



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA

CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

DEPARTAMENTO DE MORFOLOGIA

LABORATÓRIO DE MORFOLOGIA ANIMAL

TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

**INFLUÊNCIA DA RADIAÇÃO ULTRAVIOLETA SOBRE
A MATURAÇÃO OVARIANA DE *MACROBRACHIUM*
OLFERSI (DECAPODA, PALAEMONIDAE)**

Acadêmica: Francielle Regina Ceccato

Prof^o. Orientadora: Dr^a Kiev Resende Sousa de Moura

Florianópolis

Dezembro de 2009

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA

CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

DEPARTAMENTO DE MORFOLOGIA

LABORATÓRIO DE MORFOLOGIA ANIMAL

TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

**INFLUÊNCIA DA RADIAÇÃO ULTRAVIOLETA SOBRE
A MATURAÇÃO OVARIANA DE *MACROBRACHIUM*
OLFERSI (DECAPODA, PALAEMONIDAE)**

Acadêmica: Francielle Regina Ceccato

Orientadora: Prof^ª. Dra. Kieiv Resende Sousa de Moura

Florianópolis
Dezembro de 2009

Tudo que é conquistado só vale apenas se na caminhada outras pessoas também conquistaram alguma coisa, e nenhuma, por mais simples ou arrogante que seja tenha sido diminuído em face da verdade...

Agradecimentos

**Em primeiro lugar agradeço a uma força superior que nos ilumina e guia ao longo de
nossas caminhadas...**

**Agradeço enormemente a minha querida e amada mãe a qual me deu força e fez tudo ao
seu alcance para que chegasse até aqui, amo-te...**

**As pessoas que fizeram de minha graduação um caminho alegre e com menos pedras ao
longo dele Carol, Ana Carol, Mari, Celeste, Iva, Ana, Aninha, Nat, Nina, Cris e Rafaela.**

**Pelos lugares que trabalhei ao longo de minha graduação, Laboratório de Desenvolvimento
e Reprodução Animal, ao qual fiquei uns bons anos de minha graduação. Agradeço as
profs^a Yara e em especial Evelise pela paciência e dedicação que me foi dada. Aos demais
colegas de laboratório Dib, Márcia, Karoline, Larissa, Cléo em especial duas queridas
amigas Helo e Lizia pelos cafés e boas risadas que demos...**

**Laboratório de morfologia animal ao qual trabalhei com enorme alegria e prazer, a minha
colega de laboratório Natália, pelas tardes descontraídas, a minha orientadora Kiev pelo
carinho, atenção, delicadeza, profissionalismo e honestidade ao qual sempre me tratou. A
prof^a Eliane pela grande profissional lutando pela sua verdade, sem nunca perder sua
alegria e espontaneidade. Sirlei, sempre disposta a me ajudar e sem esquecer das boas
risadas que demos. Ao prof^o Eduardo pelas dicas valiosas e sua atenção, a prof^a Zenilda
por deixar as portas de seu laboratório sempre abertas para que pudéssemos usar.**

**A minha querida amiga Elaine que sempre me apoiou e me ouviu com enorme paciência á
todas as minhas angústias, decepções e alegrias durante esta caminhada. A minha Família
em especial a minha prima Kelly por sempre me apoiar e acreditar em mim, e agora por
me dar a honra de ser madrinha do Arthur...**

**Aos meus animais de estimação os que estão comigo e os que já partiram, e que uma página
seria pouco para denominá-los. Mas que trouxeram alegria mesmo nos momentos mais
tristes...**

