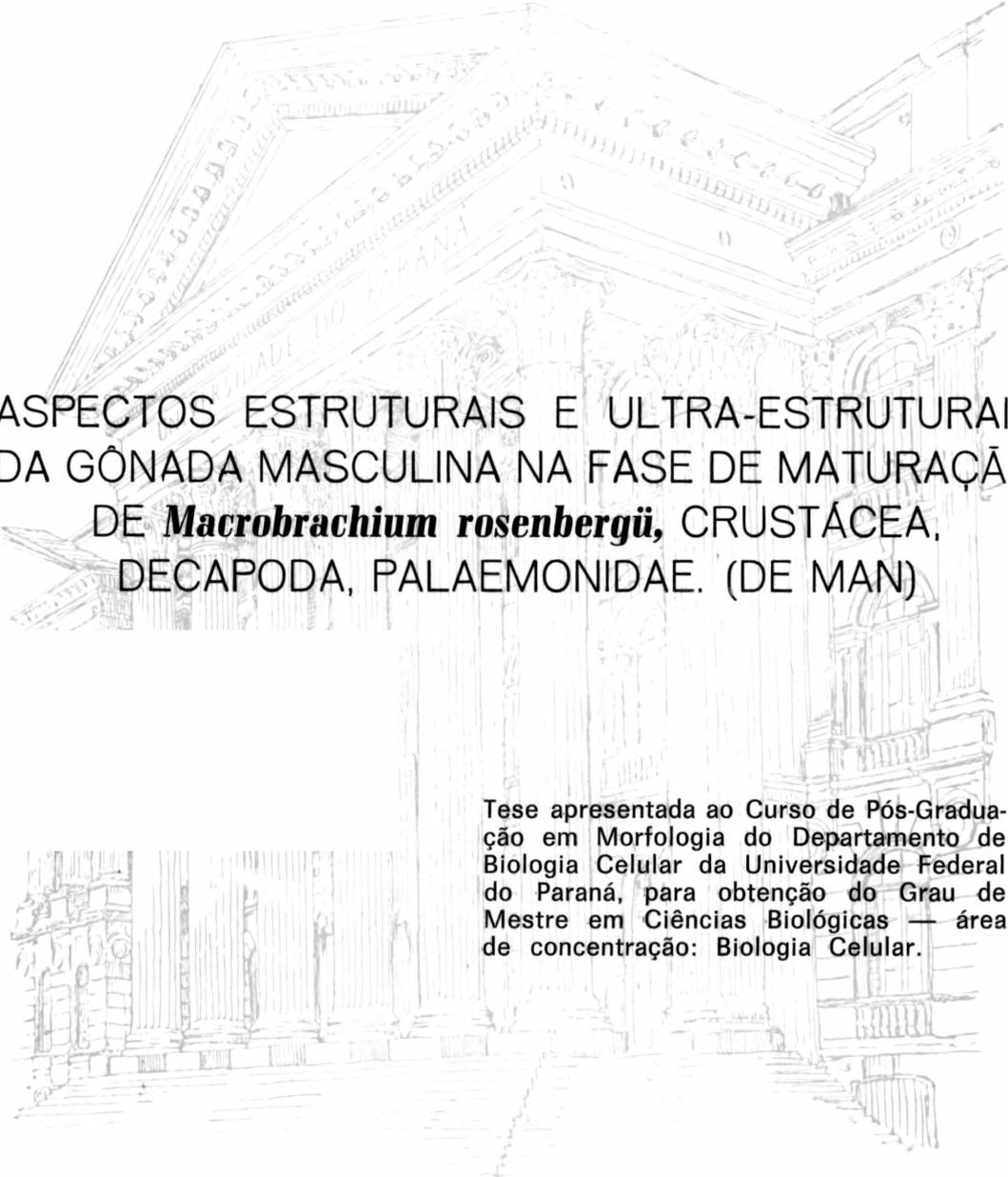


NECI MORAIS



ASPECTOS ESTRUTURAIS E ULTRA-ESTRUTURAIS
DA GÔNADA MASCULINA NA FASE DE MATURAÇÃO
DE *Macrobrachium rosenbergii*, CRUSTÁCEA,
DECAPODA, PALAEMONIDAE. (DE MAN)

Tese apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Morfologia do Departamento de Biologia Celular da Universidade Federal do Paraná, para obtenção do Grau de Mestre em Ciências Biológicas — área de concentração: Biologia Celular.

CURITIBA
1990

NECI MORAIS

ASPECTOS ESTRUTURAIS E ULTRA-ESTRUTURAIS
DA GÔNADA MASCULINA NA FASE DE MATURAÇÃO
DE *Macrobrachium rosenbergü*, CRUSTÁCEA,
DECAPODA, PALAEMONIDAE. (DE MAN)

Tese apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Morfologia do Departamento de Biologia Celular da Universidade Federal do Paraná, para obtenção do Grau de Mestre em Ciências Biológicas — área de concentração: Biologia Celular.

CURITIBA
1990

ORIENTADORA:

Professora Dr^a. EDITH FANTA

Departamento de Biologia Celular

Universidade Federal do Paraná - Brasil

Bendito seja o Senhor que por mim realizou
maravilhas de amor. sl. 31,22

Sou grata Senhor !

DEDICO

A minha família
em especial
a meus pais
Liberato Quirino Silva e
Olga Araújo Silva
e a meu filho
Eduardo Moraes

Pela compreensão e carinho durante
minha ausência e pela graça de per
manecermos juntos.

AGRADECIMENTOS

Ao término deste trabalho registro meu reconhecimento às pessoas e entidades que de uma maneira ou de outra contribuíram para a realização do mesmo.

À Professora Doutora Edith Fanta, orientadora e amiga, pelo exemplo de sabedoria e rigor científico.

Ao Professor Doutor Waldemiro Gremski, pela dedicada atenção, amizade e ricas sugestões.

Às funcionárias da Biblioteca do Setor de Ciências Biológicas, Mariza e Isabella, pelo auxílio durante a revisão bibliográfica.

Ao Centro de Microscopia Eletrônica da Universidade Federal do Paraná, pelo uso dos aparelhos para confecção e análise do material de tese.

Aos funcionários do Centro de Microscopia Eletrônica da Universidade Federal do Paraná, Thereza Turesso Nadalini, Maria Lori Machado, Vera Regina e Célia Regina Franco, pelo auxílio e amizade.

À estudante de Biologia Vera Lúcia Pereira dos Santos, pelo auxílio na confecção das eletromicrografias e pela amizade.

A **Sideval Ruppel** pela confecção dos slides.

A **Rubens S. Gaier** do Departamento de **Biologia Celular**, pelo auxílio e amizade.

A **Elizabeth Regina Xisto** pela datilografia, meu carinho e amizade.

Ao **Engenheiro de Pesca Javier A. C. Macchiavello**, do Departamento de Aquicultura da Universidade Federal de Santa Catarina, pelo auxílio nas coletas, pela amizade e eficiência.

À **Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Ensino Superior (CAPES)** pela bolsa de estudos usufruída durante o período de desenvolvimento deste trabalho e ao **CNPq** pelo auxílio à pesquisa concedido a este projeto.

Ao **Professor Doutor Ives José Sbalqueiro**, responsável pela ^oLaboratório de Citogenética Animal do Departamento de Genética da Universidade Federal do Paraná, pelo uso do microscópio para análise e fotografia do material.

Às minhas irmãs **Nanci Araújo Silva** e **Neusa Araújo Silva Schmit**, pelo estímulo, carinho e amizade.

Í N D I C E

RESUMO	ix
ABSTRACT	xii
OBJETIVOS	xiii
1 INTRODUÇÃO	1
2 MATERIAL E MÉTODOS	5
2.1 Material	5
2.1.1 Caracterização	5
2.1.2 Obtenção do Material	6
2.2 Métodos	8
2.2.1 Obtenção das gônadas masculinas para micros- copia óptica	8
2.2.2 Fixação e inclusão	8
2.2.3 Coloração hematoxilina-eosina (CAMARGO,1979) modificado	12
2.2.4 Teste do PAS	12
2.2.5 Tricômico de Gomori	13
2.3 Preparo dos testículos para Microscopia Ele- trônica	13
2.3.1 Fixação	13
2.3.2 Desidratação e inclusão	14
2.3.3 Obtenção de cortes ultra-finos	15
2.4 Observação e Fotografias	16
3 RESULTADOS	17
3.1 Organização tecidual dos testículos	17
3.2 Aspectos morfológicos das células germinati- vas	18
3.2.1 Espermatogônias	18
3.2.1.1 <u>As</u> Espermatogônias A	18

3.2.1.2	Espermatogônias B	18
3.2.2	Espermatócitos	19
3.2.2.1	Espermatócito I ou Primário	19
3.2.2.2	Espermatócito II ou Secundário	20
3.2.3	Espermátides	21
3.2.4	Espermatozóide	21
3.3	Aspectos ultra-estruturais das células germinativas	22
3.3.1	Espermatogônias	22
3.3.1.1	Espermatogônias A	22
3.3.1.2	Espermatogônias B	22
3.3.2	Espermatócito	23
3.3.2.1	Espermatócito I ou Primário	23
3.3.2.2	Espermatócito II ou Secundário	24
3.3.3	Espermátides	24
3.3.4	Espermatozóide	25
3.4	Células sustentaculares	26
3.5	Fibroblastos	27
	FIGURAS	28
4	DISCUSSÃO	58
4.1	Organização anatômica e tecidual dos testículos de <u>Macrobrachium rosenbergii</u>	58
4.2	Células germinativas de <u>Macrobrachium rosenbergii</u>	59
4.2.1	Espermatogônias	59
4.2.2	Espermatócitos	60
4.2.3	Espermátides	61
4.2.4	Espermatozóide	62
4.3	Células sustentaculares	63
	CONCLUSÕES	65
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	67

R E S U M O

Este trabalho teve como objetivo estudar os aspectos estrutural e ultra-estrutural da gônada masculina do camarão Macrobrachium rosenbergii, sendo utilizadas técnicas histológicas e citoquímicas de cortes em historesina analisados em microscopia óptica e técnica de cortes ultra-finos de fragmentos de testículos incluídos em resina "Spurr" observadas ao microscópio eletrônico.

Os resultados obtidos revelaram serem as espermatogônias A, células que por mitose formam os espermatócitos primários, que por sua vez através de meiose chegam a espermatídes, por um processo denominado de espermatogênese.

A forma final adquirida pelo espermatozóide deve-se ao extenso processo de citodiferenciação das espermatídes que passam de células esféricas a células levemente alongadas.

O crescimento, de forma sincrônica, dos espermatozóides para o interior dos cistos, pode ser atribuído a estruturas semelhantes a desmossomos que contactam um espermatócito com outro.

Os espermatozóides maduros são desprovidos de acrossomo e flagelo, apresentando uma estrutura pontiaguda "Spike" formada por fibrilas que dão flexibilidade no momento da

fertilização do óvulo.

As células sustentaculares estão em íntima associação com as células germinativas, desde as mais primitivas, apresentando portanto grande atividade no processo citoplasmático que envolve a maturação dos espermatozoides.

A B S T R A C T

The structure and ultrastructure of the schrimp Macrobrachium rosenbergii (de Man) testis was described. Histological and histochemical staining techniques were used on historesin preparations, analyzed with the light microscope as well as ultrathin preparations embedded in "Spurr" and observed with the transmission electron microscope.

Through mitosis, spermatogonia A develop into spermatocytes I that, through meiosis, are transformed into spermatids. This process is called spermatogenesis.

The end form acquired by the sperm cell is the consequence of citodifferentiation of the spermatides whose shape initially is spherical and, at the end, slightly elongated.

Sperm cells grow towards the interior of the cysts in a synchronic way, probably helped by the desmosome like structures that bind one spermatocyte to another.

Mature sperm cells have no acrosome and flagellum, and show a spike formed by fibrils that give them flexibility during fertilization.

Supporting cells are closely associated to germ

cells, from the most primitive stages, and they show evidences of intense cytoplasmic activity throughout sperm maturation.

O B J E T I V O S

Tendo em vista a carência de informações acerca da morfologia tecidual dos testículos o objetivo principal deste trabalho é contribuir para a análise dos aspectos estruturais e ultra-estruturais da espermatogênese de Macrobrachium rosenbergii.

No presente estudo será dado enfoque nos seguintes tópicos:

1. Estudo histológico dos testículos bem como análise estrutural e ultra-estrutural das células germinativas ao longo da espermatogênese.
2. Estudo estrutural e ultra-estrutural do comportamento nuclear (compactação cromatínica) ao longo da espermatogênese.

1. INTRODUÇÃO

O camarão da Malásia "gigante da Malásia", Macrobrachium rosenbergii é um crustáceo pertencente à família Palaemonidae, da ordem Decapoda, nativa das regiões tropicais e subtropicais Indo-Pacíficas (LING, 1969; VALENTI, 1986).

A família Palaemonidae encontra-se distribuída por todos os continentes, com seus representantes vivendo principalmente em água salobra e doce (HOLTHUIS, 1952).

Esta família é constituída por quatro sub-famílias: Typhlocaridinae, Pantonunae, Euryhynchinae e Palaemonidae, sendo que somente as três últimas ocorrem no Brasil (GOMES-CORREA, 1977).

A sub-família Palaemonidae é a mais expressiva delas, com sete gêneros e vinte e três espécies descritas no Brasil (GOMES - CORREA, 1977).

O gênero Macrobrachium é representado por aproximadamente cento e vinte espécies, sendo que cinquenta são encontradas na América Latina. No sul do Brasil o gênero Macrobrachium é o mais representativo desta família, com vinte e seis espécies, todas de água doce, sendo que a maioria desova em água salobra (HOLTHUIS, 1952).

O Macrobrachium rosenbergii, vive em diferentes ambi-

entes de água doce e água salobra, como nos rios que sofrem influência das marés, nos reservatórios de águas e canais de irrigação.

Os jovens e adultos habitam os fundos dos rios, lagos, estuários, permanecendo escondidos sob pedras e plantas durante o dia. Têm hábitos noturnos, saindo à noite de seus esconderijos para a caça, a busca de alimentos e o acasalamento. Devido ao seu tamanho, abundância e valor econômico tem sido objeto de muitos estudos científicos.

As espécies que mais se destacam no sul do Brasil são: Macrobrachium acanthurus, Macrobrachium carcinus, Macrobrachium olfersii e Macrobrachium brasiliense (BOSCHI, 1974).

Tendo sido reconhecida a produção de camarões como uma fonte alternativa de alimentos, vários trabalhos vem sendo realizados com diferentes espécies.

Já em 1880 Muller publicou resultados sobre a produção de pós-larvas de Macrobrachium potiuna em cativeiro (MULLER, 1880).

Em 1939 a espécie Macrobrachium amazonicum foi introduzida nos açudes do Nordeste com a finalidade de servir de alimento a peixes carnívoros (Departamento Nacional de Obras contra as Secas - DNOCS, 1939), tendo sido obtida uma produção média anual de 2.500 t (PAIVA, 1980).

Aos poucos foram sendo realizados mais estudos técnicos sobre o cultivo de espécies de interesse comercial como Macrobrachium carcinus (SOARES, 1956), seguidos de descrições de sua biologia (COELHO, 1963).

O cultivo de Macrobrachium rosenbergii, foi iniciado em 1961 (LING, 1961) por pesquisadores da Malásia e em 1965 pelo Havai (FUJIMURA, 1965), que em 1977 exportou pós-larvas adquiridas pelo Departamento de Oceanografia da Universidade Federal de Pernambuco (COELHO, 1982). Visava-se tentar a aclimação desta espécie, com o objetivo de realizar cultivos comerciais adequados às condições brasileiras. Surgia assim o Macrobrachium rosenbergii como uma fonte alternativa de alimento, por ser um dos poucos crustáceos comestíveis de água doce de indiscutível valor econômico; a viabilidade de sua exploração zootécnica foi confirmada por ZIMMERMANN (1986).

Já se reconheceu a necessidade de um conhecimento mais aprofundado sobre a biologia desta espécie, principalmente das gônadas, dos ovos e das larvas, o que vem sendo realizado, já que a espécie é muito apreciada no mundo todo (COELHO, et al, 1981).

Poucos são, entretanto, os trabalhos que abordam os aspectos estruturais e ultra-estruturais da gônada masculina. Dougherty e Sandifer (1984) realizaram estudos da gônada masculina ao longo dos cordões seminíferos, reportando-se apenas às junções das células germinais e células sustentaculares.

SAGI, et al. (1988) estudaram os três tipos de machos de Macrobrachium rosenbergii, o de pata branca, pata laranja e pata azul, relacionando os morfotipos com os estoques de esperma.

PAPATHANASSIOU e KING (1984) estudaram o processo de citodiferenciação de espermátide até espermatozóide (espermio gênese), em Palaemon serratus.

Consideramos a carência de informações acerca de morfologia tecidual da gônada masculina (testículos) e o processo de maturação ao longo do epitélio germinal. Assim o objetivo principal deste trabalho é contribuir para a análise estrutural e ultra-estrutural da espermatogênese de Macrobrachium rosenbergii para um melhor entendimento da biologia desta espécie.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. MATERIAL

2.1.1. CARACTERIZAÇÃO

O Macrobrachium rosenbergii (DE MAN) caracteriza-se como crustáceo por ter um exo-esqueleto quitinoso impregnado de sais de cálcio revestindo o corpo, dividido em céfalo-tórax e abdômen.

Os segmentos cefálicos são cinco, apresentando dois pares de antenas e três pares de apêndices bucais.

Tem olhos pedunculados e compostos na cabeça e oito segmentos torácicos, todos com apêndices, sendo três pares de maxilípedes e cinco pares de patas, sendo portanto designados de Decapoda (LING, 1969; CAVALCANTI, 1986).

A família Palaemonidae à qual pertence o Macrobrachium rosenbergii caracteriza-se por apresentar o 2º par de pereiópodos bem mais desenvolvido que o primeiro, sendo mais compridos e mais robustos. O 2º segmento do pleon tem a sua pleura recobrando as pleuras do primeiro e do terceiro segmento e a secção do último segmento (XIX) abdominal antes do telson, mostra a fase superior do tergito arredondada e lisa; além disso apresenta o primeiro par de antenas com três apêndices filiformes, sendo os dois externos, reunidos na ba

se. A mandíbula é distintamente bipartida e quase sempre munida de palpos e nenhum dos pereiópodos apresenta epipóditos.

A espécie foi determinada segundo LING (1969) existindo as variedades de morfotipos: pata branca, pata laranja e pata azul (KURIS, et al, 1987). O presente trabalho usou apenas o pata azul.

2.1.2. OBTENÇÃO DO MATERIAL

Machos adultos de Macrobrachium rosenbergii foram coletados numa fazenda de cultivo, no município de Biguaçu, distante 30 km de Florianópolis, Santa Catarina, durante o ano de 1989. Utilizou-se para a pesca a rede de arrasto.

Após a captura foram selecionados 20 machos reprodutores (pata azul) de cada vez, sendo utilizado um total de 60 exemplares para a análise do presente trabalho.

O critério adotado com maior segurança na determinação do sexo foi a observação do 2º par de patas natatórias (pleópodos), onde observa-se o protopódito, o exopódito e o endopódito, dotado de um apêndice interno e do apêndice sexual masculino, que auxilia na cópula (Prancha I).

