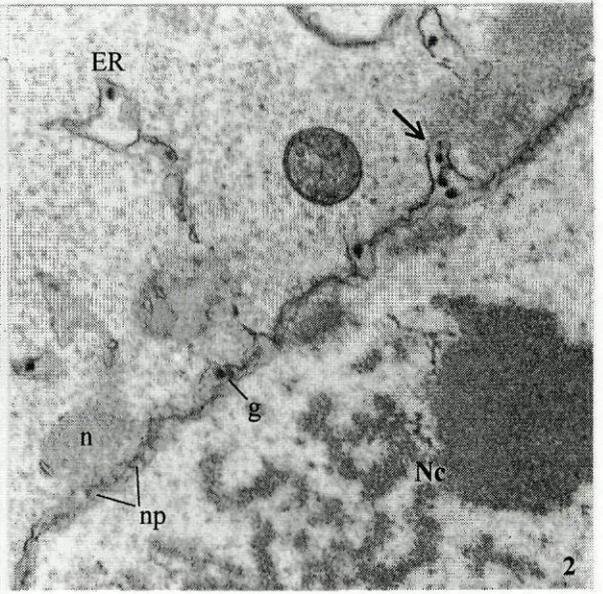
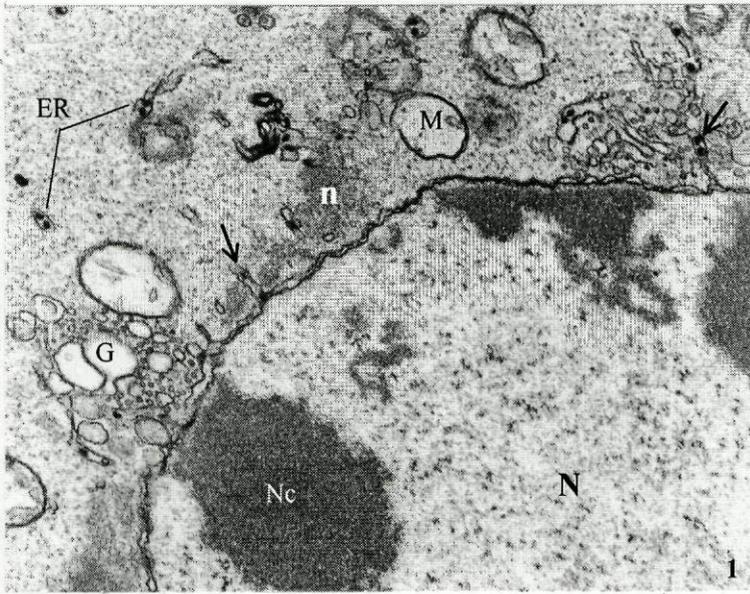
Figura 2. Detalhe da formação de cisternas do retículo endoplasmico (ER) a partir de expansões da membrana externa do invólucro nuclear e do espaço intermembranar (seta) onde também se observam pequenos grânulos eletronodensos (g) que são exportados para essas cisternas do retículo endoplasmico. Do núcleo, onde é visível a rede de finos cordões que interligam os nucléolos (Nc), é exportado através dos numerosos poros nucleares (np) material fibriligranular que no citoplasma formam as nuages (n). $\times 20.000$

Figura 3. Pormenor de um agregado de grânulos intercromatínicos (*) no nucleoplasma. $\times 8.000$

Figura 4. Técnica citoquímica de Thiéry. Os grânulos densos (g) do retículo endoplasmico (ER) marcam positivamente para glicoproteínas. (G), aparelho de Golgi. $\times 26.000$

Figura 5. Pormenor de um conjunto de mitocôndrias (M), no qual se pode observar o seu aspecto pleomórfico e ramificado. $\times 10.600$

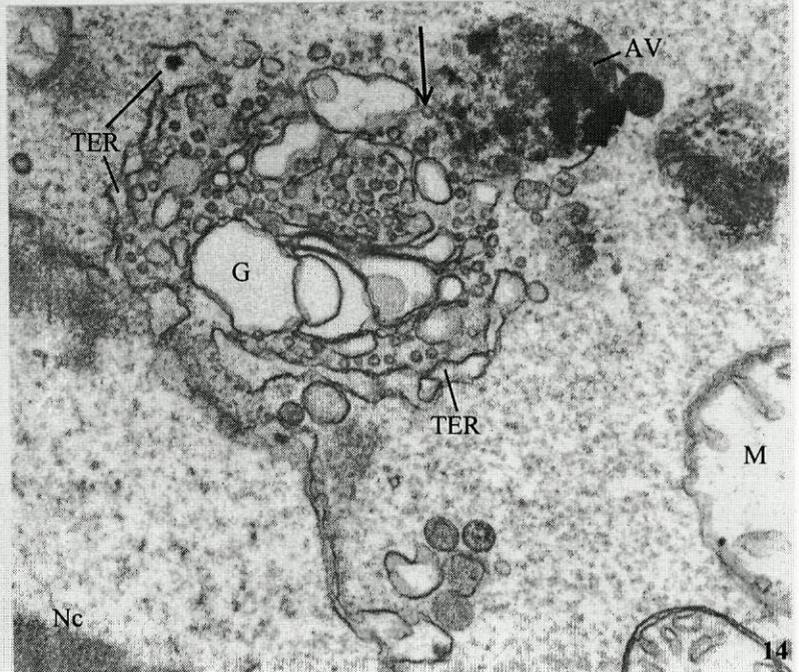
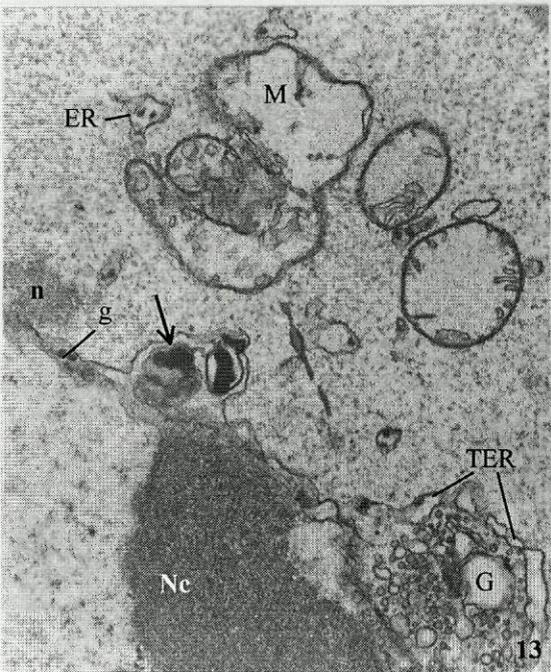
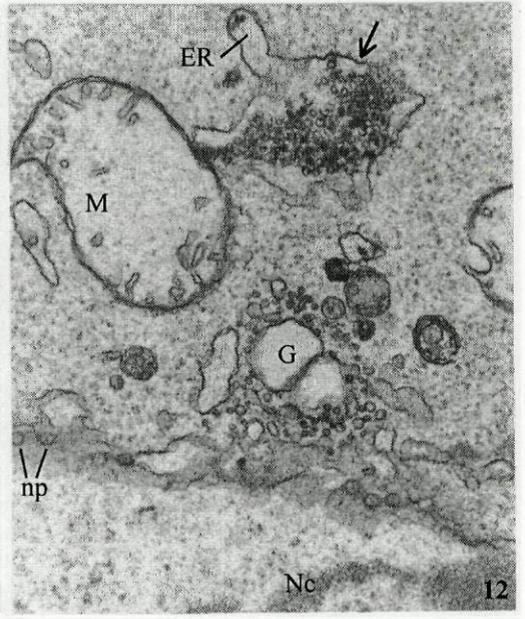
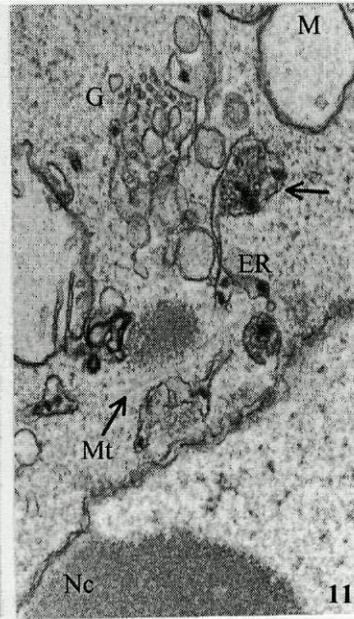
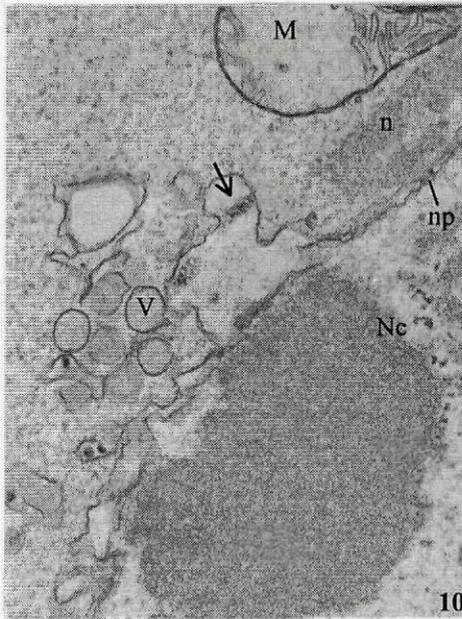
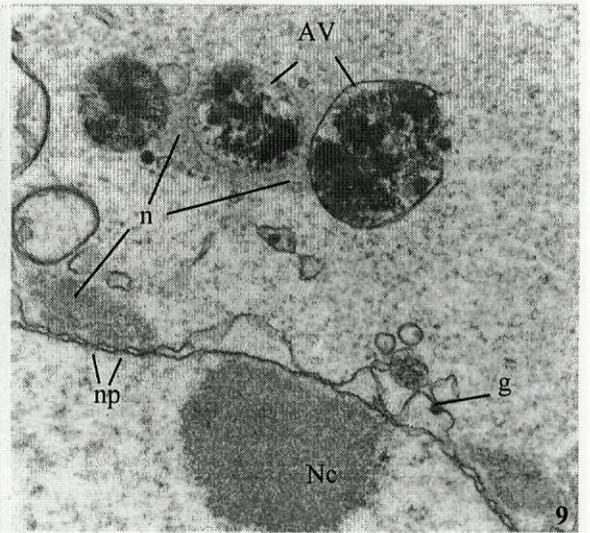
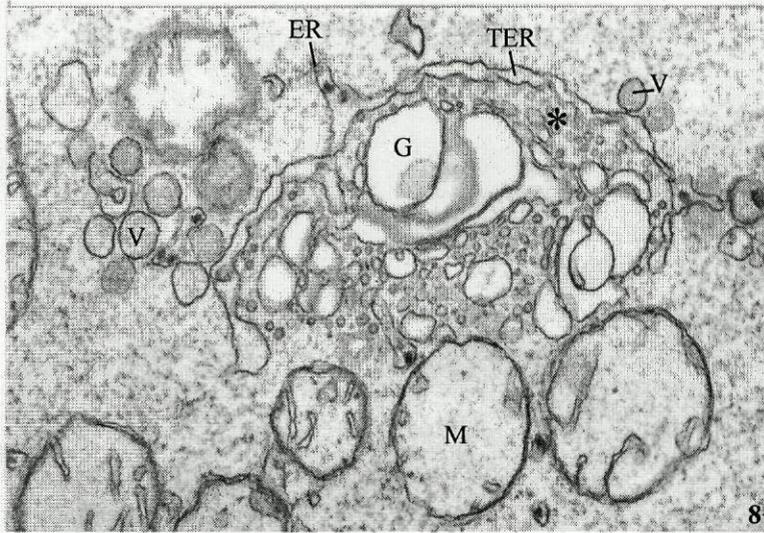
Figuras 6 e 7. Formação do aparelho de Golgi (G) a partir da vesiculação de expansões curta (b) e alongada (TER) da membrana externa do invólucro nuclear. A expansão alongada circunda a área de formação do Golgi e constitui uma cisterna transicional do retículo endoplasmico (TER) à qual se associam grânulos densos (g). Nesta região perinuclear são ainda visíveis várias mitocôndrias (M), material fibriligranular (n - "nuages"), e grânulos densos no interior do invólucro nuclear (seta). Algumas cisternas livres do retículo endoplasmico (ER), bem como o lado da cisterna transicional do retículo endoplasmico que fica oposto à área de formação do Golgi, originam pequenas vesículas de densidade intermédia (V). Estas vesículas incorporam o fino material fibrilar que está contido no lúmen do retículo endoplasmico. Fig. 6, $\times 30.000$; Fig. 7, $\times 24.000$



Previtelogénese

Figura 8. Aparelho de Golgi (G), formado e independente das ligações ao invólucro nuclear. Note-se que a cisterna transicional do retículo endoplásmico (TER), que dá origem por vesiculação a partir de sua face côncava (*) ao Golgi, se apresenta ligado ao retículo endoplásmico (ER). A cisterna transicional do retículo endoplásmico também origina, a partir da sua face convexa as vesículas de densidade intermédia (V). M, mitocôndria. $\times 24.000$

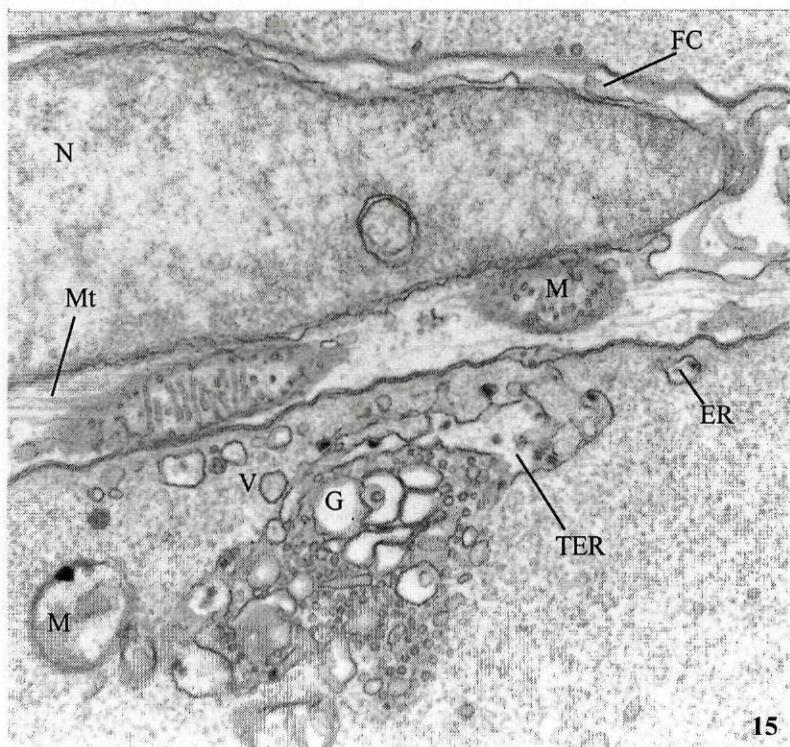
Figuras 9 - 14. Formação das vesículas autofágicas (AV). As vesículas autofágicas surgem na periferia nuclear e apresentam-se rodeadas por nuages (n). No interior das vesículas autofágicas podem-se discriminar estruturas de tipo vesicular e estruturas tipo corpos mielínicos (figura 9). As vesículas autofágicas incorporam vários elementos: a) pequenas estruturas vesiculares que surgem no interior de expansões da membrana externa e invólucro nuclear (figura 10, seta), que são de seguida incorporadas no retículo endoplásmico (ER) (figura 11, seta), e finalmente exportadas deste na forma de grandes vesículas (figura 12, seta); b) estruturas tipo corpos de mielina exportadas directamente do invólucro nuclear (figura 13, recta); e c) vesículas transgolgianas (figura 14, seta). Nas microfotografias também são evidentes a associação entre os poros nucleares (np) e as nuages (n), grânulos densos (g) no interior do invólucro nuclear, mitocôndrias (M), microtúbulos (Mt), aparelhos de golgi (G) em formação a partir de expansões do invólucro nuclear que formam as cisternas transicionais do retículo endoplásmico (TER), e vesículas de densidade intermédia (V). Figura 9 – 11, $\times 20.000$; Figura 13, $\times 16.000$; Figura 14, $\times 30.000$.



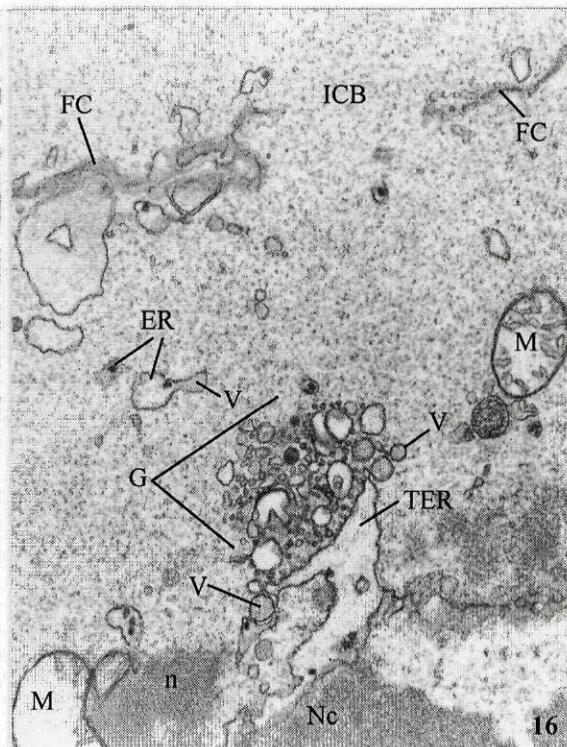
Previtelogénese

Figura 15. Acumulação na periferia do ovócito dos vários organelos difundidos do espaço perinuclear onde são formados: mitocôndrias (M), cisterna transicional do retículo endoplásmico (TER), aparelho de Golgi (G), cisternas livres de retículo endoplásmico (ER) e vesículas de densidade intermédia (V). Rodeando o ovócito pode ser observada uma célula folicular (FC) de núcleo alongado e eucromático. No seu citoplasma apenas se observam mitocôndrias (M), e numerosos feixes de microtúbulos (Mt). $\times 20.000$

Figura 16. Detalhe de uma ponte intercelular (ICB) interligando dois ovócitos adjacentes de aspecto ultrastrutural idêntico. Limitando a ponte intercelular e separando os dois ovócitos podem ser visualizadas pequenas porções das células foliculares (FC). No citoplasma de um dos ovócitos encontramos vários organelos como mitocôndrias (M), uma cisterna transicional de retículo endoplásmico (TER) a dar origem ao aparelho de Golgi (G) e a vesículas de densidade intermédia (V), e cisternas livres de retículo endoplásmico (ER) a formar também pequenas vesículas de densidade intermédia. Junto ao invólucro nuclear encontramos massas densas fibrilo-granulares (“nuages”-n) situadas em oposição ao nucléolo (Nc). $\times 16.000$



15



16

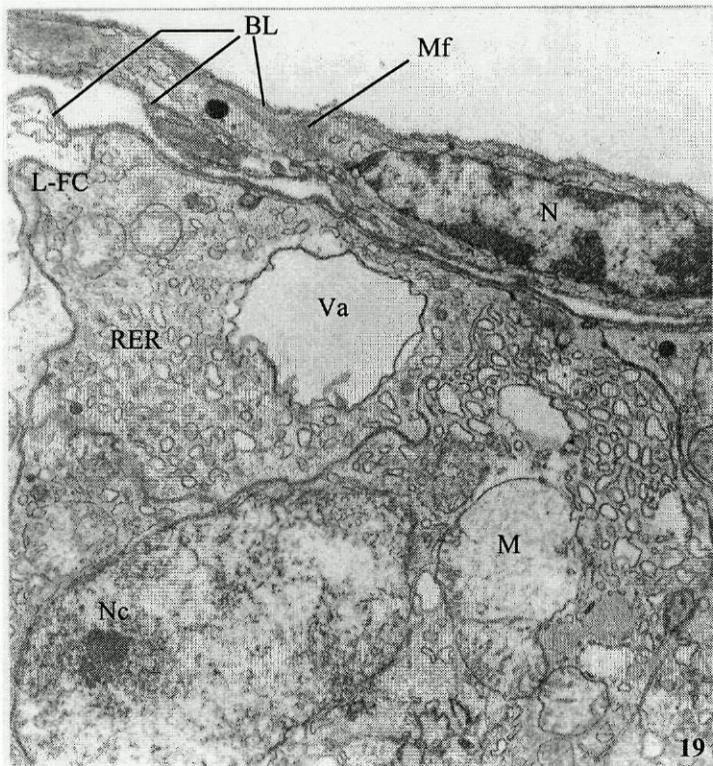
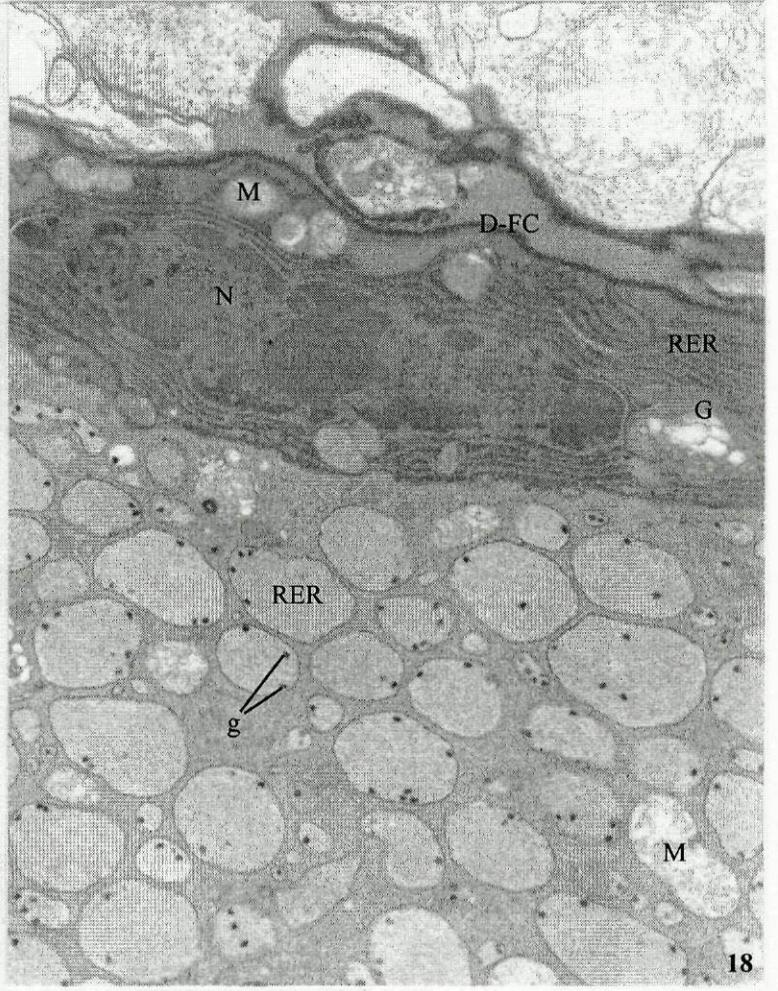
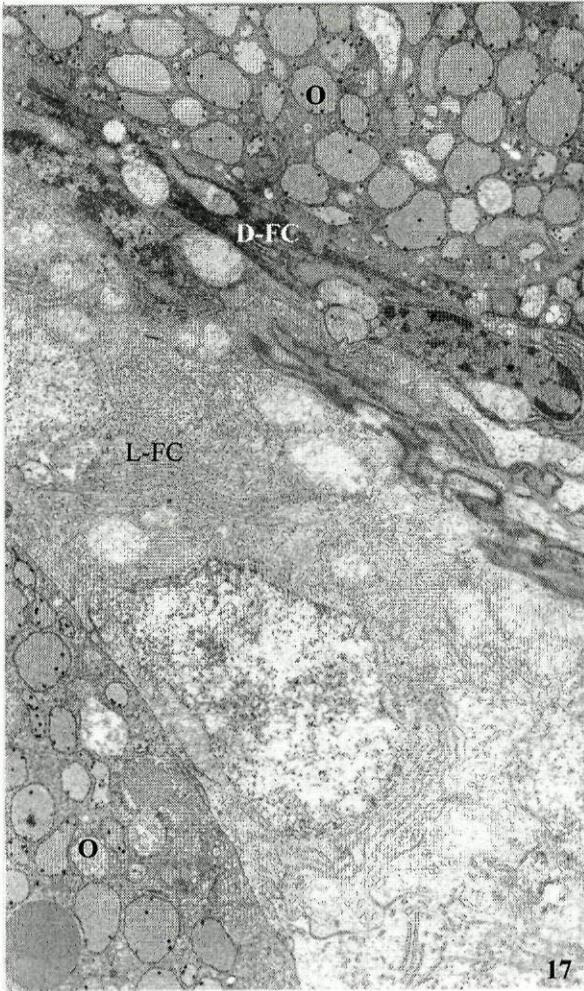
Vitelogénese Inicial

Figura 17. Entre dois ovócitos (O) adjacentes podem ser observados dois tipos de células foliculares: células foliculares densas (D-FC) e células foliculares claras (L-FC). $\times 5.600$

Figura 18. A limitar um ovócito, cujo citoplasma para além de algumas mitocôndrias (M) se encontra repleto de vesículas de retículo endoplásmico rugoso (RER) contendo inúmeros grânulos electrono-densos (g), pode ser observada uma célula folicular densa (D-FC). A célula folicular densa (D-FC), estreita, possui um núcleo (N) alongado e um citoplasma preenchido com cisternas de retículo endoplásmico rugoso (RER). No citoplasma da célula folicular densa (D-FC) podem ser ainda observadas mitocôndrias (M) e um aparelho de Golgi (G). $\times 10.600$

Figura 19. Constituindo outro tipo de célula folicular, a célula folicular clara (L-FC) é de maior dimensão. Possui um núcleo claro, um citoplasma pouco denso rico em retículo endoplásmico rugoso (RER) e mitocôndrias (M). No citoplasma pode ainda ser observado um vacúolo (Va). Por fora da célula folicular observa-se uma porção da parede do ovário separada por lâminas basais (LB) e contendo células alongadas ricas em microfilamentos (Mf). $\times 8.000$

Figura 20. Pormenor de uma célula folicular clara (L-FC), apresentando um grande núcleo (N) e um citoplasma com mitocôndrias (M), retículo endoplásmico rugoso (RER) e algumas vesículas contendo material fibrilar a ser exocitado (setas) para o espaço perivitelino, contribuindo deste modo para a formação da camada vitelina. Nesta microfotografia pode-se também observar um ovócito adjacente à célula folicular clara (L-FC). No seu citoplasma observam-se vesículas de retículo endoplásmico rugoso (RER) com grânulos electrono-densos no seu interior, gotículas lipídicas (L) e vesículas vitelinas (YV) em formação por fusão de vesículas de menor dimensão (V). $\times 20.000$



Vitelogénese Inicial

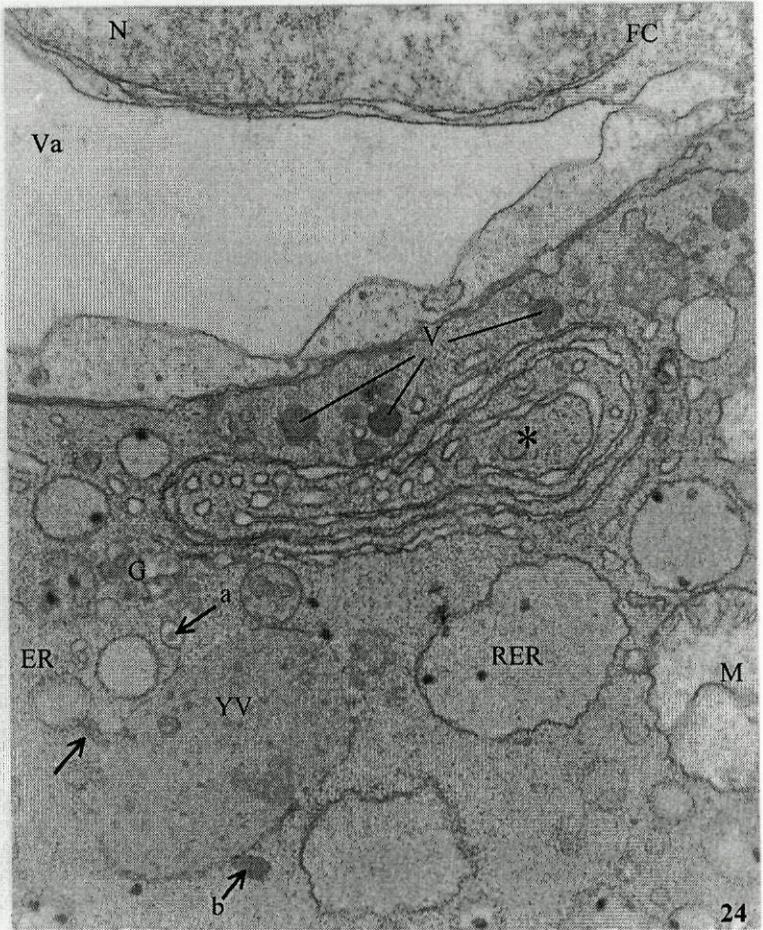
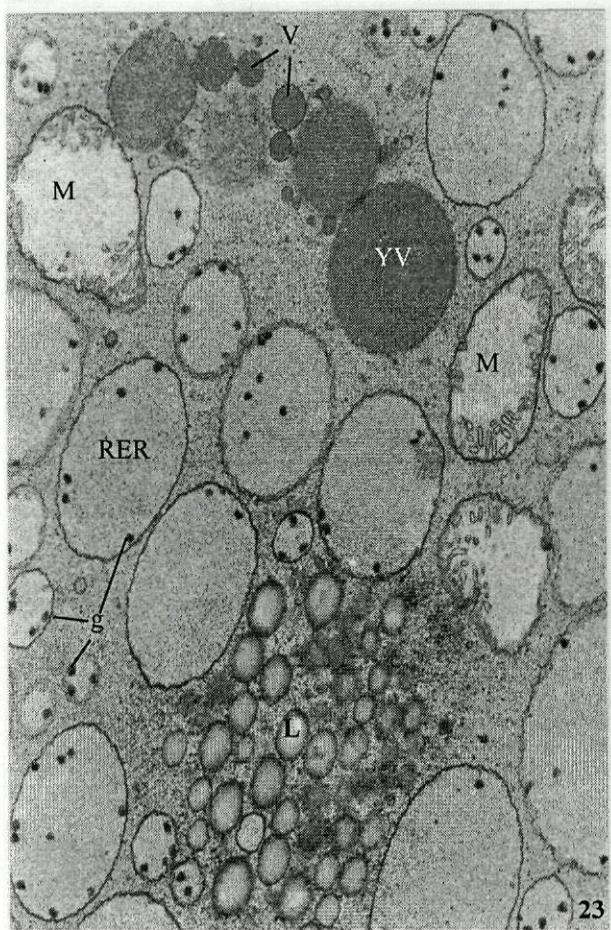
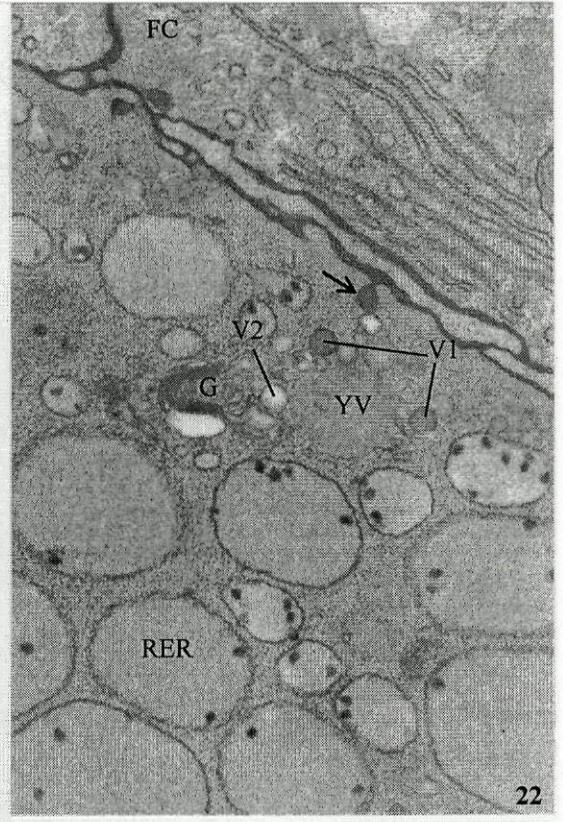
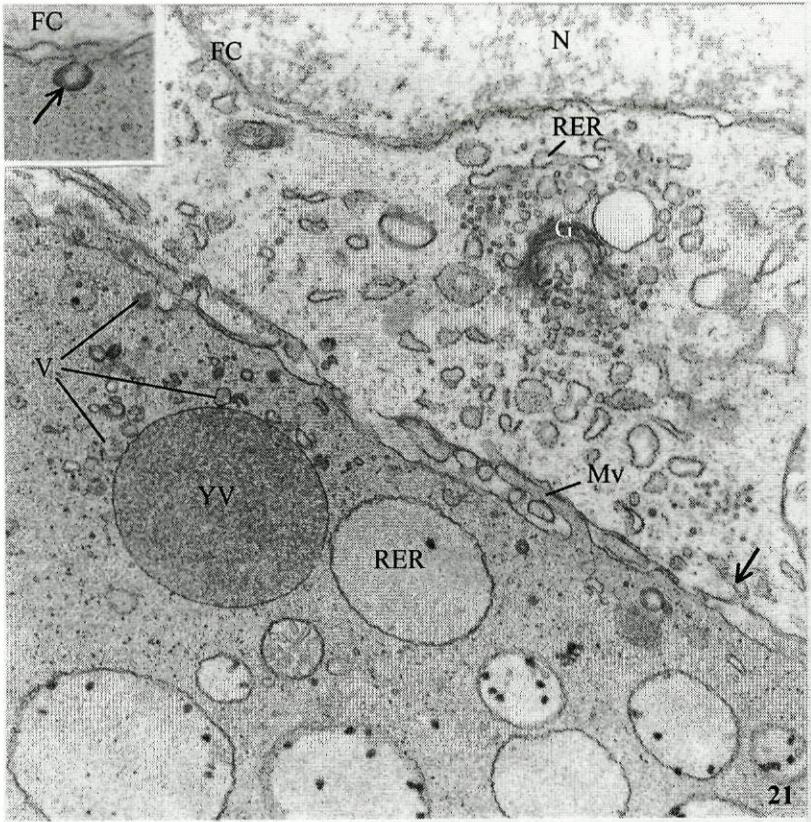
Figura 21. A vitelogénese inicial caracteriza-se pela proeminência dos fenómenos de endocitose. O citoplasma do ovócito está preenchido por grandes vesículas de retículo endoplásmico rugoso (RER) de matriz fibrilar e com pequenos grânulos densos. Na periferia do ovócito, junto à membrana citoplásmica, uma vesícula vitelina (YV) em formação funde-se com pequenas vesículas (V) revestidas resultantes de endocitose. São visíveis algumas microvilosidades (Mv) do ovócito. A célula folicular (FC), com um núcleo bem desenvolvido (N), apresenta no seu citoplasma retículo endoplásmico rugoso (RER) e um aparelho de Golgi (G). Algumas vesículas, presentes na periferia da célula folicular, parecem exocitar o seu conteúdo no espaço perivitelino, contribuindo para a formação da camada vitelina (seta). × 16.000

Figura 21 (inset). Detalhe da endocitose de material finamente granular existente no espaço perivitelino (entre o ovócito e a célula folicular - FC). Por se tratar de uma vesícula revestida (seta), o processo representa endocitose mediada por receptores. Após a endocitose, estas vesículas revestidas perdem o seu revestimento e fundem-se com as vesículas vitelinas em formação. × 26.000

Figura 22. Na periferia do citoplasma do ovócito, limitado superiormente por uma célula folicular (FC), observa-se uma vesícula vitelina (YV) em formação que se funde com vesículas (V1) provenientes de endocitose (seta) e vesículas (V2) provenientes do aparelho de Golgi (G). × 20.000

Figura 23. As vesículas vitelinas (V) originadas por endocitose e por participação golgiana dispersam-se da periferia do citoplasma para o interior da célula, acabando por se fundir entre si para originar vesículas vitelinas densas de grande dimensão (YV). Para além das vesículas de retículo endoplásmico rugoso (RER), contendo pequenos grânulos densos (g), e de mitocôndrias, o citoplasma do ovócito apresenta nesta fase agregados de gotículas lipídicas (L). × 16.000

Figura 24. Ocasionalmente observaram-se grandes vesículas de densidade intermédia (YV) oriundas de expansões (seta) do retículo endoplásmico (ER). Estas vesículas constituem um segundo tipo de vesículas vitelinas em formação e a sua membrana lábil parece receber por fusão vesículas golgianas (a) e vesículas de endocitose (b). Nesta fase, encontram-se frequentemente à superfície dos ovócitos agregados de cisternas de retículo endoplásmico rugoso dispostas circunferencialmente (*). Na célula folicular (FC) que limita o ovócito, pode ser observado o seu núcleo (N), bem como um vacúolo (Va) no seu citoplasma. × 20.000



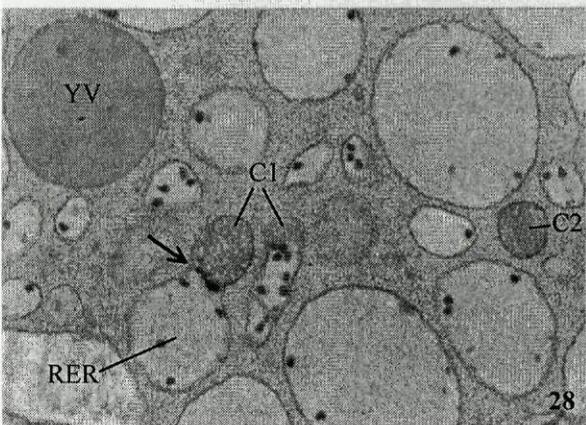
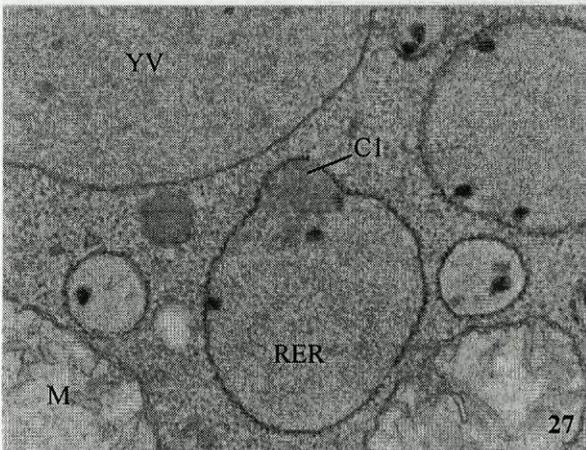
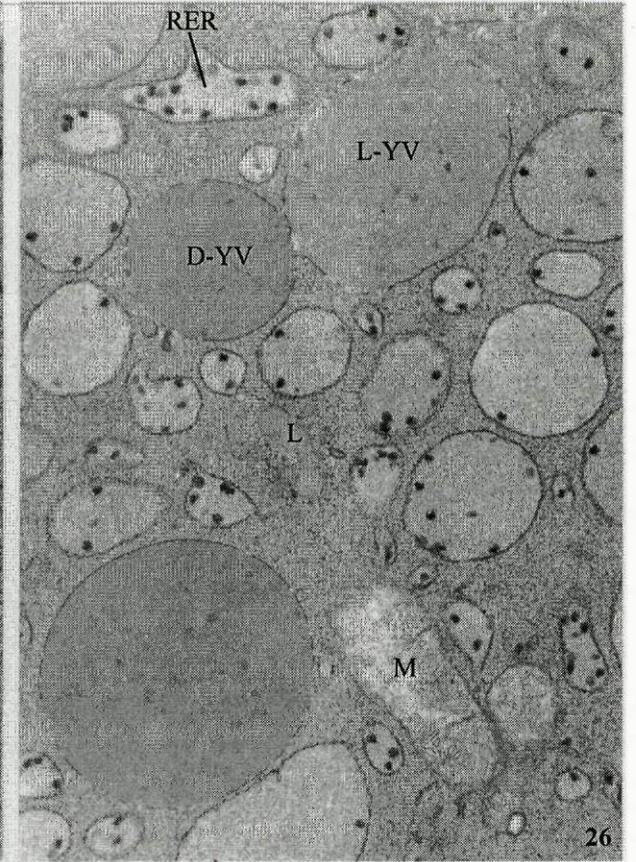
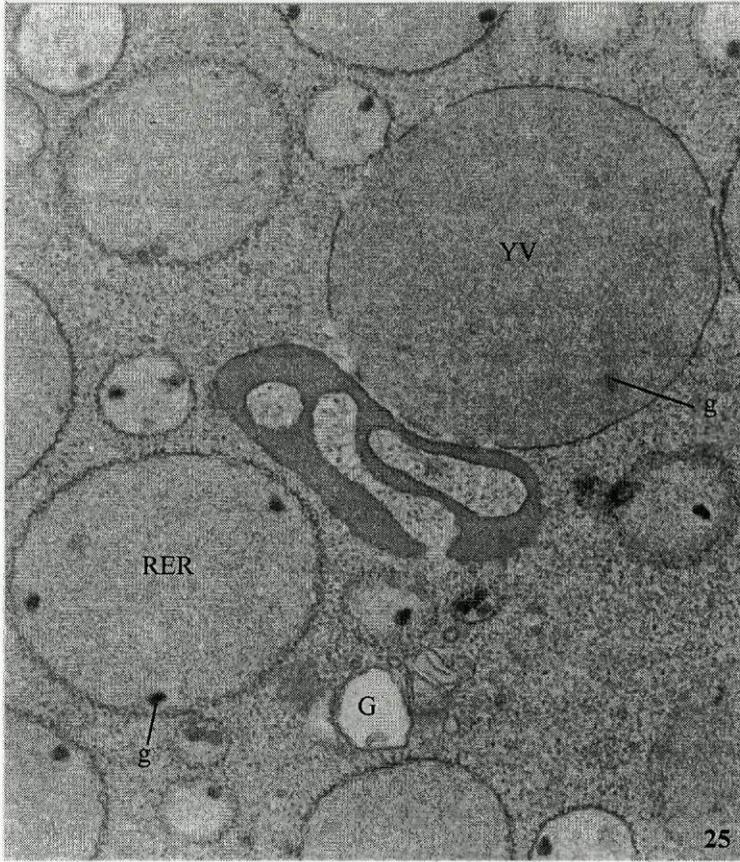
Vitelogénese Inicial

Figura 25. Pormenor de uma vesícula vitelina de densidade intermédia (YV) para evidenciar a sua relação com componentes das vesículas de retículo endoplásmico rugoso (RER). No interior da vesícula vitelina nota-se ainda a presença dos grânulos densos (g), específicos do retículo endoplásmico rugoso. × 26.000

Figura 26. Pormenor dos dois tipos de vesículas vitelinas, densas (D-YV) e de densidade intermédia (L-YV) rodeadas de vesículas de retículo endoplásmico rugoso (RER) com grânulos densos no seu interior, gotículas lipídicas (L), e mitocôndrias (M). × 16.000

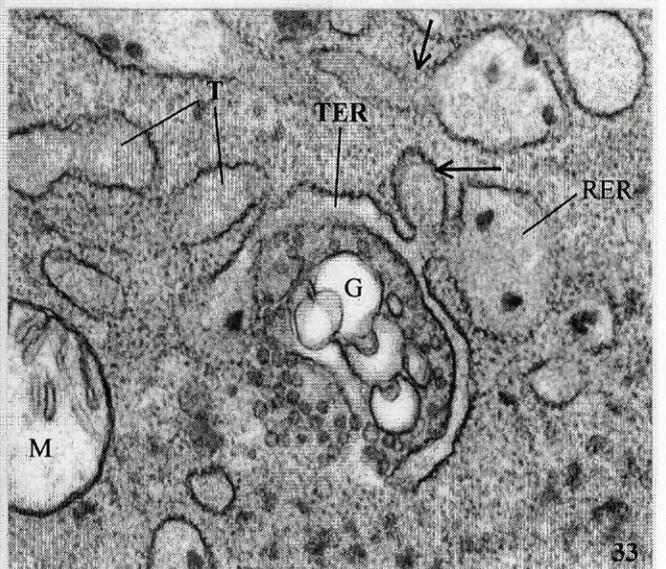
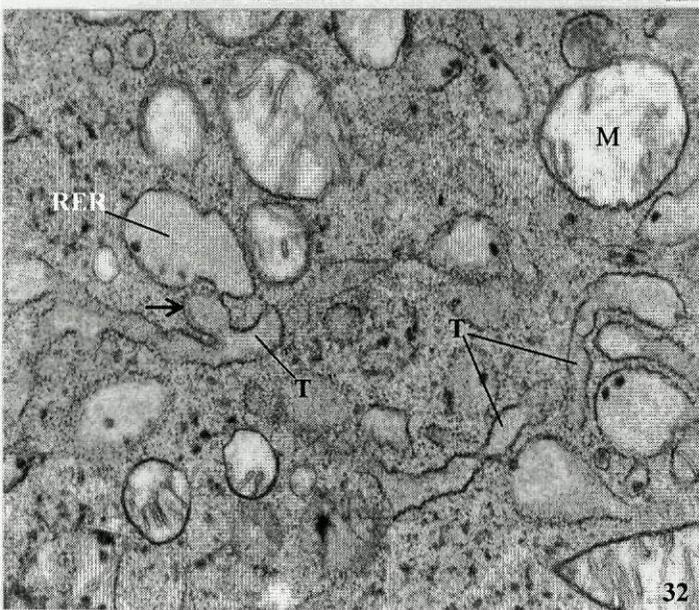
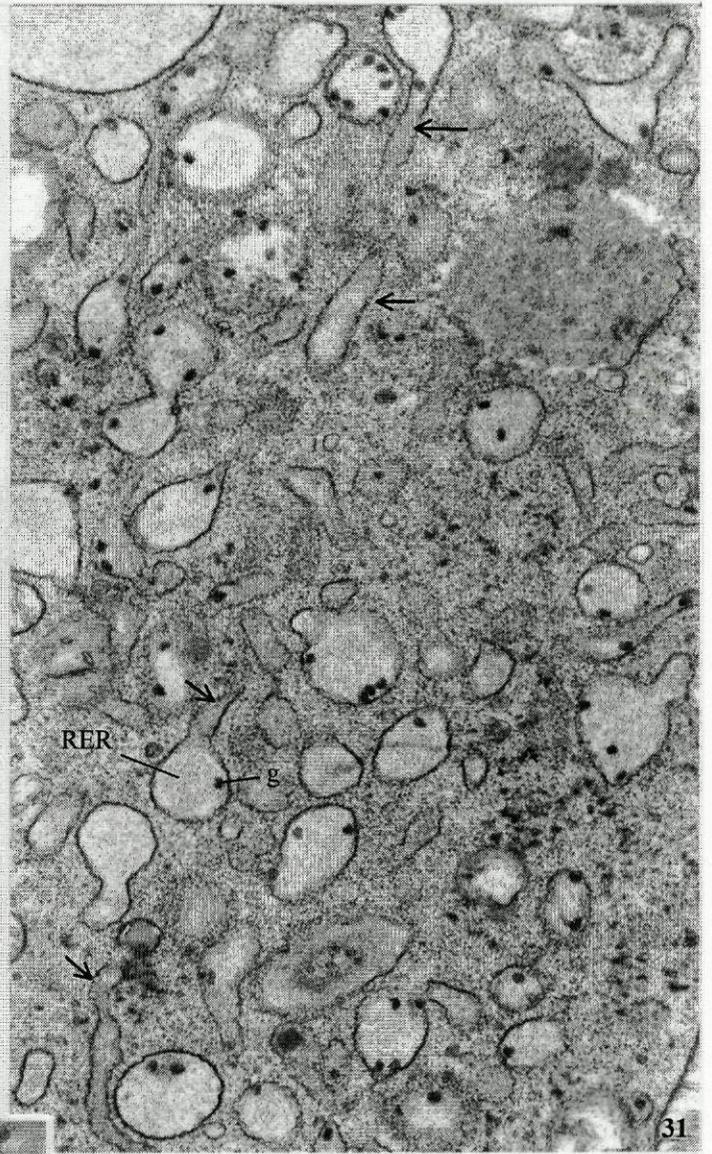
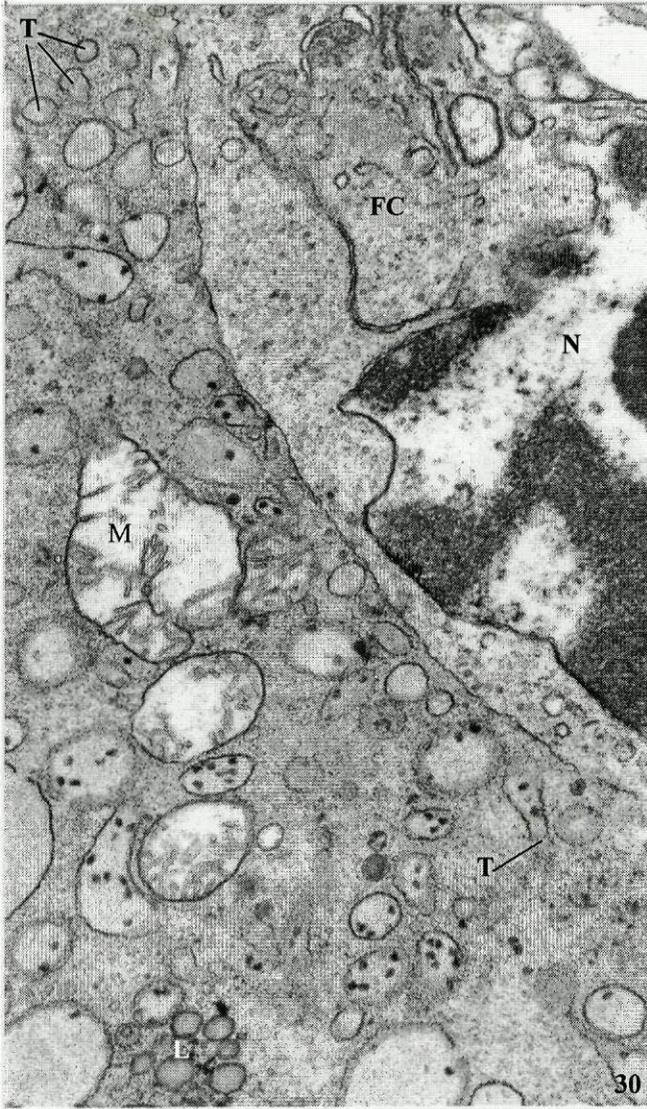
Figuras 27 e 28. Ocasionalmente, as vesículas do retículo endoplásmico rugoso (RER) formam no seu interior agregados em forma de cordão (C1) que são circundados por grânulos densos (g) e progressivamente concentrados na periferia do retículo endoplásmico rugoso (seta) até à sua completa vesiculação (C2). Fig. 27, × 26.000; Fig. 28, × 16.000