Resumo

A diminuição da camada de ozônio aumenta a incidência da radiação UVB nos ecossistemas, inclusive nos ambientes aquáticos com até 50cm de profundidade. Nestes ambientes aquáticos com pequena profundidade como rios, riachos e lagoas são encontrados os camarões de água doce *Macrobrachium olfersi*. Estes camarões têm seu processo de reprodução controlado por mecanismos endógenos, diretamente dependentes das variações ambientais tais como: mudança na incidência de luz, temperatura e salinidade. Com o aumento progressivo da radiação UVB, os estudos sobre os efeitos desta radiação, na reprodução desta espécie, são necessários. Deste modo, fêmeas de *M. olfersi* foram separadas em dois grupos, o **controle** e o **irradiado**. De acordo com o estágio de maturação ovariana, estes grupos foram ainda divididos em subgrupos: o subgrupo controle intermediário (**SCI**), o subgrupo controle avançado (**SCA**), o subgrupo irradiado intermediário (**SII**) e o subgrupo irradiado avançado (**SIA**). As fêmeas do grupo irradiado (**SII** e **SAI**) foram irradiadas durante 30 minutos em aquários vedados. Após 4 dias, os animais deste grupo foram sacrificados. Já para o grupo controle (**SCI** e **SCA**) decorrido o tempo de aclimação essas fêmeas foram sacrificadas. Foram obtidos dados biométricos dos ovários e índice gonadossomático (**IGS**). Os ovários foram fixados em Bouin e corados com as técnicas usuais para historesina H&E, Mallorly, V.O.F., Alcian Blue, P.A.S. e Azul de Toluidina. As lâminas foram observadas e submetidas à estereologia e morfometria das células germinativas. O comprimento longitudinal e transversal dos ovários e o **IGS** apresentaram aumento no **SIA**. As observações microscópicas revelaram alterações morfológicas e maior acúmulo de substâncias nos ovócitos pré-vitelogênicos (**OPV**), além do aumento do número destas células nos ovários do **SII**. Observaram-se também, um aumento expressivo de ovogônias (**O**), nos ovários do **SIA**, e de ovócitos vitelogênicos (**OV**), nos ovários irradiados de ambos os subgrupos (**SII** e **SIA**). A exposição à radiação parece afetar o processo de maturação ovariana, podendo influenciar em diferentes etapas, como o processo de acúmulo de vitelo, pela ocorrência de **OV** com diâmetro maior. Sendo assim, a exposição à radiação UVB por 30 minutos é capaz de causar alterações nos ovários de fêmeas irradiadas, o que pode comprometer a reprodução do camarão *Macrobrachium olfersi*.

Sumário

RESUMO	vi
LISTA DE FIGURAS	vii
LISTA DE TABELAS	vii
LISTA DE ABREVIATURAS	viii
1-INTRODUÇÃO	1
2-OBJETIVOS	7
3-MATERIAS E MÉTODOS	8
3.1-CARACTERIZAÇÃO DOS GRUPOS EXPERIMENTAIS.....	8
3.2-OBSERVAÇÃO MACROSCÓPICA DOS OVÁRIOS.....	9
3.3-BIOMETRIA E DISSECAÇÃO DOS OVÁRIOS.....	9
3.4-TÉCNICAS HISTOLÓGICAS.....	10
3.5-ANÁLISES MORFOMÉTRICA E ESTEREOLÓGICA.....	12
3.6-ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	12
4-RESULTADOS E DISCUSSÃO	13
4.1-PADRONIZAÇÃO DA METODOLOGIA.....	13
4.2-ANÁLISE MACROSCÓPICA DOS OVÁRIOS.....	17
4.3-ANÁLISE MICROSCÓPICA DOS OVÁRIOS.....	20
4.4-ESTEREOLOGIA E MORFOLOGIA.....	22
6-CONCLUSÕES	26
7-FONTES DE PESQUISA	27

Lista de figuras e tabelas

A) Lista de figuras

Fig. 1: Fêmea de *Macrobrachium olfersi*, ovário em estágio avançado de maturação ovariana.....PG:2

Fig. 2: Ovários observados *in vivo*, nos estágios de maturação: intermediário e avançado.....PG:3

Fig. 3: Esquema macroscópico do desenvolvimento dos ovários observado em três estágios de maturação ovariana: inicial, intermediário e avançado. (Modificado de Martins *et al.*, 2007).....PG:3

Fig. 4: Ovário em corte histológico no estágio avançado de maturação.....PG:5

Fig. 5: Corte de um ovário controle em estágio intermediário de maturação.....PG:12

Fig. 6: Resultados não esperados para as colorações V. O. F. e Tricrômico de Mallory.....PG:14

Fig. 7: Células que compõem o ovário em estágio intermediário de maturação ovariana.....PG:17

Fig. 8: Cortes de ovário de *M. olfersi* em estágio intermediário de maturação ovariana.....PG:21

Fig. 9: Células de ovários **controle** e **irradiado**, em estágio intermediário de maturação ovariana.....PG:21

B) Lista de tabelas

Tab. 1: Resultados das colorações e histoquímicas em histoiresina nas células foliculares e germinativas dos ovários controle em ambos os estágios de maturação ovariana.....PG:15