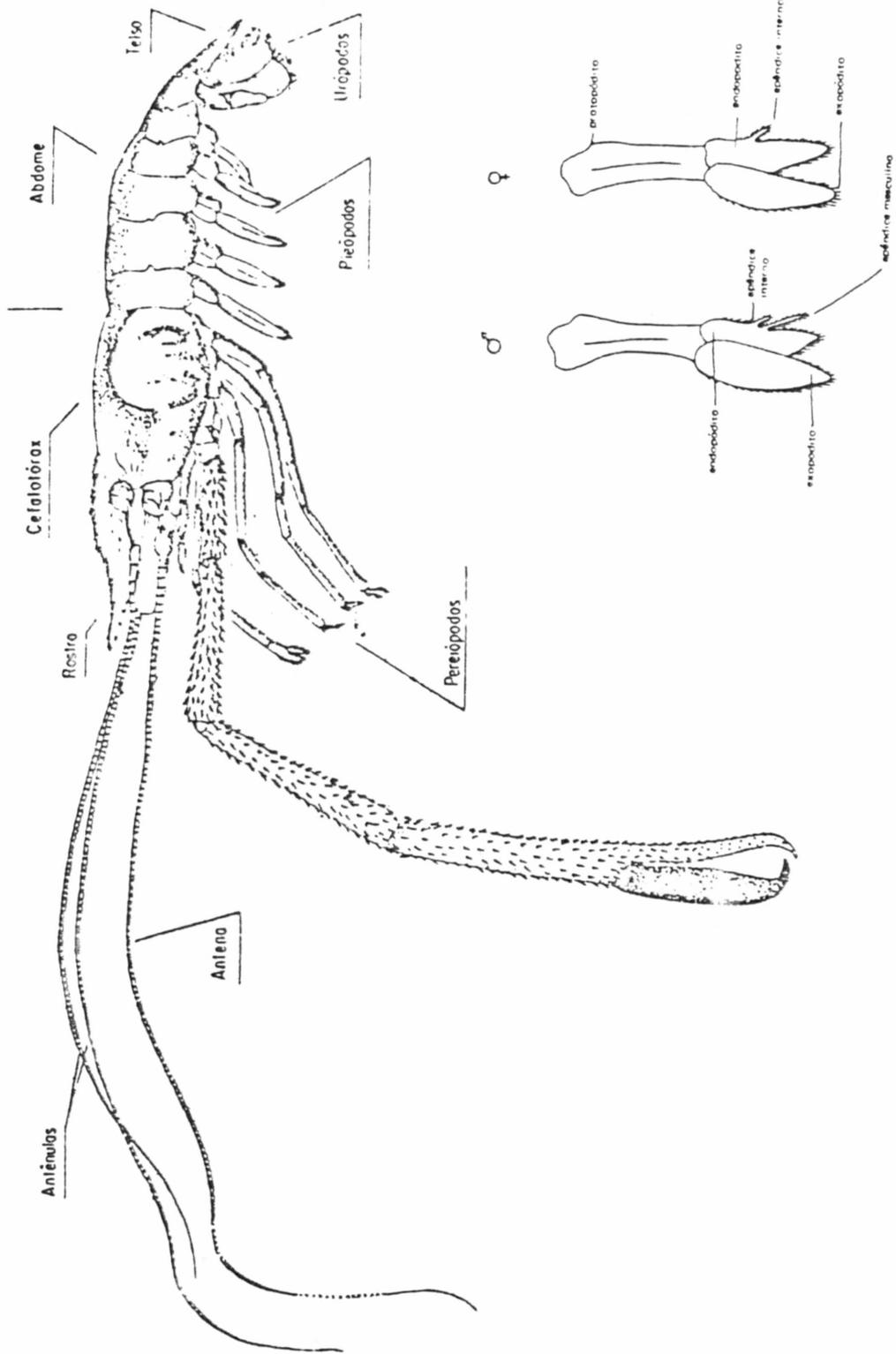
Em seguida, com o auxílio de uma régua milimetrada, procedeu-se à medição de cada exemplar: o tamanho médio foi 25 cm de comprimento. O peso médio foi de 120 gramas.

Após estes procedimentos, os exemplares foram colocados em caixas de isopor, com capacidade para 10 litros com um sistema de aeração para a melhor oxigenação da água, garantindo assim a sobrevivência dos animais até sua chegada

PRANCHA I

A. Morfologia externa de *Macrobrachium rosenbergii*. (VALENTE, 1986).
Vista lateral.

B. Detalhe da estrutura básica dos pleópodos ou apêndices natatórios, mostrando a diferença entre os sexos.



ao Departamento de Aquicultura da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC) em Itacorubí-Florianópolis, onde foram conservados em tanques de cultivo e daí coletados mensalmente.

2.2. MÉTODOS

2.2.1. OBTENÇÃO DAS GÔNADAS MASCULINAS PARA MICROSCOPIA ÓPTICA

No laboratório os exemplares vivos utilizados foram insensibilizados previamente pelo frio (-4°C) sendo logo após dissecados ao microscópio estereoscópio Zeiss.

Foi feita uma incisão longitudinal na linha mediana dorsal da carapaça com posterior afastamento lateral desta (Prancha II).

Os testículos, que estão localizados no cefalotórax, com os dois terços anteriores recobrimdo o hepatopâncreas e o terço posterior sob o coração, estando no total, compreendidos na região entre o estômago e a margem posterior do cefalotórax, sob o tubo digestivo, foram removidos e com o uso de uma gilete obtiveram-se fragmentos de tecido com dimensões de 1 x 1 mm para microscopia óptica e microscopia eletrônica.

2.2.2. FIXAÇÃO E INCLUSÃO

Os fragmentos de testículos foram colocados na solução fixadora de formaldeído a partir de paraformaldeído sendo:

Paraformaldeído

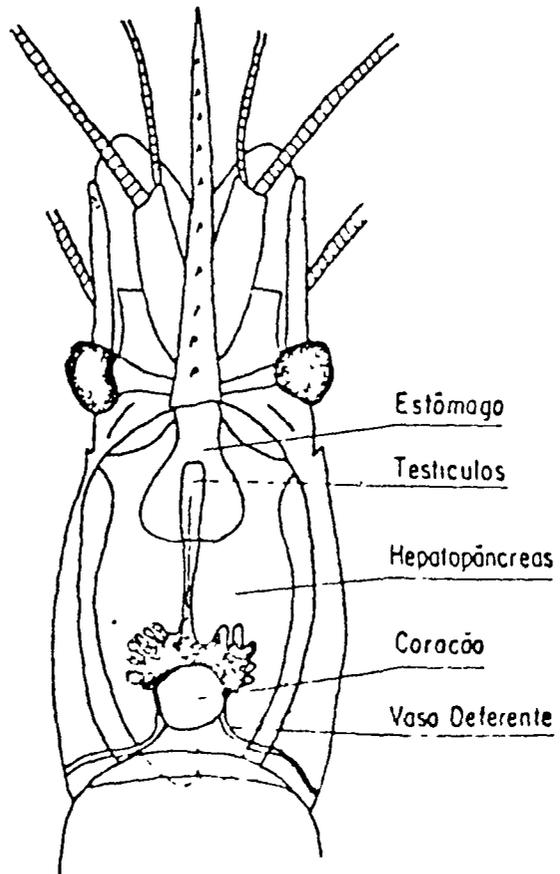
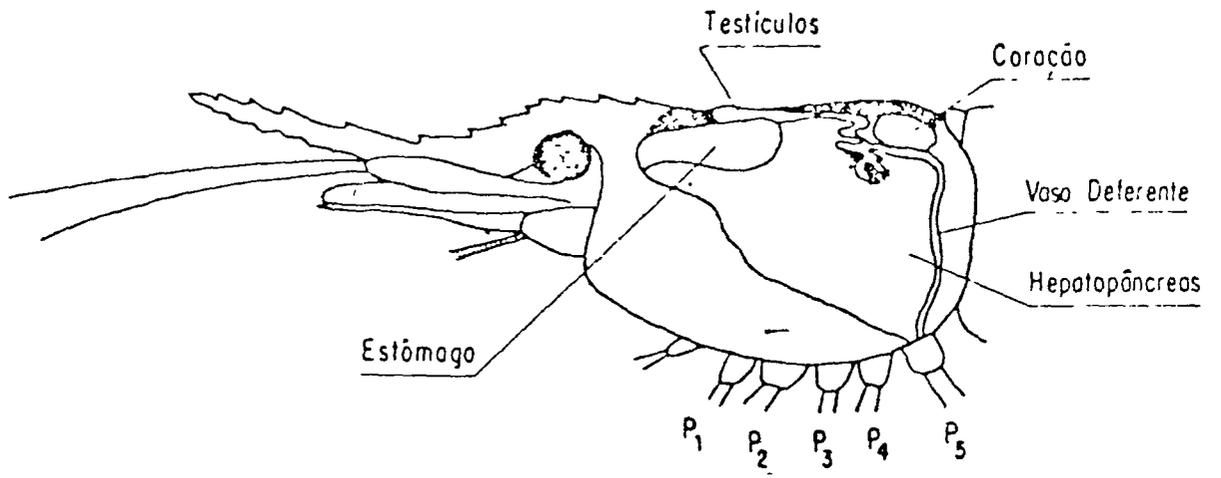
0,5 g

PRANCHA II

Detalhes da dissecação do cefalotórax de *Macrobrachium rosenbergii* indicando a posição dos testículos.

A. Vista lateral

B. Vista dorsal



Tampão fosfato 0,2 M	25 ml
Sol. Sat. NaOH	2 gotas
Cloreto de cálcio	25 mg
Água destilada	20 ml.

Preparo da mistura:

- 1º Aquecer a água com o paraformaldeído a 60°C.
- 2º Retirar do fogo e acrescentar 2 gotas de soda (NaOH), agita-se até ficar uma solução cristalina.
- 3º Acrescentar o cloreto de cálcio dissolvido no tampão fosfato 0,2M.
- 4º Filtrar a mistura.

Obs: Esta mistura deve ser preparada no momento de usá-la, pois seu tempo de vida útil é curta, formando precipitado, quebrando a estabilidade da mesma.

Os fragmentos de testículo permaneceram durante 4 horas numa solução fixadora. Em seguida foram lavados 2 vezes com tampão fosfato 0,2M e pH=7,2 por 15 minutos para cada banho. Em seguida foram desidratados em uma série crescente de etanóis de 50% até 100%, sendo 2 trocas de 15 minutos à temperatura ambiente para cada etanol.

Como utilizamos para o preparo de nosso material a resina plástica, Glicolmetacrilato (GMA) (ARNOLD, 1975) podemos verificar as vantagens do uso deste método sobre os métodos usuais como parafina e paraplast tais como: processamento mais rápido, cortes semi-finos, melhor resolução ao microscópio óptico, infiltração e polimerização à temperatura

ambiente, bem como menor distorção e artefatos, o que poderá ser comprovado à medida que descrevemos a técnica e apresentarmos os resultados.

Logo após foi realizada uma pré-infiltração dos fragmentos de testículo usando-se uma mistura de etanol 100% - 10 ml e GMA (Solução infiltração A) - 10 ml durante 2 horas à temperatura ambiente.

Preparo da Solução de infiltração A:

- Historesina (líquida) 50 ml
- Ativador (pó) 0,5 g

Após a remoção dos fragmentos de testículos da solução de infiltração A estes permaneceram por 12 horas (em "overnight") numa solução de infiltração.

Removidos da solução de infiltração procedeu-se à inclusão dos mesmos em moldes plásticos contendo \pm 1 ml da solução de inclusão formada por uma mistura de:

- Solução de infiltração A 15 ml
- Acelerador (endurecedor) 1 ml

A polimerização ocorre de 1 a 2 horas à temperatura ambiente.

Foi utilizado para a confecção dos cortes o micrótomo manual de parafina e as usuais navalhas de aço, obtendo-se cortes com espessuras de 3 micrômetros.

Estes foram distendidos em um recipiente de vidro com água à temperatura ambiente.

Foram secos em estufa a 60°C durante 15 minutos para maior aderência dos cortes à lâmina.

Os fragmentos de testículos assim processados foram submetidos às colorações por Hematoxilina-eosina, PAS e Gomori com a finalidade de se estudar a histologia do epitélio germinal bem como a basofilia nuclear das células germinais.

2.2.3. COLORAÇÃO HEMATOXILINA-EOSINA (CAMARGO, 1979) MODIFICADO

Os cortes foram submetidos a uma bateria de álcoois em ordem decrescente (100% até 70%) até a lavagem em água corrente durante 5 minutos. Depois de serem colocados em contato com hematoxilina de Harris durante 8 minutos, foram lavados em água corrente por 5 minutos para uma melhor acentuação do tom do corante. Em seguida, depois de 2 banhos com água destilada foram contra-corados com eosina por 15 minutos. Como a eosina utilizada foi a eosina amarela e portanto não a indicada para a da técnica historesina (eosina Y) fizemos uma modificação. Logo após a remoção da lâmina da eosina, esta foi colocada em uma solução aquosa acidificada a 1% (ácido acético glacial) durante 2 minutos para uma melhor acentuação e diferenciação do corante. Em seguida após rápida passagem em álcool 100% (2 vezes) e xilol, foi realizada a montagem sob lamínula com entelan.

2.2.4. TESTE DO PAS (PEARSE, 1968)

Os cortes hidratados, foram oxidados pelo ácido pe-

riódico 0,4% por 30 minutos em estufa a 56°C. Após serem lavados em água corrente por 5 minutos foram colocados em 3 banhos de água destilada (rapidamente).

Em seguida os cortes foram tratados pelo reativo de Schiff durante 15 minutos.

Decorrido esse tempo os cortes foram lavados três vezes em água sulfurosa (MELLO e VIDAL, 1980) durante 3 minutos com a finalidade de se remover as moléculas do reativo excedentes e não ligadas ao substrato. Depois da lavagem em água destilada por 5 minutos, desidratadas rapidamente, diafanizadas, montadas sob lamínula com entelan.

2.2.5. TRICRÔMICO DE GOMORI (1952)

Os cortes preparados foram imersos em hematoxilina de Harris durante 8 minutos para coloração dos núcleos. Após lavagem em água acidificada 1% (ácido acético glacial) durante 2 minutos foram transferidos para o tricrômico de Gomori durante 20 minutos. Em seguida foram transferidos para uma solução de água acidificada a 1% para diferenciação e "acentuação" do corante. Após rápida passagem em álcool 100% e xilol foram montadas sob lamínulas com entelan.

2.3. PREPARO DOS TESTÍCULOS PARA MICROSCOPIA ELETRÔNICA

2.3.1. FIXAÇÃO

Os fragmentos de testículos foram colocados em uma solução fixadora de glutaraldeído 2,5% em tampão fosfato 0,1M, pH=7,2 a 4°C durante 1 hora e 30 minutos.

Preparo da solução fixadora:

- Glutaraldeido 25% 2,24 ml
- Sacarose 0,684 g
- Tampão fosfato 0,1M 20 ml

Após remoção da solução fixadora, os fragmentos de testículos permaneceram durante 15 minutos em 3 banhos de tampão fosfato 0,1M, pH=7,2 a 4°C.

Em seguida foi realizada uma pós-fixação durante 1 hora com tetróxido de ósmio a 1% a 4°C, lavagem com NaCl 0,1M, 2 banhos de 5 minutos cada a 4°C e removido para uma solução aquosa de acetato de uranila 1% a 4°C por um período de 18 horas, para contrastação dos mesmos.

2.3.2. DESIDRATAÇÃO E INCLUSÃO (SPURR, 1969)

Após a desidratação dos cortes à temperatura ambiente em uma série de álcoois crescentes (70% - 100%) sendo 2 banhos de 10 minutos para cada álcool, foram embebidos em uma mistura de álcool 100% com acetona P.A. durante 10 minutos numa proporção de 1:1 à temperatura ambiente. Em seguida foram removidos para acetona P.A. durante 45 minutos e, logo após, transferidos para uma mistura de acetona com resina Spurr durante 1 hora numa proporção de 2:1. Em seguida permaneceram durante 1 hora e 30 minutos em Spurr sendo realizadas 2 trocas. Após uma última embebição em Spurr durante 1 hora, foi realizada a emblocagem dos fragmentos de testículos, em moldes plásticos por um período de 24 horas em estufa a 70°C até completa polimerização.

Preparo da resina Spurr:

1º	Vinylcyclohexene dioxide VCD	5,0 ml
2º	Diglycidyl ether polypropilenoglycol DER	3,0 ml
3º	Nonenyl succinic anhydride NSA	13,0 ml
4º	Dimethylaminoethanol DMAE	0,2 ml

Procedimento: Para preparar a mistura usa-se uma proveta graduada e medem-se os 5 ml de VCD em seguida os 3 ml de DER e os 13 ml de NSA, com uma pipeta graduada para 0,2 ml de DMAE. Em seguida com um bastão de vidro durante aproximadamente 30 minutos agitamos a mistura até torná-la homogênea. Em seguida usa-se uma seringa plástica para guardá-la em freezer.

2.3.3. OBTENÇÃO DE CORTES ULTRA-FINOS

Cortes ultra-finos de aproximadamente 50 a 70 nm de espessura, apresentando coloração levemente dourada, segundo a escala de cores de interferência proposta por PEACHEY (1958), foram obtidos no ultramicrotomo Porter-Blum MT₂-B (Sorvall) com navalhas de vidro.

Estes cortes foram colhidos em telas de cobre de 200 mesh e contrastados em solução aquosa de acetato de uranila a 1% por 30 minutos à temperatura ambiente (WATSON, 1958). Depois de rápida lavagem em 3 banhos de água destilada e secagem os cortes foram colocados na superfície de uma gota de solução de Reynolds durante 5 minutos à temperatura ambiente, e dentro de placa de Petri selada, onde grande parte do dióxido de carbono é absorvido por pastilhas de hidróxido de sódio. Posteriormente as telas foram lavadas em 2 banhos de

água destilada e repousaram durante 10 minutos para secagem.

Solução de Reynolds:

- Nitrato de chumbo $P_b (NO_3)_2$ 1,33 g
- Citrato de sódio $Na_3(C_6H_5O_7)2H_2O$ 1,76 g
- Água destilada aquecida previamente 30 ml

Preparo da solução Reynolds:

Depois de agitar fortemente e deixar em repouso intercalando durante 30 minutos, adicionar à solução 8 ml de hidróxido de sódio (NaOH) normal e completar para um volume de 50 ml com água destilada.

2.4. OBSERVAÇÃO E FOTOGRAFIAS

As lâminas histológicas foram observadas e fotografadas em microscópio Carl Zeiss e máquina Winder M.35 e em filme Kodacolor II, 100 ASA (135).

A observação dos cortes ultra-finos nas telas se deu em microscópio eletrônico de transmissão Philips EM-300, operado em 80 KV, do Centro de Microscopia Eletrônica da Universidade Federal do Paraná em Curitiba.

As eletromicrografias foram obtidas em filme Fuji (Fuji-Electron-Microscopy Film-FG).

A revelação e ampliação para a obtenção de eletromicrografias ocorreu no laboratório fotográfico do Centro de Microscopia Eletrônica da Universidade Federal do Paraná. O papel utilizado foi Kodabromide RC-F4.

3. RESULTADOS

3.1. ORGANIZAÇÃO TECIDUAL DOS TESTÍCULOS

Os testículos de Macrobrachium rosenbergii se localizam no cefalotórax com os dois terços anteriores recobrimdo o hepatopâncreas e o terço posterior sob o coração, estando compreendidos entre o estômago e a margem posterior do cefalotórax, sob o tubo digestivo. São bilobados, sendo os lobos alongados esbranquiçados unidos em sua terminação anterior formando estruturas em forma de V que estendem da parte antero-vertical do estômago até a pósterocentral do coração, se dispondo acima do hepatopâncreas e abaixo do coração (CHOW et al, 1982).

A análise dos cortes histológicos com 3 micrômetros (inclusão em historesina) e dos cortes semi-finos com 50 a 70 nanômetros de espessura (inclusão em Spurr) revelaram a presença de uma fina cápsula de tecido conjuntivo, rica em fibras conjuntivas e fibroblastos que envolve o epitélio germinal (figs. 1, 8 e 9).

Os espermatozoides se desenvolvem ao nível dos cordões seminíferos e estão distribuídos livremente no interior de cistos por toda a área testicular (fig. 1).

No interior dos cordões seminíferos encontram-se células germinativas em diferentes estágios de diferenciação

(figs. 2, 3, 6, 8 e 11) bem como células em várias fases de divisão (fig. 2 a 7).