Figura 29. Nesta fase de vitelogénese inicial os ovócitos apresentam núcleos volumosos eucromáticos com nucléolos (Nc) de grande dimensão. Os nucléolos compõem-se de uma grande região central densa rodeada por uma estreita zona periférica reticulada. Excepto numa estreita faixa na periferia do núcleo, o citoplasma perinuclear apresenta-se preenchido por vesículas de retículo endoplásmico rugoso (RER), com grânulos densos no seu interior, mitocôndrias (M) e vesículas vitelinas densas (YV). × 8.000



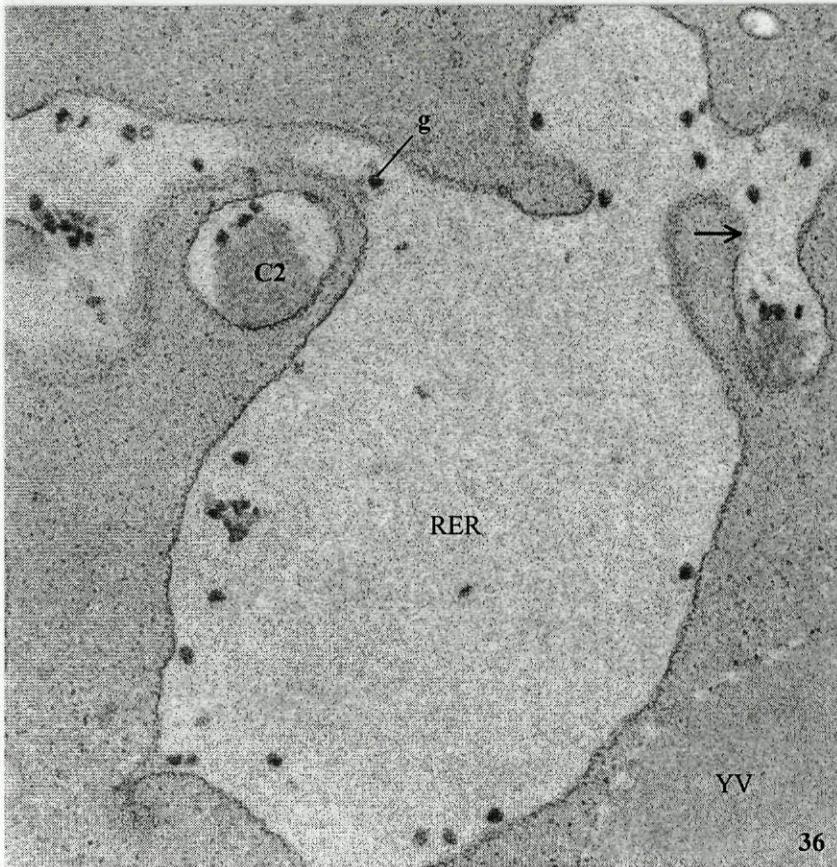
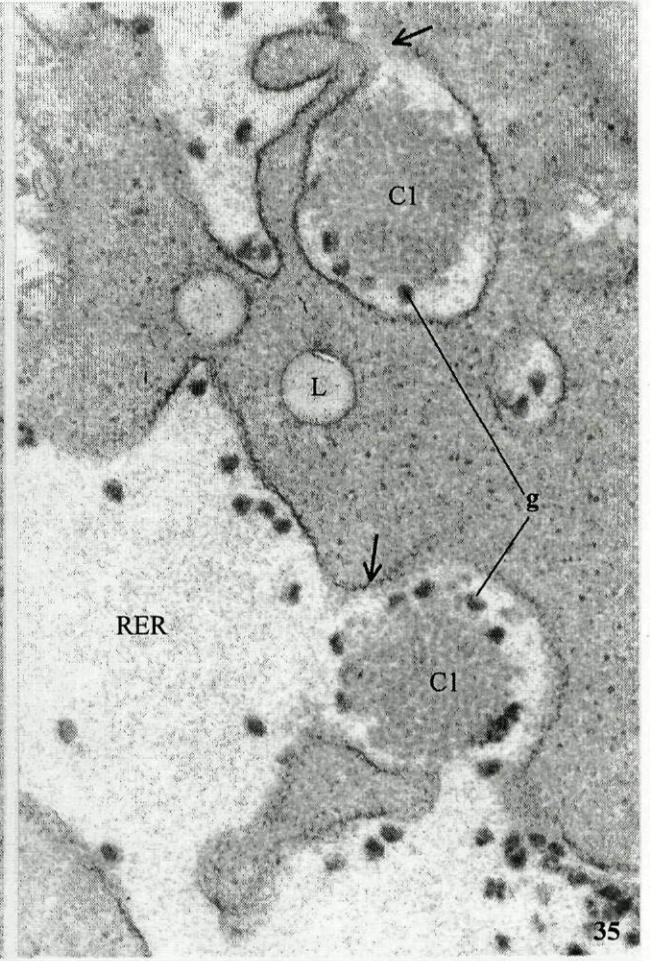
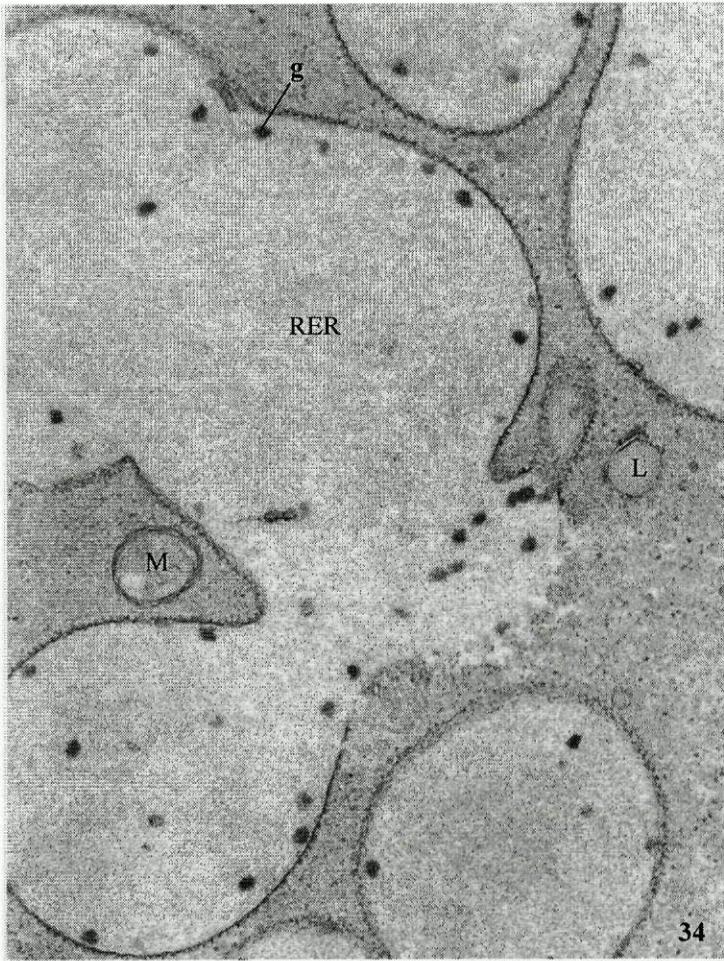
Vitelogénese intermédia. Fase inicial.

Figuras 30 - 33. Esta fase caracteriza-se pela formação extensa de retículo endoplásmico tubular (T) a partir de expansões (setas) do retículo endoplásmico rugoso (RER), expansões que não possuem grânulos densos (g) e acumulam no seu lúmen um material finamente fibrilar. Na figura 33 pode-se observar a continuidade das vesículas do retículo endoplásmico rugoso (RER), com os seus prolongamentos, nomeadamente, a origem do retículo endoplásmico tubular (seta) e a cisterna transicional do retículo endoplásmico (TER) associado ao aparelho de Golgi (G). Fig. 30, $\times 16.000$; Fig. 31, $\times 20.000$; Fig. 32, $\times 20.000$; Fig. 33, $\times 32.000$



Vitelogénese intermédia. Fase Final.

Figura 34 – 37. Esta fase caracteriza-se pela hipertrofia, dilatação e confluência anastomótica das vesículas do retículo endoplásmico rugoso (RER), com deslocação preferencial dos seus grânulos densos (g) para a sua periferia. Nesta fase ocorrem outros dois fenómenos: a) a formação de pontes entre as vesículas do retículo endoplásmico rugoso (*), pontes essas com aspecto de lamelas aneladas; e, b) a formação no interior do retículo endoplásmico rugoso de inúmeros agregados de estruturas em cordão (C1) dele delimitadas por grânulos densos (g), e que são vesiculados (setas) para formar vesículas livres com as estruturas em cordão e alguns grânulos densos (C2). Fig. 34, × 26.000; Fig. 35, × 32.000; Fig. 36 e 37, × 26.000.



Vitelogénese tardia

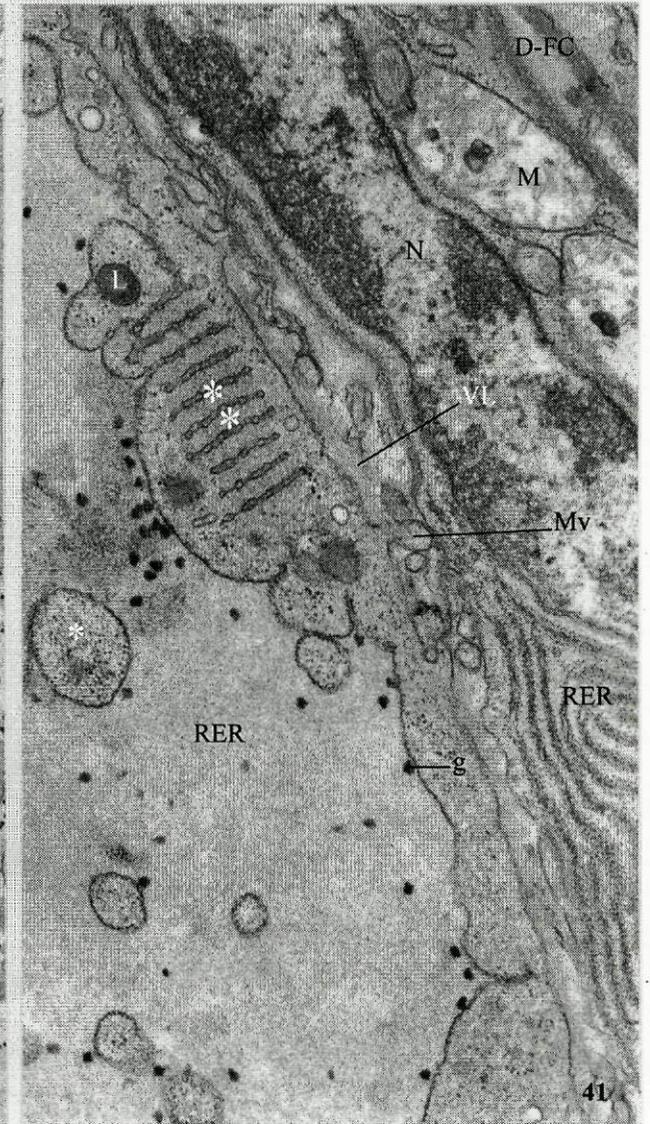
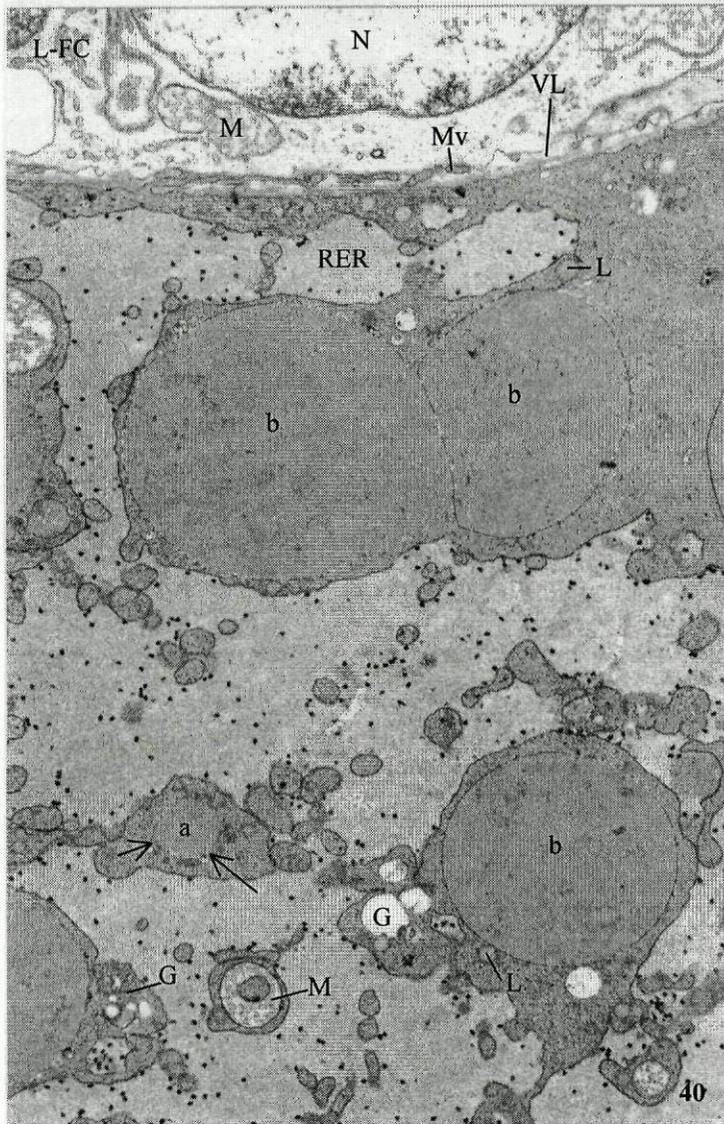
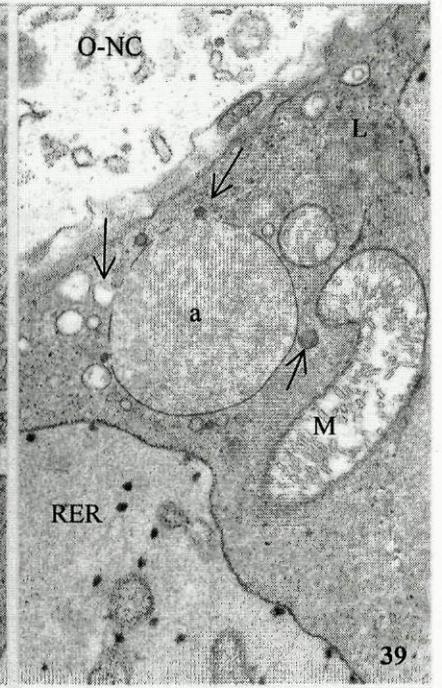
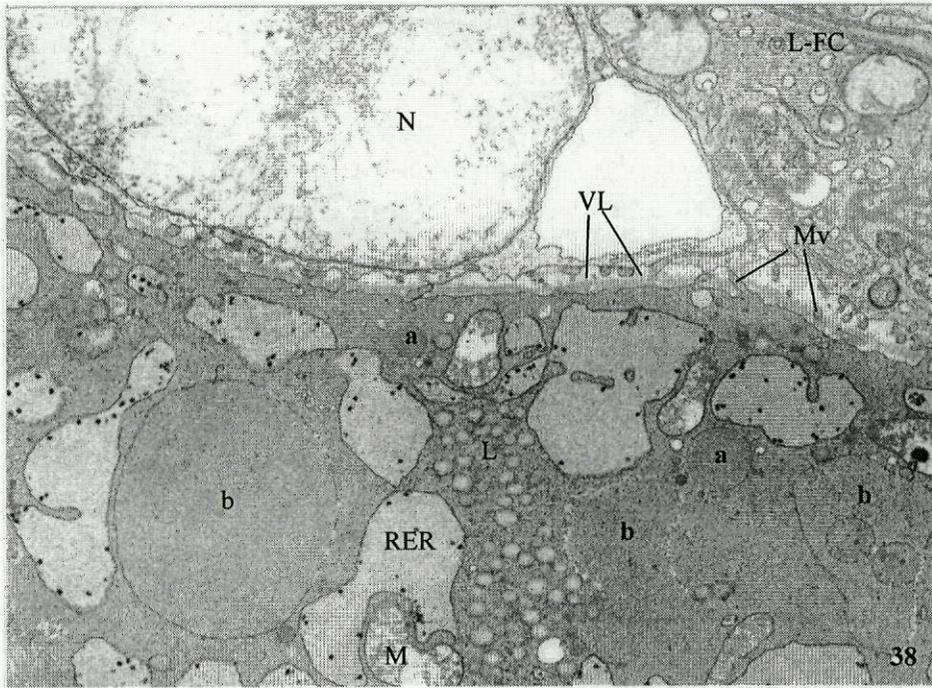
A vitelogénese tardia caracteriza-se pela presença do retículo endoplásmico rugoso (RER) anastomótico extenso e pela formação extensiva de vesículas vitelinas (YV) essencialmente a partir de materiais endógenos.

Figura 38. Uma célula folicular clara (L-FC), com um núcleo de grande dimensão, limita um ovócito em vitelogénese tardia, o qual, apresenta microvilosidades (Mv) que atravessam a camada vitelina (VL) que separa os dois tipos celulares. No citoplasma do ovócito, o retículo endoplásmico rugoso (RER) anastomótico, limita áreas de citoplasma onde se concentram gotículas lipídicas (L), mitocôndrias (M) e vesículas vitelinas em formação (a e b). As vesículas de vitelo (a), com que se fundem as vesículas de endocitose são mais escassas nesta fase. As vesículas vitelinas predominantes (b) são de muito maior dimensão e a sua origem é essencialmente endógena. $\times 8.000$

Figura 39. Pormenor de uma vesícula vitelina em formação (a) por fusão com vesículas de endocitose (setas). A limitar o ovócito, pode-se observar para além das células foliculares, ovócitos (O-NC) de forma aplanada e de desenvolvimento retardado, os quais parecem ter um papel de células nutritivas ("nurse-cells"). $\times 16.000$

Figura 40. O retículo endoplásmico rugoso (RER), altamente anastomosado nesta fase avançada da vitelogénese, limita áreas do citoplasma onde se processa o crescimento e a maturação das vesículas vitelinas. As grandes vesículas vitelinas (b) são de origem essencialmente endógena e constituem virtualmente todo o vitelo. No entanto, em menor quantidade, observam-se também vesículas vitelinas de menores dimensões (a) resultantes de uma origem associada à endocitose e que por isso se apresentam rodeadas por pequenas vesículas em fusão (setas). Nesta áreas do citoplasma encontram-se gotículas lipídicas (L), aparelho de Golgi (G) e mitocôndrias (M) anelares. $\times 8.000$

Figura 41. Uma célula folicular densa (D-FC), com um núcleo (N) alongado e um retículo endoplásmico rugoso (RER) muito desenvolvido e lamelado encontra-se adjacente a um ovócito em vitelogénese avançada. A porção de citoplasma do ovócito visível na microfotografia é quase completamente preenchida por retículo endoplásmico rugoso (RER) anastomosado contendo grânulos densos (g). Frequentemente, o retículo endoplásmico rugoso forma finas expansões do tipo lamelas aneladas (**) dirigidas para o oolema. O retículo endoplásmico rugoso anastomosado também delimita pequenas áreas cujo citoplasma adquire uma textura menos densa (*) onde parecem formar-se pequenas partículas densas de glicogénio. Entre o ovócito e a célula folicular densa (D-FC) pode ser observada a camada vitelina (VL) interrompida apenas por algumas microvilosidades (Mv) do ovócito. $\times 20.000$



Vitelogénese tardia

Figura 42. Os vários nucléolos (Nc) presentes no núcleo, de grandes dimensões, do ovócito em vitelogénese tardia, são compostos de grandes massas densas e irregulares, interligadas por um amplo retículo de finos cordões. O invólucro nuclear é perfurado de inúmeros poros nucleares (np). No citoplasma perinuclear observam-se, no espaço deixado livre pelo retículo endoplásmico rugoso (RER) altamente anastomosado, mitocôndrias (M), gotículas lipídicas (L) e vesículas vitelinas (YV). $\times 10.600$

Formação e maturação do vitelo

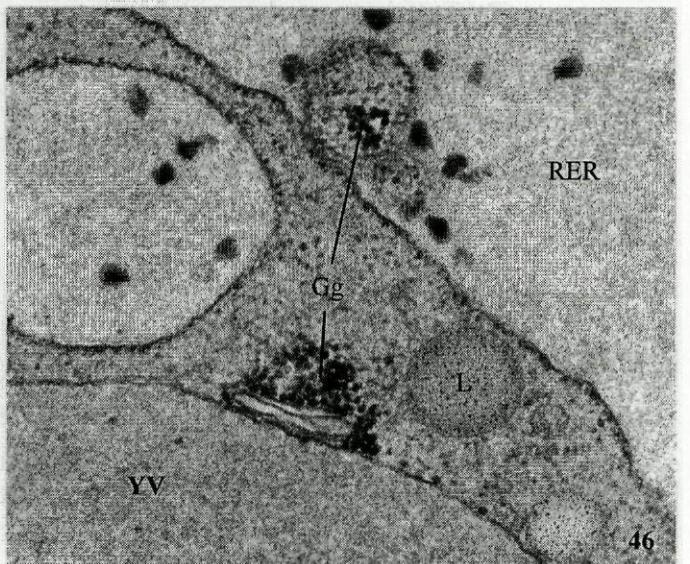
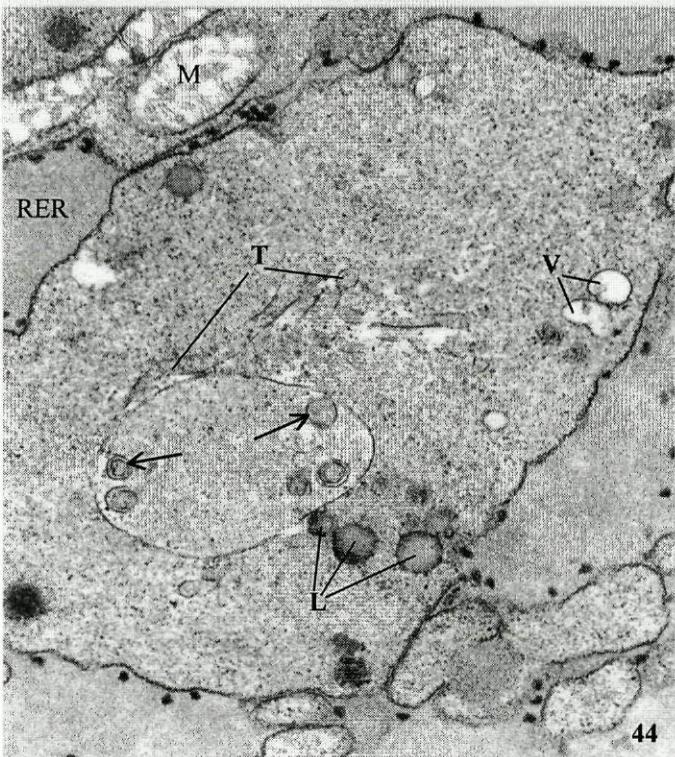
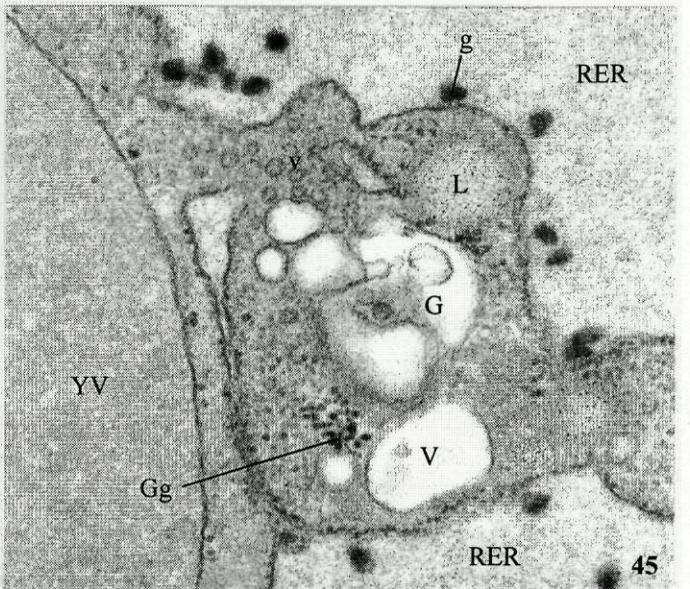
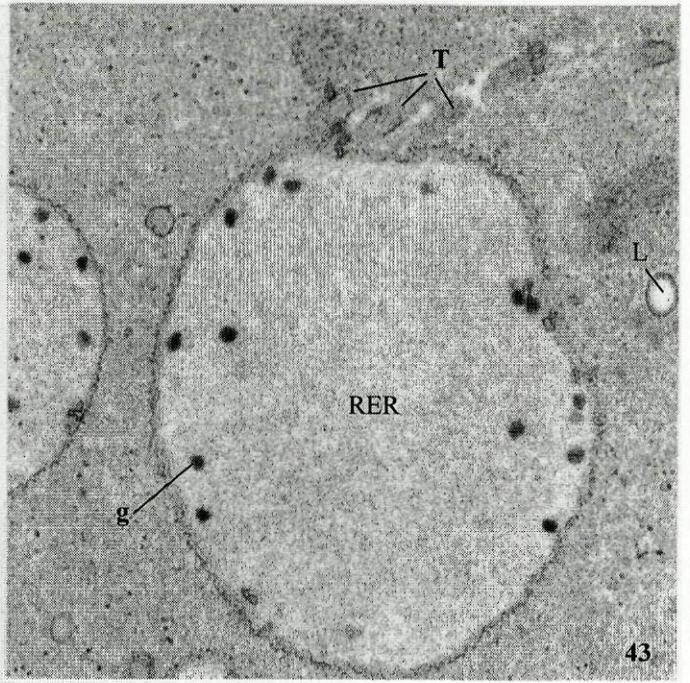
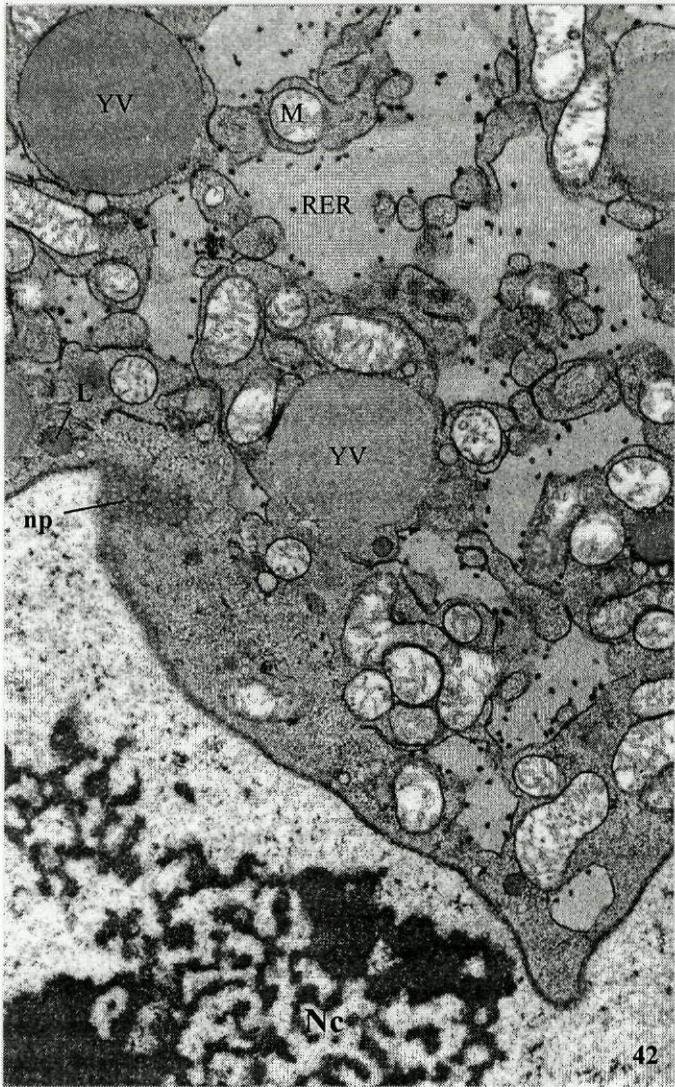
As vesículas vitelinas que ocuparão o citoplasma do ovócito maduro correspondem às grandes vesículas vitelinas que se formam na fase de vitelogénese tardia. Este vitelo deriva, em primeira instância, de expansões do retículo endoplásmico rugoso (Fig. 24) e da incorporação (Fig. 44) do retículo endoplásmico tubular (T) formado na fase de vitelogénese intermédia (Figs. 30 a 33). Na formação do vitelo intervêm ainda o glicogénio (Figs. 46 e 47), vesículas golgianas (Fig. 48), vesículas vitelinas densas (Fig. 49), corpos lamelares originados do sistema tubular do retículo endoplásmico (Figs. 50 e 51) e vesículas do retículo endoplásmico com estruturas em cordão (Fig. 52).

Figura 43. Vesícula de retículo endoplásmico rugoso (RER), contendo grânulos densos (g), ainda apresentando conexões evidentes ao retículo endoplásmico tubular (T). $\times 26.000$

Figura 44. Completamente rodeada de retículo endoplásmico rugoso (RER) anastomótico observa-se a formação de uma vesícula vitelina em processo de fusão com o sistema tubular do retículo endoplásmico (T) e sua posterior absorção (setas). Em contacto íntimo com a vesícula vitelina em formação são observadas gotículas lipídicas (L) e pequenas vesículas claras (V) provenientes do aparelho de Golgi. $\times 20.000$

Figura 45. O aparelho de Golgi (G), continua a receber pequenas vesículas (v) do retículo endoplásmico rugoso (RER) e produz vesículas (V). Nestas áreas observa-se a formação de partículas β de glicogénio (Gg). $\times 40.000$

Figura 46. Os grânulos de glicogénio (Gg) formados em pequenas áreas de citoplasma delimitadas por ramificações do retículo endoplásmico rugoso (RER) anastomótico, migram para a periferia das vesículas vitelinas (YV). $\times 40.000$



Vitelogénese tardia.

Formação e maturação do vitelo.

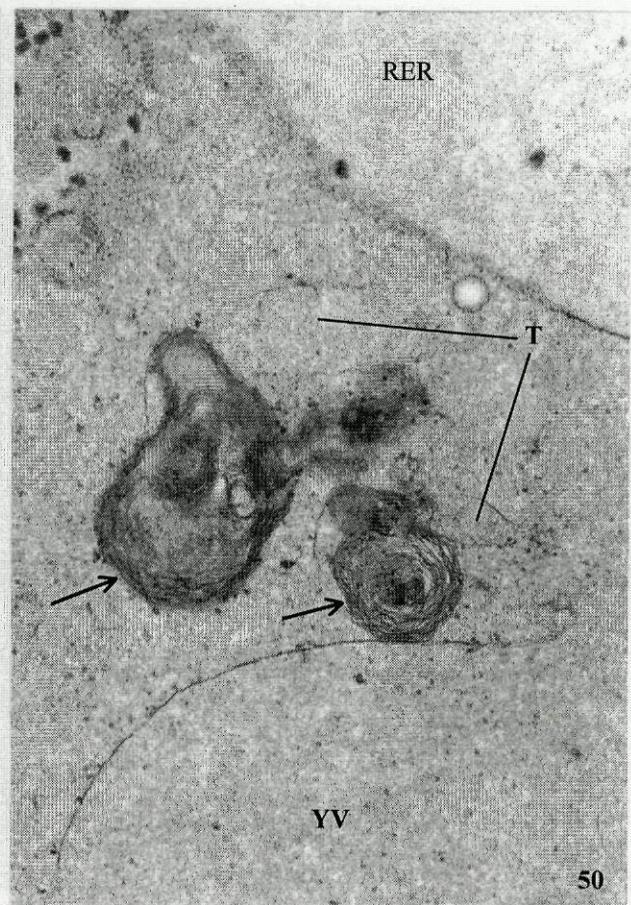
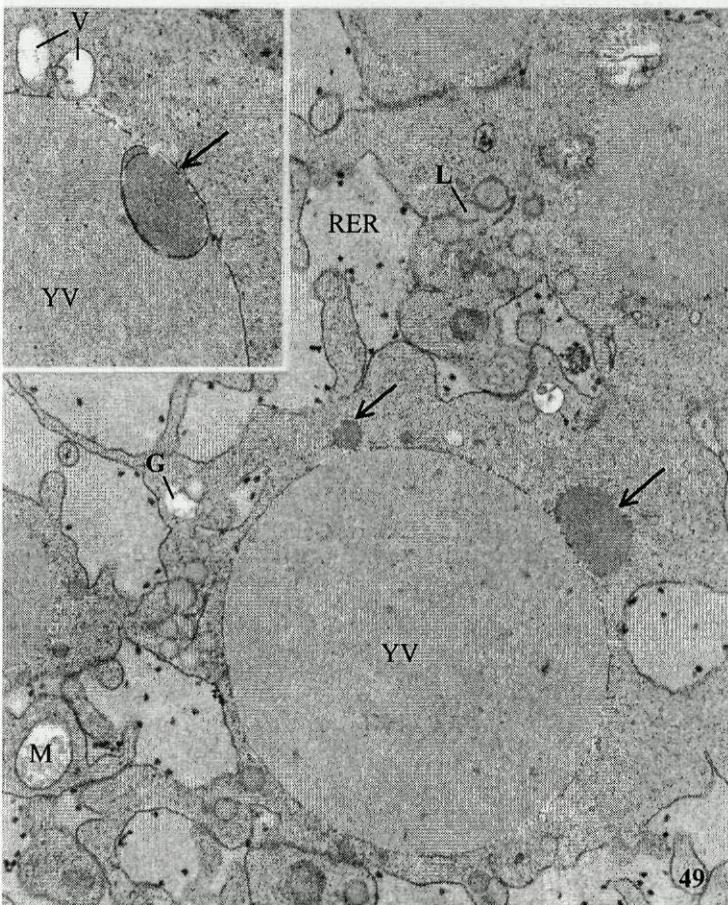
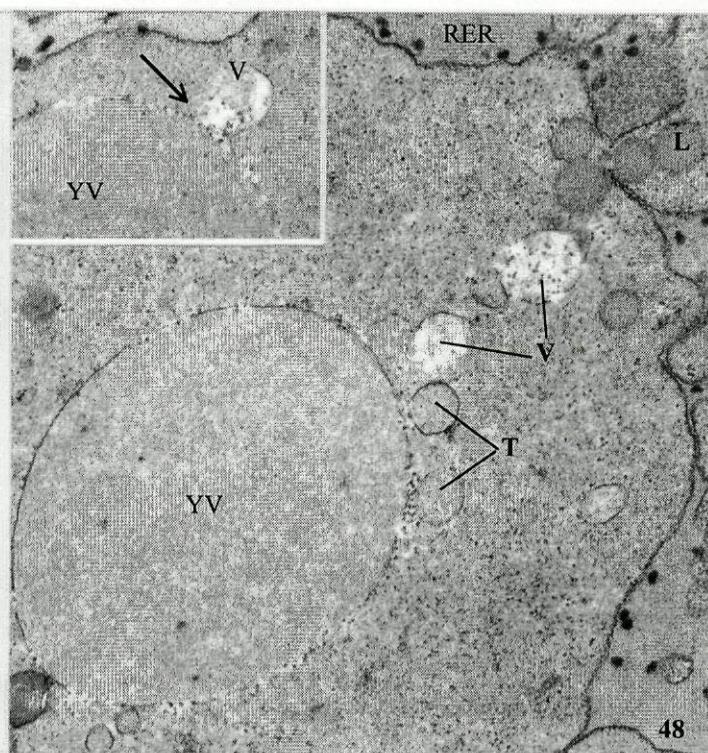
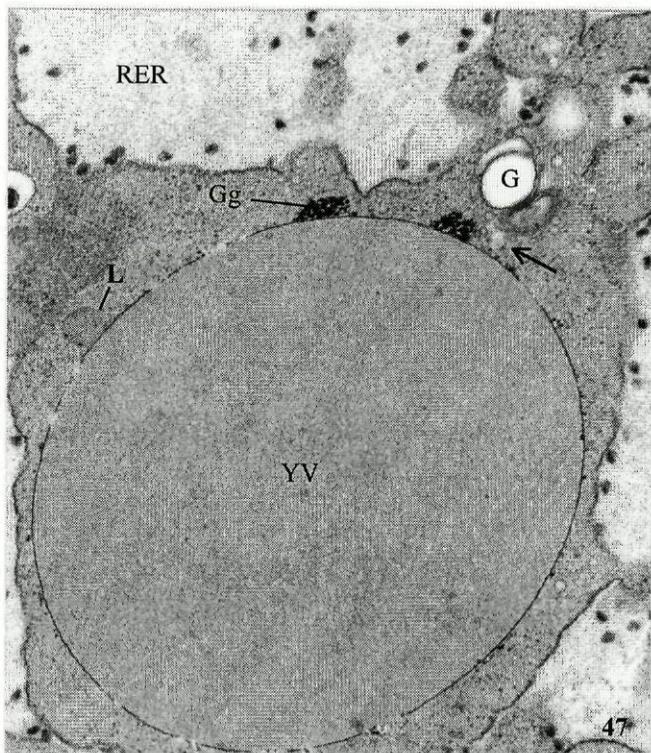
Figura 47. Detalhe de uma vesícula vitelina (YV) rodeada completamente pelo retículo endoplásmico rugoso (RER) anastomosado, mostrando a sua associação com gotículas lipídicas (L) e grânulos de glicogénio (Gg) bem como a fusão com pequenas vesículas (seta) provenientes do aparelho de Golgi (G). × 20.000

Figura 48. Na área do citoplasma do ovócito limitada pelo retículo endoplásmico rugoso (RER) anastomosado, e onde se encontra uma vesícula vitelina em processo de maturação, podem ser observados vários elementos que nesta fase se fundem com a vesícula vitelina (YV): vesículas grandes provenientes do Golgi (V) e elementos tubulares (T) do retículo endoplásmico tubular. As vesículas grandes do Golgi contêm um material grânulo-fibrilar. × 20.000

Figura 48 (inset). Detalhe da fusão (seta) de uma grande vesícula de origem golgiana (V), contendo um fino material grânulo-fibrilar, com uma vesícula vitelina (YV) em processo de maturação. × 20.000

Figura 49. No elaborado processo de maturação das vesículas vitelinas (YV), estas também se fundem com as vesículas vitelinas densas (setas) incorporando-as no seu interior (inset). No inset é ainda evidente a fusão das vesículas vitelinas com vesículas (V) claras provenientes do aparelho de Golgi. Fig.49, × 10.600; inset, × 20.000

Figura 50. O retículo endoplásmico tubular (T), elaborado a partir do retículo endoplásmico rugoso (RER), dá também origem a figuras mielínicas (setas) que se fundem com a vesícula vitelina (YV) em processo de maturação. × 26.000



Vitelogénese tardia.

Formação e maturação do vitelo.

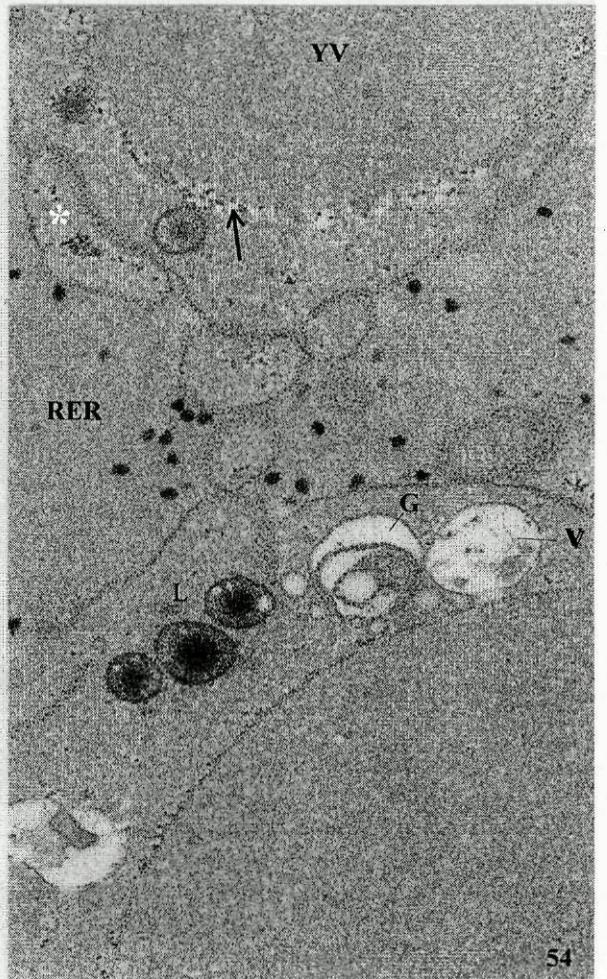
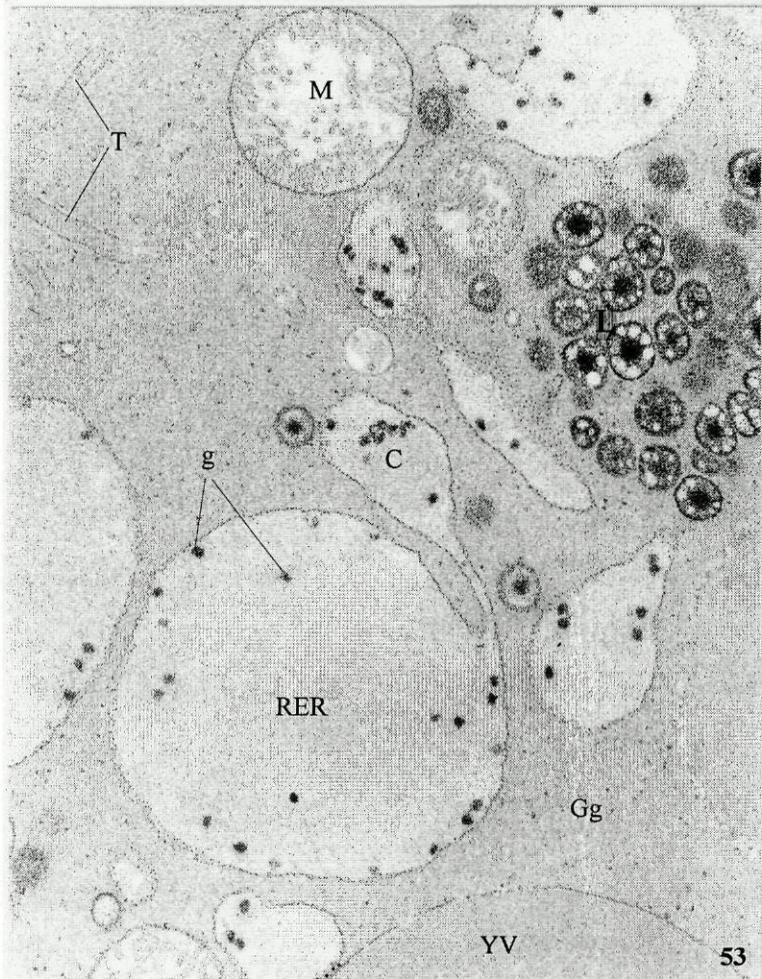
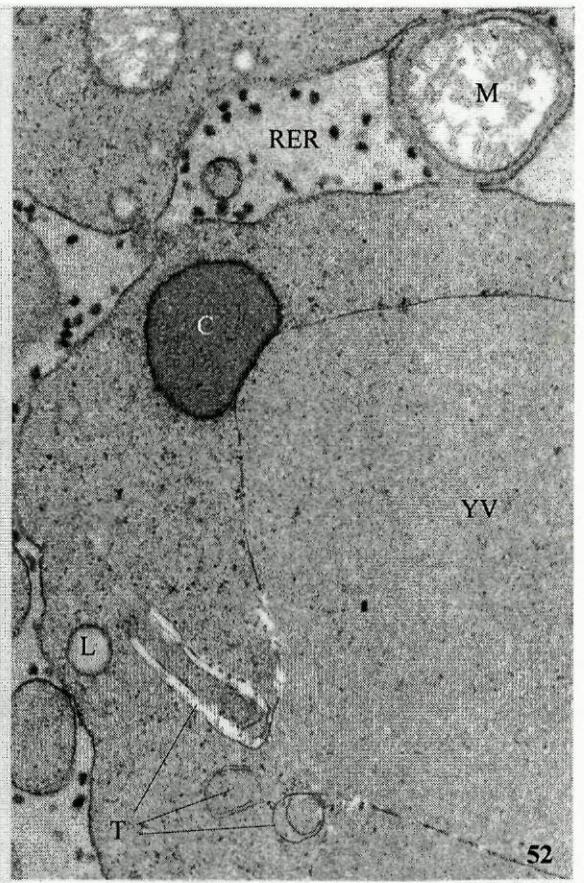
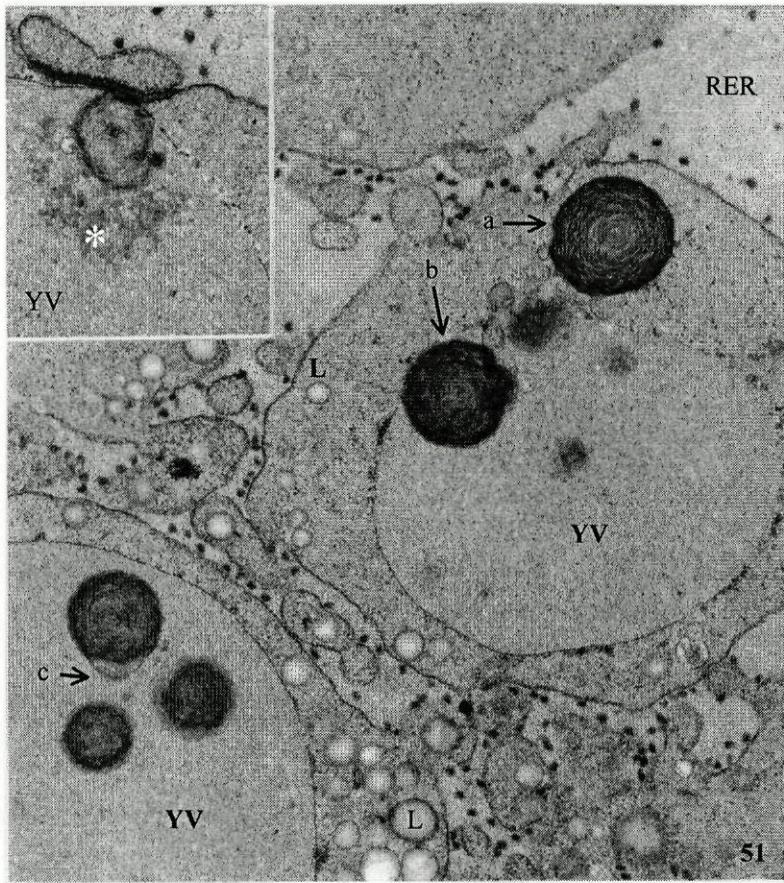
Figura 51. Fusão e incorporação dos corpos mielínicos (a, b, c) nas vesículas vitelinas (YV). Podem também ser observadas inúmeras gotículas lipídicas (L) dispersas na pequena área do citoplasma entre o retículo endoplásmico rugoso (RER) e as vesículas vitelinas (YV). × 16.000

Figura 51 (inset). Uma vez incorporadas na vesícula vitelina (YV) o conteúdo dos corpos mielínicos parece dispersar-se (*). × 20.000

Figura 52. As vesículas derivadas do retículo endoplásmico rugoso (RER) contendo estruturas em cordão (C) associam-se intimamente com as vesículas vitelinas (YV). Apesar de não terem sido observados fenómenos de incorporação, o número de vesículas com estruturas em cordão decresce significativamente após esta fase de interacção com as vesículas vitelinas. Na imagem pode também observar-se a fusão continuada do retículo endoplásmico tubular (T) com as vesículas vitelinas. × 20.000

Figura 53. Técnica citoquímica de Thiéry para detecção de polisacáridos e glicoproteínas. Note-se a marcação intensa dos grânulos densos (g) do retículo endoplásmico rugoso (RER)-glicoproteínas – e a presença de inúmeros grânulos de glicogénio (Gg) dispersos no citoplasma. As membranas dos organelos ricos em glicoproteínas também estão evidenciadas. A marcação das gotículas lipídicas (L) é um efeito secundário da técnica. Note-se que o retículo endoplásmico tubular (T) e as estruturas em cordão (C) do retículo endoplásmico rugoso não marcam para as glicoproteínas. × 20.000