Tab. 2: Resultados das colorações e histoquímicas em histoiresina nas células foliculares e germinativas dos ovários irradiado em ambos os estágios de maturação ovariana.....PG:15

Tab. 3: Dados biométricos dos eixos Longitudinal e Transversal dos ovários dos grupos controle e irradiado.....PG:18

Tab. 4: Dados reprodutivos do índice gonadossomático de fêmeas dos grupos controle e irradiado.....PG:19

Tab. 5: Estereologia das células germinativas da **região medular** dos ovários controle e irradiado, em estágio intermediário e avançado de maturação ovariana em fêmeas de *M. olfersi*.....PG:22

Tab. 6: Estereologia das células germinativas da **região cortical** dos ovários controle e irradiado, em estágio intermediário e avançado de maturação ovariana em fêmeas de *M. olfersi*.....PG:22

C) Lista de gráficos

Gráfico1: Morfometria do diâmetro das células germinativas de ovários controle e irradiado em estágio intermediário de maturação ovariana. (*) valores significantes ($P < 0,05$).....PG:23

Gráfico2: Morfometria do diâmetro das células germinativas de ovários controle e irradiados em estágio avançado de maturação ovariana. (*) valores significantes ($P < 0,05$).....PG:24

Lista de abreviações

COX-Complexo órgão X

GS- Glândula do seio

I- Ovário inicial

II- Ovário intermediário

III- Ovário avançado

IGS- Índice gonadosomático

O- Ovogônia

OPV- Ovócito pré-vitelogênico

OV- Ovócito vitelogênico

P.A.S.- Periodic Acid Schiff

SAI- Subgrupo irradiado avançado

SCA- Subgrupo controle avançado

SCI- Subgrupo controle inicial

SII- Subgrupo irradiado inicial

V.O.F.- Verde Luz Orange G

1- INTRODUÇÃO

A radiação solar é essencial para a vida em nosso planeta, já que ilumina, aquece, participa da fotossíntese e da síntese de vitamina D (Diffey, 1991; Okuno & Vilela, 2005). Dependendo do seu comprimento de onda, frequência e conteúdo de energia, a radiação solar pode ser dividida em vários subtipos, como as faixas da luz visível e do ultravioleta (Barreto *et al.*, 2008).

Por sua vez, a radiação ultravioleta pode ser subdividida de acordo com o seu comprimento de onda (Diffey, 2002) em:

-Radiação UVA (315-400 nm): esta radiação é a menos prejudicial para os seres vivos. Não é absorvida pela camada de ozônio e está presente em grande quantidade na atmosfera.

-Radiação UVB (280-315 nm): grande parte desta radiação é absorvida pela camada de ozônio, em condições normais de temperatura e incidência de luz solar. Esta radiação, quando absorvida pelas células, pode alterar a estrutura das proteínas, do DNA e das membranas biológicas.

-Radiação UVC (100-280 nm): é o tipo mais perigoso de radiação ultravioleta. Os comprimentos de onda ao redor de 260 nm causam danos ao DNA das células, afetando assim, grande parte dos organismos vivos; esta radiação é totalmente absorvida pela camada de ozônio (Häder *et al.*, 2003).

A camada de ozônio atmosférico absorve parte das radiações solares, com exceção da radiação UVA; a porcentagem de luz solar que é absorvida depende da espessura desta camada que é naturalmente variável ao longo das estações do ano, assim como de um ano para o outro (Tsilimigaki *et al.*, 2003). Além disso, nas duas últimas décadas, o monitoramento da camada de ozônio revelou uma redução na sua espessura e uma ampliação do buraco de ozônio antártico, o que elevou a preocupação com o aumento na intensidade de radiação ultravioleta na superfície terrestre (Kirchhoff *et al.*, 2000).

O aumento da incidência de radiação ultravioleta ocorre, principalmente, na faixa da radiação UVB, afetando não só os ecossistemas terrestres, mas também os aquáticos, já que a incidência desta radiação em ambientes aquáticos, com até 50 cm de profundidade, ocorre na mesma intensidade que na superfície terrestre (Bancroft *et al.*, 2007). O aumento da radiação UVB pode causar danos aos organismos, pois ela altera proteínas, lipídios, e no DNA provoca uma dimerização das bases nitrogenadas, principalmente a pirimidina, causando mutações que podem acarretar em modificações celulares (Mouret *et al.*, 2008).