Os espermatozoides presentes nos cistos, parecem flutuar livremente na luz dos cordões (fig. 1).

As células sustentaculares são frequentes nos cordões seminíferos, apresentando um núcleo claro e citoplasma amplo. (fig. 8, 14).

3.2. ASPECTOS MORFOLÓGICOS DAS CÉLULAS GERMINATIVAS

3.2.1. ESPERMATOGÔNIAS

Nos cordões seminíferos estas células podem ser classificadas como espermatogônias A e B.

3.2.1.1. ESPERMATOGÔNIAS A (fig. 3)

São células que resultam de divisão mitótica das espermatogônias B. Crescem tornando-se muito volumosas e passam a chamar-se de espermatócito I (primário), ou podem ser considerados os espermatócitos I em estágios pré-leptoteno.

O núcleo apresenta-se claro, com cromatina que pode estar aderida ou não ao envoltório nuclear em grumos grosseiros. O núcleo é arredondado e volumoso e o citoplasma é pouco corado, tanto pela hematoxilina-eosina quanto pelo Gomori tendo reação negativa com o teste do PAS.

3.2.1.2. ESPERMATOGÔNIAS B (figs. 3, 5 e 8)

Estas células estão distribuídas ao longo dos cordões seminíferos, mais próximas à porção externa. São células in_

cialmente cúbicas com citoplasma pouco distinto, que não sofrem transformações, com o núcleo apresentando-se alongado ou ovóide. A cromatina é organizada em grumos grosseiros aderidos à carioteca bem contrastados pela hematoxilina e tricrômico de Gomori, não apresentando nenhuma reação positiva com o teste do PAS.

3.2.2. ESPERMATÓCITOS

São células que se caracterizam pelos diferentes graus de compactação de seus núcleos.

3.2.2.1. ESPERMATÓCITO I OU PRIMÁRIO (figs. 3, 4, 5 e 8)

São células volumosas que resultam de um período pré-leptoteno, iniciando a 1ª divisão meiótica, entrando portanto no estágio leptoteno, onde o núcleo é esférico, grande e apresentando a cromatina aderida ao envoltório nuclear com grumos grosseiros mais centrais. Provavelmente, por ser a prófase da divisão meiótica um período muito longo, encontramos um maior número de células neste período e no estágio leptoteno. Observamos que as células que apresentam-se num estágio mais inicial ou seja pré-leptoteno, tem um núcleo volumoso e claro com a cromatina menos compactada. À medida que avança o processo de divisão, a cromatina torna-se mais compactada e os núcleos tornam-se mais escuros, contrastando com o citoplasma pouco acidófilo.

Nos estágios mais avançados da prófase não foi possível sua identificação. Entretanto em cortes corados com hematoxilina-eosina e também com tricrômico de Gomori é possível

distinguir entre um espermatócito I no estágio leptoteno e um no pré-leptoteno (espermatogônia A).

Os espermatócitos I com uma maior compactação da cromatina, coram mais intensamente com a hematoxilina, que por ser um corante de caráter básico, tem grande afinidade com os grupos ácidos da molécula do DNA, revelando assim uma maior basofilia nuclear. O citoplasma destas células cora-se mais com a eosina, que por ser um corante ácido, liga-se com os grupos básicos, adquirindo assim uma coloração levemente rosa. O mesmo é válido para o tricrômico de Gomori, onde o citoplasma é corado em verde pelo verde-luz, permitindo assim uma melhor identificação desta célula em diferentes estágios (figs. 2, 8, 11, 12 e 13) observando-se portanto um citoplasma distinto e reduzido quando comparado com o volume do núcleo.

As reações PAS, usadas para detectar a presença de glicoproteínas foram negativas, pois não houve reação do Schiff ao nível destas. Observamos entretanto a presença de grumos esparsos de glicogênio ao nível de vasos hemolinfáticos dispostos entre os cordões seminíferos (fig. 15).

3.2.2.2. ESPERMATÓCITO II OU SECUNDÁRIO

São células resultantes da 1ª divisão meiótica, portanto, encontrando-se na 2ª divisão da meiose, sendo assim células menores que o espermatócito I.

Por ser a 2ª divisão meiótica um processo rápido, os espermatócitos II foram infreqüentes ao nível do epitélio germinal.

Nos cortes corados pela hematoxilina-eosina o tricrô-

mico de Gomori, o núcleo se apresentou fortemente corado pela hematoxilina e tricrômico de Gomori, tornando-se escuro e bem evidente. Já há nesta fase uma maior compactação da cromatina, a forma do núcleo sendo esférica, com um citoplasma pouco corado pela eosina, sendo levemente acidófilo, e corado em verde pelo tricrômico de Gomori (figs. 2 e 11).

3.2.3. ESPERMÁTIDES (figs. 3, 4, 6 e 16)

Apresentam durante o processo de citodiferenciação, mudanças marcantes em sua forma, desde esféricas até alongadas.

O citoplasma é distinto e acidófilo. O núcleo é esférico e excêntrico, homogêneo e escuro, com a cromatina bem compactada.

As espermátides, em fases mais adiantadas do processo de citodiferenciação (fig. 2), encontram-se próximas à luz ou presentes nesta com o núcleo elíptico até atingir a forma de taça com grande quantidade de citoplasma em seu interior.

3.2.4. ESPERMATOZÓIDE (Figs. 9 e 10)

São células com núcleo em forma de taça com a cromatina bem compactada, corada fortemente pela hematoxilina, tricrômico de Gomori e apresentando reação negativa ao PAS a nível de núcleo. Da base do núcleo projeta-se uma estrutura pontiaguda ou "spike" com função similar à do flagelo dos espermatozóides de mamíferos, apresentando também reação negativa ao teste do PAS e coradas em verde pelo Gomori e em rosa pela eosina.

Estas células flutuam livremente na luz dos cistos (fig.1).

3.3. ASPECTOS ULTRA-ESTRUTURAIS DAS CÉLULAS GERMINATIVAS

3.3.1. ESPERMATOGÔNIAS (fig. 17)

3.3.1.1. ESPERMATOGÔNIAS A

As espermatogônias são células volumosas, com o núcleo oval ou esférico, com um nucleoplasma claro, mostrando uma fina textura granulo-filamentosa devido à pouca compactação do material cromatínico, não sendo portanto contrastado com o acetato de uranila. Apenas certas regiões apresentam grumos mais compactados, devido ao contraste com o acetato de uranila.

O citoplasma dessas células apresenta grande quantidade de organelas, como mitocôndrias e ribossomos. O retículo endoplasmático é bem desenvolvido com aspecto tubular, formando cordões no citoplasma. As mitocôndrias iniciam sua polarização. Observa-se que os corpos destas células são rodeados pelo citoplasma.

3.3.1.2. ESPERMATOGÔNIAS B

As espermatogônias B são células menores que as espermatogônias A e repousam sobre a membrana basal dos cordões seminíferos. O núcleo com aspecto aproximadamente triangular, tem o material cromatínico bem compactado e portanto, contrastado pelo acetato de uranila, mostra poucas regiões claras, com cromatina menos compactada. O citoplasma é pouco distinto com poucas organelas membranosas (fig. 19).

Observa-se também uma espermatogônia B em metáfase da mitose (fig. 18).

3.3.2. ESPERMATÓCITO

Os espermatócitos se caracterizam por serem células com núcleo geralmente arredondado, podendo ter forma irregular, estar em divisão meiótica e apresentar diferentes graus de compactação de seu material nuclear.

3.3.2.1. ESPERMATÓCITO I OU PRIMÁRIO

Os espermatócitos primários, formam as células mais frequentes no epitélio dos cordões seminíferos.

Isto se deve ao fato de ser a prófase da meiose muito longa em relação às demais fases da meiose.

Os espermatócitos I recém-formados encontram-se numa interfase pré-meiótica seguida de uma prófase da primeira divisão da meiose, sendo o grau de compactação cromatínico um ponto de caracterização. São células grandes (volumosas) com núcleo arredondado, cromatina em diferentes graus de compactação e envoltório nuclear apresentando grande quantidade de complexos de poros. Em certas regiões do envoltório nuclear é visível sua dilatação e a presença de vesículas intranucleares tanto associadas ao envoltório nuclear como ao interior do nucleoplasma (fig. 22).

O citoplasma apresenta desenvolvidas organelas membranosas, partículas poliribossômicas, grande quantidade de mitocôndrias. Em certos espermatócitos já é visível a polarização das mitocôndrias, bem como o retículo endoplasmático na forma tubular e o complexo de Golgi.

Na análise dos resultados dos espermatócitos obser-

vamos junções semelhantes aos desmosomas. São junções que ocorrem entre um espermatócito e outro e formam densificação do citoplasma nas faces das membranas, sendo que os filamentos citoplasmáticos não se inserem dentro da densificação. O espaço intercelular é preenchido com material amorfo. O corpo celular dos espermatócitos é envolvido pelo citoplasma das células sustentaculares (figs. 20, 21, 23, 24, 25, 26, 27, 29 e 38).

Prováveis complexos sinaptonêmicos na fig. 26.

3.3.2.2. ESPERMATÓCITO II OU SECUNDÁRIO

São células muito semelhantes morfológicamente aos espermatócitos I, mas caracterizam-se por um maior grau de compactação de seu material nuclear, formando grandes massas cromatínicas no nucleoplasma.

O citoplasma apresenta mitocôndrias, ribossomos, várias figuras mielínicas e retículo endoplasmático desorganizado, formando filamentos ou estruturas vesiculares (figs. 20 e 21).

3.3.3. ESPERMÁTIDES

As espermátides são células que sofrem um extenso processo de citodiferenciação denominado de espermiogênese para transformarem-se em espermatozóide.

Estas células resultam da 2ª divisão da meiose. São células com núcleo oval ou esférico e que apresentam material cromatínico mais compactado. O citoplasma apresenta grande

quantidade de ribossomos, mitocôndrias com cristas tubulares, corpos cromatínicos, regiões vesiculares e formações concêntricas de lamelas aneladas, organizadas próximas ao núcleo. Observa-se também centríolo.

O citoplasma das células sustentaculares rodeia as espermatídes, podendo ser observadas, em certas regiões da membrana plasmática, vesículas pinocíticas (figs. 31, 32, 33 e 34).

Em estágios mais adiantados do processo ocorrem modificações na forma do núcleo, que passa de oval para angular, com a cromatina formando massas compactadas na periferia. Na região central há uma cromatina menos compactada, com um nucleoplasma claro.

O citoplasma nesse estágio apresenta material membranoso, vesículas pequenas e muito material fibrilar (fig. 35).

3.3.4. ESPERMATOZÓIDE

O espermatozóide é uma célula resultante do processo de citodiferenciação da espermatíde que sofreu várias transformações até atingir um estágio onde o núcleo passou de esférico para angular, terminando com seu material cromatínico compactado mais próximo à periferia do envoltório nuclear e em alguns pontos da região central, apresentando no centro um nucleoplasma claro. Em fases finais de maturação do espermatozóide o núcleo adquire um formato em taça, com a cromatina bem compactada nesta região.

O citoplasma que o envolve na região nuclear é escasso e apresenta muito material fibrilar.

No polo apical contém vesículas pequenas e material fibrilar que se distribui por todo o citoplasma. No polo basal há a presença de vesículas maiores com material granular. O material amorfo estende-se na base da vesícula granular em forma de estrutura pontiaguda, denominada "spike".

Aparentemente o espermatozóide de Macrobrachium rosenbergii não apresenta acrossomo (figs. 36 e 37)

3.4. CÉLULAS SUSTENTACULARES

Os cortes de 3 micrômetros (inclusão historesina) revelaram a presença de células sustentaculares distribuídas nos cordões seminíferos. São células com núcleo claro, podendo apresentar grumos de cromatina mais próximos ao envoltório nuclear, nucléolo bem distinto, fortemente corado pela eosina (fig. 8). O citoplasma apresenta-se claro, dificultando muitas vezes a distinção entre este e o núcleo. Observa-se a íntima associação entre o citoplasma ramificado destas células com o citoplasma das células germinais (figs. 4, 7, 8 e 14).

Os cortes ultra-finos das células sustentaculares nos revelaram uma morfologia muito complexa. Apresentam um corpo relativamente pequeno com o núcleo frequentemente angular e a cromatina mais aderida ao envoltório nuclear com um nucleoplasma claro, apresentando em alguns de seus pontos massas cromatínicas.

O corpo celular está preferencialmente localizado na periferia dos cordões seminíferos.

O citoplasma destas células é extensivo, passa entre cada célula germinal e repousa sobre a membrana basal (figs. 19, 28 e 30), apresentando mitocôndrias, retículo endoplasmático liso e rugoso e complexo de Golgi. Apresenta também grandes vesículas aparentemente repletas de material fagocitado (figs. 28 e 34).

3.5. FIBROBLASTOS

A fina bainha de tecido conjuntivo que circunda cada cordão seminífero apresenta em toda sua extensão células fusiformes caracterizadas como fibroblastos. O núcleo alongado destas células acompanha o aspecto fusiforme das mesmas, podendo ser observadas ao nível de microscopia óptica (figs. 1 e 8).

A microscopia eletrônica nos revela também um núcleo alongado, grande, com a cromatina aderida à membrana interna no envoltório nuclear. No nucleoplasma observam-se filamentos cromatínicos e regiões de cromatina mais compactada. Há a presença de um ou mais nucléolos geralmente na periferia do núcleo. O citoplasma que circunda o núcleo é relativamente pequeno mas projeta-se no sentido anterior e posterior a este, formando prolongamentos e conferindo a estas células o aspecto fusiforme (figs. 28 e 30).

FIGURA 1. Corte longitudinal do cordão seminífero. Fina bainha de tecido conjuntivo (seta pequena) fibroblastos (seta) e cisto (C). Aumento 125x coloração HE.

FIGURA 2. Cordão seminífero com espermatócitos primários (Sp), Prófase (seta), espermatócito secundário (seta pequena), células sustentaculares (S) e espermatozóide (Sz). Aumento 500x coloração HE.

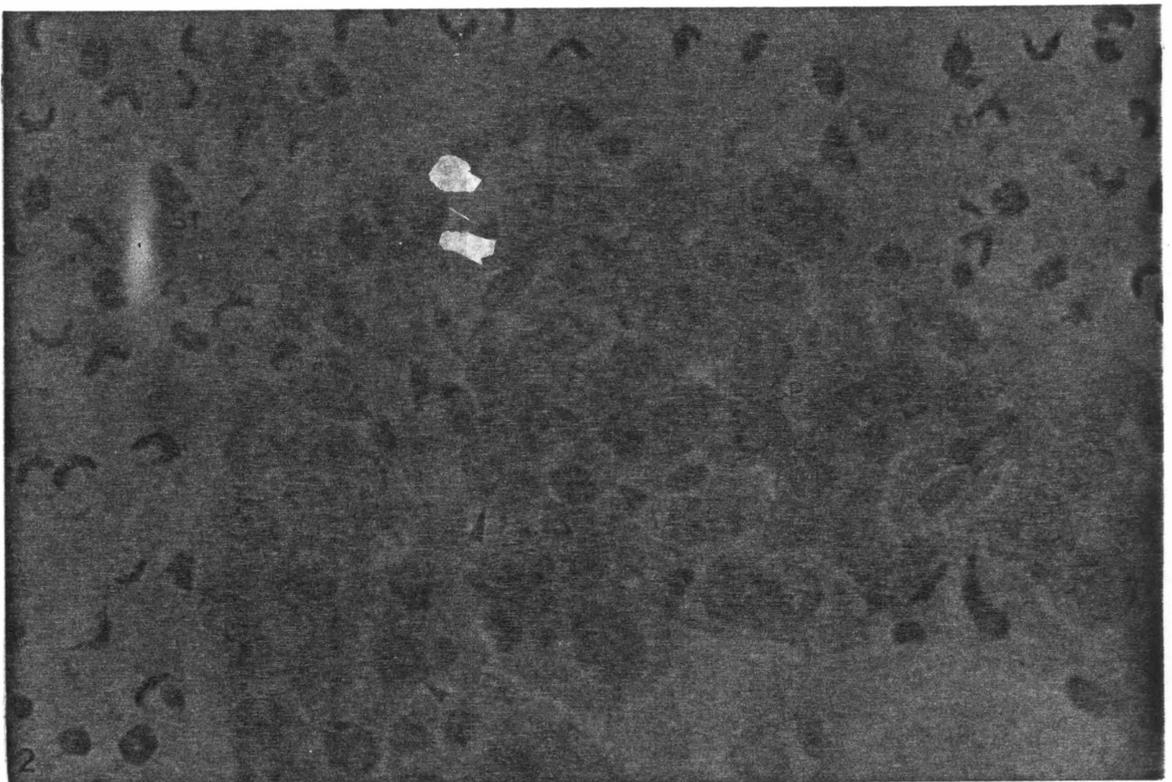
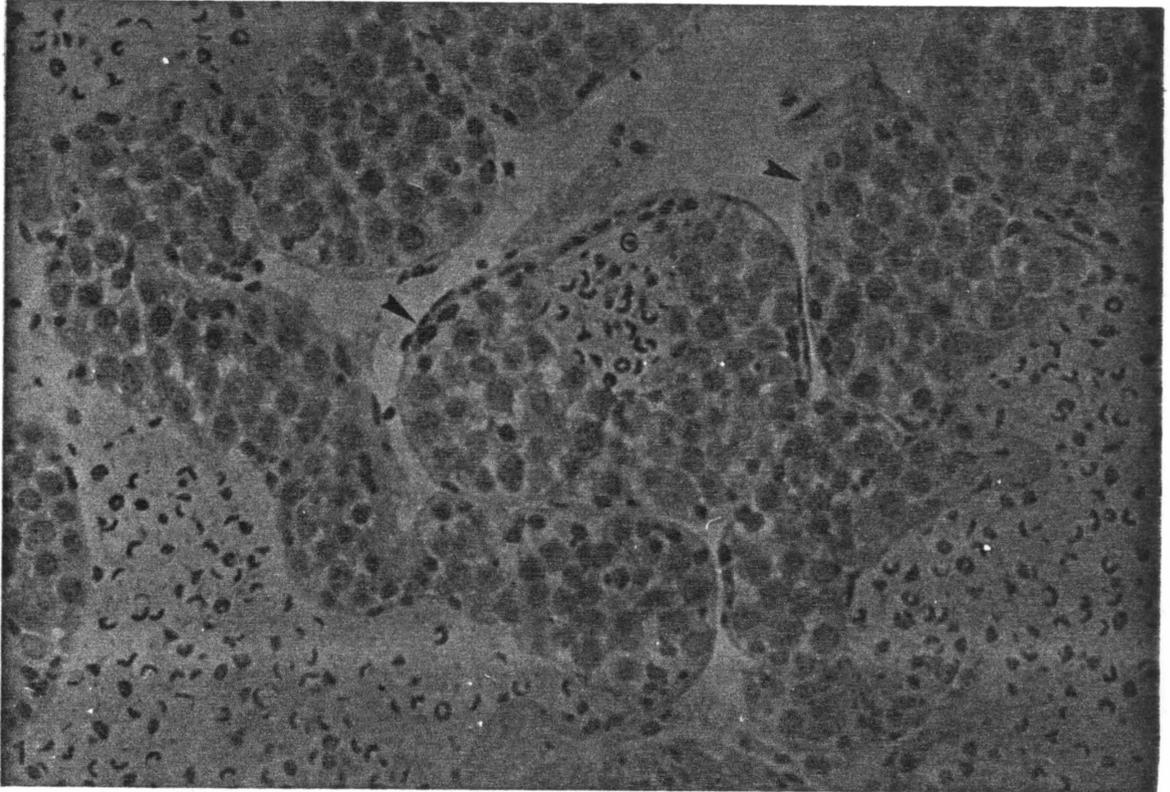


FIGURA 3. Cordões seminíferos com espermatogônia A (Sg), espermatogônia B (seta pequena), espermatócitos primários (Sp), célula em metáfase (seta), espermatídes (St).
Aumento 500x coloração HE.