Figura 54. Nas grandes vesículas (V) originadas no aparelho de Golgi (G), as fibrilas não reagem à coloração citoquímica de Thiéry para o glicogénio, mas os grânulos contidos nas pequenas vesículas, que têm a mesma origem (*), coram positivamente e parecem largar o seu conteúdo na superfície (seta) da vesícula vitelina. × 26.000



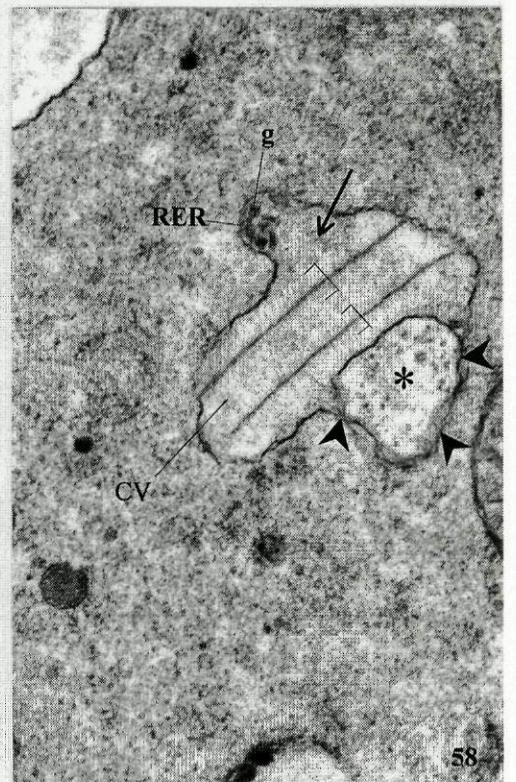
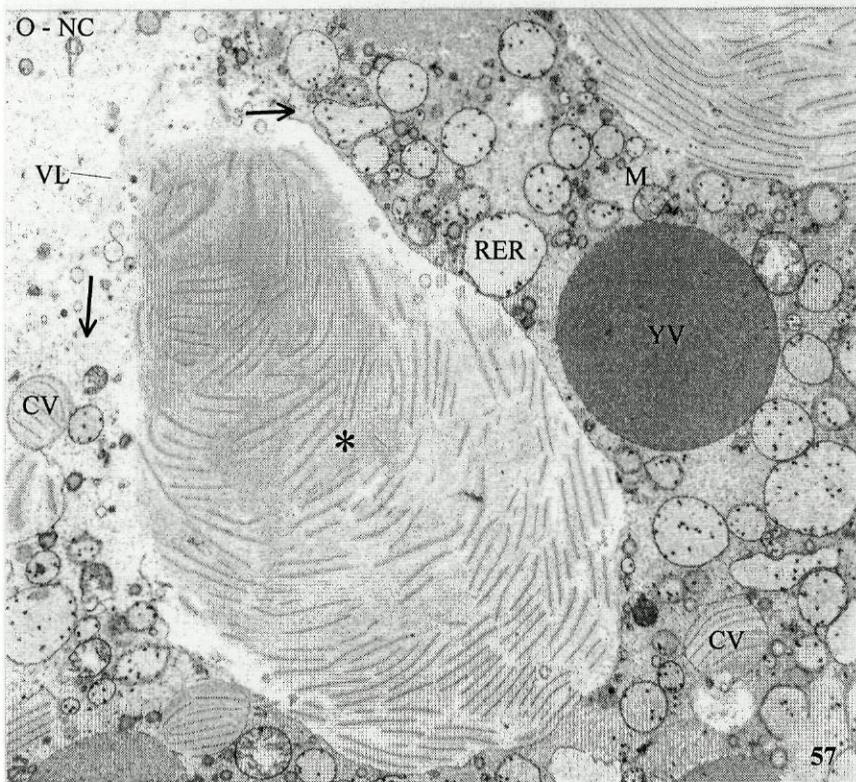
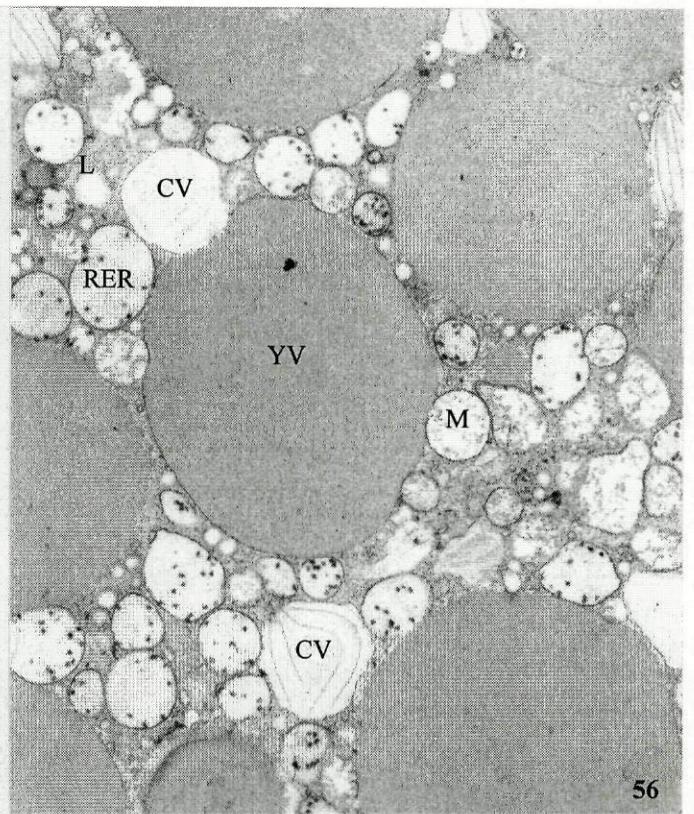
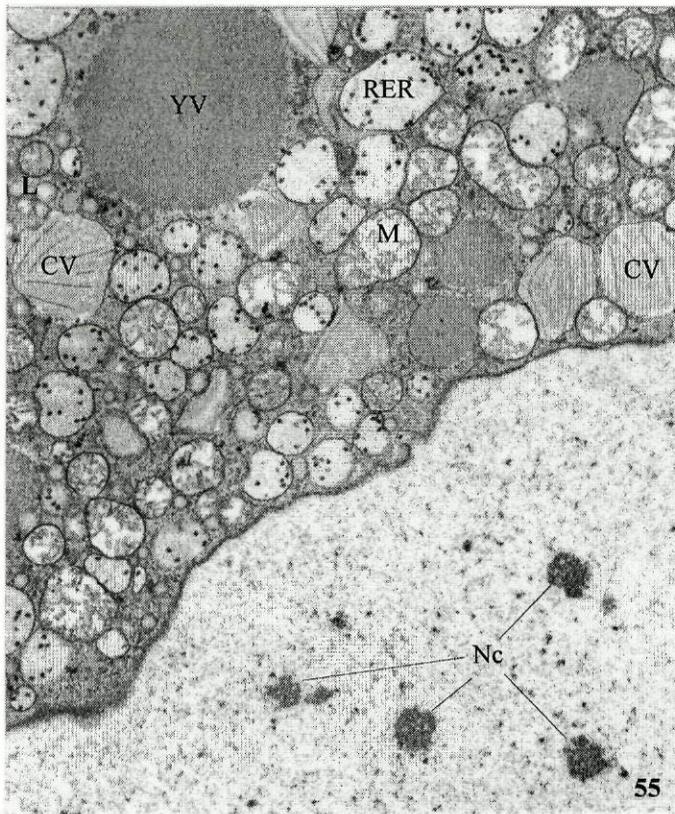
Formação das vesículas corticais

Figura 55. Região perinuclear. Nesta fase da ovogénese o retículo endoplásmico rugoso (RER) anastomosado cinde-se em inúmeras vesículas, contendo ainda grânulos densos, que juntamente com as vesículas vitelinas (YV), mitocôndrias (M) e gotículas lipídicas (L) preenchem todo o citoplasma. Entre este conjunto de organelos citoplasmáticos aparecem agora inúmeras pequenas vesículas corticais (CV), de superfície irregular, compostas por estruturas cujo aspecto morfológico é semelhante ao dos proteoglicanos. Nesta fase, o núcleo apresenta vários nucléolos (Nc), pequenos e reticulados. × 8.000

Figura 56. Região interna do citoplasma. O citoplasma está repleto de vesículas vitelinas (YV), entre as quais se observam mitocôndrias (M), gotículas lipídicas (L), vesículas de retículo endoplásmico rugoso (RER) e pequenas vesículas corticais (CV). × 8.000

Figura 57. Na periferia do ovócito, limitado neste caso por uma célula nutritiva (O-NC) e dela separada pela camada vitelina (VL), observa-se uma vesícula cortical (*) de maior dimensão, fundida ao oolema pela sua zona apical (setas). Este fenómeno, nesta fase, é, porém, ocasional. Nesta zona periférica do ovócito estão também presentes pequenas vesículas corticais (CV), vesículas vitelinas (YV), mitocôndrias (M), vesículas de retículo endoplásmico rugoso (RER) e gotículas lipídicas (L). × 5.600

Figura 58. Origem das vesículas corticais. As vesículas corticais (CV) formam-se a partir de expansões terminais do retículo endoplásmico rugoso (RER), cujo conteúdo em grânulos densos (g) se parece diferenciar (seta) em estruturas do tipo proteoglicano ([]). Nesta fase, as vesículas corticais (CV) também exibem finas expansões (pontas de seta) que limitam áreas do citoplasma com matriz menos densa (*). × 32.000

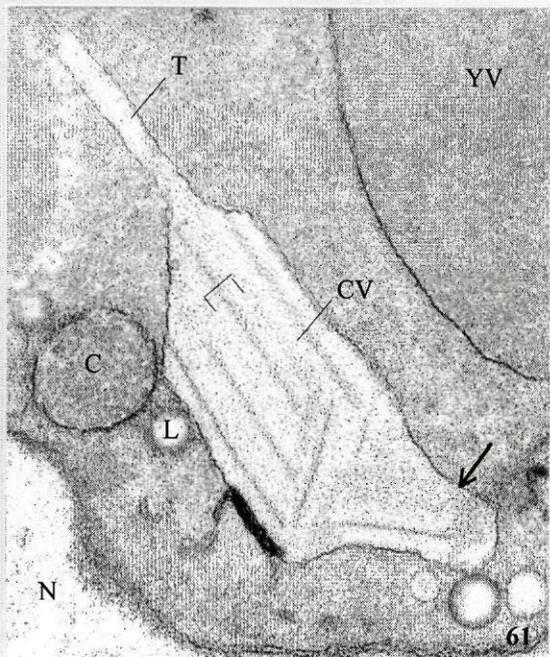
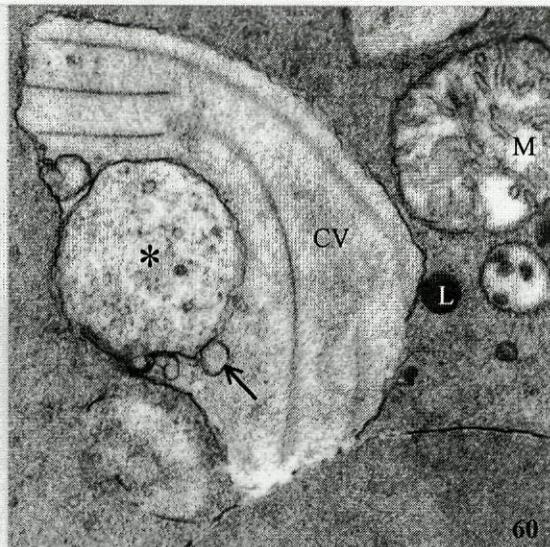
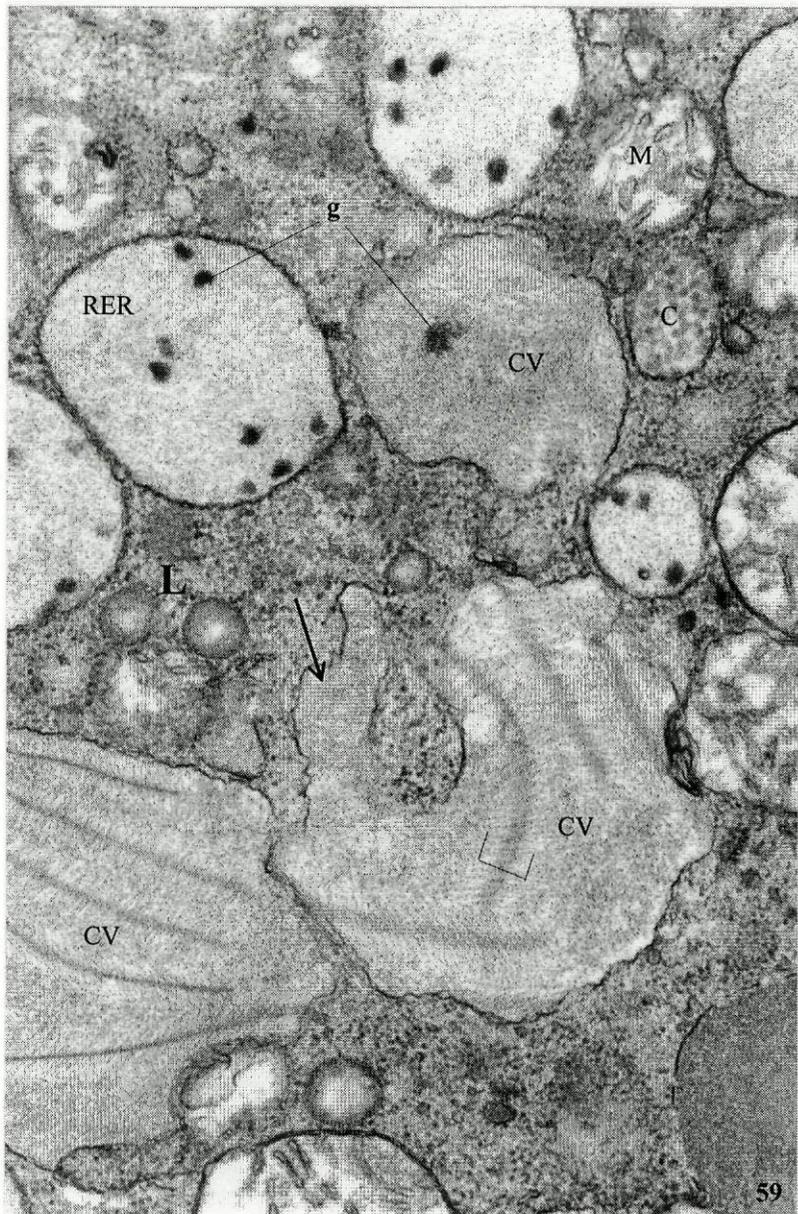


Formação das vesículas corticais

Figura 59. Expansões (seta) do retículo endoplasmático rugoso (RER) originam as vesículas corticais (CV). No interior e periferia das vesículas corticais, os grânulos densos do retículo endoplasmático rugoso (g) desagregam-se para formar as estruturas de tipo proteoglicano ([]). As gotículas lipídicas (L), agora em menor número, continuam individualizadas. Junto de uma mitocôndria (M), pode observar-se uma vesícula com estruturas em cordão (C). × 32.000

Figura 60. As vesículas corticais (CV) apresentam num dos polos umas finas expansões (pontas de seta) que delimitam pequenas áreas de citoplasma (*) com matriz mais clara. Esta área do citoplasma é depois incorporada na vesícula cortical (seta). × 26.000

Figura 61. Entre o núcleo (N) e uma vesícula vitelina (YV) encontra-se uma vesícula cortical (CV) em formação. É ainda nítida a ligação tubular (T) ao retículo endoplasmático, bem como a diferenciação do conteúdo do retículo endoplasmático (seta) nos elementos tipo proteoglicano ([]). Junto à vesícula cortical podem ainda observar-se uma vesícula com estruturas em cordão (C) e gotículas lipídicas (L). × 26.000



Ovócitos maduros

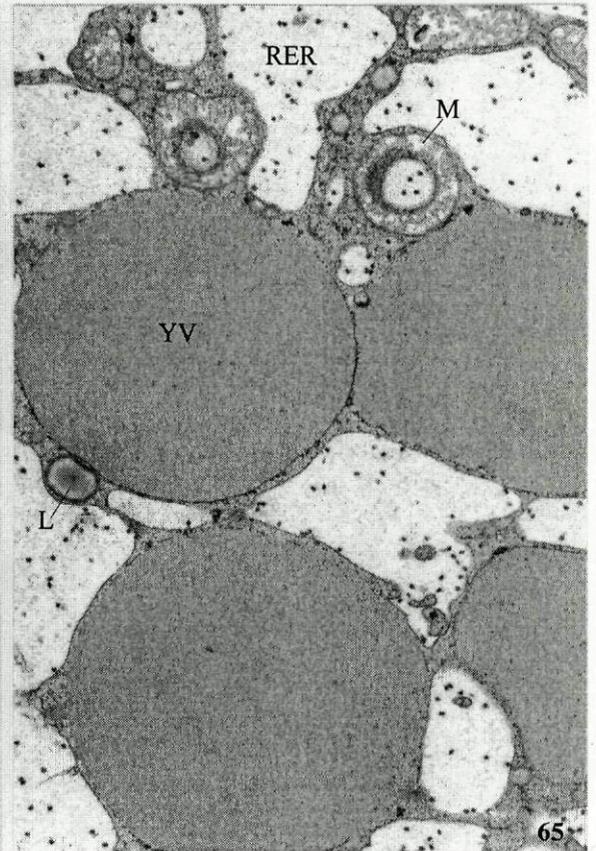
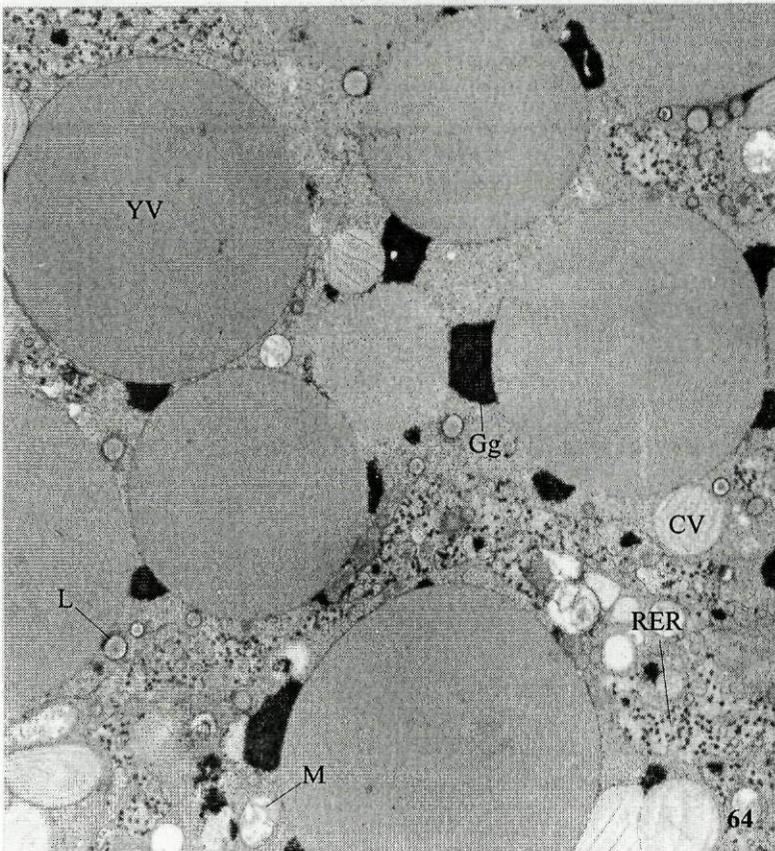
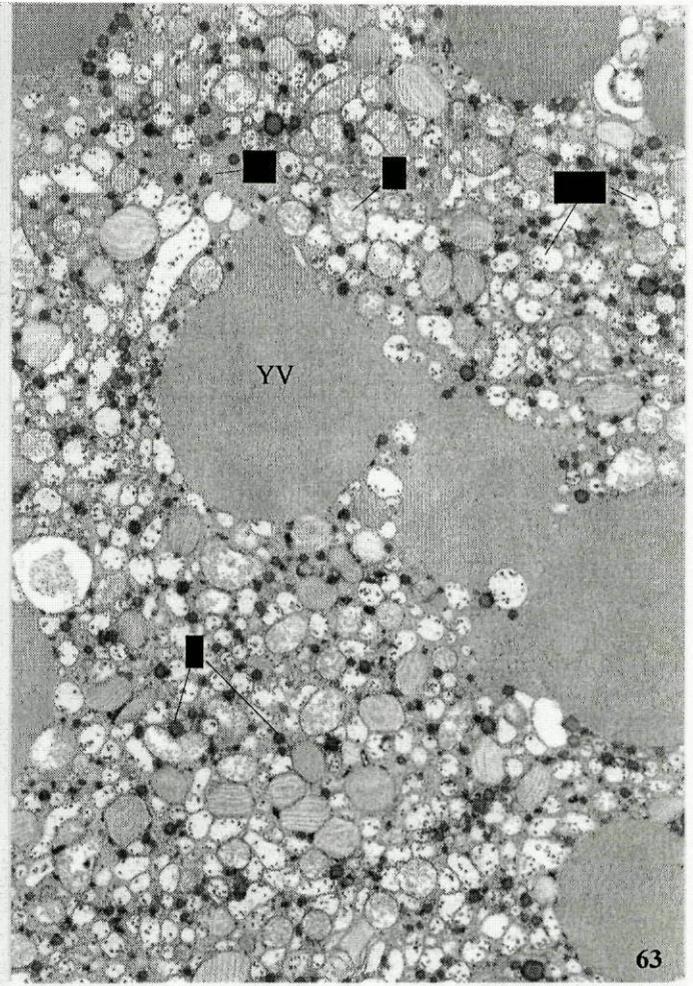
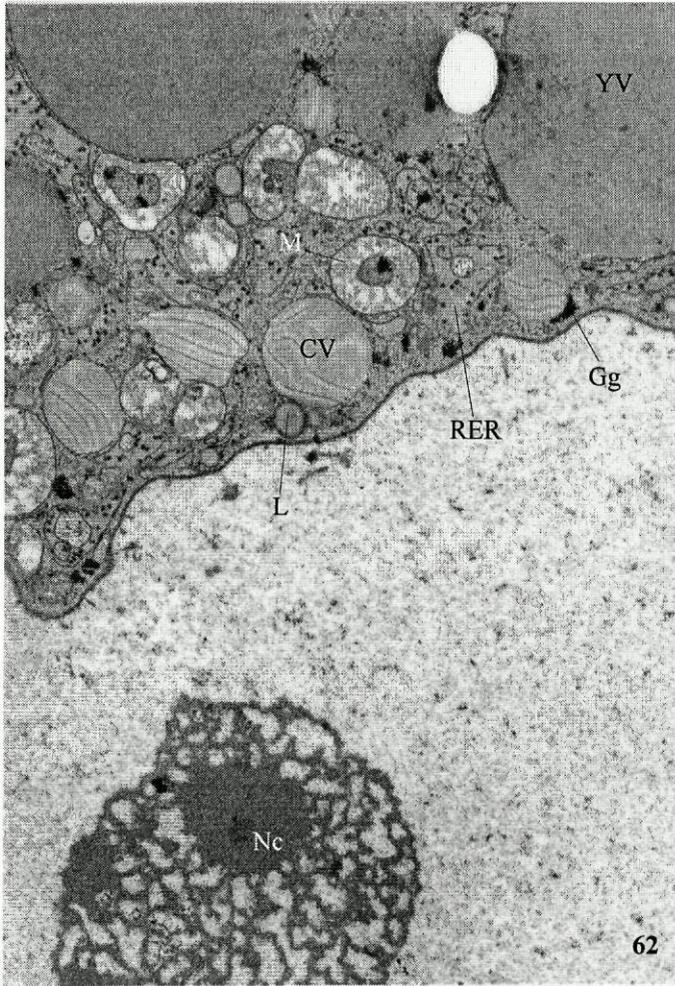
Figura 62. Região perinuclear. Nesta fase, caracterizada pela existência na periferia do ovócito de grandes vesículas corticais fundidas com o oolema, o núcleo apresenta novamente nucléolos (Nc) de maior dimensão constituídos por pequenas regiões redondas e densas rodeadas por uma ampla rede de finos cordões. O citoplasma perinuclear apresenta vesículas vitelinas (YV), pequenas vesículas de retículo endoplásmico rugoso (RER), pequenas vesículas corticais (CV), mitocôndrias aneladas (M), agregados de glicogênio (Gg) e gotículas lipídicas (L). × 8.000

A região do citoplasma que se situa entre a região perinuclear e a base das vesículas corticais gigantes da superfície denomina-se citoplasma interno e apresenta três estratos morfologicamente distintos: estratos interno, médio e externo (Figs. 63, 64 e 65).

Figura 63. A seguir à região perinuclear, o citoplasma apresenta uma enorme densidade de pequenas vesículas corticais (CV), mitocôndrias (M), pequenas vesículas de retículo endoplásmico rugoso (RER), agregados de glicogênio (Gg) e gotículas lipídicas (L). Neste fundo observam-se também várias vesículas vitelinas (YV). × 5.600

Figura 64. O estrato médio do citoplasma interno evidencia uma grande densidade de vesículas vitelinas (YV), as quais apresentam à sua periferia grandes agregados de grânulos de glicogênio. Nesta região, a densidade das pequenas vesículas de retículo endoplásmico rugoso (RER), mitocôndrias (M) pequenas vesículas corticais (CV) e gotículas lipídicas (L) é muito menor. × 8.000

Figura 65. O estrato externo do citoplasma interno é igualmente rico em vesículas vitelinas (YV), mas praticamente sem glicogênio associado, estando envolvidas por um retículo endoplásmico rugoso (RER) anastomosado. As mitocôndrias (M) voltam a ser aneladas, as gotículas lipídicas (L) são escassas e as vesículas corticais estão virtualmente ausentes. × 8.000



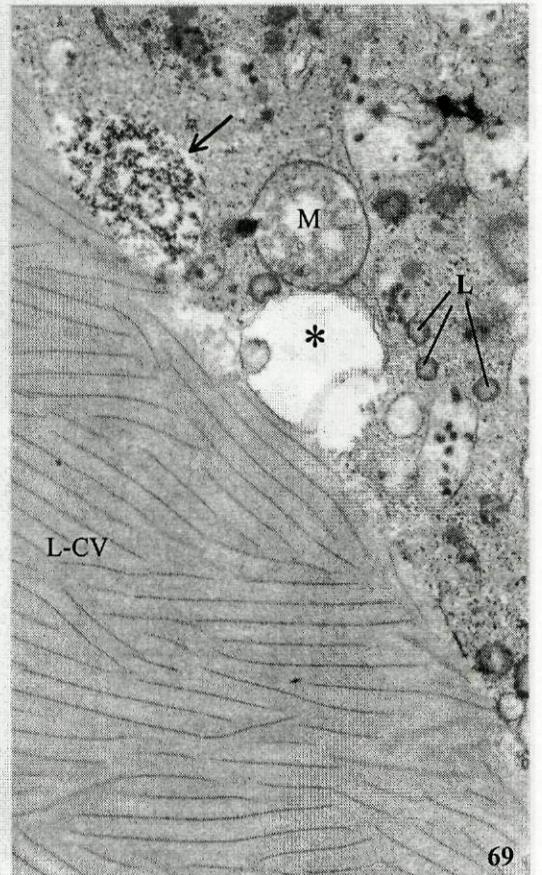
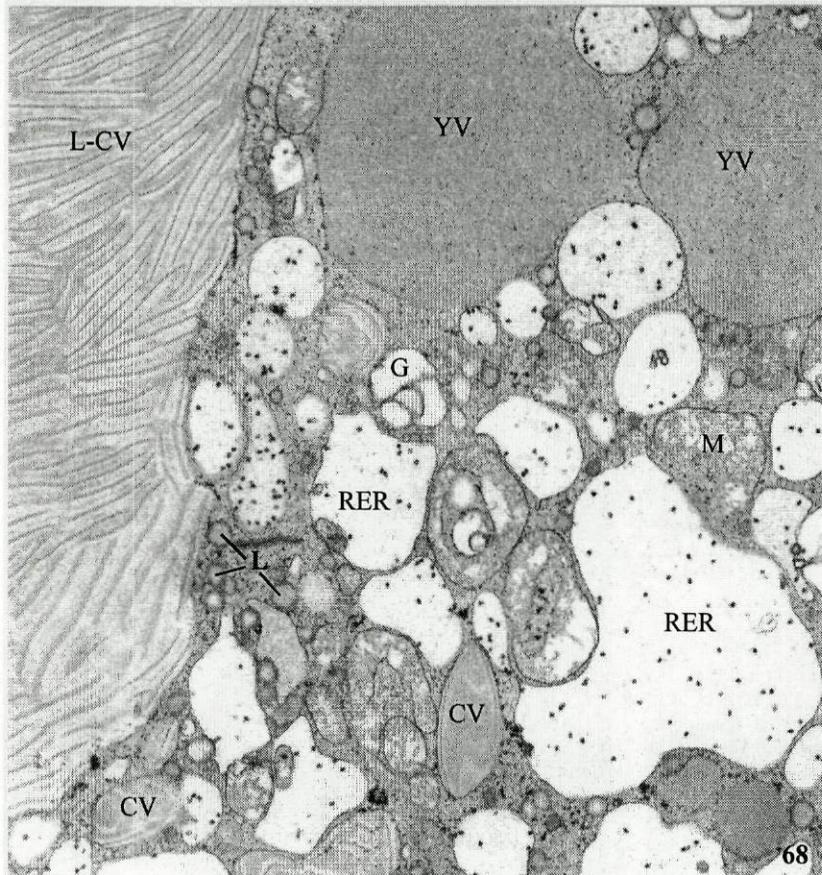
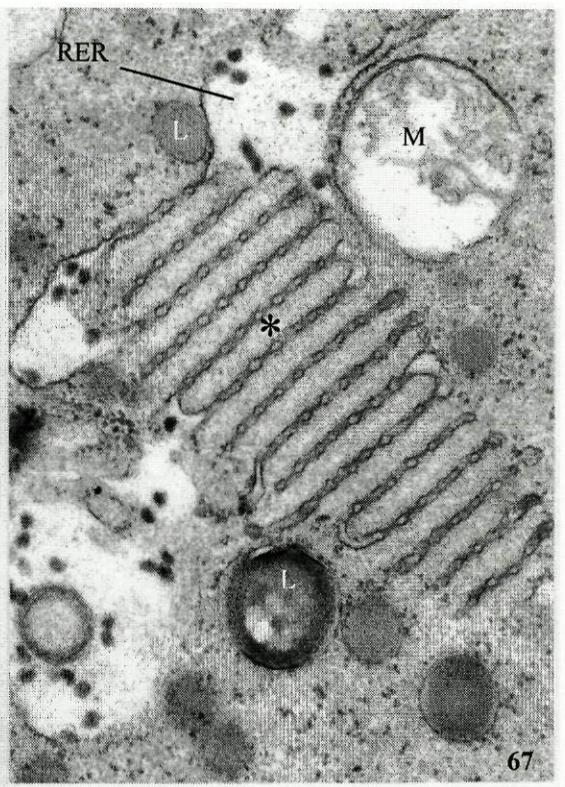
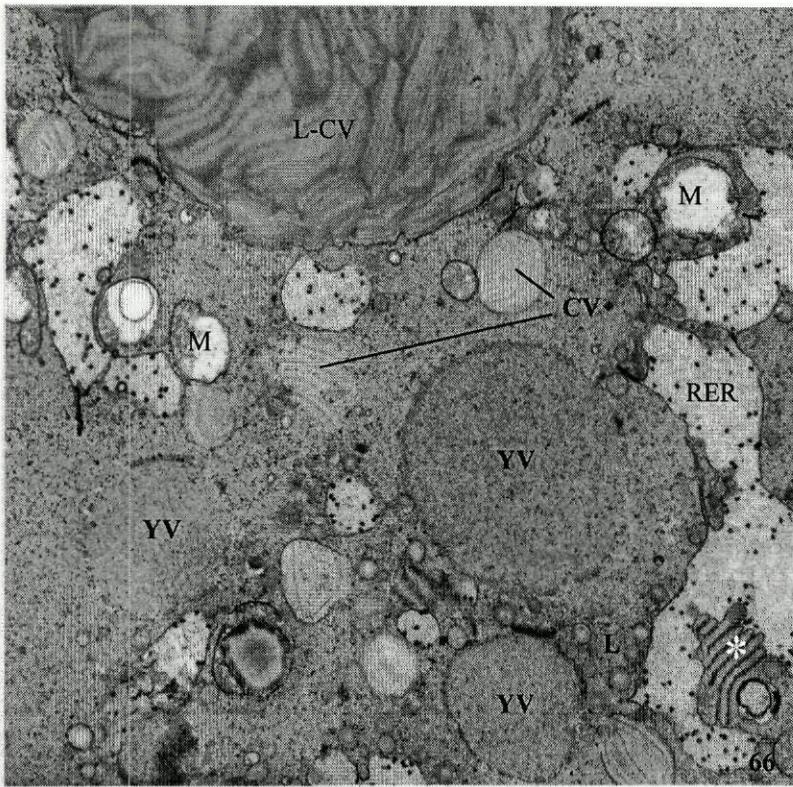
Ovócitos maduros

Figura 66. Na zona do citoplasma onde se encontra a parte basal das grandes vesículas corticais (L-CR) já fundidas com o oolema, o número de vesículas vitelinas (YV) é menor e o retículo endoplásmico rugoso (RER) torna-se menos anastomosado, apresentando pontes entre si que tomam a forma de “lamelas aneladas” (*). Nesta zona encontram-se também várias pequenas vesículas corticais (CV), mitocôndrias (M) e gotículas lipídicas (L). × 8.000

Figura 67. Detalhe das pontes entre o retículo endoplásmico rugoso (RER), com o seu aspecto tipo “lamelas aneladas” (*). × 26.000

Figura 68. Região baso-lateral das grandes vesículas corticais (L-CV) periféricas. Na sua proximidade encontram-se gotículas lipídicas (L) isoladas, pequenas vesículas corticais (CV), aparelho de Golgi (G), retículo endoplásmico rugoso (RER), vesículas vitelinas (YV), e mitocôndrias (M), algumas das quais com forma anelar. × 8.000

Figura 69. A região baso-lateral das grandes vesículas corticais periféricas (L-CV) funde-se com vesículas de conteúdo granulo-fibrilar (seta) e com vesículas claras (*) golgianas. × 16.000



Ovócitos maduros

Figuras 70 a 74. Região superficial do ovócito

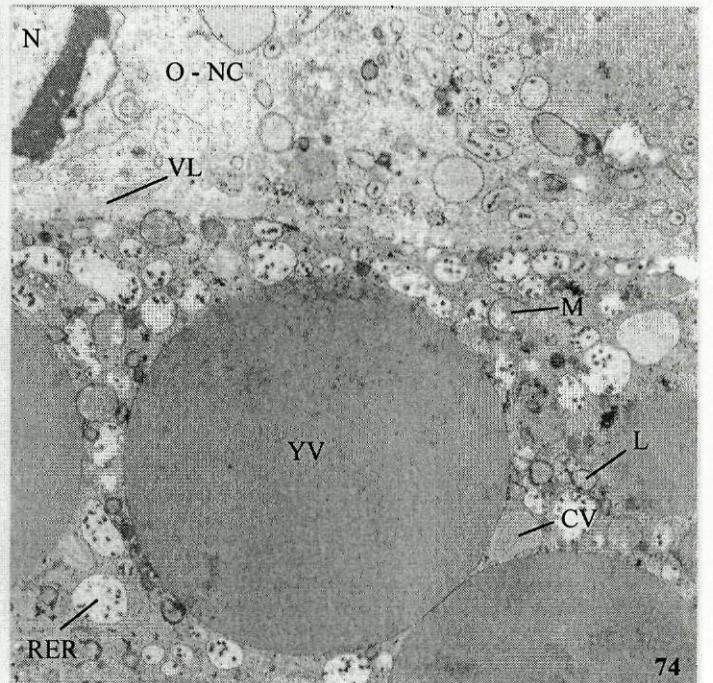
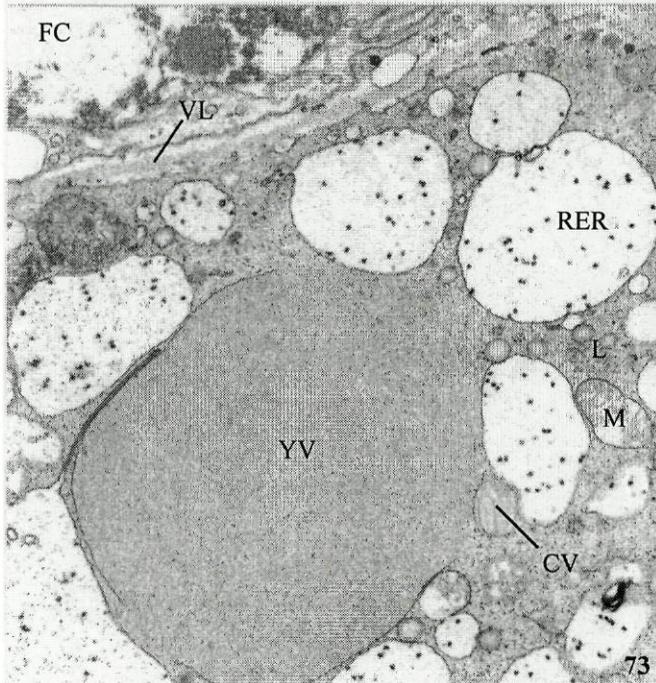
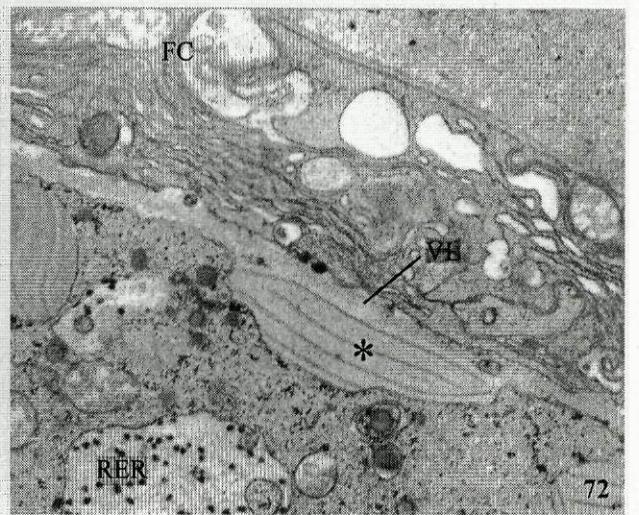
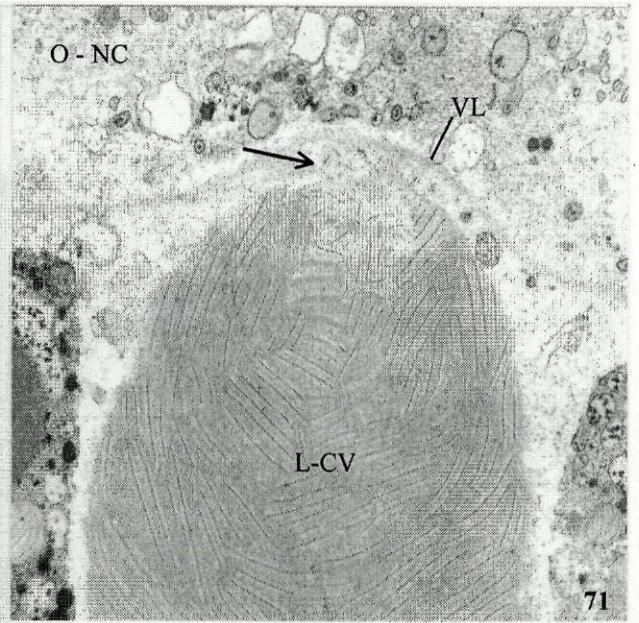
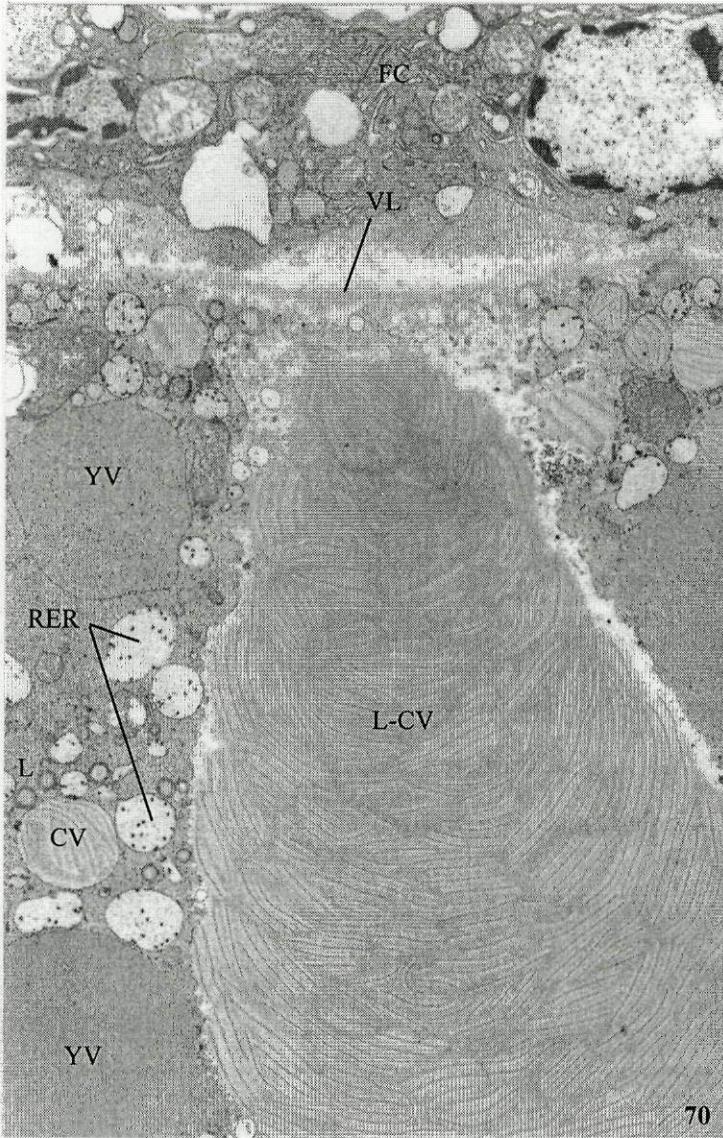
Figura 70. No cortex do ovócito as grandes vesículas corticais (L-CV) apresentam-se fundidas com o oolema. Podem também observar-se várias pequenas vesículas corticais (CV), gotículas lipídicas (L) isoladas, vesículas vitelinas (YV) e vesículas de retículo endoplásmico rugoso (RER). O ovócito está separado da célula folicular (FC) pela camada vitelina (VL). × 8.000

Figura 71. Pormenor da zona apical de uma grande vesícula cortical (L-CV). Apesar de todo o conteúdo destas vesículas corticais estar exposto ao exterior, apenas a porção apical do conteúdo da L-CV se parece dispersar e fundir com a camada vitelina (VL). Nesta zona o ovócito está recoberto por uma célula nutritiva (O-NC). × 26.000

Figura 72. Contrariamente às grandes vesículas corticais, pequenas vesículas corticais (*) fundem-se com o oolema e o seu conteúdo é completamente exocitado e fundido com a camada vitelina (VL). A célula folicular (FC) adjacente ao ovócito é estreita e de tipo denso. × 8.000

Figura 73. Na periferia do ovócito podem ser observadas vesículas vitelinas (YV), pequenas vesículas corticais (CV), gotículas lipídicas (L) isoladas, mitocôndrias (M) e vesículas de retículo endoplásmico rugoso (RER), que nesta região já não é anastomosado. Entre o ovócito e a célula folicular de tipo claro (FC) que a limita está bem visível a camada vitelina (VL). × 16.000

Figura 74. Algumas regiões da superfície do ovócito são rodeadas não por células foliculares mas por ovócitos aplanados, representando provavelmente o papel de células nutritivas (O-NC). Nesta fase de ovogénese estas apresentam, um núcleo (N) cuja disposição da heterocromatina em barras densas periféricas lembra os processos de apoptose. Na região periférica do ovócito, além das vesículas vitelinas (YV) estão presentes pequenas vesículas corticais (CV), mitocôndrias (M), gotículas lipídicas (L) isoladas e um grande número de pequenas vesículas de retículo endoplásmico rugoso (RER). × 16.000



Ovócitos maduros

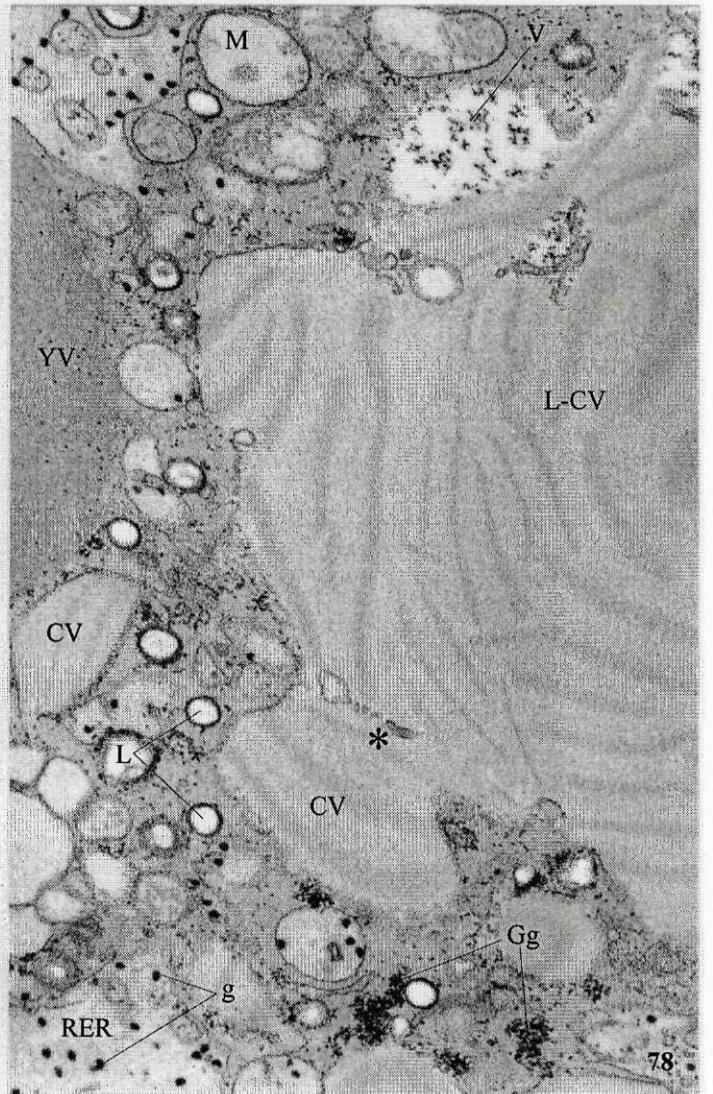
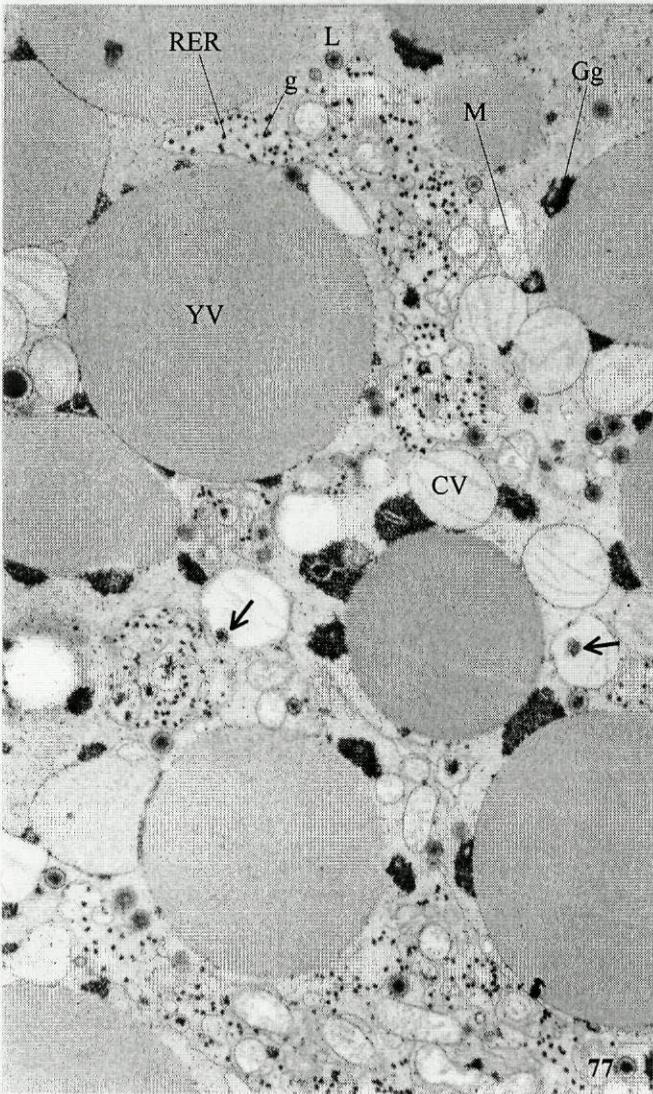
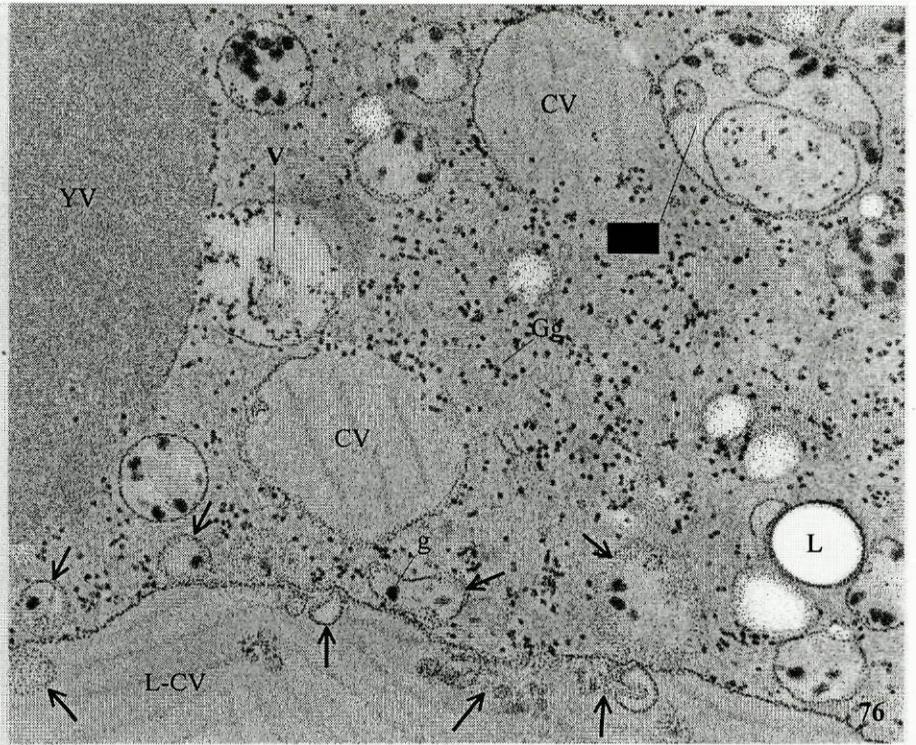
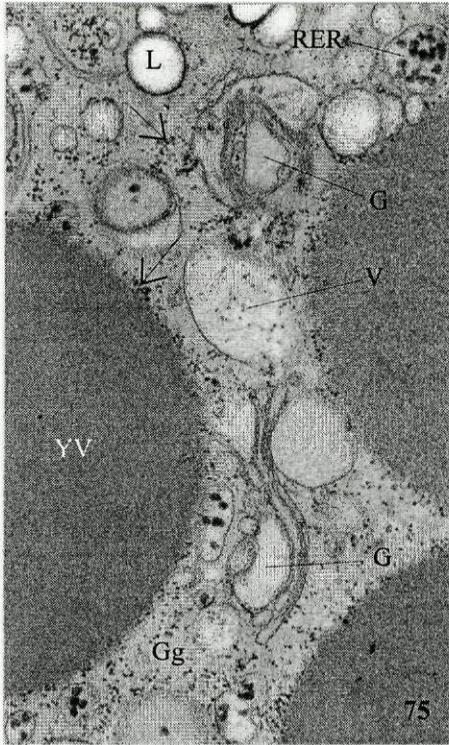
Figuras 75 a 78. Técnica citoquímica de Thiéry