Dentre os animais encontrados em ambientes aquáticos de baixa profundidade, como rios riachos e lagoas, estão os camarões de água doce *Macrobrachium olfersi*, conhecidos popularmente

como “Pitu”, (**Figura 1**). A reprodução deste camarão envolve vários processos endógenos que respondem a variações ambientais tais como: incidência de luz solar, temperatura e salinidade (Kulkarni *et al.*, 1991; Jayawadane *et al.*, 2003; Martins *et al.*, 2006; Sampaio *et al.*, 2007); estas variações regulam o mecanismo hormonal do sistema endócrino peduncular, que atua sobre o desenvolvimento ovariano (Pradeille-Rouquette, 1976). O pedúnculo ocular dos crustáceos abriga células neuro-secretoras que formam o complexo órgão-X/glândula do seio (COX/GS), responsável pela produção, estocagem e distribuição de hormônios reguladores como, por exemplo, o Hormônio Inibidor Gonadal (HIG), sintetizado pelo órgão-X é responsável pela inibição da maturação ovariana (Cunha, 2008).

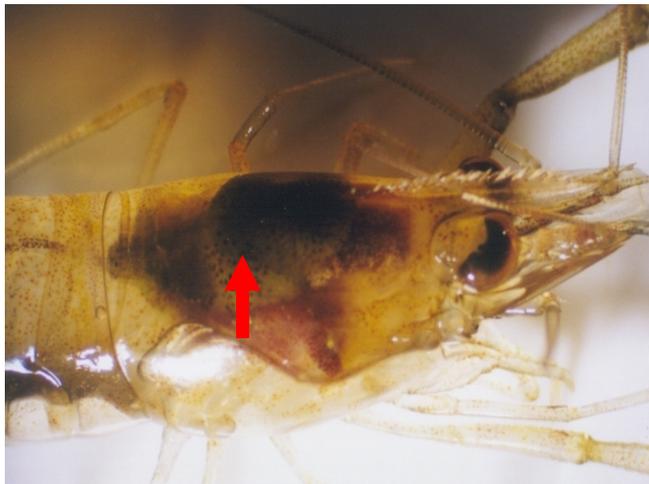


Figura 1: Fêmea de *Macrobrachium olfersi*, no detalhe (→) ovário em estágio avançado de maturação ovariana.

As fêmeas de *M. olfersi* têm seu pico reprodutivo nos meses que coincidem com a estação do verão (Ammar *et al.*, 2001), quando a incidência da radiação UVB é maior (André *et al.*, 2003). Durante o ciclo reprodutivo desta espécie, a maturação dos ovários ocorre de forma gradual, apresentando um grau de modificação de um estágio de maturação ovariana para outro (Kao *et al.*, 1999). A observação macroscópica dos ovários é possível graças à transparência da carapaça do cefalotórax, que permite a visualização da forma, tamanho, textura e cor do órgão, características utilizadas para a determinação do estagiamento macroscópico dos ovários (**Figura 2**) (Alves & Tomé, 1966; Brown & Patlan, 1974; Martins *et al.*, 2007).