FIGURA 4. Cordões seminíferos com espermatócitos primários (Sp), espermatídes (St), células sustentculares (S) e célula em início metáfase (seta).
Aumento 500x coloração HE.

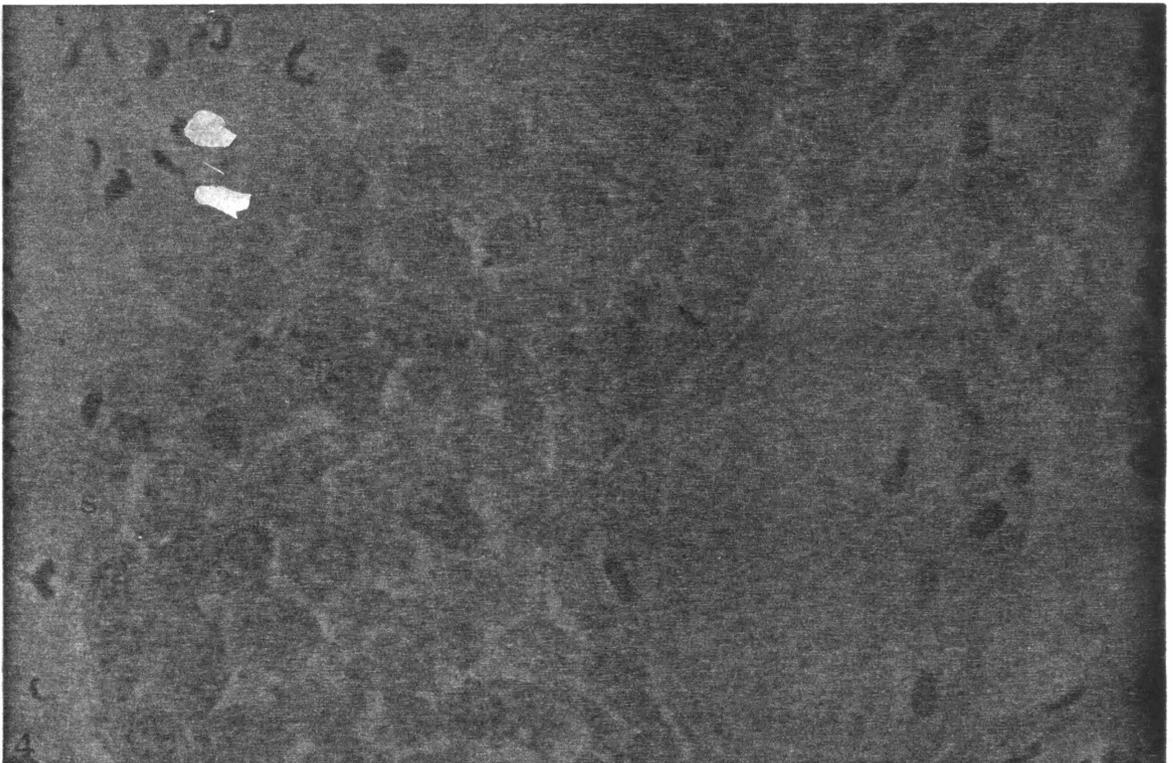
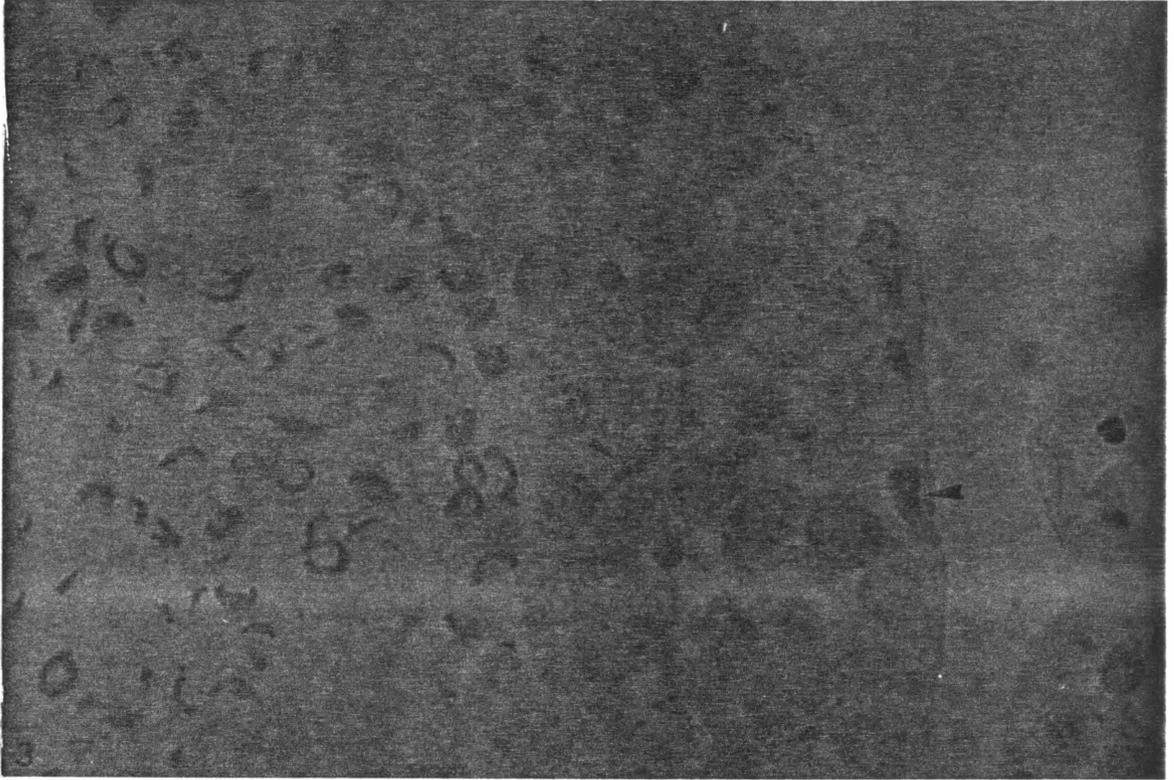


FIGURA 5. Cordões seminíferos com espermatogônia B (seta pequena), espermatogônia A (Sg), espermatócitos primários (Sp), espermatídes (St) e célula em Metáfase (seta).
Aumento 500x coloração HE.

FIGURA 6. Cordões seminíferos com espermatogônias B (seta pequena), espermatócitos primários (Sp), espermatídes (St) e célula em telófase (seta).
Aumento 500x coloração HE.

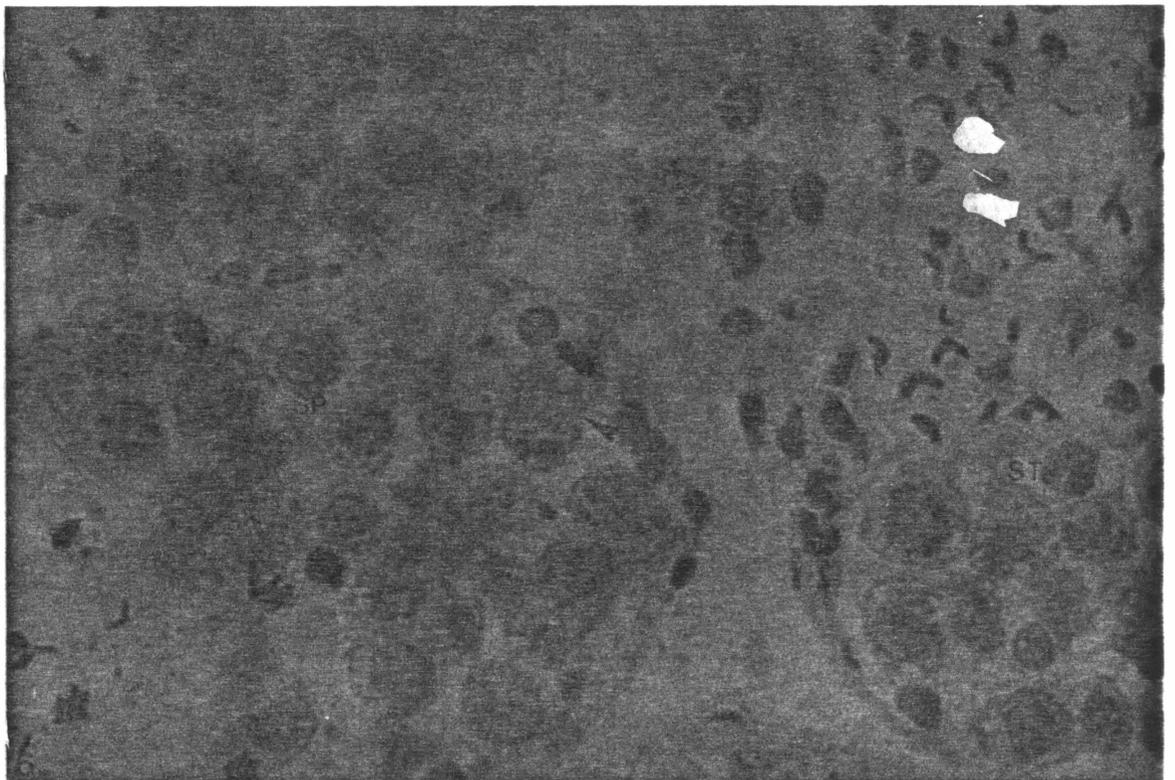
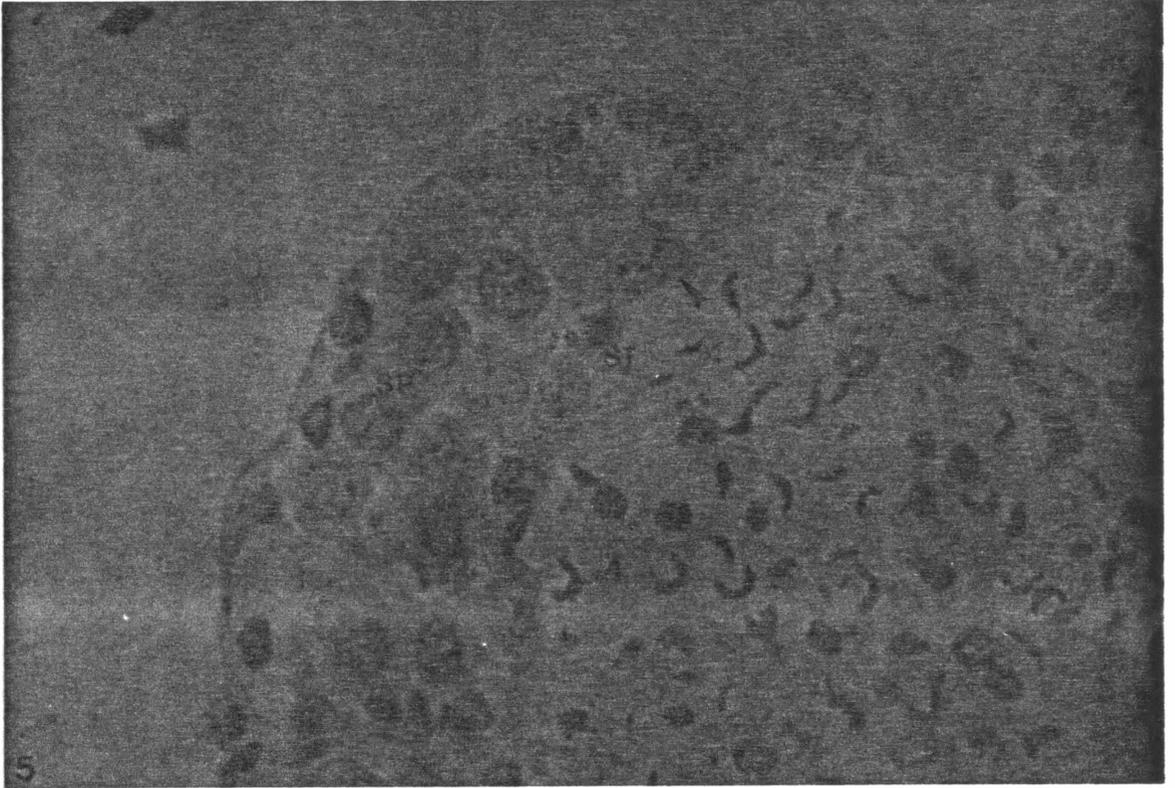


FIGURA 7. Cordões seminíferos com espermatogônia B (seta menor), espermatócitos primários (Sp), células sustentaculares (S) e célula em telófase (seta). Aumento 500x em coloração HE.

FIGURA 8. Cordões seminíferos com fina bainha de tecido conjuntivo (seta pequena), fibroblastos (seta grande), espermatogônia B (seta fina), espermatócitos primários (Sp) e células sustentaculares associadas a espermatócitos (S). Aumento 500x coloração HE.

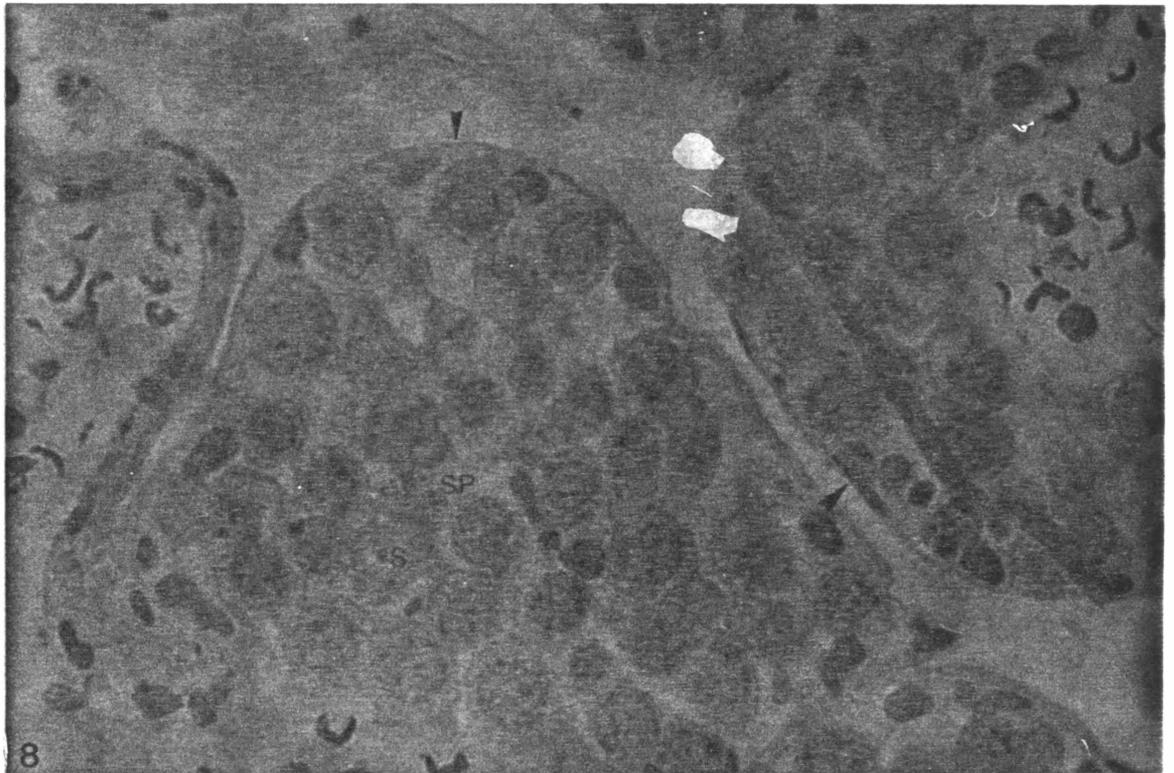
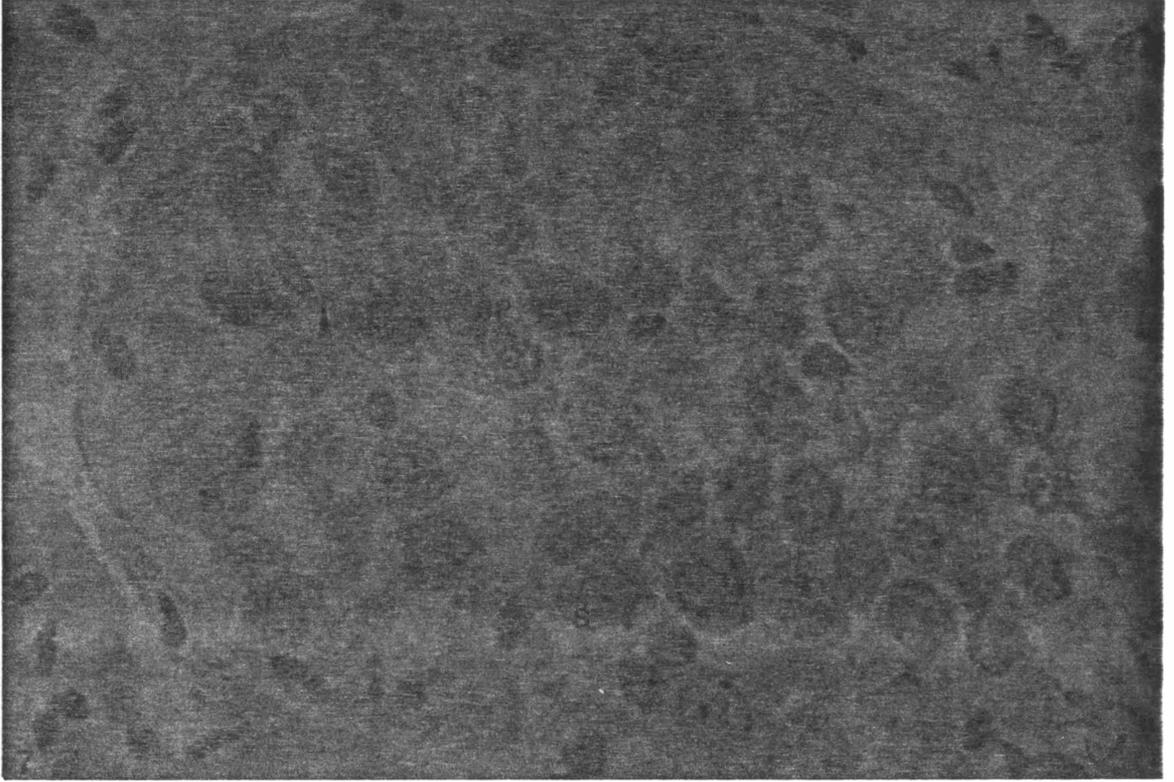


FIGURA 9. Cordões seminíferos com cápsula de tecido conjuntivo (seta pequena), fibroblastos (seta grande), espermatozóides (seta fina), célula em prófase (Cp).

Aumento 500x em coloração HE.

Teste do PAS + hematoxilina

FIGURA 10. Cortes de cordões seminíferos ao nível dos cistos, espermatozóides (seta fina), grumos de glicogênio (seta cheia).

Aumento 500x.