Figura 75. Região do citoplasma junto à porção basal das grandes vesículas corticais. Pormenor do aparelho de Golgi (G) para evidenciar a origem golgiana de vesículas com componentes marcados positivamente para as glicoproteínas (V). Na imagem é também evidenciado pequenos depósitos de glicogénio (setas) na periferia das vesículas vitelinas (YV) e dispersos no citoplasma. Os grânulos densos (g) do retículo endoplásmico rugoso (RER), também marcam positivamente para as glicoproteínas. × 16.000

Figura 76. Região baso-lateral das grandes vesículas corticais (L-CV). Verifica-se que pequenas vesículas do retículo endoplásmico rugoso (RER) se fundem com a vesícula cortical sendo absorvidas (setas) É também patente a fusão de uma vesícula golgiana (V) com uma vesícula vitelina (YV). Nesta imagem estão marcados positivamente para as glicoproteínas os grânulos densos (g) do retículo endoplásmico rugoso (RER) e o conteúdo da vesícula golgiana (V). O glicogénio marcado apresenta-se na forma de pequenas partículas densas dispersas pelo citoplasma (Gg). × 26.000

Figura 77. Estrato médio do citoplasma interno. Note-se a marcação positiva para o glicogénio (Gg) que forma agregados na periferia das vesículas vitelinas (YV) e das vesículas corticais (CV). Os grânulos densos (g) do retículo endoplásmico rugoso (RER) estão marcados positivamente para glicoproteínas. × 8.000

Figura 78. Região basal e lateral das grandes vesículas corticais (L-CV). Na porção basal da grande vesícula cortical (L-CV) ocorrem fenómenos de fusão (*) com pequenas vesículas corticais (CV). A porção lateral da grande vesícula cortical (L-CV) funde-se com vesículas golgianas (V). O conteúdo da vesícula golgiana (V) e os grânulos densos (g) do retículo endoplásmico rugoso (RER) marcam positivamente para as glicoproteínas. No citoplasma os agregados de partículas densas estão positivamente marcados para o glicogénio (Gg). × 16.000



Ovócitos maduros

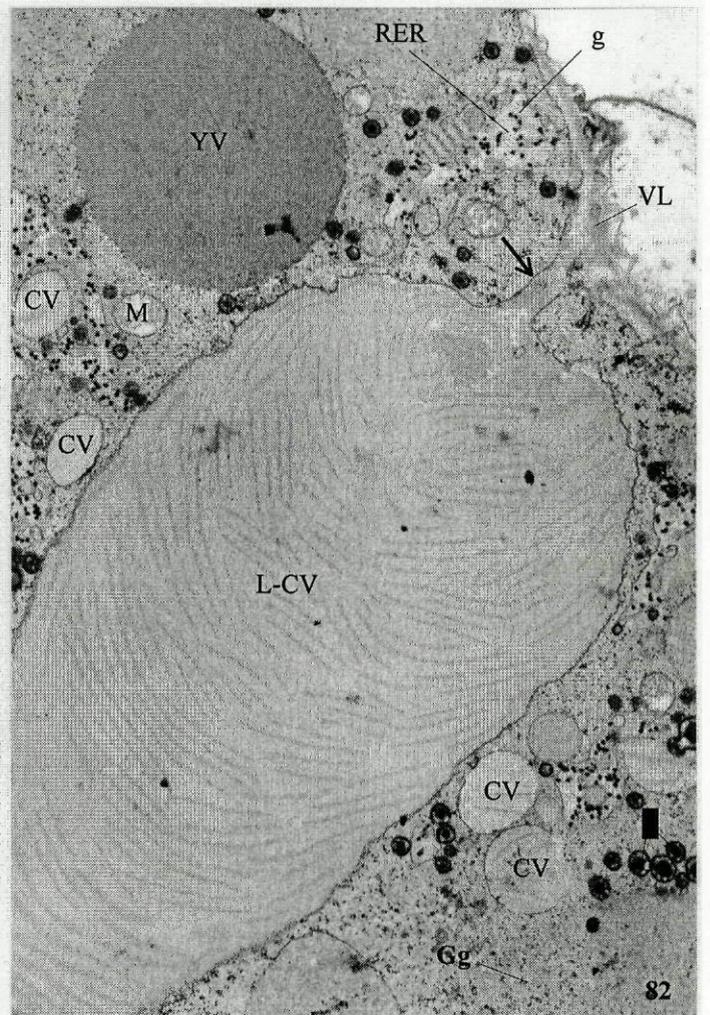
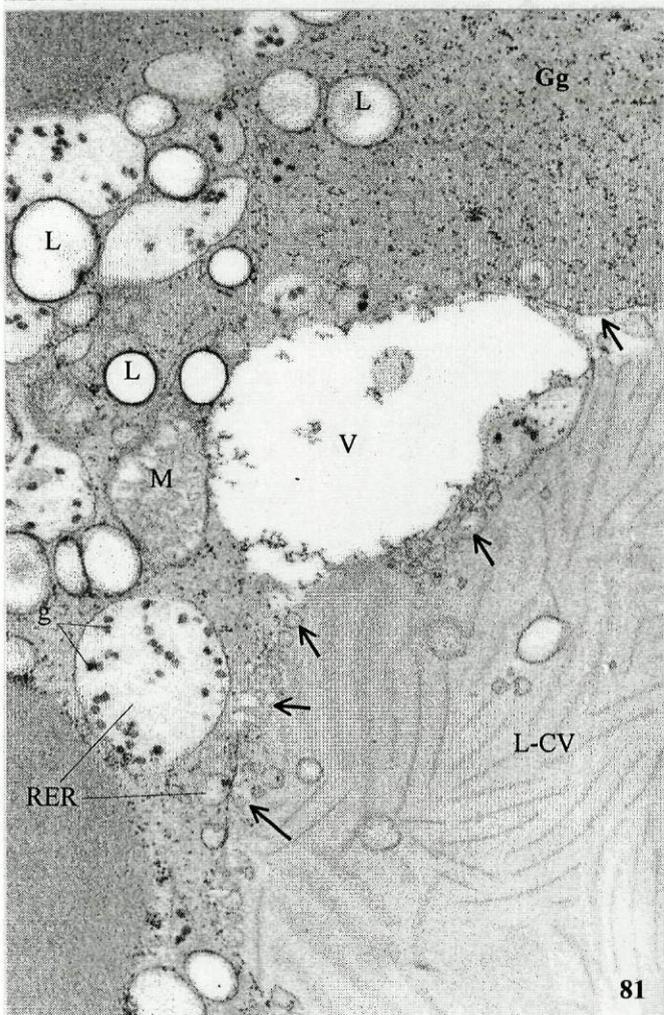
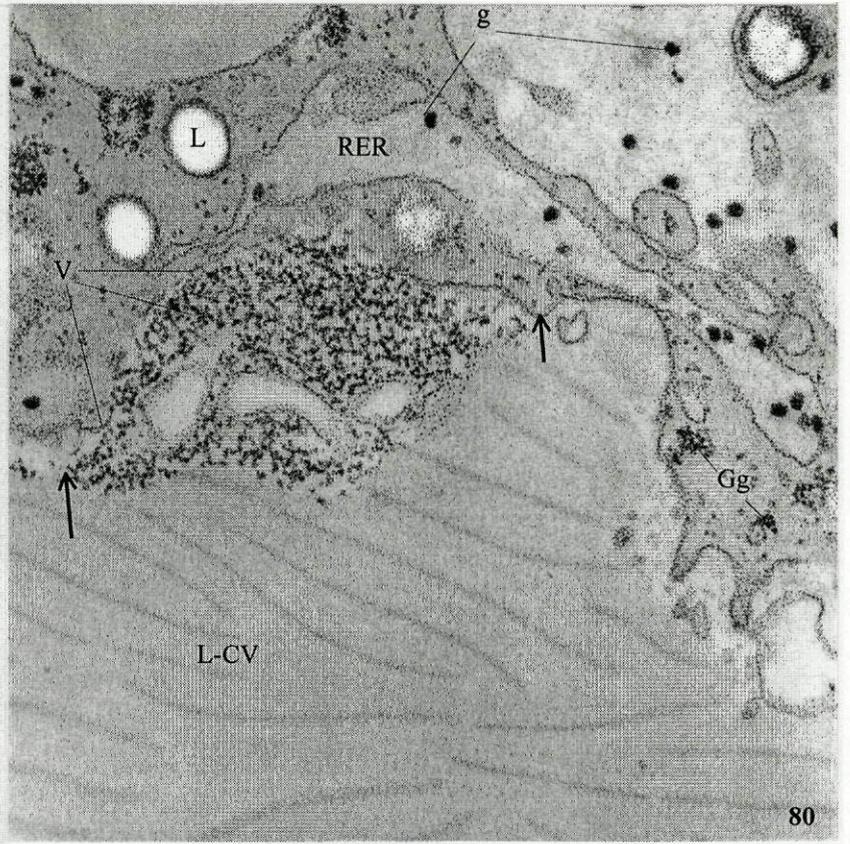
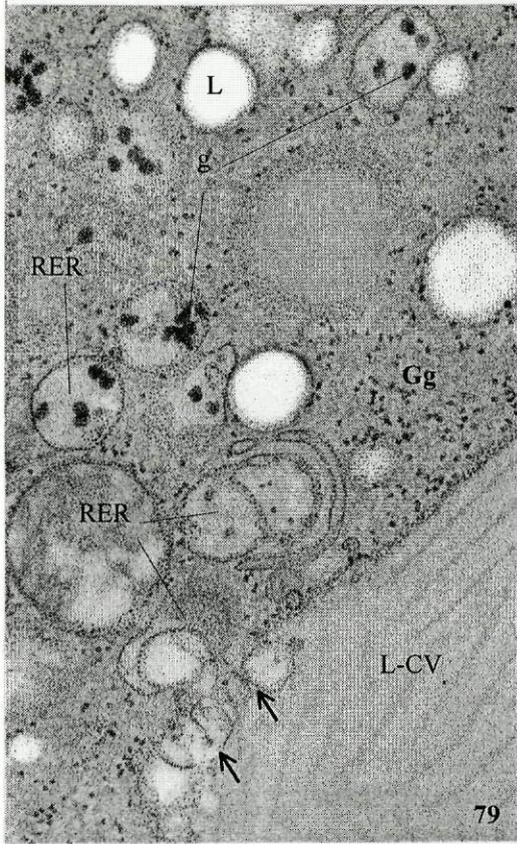
Figuras 79 a 82. Técnica citoquímica de Thiéry

Figura 79. Região baso-lateral de uma grande vesícula cortical (L-CV). Pormenor evidenciando a fusão e incorporação (setas) de vesículas de retículo endoplásmico rugoso (RER) com a grande vesícula cortical (L-CV). Os grânulos densos (g) do retículo endoplásmico rugoso marcam positivamente para glicoproteínas. As partículas densas dispersas pelo citoplasma marcam positivamente para o glicogénio (Gg). × 26.000

Figura 80. Região baso-lateral de uma grande vesícula cortical (L-CV). Note-se a fusão (setas) de uma grande vesícula golgiana (V) com a grande vesícula cortical. Os grânulos densos (g) do retículo endoplásmico rugoso e o conteúdo da vesícula golgiana marcam positivamente para glicoproteínas. No citoplasma há depósitos dispersos de partículas densas marcadas positivamente para o glicogénio (Gg). × 26.000

Figura 81. Região baso-lateral de uma grande vesícula cortical (L-CV). Grandes vesículas golgianas (V) e pequenas vesículas do retículo endoplásmico rugoso (RER) fundem-se (setas) com a grande vesícula cortical. Os grânulos densos (g) do retículo endoplásmico rugoso marcam positivamente para glicoproteínas. Na imagem, a grande vesícula golgiana (V) possui um conteúdo pouco rico em glicoproteínas (comparar com a Fig. 80). As partículas densas dispersas pelo citoplasma estão marcadas positivamente para o glicogénio (Gg). × 16.000

Figura 82. Periferia do ovócito. Observe-se a fusão (seta) da porção apical de uma grande vesícula cortical (L-CV) com o oolema. Estão marcadas positivamente para glicoproteínas os grânulos densos (g) das vesículas do retículo endoplásmico rugoso (RER). As partículas densas dispersas pelo citoplasma estão marcadas positivamente para o glicogénio (Gg). Note-se que o conteúdo da grande vesícula cortical (L-CV), das pequenas vesículas corticais (CV) e das vesículas vitelinas (YV) não marcam para as glicoproteínas. A camada vitelina (VL) também não se apresenta marcada. A marcação dos lípidos das gotículas lipídicas é um efeito secundário da técnica citoquímica. × 8.000



Parte II. Endocrinologia

*Extração e Purificação Simultânea de Ecdisteróides
e Esteróides Sexuais. Validação do Método.*

Introdução

Desde a sua descoberta nos insectos como reguladores de várias funções importantes, os ecdisteróides foram considerados, durante algum tempo, o único tipo de hormonas esteróides nos artrópodes. O aparecimento de outros tipos de esteróides frequentes nos vertebrados (estrogénios, progestagénios, androgénios e corticosteróides) foi assim, considerado como artefacto ou consequência da inespecificidade do bioensaio utilizado.

Porém, nos últimos anos, o desenvolvimento de várias técnicas analíticas, mais específicas, sensíveis e rigorosas, conduziu à identificação inequívoca e à quantificação precisa de várias hormonas esteróides em invertebrados, nomeadamente em crustáceos (daí denominadas “do tipo de vertebrados”)(ver Introdução Geral e Introdução do capítulo 5).

Presentemente, a cromatografia líquida de alta pressão (HPLC), que combinando uma melhor selectividade com uma alta recuperação constitui uma vantagem em relação à cromatografia em camada fina (TLC), tornou-se a técnica mais eficiente e a mais utilizada para o estudo de esteróides em materiais biológicos. A cromatografia de gás (GC), embora com maior capacidade de separação e detecção, requer um processo de derivatização (transformação dos esteróides polares e termolábeis em esteres trimetilsilil mais voláteis) o que constitui um factor limitante à aplicação mais generalizada desta técnica. Normalmente combinados com a cromatografia utilizam-se métodos espectrométricos (absorção U.V., espectrometria de infravermelhos e de ressonância magnética nuclear, e espectrometria de massa-MS) para a sua detecção e quantificação. No entanto, devido por um lado às misturas complexas que são os extractos biológicos e por outro ao limite de detecção do HPLC (5 a 10 ng), as fracções provenientes da separação são frequentemente sujeitas a métodos mais sensíveis de detecção e quantificação como o RIA/EIA ou o MS (Hilde *et al.*, 1988).

Não obstante a existência de vários trabalhos que incluem a extracção e purificação com subsequente quantificação de esteróides ou dos seus polihidroxiados ecdisteróides (esteróides: Hines, 1992; Sasser e Singhas, 1992; ecdisteróides: Wilder, 1990, 91; Okumura, 1993, entre outros), apenas foi encontrado no trabalho de Bradbrook (1990) uma metodologia para o tratamento simultâneo, i.e., na mesma amostra, para os dois tipos de hormonas. Por outro lado, outra limitação encontrada foi a grande quantidade de material biológico normalmente necessária para as extracções, de tal forma que a maioria dos autores ou analisa animais inteiros ou “pools” de órgãos de animais (p. ex., numa mesma fase de desenvolvimento). Por último, a recuperação final das hormonas após a sua purificação, bastante variável nos vários trabalhos revistos e entre as hormonas estudadas (desde 50%), pareceu-nos possível de otimizar. Desta forma, desenvolvemos um método simples e rápido, de extracção e purificação de ecdisteróides e esteróides sexuais na mesma amostra biológica, utilizando reduzidas quantidades (150 a 250 µl de hemolinfa e 100 a 300 mg de tecido liofilizado) o que permite, a maioria das vezes, resultados individuais e com uma recuperação quase total (acima dos 90%). Por fim, a reprodutibilidade dos resultados, assim como a rapidez e economia do processo desenvolvido, legitimam a proposta desta nova técnica de extracção.

Material e Métodos

O desenvolvimento da técnica de extracção simultânea de hormonas ecdisteróides e esteróides, foi realizada utilizando vários tecidos (músculo, ovário, hemolinfa, etc.) de *P. japonicus*.

A metodologia seguida para a optimização desta técnica foi a seguinte: partindo de uma mistura de padrões de várias hormonas (esteróides e ecdisteróides) adicionada a material biológico, foram estudados vários parâmetros de extracção e purificação tendo em vista a máxima recuperação, através da sua quantificação final por HPLC.

Finalmente, a técnica foi validada (quantificação das perdas ao longo do processo de extracção, percentagem final de recuperação dos dois tipos de hormonas e sua reprodutibilidade) com amostras de hemolinfa e posteriormente também testada com amostras de ovário. Para avaliar a eficiência do método desenvolvido uma quantidade conhecida de [1,2,6,7-³H(N)]-Progesterona e/ou de α -[23,24-³H(N)]-Ecdisona, foi adicionada ao material biológico. As hormonas foram extraídas, e em todas as fases do método retiradas alíquotas, com volumes proporcionais (5%), para posterior medição dos níveis de radioactividade em contador de cintilação líquida.

A. Parâmetros estudados na optimização da técnica de extracção e purificação

1. EXTRACÇÃO

Inicialmente foram realizadas algumas experiências de extracção de uma mistura de padrões dos dois tipos de hormonas introduzidas (c.a. 1 μ g de cada) em tecidos frescos (de 1 a 6 g), em tecidos liofilizados (100 a 300 mg), e em hemolinfa (150 a 250 μ l) com o objectivo de estudar o melhor procedimento extractivo.

Esta extracção foi realizada testando como solvente éter dietílico (Merck) e metanol p.a. (Merck), em quantidades variáveis de forma a obter a melhor recuperação.

Mistura de padrões de ecdisteróides e esteróides a estudar:

Ecdisteróides: Ecdisona (Sigma E-9004)

20-OH-Ecdisona (Sigma H-5142)

Esteróides:	Estriol (Sigma E-1253)
	Estrona (Sigma E-9750)
	β -Estradiol (Sigma E-8875)
	Testosterona (Sigma T-1500)
	17 α -OH-Progesterona (Sigma H-5752)
	Progesterona (Sigma P-0130)

Soluções etanólicas (etanol p.a., Merck) dos padrões foram preparadas individualmente com a concentração de $\pm 0,5$ mg/ml. Destas, foi preparada uma mistura com todos os padrões com a concentração final de ± 5 μ g/ml de cada.

Foram igualmente testados dois processos de evaporação dos solventes: no rotavapor e em corrente de azoto em blocos térmicos (Techne, Dri-Block, DB.3, Sample Concentrator) ou em banho-maria (Jouan) a 50°C.

2. PURIFICAÇÃO

Com o objectivo de purificar o extracto metanólico, foram estudados dois métodos:

- em fase sólida (SPE), com a utilização de mini-colunas de fase reversa C18 (Merck RP-18) de 400 ou 500 mg.
- extracção líquido-líquido com n- hexano p.a. (Merck) e purificação da fase metanol/água (MeOH/H₂O) 90%, em mini-colunas C18 (SPE).

No processo de purificação da amostra em fase sólida foram ainda experimentados dois métodos:

- a) ressuspensão da amostra em 5 ml de MeOH/H₂O 30%, e extracção das hormonas com a mini-coluna pré-acondicionada com 7 ml MeOH/H₂O 30%, v/v, 4 ml MeOH, 5 ml MeOH/H₂O 30%, v/v e sua eluição com 4 ml de MeOH/H₂O 30%, v/v (fracção 1), 4 ml de MeOH (fracção 2) e mais 4 ml de MeOH (fracção 3). Os esteróides e ecdisteróides são eluídos na fracção 2.

- b) ressuspensão da amostra em 5 ml de tampão fosfato (0.122 M Na₂HPO₄·2H₂O e 0.078 M KH₂PO₄, pH=7.6), neste caso com a mini-coluna previamente acondicionada com 2.5 ml MeOH e 5 ml H₂O. As hormonas são eluídas com 5 ml MeOH/H₂O - 90%, v/v.

A utilização do tampão fosfato, como solvente da amostra, permitiu ainda estudar a optimização da sua purificação (diminuição das contaminações visíveis nos cromatogramas do HPLC), através da eluição das impurezas com água e misturas MeOH/H₂O em diferentes concentrações.

O aparecimento ocasional, em extractos de ovário, na ressuspensão final (antes da injeção no HPLC) de um certo precipitado, determinou a sua filtração (filtros de nylon 66, Schleicher & Schuell, 0.2 µm; Ø 3 mm) no sentido de preservar a coluna analítica do HPLC.

Finalmente, foi testada a possibilidade de concentração da amostra numa pré-coluna (3 Nucleosil 120-5 C18, 30×4 mm ID, Macherey-Nagel) colocada no injektor e sua purificação através da lavagem com diversos volumes de água.

3. SEPARAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO POR HPLC

Depois de algumas experiências preliminares utilizando a cromatografia em camada fina (TLC), foram empreendidos vários estudos com o objectivo de estabelecer as melhores condições de separação das várias hormonas por HPLC. As características do HPLC utilizado foram as seguintes: Gilson:- bombas 305 e 306; Detector Universal U.V. 117 de comprimento de onda variável; Câmara de Mistura - Dinamic Mixer 811C; Manometric Module 805 Max. Press. - 60 Mpa; Coluna HPLC com enchimento C 18, Merck 50833, RP-18 - 25 cm x 0.4 cm tipo Lickrocart® 250-4. Tamanho da Partícula - 5 mm; Injector - Rheodyne 7125 - 081; Loop - 100 µl.

Foram estudados vários eluentes (acetonitrilo/água e metanol/água) e vários programas de separação (isocráticos, em gradiente linear ou por “patamares”).

Os eluentes foram filtrados antes de serem usados no HPLC, em filtros de membrana (Schleicher & Schuell, NL 16, 0.2 µm, Ø 50 mm). Posteriormente foram desgaseificados no próprio frasco do HPLC por agitação com um magnete sob vácuo (bomba de vácuo).

Com vista à optimização da reprodutibilidade dos tempos de retenção das várias hormonas, foi estudada a possibilidade de termostatização da coluna de HPLC. A coluna foi introduzida numa “manga” de PVC na qual se fez circular água de um banho-maria (com a temperatura termostatada em 50°C) que continha igualmente os frascos dos eluentes.

As várias fracções resultantes da separação por HPLC foram recolhidas num colector de fracções programável (Gilson Fraction Controller 202, rack 21).

A quantificação das várias hormonas introduzidas (1 µg) extraídas do material biológico foi feita por cálculo das áreas dos respectivos cromatogramas, injectando, com uma seringa de precisão Hamilton, 10 µl da ressuspensão final de 200 µl. A recuperação

foi calculada por comparação das áreas de iguais quantidades de padrões autênticos injectados no HPLC.

4. TÉCNICA FINAL DE EXTRAÇÃO DE ECDISTERÓIDES E ESTERÓIDES

PROTOCOLO

1. Tecido liofilizado (± 150 mg) ou hemolinfa (± 150 μ l).
2. Num almofariz colocar a amostra de tecido liofilizado. Macerar com 4 ml (2+1+1) de metanol e colocar num tubo de centrifuga. Agitar num vortex e centrifugar (B.BRAUN, Sigma 3 K 12, Rotor n.º 11133; G= 864 g; 5500/min) a 4500 rpm a 4°C durante 20 minutos. Recolher o sobrenadante.

Ressuspender em 1 ml de MeOH e centrifugar. Repetir este passo (volume final de ± 6 ml).

- 2.1. No caso da hemolinfa juntar 1.5 ml de MeOH no tubo de centrifuga contendo a amostra. Agitar num vortex e centrifugar a 4500 rpm a 4°C durante 20 minutos. Recolher o sobrenadante.

Ressuspender em 1.5 ml de MeOH e centrifugar. Repetir este passo com 1 ml de MeOH. Vf ± 4 ml.

3. Evaporar sob corrente de azoto em blocos térmicos ou em banho-maria a 50°C.
4. Ressuspender em 5 ml de tampão fosfato 0.2 M (pH= 7.6). Deixar os tubos a agitar durante a noite à temperatura ambiente.

NO DIA SEGUINTE

5. Extrair com uma mini-coluna RP-18 pré-acondicionada com 2.5 ml de MeOH e 5 ml H₂O.

6. Lavar a coluna com: 5 ml de H₂O

5 ml de MeOH/H₂O (5%)

7. Eluir com 5 ml de MeOH/H₂O (90%) com um fluxo inferior a 10 ml/minuto.

8. Evaporar (igual a 3).

9. Ressuspender em 200 µl de MeOH/H₂O (90%). Filtrar esta solução (com filtros de nylon 66) para um eppendorf. Lavar o filtro com 2× 100 µl de MeOH; evaporar, ressuspender em 150 µl de MeOH/H₂O (90%). Retirar para 3 eppendorfs as seguintes alíquotas:

- 1) 60 µl - evaporar e no momento de injectar no HPLC ressuspender em 60 µl de MeOH/H₂O (90%) e daqui injectar 2× 20 µl.
- 2) 20 µl - evaporar e no momento quantificar os ecdisteróides totais por EIA, ressuspender em 240 µl de tampão de EIA (ver capítulo 4).
- 3) 40 µl - evaporar e no momento quantificar a Progesterona por RIA, ressuspender em 240 µl de tampão de EIA (ver capítulo 5).

B. Validação da técnica com hormonas marcadas radioactivamente para estudo das perdas ao longo do processo de extracção e cálculo da eficiência e reprodutibilidade do processo

Para testar a eficiência do método (recuperação final das hormonas ecdisteróides e esteróides) uma quantidade conhecida de [1,2,6,7-³H(N)]-Progesterona (3.3 µg/ml; 1µCi/µl; 3×10⁶ cpm/µl; actividade específica 95.0 Ci/mmol; pureza 99%) e de α-[23,24-³H(N)]-Ecdisona (0.52 µg/ml; 0.1 µCi/µl; 3×10⁵ cpm/µl; actividade específica

88.57 Ci/mmol; pureza 99%) (NEM, Research Products), foi adicionada ao material biológico.

Assim, utilizando hemolinfa, foram executadas 5 experiências, sendo cada uma das hormonas testada isoladamente (em duplicado) e por fim uma experiência em que foram juntas, de forma a que a quantidade de trítio fosse igual às experiências anteriores. Esta última experiência foi repetida novamente e em duplicado usando ovário liofilizado.

As hormonas foram extraídas como descrito anteriormente (com a técnica já “afinada” com as hormonas “frias” e quantificadas no final por HPLC, ver pág. 6), e em todas as fases do método retiradas alíquotas, com volumes proporcionais (5%), para posterior medição dos níveis de radioactividade, em cintilações por minuto (cpm), num contador de cintilação líquida (Beckman LS 3801). A percentagem de eficiência para o trítio foi previamente testada resultando em 33.3% (teoricamente deveria ser de $40 \pm 2\%$). Foram também testados dois tipos de líquidos de cintilação (Universal e Insta-Gell II), utilizando o volume de 2.5 ml para a leitura de cada amostra, tendo sido obtidos idênticos resultados com ambos.

Procedimento para a recolha das várias alíquotas:

Experiência A - Extracção na hemolinfa de [1,2,6,7- $^3\text{H}(\text{N})$]- Progesterona (+ fria)

1. Num tubo de centrifuga colocar a hemolinfa (150 μl). Juntar 10 μl de uma solução de [1,2,6,7- $^3\text{H}(\text{N})$]- Progesterona, diluída $10 \times$ da solução-mãe (0.33 $\mu\text{g}/\text{ml}$) + 20 μl de padrões ($\approx 50 \mu\text{g}/\text{ml}$). Misturar. Vol. Total = 180 μl .

2. Retirar desta mistura a **aliquota-1** (3x9 μ l) e colocar em três frascos (1,1'e 1") contendo 2.5 ml de líquido de cintilação (Universal).
3. Ao tubo de centrifuga contendo a solução anterior, juntar 1.5 ml de MeOH. Vol. final de 1.653 ml (1.5+0.153).

Experiência B - Extração na hemolinfa de ^3H -Ecdisona (+ fria)

1. Num tubo de centrifuga colocar a hemolinfa (150 μ l). Juntar 10 μ l de ^3H -Ecdisona (0.52 $\mu\text{g/ml}$) + 20 μ l de padrões (\approx 50 $\mu\text{g/ml}$). Misturar. Vol. Total = 180 μ l.
2. Retirar desta mistura a **aliquota-1** (3x9 μ l) e colocar em três frascos (1,1'e 1") contendo 2.5 ml de líquido de cintilação.
3. Ao tubo de centrifuga contendo a solução anterior, juntar 1.5 ml de MeOH. Vol. final de 1.653 ml (1.5+0.153).

Experiência C - Extração na hemolinfa de [1,2,6,7- $^3\text{H(N)}$]- Progesterona (+ fria)
+ ^3H -Ecdisona (+ fria)

1. Num tubo de centrifuga colocar a hemolinfa (150 μ l). Juntar 5 μ l de [1,2,6,7- $^3\text{H(N)}$]- Progesterona (0.33 $\mu\text{g/ml}$) + 5 μ l de ^3H -Ecdisona (0.52 $\mu\text{g/ml}$) + 20 μ l de padrões (\approx 50 $\mu\text{g/ml}$). Misturar. Vol. Total = 180 μ l.
2. Retirar desta mistura a **aliquota-1** (3x9 μ l) e colocar em três frascos (1,1'e 1") contendo 2.5 ml de líquido de cintilação.
3. Ao tubo de centrifuga contendo a solução anterior, juntar 1.5 ml de MeOH. Vol. final de 1.653 ml (1.5+0.153).

⇒ Os passos seguintes da técnica foram executados igualmente para as 3 experiências (salvo quando referido o contrário):

4. Centrifugar a 4500 rpm a 4 ° C - 20 minutos.
5. Recolher o sobrenadante. Retirar **alíquota 2** (3x 75 µl) e juntar aos frascos (2,2' e 2") de 2.5 ml de líquido de cintilação.
6. Ressuspender em 1.5 ml de MeOH e centrifugar. Retirar **alíquota 3** (3x 75µl).
7. Ressuspender em 1 ml de MeOH e centrifugar. Retirar **alíquota 4** (3x 50 µl);
8. Retirar **alíquota 5** do tubo contendo os sobrenadantes (3x200 µl)(vol. aprox. final ≈ 4).
9. Evaporar em corrente de azoto em blocos térmicos ou em banho-maria a 50°C.
10. Ressuspender em 5 ml de tampão fosfato 0.2 M. (No dia seguinte:) Retirar **alíquota 6** (3x 250 µl).
11. Extrair com 1 mini-coluna RP-18 (acondicionada com 2.5 ml de MeOH e 5 ml H₂O). Retirar **alíquota 7** (3x 250 µl).
12. Lavagem:

com 5 ml de H₂O - Retirar **alíquota 8** (3x 250 µl).

com 5 ml de MeOH/H₂O (5%)- Retirar **alíquota 9** (3x 250 µl).
13. Eluir com 5 ml de MeOH/H₂O (90%). Retirar **alíquota 10** (3x 250 µl).
14. Eluir com 5 ml MeOH (100%). Retirar **alíquota 11** (3x 250 µl).
15. Evaporar (igual a 9.) ambas 13. -MeOH/H₂O (90%) e 14.-MeOH (100%).

16. Ressuspender ambas em 200 µl de MeOH/ H₂O (90%). Retirar **alíquota 12** (3x10µl) - MeOH/H₂O (90%) e **alíquota 13** (3x10 µl) -MeOH (100%).
17. Injectar - 10 µl (seringa de precisão Hamilton) da fracção 90 % MeOH/H₂O e da fracção 100% MeOH.
18. Retirar alíquotas dos tubos 6 (Progesterona, vol. ± 4 ml) das injeções anteriores (3 × 200µl) (**Experiência A**) e dos tubos11 (Ecdisona, vol. ± 1.6 ml) (3x 80 µl) (**Experiência B**) e de ambos (**Experiência C e D**).

Experiência D - Extração no ovário de [1,2,6,7- ³H(N)]- Progesterona (+ fria)
+³H-Ecdisona (+ fria)

1. Num almofariz colocar cerca de 150 mg de ovário liofilizado. Juntar 5 µl de [1,2,6,7- ³H(N)]- Progesterona (0.33 µg/ml) + 5 µl de ³H-Ecdisona (0.52 µg/ml) + 20 µl de padrões (≈50 µg/ml).
2. Macerar com 4 ml (2+1+1) de metanol e colocar num tubo de centrifuga.

Nota: a alíquota 1 não foi retirada, devido à grande quantidade de material em suspensão que interfere na leitura da radioactividade.

3. Centrifugar a 4500 rpm a 4 °C - 20 minutos. Recolher o sobrenadante.
4. Ressuspender em 1 ml de metanol e centrifugar nas condições anteriores.Juntar ao sobrenadante anterior.
5. Repetir o passo anterior. Volume final de ± 6 ml. Retirar uma alíquota de 300 µl (equivalente à alíquota 5 das experiências anteriores).
6. Seguir o procedimento das experiências anteriores a partir do ponto 9.

C. Tratamento da amostra para identificação de alguns esteróides por Espectrometria de Massa

As hormonas existentes num "pool" de 1 g de ovário liofilizado de fêmeas vitelogénicas de *Penaeus japonicus*, foram extraídas seguindo a metodologia descrita (pág. 6), no entanto sofreu algumas alterações com vista à purificação exigida pela técnica de identificação a ser usada.

Assim, o material lipídico existente na amostra ressuspensa em tampão fosfato é extraído com n-hexano/isopropanol (3:2; 2 × 25 ml). A fase orgânica foi evaporada e o resíduo misturado em 2 ml do gel Lipidex 1000®, formado pela mistura de 1 g de Lipidex 1000® com n-hexano/isopropanol, (3:2; 3.5 ml) e equilibrado durante a noite a 4°C.

O solvente foi evaporado e o sólido resultante introduzido numa coluna de cromatografia (ID 1 cm × 2.5 cm) e eluído sequencialmente com H₂O (15 ml), MeOH/H₂O (9:1, 10 ml), MeOH (10 ml) e clorofórmio (CHCl₃)(10 ml).

A fracção MeOH/H₂O (9:1) foi evaporada e enviada para o Departamento de Química da Universidade de Aveiro, para identificação de vários esteróides por Espectrometria de Massa.

Este procedimento foi previamente testado adicionando quantidades conhecidas de padrões (0.5 µg) ao tecido biológico. A fracção MeOH/H₂O (9:1) foi ressuspensa em 100 µl de MeOH e injectados 10 µl no HPLC.

Resultados

A. Parâmetros estudados na otimização da técnica de extracção e purificação

1. EXTRACÇÃO

Na extracção dos padrões adicionados aos tecidos liofilizados obtiveram-se resultados semelhantes aos inicialmente encontrados com os tecidos frescos, porém com duas enormes vantagens: por um lado a grande quantidade de água existente nos tecidos frescos (cerca de 70% em média) dificultava a execução de alguns dos passos da técnica em desenvolvimento (necessidade de executar a extracção com os tubos refrigerados em gelo, maior dificuldade nas evaporações, etc.) e por outro a manutenção, armazenagem, preservação e transporte das amostras, depois de liofilizadas tornou o processo mais fácil e expedito.

A extracção com éter dietílico dos padrões de hormonas adicionadas à hemolinfa resultou em grandes perdas, verificadas pelo desaparecimento de algumas hormonas por TLC. Estas perdas foram resultado da grande dificuldade de separação das duas fases e da formação de emulsões na ressuspensão com MeOH/H₂O.

Pelo contrário, usando o metanol como solvente extractivo das hormonas, quer no material biológico fresco quer no liofilizado, não foram encontradas grandes dificuldades no procedimento.

Não obstante os bons resultados, a nível das recuperações, obtidos com a evaporação no rotavapor, a necessidade de frequentes evaporações ao longo do processo assim como o elevado número de amostras a serem processadas, determinou o uso de uma corrente de azoto a 50°C em blocos térmicos ou em banho-maria, processo igualmente eficiente e muito mais prático.

2. PURIFICAÇÃO

As experiências efectuadas com o objectivo de purificar a amostra (em fase sólida- SPE e com prévia extracção líquido-líquido com n- hexano) mostraram não haver diferença significativa, quer a nível das impurezas obtidas nos cromatogramas, quer a nível da recuperação das várias hormonas (idênticas áreas nos cromatogramas).

Com a ressuspensão em tampão fosfato, do resíduo resultante da evaporação do extracto metanólico inicial, os resultados obtidos foram superiores (recuperação vs pureza) aos outros métodos de extracção experimentados (especialmente quando a experimentação se fazia com amostras de ovário). A dissolução do referido resíduo foi otimizada com a agitação da mistura durante a noite. A eliminação de impurezas, sem comprometimento das recuperações, foi otimizada através da "lavagem" das mini-colunas com 5 ml de H₂O seguida de 5 ml de MeOH/H₂O 5%.

Esta técnica de extracção foi inicialmente desenvolvida, como já foi referido, com a hemolínfa e posteriormente testada com ovário. Com este tecido os resultados foram muito idênticos tendo-se porém, obtido ocasionalmente na ressuspensão final alguns precipitados ou depósitos na solução. Daí que a técnica tenha sido melhorada, com o objectivo de preservar a coluna do HPLC, filtrando a amostra, com filtros de nylon 66, antes da injeção da amostra.

Os resultados obtidos nas experiências de purificação da amostra concentrada numa pré-coluna de C18, colocada no injector, com diversos volumes de água, mostraram perdas significativas de várias hormonas em estudo, pelo que se concluiu pela melhor purificação possível antes da amostra ser injectada no HPLC e a substituição da pré-coluna por um "loop" de 100 µl.

3. SEPARAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO POR HPLC

Como foi referido em Material e Métodos, as recuperações das várias hormonas esteróides e ecdisteróides nos vários processos e condições experimentadas foram quantificadas pela área dos picos resultantes da separação por HPLC. Desta forma, paralelamente ao desenvolvimento do processo extractivo, também vários programas de HPLC foram aplicados ao longo do estudo. Além disso, a utilização de um sistema para a termostatização da temperatura (50°C) na coluna conduziu a um aumento da reprodutibilidade dos tempos de retenção dos vários padrões injectados (p. ex. 20 OH-Ecdisona $RT= 9.63\pm 0.2$ min; Ecdisona $RT= 18.86\pm 0.3$ min), permitindo a recuperação das várias hormonas no colector de fracções.

Vários eluentes (acetonitrilo/água e metanol/água) e programas de separação (isocráticos, em gradiente linear ou por “patamares”) assim como do colector de fracções, foram experimentados, conduzindo por um lado, aos necessários resultados das recuperações do processo de extracção em estudo, e por outro, ao próprio desenvolvimento do(s) programa(s) para a melhor separação e recuperação (no colector) das hormonas ecdisteróides e esteróides em estudo. Para a validação da técnica de extracção foram utilizados os programas cujos cromatogramas estão representados nas figuras 3.1. e 3.2.

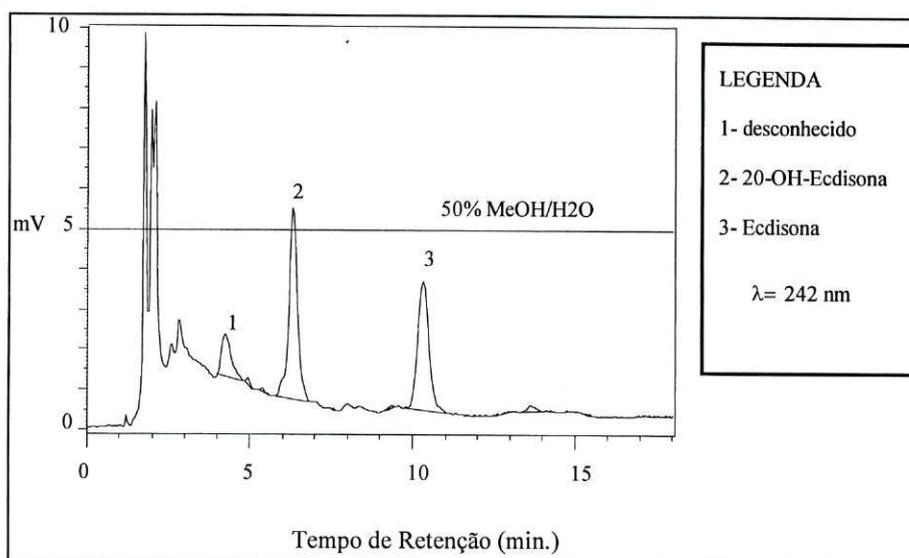


Figura 3.1. Cromatograma de separação de ecdisteróides por HPLC (coluna de fase reversa, RP-18, 250 mm×4 mm, sistema isocrático MeOH/H₂O 50% v/v)

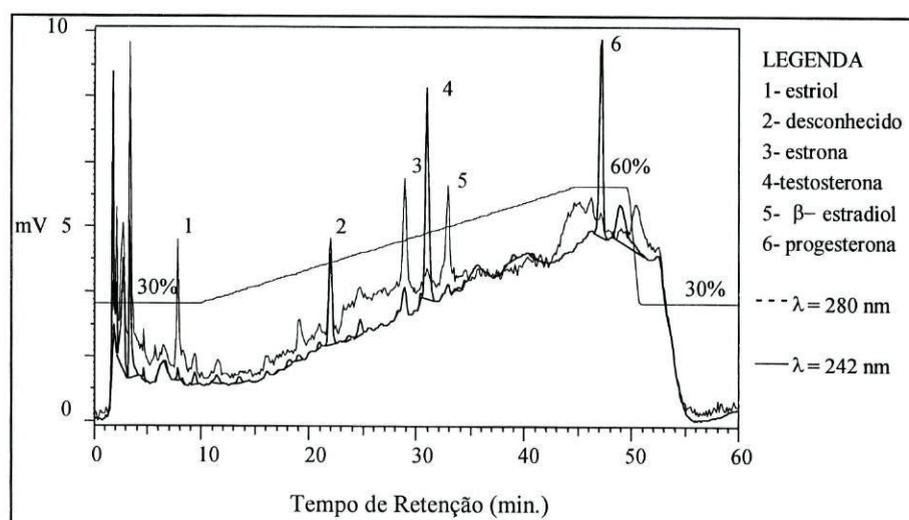


Figura 3.2. Cromatograma de separação de esteróides por HPLC (coluna de fase reversa, RP-18, 250 mm×4mm, gradiente de acetonitrilo/água 30-60%, v/v)

Os métodos de extracção e purificação seguidos da separação por HPLC das várias hormonas, descritos anteriormente permitiram calcular a percentagem de

recuperação das várias hormonas introduzidas no material biológico por comparação com iguais quantidades de padrões autênticos injectados, tendo sido obtidos valores superiores a 90%, confirmados posteriormente e de forma mais precisa, pela quantificação da radioactividade das duas hormonas marcadas (pág.18).

PROGRAMAS DO HPLC E DO COLETOR

Tendo como objectivo principal o estudo do papel de várias hormonas ecdisteróides (26-OH-Polipodina, 20,26-Ecdisona, 20-OH-Ecdisona, Ecdisona, 2-deoxi-20-OH-Ecdisona e Ponasterona) e da Progesterona na reprodução de crustáceos penaeidos (ver Introdução Geral), foram elaborados novos programas do HPLC para a sua separação e recolha num colector de fracções.

A separação das referidas hormonas é iniciada com um programa (denominado ECDIS) para a separação dos ecdisteróides que consiste num gradiente MeOH/H₂O 45 a 50% (v/v) (30 minutos cada), com um caudal de 0.8 ml/min. No colector de fracções foi introduzido um programa misto de “pico + tempo” com as seguintes características: 1) através do “modo pico”, recolhe hormonas previamente identificadas com padrões autênticos e 2) com o “modo tempo” no intervalo entre os picos, durante o qual foram colectadas fracções de 4 ml. Foram recolhidas, com este primeiro programa para separação dos ecdisteróides, um total 14 fracções.

A este programa está ligado automaticamente outro (denominado ESTE) que separa vários esteróides, sendo um programa isocrático de MeOH/H₂O a 80% (v/v), com um fluxo de 0.8 ml/min., durante 30 minutos ao longo dos quais foram recolhidas 8 fracções. Finalmente, este programa está ligado, também automaticamente, um outro (EST2) isocrático de MeOH/H₂O a 45% (v/v), com um fluxo de 0.8 ml/min., durante 10 minutos para estabilização da coluna, findo o qual automaticamente inicia novo ECDIS para injeção de nova amostra.

Desta forma são recolhidas um total de 22 fracções (14 de ecdisteróides e 8 de esteróides). Os cromatogramas das figuras 3.3. e 3.4., foram obtidos com estes programas após injeccção de uma mistura de padrões de 6 ecdisteróides e de Progesterona.

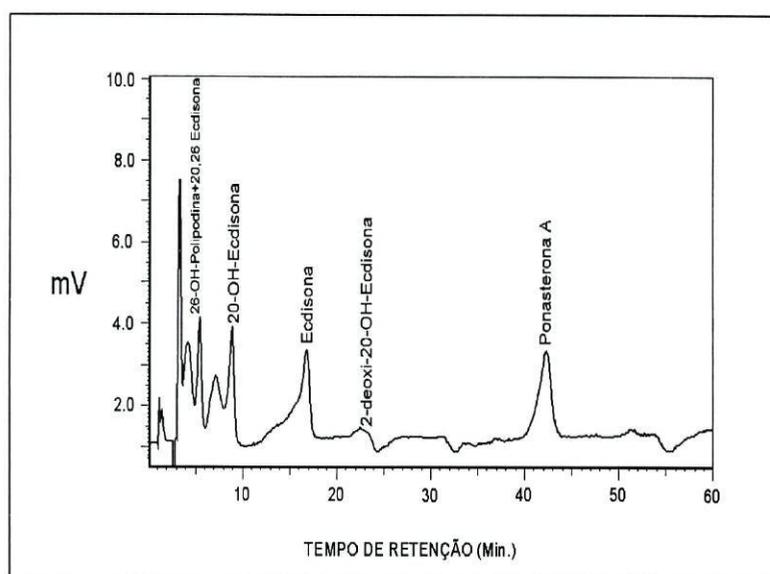


Figura 3.3. Cromatograma de separação de ecdisteróides por HPLC (coluna de fase reversa, RP-18, 250 mm×4mm, gradiente MeOH/H₂O 45-50% v/v; 0.8 ml/min. durante 60 minutos)

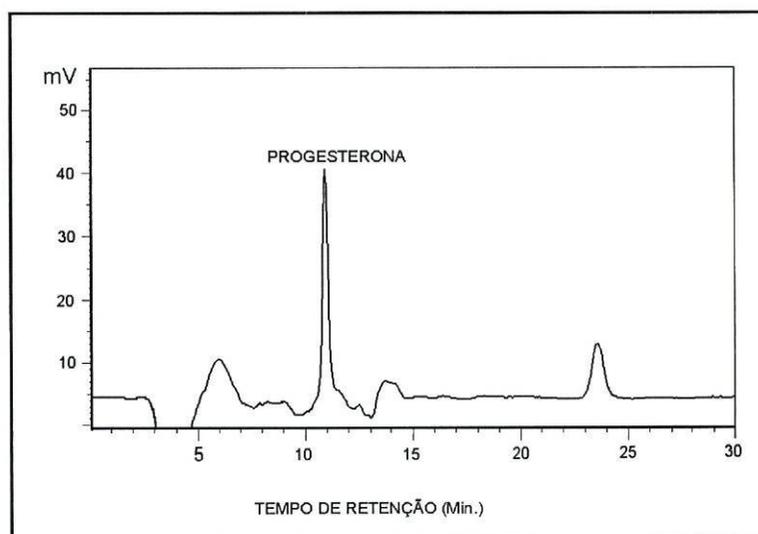


Figura 3.4. Cromatograma de separação de esteróides por HPLC (coluna de fase reversa, RP-18, 250 mm×4mm, sistema isocrático MeOH/H₂O 80%, v/v; 0.8 ml/min. durante 30 minutos)

B. Validação da técnica com hormonas marcadas radiativamente para estudo das perdas ao longo do processo de extracção e cálculo da eficiência e reprodutibilidade do processo

Com esta técnica de extracção e purificação (na hemolinfa) obtiveram-se recuperações finais de Progesterona de 94,2 % (com um desvio padrão de $\pm 12,4$ %, $n=3$) e de Ecdisona de 90,9 % (com um desvio padrão de $\pm 6,1$ %, $n=3$) (figura 3.5.).