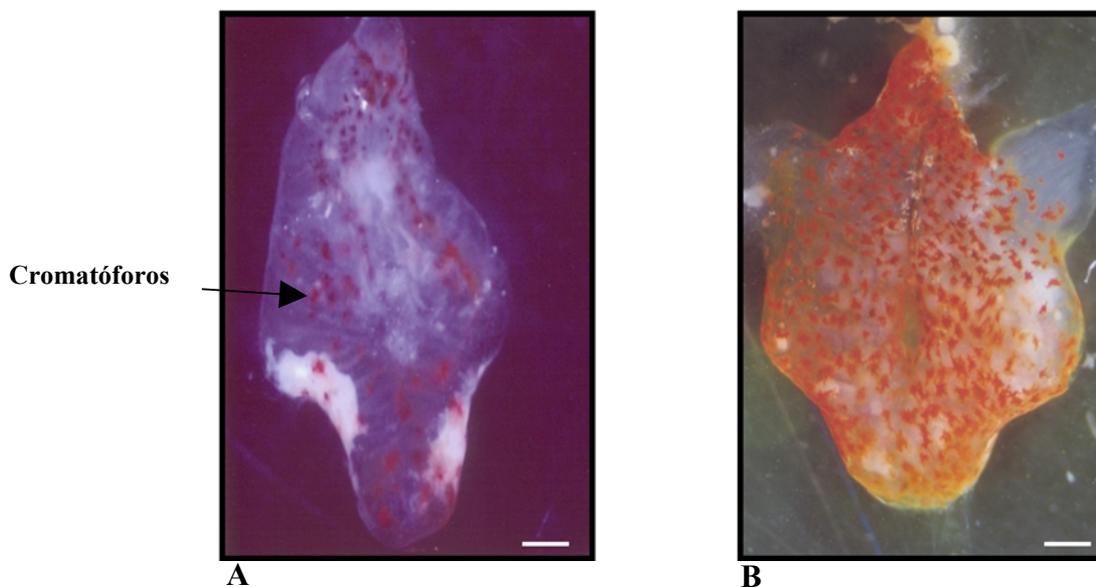


Figura 2: Ovários observados macroscopicamente, *in vivo*, em dois estágios de maturação: (A) estágio intermediário de maturação e (B) estágio avançado de maturação. Barra=1mm.

1.1-ESTAGIAMENTO MACROSCÓPICO DOS OVÁROS

Macroscopicamente, o estagiamento dos ovários de *M. olfersi* é dividido em 5 fases (Tan-Fermin & Pundera, 1989; Quintero & Gracia, 1998; Mossolin & Bueno, 2002): período pós-desova, período antes da proliferação celular, período de proliferação e crescimento das células germinativas (sendo este subdividido em: **inicial**, **intermediário** e **avançado**) (Figura 3).

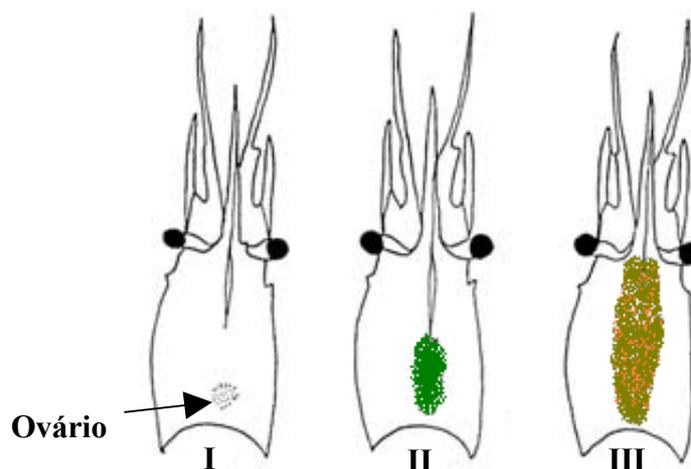


Figura 3: Esquema do desenvolvimento dos ovários observado macroscopicamente: (I) ovário inicial, (II) ovário intermediário e (III) ovário avançado. (Modificado de Martins *et al.*, 2007).

No **estágio inicial**, os ovários são translúcidos, possuem tamanho reduzido e, por muitas vezes, não é possível observá-los a olho nu (Castiglioni *et al.*, 2007).

Já os ovários **no estágio intermediário** apresentam tamanho médio, quando comparados aos ovários iniciais e avançados; localizam-se sob o coração e estendem-se sobre o hepatopâncreas, atingindo progressivamente a região lateral e antero-posterior do cefalotórax (Dumont & D’Incao, 2004). Neste estágio, os ovários apresentam coloração esverdeada e possuem poucos cromatóforos (Barreto *et al.*, 2008a).

Os ovários em **estágio avançado** apresentam-se bastante desenvolvidos, expandindo-se principalmente em direção à região ventral do cefalotórax. Sua coloração vai do verde-oliva ao verde escuro, com grande quantidade de cromatóforos espalhados pela superfície do órgão (Verdi, 1995).

Histologicamente, os ovários são constituídos por duas linhagens de células, as células germinativas e as células foliculares (**Figura 4**) (Favaro & Chaves, 1999). As células germinativas podem ser classificadas em três diferentes etapas de desenvolvimento (Pacheco, 1997; Peixoto *et al.*, 2003; Santana, 2005; Ribeiro, 2006):

- **Ovogônias:** localizam-se na região central do ovário; apresentam citoplasma pouco evidente e núcleo central, possuindo uma intensa basofilia quando coradas com H&E.