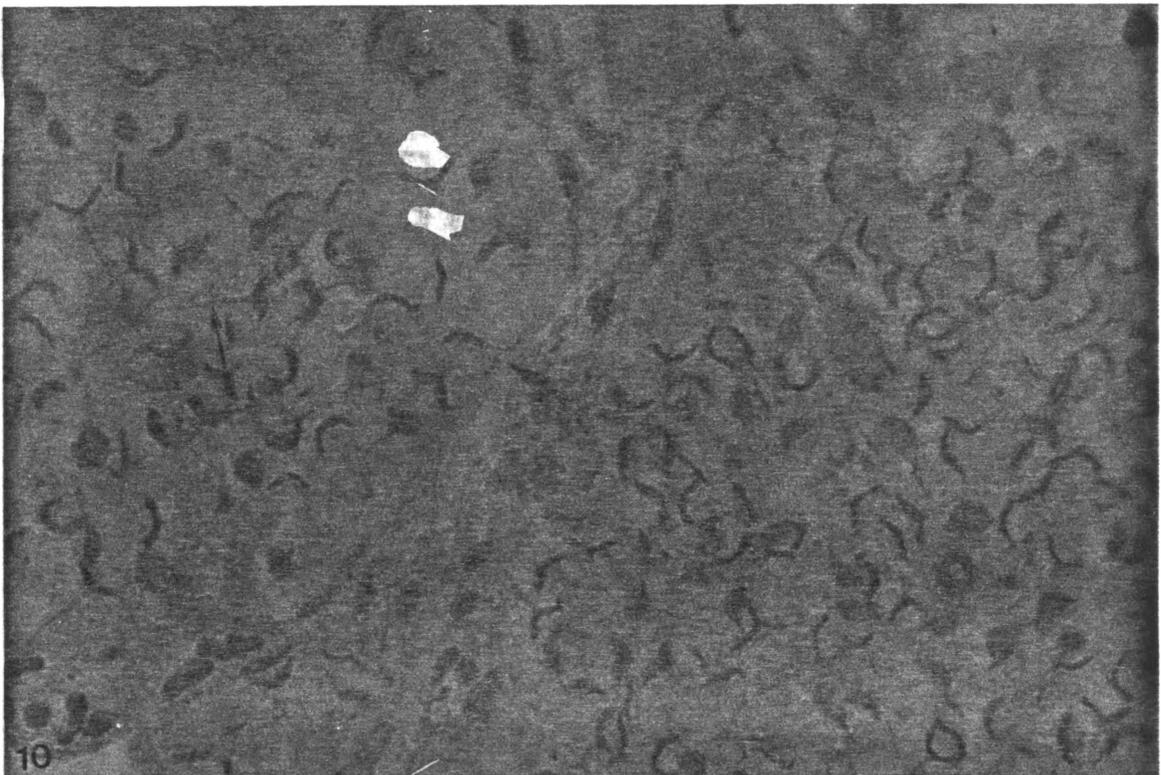
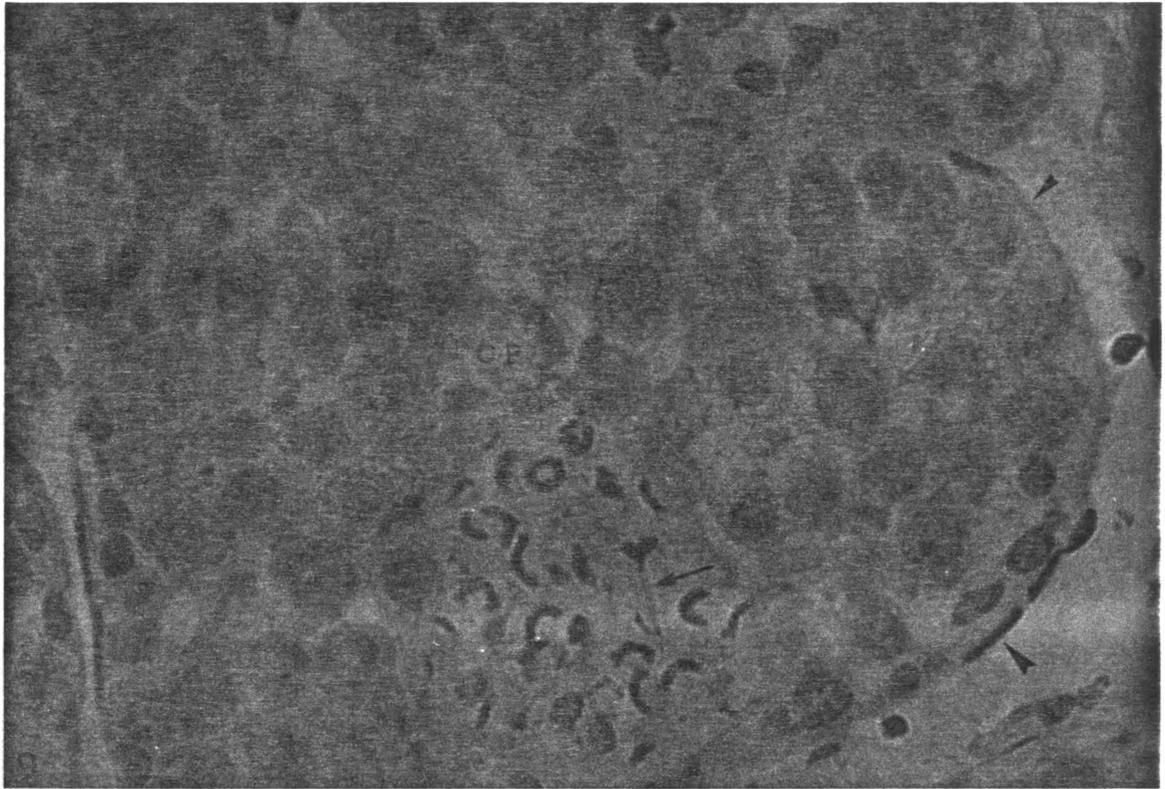


FIGURA 11. Coloração Tricrômico de Gomori. Cordões seminíferos com espermatogônia B (seta pequena), espermátocitos primários (Sp), espermátocito secundário (seta grande) e espermátides (Sp). Aumento 500x.

FIGURA 12. Coloração Tricrômico de Gomori. Cordões seminíferos com espermatogônia B (seta pequena) espermátocitos primários (Sp) e células sustentaculares (S). Aumento 500x.

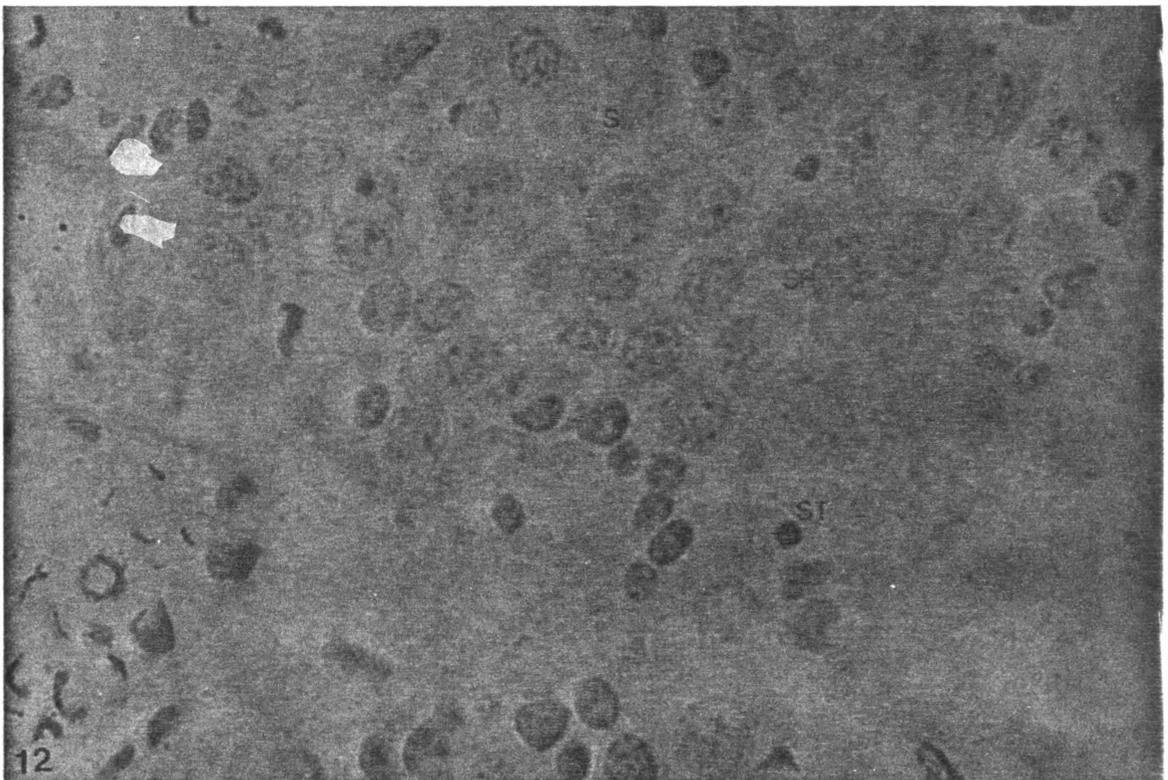
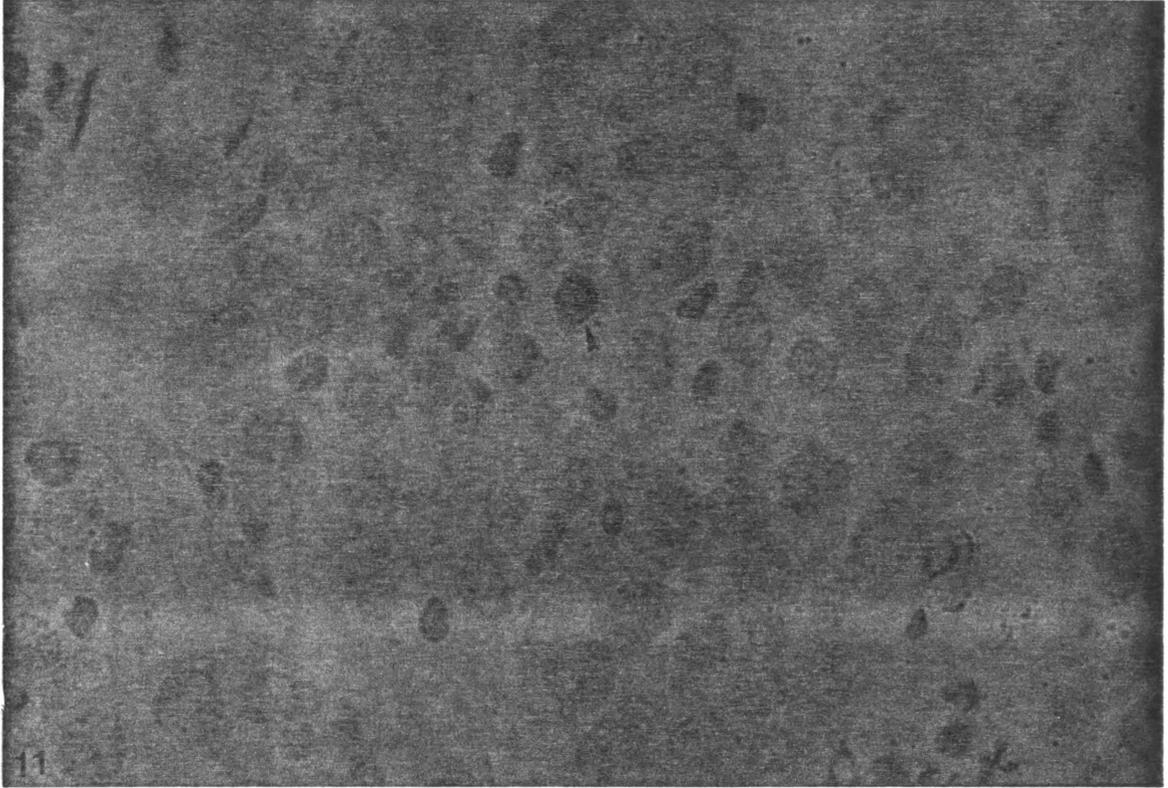


FIGURA 13. Coloração tricrômico de Gomori. Cortes de cordões seminíferos com espermatogônia B (seta pequena), espermatócitos primários (Sp) e espermátides (St).
Aumento 500x.

Teste de PAS + hematoxilina

FIGURA 14. Cortes de cordões seminíferos com espermatogônias A (Sg), espermatogônia B (seta pequena), espermatócitos (Sp), células sustentaculares (S), cisto (C) e espermátides (St).
Aumento 500x.

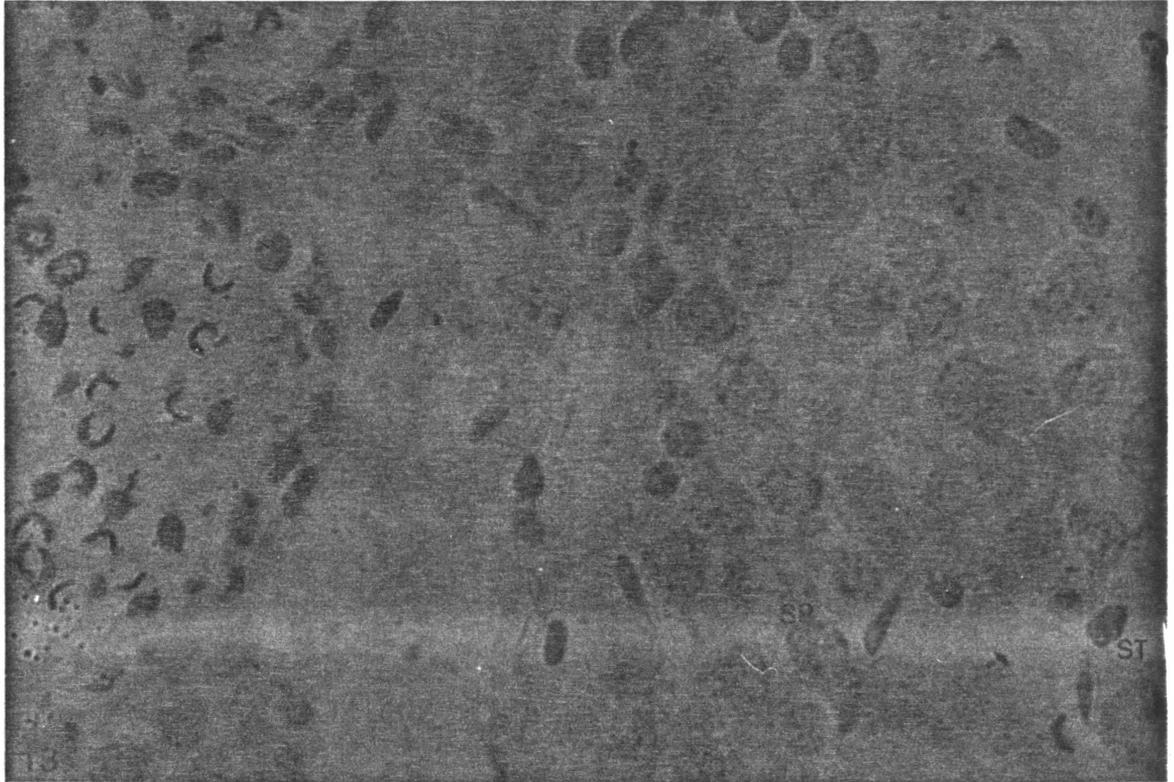


FIGURA 15. Glicogênio ao nível de vasos hemolinfáticos (seta cheia), espermatócitos primários (Sp).
Aumento 500x.
Reação de PAS + hematoxilina.

FIGURA 16. Espermatogônia A (Sg), espermatócitos primários (Sp), célula em metáfase (seta grande), espermátides (St).
Aumento 500x coloração HE.

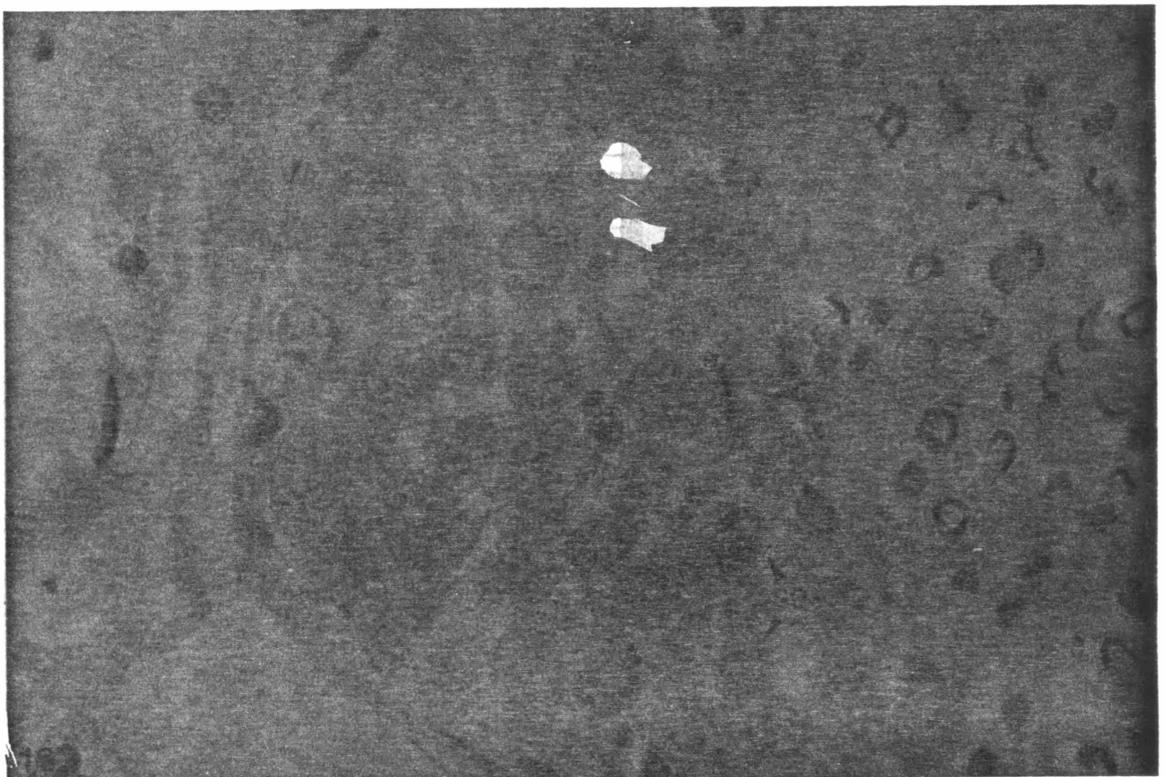
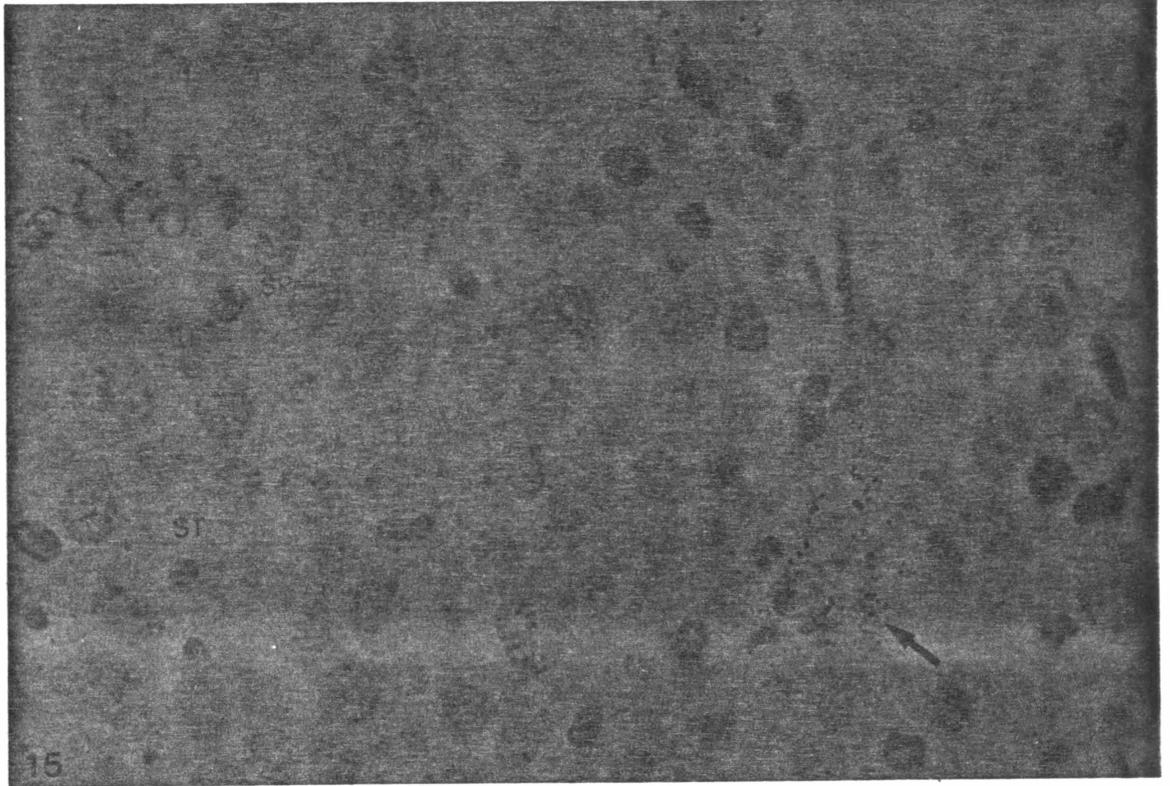


FIGURA 17. Espermatogônias A. Núcleo (N), cromatina compactada (Cr) mitocôndrias (M), retículo endoplasmático (Re), e membrana basal (seta). Aumento 9.900x.