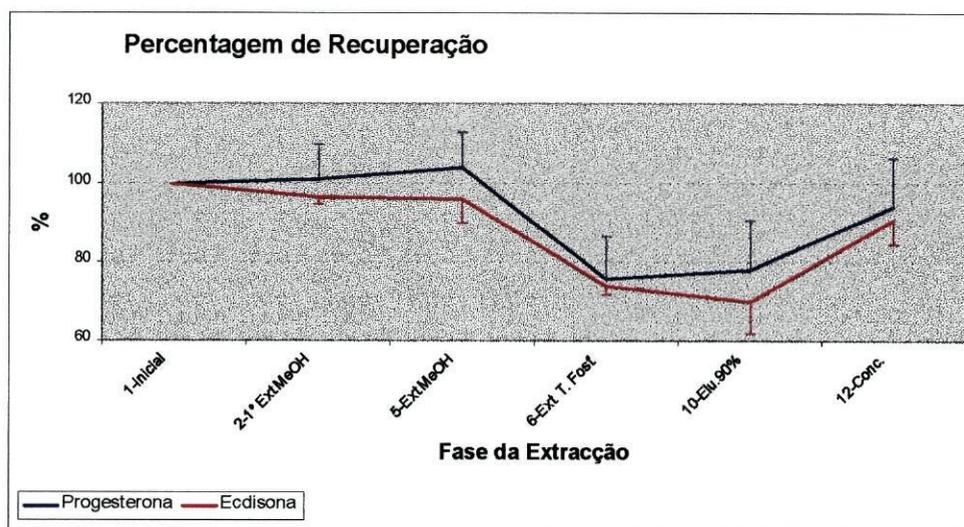


Figura 3.5. Representação gráfica da recuperação (em percentagem) das duas hormonas (Ecdisona e Progesterona) ao longo do processo extractivo.

Na Tabela 3.1. estão apresentados os resultados respeitantes aos níveis de radioactividade encontrados em várias alíquotas retiradas ao longo do processo extractivo na hemolinfa. Das 13 alíquotas retiradas a longo do processo, e apesar de terem todas sido objecto de leitura dos níveis de radioactividade nelas contidos (=quantidade de hormona marcada), apenas os valores de 6 são apresentados (quadro, gráficos e estatística) uma vez que nas restantes o seu valor, como era desejável, foi quase nulo (só seria elevado se nesses passos da técnica houvesse perdas significativas).

O valor inicial dos "teóricos" é a média de um elevado número de leituras de alíquotas (± 20) retiradas de uma amostra idêntica às utilizadas nas experiências A e B. Os restantes valores foram calculados admitindo um rendimento de 100%.

Os valores de radioactividade lidos na experiência C correspondem à mistura de iguais quantidades de Progesterona e Ecdisona marcadas radioactivamente de forma a poder ser comparada com as duas primeiras. As percentagens de recuperação foram calculadas relacionando os valores lidos com os teóricos, resultando na recuperação

final de 94.2% (SD=12.4) e 90.9% (SD=6.1) para a Progesterona e Ecdisona respectivamente.

Tabela 3.1. Quadro resumo dos níveis de radioactividade (cpm) na amostra ao longo do processo extractivo e respectivas percentagens de recuperação final em 5 experiências com 3 réplicas em cada fase do processo. As fases não representadas correspondem a níveis de radioactividade desprezáveis.

Alíquota	1	2	5	6	10	12	% REC.	
	Inicial	1º Ext.MeOH	Ext.MeOH	Ext. T. Fosf.	Elu.90%	Conc.	FINAL	MÉDIA±SD
PROGESTERONA								
Teóricos	742583	631196	536516	456039	387633	329488		
EXP.A1	790587	744342	650267	419887	376910	366760	104,6	
EXP.A2	914669	730918	637965	365369	316358	326719	80,5	
EXP.C	876053	737225	647384	409375	351924	379508	97,6	94,2 ± 12,4
ECDISONA								
Teóricos	822958	699514	594587	505399	429589	365151		
EXP.B1	896032	728880	622085	396035	335985	340811	85,7	
EXP.B2	857800	697136	558618	390261	274001	339435	89,2	
EXP.C	876053	737225	647384	409375	351924	379508	97,6	90,9 ± 6,1

As figuras 3.6. e 3.7. representam as rectas de regressão linear para cada uma das experiências efectuadas e dos valores teóricos. A média dos valores obtidos das 3 réplicas, em cada uma das fases do processo extractivo, nas três experiências efectuadas para cada hormona, foi comparada aplicando o teste estatístico ANOVA, tendo sido demonstrada não existir diferenças significativas entre as três experiências efectuadas para cada hormona ($0.01 < P < 0.05$ na alíquota 6 - fase de extracção com tampão fosfato, e $P > 0.05$ para as restantes fases do processo).

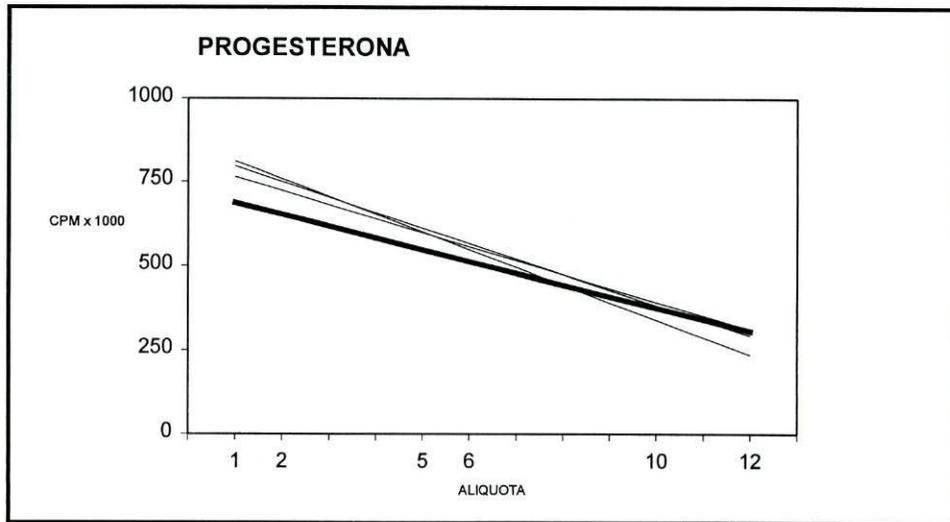


Figura 3.6. Regressão linear dos valores teóricos (linha a cheio) e experiências A1, A2 e C, com [1,2,6,7-³H(N)]-Progesterona. Em abcissas são apresentadas as alíquotas retiradas ao longo do processo extractivo na proporção de 5% .

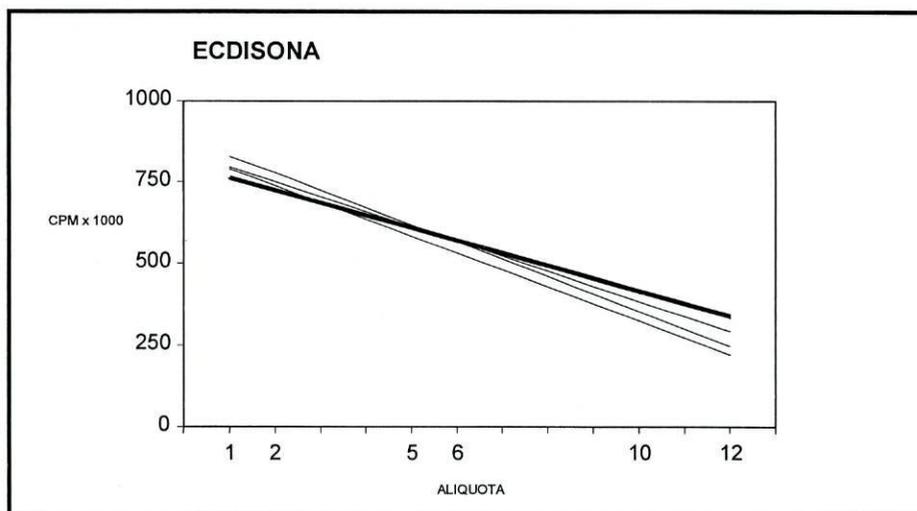


Figura 3.7. Regressão linear dos valores teóricos (linha a cheio) e das experiências B1, B2 e C, com α -[23,24-³H(N)]-Ecdisona.

Verificada a não existência de diferenças significativas entre as três experiências para cada hormona (inclinações e ordenadas na origem das rectas sem diferença significativa, $P < 0,001$), o conjunto das três experiências para cada hormona pode ser representada por uma recta de regressão (figuras 3.8. e 3.9.). A inclinação desta recta corresponde praticamente às perdas das hormonas (CPMs) nas várias alíquotas retiradas (na proporção de 5% do volume de cada fase do processo extractivo - de 180 μ l a 5 ml).

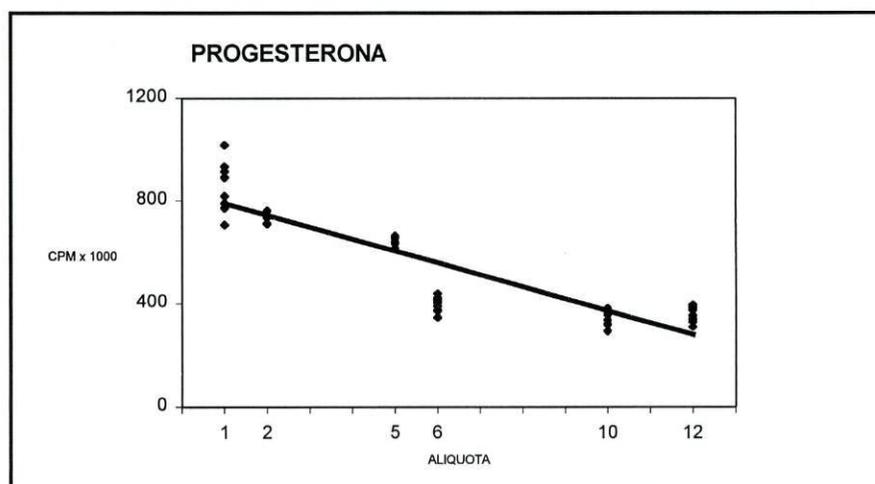


Figura3.8.- Regressão linear ($R^2 = 0,81$; $P < 0,001$) dos valores das experiências A1, A2 e C ($[1,2,6,7-^3H(N)]$ -Progesterona).

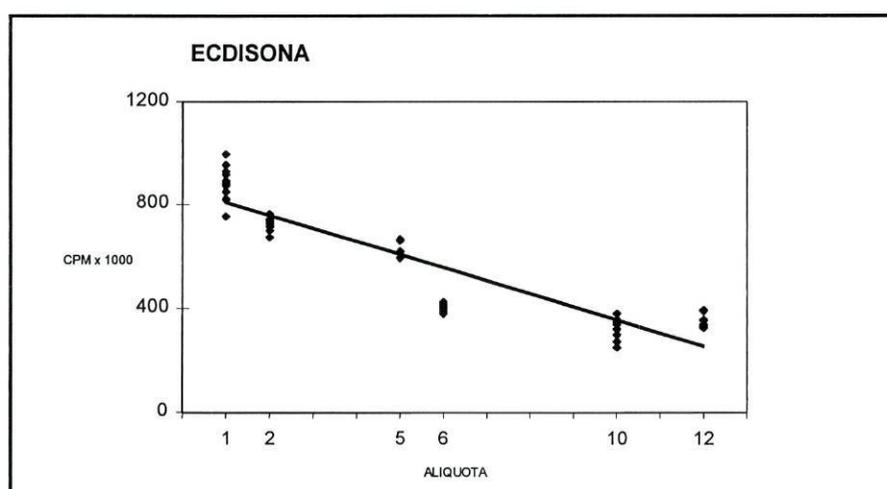


Figura3.9. Regressão linear ($R^2 = 0,93$; $P < 0,001$) dos valores das experiências B1, B2 e C (α - $[23,24-^3H(N)]$ -Ecdisona).

Finalmente a comparação dos resultados obtidos com os valores teóricos nas três repetições da extracção, por análise de covariância, demonstra a reprodutibilidade da técnica para a extracção de Progesterona. A probabilidade de haver covariância entre o tratamento (execução da técnica) e a variável dependente (quantidade de hormona recuperada) foi de $p=0.370$ ($n=18$, $F=1.080$, $R^2=0.937$), sendo plausível assumir que os declives são homogêneos. Em relação à ordenada na origem o tratamento (3 ensaios da técnica) ajustado à covariante (valores teóricos) não é significativo ($p=0.881$) (figura 3.10.).

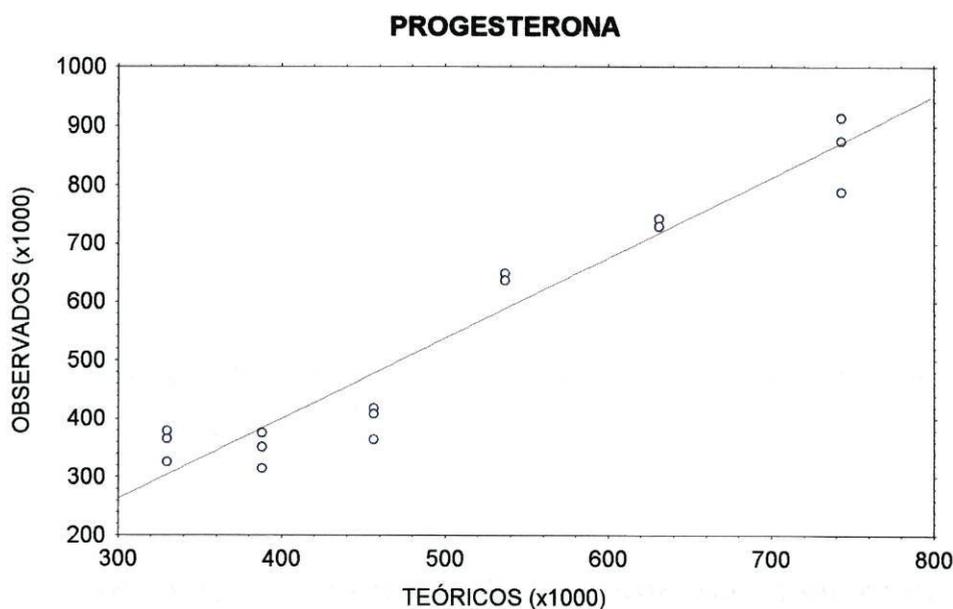


Figura 3.10. Regressão linear dos valores observados e teóricos das experiências A1, A2 e C ($a= -133277$; $b= 1.375$; $R^2=0.924$; $n=18$)

De forma idêntica para a ecdisona o mesmo estudo estatístico de análise de covariância revela a elevada semelhança ($R^2=0.949$) entre as três experiências (declive: $F=0.107$ e $p=0.899$) e finalmente uma elevada correlação entre os valores observados e os calculados ($R^2=0.939$) (figura 3.11.).

A técnica foi igualmente testada para a extracção de ovário liofilizado (Experiência D, pág. 11), tendo sido obtida a recuperação final de 94.3%.

Foram ainda calculadas as perdas na filtração (em filtros de nylon 66), injeção no HPLC e posterior recolha no colector, tendo sido verificado serem no global inferiores a 10 %.

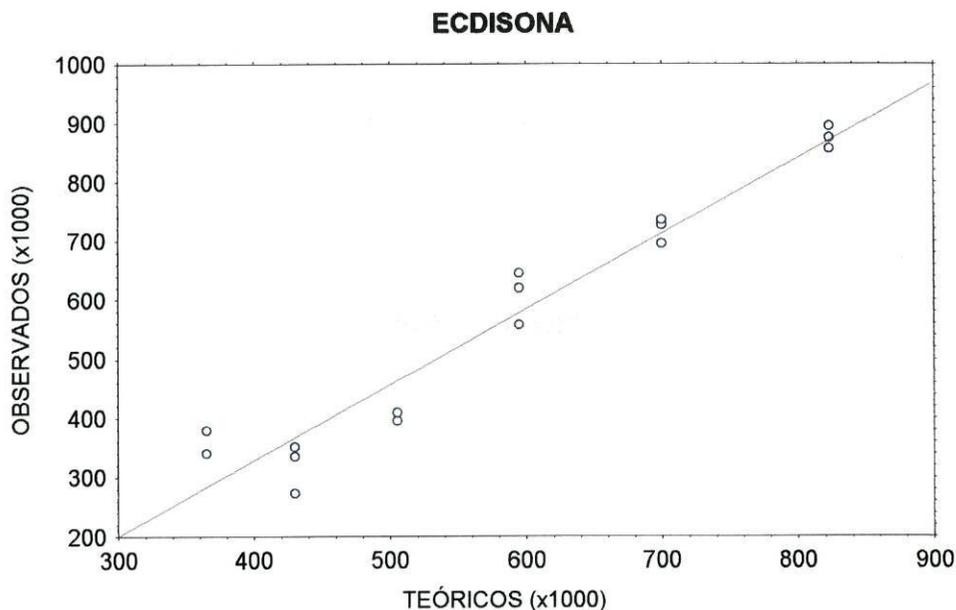


Figura 3.11. Regressão linear dos valores observados e teóricos das experiências B1, B2 e C ($a=-182747$; $b= 1.281$; $R^2=0.939$; $n=18$)

C. Tratamento da amostra para identificação de alguns esteróides por Espectrometria de Massa

Neste método de extracção e purificação dos esteróides existentes no ovário foi obtida uma recuperação de $\pm 80\%$, por comparação das áreas dos cromatogramas, resultantes da injeção da mistura de padrões e do extracto da amostra com iguais quantidades da mesma mistura.

Foi possível, através de Espectrometria de Massa, detectar a presença de Testosterona, Pregnenolona, 17 α -Hidroxiprogesterona e Progesterona no ovário de *Panaeus japonicus* (ver capítulo 5).

Discussão

A extracção de esteróides, normalmente realizada em tecidos frescos ou congelados, pode ser realizada em tecidos liofilizados (Reis-Henriques *et al.*, 1990; Dunstan, *et al.*, 1993), sem perdas significativas e com óbvias vantagens: por um lado a menor quantidade de tecido processado, pois é reduzido em cerca de 30%, e por outro lado a ausência de água, a qual conduz a um extracto metanólico de fácil evaporação. O processo de liofilização, evaporação por vácuo ou a baixa pressão, embora normalmente não utilizado nos tecidos, é frequentemente utilizado para concentração ou evaporação dos extractos, antes da purificação ou da quantificação por RIA (Young *et al.*, 1992; Wilder *et al.*, 1990, 91; Lee *et al.*, 1990; Fairs *et al.*, 1990, entre outros).

Para a extracção destas hormonas (extracto lipídico), quer na hemolinfa quer no ovário, foi escolhido o metanol visto ser o mais utilizado para obtenção de uma só fase orgânica (p. ex.: Reis-Henriques *et al.*, 1990; Chan, 1995; Garcia *et al.*, 1995; Okumura *et al.*, 1992) embora o etanol também seja frequentemente utilizado (p. ex.: Swevers *et al.*, 1991, 92; Young *et al.*, 1993a, b; Bradbrook *et al.*, 1990), hexano-propano-2-ol (Fairs *et al.*, 1990). Também comuns são a utilização de misturas para formação de uma fase orgânica/ fase aquosa como clorofórmio/metanol (Lee *et al.*, 1990), éter etílico e água (do próprio tecido) (Sasser e Singhas, 1992), tampão fosfato/ cloreto de metilo (Hines *et al.*, 1992), misturas estas que realizam simultaneamente uma extracção líquido-líquido, constituindo um processo de purificação também por nós experimentado (já no extracto metanólico), mas com fracos resultados.

O processo de evaporação ou concentração de extractos mais utilizado é a corrente de azoto (com ou sem aquecimento dos tubos). Optamos também por este processo uma vez que o rotavapor, utilizado por alguns autores (Bradbrook *et al.*, 1990; Chan, 1995), constitui um processo mais demorado devido ao elevado número de amostras.

Para a purificação do extracto são normalmente utilizadas duas técnicas (isolada ou conjuntamente): extracção líquido-líquido (p. ex.: Lee *et al.*, 1990; Wilder *et al.*, 1991, 92; Hines *et al.*, 1992; Sasser e Singhas, 1992) e em fase sólida através de mini-colunas de fase reversa C18, Sep-Paks ou RP-18 (p. ex.: Lee *et al.*, 1990; Young *et al.*, 1993a,b; Garcia *et al.*, 1995; Chan, 1995; Summavielle *et al.*, 1995; Fairs *et al.*, 1990). Como coluna C18, pode ser utilizada para separação de vários esteróides e ecdisteróides, com a utilização de misturas de solventes de diferente polaridade (Bradbrook *et al.*, 1990) ou apenas para purificação do conjunto de esteróides e/ou ecdisteróides (Fairs *et al.*, 1990; Lee *et al.*, 1990). A utilização da extracção em fase sólida permitiu-nos uma boa purificação dos extractos, importante a nível do HPLC, sem contudo sofrer grandes perdas no conjunto das hormonas esteróides e ecdisteróides como pode acontecer numa utilização mais diferenciada (Bradbrook *et al.*, 1990).

A utilização de métodos de quantificação como o RIA (Swevers *et al.*, 1992; Okumura *et al.*, 1993; Chan, 1995), em extractos purificados, pode resultar em reacções cruzadas, pelo que alguns autores validam o método (Wilder *et al.*, 1990; Bradbrook *et al.*, 1990; Sasser e Singhas, 1992; Hines *et al.*, 1992). A separação por HPLC com recolha dos picos das diferentes hormonas pode obviar este problema. A optimização de dois programas ligados para a separação de ecdisteróides e de esteróides, com a programação do colector de forma a recolher os vários picos identificados com padrões autênticos, permite uma posterior quantificação dos vários ecdisteróides presentes nas amostras (por EIA) e de esteróides (no presente trabalho apenas é quantificada a Progesterona). A quantificação por HPLC será possível no caso de utilização de maior

quantidades de amostra recorrendo a um “pool” de hemolinfa ou ovário de vários animais (Summavielle *et al.*, 1995).

Dos trabalhos revistos dos vários grupos que investigam estes dois tipos de hormonas apenas Bradbrook *et al.*, (1990) utiliza uma técnica de extracção e purificação para obtenção de ambos, na mesma amostra. Em relação à técnica descrita por aqueles autores, o desenvolvimento do método por nós apresentado orientou-se no sentido da resolução de duas deficiências identificadas nesse método: por um lado a complexidade de passos com a utilização ao longo do processo de 4 colunas sep-pak (com o custo inerente) e o baixo rendimento apresentado (Progesterona-53,2%±4,7 e Ecdisona 55,9%±4,9). De facto, estas baixas recuperações têm um reflexo enorme quanto à quantidade de material biológico necessário para os doseamentos posteriores das hormonas (RIA ou EIA). Embora a maioria dos autores não especifique a recuperação final do método e nas condições em que o utiliza, o certo é que a maioria utiliza alíquotas de vários animais, órgãos, hemolinfa (p. ex.: Young *et al.*, 1993a,b - 3 a 8 ovários e 3 ml de hemolinfa de vários; Chan, 1995 - “pool” de vários ovários; Summavielle *et al.*, 1995 - “pool” de hemolinfa de vários animais). Uma elevada recuperação pode permitir o tratamento de amostras individualizadas e assim uma maior aproximação à variabilidade individual e do processo em estudo (no nosso caso a reprodução). O método por nós desenvolvido permite, através de uma recuperação quase total, a utilização de pequenas quantidades de amostra biológica e assim a obtenção de resultados individuais (excepto em casos como p. ex. quando o ovário está em previtelogénese é quase inexistente!). A recuperação (assim como a sua reprodutibilidade) foi estudada passo a passo ao longo da extracção e purificação até à recolha no colector de fracções.

Os resultados obtidos com o teste estatístico ANOVA, permitem-nos concluir não existirem diferenças significativas entre as médias obtidas para os vários passos das cinco experiências realizadas ($P > 0,05$), pelo que o método apresenta um elevado nível de reprodutibilidade. Assim, não havendo diferenças significativas entre as três

experiências ($P>0,05$), foi traçada a recta de regressão com todos os valores lidos para cada uma das hormonas estudadas. De notar que o declive desta recta traduz praticamente o efeito das várias alíquotas retiradas pois apenas a diferença para o declive da recta de regressão dos valores calculados (100% de recuperação) representa as perdas ao longo do processo extractivo.

O rendimento final obtido foi na ordem dos 94,23 % (SD=12,38) para a progesterona e de 90,85 % (SD=6,13) para a ecdisona (quadro 3.1. e figura 3.5.).

Comparativamente a outros resultados descritos na literatura (Bradbrook *et al.*, 1990; Young *et al.*, 1993a,b), este método para além da maior facilidade e rapidez de execução, apresenta níveis de reprodutibilidade e eficiência elevados.

Os resultados obtidos permitem-nos assim concluir que o método extractivo descrito é de fácil e rápida execução, apresentando níveis de reprodutibilidade elevados e rendimentos sempre acima de 90%, o que permite a utilização de quantidades de material biológico conducentes a resultados individuais. Por fim o custo de cada análise não é elevado, uma vez que as mini-colunas de fase reversa (RP-18- 400 mg, Merck), podem ser facilmente regeneradas.

Perfil de Ecdisteróides ao Longo das Fases de Desenvolvimento do Ovário das Espécies Penaeus japonicus e P. kerathurus.

Introdução

A hormona da muda, a ecdisona (2 β , 3 β , 14 β , 22R, 25-pentahidroxi- 5 β -coles-7-em-6-ona, também conhecida como α -ecdisona), tem origem numa glândula endócrina ectodérmica (não-neuronal), o órgão Y. Este órgão endócrino par, está situado na região cefálica dos Malacostraca (nos crustáceos inferiores como os Entomostraca estão ausentes) (ver Introdução Geral). Nas suas células, de um só tipo (Fingerman, 1987, 1992), estão ausentes os produtos de secreção (normalmente libertam os produtos à medida que os sintetizam sem os armazenar), à semelhança do que se passa nas células secretoras de esteróides dos mamíferos. No entanto, as células do órgão Y apresentam alterações ao longo do ciclo da muda: aumento do volume do núcleo e da actividade mitótica (Bressac, 1988b), assim como variações do tamanho das células, que apresentam o seu menor tamanho durante a intermuda, atingindo cerca do dobro no fim da pré-muda, acompanhadas de alterações das dimensões das mitocôndrias, que aumentam cerca de 15 vezes na intermuda e início de pré-muda (Fingerman, 1992). No fim da pré-muda são observados, no espaço entre as células e a membrana basal, grupos de vesículas derivadas provavelmente do retículo endoplasmático, e cujos grânulos secretados poderão constituir a hormona da muda, que irá iniciar o processo que conduz à libertação da carapaça (revisto por Adiyodi e Adiyodi, 1970; Fingerman, 1987, 1992).

Três diferentes mecanismos de secreção dos ecdisteróides têm sido propostos: 1. Simples difusão através da membrana, 2. Exocitose dos grânulos de secreção e 3. Difusão facilitada ou co-transporte.

A entrada dos ecdisteróides nas células-alvo é, pelo contrário, um processo que envolve energia (Na⁺/K⁺-ATPase), sugerindo um mecanismo de co-transporte idêntico ao utilizado para a glicose ou aminoácidos (Lachaise *et al.*, 1993).

A ultraestrutura do órgão Y, idêntica à glândula protorácica dos insectos, é sugestiva de um órgão responsável pela formação de esteróides a partir de um precursor como o colesterol (Adiyodi e Adiyodi, 1970; Bressac, 1988b; Fingerman,

1987). Como no caso dos insectos, as vias metabólicas de biosíntese dos ecdisteróides, esteróides da família denominada esteróides polihidroxiados C27, são na sua maioria desconhecidas, excepto para o primeiro passo (conversão do colesterol a 7-dihidrocolesterol) e os três últimos (hidroxilações nas posições 25, 22 e 2) (Lachaise *et al.*, 1993).

O órgão Y secreta não só a ecdisona (E) mas também 25-deoxi-ecdisona (25dE) e 3-dihidro-ecdisona (3DE) (Lachaise *et al.*, 1993). A hormona da muda (MH), ecdisona, é hidroxilada na hemolinfa para se tornar na hormona activa 20-OH-ecdisona (também denominada β -ecdisona, ecdisterona ou crustecdisona). Assim, este órgão tem como função principal o controlo da muda.

Foi também descrito um efeito estimulador da secreção de ecdisona, pela molécula terpenóide produzida no órgão mandibular (MO) e idêntica à hormona juvenil dos insectos, o farnezoato de metilo (MF) (Chang *et al.*, 1993).

O processo da muda é inibido por um neuropéptido - a hormona inibidora da muda (MIH) (ver Introdução Geral), produzido nos neurónios do órgão X e acumulado na glândula do seio, ambos situados nos pedúnculos oculares. A acção da MIH pode ser directa, inibindo a secreção de MH pelo órgão Y, ou indirecta, agindo antagonicamente na epiderme e regulando a resposta do tecido à hormona da muda (Fingerman, 1987). A acção directa da MIH no órgão Y traduz-se no aumento do AMPc, o qual inibe quer a entrada quer a utilização do colesterol, assim como inibe a síntese proteica. O cálcio tem um importante papel regulador, activando a destruição enzimática do AMPc e estimulando assim a síntese e secreção de ecdisteróides (Spaziani *et al.*, 1994). Para além destes dois segundos mensageiros (AMPc e cálcio), que actuam como mediadores da resposta celular a sinais extracelulares, foi encontrado um terceiro, independente dos dois anteriores, a PKC (quinase da proteína C), que estimula a síntese proteica e a esteroidogénese (Mattson, 1986).

Recentemente foi posto em evidência o efeito inibidor da biosíntese de ecdisteróides pelo ácido xantorénico (XA), molécula isolada nos pedúnculos oculares.

A sua acção traduz-se através da inibição directa da citocromo P-450 mono-oxigenase (revisto por Lachaise *et al.*, 1993). Finalmente, os ecdisteróides inibem a libertação (não a síntese) de MIH (Mattson, 1986), actuando directamente nas células neurosecretoras do órgão X ou através da inibição do controlo serotoninérgico de libertação da MIH (Spaziani *et al.*, 1994).

O perfil típico da variação dos níveis de ecdisteróides circulantes é de uma subida gradual ao longo do ciclo da muda atingindo um máximo no final na pré-muda (fases D₂-D₃), para logo baixar antes da exuviação (Baldaia *et al.*, 1984). Está provado que uma subida inicial dos ecdisteróides circulantes e uma descida rápida e coordenada no final da pré-muda é absolutamente necessário para uma exuviação bem sucedida (Chang *et al.*, 1993). Da forma idêntica, para a espécie *Siriella armata* (Cuzin-Roudy e Saleuddin, 1989), são necessários baixos níveis de ecdisteróides para uma exuviação normal.

Enquanto nos vertebrados os esteróides circulantes se encontram ligados a proteínas, não são conhecidos para os crustáceos proteínas específicas de transporte dos ecdisteróides (Hilde *et al.*, 1988), circulando pelo menos 95% destes na forma livre (Fingerman, 1987). As variações dos níveis circulantes da hormona activa parecem ser devidas a alterações na taxa de síntese e secreção de ecdisona pelo órgão Y, mais do que pela taxa de hidroxilação da ecdisona a 20-OH-ecdisona, ou da taxa de degradação e depuração (“clearance”) da hormona na hemolinfa (Chang, 1991).

No entanto, o papel dos ecdisteróides parece não se esgotar no processo da muda, relacionando-se com a reprodução, ainda que de forma pouco clara. O crescimento e a reprodução constituem dois processos inseparáveis e integrados, logo necessitando de um mecanismo de controlo estreitamente interligado. Assim, a muda é desencadeada quando os níveis das hormonas MIH e GSH são baixos e os das hormonas GIH e MH são elevados. Pelo contrário, o processo reprodutivo é iniciado quando os níveis das hormonas MIH e GSH são elevados e os das hormonas GIH e MH são baixos. Nos animais ablacionados (corte de 1 ou 2 pedúnculos oculares), a muda

acontece se a actividade da hormona GSH estiver suprimida pelo sistema nervoso central (SNC) ou/e pela MH, e a reprodução pode ocorrer se a GSH, por estimulação do SNC, suprimir a acção da MH (Adiyodi e Adiyodi, 1970).

Na reprodução, e mais concretamente na ovogénese, os ecdisteróides parecem ser necessários, para a multiplicação mitótica nas gónadas, particularmente nas fases pré-pubertais (Adiyodi e Adiyodi, 1970), ainda que aos níveis envolvidos sejam diminutos (Meusy e Payen, 1988).

Assim, os ecdisteróides parecem ser essenciais para as fases iniciais do desenvolvimento da gónada, especificamente nas mitoses das ovogónias e crescimento previtelogénico (Meusy e Payen, 1988). No entanto, o efeito destas hormonas sobre a gónada poderá ser apenas parte de um efeito mais geral exercido em todos os tecidos organizados (Adiyodi e Adiyodi, 1970).

Tem sido também sugerido, que os ecdisteróides circulantes possam ter um papel na regeneração e na maturação da gónada (Adiyodi e Adiyodi, 1970), assim como de estimulação do desenvolvimento do ovário, da síntese proteica e da produção de vitelogenina (Fingerman, 1987; Van Herp e Payen, 1991; Hasegawa *et al.*, 1993). A síntese de vitelogenina é iniciada com uma taxa baixa de 20-OH-ecdisona e parece ser mantida também com um nível baixo desta hormona (Charniaux-Cotton, 1980; Payen, 1980). Assim, a síntese de vitelogenina e a sua captura pelo ovócito parecem ter correlação com os níveis circulantes de ecdisteróides (Van Herp e Payen, 1991).

Continua por definir a relação entre a hormona activa 20-OH-ecdisona e a vitelogénese, não havendo na actualidade provas da sua acção directa na síntese de vitelogenina ou na vitelogénese. Por outro lado, vários autores mostraram, que não é possível a vitelogénese em animais aos quais foi retirado os órgãos Y (produtores de ecdisteróides). Também continuam por esclarecer a função e destino dos ecdisteróides (especialmente a ponasterona A) acumulados no ovário no fim da vitelogénese (Meusy e Payen, 1988). A sua utilização pelos nauplius, para coordenação de vários processos do seu desenvolvimento, parece ser uma hipótese plausível (Chang, 1991).

A evidência mais forte de uma função directa dos ecdisteróides na reprodução, parece ter sido encontrada como o estímulo exacto para a reiniciação meiótica na maturação do ovócito (Lanot e Clédon, 1989).

O objectivo deste trabalho foi determinar a variação dos ecdisteróides totais e, pela sua importância, de alguns ecdisteróides previamente identificados e isolados (p. ex. ecdisona, 20-OH-ecdisona, ponasterona), na hemolinfa e no ovário, ao longo do desenvolvimento do ovário durante a época reprodutiva, no sentido de a relacionar com as diferentes fases vitelogénicas determinadas pelo aspecto histológico do ovário.

Material e Métodos

Quantificação de ecdisteróides por ELISA (EIA)

A técnica de EIA utilizada (Porcheron *et al.*, 1989) tem como marcador a enzima acetilcolinesterase ligada covalentemente à derivada 20-hidroxi-ecdisona-6-carboximetoxima. A reacção imunológica tem lugar numa placa de microtitulação de 96 poços (Nunc-Immuno Plate MaxiSorp F96) pré-revestida com o anticorpo secundário (IgG (H+L) de cabra anti-coelho, (Kirkegaard & Perry Laboratories Inc.).

O doseamento foi realizado num volume total de 150 μ l, sendo 50 μ l de ecdisteróide-padrão ou extracto biológico, 50 μ l do marcador enzimático diluído (1/100) e 50 μ l do antisoro específico diluído (1/10000). Este antisoro é altamente específico para a ecdisona e 20-OH-ecdisona. As reacções cruzadas com outros ecdisteróides estão especificadas na tabela I.

O marcador enzimático (G4-AChE) e o antisoro específico (AS4919) utilizados nas nossas experiências foram generosamente cedidos pelo Dr. P. Porcheron (ENS, Paris). A actividade enzimática foi determinada pela adição do reagente de Ellman a cada poço e a intensidade da cor amarela resultante medida 4-5 horas depois a 405 nm num leitor de placas ELISA (Micro Plate Reader, Dupond, MRP-A4).

Tabela I. Reações cruzadas do antisoro específico para a ecdisona e 20-OH-ecdisona com outros ecdisteróides (Porcheron *et al.*, 1989).

ECDISTERÓIDE	Reacção Cruzada	ECDISTERÓIDE	Reacção Cruzada
20-OH-Ecdisona	100	Podecdisona C	4,5
Ecdisona	100	Makisterona A	4
2-deoxi-20-OH-Ecdisona	88	26-OH-Ecdisona	1,4
Polipodina B	70	Munisterona A	1,2
2-deoxi-Ecdisona	63	Kaladasterona	1
Ponasterona A	43	22-Epi-Ecdisona	< 0,1
Ciasterona	5	Posterona	< 0,1

As ligações não específicas (NSB) foram determinadas usando uma mistura de incubação na qual o anticorpo primário e o ecdisteróide-padrão foram substituídos por 100 µl de tampão fosfato EIA. A actividade enzimática da ligação do marcador na ausência de competidor (B_0) foi determinada em poços contendo 50 µl de tampão no lugar do ecdisteróide-padrão. Todas as medições para NSB, padrões e amostras foram executadas em duplicado e a de B_0 em quadruplicado.

Os resultados são expressos como $B/B_0 \times 100$ em função do logaritmo da dose. B representa a absorvância medida na fracção ligada na presença de competidor. Para o ajuste da curva-padrão foi utilizada a transformação linear log-logit.

EIA - Protocolo

(1º DIA)

1. Lavar a placa com tampão lavagem (ciclo de 5 a 6 lavagens).

2. Colocar tampão EIA nos poços 2C e D - 100 μ l
2E,F,G,H - 50 μ l
3. Nas colunas 3 e 4 - curva padrão: de 1000 fmol a 8 fmol, em duplicado - 50 μ l
4. Colocar as amostras nas colunas seguintes (em duplicado) - 50 μ l
5. A partir do poço 2C, colocar em cada poço 50 μ l do marcador enzimático (G4.O).
6. A partir do poço 2E, colocar em cada poço 50 μ l do antisoro (49.19).
7. Incubação: 3 horas no agitador de placas, seguido de 1 noite no frigorífico (proteger a placa).

(2º DIA)

8. Lavagem da placa com tampão lavagem.
9. Colocar nos poços 2A e 2B, 5 μ l do marcador usado no dia anterior, diluído 100x.
10. Colocar 200 μ l do reagente d' ELLMAN em TODOS os poços.
11. Colocar a placa (tapada com papel de alumínio) no agitador de placas. Ler ao fim de cerca de 2 horas.

EIA - "COATING"

Protocolo para 30 placas

(1º DIA)

1. Marcar as placas com o dia do "coating".
2. Juntar a 570 ml de água tridestilada e filtrada, 30 ml de tampão fosfato 1M (com azide) e 750 μ l de anticorpo de carneiro (3/4 do frasco de 1ml que pode estar congelado). Desta solução colocar 200 μ l (com pipeta multicanal) em cada poço.
3. Deixar uma noite à temperatura ambiente (guardar numa caixa para evitar poeiras).

(2º DIA)

4. Colocar 100 µl de tampão-Coating em cada poço (com pipeta multicanal).
5. Tapar as placas com folhas adesivas para placas ELISA.
6. Guardar as placas no frigorífico.

EIA

REAGENTES/SOLUÇÕES

1. Tampão fosfato 1M (para 1 litro)

139.34 g (PO₄HK₂)
 27.22 g (PO₄H₂ K)
 0.1 g Azide Na (NaN₃)

1 Litro H₂O Dest. Ajustar pH= 7.4 (conservar no frigorífico)

2. Tampão Coating (para 40 placas)

45 ml Tampão fosfato 1M
 45 mg (NaN₃)
 4.05 g NaCl
 0.167 g EDTA diNa
 1.35 g BSA

450 ml H₂O Dest. (conservar no frigorífico)

3. Tampão EIA (para 1 Litro)

100 ml Tampão fosfato 1M
 0.1 g Azide Na (NaN₃)
 9 g NaCl
 0.37 g EDTA diNa
 1 g BSA

1 Litro H₂O Dest. (conservar no frigorífico)

4. Tampão (fosfato) Lavagem (para 1/2 litro)

5 ml Tampão fosfato 1M
 250 µl Tween 20

1/2 Litro H₂O Dest. (conservar no frigorífico)

5. Antisoro 49.19 (conservar no congelador a -20°C ou no frigorífico).
- Juntar 5 ml de Tampão EIA para ficar com uma diluição de 1/100000.

6. Anticorpos de carneiro (para o "Coating" do 1º dia)
- Rehidratar com 1 ml de tampão fosfato 0.05 M. Pode ser congelado a seguir. Para 30 placas são necessário 750 μl .

7. Reactivo de ELLMAN

Procedimento para 40 tubos: ao abrigo de luz forte juntar a 10 ml de tampão fosfato 1 M, 200mg de iodeto de acetiltiocolina e 215 mg de ácido 5-5' ditiobis-2-nitrobenzoico. Dissolver e distribuir 250 μl por tubo e congelar a -20°C .

Foram realizados, através da técnica de EIA exposta, dois tipos de doseamentos, a que corresponderão duas diferentes alíquotas resultantes da extracção e purificação quer do ovário quer da hemolinfa (ver Cap. 3):

1. Ecdisteróides Totais:

Dos 150 μl de MeOH/H₂O (90%) da ressuspensão final (ver ponto 10 da Técnica Final no Cap.3), foram retiradas 3 alíquotas. Uma delas de 20 μl foi evaporada e no momento quantificar os ecdisteróides totais por EIA, foi ressuspendida em 240 μl de tampão de EIA.

2. Doseamento de vários ecdisteróides (entre os quais 5 identificados por co-eluição com padrões autênticos):

Outra das 3 referidas alíquotas, de 60 μl foi evaporada e no momento de injectar no HPLC foi ressuspendida em 60 μl de MeOH/H₂O (90%) e daqui injectados 40 μl . Um programa (denominado ECDIS) faz a separação dos ecdisteróides, e um programa no colector de fracções que permite a recolha de 14 fracções de ecdisteróides. Este programa consiste num gradiente metanol/água 45/55 a 50/50 (v/v) (30 minutos cada), com um caudal de 0.8 ml/min. Um programa do tipo "peak+time" foi utilizado no

colector de fracções o que permitiu 1) através do “modo pico”, recolher hormonas previamente identificadas com padrões autênticos e 2) com o “modo tempo” no intervalo entre os picos, durante o qual foram colectadas fracções de 4 ml. Foram recolhidas, com este primeiro programa para separação dos ecdisteróides, um total 14 fracções. Porém, foram utilizados inicialmente programas muito semelhantes (no HPLC e no colector de fracções) para a análise do ovário da espécie *P. japonicus*, de forma que os resultados para esta espécie correspondem a 16 fracções (e não 14). Foi, no entanto, estabelecida a respectiva correspondência relativamente às principais fracções, isto é, às cinco fracções identificadas por co-eluição com padrões autênticos, apresentada no quadro:

Hormona	16 FRACÇÕES		14 FRACÇÕES	
	Fracção	RT (min.)	Fracção	RT (min.)
26-OH-Polipodina+20,26 Ecdisona	F1	5.72	F1	4,74
20-OH- Ecdisona	F3	9.63	F2	8,40
Ecdisona	F6	18.86	F4	15,5
2- deoxi- 20-OH- Ecdisona	F8	26.43	F6	22,0
Ponasterona A	F13	46.61	F10	40,5

Para além dos ecdisteróides de reconhecida importância fisiológica, ecdisona, 20-OH-ecdisona e da ponasterona A, os restantes padrões foram utilizados apenas como referência relativamente às suas características cromatográficas (polaridade). As hormonas 26-OH-polipodina e a 20,26 ecdisona sendo duas hormonas distintas apenas são separadas cromatograficamente em fase normal, co-migrando no sistema, por nós utilizado, de fase reversa.

Resultados

Ecdisteróides Totais

P. japonicus

Os níveis de ecdisteróides totais no ovário da espécie *P. japonicus* no início do seu desenvolvimento, situam-se na ordem dos 250 ng/g de peso seco (n=6) (figura 4.1.).

Este valor mostra uma tendência para uma ligeira descida nas fases seguintes (II e III) sendo atingido o seu mínimo no final da vitelogénese (fase IV) com o valor de 115 ng/g (n=2). Desta fase para a seguinte, isto é na fase de desova (fase V) o seu valor atinge o máximo, na ordem de 500 ng/g (n=3).

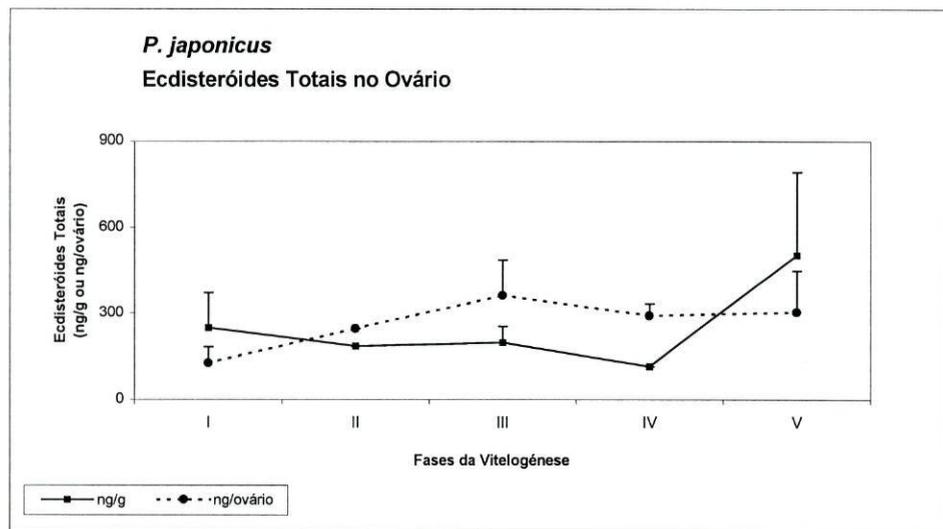


Figura 4.1. Níveis de Ecdisteróides Totais no ovário de *P. japonicus*, ao longo da vitelogénese. As barras verticais indicam o erro padrão.

A quantidade total de ecdisteróides por ovário é inicialmente reduzida (126 ng) mas vai aumentando com o incremento da massa ovárica, parecendo estabilizar a partir da fase III em valores de cerca de 300 ng (com um ligeiro máximo nesta fase de 362 ng) até à desova (fase V) (ver figura 4.1.).

P. kerathurus

Nesta espécie, o ciclo de desenvolvimento do ovário é iniciado com um nível de ecdisteróides totais na ordem dos 400 ng/g de peso seco (n=6) (figura 4.2.). Aumentando ligeiramente para 480 ng/g na fase II, os níveis destas hormonas descem nas fases III e IV, fase final de maturação esta que regista os níveis mínimos do ciclo: 155ng/g (n=5). Deste valor mínimo na fase IV, a concentração de ecdisteróides totais sobe acentuadamente para o valor máximo do ciclo, no ovário em desova (fase V), que se situa na ordem dos 600 ng/g (n=7).

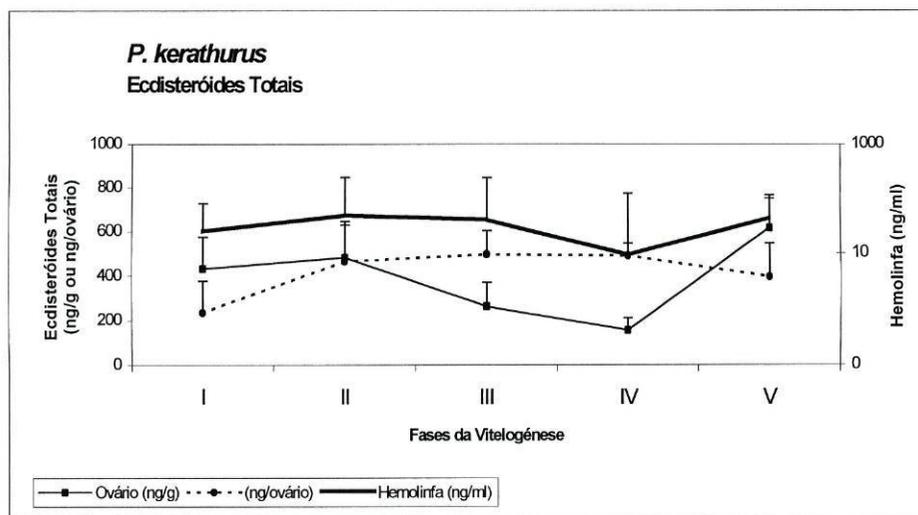


Figura 4.2. Níveis de Ecdisteróides Totais no ovário e hemolinfa de *P. kerathurus*, ao longo da vitelogénese. As barras verticais indicam o erro padrão.