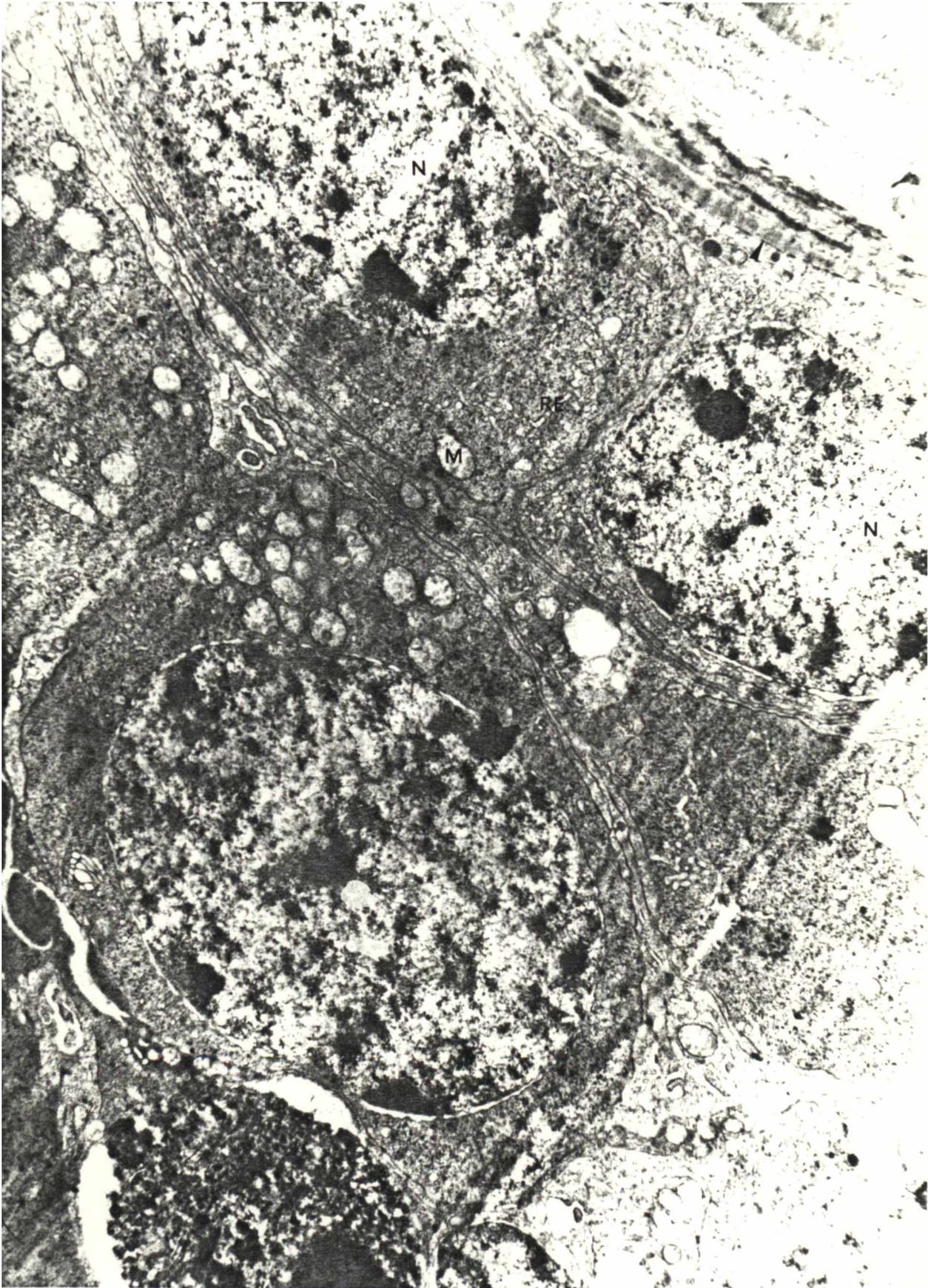
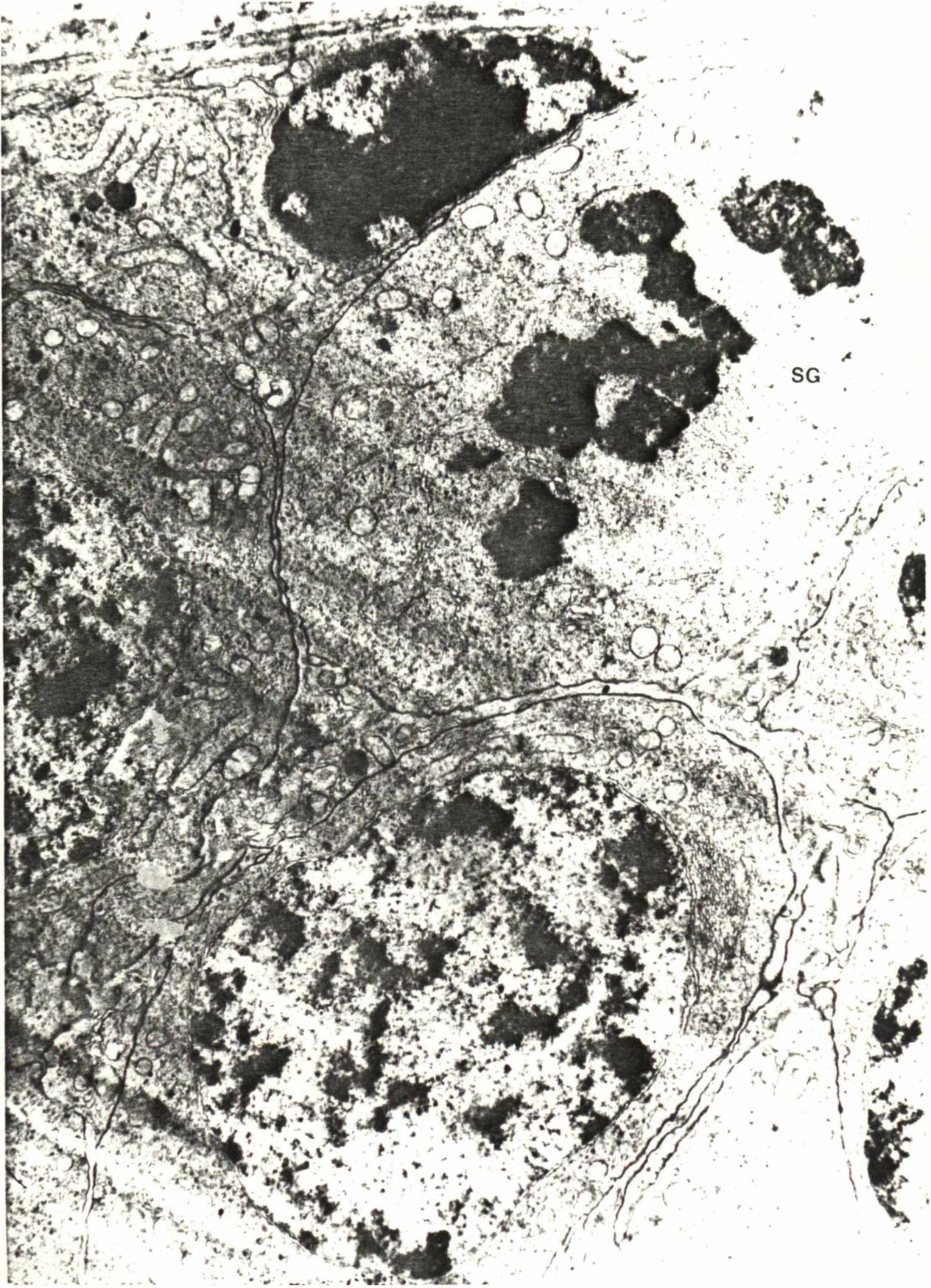


FIGURA 18. Espermatogônia (Sg), em metáfase da mitose.
Aumento 10.208x.



SG

FIGURA 19. Células sustentaculares. Núcleo (N), evaginação da membrana plasmática (seta), Complexo Golgi (G) extensivo, citoplasma (seta), e célula espermatogônia B (Sg).
Aumento 10.208x.



FIGURA 20. Espermatócito Secundário mostrando o adiantado grau de compactação da cromatina (Cr), envoltório nuclear (seta), retículo endoplasmático (Re) e citoplasma de células sustentaculares (S). Espermatócito I (C1), mitocôndrias (m), polissomos (seta pequena).
Aumento 21.204 x.



FIGURA 21. Espermatócitos mostrando diferentes graus de compactação da cromatina. Espermatócito em pré-leptoteno (Sg), espermatócito em leptoteno (Sp) e espermatócito secundário com material membranoso (seta).
Aumento 17.856 x.



FIGURA 22. Espermatócito primário em prófase I. Núcleo (N), cromatina compactada (Cr), vesículas intra-nucleares (V), mitocôndrias (M), retículo endoplasmático (Re), e polissomos (seta). Aumento 31.248 x.



FIGURA 23. Espermatócito primário. Núcleo (N), cromatina compactada (Cr), vesícula associada ao envoltório nuclear (V), mitocôndria (M) e polissomos (seta pequena) e poros nucleares (seta). Aumento 18.414 x.

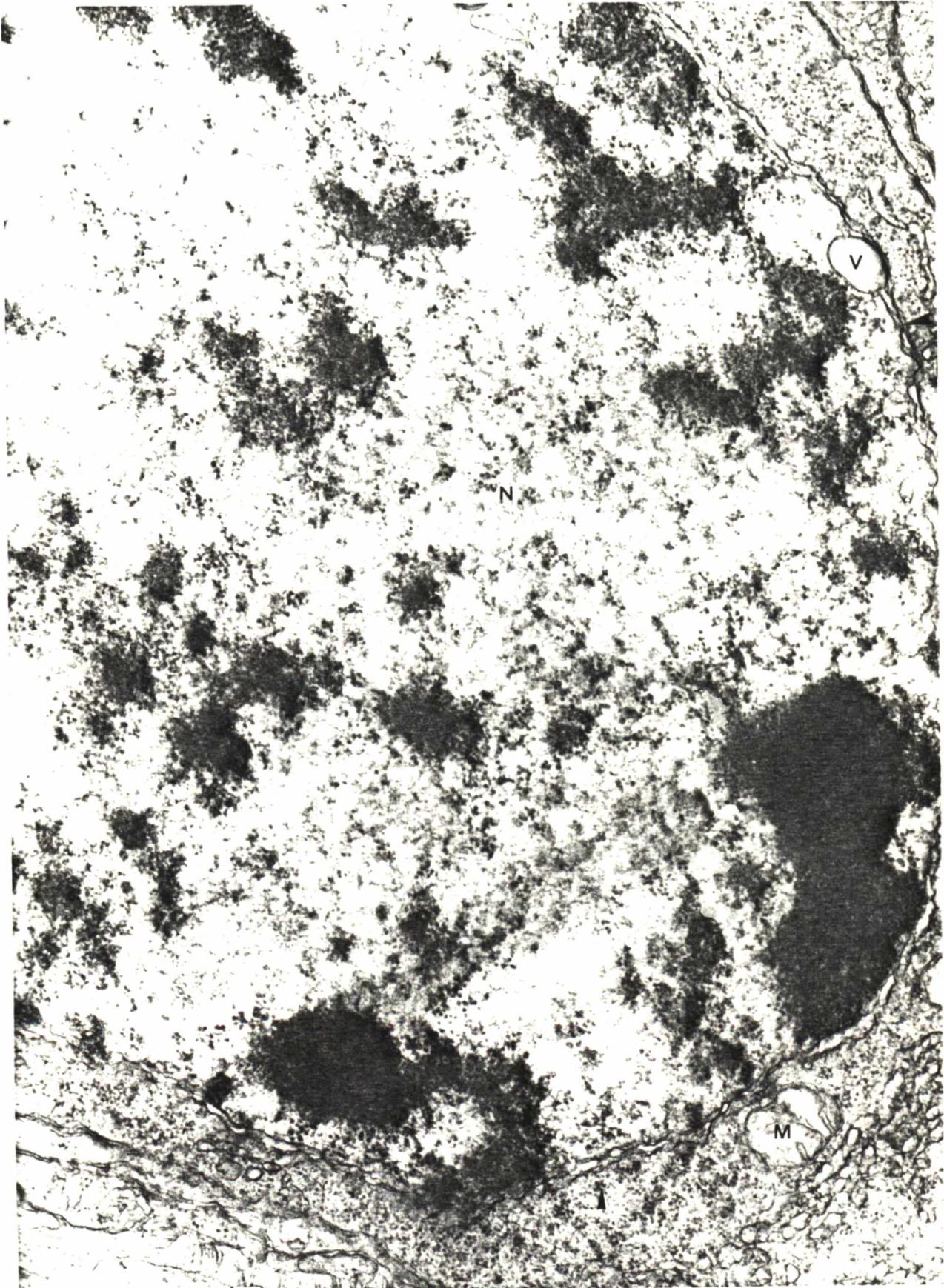


FIGURA 24. Espermatócito primário prófase I. Núcleo (N), complexo de poros (seta), mitocôndrias (M) e citoplasma de células sustentaculares (S). Aumento 13.079 x.

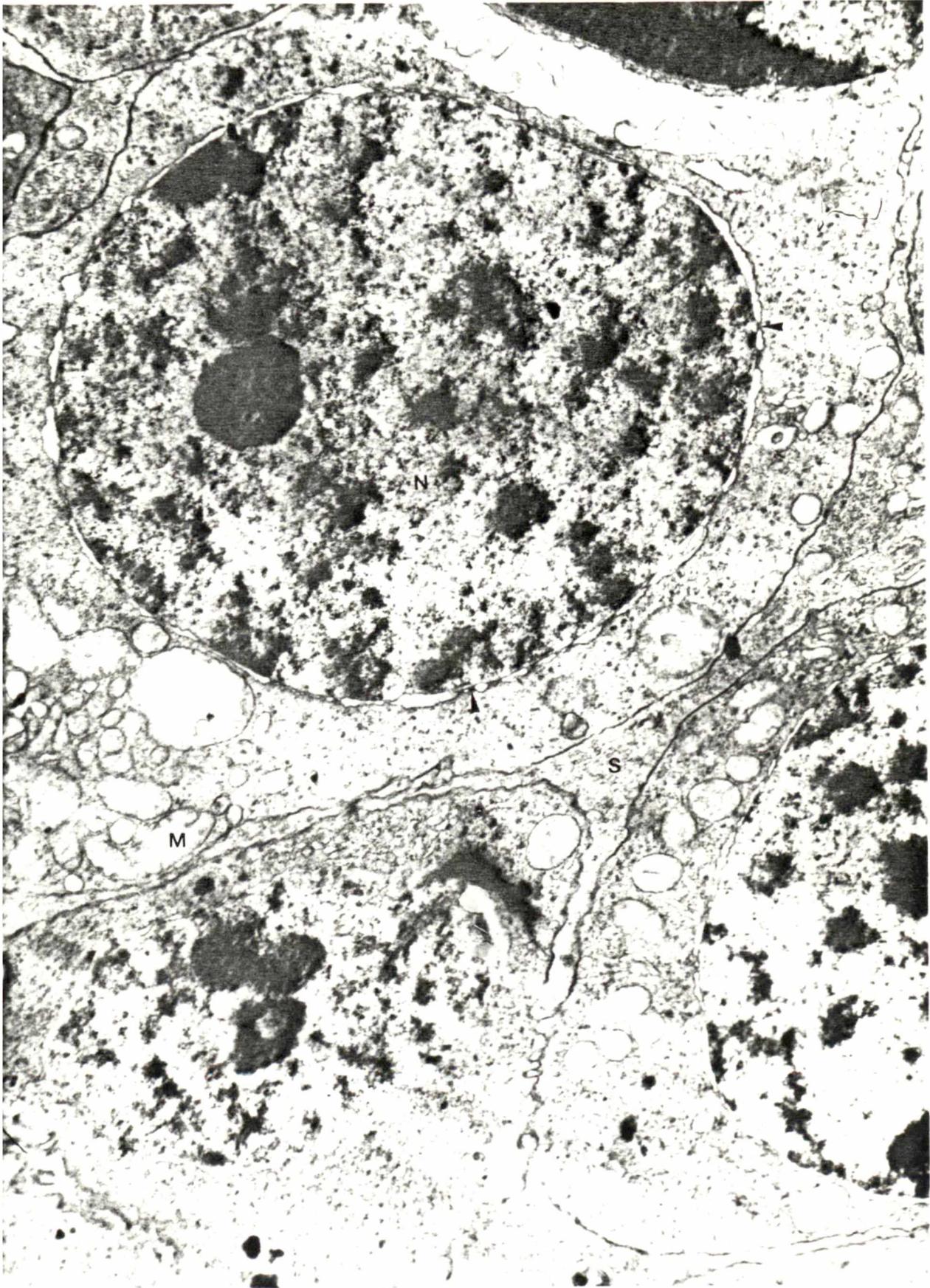


FIGURA 25. Espermatócitos primários em prófase I. Núcleo (N), envoltório nuclear (seta), complexo de Golgi (G), mitocôndrias (M), retículo endoplasmático tubular (Re).
Aumento 11.997 x.