A quantidade total de ecdisteróides presentes por ovário aumenta desde o valor inicial (na fase I) de cerca de 230 ng para o dobro na fase II (por aumento ligeiro da concentração hormonal conjugada com o aumento do peso da gónada) e para o máximo na fase III (cerca de 500 ng) que se mantém na fase seguinte.

Na fase V, os níveis baixam para a ordem de 400 ng que, dado à diminuição drástica de peso que o ovário manifesta com a desova, conduz à elevada concentração de ecdisteróides encontrados nesta fase. O número de animais utilizado nestas análises variou entre 5 e 6.

Na hemolinfa, o perfil das variações do nível de ecdisteróides detectadas é semelhante ao encontrado no ovário com a diferença de estas variações serem muito mais acentuadas. Assim, na fase I os níveis médios encontrados em 6 espécimes foi de 26 ng/ml.

Uma subida algo acentuada foi verificada na fase II (49 ng/ml, n=5), valor mantido na fase seguinte. De igual modo, foi detectado o mínimo de ecdisteróides totais foi detectado na fase IV (9 ng/ml, n=5), para na fase seguinte, na desova, os valores voltarem a subir até ao valor próximo do máximo com cerca de 44 ng/ml (figuras 4.2. e 4.3.).

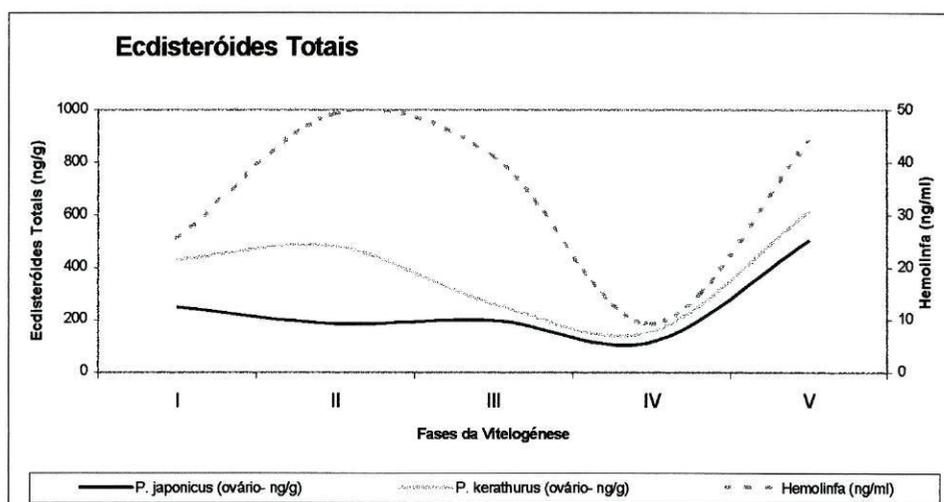


Figura 4.3. Comparação dos perfis de Ecdisteróides Totais (ng/g de peso seco) no ovário de *P. japonicus* e *P. kerathurus* e na hemolinfa de *P. kerathurus*, ao longo da vitelogénese.

A comparação dos resultados obtidos para as duas espécies e nos dois tecidos estudados (numa das espécies) mostra uma certa semelhança no perfil das variações do nível de ecdisteróides ao longo do ciclo vitelogénico, parecendo coincidir nos níveis mínimos na fase IV e máximos logo na fase seguinte (V) isto é, aquando a desova.

Em *P. kerathurus*, o perfil apresentado pelas variações do nível de ecdisteróides na hemolinfa segue quase paralelo com o do ovário, apenas sendo mais pronunciada a subida dos níveis na fase II e por conseguinte também a descida mais brusca até à fase

IV. Comparando as duas espécies, as semelhanças também são grandes quanto aos valores absolutos, principalmente nos pontos mínimos e máximos. Nas fases I e II os valores da espécie *P. japonicus* são, no entanto, cerca de metade dos níveis apresentados pela espécie *P. kerathurus*.

A comparação dos resultados em termos de quantidade de ecdisteróides totais em todo o ovário (figura 4.4.) acentua as semelhanças anteriormente descritas, com variações ao longo das fases vitelogénicas de tendências idênticas, sendo no entanto os valores para a espécie *P. kerathurus* sempre superiores aos da espécie *P. japonicus*.

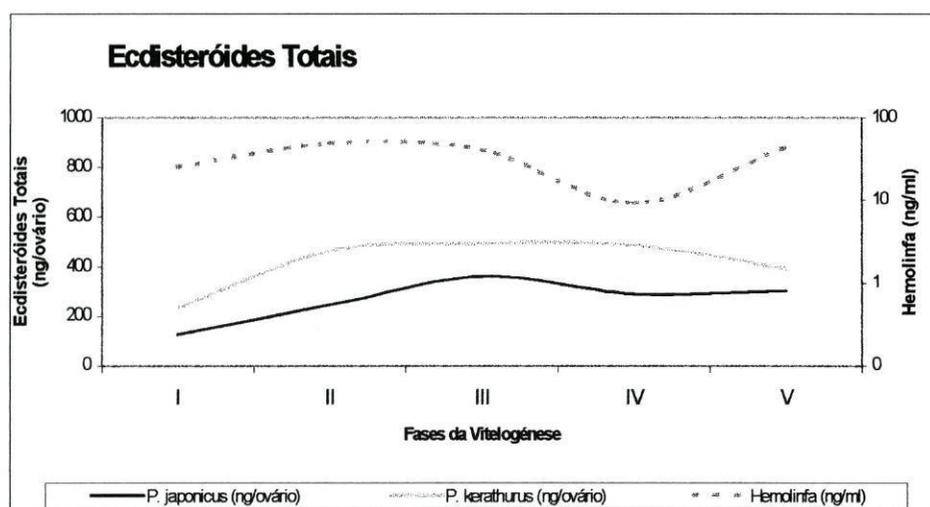


Figura 4.4. Comparação dos perfis de Ecdisteróides Totais em todo o ovário de *P. japonicus* e *P. kerathurus* e na hemolinfa de *P. kerathurus*, ao longo da vitelogénese.

Identificação e quantificação de vários ecdisteróides

Todas as fracções obtidas pela separação de ecdisteróides por HPLC foram quantificados por EIA, sendo o valor de cada fracção, de forma idêntica aos resultados de ecdisteróides totais, expresso como equivalentes de ecdisona.

Os ecdisteróides foram doseados no ovário de *P. japonicus* e no ovário e hemolinfa de *P. kerathurus*, com uma média de 4 a 5 animais por fase vitelogénica. Uma vez que o número total de fracções separadas por HPLC é diferente nas amostras

de *P. japonicus* e *P. kerathurus*, apenas serão analisadas em detalhe as 5 fracções correspondentes a ecdisteróides identificados.

P. japonicus

A relação percentual relativa entre as 5 referidas hormonas (figura 4.5.), realça por um lado a presença constante, em todas as fases vitelogénicas, das hormonas 26-OH-polipodina + 20,26 ecdisona, Ecdisona e 2-Deoxi-20-OH-ecdisona e por outro as importâncias em termos quantitativos dos ecdisteróides 26-OH-polipodina + 20,26 ecdisona, 2- Deoxi- 20-OH-ecdisona e na fase III da hormona activa 20-OH-ecdisona.

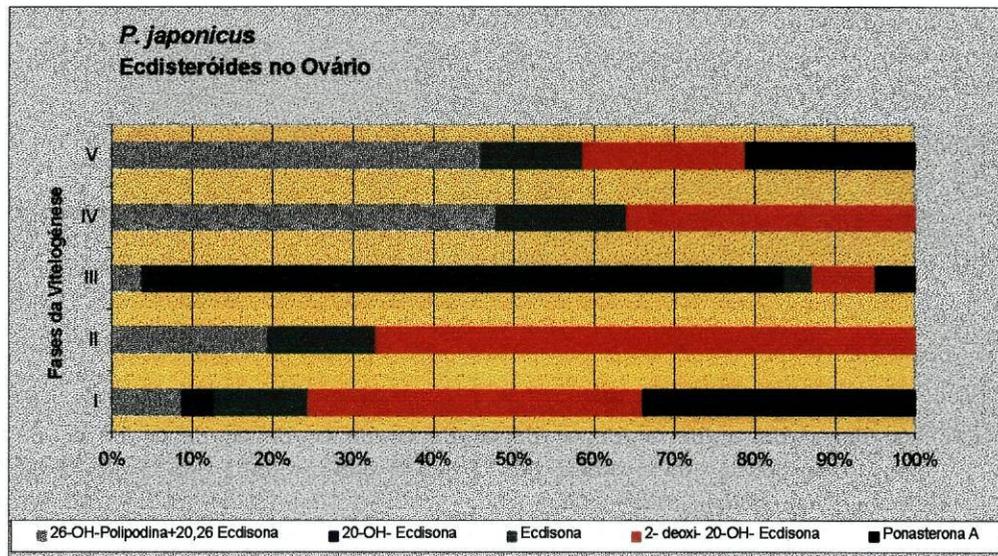


Figura 4.5. Variação percentual relativa de 5 ecdisteróides identificados no ovário de *P. japonicus* ao longo da vitelogénese.

A separação por HPLC dos extractos purificados de ovário desta espécie originou 16 fracções que foram quantificadas por EIA e cujos resultados estão representados na figura 4.6.

A análise do resultados no seu conjunto mostra uma abundância relativa importante, em todas as fases (com excepção da fase II), de produtos muito polares

(fracções f1 a f6) que parece aumentar de importância à medida que o ovário se desenvolve.

A partir da fase II, aparece um grupo de ecdisteróides pouco polares (de polaridade inferior à f6 - Ponasterona), e que se manifestam com particular relevo nas fases II, IV e V.

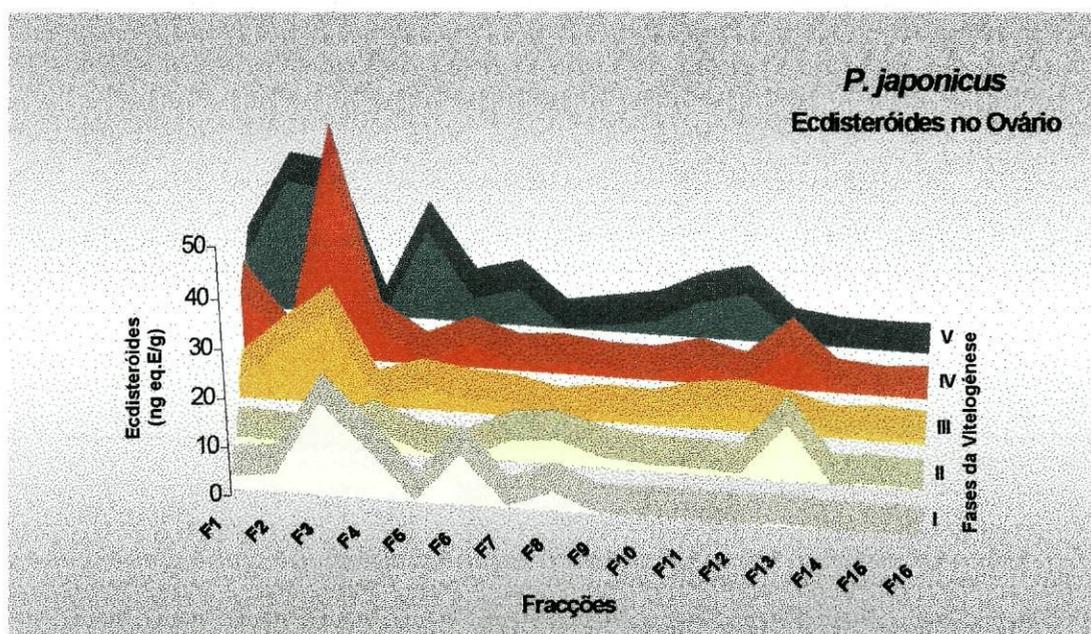


Figura 4.6. Quantificação de ecdisteróides por EIA ($n=4$ a 5 animais por fase, ng eq. Ecd./g) de 16 fracções provenientes da separação por HPLC, de extracto purificado de ovário de *P. japonicus*, ao longo do desenvolvimento do ovário. Cinco destas fracções foram identificadas por co-eluição com padrões autênticos (ver quadro na pág.12).

De uma forma geral, os cinco ecdisteróides identificados, a Ecdisona, a 20-OH-ecdisona, a Ponasterona A, a 2- Deoxi-20-OH-ecdisona e a mistura de 26-OH-polipodina+20,26 ecdisona, apresentam uma evolução semelhante, ao longo do desenvolvimento do ovário, com os mínimos nas fases iniciais e finais do ciclo (fases I e V), com cerca de 1 a 10 ng/g de peso seco ($n=4$ a 5 por fase) (figura 4.7.).

Os valores máximos, para todas as hormonas presentes em todas as fases (ecdisona, 2-deoxi-20-OH- ecdisona e a mistura de 26-OH-polipodina+20,26 ecdisona) aparecem na fase III. A 20-OH-ecdisona (apenas detectada nas fases I e III), atinge

valores da ordem de 200 ng/g (n=8) na fase III, constituindo nesta fase a fracção de maior abundância relativa (figura 4.6).

No ovário desta espécie, e entre os ecdisteróides identificados, o ecdisteróide de maior prevalência e abundância é a 2-deoxi-20-OH-ecdisona.

Apresentando uma variação paralela a esta hormona, mas de níveis ligeiramente inferiores, foi encontrada a hormona precursora da hormona activa, a Ecdisona.

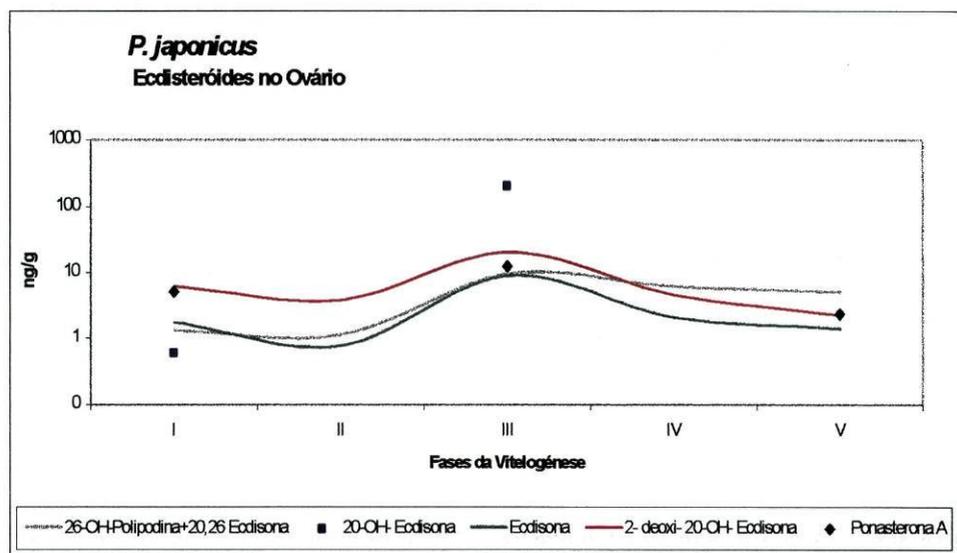


Figura 4.7. Variação ao longo da vitelogénese de 5 ecdisteróides identificados no ovário de *P. japonicus*. Os valores são apresentados como equivalentes de Ecdisona (ng/g).

A Ponasterona A não foi encontrada na fase II e IV, variando entre 2 ng/g (mínimo na fase V) e o máximo na fase III com 12 ng/g (n=8).

As hormonas 26-OH-polipodina+20,26-ecdisona de níveis entre 1 e 10 ng/g têm o seu máximo na fase III terminando o ciclo com cerca de 5 ng/g.

P. kerathurus

Ovário

As percentagens relativas, dos 5 ecdisteróides identificados, presentes no ovário desta espécie mostra claramente a 20-OH-ecdisona como a hormona maioritária em todas as fases do ciclo da vitelogenese (figura 4.8.).

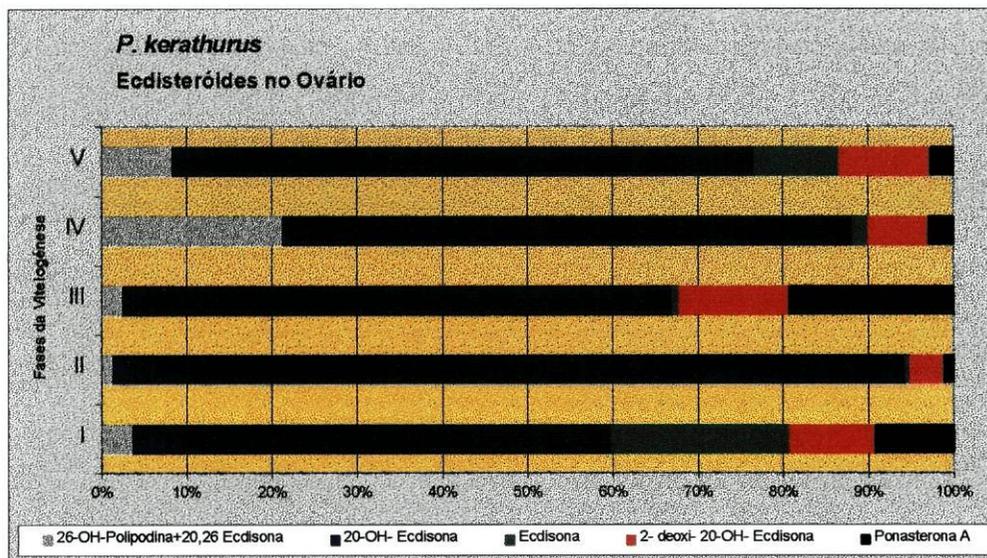


Figura 4.8. Variação ao longo da vitelogenese de 5 ecdisteróides identificados no ovário de *P. kerathurus*.

Desta forma, todos os outros ecdisteróides apresentam uma abundância relativa de menor importância: na fase I a ecdisona atinge a cota de 20%, valor este igual para o conjunto de 26-OH-Polipodina+20,26 ecdisona na fase IV e para a ponasterona A na fase III.

Nesta espécie, a separação por HPLC em 14 fracções dos extractos purificados do ovário, em distintas fases do seu desenvolvimento vitelogénico, e sua posterior quantificação por EIA resultou nos perfis apresentados na figura 4.9.

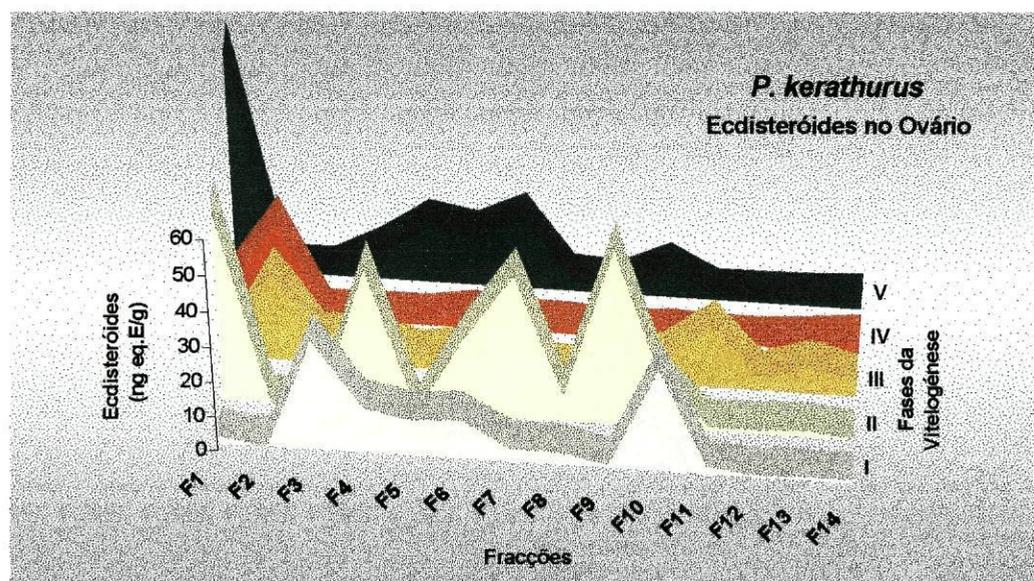


Figura 4.9. Resultado da quantificação de 14 fracções de ecdisteróides provenientes da separação por HPLC, de extracto purificado de ovário liofilizado de *P. kerathurus*, ao longo de 5 fases vitelogénicas. Os valores são apresentados como equivalentes de Ecdisona (ng/g).

Na fase I estão presentes grupos polares (f2- 20-OH-ecdisona e f3) e medianamente polares (entre a f4- ecdisona e a f10- ponasterona A), notando-se a ausência de substâncias muito polares (f1) assim como as de menor polaridade (após a f10- ponasterona A).

Na fase seguinte (fase II) são evidenciados quatro grupos desde os muito polares (f1) até aos medianamente polares, em quantidades significativas, as quais desaparecem na fase III, dando lugar a dois grupos distintos, um muito polar e outro pouco polar.

No final da vitelogénese (fase IV), apenas um grupo de ecdisteróides muito polar é visível. Na desova (fase V), são evidenciados: um importante grupo muito polar e a ausência de substâncias pouco polares bem como a presença de grupos de polaridade média.

Nesta espécie foram detectados no ovário, em todas as fases vitelogénicas, os cinco ecdisteróides identificados (figura 4.10.).

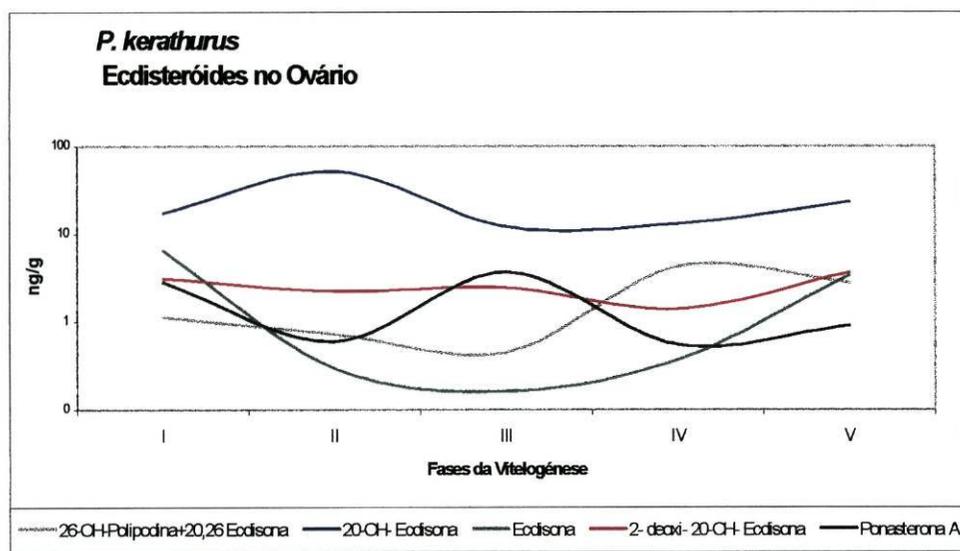


Figura 4.10. Variação ao longo da vitelogénese de 5 ecdisteróides identificados no ovário de *P. kerathurus*. Os valores são apresentados como equivalentes de Ecdisona (ng/g).

A hormona activa da muda, a 20-OH- Ecdisona, é maioritária em todas as fases, iniciando o ciclo com valores da ordem de 17 ng/g de peso seco (n=5), subindo rapidamente na fase seguinte para 52 ng/g (n=6). Do máximo na fase II, o valor desta hormona desce acentuadamente para o seu mínimo na fase seguinte (fase III, 12 ng/g, n=5). Mantendo-se na fase IV, o seu valor volta a aumentar na fase de desova para um valor um pouco superior ao inicial (fase V, 23 ng/g, n=7).

A ecdisona, precursora da hormona activa, inicia o ciclo com uma concentração de 6 ng/g (n=6) para logo baixar para níveis abaixo da unidade nas fases II, III e IV e novamente subir para 3 ng/g na última fase (V, n=8).

A Ponasterona A apresenta um comportamento distinto: na fase I começa com 3 ng/g, diminuindo na fase II para 1 ng/g. Na fase III apresenta o seu máximo, com 4 ng/g, baixando na fase seguinte para 1 ng/g, mantendo-se com este valor até à desova (fase V).

O ecdisteróide 2-deoxi-20-OH-ecdisona é o que apresenta menor variação ao longo da vitelogénese.

Os ecdisteróides mais polares, 26-OH-Polipodina+20,26 Ecdisona, têm o seu máximo (4 ng/g) na fase IV, diminuindo para 3ng/g na última fase do ciclo, mostrando no início do mesmo valores baixos de cerca de 1 ng/g (fases I, II e III).

Hemolinfa

Da análise da abundância relativa dos 5 ecdisteróides identificados, ao longo da vitelogénese, ressalta a predominância da 20-OH-ecdisona, atingindo quase 100% na fase II.

O início do ciclo é marcado pela presença de todas as formas hormonais, situação que não se repetirá nas restantes fases do ciclo vitelogénico (figura 4.11.).

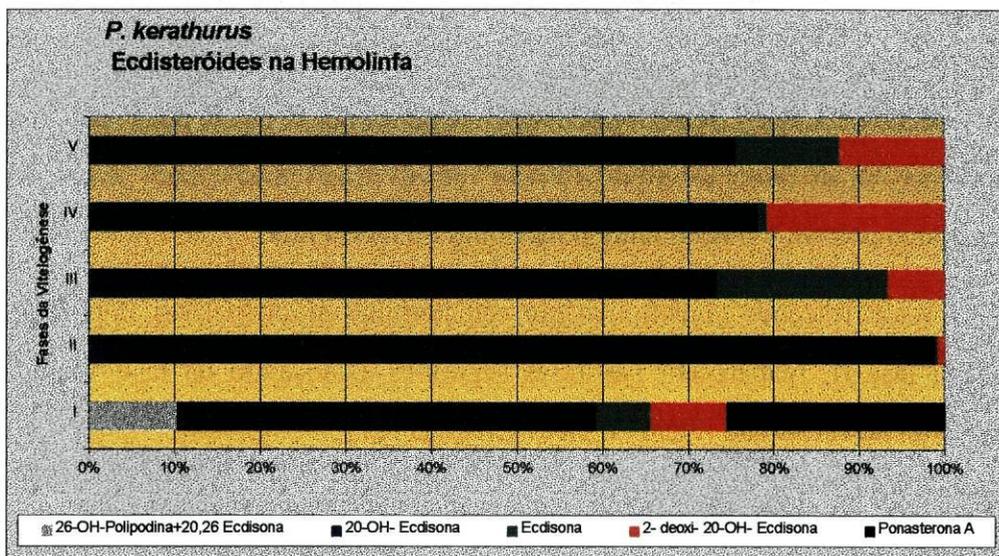


Figura 4.11. Variação ao longo da vitelogénese de 5 ecdisteróides identificados na hemolinfa de *P. kerathurus*.

O resultado da quantificação, de todas as 14 fracções obtidas da separação por HPLC de extractos purificados de hemolinfa da espécie *P. kerathurus*, estão representadas graficamente na figura 4.12.

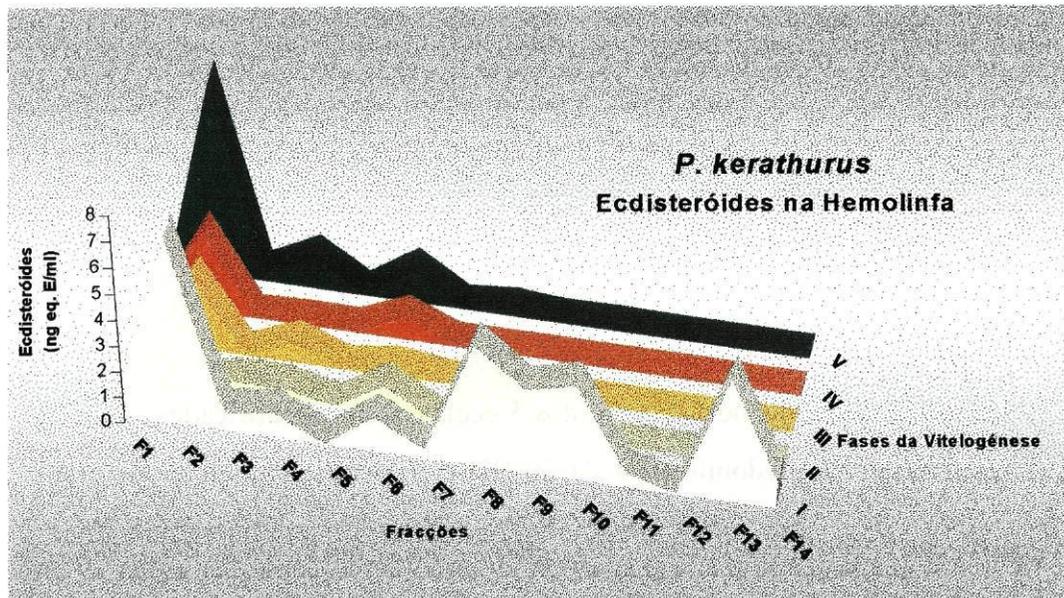


Figura 4.12. Resultado da quantificação de 14 fracções de ecdisteróides provenientes da separação por HPLC, de extracto purificado de hemolinfa de *P. kerathurus*, ao longo de 5 fases vitelogénicas. Os valores são apresentados como equivalentes de Ecdisona (ng/g).

A abundância na fase I de vários ecdisteróides muito polares, de polaridade média e pouco polares em quantidades significativas contrasta fortemente com a ausência de produtos pouco polares e mediamente polares nas restantes fases.

As primeiras fracções, constituídas por ecdisteróides muito polares, depois de uma ausência na fase II, reaparecem nas fases seguintes alcançando na fase V um nível equivalente ao alcançado no início do ciclo vitelogénico.

Apenas três ecdisteróides foram encontrados na hemolinfa em todas as fases vitelogénicas: 20-OH-ecdisona, Ecdisona e 2-Deoxi-20-OH-ecdisona.

A 20-OH-ecdisona, com um valor inicial de cerca de 4 ng/ml na fase I, atinge na fase II o seu valor máximo de 74 ng/ml (n=5), diminuindo de seguida para valores baixos nas fases III e IV (1 a 1.5 ng/ml). Na fase de desova (fase V) a 20-OH-ecdisona retorna ao valor de início do ciclo ou seja de cerca de 4 ng/ml (n=8).

Os níveis da hormona ecdisona parecem manter-se constantes ao longo do ciclo vitelogénico (cerca de 0.5 ng/ml) apresentando, no entanto um mínimo, na fase de

maturação (fase IV). A variação da ecdisona evidencia um perfil quase simétrico à hormona activa 20-OH-ecdisona, o que condiz com a sua condição de hormona precursora da hormona activa.

O ecdisteróide Ponasterona A apenas aparece na fase I (2 ng/ml) assim como o conjunto 26-OH-Polipodina+20,26 Ecdisona com o valor de apenas 0.8 ng/ml (Figura 4.13.).

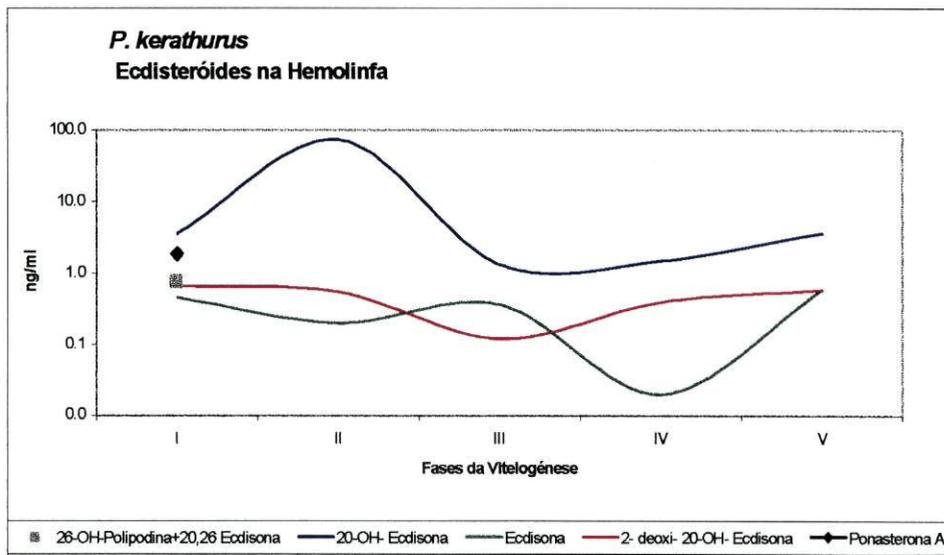


Figura 4.13. Variação de ecdisteróides na hemolinfa de *P. kerathurus* ao longo da vitelogénese. Os valores são apresentados como equivalentes de Ecdisona (ng/ml).

Discussão

O ciclo de desenvolvimento do ovário dos peneídeos pode ser dividido nas seguintes fases (ver capítulos 2 e 3): I- imaturos e início da previtelogénese; II- previtelogénese avançada ou tardia (que corresponde à vitelogénese primária classicamente descrita como vitelogénese endógena); III- vitelogénese (ou vitelogénese secundária classicamente descrita como vitelogénese exógena); IV- maturação (aparecimento das vesículas corticais, cisão da vesícula germinal, reiniciação meiótica e ovulação) e V- desova.

Os resultados obtidos nas duas espécies de peneídeos estudadas revelam a presença de ecdisteróides no ovário, bem como a sua variação ao longo do ciclo vitelogénico. A presença de ecdisteróides no ovário foi já descrita em vários crustáceos como por exemplo, em *Penaeus vannamei* (Chan, 1995), em *Macrobrachium rosenbergii* (Wilder *et al.*, 1991; Young *et al.*, 1993), em *Penaeus monodon* (Young *et al.*, 1993), em *Palaemon serratus* (Lanot e Clédon, 1989) e *Homarus gammarus* (Goudeau *et al.*, 1990).

O perfil da variação de ecdisteróides totais nos ovários de *P. japonicus* e *P. kerathurus* foi semelhante: diminuição progressiva desde a previtelogénese (fase I) até ao final da maturação (fase IV) e aumento brusco na fase V, que corresponde à desova.

A diminuição dos níveis de ecdisteróides no ovário desde o seu estado imaturo para o início de previtelogénese, seguida de uma queda brusca da previtelogénese até à maturação foi descrita no peneídeo *P. monodon* (Young *et al.*, 1993). Na espécie *Macrobrachium rosenbergii*, os mesmos autores encontraram um máximo no nível de ecdisteróides totais no ovário imaturo para, depois de uma diminuição brusca na previtelogénese, o nível subir novamente até à maturação. No entanto, estes resultados não coincidem com os obtidos por Wilder *et al.* (1991) que, trabalhando com a mesma espécie, mostraram que os ecdisteróides se acumulavam no ovário durante a vitelogénese.

Considerando o aumento acentuado da massa do ovário durante a vitelogénese (que na fase I é inferior a 1% do peso corporal e atinge na maturação cerca de 14%, na espécie *P. kerathurus*) os valores podem ser expressos em nanogramas de ecdisteróides por ovário. Expressos desta forma, o perfil de ecdisteróides totais aumenta gradualmente até à fase III e mantém-se sensivelmente nos mesmos valores na fase IV. Resultados semelhantes foram obtidos no ovário da espécie *Macrobrachium rosenbergii* (Young *et al.*, 1993), no qual a diminuição da concentração dos ecdisteróides ao longo da vitelogénese é “compensada” pelo aumento do peso da gónada durante esse processo.

Nos animais desovados (fase V) em que observa uma acentuada diminuição do peso do ovário, como consequência da saída dos óvulos, o nível de ecdisteróides totais por ovário diminui ligeiramente (no *P. kerathurus*) ou mantém-se num valor semelhante à fase de maturação que precede a desova (no *P. japonicus*). Estes dados, de difícil comparação dado que normalmente esta fase não é considerada nos trabalhos revistos, parecem indicar a presença de ecdisteróides em elevadas quantidades nas células que ficam no ovário após a desova ou seja nas células foliculares, ovócitos imaturos (mas que podem iniciar imediatamente novo ciclo vitelogénico- ver capítulo 1) e alguns ovócitos maduros assim como restos de vesículas corticais em processo de absorção.

Na hemolinfa da espécie *P. kerathurus* o perfil da variação do nível de ecdisteróides totais parece seguir em paralelo as variações verificadas no ovário, incluindo o aumento da concentração da fase IV para a fase V. No entanto, dadas as diferenças encontradas nos níveis de vários ecdisteróides, identificados nos dois compartimentos durante o ciclo vitelogénico, pensamos que a existência destes compostos no ovário não deverá ser unicamente explicada pela sua perfusão pela hemolinfa, mas sim pelos processos metabólicos e síntese *de novo* no seio daquele órgão.

Na espécie *Macrobrachium nipponense* o ciclo reprodutivo coincide com o ciclo da muda, sendo possível uma comparação entre os níveis de ecdisteróides durante o chamado ciclo de muda reprodutivo e o ciclo de muda não-reprodutivo. No ciclo de muda não-reprodutivo, após o máximo de ecdisteróides totais na hemolinfa observado na fase D3 (pré-muda), este valor vai diminuindo progressivamente nas fases de pós-muda (A e B). Porém, no ciclo de muda reprodutivo, o valor máximo de ecdisteróides totais na hemolinfa, observado igualmente na fase D3 (que antecede a muda e a desova), diminui rapidamente, sendo observado outro máximo (de menor amplitude) na pós-muda, coincidente com o aparecimento da vitelogenina na hemolinfa (Okumura *et al.*, 1992). Desta forma, os valores máximos de ecdisteróides totais na hemolinfa da espécie *Macrobrachium nipponense* coincidem com o início da vitelogénese e com a

desova, situação semelhante à encontrada neste trabalho para a espécie *Penaeus kerathurus*.

A Ecdisona está presente no ovário e na hemolinfa de ambas as espécies estudadas e em todas as fases do ciclo vitelogénico. Porém, o perfil da variação desta hormona para uma espécie parece o oposto do perfil observado na outra. Enquanto em *Penaeus japonicus* esta hormona apresenta o nível máximo durante a vitelogénese (fase III) e os valores mínimos no início e fim do ciclo (fases I e V) na espécie *P. kerathurus* esta hormona tem os seus máximos nestas fases e o valor mínimo na fase III. Em *Penaeus kerathurus*, os níveis de ecdisteróides na hemolinfa são aproximadamente constantes ao longo do ciclo, com um valor mínimo na fase de maturação (fase IV). Na espécie *Acanthonyx lunulatus* a Ecdisona no ovário aumenta no início da vitelogénese e novamente quando o ovócito atinge a maturação (Chaix e De Reggi, 1982). Resultados semelhantes foram encontrados durante o ciclo de muda reprodutivo da espécie *Macrobrachium nipponense* relacionando um máximo desta hormona, no ovário, com a desova e outro de menor amplitude com o início da vitelogénese (Okumura *et al.*, 1992). Curiosamente um máximo desta hormona no início do ciclo da muda foi também observado em *Palaemon serratus* (Baldaia *et al.*, 1984), para o qual considerando apenas o processo da muda, não foi encontrada explicação.

Da mesma forma que nos insectos, os crustáceos parecem poder sintetizar no ovário a Ecdisona (além da 20-OH-ecdisona e Ponasterona A) a partir do colesterol, através das células foliculares (Blanchet-Tournier, 1982). A síntese e o armazenamento de Ecdisona nos ovócitos, e a sua presença nos ovos após a desova, sugere o armazenamento da pro-hormona, que após hidroxilação (para dar lugar à hormona activa 20-OH-Ecdisona) participa no desenvolvimento dos embriões (Chaix e De Reggi, 1982). O nível praticamente constante da Ecdisona na hemolinfa em todas as fases vitelogénicas em *Penaeus kerathurus* parece indicar a síntese *de novo* desta hormona a nível do ovário.

A variação da Ecdisona ao longo do ciclo vitelogénico na espécie *Penaeus monodon* poderá ser similar à da espécie *P. kerathurus* uma vez que Young *et al.*

(1993) observaram naquela espécie valores máximos da hormona nos ovócitos imaturos e a sua diminuição até à maturação, não apresentando porém valores para animais em desova os quais poderiam ser igualmente elevados.

No final da vitelogénese os ovócitos, que atingem o seu tamanho máximo, estão bloqueados no estágio terminal (diploteno) da profase da meiose I. Neste estágio o ovócito possui um grande núcleo que toma o nome de vesícula germinal. A maturação do ovócito (ou maturação meiótica) consiste na progressão da meiose (do estágio diploteno até ficar bloqueado novamente em metafase I ou II) que inclui a dissociação nucleolar, condensação dos cromossomas e cisão da vesícula germinal. Em *Palaemon serratus* os níveis de Ecdisona (bem como os de 20-OH-ecdisona) estão correlacionados com a reiniciação meiótica (Lanot e Clédon, 1989) sugerindo estarem estas hormonas envolvidas na maturação do ovócito. O nível elevado de Ecdisona encontrado na espécie *P. japonicus* nos ovócitos no final da vitelogénese parece consistente com a possível função dos ecdisteróides no desencadear da maturação dos ovócitos.

A hormona activa 20-OH-ecdisona foi detectada no ovário da espécie *Penaeus japonicus* apenas no início do ciclo e durante a vitelogénese atingindo nesta última fase altas concentrações. Com um comportamento distinto na espécie *P. kerathurus*, a 20-OH-ecdisona é a hormona maioritária em todas as fases vitelogénicas, apresentando o seu máximo antes da vitelogénese e o mínimo nesta fase (III). O predomínio da hormona activa 20-OH-ecdisona no início do ciclo vitelogénico (imaturos ou início da previtelogénese) foi também descrita nas espécies *Penaeus vannamei* (Chan, 1995) e *P. monodon* (Young *et al.*, 1993). Na hemolinfa de *P. kerathurus* esta hormona, que representa na fase II quase 100% das hormonas identificadas, apresenta dois máximos, nas fases II e IV, situação semelhante à descrita em *P. orientalis*, com valores máximos no início do desenvolvimento do ovócito (que parece corresponder à fase II) embora não tivessem sido analisados animais em desova (Weixin *et al.*, 1992).

A Ponasterona A (cujo precursor sintetizado no órgão Y é a 25-deoxiecdisona) é a hormona maioritária nos ovos das espécies *Homarus gammarus* e *Carcinus maenas*,

parecendo estar relacionada com a finalização da secreção do invólucro embrionário do ovo (Goudeau *et al.*, 1990). No entanto este ecdisteróide não foi encontrado durante a vitelogênese do *Penaeus monodon* (Young *et al.*, 1993). Na espécie *P. japonicus* foi detectado no ovário nas fases I e III e em todas as fases do ciclo vitelogênico na espécie *P. kerathurus* (com o máximo em I e III).

O ecdisteróide 2-deoxi-20-OH-ecdisona, utilizado neste trabalho como composto de referência, foi o que apresentou maior prevalência e abundância (máximo na fase III) na espécie *P. japonicus*. Na espécie *P. kerathurus*, também aparece em todas as fases quer na hemolinfa quer no ovário, sem contudo apresentar variações. Este composto, utilizado igualmente como padrão autêntico no trabalho de Okumura *et al.* (1992), não foi porém detectado na espécie *Macrobrachium nipponense*.

Incluídos no grupo dos chamados “produtos muito polares” (HPP), que cromatograficamente eluem antes da 20-OH-ecdisona, estão os dois ecdisteróides 26-OH-polipodina e 20, 26-ecdisona (mas que no entanto em cromatografia de fase reversa não são separados) que foram utilizados como referências neste trabalho. Este grupo (HPP) está presente no ovário das espécies *Penaeus japonicus* e *P. kerathurus* em todas as fases vitelogênicas e parecendo aumentar de importância até à maturação. Na hemolinfa este grupo apenas foi detectado no início do ciclo. Os HPP foram detectados na hemolinfa de *P. japonicus* ao longo do ciclo da muda (Okumura *et al.*, 1989), em *Palaemon serratus* (Baldaia *et al.*, 1984) e nos ovos (recém desovados) de *Acanthonyx lunulatus* (Chaix e De Reggi, 1982). Os produtos de muito polares (HPP), para além de formas livres de ecdisteróides (como os dois ecdisteróides utilizados como referência) parecem incluir formas conjugadas de ecdisteróides que desta forma ficam inactivos (Okumura *et al.*, 1989, 1992). Os “produtos de baixa polaridade” (LPP), que neste trabalho são considerados como os de polaridade inferior à Ponasterona A, foram detectados em *P. kerathurus* apenas na fase I quer na hemolinfa quer no ovário. No ovário da espécie *P. japonicus* a sua importância parece aumentar no final do desenvolvimento do ovário até à desova. Embora de pouca importância relativa estes grupos (HPP e LPP) podem reflectir variações do metabolismo dos ecdisteróides ao

longo dos ciclos de muda e reprodutivo ou mesmo uma função fisiológica de algum dos componentes ainda não isolado (Okumura *et al.*, 1989).

Em conclusão os resultados descritos sugerem a relação dos ecdisteróides com a reprodução em vários níveis: como promotores da vitelogénese (síntese nas células foliculares ou sua captura pelo ovócito), na maturação do ovócito (reinição meiótica), no controlo da secreção do invólucro embriónico e finalmente actuando nos processos embriológicos dentro do ovo. Porém, a imensa disparidade dos resultados obtidos sobre as variações dos níveis de vários ecdisteróides ao longo do ciclo reprodutivo em diferentes espécies de crustáceos, pressupõe, de forma idêntica ao observado nos insectos, diferenças fundamentais no papel destas hormonas na reprodução dos crustáceos. Desta forma, parece-nos necessário um aprofundamento substancial do estudo para determinar o papel dos ecdisteróides na ovogénese nos crustáceos.

Hormonas esteróides no ovário de Penaeus japonicus. Perfil de Progesterona ao Longo das Fases de Desenvolvimento do Ovário das Espécies Penaeus japonicus e P. kerathurus.

Introdução

Como foi já referido (ver Introdução Geral), ao longo dos últimos 25 anos têm sido observados em invertebrados diversos esteróides sexuais, originalmente descobertos em vertebrados (daí a designação de esteróides do tipo de vertebrados). São exemplos a progesterona, a testosterona, o estradiol, cuja possível função hormonal ainda não está provada (Lafont, 1991). De facto, são vários os estudos incidindo sobre os efeitos de hormonas reprodutivas de vertebrados em crustáceos, assim como sobre a sua identificação e quantificação, quer na hemolinfa, quer em possíveis tecidos produtores ou alvo, bem como a própria capacidade enzimática para uma síntese endógena (revisões de Fingerman, 1987; Fingerman *et al.*, 1993; Sandor, 1980).

Em vários trabalhos de revisão sobre o controlo endócrino da reprodução em crustáceos (Meusy e Payen, 1988; Laufer e Landau, 1991, entre outros) são descritos vários resultados de estimulação da vitelogénese por hormonas sexuais de mamíferos tais como a hormona coriónica humana (HCG) e a Progesterona. A detecção de vários destes esteróides na hemolinfa, ovário, hepatopâncreas, órgão mandibular etc., em diferentes espécies de crustáceos, indicia a necessidade de mais estudos para consolidar a hipótese do seu papel como hormonas nos crustáceos. Argumentos a favor da hipótese de que os esteróides (C_{21} , C_{19} , e C_{18}) são moléculas universais e que constituem mensageiros nativos dos invertebrados, ainda que de função fisiológica não definida, estão revistos no trabalho de Sandor (1980). Como foi já referido na Introdução Geral, a regulação da vitelogénese secundária é realizada através de factores neuroendócrinos como a hormona inibidora da vitelogénese (VIH) dos pedúnculos oculares e a hormona estimuladora da vitelogénese (VSH) dos gânglios torácicos. Finalmente, uma hormona ovárica estimuladora da vitelogenina (VSOH), secretada pelas células foliculares secundárias poderá, a exemplo do que acontece nos anfípodes (Payen, 1980), contribuir para a estimulação da síntese de vitelogenina nos crustáceos decápodes (Charniaux-Cotton, 1980; Hasegawa *et al.*, 1993). Como parece representar um papel semelhante ao 17β -estradiol nos vertebrados ovíparos (Meusy e Payen,

1988), a sua natureza química poderá ser esteróide (Van Herp e Payen, 1991). De facto, existe hoje um conjunto de evidências que levam a sugerir que as hormonas esteróides sexuais do tipo de vertebrados podem representar um importante papel na regulação da vitelogenese. A produção de várias hormonas esteróides tendo como precursor o colesterol foi conseguida por Kanazawa e Theshima (1971) na espécie *Panulirus japonica*. O trabalho recente de Summavielle *et al.*, (1997) demonstra a existência, no ovário de *P. japonicus*, de vários sistemas enzimáticos (20α -HSD, 17α -hidroxilase, C_{17} - C_{20} liase, 17α -HSD e aromatase) necessários para produção e conversão de hormonas esteróides.

Na espécie *Penaeus monodon* os níveis de vários esteróides foram estudados ao longo do ciclo reprodutivo (Fairs *et al.*, 1990). Foi também demonstrada uma alternância de estrogénios e progestagénios no ciclo sexual da *Artemia*, tendo os primeiros o seu máximo durante a vitelogenese e os segundos entre os ciclos vitelogénicos (antes e depois da desova) (Van Beek e De Loof, 1988). Com o objectivo de estabelecer o papel dos esteróides na regulação da ovogénese nos crustáceos, determinamos a presença de vários esteróides no ovário de *Penaeus japonicus* através de espectrometria de massa (MS) e a variação dos níveis de Progesterona no ovário e na hemolinfa na espécie autóctone *P. kerathurus*.