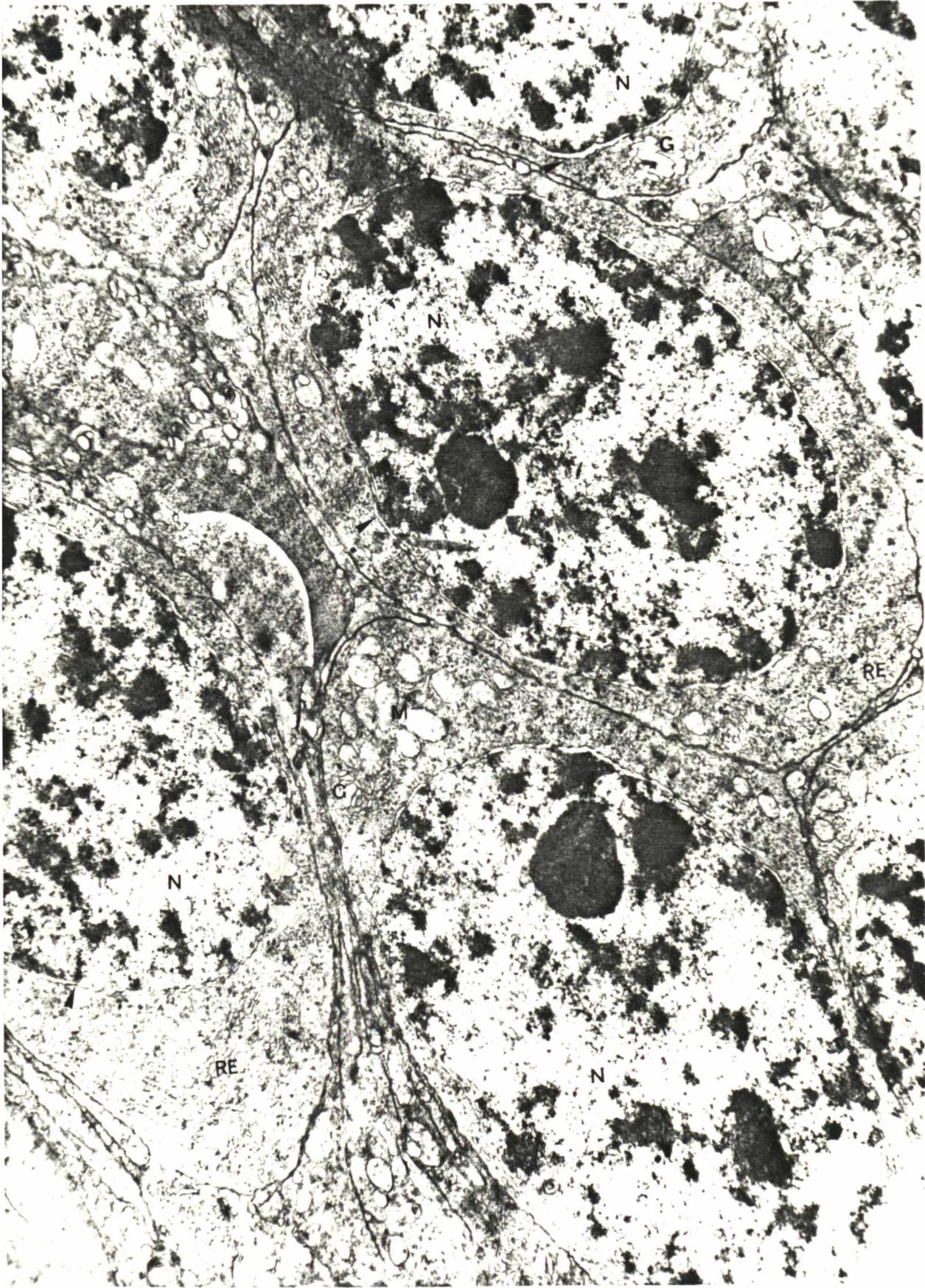


FIGURA 26. Espermatócito primário em prófase I. Núcleo (N), envoltório nuclear (seta), mitocôndrias (M), retículo endoplasmático (Re) e célula sustentacular (S), complexos sinaptonêmicos (seta fina).
Aumento 10.208 x.



FIGURA 27. Corte tangencial de espermatócito primário. Núcleo (N), complexo de poros (Cp), mitocôndrias (M), complexo de Golgi (G), retículo endoplasmático granular (Re) e junções semelhantes a desmossomos (seta).
Aumento 38.512 x.

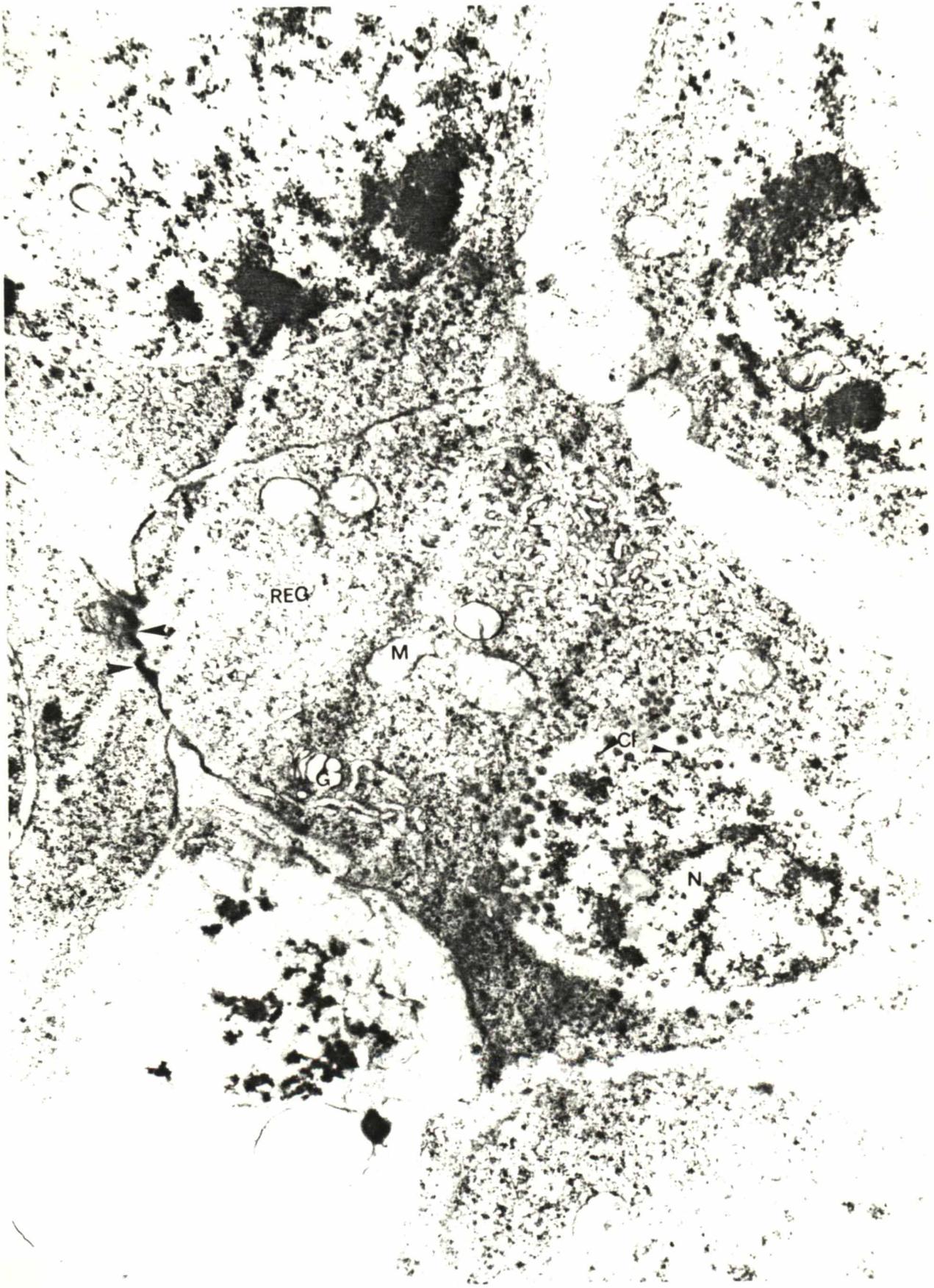


FIGURA 28. Células sustentaculares (Núcleos), cromatina compactada (Cr), nucléolo (Nu), citoplasma com grandes vesículas de material (seta pequena), mitocôndrias (M), tortuosidade da membrana plasmática (seta) e fibroblastos (seta fina). Aumento 21.888 x.



FIGURA 29. Espermatócitos (Sp), junções semelhantes a desmosomas (seta), complexo de Golgi (G), retículo endoplasmático (Re) e extensivo citoplasma de células sustentaculares (S). Aumento 63.612 x.



FIGURA 30. Fibroblastos. Núcleo (N), Nucléolos (Nu), envoltório nuclear (seta) e retículo endoplasmático (Re).
Aumento 21.888 x.



FIGURA 31. Espermátide. Núcleo (N), corpos cromatínicos (Cc), mitocôndrias (M), vesículas (V), polissomos (seta) e retículo endoplasmático (Re). Aumento 21.888 x.

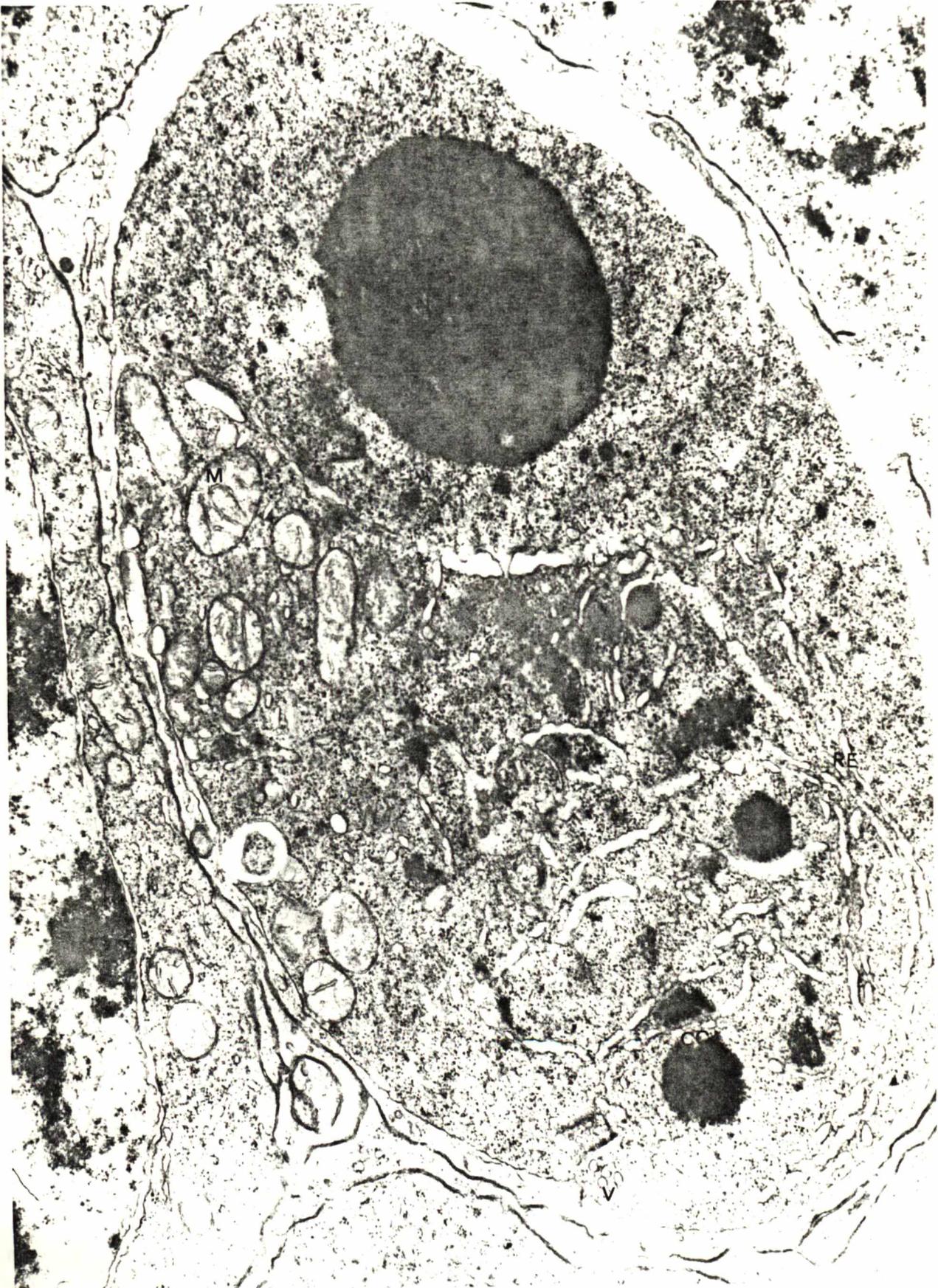


FIGURA 32. Espermátide. Núcleo (N), mitocôndrias (M), la
mela anelada (La) e polissomos (seta).
Aumento 37.620 x.



FIGURA 33. Espermatíde. Corpos cromatínicos (Cc), lamela
anelada (La) e canal de pinocitose (seta).
Aumento 37.620 x.



FIGURA 34. Espermatócitos primários. Núcleo (N), cromatina compactada (Cr), envoltório nuclear (seta) retículo endoplasmático (Re), espermatíde (seta pequena) e grande vesícula de material denso no citoplasma de célula sustentacular (seta).
Aumento 10.208 x.



FIGURA 35. Espermatíde. Núcleo (N), cromatina compactada (Cr) e material fibrilar (seta).
Aumento 31.860 x.



FIGURA 36. Espermatozóide, Núcleo (N), cromatina compactada (Cr), vesículas pequenas (Vp), vesícula granular (Vg), citoplasma amorfo (Ca), material fibrilar (seta pequena) e estrutura pontiaguda (seta).
Aumento 16.872 x.

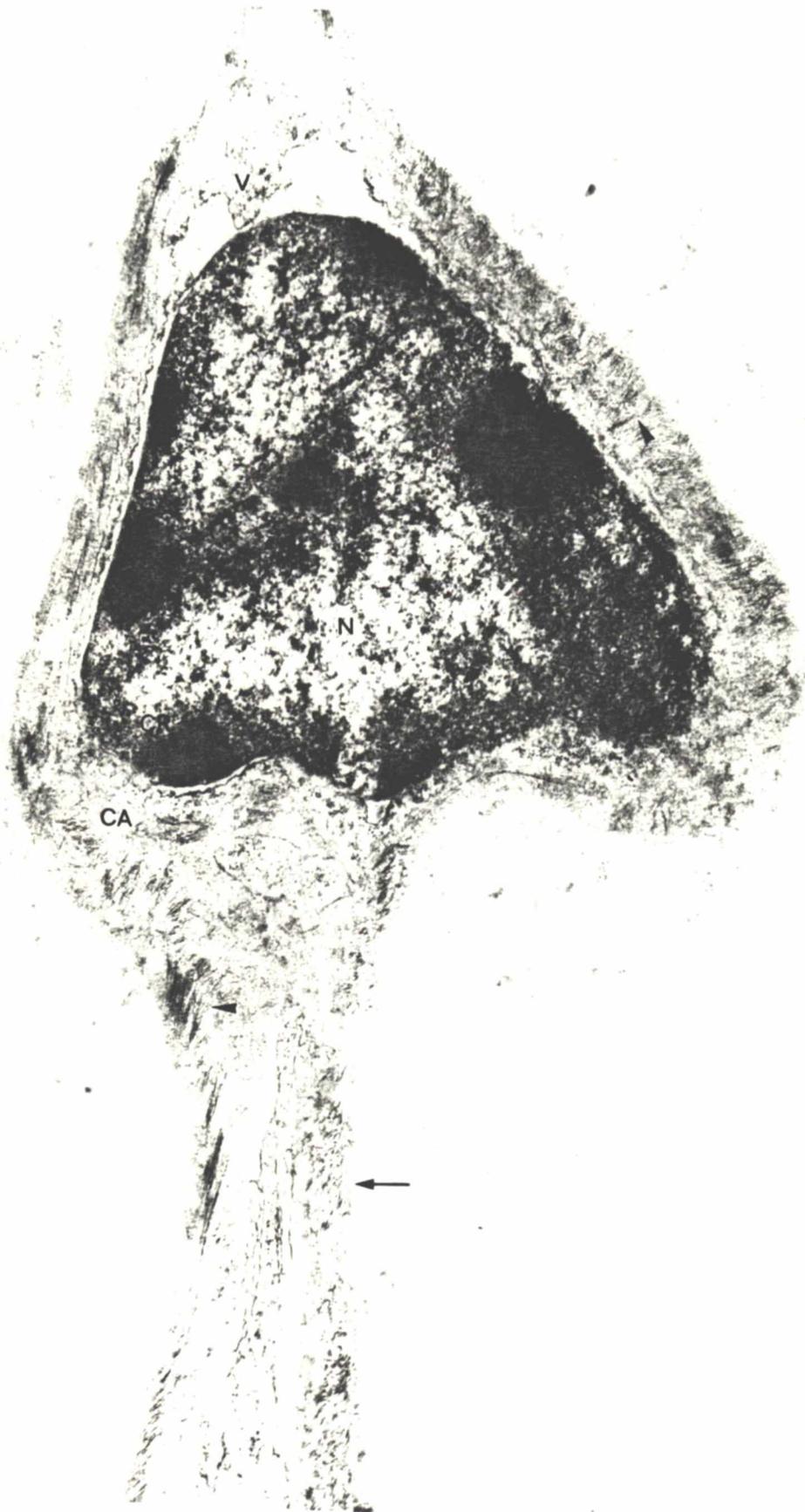
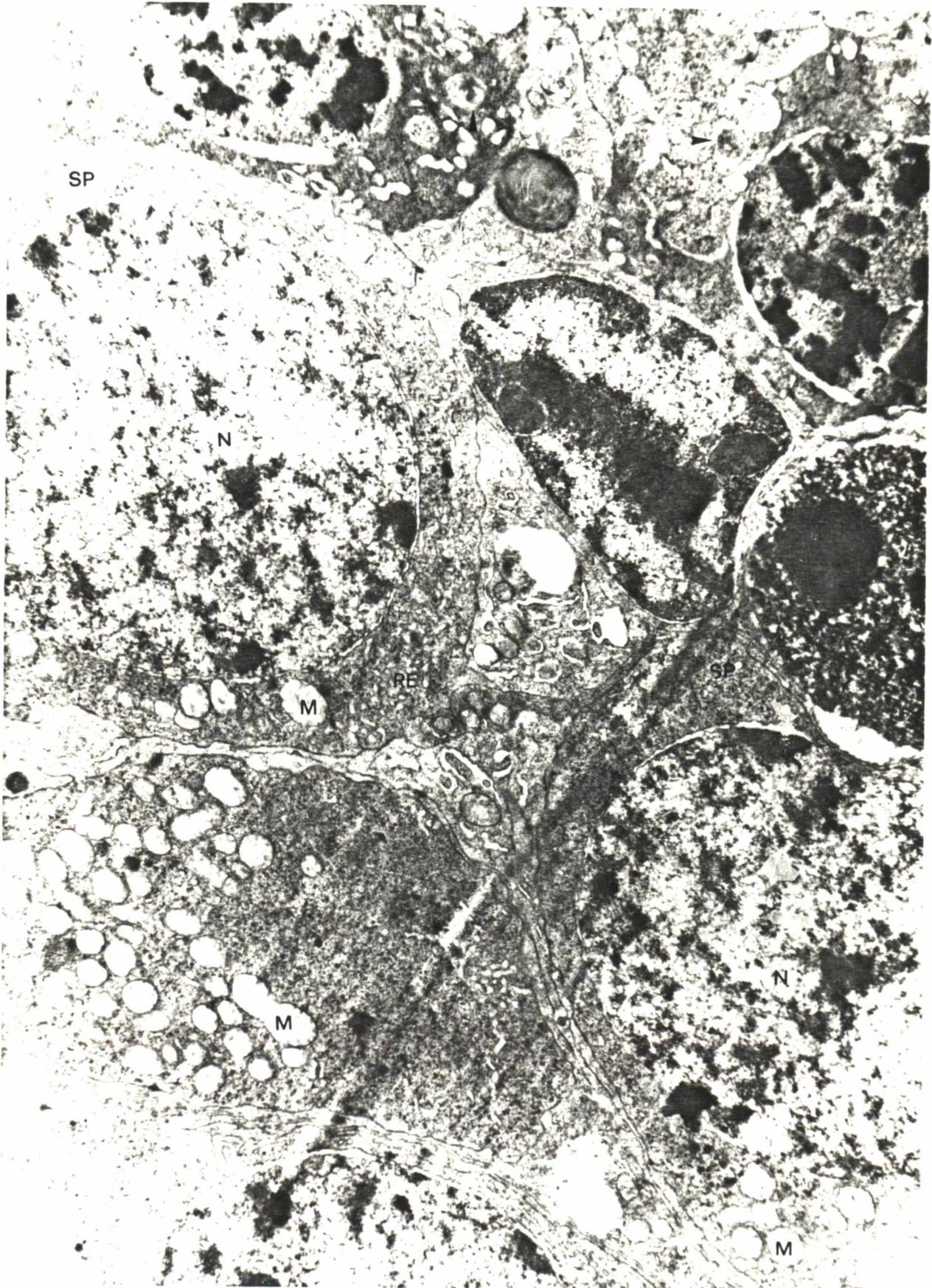


FIGURA 37. Espermatozóide. Núcleo (N). Vesícula granular (Vg), material fibrilar (seta).
Aumento 12.122 x.



FIGURA 38. Espermatócitos primários (Sp), Núcleo (N), mitocondrias, retículo endoplasmático (Re) e espermatócitos secundários com grande quantidade de vesículas com material a ser liberado (seta).

Aumento 9.889 x.



4. DISCUSSÃO

4.1. ORGANIZAÇÃO ANATÔMICA E TECIDUAL DOS TESTÍCULOS DE MACROBRACHIUM ROSENBERGII

As observações realizadas em microscópio óptico dos lobos testiculares revela que cada lobo é envolvido por uma fina bainha de tecido conjuntivo. Cada lobo é formado por longos e sólidos cordões seminíferos, lobulados e enovelados, sendo as paredes destes cordões seminíferos constituídos por células germinativas. Estes cordões terminam em cavidades de extremidade cega denominadas de cistos, onde ficam encerrados os espermatozoides maduros. A mesma organização é descrita por Dougherty e Sandifer (1984).

Na parede dos cordões seminíferos ocorre a gametogênese. A análise destes cordões nos revelaram que a gametogênese não ocorre ao mesmo tempo por todo o cordão seminífero e nem por ondas ou seja, iniciando-se num determinado ponto e em seguida no seguinte até atingir toda a parede do cordão, como ocorre em Macrobrachium acanthurus (CARVALHO, 1978).

A gametogênese ocorre por regiões, sendo que é observado ao mesmo tempo em vários focos da parede dos cordões seminíferos. Há portanto uma diferença quando comparado a outros animais como por exemplo mamíferos (JUNQUEIRA & ZAGO, 1982).

À medida que formam-se os gametas, ou espermatozoides, estes são lançados para a luz dos cistos.

4.2. CÉLULAS GERMINATIVAS DE MACROBRACHIUM ROSENBERGII

A produção de espermatozóides nos cordões seminíferos ocorre de forma constante. Uma vez atingida a maturidade sexual destes camarões há uma atividade contínua nos testículos, ou seja as células da linhagem germinativa sofrem contínuas divisões e diferenciações ao longo de toda a época reprodutiva da espécie.

Para a identificação das células, como espermatogônias, espermatócitos, espermatídes e espermatozóides, utilizamos o grau de compactação da cromatina e o volume nuclear, além de outras características, integrando informações obtidas através de estudos do material com microscópio óptico e eletrônico e sua comparação com informações obtidas da literatura para outros grupos animais.

4.2.1. ESPERMATOGÔNIAS

As espermatogônias são células germinativas imaturas, que se localizam próximas à membrana basal.

Estas células germinativas primitivas são relativamente pequenas, o núcleo apresenta uma cromatina com formato irregular, e acúmulos grosseiros. Na fase de maturidade sexual do animal as espermatogônias se dividem continuamente por mitose. As células assim formadas podem ser uma fonte de espermatogônias, já que sofrem novas mitoses, pois continuam semelhantes à célula mãe, enquanto outras se dividem e crescem, tornando-se maiores que as espermatogônias passando a chamar-

se de espermatócitos primários (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 1985 e JUNQUEIRA & ZAGO, 1982).

Estas células foram observadas em microscopia óptica e em ultra-estrutura.

4.2.2. ESPERMATÓCITOS

Os espermatócitos primários nos estágios pré-leptote no da meiose são as células encontradas com mais frequência nos cordões seminíferos. Isto deve-se ao fato de ser o estágio de prófase um período muito longo enquanto os demais são estágios rápidos no processo da gametogênese. Os espermatócitos I foram infrequentes nos diferentes estágios da meiose I, e quando ocasionalmente presentes encontravam-se entre os espermatócitos pré-leptoteno e as células sustentaculares. Os diferentes graus de compactação da cromatina são também parâmetros importantes, bem como a presença de estruturas juncionais. Segundo Dougherty e Sandifer (1984) ocorrem estruturas juncionais entre um espermatócito e outro, que são denominados de "semelhantes a desmossomo", como pode ser visto nas figuras 27 e 29. Essas estruturas juncionais semelhantes aos desmossomos provavelmente tem função de manter contato entre um espermatócito e outro.

Também foram identificadas estruturas juncionais semelhantes aos desmossomos que ocorrem entre um espermatócito e outro, com provável função de manter contato entre estes (figs. 27 e 29). Estas estruturas juncionais semelhantes aos desmossomos diferem dos desmossomos típicos denominados de

macula aderente estudados por Farquhar e Palade (1963), em vários epitélios de vertebrados, pela presença de espaços intra-celulares com uma linha densa central de material denso, por discreta placa citoplasmática disposta paralelamente para o interior de cada uma das células e pela presença de fibrilas citoplasmática convergindo em direção a estas.

4.2.3. ESPERMÁTIDES

Observou-se nas espermátides a formação de um cordão de citomembranas que terminaram por formarem estruturas concêntricas chamadas de lamelas aneladas que entrariam na formação do espermatozóide maduro (figs. 32 e 33), (POCHON-MASSON, 1969), sendo provavelmente derivadas do envelope nuclear.

A presença do Complexo de Golgi deve estar relacionada com a produção de hidrolases usadas durante a perda citoplasmática, já que na formação do espermatozóide maduro não ocorre a formação do acrosso, como descrição para *Palaemon serratus* (PAPATHANASSIOU & KING, 1984).

Segundo Mello e Vidal (1980) o teste do PAS tem como finalidade detectar os açúcares das glicoproteínas acrossomais sendo eficaz na determinação e caracterização de acrosso e seletivo para polissacarídeos neutros, podendo reagir positivamente com o glicogênio e acrosso.

Tem sido demonstrado que proteoglicanas (constituídas de ácido urônico e acetil-hexosaminas sulfatadas ou não) não são PAS positivas (HOOGHWINKEL & SMITS, 1957). Nos cortes

de tecido fixado, o ácido periódico provavelmente libera radicais aldeídicos somente a partir dos resíduos glicosil, galactosil, manosil e fucosil (LEBLOND et alii, 1957) que são componentes do glicogênio e das glicoproteínas.

As proteoglicanas são PAS negativas porque o tratamento rotineiro com o ácido periódico não promove a oxidação em ácido glicurônico e idurônico (SCOTT & HARBINSON, 1969).

Na análise das células foram obtidas reações negativas tanto nas espermátides quanto nos espermatozoides. Isto deve-se ao fato da não presença de acrossomo na formação dos espermatozoides maduros.

O complexo de Golgi está ativo durante o processo de espermatogênese, mas nos estágios mais tardios do processo acha-se ausente, segundo MOSES (1961) e HOEHLER (1970), o que tem sido descrito para alguns decapodes.

A grande quantidade de ribossomos indica a síntese de proteínas que participaria na forma do material fibrilar do espermatozoide maduro.

Com a formação da espermátide termina o processo da gametogênese e inicia-se um processo de citodiferenciação denominado de espermiogênese que começa com a espermátide e inclui as citodiferenciações ocorridas terminando com a formação de espermatozoides.

4.2.4. ESPERMATOZÓIDE

Os resultados demonstraram que os espermatozoides maduros de Macrobrachium rosenbergii são do tipo modificado e

que se caracterizam por apresentar ausência de flagelo e do acrossomo e por apresentarem um núcleo em forma de taça ou xícara e uma longa estrutura pontiaguda. Isto deve estar relacionado com o fato dos ovos serem fertilizados imediatamente após serem liberados (PAPATHANASSIOU & KING, 1984).

Uma variedade de tipos de espermatozóide está presente em crustácea e outros grupos animais, segundo Baccetti (1970) deve existir uma relação entre o tipo de espermatozóide e a biologia de fertilização. Espermatozóides flagelados ocorrem em Ostracode e Cracos (BACCETTI, 1970) e espermatozóides não flagelados ocorrem em Decapoda e Isopoda (REGER, 1964; POCHON-MASSON, 1968 e 1969 e KOEHLER, 1979).

Baccetti (em 1970) conclui que a presença de flagelo com padrão básico de $9 + 2$ não é requerido para fertilização interna.

A organização fibrilar ao longo da estrutura pontiaguda "Spike" no espermatozóide lhe dá flexibilidade no momento em que os espermatozóides estão sendo depositados para a fertilização do ovo.

4.3. CÉLULAS SUSTENTACULARES

As células sustentaculares fazem parte dos cordões seminíferos de Macrobrachium rosenbergii com um extensivo citoplasma que penetra entre as células germinais realizando assim um papel fundamental na sustentação destes cordões e separando desta forma os espermatócitos da membrana basal (fig. 17 e 28) já que seu citoplasma repousa sobre a mesma.

A extensividade do citoplasma das células sustentaculares permite que estas estejam em íntima associação com as células germinativas reabsorvendo material eliminado no processo da gametogênese.

As grandes vesículas provavelmente de material fagocitado, presentes no citoplasma destas células demonstram a grande atividade no processo de reabsorção dos restos citoplasmáticos.

Por estas características assemelham-se às células de Sertoli descritas em outros grupos animais como por exemplo Hyla ranki (TABOGA, 1990).

As diferenças provavelmente estão relacionadas com o processo de citodiferenciação.

CONCLUSÕES

1. A organização dos testículos de Macrobrachium rosenbergii é do tipo lobo-lobular, ou seja, é formado por lobos e estes formados por cordões que por sua vez apresentam lobulações.
2. A espermatogênese ocorre de forma focal e no interior dos cordões lobulados e à medida que os espermatozóides vão sendo formados, são encerrados nos cistos.
3. Os cistos formados pelas extremidades cegas dos cordões seminíferos apresentam um revestimento de tecido epitelial que não faz parte do epitélio germinal.
4. Em Macrobrachium rosenbergii verificaram-se os seguintes estágios de formação dos gametas masculinos: Espermatogônias A e B, espermátocitos I e II, espermátides e espermatozóides.
 - 4.1. Espermatogônias B: são células que garantem uma fonte de espermatogônias.
 - 4.2. Espermatogônias A: são células que transformam-se em espermátocitos primários. Por suas características apresentadas concluímos estarem em grande atividade metabólica.
5. As estruturas semelhantes aos desmossomos que ocorrem entre um espermátocito e outro talvez sejam de importância durante o processo de espermatogênese desta espécie e podem servir para manter contatos entre espermátocitos que estejam nos mesmos estágios de desenvolvimento celular, garantindo assim o encistamento numa sequência de crescimento sincrônico.

6. As células sustentaculares são de fundamental importância tanto na estruturação dos cordões onde funcionam como suporte, como no processo da gametogênese, realizando a reabsorção dos conteúdos citoplasmáticos.

7. O desenvolvimento dos espermatozoides de Macrobrachium rosenbergii ocorre de forma contínua e sendo os mesmos lançados no interior de cistos a partir do momento da maturidade sexual do animal. São do tipo modificado, sem flagelo por apresentarem grande quantidade de material fibrilar e vesículas grandes com material granular e citoplasma amorfo.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ARNOLD, W., MITRENGA, D. e MAYERSBACH, H. VON, Gefriertrocknung und Einbettung in Glycolmethacrylat (GMA) - Ergebnisse histochemischer Reaktionen. *Acta Histochem. Suppl.* 14:271-277, 1975.
2. BACCETTI, B. The spermatozoon of Arthropoda. IX. The Sperm as an index of arthropod phylogenesis. In: BACCETTI, B. ed. Comparative spermatology. New York, Academic Press, 1970. p. 169-181.
3. BOSCHI, E. E. Biología de los Crustáceos Cultivables en America Latina. *Carpas* 6: 1-24, 1974.
4. CAMARGO, M.L.Z. Guia de Técnicas Citológicas e Histológicas. Curitiba, 1979. 21f. (apostila mimeografada).
5. CARVALHO, H.A. Ciclo Sexual de Macrobrachium acantharus (Weigmann, 1836); (Crustaceo Decapoda): Relações com Abióticos e Ciclo de Intermudas. S.Paulo, Instituto de Biociências 199 p. Tese (Doutorado). Departamento de Fisiologia Geral do Instituto de Biociências da U.S.P., 1978.
6. CAVALCANTI, L.B. Camarão - Manual de cultivo de Macrobrachium Rosenbergii. Recife. Aquaconsult, 1986.
7. CHOW, S., OGASAWA, Y., TAKI, Y. Male reproductive system and fertilization of the palaemonid shrimp Macrobrachium rosenbergii. *Bull. JPN. Soc. Sci. Fish.*, 48(2): 177-183, 1982.
8. COELHO, P.A. Observações preliminares sobre a biologia e a pesca dos camarões do gênero Macrobrachium Bate, 1968 (Decapoda, Palaemonidae) no estado de Pernambuco, Brasil. *Trab. Inst. Oceanogr. Univ. Recife*, 3(4):75-81, 1963.
9. COELHO, P.A. Biologia e cultivo de camarão de água doce. Recife, Ed. Universidade Federal de Pernambuco. 1982, 53p.
10. COELHO, P.A., PORTO, R.M., SOARES, A.M.C. Cultivo de Camarões do gênero Macrobrachium Bate (Decapoda, Palaemonidae) no Brasil. Natal, Secretaria da Agricultura do RN, 1981, 66p.

11. DOUGHERTY, W.J. & SANDIFER, P.A. Junctional relationships between germinal and sustentacular cells in the tests of palaemonid shrimp. *Tissue & Cell*, 16(1):115-124, 1984.
12. FARQUHAR, M.W., & PALADE, G.E. Junctional complexes in various epithelia. *J.Cell. Biol.*, 17:375-412, 1963.
13. FUJIMURA, T. Notes on the development of a practical mass culture technique of the giant prawn *Macrobrachium rosenbergii*. In: INDO-PACIFIC. FISHERIES COUNCIL 12, IPFC/C66/WP47, 1965.
14. GOMES-CORREA, M.M. Palaemonídeos do Brasil (Crustácea, Decapoda): Rio de Janeiro, 1977. 119p. Tese, Mestrado, Universidade Federal do Rio de Janeiro.
15. GOMORI, G. Microscopic Histochemistry, Chicago, University, of Chicago Press, 1952.
16. HAPLAINEN, R. Utilização de resinas plásticas em técnicas de preparação de material biológico. Sao Paulo, 5f., 1988 (apostila mimeografada).
17. HOLTHIUS, L.B. A General revision of the Palaemonidae (Crustacea, Decapoda, Natantia) of the Americas. II. The subfamily Palaemonidae. *Allan Hancock Found. Publ. Oceas-Pap.*, 12:1-396, 1952.
18. HOOGHWINKEL, G.J.M., & SMITS, G. The specificity of the periodic acid - Schiff technique studied by a quantitative test - the method. *J. Histochem. Citochem.*, 5:120-126, 1957.
19. JUNQUEIRA, L.C.U., & CARNEIRO, J. Histologia Básica. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 1985, 512 p.
20. JUNQUEIRA, L.C.U., & ZAGO, D. Embriologia médica e comparada. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 1982, 291 p.
21. KARNOVSKY, M.J. A formaldehyde - glutaraldehyde fixative of high osmolarity for use in electron microscopy. *J. Cell Biol.* 27, 137A-138A. 1965.
22. KOEHLER, L.D. A unique case of cytodifferentiation: spermiogenesis of the prawn, *Palaemonetes paludosus*. *J. Ultrastruct. Res.* 69:109-120. 1979.
23. KURIS, M.A. RA'ANAN, Z., COHEN D. Morphotypic differentiation of male giant prawns, *Macrobrachium rosenbergii*. Jornal of crustacean Biology, 7(2):219-237, 1987.
24. LEBLOND, C.P.; GELGG, R.E., EIDINGER, D. Presence of carbohydrates free, 1,2 - glycol groups in sites stained by the periodic acid - Schiff technique. *J. Histochem. Cytochem.*, 5:455:458, 1957.

25. LING, S.W. The general biology and development of *Macrobrachium rosenbergii* (de Man) FAO Fish.Rep., 3:(57): 589-605, 1969.
26. LING, S.W. & MERICAN, A.B.D. Notes on the life and habits of the adults and larval stages of *Macrobrachium rosenbergii*. Proc. Indo-Pacif. Fisch. Coun., 9 (2):55-60. 1961.
27. MELLO, M.L.S., & VIDAL, B.C. Práticas em Biologia Celular. São Paulo, E. Bücher, 1980., p.59-69.
28. MOSES, M.J. Spermiogenesis in the crayfish (*Procambarus clarkii*) II. Description of stages. J. Biophys. Biochem. Cytol., 10:301-333, 1961.
29. MULLER, F. *Palaemon potituna* Ein Beispiel abgekürzter Verwandlung. Zool. Anz., 3:152-157, 1880.
30. PAIVA, M.P. Alternativas e metas para produção de pescado nas águas interiores no Nordeste do Brasil. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ZOOLOGIA, 8. Mossoró, 1980, p.11-150.
31. PAPATHASSIOU, E., & KING, P.E. Ultrastructural studies on gametogenesis of the prawn *Palaemon serratus* (Pennant). II: Spermiogenesis. Acta Zool. (Stockh) 65:30-40, 1984.
32. PEACKEY, L.O. Thin Sections. I. A study of sections thickness and physucak dustirtuib oriduced during microtomy. J. Biophys. Biochem. Citol., 4:233, 1958.
33. PEARSE, A.G.E. Histochemistry Theoretican and Applied. 3. ed. Boston, Little, Brown, 1968, v.1.
34. POCHON-MASSON, J. L'ustrastucture des Spermatozoides vesiculaires chez les Crustácees Décapodés avant et au cours de leur devagination experimentale. II. Macroures. Discussion et conclusions. Ann. Sci. Nat. Zool. Biol. Anim., 10:367:454, 1968.
35. POCHON-MASSON, J. Infrastructure du spermatozoide de *Paleamon elegans* (de Man), (Crustacé, Décapodé). Arch. Zool. Exp. Gen., 110:363-372, 1969.
36. REGER, J.F. The fine structure of spermatozoa from the isopod Asellus militaris (Hay). J. ULtrastruct. Res. 11:181-192, 1964.
37. REYNOLDS, E.S. The use of lead citrate of high pH as an electron-opaque stain in electron microscopy, J. Cell. Biol., 17:208, 1963.
38. SAGI, A., MILNER, Y., COHEN, D. Spermiogenesis and sperm storage in the Tests of the Behaviolally Distinctive Male Morphotypes of *Macrobrachium Rosenbergi* (Decapoda, Palemonidae). Biol. Bull. 174: 330-336, 1988.

39. SCOTT, J.E. & HARBISON, R.J. Periodate oxidation of acid polysaccharides. II. Rates of oxidation of uronic acids polyuronides and acid mucopolysaccharides. *Histochemie*. 19:155-161, 1969.
40. SOARES, L.O. Observações ecológicas e aquarioróticas de **Macrobrachium carcinus** (L) pitu da família Palaemonidae (Crustácea). *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*. Rio de Janeiro. 54:(3):549:557, 1956.
41. SPURR, A.R. A low viscosity epoxy resin embedding medium for electron microscopy. *J. Ultrastruct. Res.* 26:31-43. 1969.
42. TABOGA, R.S. Estudo estrutural, ultra-estrutural e citoquímico da espermatogênese, com ênfase na espermiogênese de Hyla Ranki (Amphibia Anura, Hyladae). Campinas, S.Paulo, Instituto de Biologia, 172 p. Tese (Mestrado). Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas, 1990.
43. VALENTI, W.C. Cultivo de Camarões de Água Doce. São Paulo, Nobel, 1986. 71 p.
44. WATSON, M.L. Staining of tissue sections of electron microscopy with heavy metals. *J. Biophys. Biochem Cytol.* 4:(4):475:478, 1958.
45. ZIMMERMANN, S. A viabilidade da exploração zootécnica do camarão de água doce. **Macrobrachium rosenbergii** (De Man) em regiões de clima sub-tropical. Porto Alegre, UFRGS, 1986.

ERRATA

NECI MORAIS lê-se NECI MORAES

e

Macrobrachium rosenbergi lê-se Macrobrachium
rosenbergii.