Material e Métodos

A extracção dos esteróides foi realizada segundo a técnica cujo desenvolvimento e validação é objecto do capítulo 3, onde é também apresentado o programa de HPLC utilizado para separação de esteróides. Embora o programa esteja preparado para separar vários esteróides assim como o colector de fracções programado para recolher especificamente certos picos, foi utilizada a técnica de radio-imuno-ensaio (RIA), para o doseamento de Progesterona, uma vez que a concentração existente nos tecidos se situa abaixo do limite de detecção do HPLC.

No capítulo 3 é igualmente descrita a preparação das amostras de ovário da espécie *P. japonicus*, nas quais o Departamento de Química da Universidade de Aveiro, identificou várias hormonas esteróides, utilizando técnicas de espectrometria de massa como a “Tandem Mass Spectrometry (MS/MS) e “Sequential Product Ion Scanning” (MS/MS/MS).

Quantificação de Progesterona por RIA

Os níveis de Progesterona foram determinados utilizando “kits” ^{125}I -RIA em fase sólida COAT-A-COUNT, fornecidos por "Diagnostic Products Corp. (Los Angeles, CA). Nestas determinações os esteróides competem com um marcador (^{125}I -Progesterona), para um anticorpo específico ligado à parede de tubos de polipropileno. O antisoro usado é também altamente específico. As quantidades de Progesterona foram calculadas através da recta-padrão (com transformação log-logit) obtida de padrões entre 0-40 ng/ml. Nas nossas condições este método apresenta os seguintes parâmetros de qualidade:

- ligação máxima (MB) $39.8 \% \pm 3.3$ (n=4)
- ligações não específicas (NSB) $0.86 \% \pm 0.23$ (n=4)
- 50% B/B₀, $2.78 \text{ ng/ml} \pm 1.63$ (n=4)

Validação do RIA aplicado a tecidos de crustáceos

Como o “kit” de RIA para a Progesterona foi desenvolvido inicialmente para o doseamento em soro humano, fizemos a sua validação para extractos brutos de ovário de camarão através de testes de exactidão, de precisão intra e inter-ensaios e de possíveis reacções cruzadas (Prat *et al.*, 1986).

A. Precisão: traduz a reprodutibilidade do método, medida através do coeficiente de variação entre várias (mínimo 3) réplicas dentro do mesmo ensaio (intra-ensaio) e

entre vários ensaios (inter-ensaio).

B. Exactidão:

B1 Teste de paralelismo: permite verificar a existência de possíveis reacções cruzadas comparando a recta padrão com 3 rectas semelhantes à anterior usando o extracto em estudo.

Para as rectas de diluição do extracto foram juntas várias porções de gónada liofilizada de vários animais até perfazer um "pool" de 1250 mg. Foram depois pesadas 3 vezes 200 mg e extraídas cada uma com 10 ml de metanol (4+3+3), fazendo centrifugações intermédias e juntando os respectivos sobrenadantes. Finalmente foram evaporadas e ressuspendidas em 750 µl de tampão fosfato (pH=7.4, 0.1 M, utilizado no EIA, ver capítulo 4).

B₂. Teste de sobrecarga: foram adicionadas quantidades conhecidas de Progesterona aos extractos (mínimo 3) em estudo e posteriormente determinada a correlação existente entre os valores obtidos e os valores esperados.

1. Preparação do extracto:

Foram pesados 200 mg de gónada liofilizada (em triplicado) e extraídos com 10 ml de MeOH. Depois de evaporadas com azoto e ressuspendidas em 750 µl de tampão fosfato (pH=7.4, 0.1 M), foram retiradas alíquotas de 150 µl e adicionado um volume fixo de padrão.

2. Preparação da solução padrão:

Foi evaporado 1 ml de Progesterona diluída em EtOH com uma concentração de 3.3 µg/ml e ressuspendido em 50 ml de tampão fosfato ficando assim com uma concentração final de 66 ng/ml.

3. Foram realizadas várias diluições procedendo de acordo com o quadro 5.1.

Quadro 5.1. Diluições do extracto + padrão para o teste de sobrecarga

V. a medir	V _f (EIA)	Conc. Padrão	V. Pa. + V. Ext.	Conc. No Ext.
(ml)	(ml)	ng/ml	(μ l) (μ l)	ng/ml
0.04	4	0.66	100 + 150	0.264
0.125	4	2.063	100 + 150	0.825
0.250	4	4.125	100 + 150	1.650
0.5	4	8.25	100 + 150	3.3
1.0	4	16.5	100 + 150	6.6
2	4	33.0	100 + 150	13.2
0	-	66.0	100 + 150	26.4

Resultados

I. Identificação de esteróides por Espectrometria de Massa

Foram identificadas no ovário da espécie *P. japonicus* as seguintes hormonas esteróides: Testosterona, Pregnenolona, 17 α -Hidroxiprogesterona e Progesterona. Estes resultados foram obtidos no Departamento de Química da Universidade de Aveiro, através de “Tandem Mass Spectrometry (MS/MS)” e “Sequential Product Ion Scanning” (MS/MS/MS) (Cardoso, *et al*, 1997).

II. Validação do Método

A exactidão foi obtida pelo cálculo da regressão linear entre os valores esperados do padrão (concentrações entre 0 e 40 ng/ml) e os valores esperados do extracto com igual concentração ($r=0.95$ e $p<0.001$).

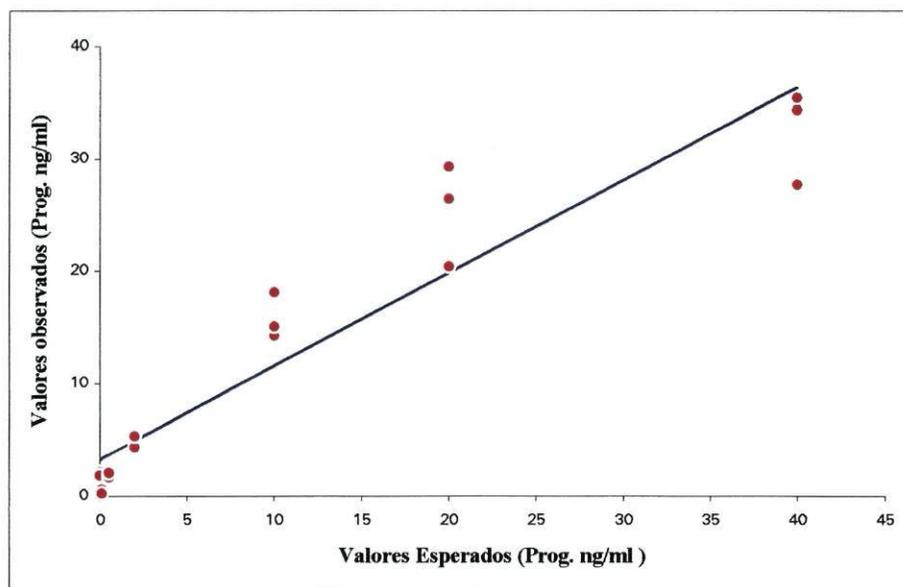


Figura 5.1. Regressão linear entre os valores esperados e observados ($r=0.95$ e $p<0.001$).

A precisão intra-ensaios, traduzida pelo coeficiente de variação (CV) de várias réplicas ($n=4$), de quantidades conhecidas de Progesterona (concentrações entre 0.624 e 14.2 ng/ml) introduzidas em extractos, situou-se entre 4.47 e 8.55%. A precisão inter-ensaios ($n=3$) testada com 2.103 ng/ml de Progesterona resultou num CV= 12.86%.

Quadro 5.2. Replicados de uma amostra no mesmo ensaio (1) e em diferentes ensaios (2). Média (X), Desvio Padrão (SD) e coeficiente de variação (CV)

INTRA-ENSAIO (1)			INTER-ENSAIO (2)		
X=0.624 ng/ml	SD=0.039	CV=6.18 % (n=4)			
X=1.738 ng/ml	SD=0.093	CV=5.35 % (n=4)	X=2.103 ng/ml	SD=0.270	CV=12.86% (n=3)
X=2.063 ng/ml	SD=0.176	CV=8.55 % (n=4)			
X=4.678 ng/ml	SD=0.345	CV=7.37 % (n=4)			
X=14.2 ng/ml	SD=0.634	CV=4.47 % (n=3)			

Os efeitos de possíveis reacções cruzadas foram avaliados comparando curvas log-logit de diluição de padrões com curvas log-logit de diluição de amostras biológicas (extracção simples), com iguais concentrações de Progesterona.

O teste t aplicado ao estudo do paralelismo das curvas de diluição mostrou pequenas mas significativas diferenças, indicando a existência de prováveis reacções cruzadas.

Deste modo, e de forma a evitar as eventuais reacções cruzadas, os doseamentos de Progesterona por RIA foram executados não no extracto purificado mas na fracção correspondente após separação por HPLC.

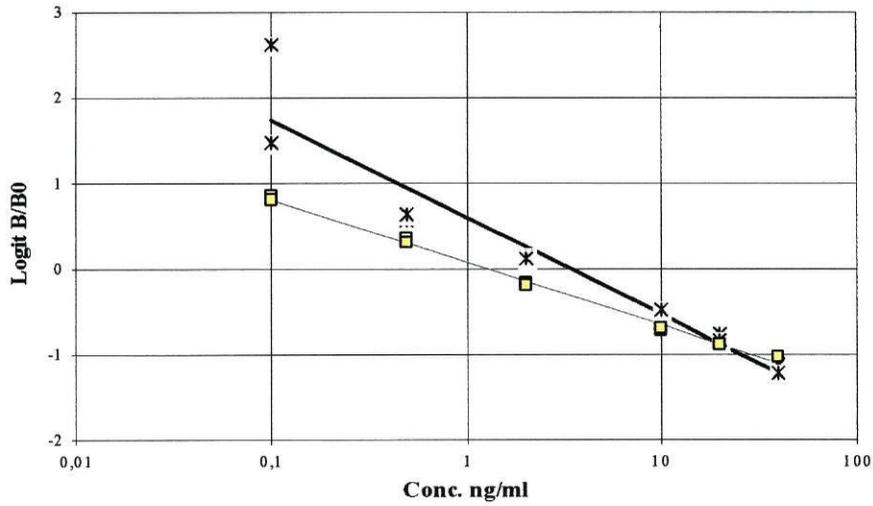


Figura 5.2. Regressão linear das curvas Log-logit de Padrões (***) e do extracto (-): $t_{Cal}(-3.71) > t_{Crit.}(2.086)$ e $0.1 < P < 1\%$

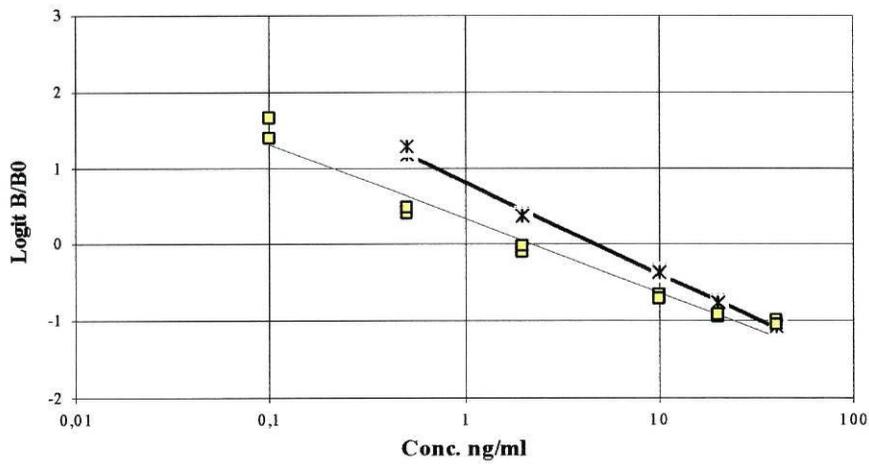


Figura 5.3. Regressão linear das curvas Log-logit de Padrões (***) e do extracto (-): $t_{Cal}(-3.05) > t_{Crit.}(2.101)$ e $0.1 < P < 1\%$

A alíquota destinada à injeção em HPLC (eppendorf referido na técnica final por 10.1, ver capítulo 3), foi ressuspensa, antes de injectar, em 60 µl de MeOH/H₂O (90%) e daqui injectados 40 µl com uma seringa de precisão Hamilton. Depois do programa para separação dos ecdisteróides (denominado ECDIS, ver capítulo 4) e a ele ligado automaticamente, é iniciado um outro (denominado ESTE) que separa vários esteróides, sendo constituído por um programa isocrático de metanol a 80% (MeOH/H₂O 80%, v/v), com um fluxo de 0.8 ml/min., durante 30 minutos ao longo dos quais foram recolhidas 8 fracções. Uma das fracções recolhidas corresponde ao pico de Progesterona (TR- 12 min. no programa ESTE).

III. Quantificação de Progesterona por RIA em Amostras de Ovário e Hemolinfa de *Penaeus japonicus* e *P. kerathurus*

Penaeus japonicus

Na espécie *P. japonicus*, a concentração de Progesterona no ovário no início do seu desenvolvimento (fase I) é de cerca de 4 ng/g de peso seco (n=6), constituindo este o valor máximo encontrado em todo o ciclo vitelogénico (figura 4.4.).

Na fase seguinte (fase II), o valor da Progesterona situa-se abaixo de 1 ng/g, (sendo no entanto este valor proveniente de um só animal). Na fase III, o valor é de cerca de 2 ng/g (n=7) e torna-se ainda mais reduzido na fase IV para na fase final de desova (fase V) voltar a atingir um valor próximo do inicial (cerca de 3 ng/g, n=4).

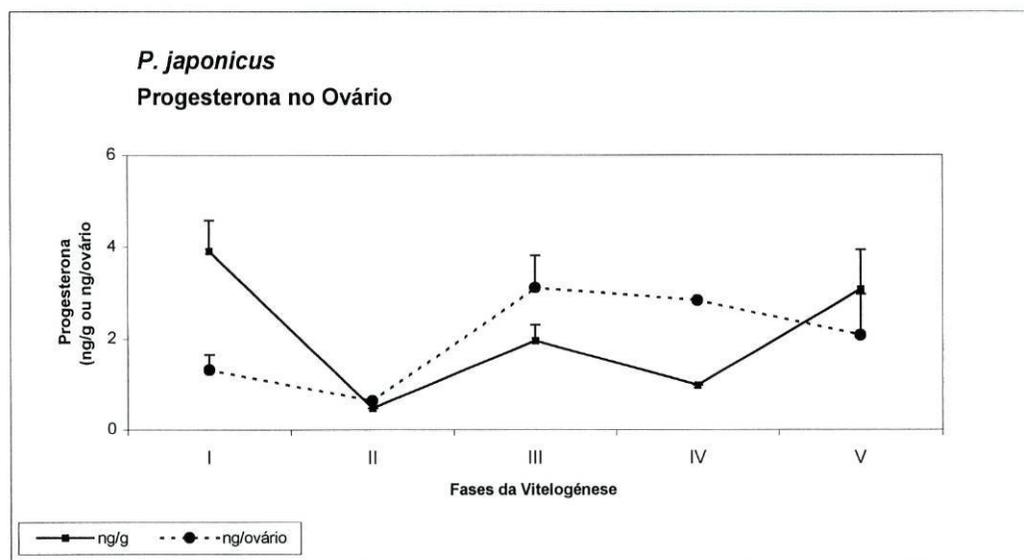


Figura 5.4. Níveis de Progesterona no ovário de *P. japonicus*, ao longo da vitelogénese. As barras verticais indicam o erro padrão.

Tendo em conta o aumento do peso do ovário ao longo da vitelogénese, foi calculada a quantidade de Progesterona no ovário. Esta apresenta o seu menor valor no início do ciclo, dado o reduzido peso do ovário nesta fase, aumentando nas fases III e IV (cerca de 3ng/ovário), para durante a desova e devido à diminuição do peso do ovário pela saída dos ovos, voltar a baixar a sua quantidade total (2 ng/g) em contraste com o aumento da concentração nesta fase do ciclo (figura 5.4.).

Penaeus kerathurus

Os resultados obtidos nesta espécie dos níveis de Progesterona no ovário e hemolinfa estão representados graficamente na figura 5.5.

O ovário da espécie *P. kerathurus*, apresenta no início do seu desenvolvimento isto é nas fases I e II, os níveis de Progesterona mais baixos do ciclo (0.3 e 0.5 ng/g, n=4), os quais são elevados para cerca de 2 ng/g nas fases seguintes, alcançando o máximo na fase final de maturação e desova (fase V, 2.6 ng/g, n=5).

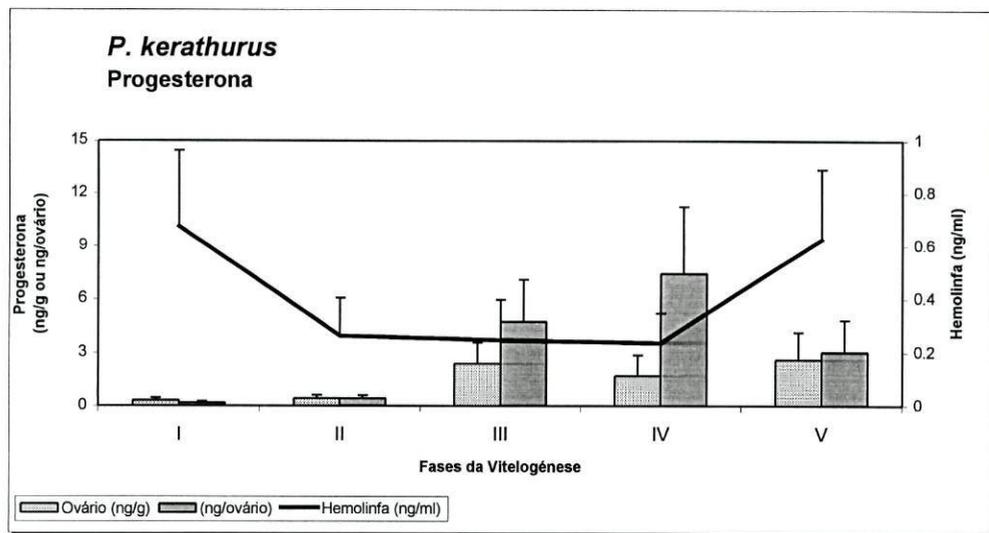


Figura 5.5. Níveis de Progesterona no ovário de *P. kerathurus*, ao longo da vitelogênese. As barras verticais indicam o erro padrão.

O grande aumento do peso do ovário observado na passagem da fase III para a fase IV resulta no aumento da quantidade total de Progesterona em todo o ovário verificado na fase final da vitelogênese (IV) situando-se em 7.5 ng (n=5), o que representa cerca do dobro da fase anterior (fase III). Finalmente, a saída dos ovócitos, e não obstante o aumento da concentração da hormona nesta fase final, determina a diminuição da quantidade existente no ovário na fase V, a qual se situa em cerca de 3 ng (n=4).

Na hemolinfa, os resultados obtidos apontam para dois pontos máximos do ciclo, na fase I (n=4) e na fase V (n=6) com 0.7 e 0.6 ng/ml respectivamente, mantendo-se o nível de cerca de 0.25 ng/ml nas restantes fases do ciclo de desenvolvimento do ovário (n=16).

Na figura 5.6. estão representadas as curvas obtidas para os valores de Progesterona no ovário da espécie *P. japonicus* e no ovário e hemolinfa da espécie *P. kerathurus*.

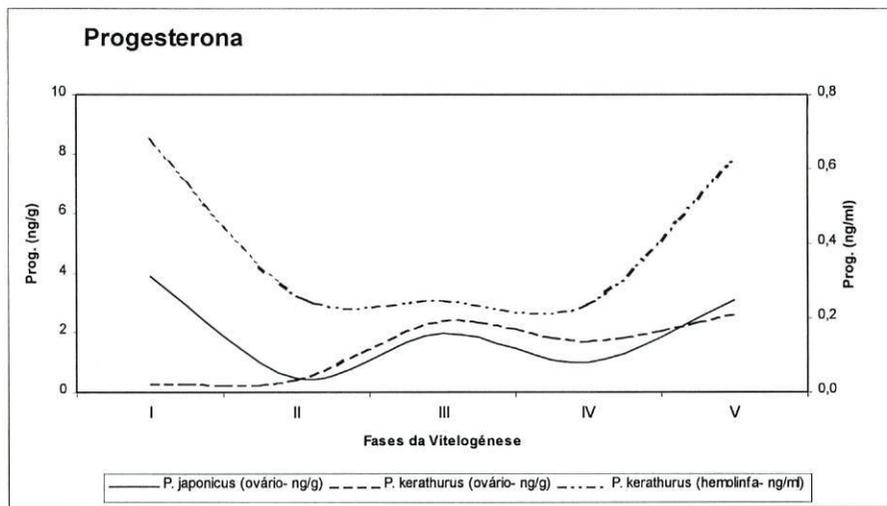


Figura 5.6. Comparação dos perfis de Progesterona no ovário de *P. japonicus* e *P. kerathurus*, e hemolinfa de *P. kerathurus* ao longo da vitelogenese.

Exceptuando os baixos valores de Progesterona verificados no ovário da espécie *P. kerathurus* no início do ciclo vitelogénico e que contrastam com os níveis elevados na hemolinfa assim como no ovário do *P. japonicus*, a variação é semelhante em todas as outras fases para as duas espécies e nos dois tecidos estudados.

Assiste-se a uma diminuição dos níveis da hormona (ou manutenção de um nível baixo) da fase I para a fase II, seguida de uma tendência de aumento na fase III, mais pronunciada no ovário, para depois de uma ligeira diminuição na fase IV voltar a aumentar na fase V ou seja na desova, cujos valores são semelhantes aos da fase I parecendo fechar de forma contínua o ciclo vitelogénico.

Discussão

Foram identificados, por espectrometria de massa, vários esteróides sexuais no ovário da espécie *P. japonicus*. A presença inequívoca de Pregnenolona e Testosterona nesta espécie vem confirmar os resultados obtidos, também por cromatografia de gás-espectrometria de massa (GC-MS), por Fairs *et al.* (1990), no ovário da espécie *P.*

monodon. Estes esteróides foram também detectados, por co-eluição com padrões autênticos em HPLC, na hemolinfa de *P. japonicus*, por Summavielle *et al.* (1996). A 17 α -Hidroxiprogesterona foi também identificada no ovário de *P. japonicus*. Nesta mesma espécie, Yano (1987) demonstrou a acção estimuladora deste esteróide na síntese e/ou libertação de vitelogenina na hemolinfa.

Foi também detectada e identificada no ovário de *P. japonicus* a Progesterona, esteróide já detectado nesta espécie, através de HPLC, por Summavielle *et al.* (1996). Igualmente por espectrometria de massa, Fairs *et al.* (1990), identificaram este esteróide no ovário da espécie *P. monodon*.

Não foi ainda estabelecido o papel fisiológico destes esteróides sexuais nos invertebrados, nomeadamente nos crustáceos (Lafont, 1991). No entanto, a sua presença inequívoca nestes animais, demonstrada por vários autores, assim como a evidência do seu efeito na estimulação da vitelogénese (Yano, 1985, 1987) sugerem que o desenvolvimento do ovário e a maturação dos ovócitos podem ser regulados por hormonas esteróides de forma semelhante ao que acontece em peixes e anfíbios (Fairs *et al.*, 1990). A variação dos níveis de vários esteróides ao longo da vitelogénese durante a maturação dos ovócitos em crustáceos (Couch *et al.*, 1987, Fairs *et al.*, 1990, Summavielle *et al.*, 1996) são um forte argumento de que os esteróides estão realmente envolvidos nestes processos.

A variação dos níveis de Progesterona no ovário da espécie *P. kerathurus* ao longo do ciclo vitelogénico revela serem as fases finais deste ciclo, isto é, o fim da vitelogénese secundária (fase III), aparecimento das vesículas corticais e maturação do ovócito (fase IV) e finalmente a desova (fase V), as fases que apresentam os níveis mais elevados. A subida dos níveis de cerca de 0.4 ng/g das fases I e II para 2.3 ng/g na fase III seguida de uma ligeira descida na fase IV para 1.7 ng/g está de acordo com os resultados obtidos por Fairs *et al.*, (1990), na espécie *P. monodon*. Na fase III, esta espécie apresenta 2.7 ng/g e na fase IV 1.3 ng/g. Estes autores não analisaram animais em desova (fase V). Os nossos resultados nesta fase corresponderam ao máximo encontrado de 2.6 ng/g. Dado que a fase V corresponde à desova, o elevado valor de

concentração de Progesterona nesta fase resulta numa quantidade da hormona inferior em todo o ovário sendo a fase IV, que corresponde à maturação final do ovário aquela que apresenta o valor mais elevado (7.5 ng/ovário). O perfil das variações de Progesterona na hemolinfa da espécie *P. kerathurus* é semelhante ao do ovário com excepção da fase I (início do desenvolvimento do ovário) a qual apresenta valores próximos dos da fase V (0.68 e 0.63 ng/ml respectivamente). Curiosamente, na espécie *P. japonicus*, a variação dos níveis de Progesterona no ovário segue um perfil idêntico ao descrito para a hemolinfa de *P. kerathurus*, apresentando os máximos nas fases I e V, os mínimos em II e IV. No crustáceo *Artemia* os níveis de Progesterona são aumentados durante as últimas fases do ciclo reprodutivo em simultâneo com a descida dos níveis de estrogénios (Van Beek *et al.*, 1988). Desta forma parece que à medida que se aproxima a desova, os níveis de progestagénios aumentam e os dos estrogénios diminuem. Nos peixes e anfíbios os progestagénios estão envolvidos na estimulação da maturação dos ovócitos (cisão da vesícula germinal-GVBD), e pelos nossos resultados, juntamente com os obtidos por Fairs *et al.*, (1990) e Van Beek e De Loof (1988) poderá um sistema análogo estar envolvido na regulação da ovogénese nos crustáceos.

Parte III. Dieta Viva de Maturação

*Presença de Ecdisteróides e Esteróides Sexuais em Poliquetas
Utilizados em Aquacultura para Indução da Maturação Ovárica
de Fêmeas em Cativeiro.*

Introdução

Vários estudos biológicos e zootécnicos, com especial atenção para o processo da reprodução (Redón e San Feliú, 1993, Rodriguez, 1985, San Feliú e Oltra, 1987), têm contribuído para a evolução da produção dos peneídeos *Penaeus japonicus* e *P. kerathurus* na Península Ibérica (ver Introdução Geral). O conhecimento do papel dos ecdisteróides e esteróides sexuais do tipo de vertebrados na reprodução dos crustáceos, bem como a sua presença e possíveis funções nos invertebrados que fazem parte da alimentação dos crustáceos (ou incluídos na dieta no caso da aquacultura), poderá ser utilizado para o incremento da produção em aquacultura.

Várias hormonas esteróides foram identificadas nos invertebrados. De facto, ecdisteróides e esteróides sexuais do tipo de vertebrados estão presentes em todos os invertebrados estudados, embora pouco se saiba quanto ao seu papel na reprodução nestes animais.

Tem sido demonstrado que, para além do seu envolvimento na muda, os ecdisteróides podem ter ainda uma função na estimulação da síntese proteica no ovário e na produção da vitelogenina (ver capítulo 4). Por exemplo, foi encontrada em várias espécies de crustáceos uma correlação entre os níveis de ecdisteróides e o desenvolvimento vitelogénico (Okumura *et al.*, 1992, Summavielle *et al.*, 1995, Walgraeve *et al.*, 1988, Wilder *et al.*, 1991, Young *et al.*, 1993a,b). Por outro lado, a presença assim como a síntese de diversos esteróides sexuais foram detectados nos ovários de crustáceos (ver capítulo 5), sugerindo um papel na vitelogénese destes animais (Lafont, 1991).

As poliquetas constituem uma das dietas naturais preferenciais dos camarões. A aquacultura de camarões veio aumentar a importância das poliquetas como suplemento de alimento natural a fornecer aos camarões, principalmente às fêmeas reprodutoras. Tem sido sugerido que os ácidos gordos poli-insaturados (Luís e Ponte, 1993, Lytle e Lytle, 1990) e prostaglandinas (D'Cross *et al.*, 1988) presentes nas poliquetas são

responsáveis pela estimulação do crescimento e rápido desenvolvimento das gónadas. No entanto, a existência e possível função na reprodução de crustáceos, de outros constituintes das poliquetas como os ecdisteróides e esteróides sexuais do tipo de vertebrados, não foi ainda estabelecida.

Neste trabalho, foram identificados e quantificados vários compostos esteróides utilizando o método desenvolvido neste trabalho (capítulo 3) para a extracção e purificação simultânea de ecdisteróides e esteróides sexuais. Baseados nos resultados, discutimos o possível papel dos esteróides e ecdisteróides na reprodução e maturação dos crustáceos e de uma possível origem adicional e exógena destas hormonas através do consumo de um dos seus alimentos preferidos, isto é, as poliquetas.

Material e Métodos

Serão apresentados de forma sucinta neste capítulo os métodos utilizados, uma vez que estes foram objecto de uma descrição detalhada na Parte II (capítulo 3, 4 e 5).

Extracção e purificação simultânea de ecdisteróides e esteróides

Os espécimes de *Americanuphis magna* foram capturados numa praia próxima de Chacopata, Venezuela e os de *Nereis diversicolor*, são provenientes da foz do Rio Douro, Porto. Para os primeiros, foi obtido um extracto etanólico dos animais (67.3 g peso seco/l), por maceração a 4°C seguida de filtração por vácuo, e no segundo caso os extractos foram obtidos com metanol em amostras (cerca de 300 mg) de animais liofilizados. As hormonas foram purificadas dos extractos etanólico e metanólico segundo o procedimento descrito detalhadamente no capítulo 3.

Enzimo-imuno-ensaio (EIA) e Radio-imuno-ensaio (RIA)

Para a quantificação dos ecdisteróides foi utilizado o método enzimo-imunológico (EIA) desenvolvido por Porcheron *et al.* (1989) e descrito no capítulo 4.

A fracção correspondente ao pico de Progesterona, identificada por co-eluição com o padrão autêntico, foi quantificada através de um kit comercial de fase sólida COAT-A-COUNT ¹²⁵I-RIA da Diagnostic Products Corp. (Los Angeles, CA) cujo procedimento é detalhado no capítulo 5.

Resultados

Ecdisteróides

O nível de ecdisteróides livres totais, em extractos totais de *A. magna*, foram de 34.8×10^{-3} nmol/g de peso seco (17.4 ng/g). A análise destes extractos por HPLC é mostrado no cromatograma da figura 6.1. Nas 14 fracções resultantes da separação por HPLC, foram identificados quatro picos, por co-eluição com padrões autênticos:

- a) 26-OH-Polipodina+20,26 Ecdisona (f1; RT=4.9 min.).
- b) 20- OH-Ecdisona (f2; RT=9.4 min.).
- c) Ecdisona (f4; RT=13.6 min.).
- d) Ponasterona A (f10; RT=38.5 min.).

A fracção maioritária (42.6%) foi a 20- OH-Ecdisona (9.46×10^{-3} nmol/g peso seco) e a ecdisona representou apenas 4.3% do total das fracções com reactividade no EIA. A fracção (f1) correspondendo às hormonas 26-OH-Polipodina+20,26 Ecdisona constituíram 10.2% e a (f10) Ponasterona A, 2.2%. Assim, os ecdisteróides identificados representaram 59.3% dos ecdisteróides recolhidos.

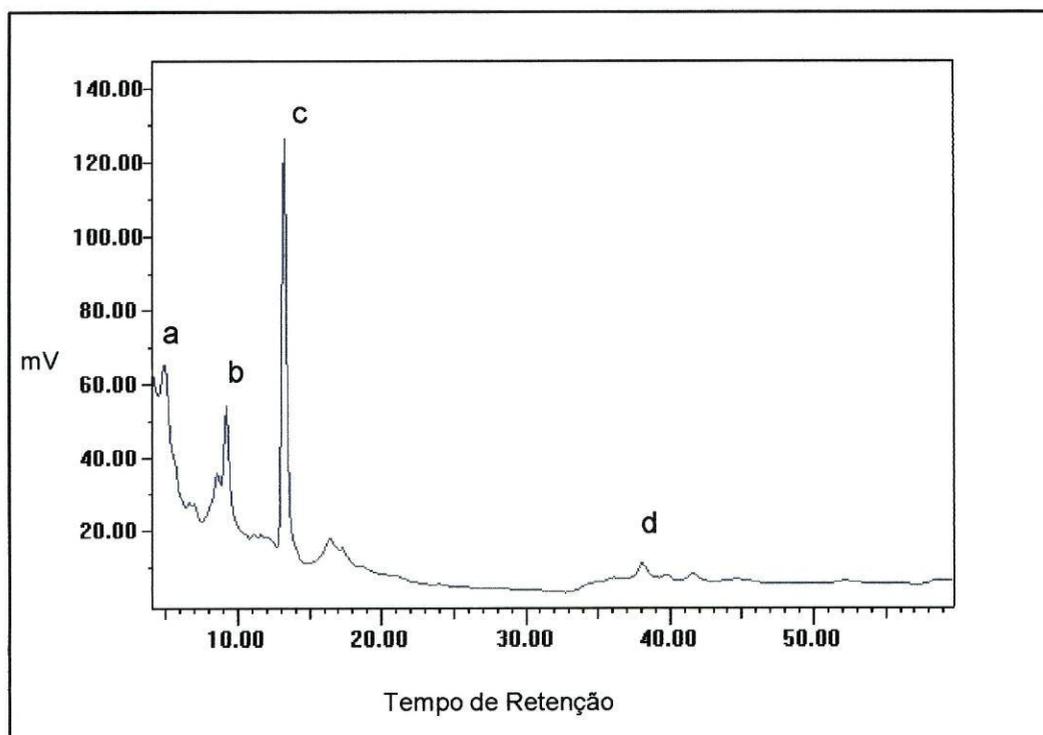


Figura. 6.1. Cromatograma de separação de ecdisteróides em extractos purificados de todo o corpo de *A. magna*, por HPLC (RP-HPLC -Gilson, coluna de fase reversa C18, 250 mm de comprimento e 4 mm Ø), gradiente metanol/água 45/55 a 50/50 (v/v) durante 60 minutos): a- 26-OH-Polipodina e 20-26 Ecdisona (f1), b- 20-OH-Ecdisona (f2), c- Ecdisona (f4) e d- Ponasterona A (f10).

Foram igualmente detectados outros picos, com reactividade no EIA (figura 6.2). A fracção (f3) com uma polaridade entre a 20- OH-Ecdisona e a Ecdisona, foi a mais representativa dos ecdisteróides não-identificados (12.1%). Ecdisteróides não-identificados com polaridade inferior à Ponasterona A ainda representam 15.4% do total de ecdisteróides. Não foram detectados níveis da hormona 2-deoxi-20-OH-Ecdisona, correspondendo à fracção (f6, RT=22 min.) usada como padrão.

Na espécie *Nereis diversicolor* os níveis de ecdisteróides totais livres encontrados variaram entre 0.8 e 4.2×10^3 pmol/g (peso seco) ou seja entre 400 a 2100 ng/g de peso seco, em sete amostragens efectuadas ao longo de cinco meses (de Outubro a Fevereiro).

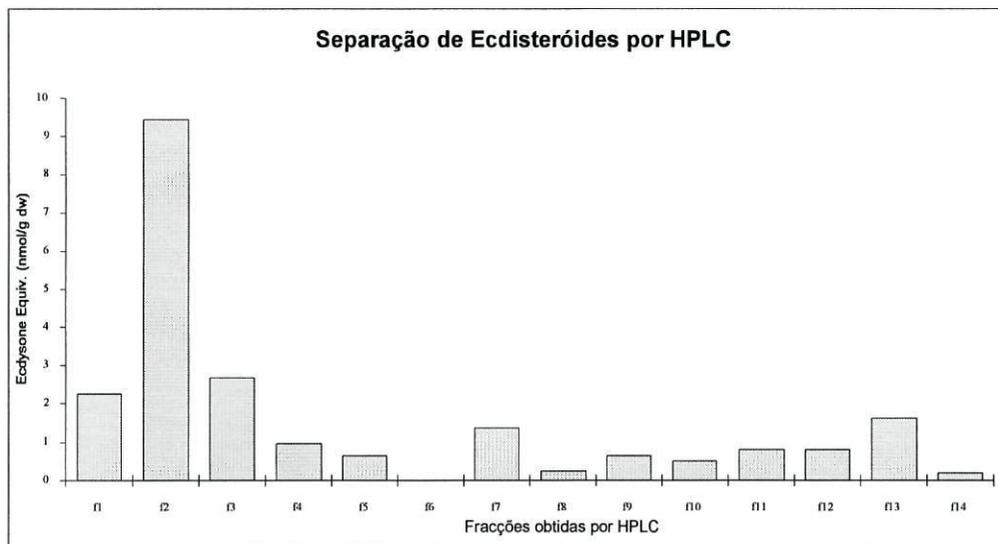


Figura. 6.2. Quantificação por EIA de cada uma das 14 fracções, obtidas por separação por HPLC. Todos os valores são expressos como equivalentes à Ecdisona (nmol/g peso seco). Cinco fracções foram identificadas como 26-OH-Polipodina+20,26 Ecdisona (f1; RT=4.9 min.), 20- OH-Ecdisona (f2; RT=9.4 min.), Ecdisona (f4; RT=13.6 min.), 2-Deoxi-20-OH-Ecdisona (f6; RT=22.0 min.) e Ponasterona A (f10; RT=38.5 min.) por co-eluição com padrões autênticos.

Esteróides

A análise por RIA do pico identificado como Progesterona resultou numa concentração de 0.57 ng/g peso seco. Outros picos não identificados podem ser observados no cromatograma da figura 6.3. Vários destes picos, representando produtos de menor polaridade que a Progesterona, parecem revelar quantidades significativas a julgar pelo tamanho relativo apresentado no cromatograma.

Na espécie *Nereis diversicolor* os níveis de Progesterona quantificados no extracto bruto variaram entre 5.7 e 16.4 ng/g (peso seco).

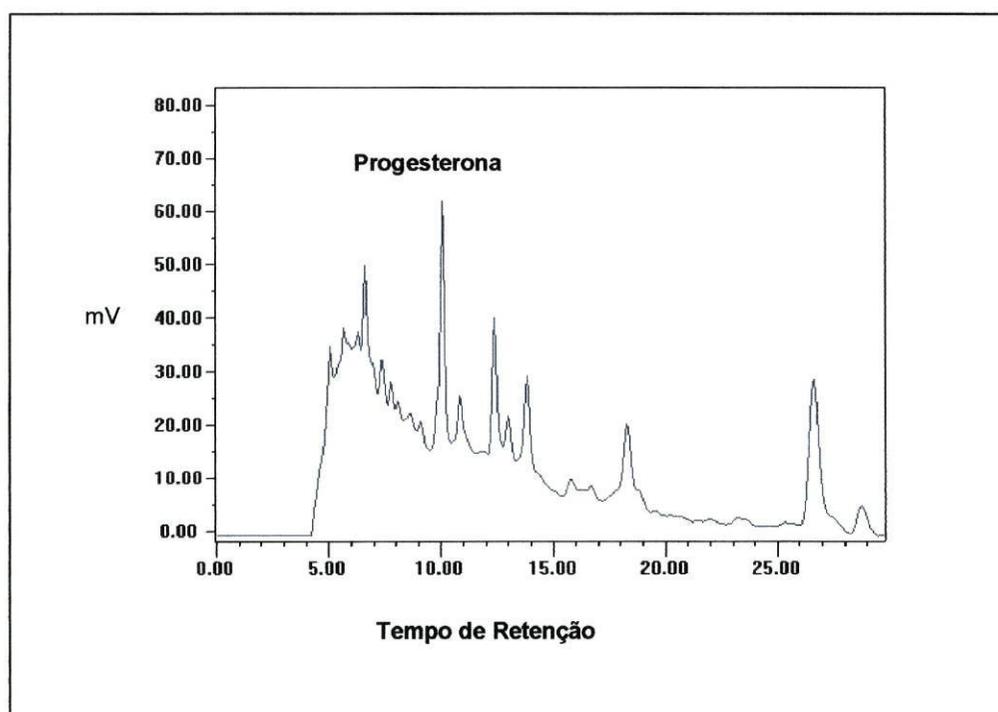


Figura. 6.3. Cromatograma de separação de esteróides, em extractos purificados de todo o corpo de *A. magna*, por HPLC. (RP-HPLC-Gilson, coluna de fase reversa C18, 250 mm de comprimento e 4 mm Ø), usando um programa isocrático de metanol/água 80/20 (v/v) durante 30 minutos.

Discussão

Os presentes resultados mostram a presença de consideráveis quantidades (34.8×10^{-3} nmol/g) de ecdisteróides livres em extractos totais de *A. magna*. Nestes extractos foram também encontrados 0.57 ng de Progesterona por grama de peso seco, e ainda vários picos não identificados, provavelmente representando outros esteróides, que podem ser observados no cromatograma em níveis significativos.

A presença de ecdisteróides e esteróides na *A. magna*, bem como os conhecidos efeitos zotécnicos na reprodução de crustáceos em cativeiro que se alimentam destes organismos (Luís e Ponte, 1993, Redón e San Feliú, 1993), sugerem que hormonas exógenas (vindas na dieta natural) podem ter um papel na indução da rápida maturação do ovário. Estes efeitos podem ser sinérgicos ou independentes de outros

do ovário. Estes efeitos podem ser sinérgicos ou independentes de outros componentes como os ácidos gordos poli-insaturados (Luís e Ponte, 1993, Lytle e Lytle, 1990) e as prostaglandinas (D’Croze *et al.*, 1988).

A presença e possível papel dos ecdisteróides na reprodução dos invertebrados é um tema que está a ser actualmente investigado em vários laboratórios. Por exemplo, em *Macrobrachium nipponense* foi encontrada uma relação entre os níveis de ecdisteróides e a vitelogenese (Okumura *et al.*, 1992). No ovário de *M. rosenbergii*, o final da vitelogenese (incluindo a cisão da vesícula germinal) é sincronizada com o ciclo da muda, com a cópula e a desova, e é acompanhada pelo aumento da acumulação de ecdisteróides no ovário, mecanismo este similar ao descrito para os insectos (Young *et al.*, 1993b). Outra analogia entre insectos e crustáceos foi claramente demonstrada com a descoberta de que os ecdisteróides estão envolvidos na reiniciação meiótica nestes dois grupos de artrópodes (Lanot e Clédon, 1989).

No presente trabalho foi encontrada uma variação nos níveis de ecdisteróides, ao longo do ciclo de maturação, em extractos de ovário de *P. japonicus* e *P. kerathurus* (capítulo 4). Em ambos os casos, e de forma idêntica ao que acontece na poliqueta *A. magna*, a hormona activa 20-OH-Ecdisona representou sempre a maior fracção.

Em invertebrados não-artrópodes, os ecdisteróides parecem envolvidos em diversos processos como o crescimento, desenvolvimento e gametogénese. Nas espécies *Paranemertes peregrina* e *P. californiensis* (Nemertinea), a concentração de ecdisteróides aumenta durante a época reprodutiva, sugerindo o seu envolvimento na reprodução (Snyder *et al.*, 1992). Em alguns poliquetas, a gametogénese é controlada negativamente por um neuro-peptido (nereidina) secretado no cérebro, tendo sido sugerido que os ecdisteróides, libertados pelos ovócitos em crescimento, actuem por um mecanismo de “feed-back” negativo no cérebro inibindo a secreção de nereidina (Lafont, 1991). Os gastrópodes possuem ecdisteróides, mas como nos outros invertebrados não-artrópodes, o seu significado biológico bem como a sua origem permanece conjectural. Mais de 80% de ecdisteróides ingeridos (Ecdisona e 20-OH-Ecdisona) permanece não-metabolizada e é excretada como tal (Garcia *et al.*, 1995).

As hormonas esteróides sexuais, que nos vertebrados regulam e coordenam processos específicos, como a reprodução e a homeostase mineral, foram recentemente isolados e quimicamente identificados em vários artrópodes incluindo crustáceos (Couch *et al.*, 1987) e insectos (Bidmon e Stumpf, 1991)(ver revisão de Lafont, 1991).

Hormonas esteróides do tipo de vertebrados flutuam de acordo com o ciclo sexual em diversos invertebrados (Couch *et al.*, 1987, Reis-Henriques *et al.*, 1990, Summavielle *et al.*, 1995), e frequentemente o teor de esteróides no ovário aumenta com a sua maturação. Proteínas transportadoras destes esteróides têm sido descritas em vários invertebrados (Bidmon e Stumpf, 1991).

Alguns esteróides detectados em tecidos e fluídos corporais de várias espécies de crustáceos têm mostrado ser biologicamente activos na estimulação da vitelogénese (ver Lafont, 1991 para uma revisão). Assim, tem sido sugerido que o desenvolvimento ovárico e a maturação do ovócito pode ser regulado por hormonas esteróides de forma semelhante ao que acontece nos peixes e anfíbios (Fairs *et al.*, 1990).

Em fêmeas não-ablacionadas de *P. japonicus*, não só foi obtida uma maior percentagem de maturação quando na dieta se incluíam poliquetas (*Nereis diversicolor*), como também esta mesma dieta se mostrou essencial para se obterem rematurações (Redón e San Feliú, 1993).

Naquela espécie, assim como em *P. kerathurus*, os níveis no ovário da hormona esteróide Progesterona, variam ao longo do ciclo de maturação (capítulo 5).

Desta forma, ecdisteróides e esteróides sexuais do tipo de vertebrados poderão ter um papel na reprodução de peneídeos, independentemente da sua origem. A possibilidade do mesmo ser possível para as próprias poliquetas não pode ser excluído sendo necessário aprofundar os estudos.

Tomados em conjunto, todos estes dados sugerem que, quer os ecdisteróides quer os esteróides presentes na poliqueta *A. magna*, podem ser factores responsáveis pela indução da rápida maturação do ovário, efeito zootécnico este já utilizado na

aquacultura mediante a alimentação dos camarões com poliquetas.

Discussão Geral e Perspectivas Futuras

Discussão geral e perspectivas futuras

A importância da cultura de camarões peneídeos, principalmente no Sudoeste Asiático e nos países Latino-americanos, contrasta com a diminuta produção destes animais na Europa (principalmente Espanha e Itália) e mais acentuadamente com a sua ausência na aquacultura portuguesa (Lee e Wickins, 1992; Laubier e Laubier, 1993). No entanto, a presença na costa sul de Portugal do peneídeo autóctone *Penaeus kerathurus*, constitui um imperativo ao seu estudo, nomeadamente em aspectos de aplicação prática como seja o seu ciclo reprodutivo (Figueiredo, 1972; Luís, 1988). Por outro lado, vários aspectos de investigação fundamental nos peneídeos, têm resultado em contribuições para o conhecimento dos mecanismos gerais da ovogénese dos crustáceos (Quackenbush, 1991). As investigações na área do controlo do ciclo reprodutivo de peneídeos, passíveis de aplicação em aquacultura, poderão no futuro resultar numa transferência tecnológica para países produtores. De facto, o interesse pelos resultados obtidos ao longo deste trabalho, demonstrada por vários grupos sul-americanos com quem mantemos relações de colaboração científica, é nessa perspectiva um bom indicativo.

Os resultados presentes neste trabalho, fruto da investigação em animais selvagens durante a época reprodutiva, podem constituir uma base de comparação em trabalhos futuros de carácter mais interventivo e aplicadas em animais em cativeiro. Assim, os resultados obtidos com as manipulações normalmente utilizadas para induzir a vitelogénese e/ou a desova (alimento, ablação do pedúnculo ocular, choque térmico) em populações em cativeiro, poderão ser agora monitorizados de forma a serem comparados com este trabalho de base e desta forma ajudar a definir melhor o papel das hormonas ecdisteróides e esteróides sexuais na reprodução dos peneídeos.

Este trabalho foi iniciado com o estudo das características morfológicas do ovário durante a época reprodutiva, com o objectivo de estabelecer distintas fases do ciclo vitelogénico. Tendo por base algumas classificações propostas por vários autores

(Meusy e Payen, 1988; Yano, 1988; Tan-Fermin e Pudera, 1989, entre outros) e reconhecidas nas duas espécies objecto de estudo as características mais proeminentes que permitissem distinguir inequivocamente distintas fases da ovogénese, foram os animais agrupados em cinco fases vitelogénicas para o estudo posterior dos níveis hormonais. Recentemente, o trabalho de Medina *et al.* (1996) nas mesmas espécies de peneídeos veio confirmar a validade dos critérios de divisão das fases vitelogénicas utilizados ao longo deste trabalho. A inclusão de uma fase de desova, ignorada por muitos autores, acarreta no entanto algumas incertezas tratando-se de animais selvagens: a capacidade de rematuração rápida do ovário após uma desova é nestes animais frequente e muito rápida (Yano, 1984). Desta forma é possível encontrar, dentro do grupo de animais considerados em desova, animais em vários estádios fisiológicos distintos e que só o estudo futuro com animais em cativeiro poderá vir a diferenciar.

O estudo da ultraestrutura do ovócito ao longo da vitelogénese permitiu a descrição, inédita nestes animais, da formação dos organelos citoplasmáticos, da origem das vesículas vitelinas e das vesículas corticais. Uma vez estabelecida cronologicamente a sucessão destes acontecimentos e a sua caracterização morfológica, será possível a utilização futura da microscopia electrónica como potente "ferramenta" para vários estudos de carácter interventivo (p. ex. as já referidas manipulações utilizadas na aquacultura para induzir a maturação, a administração de doses biológicas de várias hormonas). Por outro lado os resultados obtidos abrem novas perspectivas de estudo na interface morfologia/função. Que significado terá a existência de dois tipos de células foliculares encontradas? Estarão relacionadas com a síntese de vitelogenina como sugeriu Yano e Chinzei (1987)? Ou com o controlo endocrinológico da reprodução dando origem à "hormona ovárica estimuladora da vitelogenina, VSOH) como propõe Payen (1980) ou a hormonas esteróides (Meusy e Payen, 1988; Van Herp e Payen, 1991)? A descoberta nesta espécie de pontes intercelulares entre dois ovócitos e o desenvolvimento de ovócitos aplanados e de crescimento lento, levanta a hipótese da existência de verdadeiras células nutritivas até hoje não descritas nestes animais. O próprio processo de apoptose apresentado por estas células e sua possível regulação (por

hormonas esteróides?) merece um estudo aprofundado. Dada a importância dos lípidos como componentes do vitelo, merece maior atenção a origem das gotículas lipídicas que, na maioria dos animais estudados, parecem surgir *de novo*, sem qualquer relação aparente com organelos citoplasmáticos (Beams e Kessel, 1963; Papathanassiou e King, 1984). A possível entrada no ovócito de precursores extraovocíticos do vitelo, através de endocitose mediada por receptores deverá ser objecto de estudos mais aprofundados, quer quanto à especificidade dos receptores quer quanto à regulação da sua expressão.

O presente trabalho teve como objectivo o estudo da relação entre níveis de ecdisteróides e esteróides sexuais e o desenrolar da vitelogénese. O desenvolvimento de um método de purificação simultânea dos dois tipos de hormonas centrou-se apenas nas hormonas livres, principalmente nas hormonas activas ou seus possíveis precursores. No entanto, reconhecemos a importância que as hormonas conjugadas (sulfatos, glucuronatos) têm, quer como indicadores do metabolismo hormonal (Fairs *et al.*, 1990; Summavielle *et al.*, 1995), quer como eventuais sinais químicos ou mesmo “feromonas”. Daí que o método desenvolvido deva, no futuro, ser modificado de forma a “recuperar” as formas hormonais conjugadas, usuais no metabolismo e/ou excreção destas hormonas. Das várias hormonas esteróides separadas por HPLC centramos a nossa atenção na Progesterona. Os estudos irão progredir no sentido da separação e quantificação de outras hormonas esteróides que permitam demarcar a importância relativa de cada uma delas bem como a sua relação com a vitelogénese.

Os resultados obtidos neste trabalho da variação dos níveis de ecdisteróides ao longo da vitelogénese sugerem uma relação destas hormonas com a reprodução. No entanto para o estabelecimento do papel exacto destas hormonas na ovogénese nestes animais será necessário um estudo aprofundado. O estudo da vitelogénese numa população selvagem acarreta, a nosso ver, algumas desvantagens. A maior entre elas é o desconhecimento da “história” do animal. Como já foi referido, durante a época de reprodução, estes animais podem realizar várias desovas. Deste modo poderá existir alguma indefinição, em animais selvagens, entre animais em desova e animais em início

de previtelogénese traduzindo estados fisiológicos distintos em animais classificados nessas fases vitelogénicas. Por fim, não deve ser menosprezada a própria variabilidade biológica de que resulta a necessidade do estudo de um maior número de animais.

A conjugação do conhecimento dos níveis de várias hormonas ecdisteróides e esteróides em estádios fundamentais da ovogénese dos camarões, bem como a caracterização ultraestrutural da vitelogénese, possibilitará em consequência, a experimentação quer *in vivo* quer *in vitro* da acção de doses biológicas dessas hormonas (ou outras), ou de outros “estímulos” conhecidos, já referidos, como sejam a ablação do pedúnculo ocular, o choque térmico e a alimentação com a devida monitorização através de “ferramentas” tão potentes como a microscopia electrónica (modificações ultraestruturais nos processos previamente caracterizados) e a cromatografia líquida conjugada com processos quantitativos radio e enzimo-imunológicos (modificações no perfil “normal” das hormonas esteróides). Finalmente, o “estímulo” alimentação vem normalmente associado com rapidez e sucesso da desova em animais em condições de cultura e está relacionado com a presença de poliquetas na dieta viva (Redon e San Feliú, 1993). Nestes animais existe uma composição bem balanceada em ácidos gordos poli-insaturados (Lytle e Lytle, 1990; Luís e Ponte, 1993), bem como a presença de prostaglandinas (D’Croz *et al.*, 1988) factores estes que pareçam responsáveis pelo efeito na indução da vitelogénese e/ou maturação nos camarões. O resultado deste trabalho revelando a presença de níveis consideráveis de ecdisteróides e esteróides sexuais em duas espécies de poliquetas poderá aumentar a lista de “indutores da maturação” presentes nestes animais. Independentemente da questão do papel destes compostos nas próprias poliquetas (serão hormonas? serão sintetizadas ou têm origem exógena?), esta possível via de entrada de hormonas ou dos seus precursores com papel preponderante na ovogénese deverá ser analisada nomeadamente com experiências de incorporação de hormonas marcadas radioactivamente.

Resumo

Resumo

A importância da cultura do camarão peneídeo *Penaeus japonicus*, bem como a existência no sul de Portugal da espécie autóctone *P. kerathurus* justificam o aprofundamento dos conhecimentos sobre o seu ciclo reprodutivo. O presente trabalho resulta de uma abordagem morfológica e endocrinológica da reprodução nestas espécies, através do estudo das alterações morfológicas do ovário e da ultraestrutura do ovócito bem como da sua relação com os níveis de hormonas ecdisteróides e esteróides sexuais durante a ovogénese.

O estudo histológico do ovário de *P. japonicus* e *P. kerathurus* permitiu definir cinco fases vitelogénicas: Fase I – Previtelogénese. Fase II - Previtelogénese avançada ou vitelogénese primária. Fase III - Vitelogénese (vitelogénese secundária). Fase IV - Maturação (formação de vesículas corticais). Fase V – Desova.

O presente trabalho constitui o primeiro estudo ultraestrutural da vitelogénese na espécie *P. kerathurus*, demonstrando pela primeira vez nos peneídeos, a formação do retículo endoplásmico e a origem dos grânulos densos. A origem dos vacúolos autofágicos e a presença simultânea de dois tipos de células foliculares nos crustáceos, bem como a presença de pontes intercelulares ("nurse-cells") na sub-classe malacostraca, constituem igualmente observações inéditas deste trabalho. Em *P. kerathurus* o vitelo tem uma origem mista, i. e., intraovocítica e extraovocítica. No início da vitelogénese predominam os fenómenos de endocitose mediada por receptores. Numa fase posterior, o processo vitelogénico é fundamentalmente intraovocítico, exibindo apenas escassos fenómenos de endocitose. A síntese de vitelo endógeno, que nesta espécie apresenta características peculiares, é descrito detalhadamente. Finalizada a vitelogénese, observa-se a formação das especializações corticais (vesículas corticais com estruturas do tipo "proteoglicano") cuja origem e desenvolvimento são descritas pela primeira vez nos peneídeos.

Tendo como objectivo a quantificação de hormonas esteróides e ecdisteróides no ovário e na hemolinfa de peneídeos foi desenvolvido um método de extracção, purificação e separação simultânea para os dois tipos de hormonas. O método compreende uma extracção em fase sólida do extracto metanólico bruto, seguida de uma separação por HPLC em coluna de fase reversa, em dois programas interligados: gradiente metanol/água para separação dos ecdisteróides e um sistema isocrático

metanol/água para separação dos esteróides. A validação deste método resultou em níveis de reproductibilidade elevados e rendimentos superiores a 90%. Os ecdisteróides (totais e Ecdisona, 20-OH-ecdisona, Ponasterona A, entre outros) foram posteriormente quantificados por enzimo-imuno-ensaio (EIA) e a Progesterona por radio-imuno-ensaio (RIA), no ovário de *P. japonicus* e no ovário e hemolinfa de *P. kerathurus* ao longo das cinco fases vitelogénicas. Os resultados revelam a relação possível dos ecdisteróides com a reprodução a vários níveis: como promotores da vitelogénese, na maturação do ovócito, no controlo da secreção do invólucro embrionário e finalmente actuando nos processos embriológicos dentro do ovo.

Foram identificados, por espectrometria de massa, vários esteróides sexuais do tipo de vertebrados no ovário da espécie *P. japonicus*: Pregnenolona, Testosterona, 17α -Hidroxiprogesterona e Progesterona. A variação dos níveis de Progesterona, quantificada por HPLC/RIA, no ovário de *P. japonicus* e no ovário e hemolinfa de *P. kerathurus* foi estudada ao longo do ciclo vitelogénico.

A indução rápida da maturação do ovário nos peneídeos em condições de cultura, mediante a alimentação com poliquetas, é um efeito zootécnico conhecido e utilizado amplamente em aquacultura. O doseamento de consideráveis quantidades de vários ecdisteróides e de Progesterona (bem como a presença no cromatograma de vários picos não identificados, provavelmente representando outros esteróides em níveis significativos) nas poliquetas *Americanuphis magna* e *Nereis diversicolor* sustenta a hipótese de que estas hormonas constituem os factores responsáveis pela referida indução da maturação.

Résumé

Résumé

L'importance de l'élevage de la crevette penaeidae *Penaeus japonicus*, aussi bien que l'existence, au sud du Portugal, de l'espèce autochtone *P. kerathurus* justifie l'approfondissement de la connaissance de leur cycle de reproduction. Ce travail est le résultat d'une approche morphologique et endocrinologique de la reproduction chez ces deux espèces, par l'étude des modifications morphologiques de l'ovaire et de l'ultrastructure de l'ovocyte en même temps que l'étude de leur rapport avec les niveaux des hormones ecdystéroïdes et stéroïdes sexuelles au cours de l'ovogenèse.

L'étude histologique de l'ovaire de *Penaeus japonicus* et de *P. kerathurus* nous a permis de définir cinq phases vitellogéniques: Phase I - Prévitellogenèse. Phase II - Prévitellogenèse avancée ou vitellogenèse primaire. Phase III - Vitellogenèse (vitellogenèse secondaire). Phase IV - Maturation (formation de vésicules corticales). Phase V - Ponte.

Ce travail décrit la première étude ultrastructurale de la vitellogenèse chez *P. kerathurus*, mettant en évidence, par la première fois, la formation du reticulum endoplasmique et l'origine des granules denses. L'origine des vacuoles autophagiques et la présence simultanée de deux types de cellules folliculaires chez les crustacés, aussi bien que la présence de ponts intercellulaires ("nurse-cells") chez la sub-classe des malacostraca, sont également des observations inédites décrites au cours de ce travail. Chez *P. kerathurus* le vitellus présente une origine mixte, i.e., intraovocitaire et extraovocitaire. Au début de la vitellogenèse les phénomènes d'endocytose à médiation par des récepteurs sont prédominants. Plus tard, le processus vitellogénique est d'origine essentiellement intraovocitaire, présentant un petit nombre de phénomènes d'endocytose. La synthèse du vitellus endogène, qui chez cette espèce présente des caractéristiques particulières, est décrite en détail. Dès que la vitellogenèse est terminée, nous observons la formation des spécialisations corticales (vésicules corticales présentant des structures dites proteoglycanes) dont la description de l'origine et du développement sont inédites chez les penaidés.

Dans le but de la quantification des hormones stéroïdes et ecdystéroïdes dans l'ovaire et l'hémolymphe des penaidés nous avons développé une méthode d'extraction, purification et séparation simultanée de ces deux types d'hormones. La méthode utilise une extraction en phase solide de l'extrait méthanolique brut, suivie d'une séparation par

HPLC en colonne de phase reverse, par deux programmes interliés: gradient méthanol/eau pour la séparation des ecdystéroïdes et un système isocratique méthanol/eau pour la séparation des stéroïdes. La validation de cette méthode a mis en évidence des niveaux de reproductibilité élevés et un rendement toujours supérieur à 90%. Les ecdystéroïdes (ecdystéroïdes totaux et ecdysone, 20-OH-ecdysone, ponasterone A, parmi d'autres) ont été quantifiés en suite par enzyme-immuno-essai (EIA) et la progesterone par radio-immuno-essai (RIA), dans l'ovaire de *P. japonicus* et dans l'ovaire et l'hémolymphe de *P. kerathurus* tout au long des cinq phases vitellogéniques. Les résultats obtenus montrent un possible rapport entre les ecdystéroïdes et la reproduction, à plusieurs niveaux: comme promoteurs de la vitellogenèse, dans la maturation de l'ovocyte, dans le contrôle de la sécrétion de l'enveloppe embryonnaire et finalement en agissant dans les processus embryologiques au sein de l'oeuf.

Nous avons identifié, par spectrométrie de masse, plusieurs stéroïdes sexuels du type des vertébrés, dans l'ovaire de *P. japonicus*: pregnenolone, testotérone, 17 α -hydroxiprogesterone et progesterone. La variation des niveaux de progesterone, quantifiée par HPLC/RIA, a été étudiée tout au long du cycle vitellogénique dans l'ovaire de *P. japonicus* et dans l'ovaire et l'hémolymphe de *P. kerathurus*.

L'induction rapide de la maturation de l'ovaire chez les penaidés d'élevage, par le biais d'une alimentation riche en polichaetes, est un effet zootechnique bien connu et largement utilisé parmi les éleveurs. L'observation de quantités non négligeables de plusieurs ecdystéroïdes et de progesterone (aussi bien que la présence significative d'autres composés non identifiés, probablement des stéroïdes) chez les polichaetes *Americanuphis magna* et *Nereis diversicolis* renforce l'hypothèse que ces hormones sont les responsables par l'induction de la maturation observée par les éleveurs.

Abstract

Abstract

The need for detailed studies of the reproductive cycles of penaeid shrimps is clearly warranted, due to the economic importance of *Penaeus japonicus* and the existence of the native specie *P. kerathurus* in southern Portugal.

In this dissertation results on the study of morphological and endocrinological aspects of the reproduction in these species are presented. Our studies focused on ovarian morphological alterations and oocyte ultrastructure, as well as their relationship with ecdysteroids and steroids concentration during oogenesis.

Five vitellogenic phases were defined through ovarian histological study of these two species: I - Previtellogenesis; II - Late Previtellogenesis or Primary Vitellogenesis; III - Vitellogenesis or Secondary Vitellogenesis; IV - Maturation (cortical vesicle phase); V - Spawning.

These work represents the first ultrastructural study done on the vitellogenesis of the *P. kerathurus*. The formation of endoplasmic reticulum and the origin of dense granules were demonstrated for the first time in the family *Penaeidae*. The origin of autophagic vacuoles and the simultaneous presence of two different forms of follicular cells in crustaceans, as well as the presence of inter-cellular bridges (nurse-cells) in the sub-class malacostraca, were also described here for the first time.

In *P. kerathurus* the yolk has a dual origin, i.e., intraoocytic and extraoocytic. At the beginning of the vitellogenesis there is a predominance of a receptor-mediated endocytosis mechanism. Later on, the vitellogenic process is mainly a intraoocytic one, with very few endocytosis phenomena. The unique endogenous yolk synthesis in this specie is described in detail. Cortical specialization occurs at the end of the vitellogenesis, with the formation of cortical vesicles displaying proteoglican-like structures, which origin and development are described in *Penaeidae* family for the first time.

Specific methodology for the simultaneous extraction, purification and separation of steroids and ecdysteroids hormones in the ovary and hemolymph was developed, in order to determine the concentration of these hormones by radioimmunoassay (RIA) and enzymeimmunoassay (EIA). This methodology included solid-phase extraction, followed by reverse phase HPLC separation, using two inter-

connected programs: - a methanol/water gradient for separation of the ecdysteroids, followed by an methanol/water isocratic system for steroid separation. This method was validated by a high repeatability and recovery rates in excess of 90%. During the five vitellogenic phases, concentrations of ecdysteroids (total ecdysteroids, Ecdysone, 20-OH-Ecdysone and Ponasterone A among others) were determined by EIA and concentrations of Progesterone by RIA. These hormones were measured in the ovary of *P. japonicus*, and in the ovary and hemolymph of *P. kerathurus*. The results suggest a relationship between peaks of these hormones with several reproductive features characteristic of these species, namely induction of vitellogenesis, oocyte maturation, control of embryonic envelope secretion, and participation in the embryonic development and differentiation.

Several vertebrate-type sex steroids, namely Pregnenolone, Testosterone, 17 α -OH-Progesterone and Progesterone, were identified in the ovary of *P. japonicus*, using mass spectrometry. Furthermore, quantification of Progesterone concentration in the ovary of *P. japonicus*, and in the ovary and hemolymph of *P. kerathurus* was determined by HPLC/RIA, for the five stages of the vitellogenic cycle.

The feeding of penaeids with polichaets is a well known and commonly used method to induce rapid ovarian maturation in shrimp aquaculture. The finding of large concentrations of ecdysteroids and Progesterone in the polichaets *Americanuphis magna* and *Nereis diversicolor* support the hypothesis that these hormones are responsible for the above mentioned accelerated ovarian maturation.

Bibliografia

- Adiyodi, K.G. & Adiyodi, R.G. (1970). Endocrine control of reproduction in decapod crustacea. *Biol Rev*, **45**, 121-165.
- Anderson, S.L., Chang, E.S., & Clark, W.H., Jr. (1984). Timing of postvitellogenic ovarian changes in the ridgeback prawn *Sicyonia ingentis* (Penaeidae) determined by ovarian biopsy. *Aquaculture*, **42**, 257-271.
- Arrobas, I. & Ruano, F. (1986). Nota preliminar sobre a cultura do camarão japonês (*Penaeus japonicus* Bate, 1886), em Portugal. *4º Congresso sobre o Algarve*, **1**, 505-510.
- Arrobas, I. & Sampayo, M.A. (1989). Primeiros ensaios de reprodução e desenvolvimento larvar de *Penaeus japonicus* Bate, em Portugal. *Seminário sobre Aquacultura em Portugal. Universidade do Algarve, Faro, 18-20 Janeiro*.
- Arrobas, I. (1989). Maturação de *Penaeus japonicus* Bate, num tanque de terra com estufa de plástico. *Seminário sobre Aquacultura em Portugal. Universidade do Algarve, Faro, 18-20 Janeiro*.
- Arrobas, I. (1990). Ciclo de vida do camarão japonês (*Penaeus japonicus*). Experiências realizadas em Portugal. *6º Congresso do Algarve*, **1**, 357-365.
- Arrobas, I., Pousão-Ferreira, P., & Bessa, R. (1989). Produção de pós-larvas de camarão japonês (*Penaeus japonicus*). *Seminário sobre Aquacultura em Portugal. Universidade do Algarve, Faro, 18-20 Janeiro*.
- Arrobas, I., Ribeiro-Cascalho, A., Falcão, M.A., & Vilela, M. (1989). Experiência de crescimento de pós-larvas de *Penaeus japonicus* Bate, em regime extensivo, num viveiro da ria formosa. *Seminário sobre Aquacultura em Portugal. Universidade do Algarve, Faro, 18-20 Janeiro*.

Arrobas, I., Soares, F., & Modesto, T. (1989). Production experimental del langostino *Penaeus japonicus* Bate, en la Ria Formosa (Sur de Portugal). *Acuic Interm Inst Cien Mar Andalucia, Cadiz*, 9-21.

Arrobas, I., Zhang, L., & Song, X. (1992). Higt stocking density culturing experiment of *Penaeus japonicus* in the South of Portugal. *Seminário de Aquacultura Mediterrânica' 91*, INIP, Lisboa, 11-13 de Dezembro de 1991, 455 pp. Publicações Avulsas do INIP, **14**, 1992.

Baldaia, L., Porcheron, P., Coimbra, J., & Cassier, P. (1984). Ecdysteroids in shrimp *Palaemon serratus* relations with molt cycle. *General and Comparative Endocrinology*, **55**, 437-443.

Beams, H.W. & Kessel, R.G. (1963). Electron microscope studies on developing crayfish oocytes with special reference to the origin of yolk. *The Journal of Cell Biology*, **18**, 621-649.

Bidmon, H.-J. & Stumpf, W.E. (1991). Uptake, distribution and binding of vertebrate and invertebrate steroid hormones and time-dependence of ponasterona A binding in *Calliphora vicina*. Comparisons among cholesterol, corticosterone, cortisol, dexamethasone, 5 α -dihydrotestosterone, 1,25-dihydroxyvitamin D₃, ecdysone, estradiol-17 β , ponasterone A, progesterone, and testosterone. *Histochemistry*, **96**, 419-434.

Borst, D.W., Laufer, H., Landau, M., Chang, E.S., Hertz, W.A., Baker, F.C., & Schooley, D.A. (1987). Methyl farnesoate and its role in crustacean reproduction and development. *Insect Biochemistry*, **17(7)**, 1123-1127.

Bradbrook, D.A., Clement, C.Y., Cook, B., & Dinan, L. (1990). The occurrence of vertebrate-type steroids in insects and a comparison with ecdysteroid levels. *Comp Biochem Physiol*, **95B:2**, 365-374.

Bressac, C. (1988). Les organes neurohémaux et les glandes endocrines de *Pachygrapsus marmoratus* (Fabricius) (Decapoda, Brachyura). II. Les glandes endocrines: organe Y et glande mandibulaire. *Crustaceana*, **55**(2), 163-179.

Bressac, C. (1988). Les organes neurohémaux et les glandes endocrines de *Pachygrapsus marmoratus* (Fabricius) (Decapoda, Brachyura). I. Les organes neurohémaux: Glande du sinus et organes pericardiques. *Crustaceana*, **55**(1), 71-87.

Cardoso, A.M., Barros, C.M.F., Ferrer Correia, A.J., Cardoso, J.M., Cortez, A., Carvalho, F., & Baldaia, L. (1997). Identification of vertebrate type steroid hormones in the shrimp *Penaeus japonicus* by tandem mass spectrometry and sequential product ion scanning. *J Am Soc Mass Spectrom*, **8**, 365-370.

Carvalho, F., Cortez, A., & Baldaia, L. (1995). Manipulação do ciclo reprodutivo em Crustáceos. In Anonymous (Ed.), *Actas do V Congresso de Zootecnia "Novos rumos da Zootecnia"* Açores, Junho 1995.

Carvalho, F., Cortez, A., Cardoso, J.M., & Baldaia, L. (1994). Extraction and purification of steroids and ecdysteroids in the kuruma prawn *Penaeus japonicus*. In Anonymous (Ed.), *17th Conference of European Comparative Endocrinologists* Córdoba, 5-10 September, 1994.

Carvalho, F., Cortez, A., Cardoso, J.M., & Baldaia, L. (1994). Preliminary results on steroid and ecdysteroid titers during reproductive cycle of the kuruma prawn *Penaeus japonicus*. In Anonymous (Ed.), *Actas del VIII Congreso Latinoamericano de Acuicultura. V Seminario Nacional de Acuicultura da Colômbia* (pp. 188-196). Santafé de Bogotá, Colômbia, 25-28 Outubro, 1994.

Carvalho, F., Cortez, A., Cardoso, J.M., & Baldaia, L. (1995). Variação dos níveis das hormonas ecdisteroides e esteroides no ovário do camarão *Penaeus japonicus* ao longo do ciclo reprodutivo. In F. Castelló & A. Calderer (Eds.), *Actas del V Congreso Nacional de Acuicultura*. (pp. 345-350). San Carles de la Ràpita, 10-13 Maio 1995.

Chan, S.-M. (1995). Possible roles of 20-hydroxyecdysone in the control of ovary maturation in the white shrimp *Penaeus vannamei* (Crustacea: Decapoda). *Comp Biochem Physiol*, **112C(1)**, 51-59.

Chang, E.S. (1991). Crustacean molting hormones: cellular effects, role in reproduction, and regulation by molt-inhibiting hormone. In P.F. DeLoach, W.J. Dougherty, & M.A. Davidson (Eds.), *Frontiers of shrimp research*. (pp. 83-105). New York: Elsevier.

Chang, E.S., Bruce, M.J., & Tamone, S.L. (1993). Regulation of crustacean molting: a multi-hormonal system. *Amer Zool*, **33**, 324-329.

Charniaux-Cotton, H. (1980). Experimental studies of reproduction in malacostraca crustaceans. Description of vitellogenesis and of its endocrine control. In W.H. Clark, Jr. & T.S. Adams (Eds.), *Advances in Invertebrate Reproduction*. (pp. 177-186). Elsevier North Holland, Inc.

Chow, S., Browdy, C.L., & Sandifer, P.A. (1993). Timing ovulation in the Atlantic white shrimp *Penaeus setiferus* (Linnaeus, 1767) (Decapoda, Penaeidea). *Crustaceana*, **64(2)**, 242-248.

Clark, W.H., Jr., Lynn, J.W., Yudin, A.I., & Persyn, H.O. (1980). Morphology of the cortical reaction in the eggs of *Penaeus aztecus*. *The Biological Bulletin*, **158**, 175-186.

- Clark, W.H., Jr., Yudin, A.I., Lynn, J.W., Griffin, F.J., & Pillai, M.C. (1990). Jelly layer formation in penaeoidean shrimp eggs. *Biol Bull*, **178**, 295-299.
- Clédon, P. (1986). Study on oocyte maturation and activation of the common prawn *Palaemon serratus* (Pennant): relationship between oocyte maturation and the molt cycle cytological aspects. *Gamete Research*, **13**, 353-362.
- Coimbra, J., Albuquerque, A.C., & Baptista, P. (1985). As modificações do equilíbrio ácido-base ao longo do ciclo de intermuda em crustáceos e o sincronismo da muda. *Pesca e Navegação*, 40-44.
- Cuzin-Roudy, J. & Saleuddin, A.S.M. (1989). The mysid *Siriella armata*, a biological model for the study of hormonal control of molt and reproduction in crustaceans. A review. *Invertebrate Reproduction and Development*, **16**, 33-42.
- D'Croz, L., Wong, L., Justine, G., & Gupta, M. (1988). Prostaglandins and related compounds from the polychaete worm *Americanuphis reesei* Fauchald (Onuphidae) as possible inducers of gonad maturation in Penaeid shrimps. *Revista de Biologia Tropical*, **36(2A)**, 331-332.
- Dirksen, H. (1994). Distribution and physiology of crustacean cardioactive peptide in arthropods. *Perspectives in Comparative Endocrinology*, 139-148.
- Dunham, P.J. (1978). Sex pheromones in crustacea. *Biol Rev*, **53**, 555-583.
- Dunstan, G.A., Volkman, J.K., & Barret, S.M. (1993). The effect of lyophilization on the solvent extraction of lipid classes, fatty acids and sterols from the oyster *Crassostrea gigas*. *Lipids*, **28**, 937-943.

Durfort, M., Bargalló, R., Bozzo, M.G., Fontarnau, R., & López-Camps, J. (1980). Detalls ultraestructurals de les cèl·lules fol·liculars d' *Astacus astacus* (Crustacea, Decapoda). *Bull Inst Cat Hist Nat*, **45**(Sec. Zool., 3), 55-60.

Duronslet, M. J., Yudin, A. I., Wheeler, R. S., Clark, Jr., W. H. (1975). Light and fine structural studies of natural and artificially induced egg growth of penaeid shrimp. *Proc. Meet. World Mari. Soc.* **6**: 105-122.

Fainzilber, M., Tom, M., Shafir, S., Applebaum, S.W., & Lubzens, E. (1992). Is there extraovarian synthesis of vitellogenin in penaeid shrimp? *Biol Bull*, **183**, 233-241.

Fairs, N.J., Quinlan, P.T., & Goad, L.J. (1990). Changes in ovarian unconjugated and conjugated steroid titers during vitellogenesis in *Penaeus monodon*. *Aquaculture*, **89**, 83-99.

FAO Fisheries Department (1997). Global production. [http://www fao org/waicent/faoinfo/fishery/highligh/global htm](http://www.fao.org/waicent/faoinfo/fishery/highligh/global htm), 1-2.

FAO Fisheries Department (1997). Projection of world fishery production in 2010. <http://www.fao.org/waicent/faoinfo/fishery/highligh/2010 htm>, 1.

Fauvel, C. & Grassé, P. (1981). Étude de l'ovaire de la Crevette d'eau douce *Macrobrachium rosenbergii* (de Man) au cours du cycle de reproduction. Première description de la folliculogénèse secondaire chez un Crustacé Décapode. *C R Acad Sc Paris*, **292**, 547-552.

Figueiredo, M.J. (1972). Alguns aspectos da histologia do ovário do lagostim (*Nephops norvegicus*) e do camarão (*Penaeus kerathurus*) durante o seu ciclo maturativo. *Boletim informativo do Instituto de Biologia Marinha*, **7**, 1-19.

- Fingerman, M. (1987). The endocrine mechanisms of crustaceans. *Journal of Crustacean Biology*, **7**(1), 1-24.
- Fingerman, M. (1992). Glands and secretion. In F.W. Harrison & A.G. Humes (Eds.), *Microscopic Anatomy of Invertebrates. Vol 10 - Decapod Crustacea* (pp. 295-343). Wiley-Liss, Inc.
- Fingerman, M., Nagabhushanam, R., & Sarojini, R. (1993). Vertebrate-type hormones in Crustaceans: localization, identification and functional significance. *Zoological Science*, **10**, 13-29.
- Ganion, L.R. & Kessel, R.G. (1972). Intracellular synthesis, transport, and packing of proteinaceous yolk in oocytes of *Orconectes immunis*. *The Journal of Cell Biology*, **52**, 420-437.
- Garcia, M., Griffond, B., & Lafont, R. (1995). What are the origins of ecdysteroids in gastropods? *General and Comparative Endocrinology*, **97**, 76-85.
- Goudeau, M. & Lachaise, F. (1980). 'Endogenous yolk' as the precursor of a possible fertilization envelope in a crab (*Carcinus maenas*). *Tissue and Cell*, **12**(3), 503-512.
- Harrison, K.E. (1990). The role of nutrition in maturation, reproduction and embryonic development of decapod crustaceans: a review. *Journal Shellfish Research*, **9**(1), 1-28.
- Hasegawa, Y., Hirose, E., & Katakura, Y. (1993). Hormonal control of sexual differentiation and reproduction in Crustacea. *American Zoology*, **33**, 403-411.
- Highnam, K.C. & Hill, L. (1977). *The Comparative Endocrinology of the Invertebrates*. Edward Arnold, Ltd.

Hilde, R.M.A., Walgraeve, P., & Verhaert, D.E.M. (1988). Presence and function of ecdysteroids in invertebrates. *ISI Atlas of Science: Plants & Animals*, **1**, 164-172.

Hines, G.A., Watts, S.A., Sower, S.A., & Walker, C.W. (1992). Sex steroid levels in the testes, ovaries, and pyloric caeca during gametogenesis in the sea star *Asterias vulgaris*. *General and Comparative Endocrinology*, **87**, 451-460.

Hines, G.A., Watts, S.A., Walker, C.W., & Voogt, P.A. (1992). Androgen metabolism in somatic and germinal tissues of the sea star *Asterias vulgaris*. *Comp Biochem Physiol*, **102B:3**, 521-526.

Hinsch, G.W. & Cone, M.V. (1969). Ultrastructural observations of vitellogenesis in the spider crab, *Libinia emarginata* L. *The Journal of Cell Biology*, **40**, 336-342.

Junéra, H. & Croisille, Y. (1980). Recherche du lieu de synthèse de la vitellogénine chez le Crustacé Amphipode *Orchestia gammarella* (Pallas). Mise en évidence d'une activation de la synthèse protéique dans le tissu adipeux sous-épidermique en liaison avec la production de vitellogénine. *C R Acad Sci Paris*, **290(11)D**, 703-706.

Kanazawa, A. & Teshima, S.I. (1971). *In vivo* conversion of cholesterol to steroid hormones in the spiny lobster, *Panulirus japonica*. *Bull Jap Soc Sci Fish*, **37(9)**, 891-898.

Kessel, R.G. (1985). Annulate lamellae (porous cytomembranes): with particular emphasis on their possible role in differentiation of the female gamete. In L.W. Browder (Ed.), *Developmental Biology* (pp. 179-233). Plenum Publishing Corporation.

- Komm, B.S. & Hinsch, G.W. (1985). Oogenesis in the terrestrial hermit crab, *Coenobita clypeatus* (Decapoda, Anomura): I. Previtellogenic oocytes. *Journal of Morphology*, **183**, 219-224.
- Komm, B.S. & Hinsch, G.W. (1987). Oogenesis in the terrestrial hermit crab, *Coenobita clypeatus* (Decapoda, Anomura): II. Vitellogenesis. *Journal of Morphology*, **192**, 269-277.
- Krol, R.M., Hawkins, W.E., & Overstreet, R.M. (1992). Reproductive Components. In F.W. Harrison & A.G. Humes (Eds.), *Microscopic Anatomy of Invertebrates. Vol 10 - Decapod Crustacea* (pp. 295-343). Wiley-Liss, Inc.
- Kubrakiewicz, J., Adamski, R.T., & Bilinski, S.M. (1991). Ultrastructural studies on accessory nuclei in developing oocytes of the crustacean, *Siphonophanes grubei*. *Tissue and Cell*, **23(6)**, 903-907.
- Kulkarni, G.K., Glade, L., & Fingerman, M. (1991). Oogenesis and effects of neuroendocrine tissues on *in vitro* synthesis of protein by the ovary of the red swamp crayfish *Procambarus clarkii* (Girard). *J Crust Biol*, **11(4)**, 513-522.
- Lachaise, F., Le Roux, A., Hubert, M., & Lafont, R. (1993). The molting gland of Crustaceans: localization, activity, and endocrine control (a review). *Journal of Crustacean Biology*, **13(2)**, 198-234.
- Lafont, R. (1991). Reverse endocrinology, or "hormones" seeking functions. *Insect Biochem.*, **21:7**, 697-721.
- Lanot, R. & Clédon, P. (1989). Ecdysteroids and meiotic reiniciation in *Palaemon serratus* (Crustacea Decapoda Natantia) and in *Locusta migratoria* (Insecta orthoptera). A comparative study. *Invertebrate Reproduction and Development*, **16**, 169-175.

Laubier, A. & Laubier, L. (1993). Marine crustacean farming: present status and perspectives. *Aquatic Living Resources*, **6**, 319-329.

Laubier, A. (1987). Biologie de la reproduction et de l'élevage des crevettes penaeides. *Océanis*, **13(2)**, 217-232.

Laufer, H. & Landau, M. (1991). Endocrine control of reproduction in shrimp and other crustacea. In P.F. DeLoach, W.J. Dougherty, & M.A. Davidson (Eds.), *Frontiers of shrimp research*. (pp. 65-81). New York: Elsevier.

Lee, D.O. & Wickins, J.F. (1992). *Crustacean farming*. Cambridge: The University Press, 392 pp.

Lee, H.-M., Parish, E.J., & Bone, L.W. (1990). Occurrence of mammalian sex steroids in the free-living nematode, *Turbatrix aceti*. *Comp Biochem Physiol*, **97A:2**, 115-117.

Lepore, E., Sciscioli, M., & Gherardi, M. (1993). Some ultrastructural aspects of oocytes during vitellogenesis in two species of *Balanus* (Crustacea, Cirripidia). *Oebalia*, **19**, 79-87.

Levi, D. & Vacchi, M. (1988). Macroscopic scale for simple and rapid determination of sexual maturity in *Aristaeomorpha foliacea* (Risso, 1826) (Decapoda: Penaeidae). *J Crust Biol*, **8(4)**, 532-538.

Luis, O.J. & Ponte, A.C. (1993). Control of reproduction of the shrimp *Penaeus kerathurus* held in captivity. *Journal of the World Aquaculture Society*, **24(1)**, 31-39.

- Luis, O.J. (1988). Perspectivas para o controlo da reprodução do camarão de Quarteira, *Panaeus kerathurus* (Forsk., 1755). *5º Congresso sobre o Algarve*, 463-468.
- Lumare, F. (1983). Directrices seguidas en Italia para la cria de langostinos peneidos. *Inf Técn Inst Inv Pesq*, **109**, 3-18.
- Lumare, F. (1986). Marine shrimp culture in the world and present state and trends of kuruma prawn culture in Italy. *Inf Técn Inst Inv Pesq*, **136**, 3-23.
- Lumare, F. (1988). *Penaeus japonicus*. Biologia e allevamento. In E. E.S.A.V. (Ed.), *Penaeus japonicus. Biologia e sperimentazione*. (pp. 11-196).
- Lynn, J.W., Pillai, M.C., Glas, P.S., & Green, J.D. (1991). Comparative morphology and physiology of egg activation in selected penaeoidea. In P.F. DeLoach, W.J. Dougherty, & M.A. Davidson (Eds.), *Frontiers of shrimp research*. (pp. 47-64). New York: Elsevier.
- Lytle, J.S. & Lytle, T.F. (1990). Fatty acid composition and variations in individual bloodworms. *Journal of the World Aquaculture Society*, **21(4)**, 314-318.
- Lytle, J.S., Lytle, T.F., & Ogle, J.T. (1990). Polyunsaturated fatty acid profiles as a comparative tool in assessing maturation diets of *Penaeus vannamei*. *Aquaculture*, **89**, 287-299.
- Mattson, M.P. (1986). New insights into neuroendocrine regulation of the crustacean molt cycle. *Zoological Science*, **3**, 733-744.
- Meusy, J.-J. & Payen, G.P. (1988). Female Reproduction in Malacostracan Crustacea. *Zoological Science*, **5**, 217-265.

Minagawa, M., Chiu, J.-R., Kudo, M., Ito, F., & Takashima, F. (1993). Female reproductive biology and oocyte development of the red frog crab, *Ranina ranina*, off Hachijojima, Izu Islands, Japan. *Marine Biology*, **115**, 613-623.

New, M.B. (1990). Freshwater prawn culture: a review. *Aquaculture*, **88**, 99-143.

Ogle, J.T. (1992). A review of the current (1992) state of our knowledge concerning reproduction in open thelycum Penaeid shrimp with emphasis on *Penaeus vannamei*. *Invertebrate Reproduction and Development*, **22(1-3)**, 267-274.

Okumura, T., Han, C.H., Suzuki, Y., Aida, A., & Hanyu, I. (1992). Changes in hemolymph vitellogenin and ecdysteroid levels during the reproductive and non-reproductive molt cycles in the freshwater prawn *Macrobrachium nipponense*. *Zoological Science*, **9**, 37-45.

Papathanassiou, E. & King, P.E. (1984). Ultrastructural studies on gametogenesis of the prawn *Palaemon serratus* (Pennant). I. Oogenesis. *Acta Zoologica (Stockh)*, **65(1)**, 17-31.

Parker, S.P. (1982). Arthropoda. In Anonymous (Ed.), *Synopsis and classification of living organisms*, **2**, 1166 pp.

Payen, G.G. (1980). Aspects fondamentaux de l'endocrinologie de la reproduction chez les crustacés marins. *Oceanis*, **6(3)**, 309-339.

Pillai, M.C. & Clark, W.H., Jr. (1987). Oocyte activation in the marine shrimp, *Sicyonia ingentis*. *The Journal of Experimental Zoology*, **244**, 325-329.

Pillai, M.C., Griffin, F.J., & Clark, W.H., Jr. (1988). Induced spawning of the decapod crustacean *Sicyonia ingentis*. *Biol Bull*, **174**, 181-185.

- Porcheron, P., Morinière, M., Grassi, J., & Pradelles, P. (1989). Development of an enzyme immunoassay for edcysteroids using acetylcholinesterase as label. *Insect Biochem.*, **19:2**, 117-122.
- Prat, F., Carrillo, M. and De Mones, A. (1986). Validación del radioinmunoensayo para la estimación de testosterona, 11-cetotestosterona y 17 β -estradiol en plasma de lubina (*Dicentrarchus labrax* L.). *Inv. Pesq.* **50 (2)**: 279-295.
- Quackenbush, L.S. (1991). Regulation of vitellogenesis in Penaeid shrimp. In P.F. DeLoach, W.J. Dougherty, & M.A. Davidson (Eds.), *Frontiers in Shrimp Research*. (pp. 125-140). New York: Elsevier.
- Rankin, S.M. & Davis, R.W. (1990). Ultrastructure of oocytes of the shrimp, *Penaeus vannamei*: cortical specialization formation. *Tissue and Cell*, **22(6)**, 879-893.
- Rao, K.R. & Riehm, J.P. (1991). Structure-activity relations of crustaceans neuropeptides. In P.F. DeLoach, W.J. Dougherty, & M.A. Davidson (Eds.), *Frontiers of shrimp research*. (pp. 107-123). New York: Elsevier.
- Redón, M.J. & San Feliú, J.M. (1993). Effet de l'alimentation et de l'ablation du pédoncule oculaire sur la qualité des pontes et des larves de *Penaeus japonicus* Bate, 1888. In G. Barnabé & P. Kestemont (Eds.), *Production, Environment and Quality. Bordeaux Aquaculture '92*, 483-490.
- Reis-Henriques, M.A., Le Guellec, D., Remy-Martin, J.P., & Adessi, G.L. (1990). Studies of endogenous steroids from the marine mollusc *Mytilus edulis* L. by gas chromatography and mass spectrometry. *Comp Biochem Physiol*, **95(B):2**, 303-309.

Rodríguez, A. (1980). Growth and sexual maturation of *Penaeus kerathurus* (Forskal,1775) and *Palaemon serratus* (Pennant) in salt ponds. *Aquaculture*, **24**, 257-266.

Rodríguez, A. (1985). Biología del langostino *Penaeus kerathurus* (Forskal,1775) del Golfo de Cádiz. I. Reproducción. *Investigación Pesquera*, **49(4)**, 581-595.

Rodríguez, A. (1989). Presencia de *Penaeus japonicus* Bate (Crustacea, Decápoda) en el Golfo de Cádiz (Océano Atlántico). *Inst Cien Mar Andalucía Acui Intermareal*, 321-324.

San Feliú, J.M. & Oltra, R. (1987). Influencia de la temperatura, fotoperíodo, alimentación y ablación unilateral del pedúnculo ocular, en la maduración de *Penaeus kerathurus*. *Cuad Marisq Publ Téc*, **12**, 273-278.

Sandor, T. (1980). Steroids in Invertebrates. In W.H. Clark,Jr. & T.S. Adams (Eds.), *Advances in Invertebrate Reproduction*. (pp. 81-96). Elsevier North Holland, Inc.

Sasser, E.W. & Singhas, C.A. (1992). Presence of an estriol-like steroid in the blue crab, *Callinectes sapidus*. *Aquaculture*, **104**, 367-373.

Schade, M.L. & Shivers, R.R. (1980). Structural modulation of the surface and cytoplasm of oocytes during vitellogenesis in the lobster, *Homarus americanus*. An electron microscope-protein tracer study. *Journal of Morphology*, **163**, 13-26.

Shafir, S., Ovadia, M., & Tom, M. (1992). In vivo incorporation of labeled methionine into proteins, vitellogenin, and vitellin in females of the penaeid shrimp *Penaeus semisulcatus* de Haan. *Biological Bulletin*, **183**, 242-247.

- Shafir, S., Tom, M., Ovadia, M., & Lubzens, E. (1992). Protein, vitellogenin, and vitellin levels in the hemolymph and ovaries during ovarian development in *Penaeus semisulcatus* (de Haan). *Biological Bulletin*, **183**, 242-247.
- Shafir, S., Tom, M., Ovadia, M., & Lubzens, E. (1992). Protein, vitellogenin, and vitellin levels in the hemolymph and ovaries during ovarian development in *Penaeus semisulcatus* (de Haan). *Biological Bulletin*, **183**, 394-400.
- Snyder, M.J., Okazaki, R.K., & Chang, E.S. (1992). Nemertean ecdysteroids: relationship to reproduction. *Invertebrate Reproduction and Development*, **21:1**, 7-13.
- Sobral, A.M., Ruano, F., Arrobas, I., & Serrano, M.D. (1991). Experiência de produção conjunta de peixe, camarão e sal no estuário do Sado. *Relt Téc Cien INIP*, **36**, 1-22.
- Spaziani, E., Mattson, M.P., & Rudolph, P.H. (1994). Regulation of crustacean molt-inhibiting hormone. *Perspectives in Comparative Endocrinology*, 243-250.
- Summavielle, T., Monteiro, P., Reis-Henriques, M.A., & Coimbra, J. (1997). Metabolismo de hormonas esteróides em fêmeas de camarão *Penaeus japonicus*. *Actas do Congresso Ibérico de Reprodução Animal*, **1**, 217(Abstract).
- Summavielle, T., Reis-Henriques, M.A., Baldaia, L., & Coimbra, J. (1996). Progesterone metabolism *in vitro* in vitellogenic ovary of the decapod crustacean *Penaeus japonicus*. *Annales d'Endocrinologie*, **57(4)**, 49(Abstract).
- Summavielle, T., Silva, L., Reis-Henriques, M.A., Baldaia, L., & Coimbra, J. (1995). Haemolymph unconjugated and conjugated steroids during reproduction in *Penaeus japonicus* (Crustacea: Decapoda). *Netherlands Journal of Zoology*, **45(1-2)**, 64-67.

Swevers, L., Lambert, J.G.D., & De Loof, A. (1991). Metabolism of vertebrate-type steroids by tissues of three crustacean species. *Comp Biochem Physiol*, **99B:1**, 35-41.

Swevers, L., Lambert, J.G.D., & De Loof, A. (1992). On the origin of vertebrate-type steroids present in *Locusta migratoria*: do they originate from the food? *Comp Biochem Physiol*, **102B:3**, 591-600.

Takayanagi, H., Yamamoto, Y., & Takeda, N. (1986). An ovary-stimulating factor in the shrimp, *Paratya compressa*. *The Journal of Experimental Zoology*, **240**, 203-209.

Talbot, P. & Goudeau, M. (1988). A complex cortical reaction leads to formation of the fertilization envelope in the lobster, *Homarus*. *Gamete Research*, **19**, 1-18.

Talbot, P. (1981). The ovary of the lobster, *Homarus americanus*. I. Architecture of the mature ovary. *Journal of Ultrastructure Research*, **76**, 235-248.

Talbot, P. (1981). The ovary of the lobster, *Homarus americanus*. II. Structure of the mature follicle and origin of the chorion. *Journal of Ultrastructure Research*, **76**, 249-262.

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

Tan-Fermin, J.D. (1991). Effects of unilateral eyestalk ablation on ovarian histology and oocyte size frequency of wild and pond reared *Penaeus monodon* (Fabricius) broodstock. *Aquaculture*, **93**, 77-86.

Thiéry, J.-P. (1967). Mise en évidence des polysaccharides sur coupes fines en microscopie électronique. *Journal Microscopie*, **6**, 987-1018.

- Trujillo, L.R. & Gómez, E.T. (1986). Histología del ovario maduro del camarón rosado *Penaeus notialis* con ablación de los pedúnculos oculares. *Revista de Investigaciones Marinas*, **VII(2)**, 53-60.
- Van Beek, E. & De Loof, A. (1988). Radioimmunological determinations of concentrations of six C₂₁, C₁₉ and C₁₈ steroids during the reproductive cycle of female *Artemia* sp. (Crustacea: Anostraca). *Comp Biochem Physiol*, **89(A)**, 595-599.
- Van Herp, F. & Payen, G.G. (1991). Crustacean neuroendocrinology: perspectives for the control of reproduction in aquacultural systems. *Bull Inst Zool, Academia Sinica, Monograph*, **16**, 513-539.
- Vogt, G., Tobias-Quinitio, E., & Pascual, F.P. (1989). Interaction of the midgut gland and the ovary in vitellogenesis and consequences for the breeding success: a comparison of unablated and ablated spawners of *Penaeus monodon*. In N. De Pauw, E. Jaspers, H. Ackefors, & N. Wilkins (Eds.), *Aquaculture - A Biotechnology in Progress*. Bredene, Belgium: European Aquaculture Society, 581-592.
- Walgraeve, H.R.M.A. & Verhaert, P.D.E.M. (1988). Presence and function of ecdysteroids in invertebrates. *Animal and Plant Sciences*, **1**, 164-172.
- Walgraeve, H.R.M.A., Criel, G.R., Sorgeloos, P., & De Leenheer, A.P. (1988). Determination of ecdysteroids during the moult cycle of adult *Artemia*. *Journal of Insect Physiology*, **34(7)**, 597-602.
- Wilder, M.N., Okumura, T., & Aida, K. (1991). Accumulation of ovarian ecdysteroids in synchronization with gonadal development in the giant freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii*. *Zoological Science*, **8**, 919-927.

Wilder, M.N., Okumura, T., Aida, A., & Hanyu, I. (1990). Ecdysteroid fluctuations during embryogenesis in the giant freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii*. *General and Comparative Endocrinology*, **80**, 93-100.

Wolin, E.M., Laufer, H., & Albertini, D.F. (1973). Uptake of the yolk protein, lipovitellin, by developing crustacean oocytes. *Developmental Biology*, **35**, 160-170.

Yano, I. & Chinzei, Y. (1987). Ovary is the site of vitellogenin synthesis in kuruma prawn, *Penaeus japonicus*. *Comp Biochem Physiol*, **86(B)2**, 213-218.

Yano, I. (1984). Rematuration of spent kuruma prawn, *Penaeus japonicus*. *Aquaculture*, **42**, 179-183.

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

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

Yano, I. (1988). Oocyte development in the kuruma prawn *Penaeus japonicus*. *Marine Biology*, **99**, 547-553.

Young, N.J., Quinlan, P.T., & Goad, L.J. (1992). Progesterone metabolism *in vitro* in the decapod crustacean, *Penaeus monodon*. *General and Comparative Endocrinology*, **87**, 300-311.

Young, N.J., Webster, S.G., & Rees, H.H. (1993). Ecdysteroid profiles and vitellogenesis in *Penaeus monodon* (Crustacea: Decapoda). *Invertebrate Reproduction and Development*, **24(2)**, 107-118.

Young, N.J., Webster, S.G., & Rees, H.H. (1993). Ovarian and hemolymph ecdysteroid titers during vitellogenesis in *Macrobrachium rosenbergii*. *General and Comparative Endocrinology*, **90**, 183-191.