- **Ovócitos pré-vitelogênicos:** células de formato oval, com tamanho maior quando comparado com as ovogônias; localizam-se na região medular do ovário (Chaves & Magalhães, 1993); nestas células, podem ser observadas pequenas gotículas de lipídios esparsas em seu citoplasma, levemente acidófilo, quando corados com H&E.

- **Ovócitos vitelogênicos:** células de formato poliédrico localizam-se no córtex do órgão (Shuld, 1980); sendo as maiores células encontradas nos ovários, em decorrência do acúmulo de vitelo em seu citoplasma, e se coram intensamente com eosina.

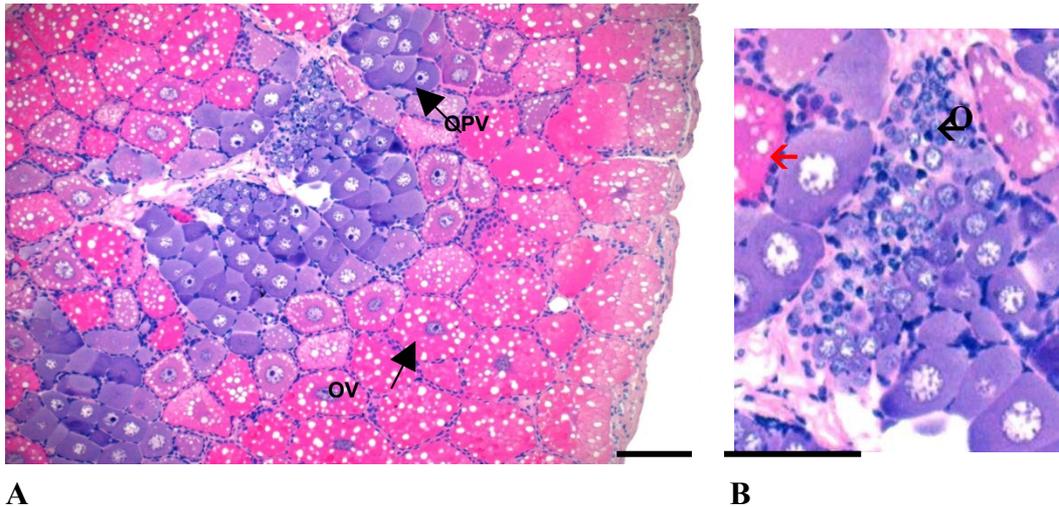


Figura 4: Ovário em estágio avançado de maturação (H&E). Na fotografia **A** observam ovócitos pré-vitelogênicos (**OPV**), ovócitos vitelogênicos (**OV**). Na fotografia **B** observa-se ovogônias (**O**) e células foliculares (**→**).

Aumento de 100x. Barra=0,1mm

1.2-ESTAGIAMENTO MICROSCÓPICO DOS OVÁRIOS

Os ovários podem, ainda, ser divididos em três estágios, de acordo com a presença e quantidade de células germinativas (Shuld, 1980a; Othomi *et al.*, 1998; Castiglioni *et al.*, 2006 e Paulraj *et al.*, 2008):

-Estágio inicial: os ovários apresentam muitas ovogônias, poucos ovócitos pré-vitelogênicos e nenhum ovócito vitelogênico.

-Estágio intermediário: neste estágio, observam-se ovogônias, muitos ovócitos pré-vitelogênicos e poucos ovócitos vitelogênicos.

-Estágio avançado: os ovários apresentam poucas ovogônias e ovócitos pré-vitelogênicos, porém, em sua região cortical, possuem grande quantidade de ovócitos vitelogênicos.

Todas as modificações descritas anteriormente, tanto macroscópicas quanto microscópicas, decorrem dos processos de ovogênese e vitelogênese. Na ovogênese, ocorre a divisão e diferenciação das ovogônias para ovócitos pré-vitelogênicos, estes ovócitos aumentam a atividade e quantidade de organelas citoplasmáticas para o acúmulo de vitelo. Dentro deste processo ocorre também a vitelogênese que é o acúmulo de grande quantidade de vitelogenina,

proteína precursora do vitelo presente na hemolinfa. Esta proteína é captada através da endocitose pelos ovócitos e modificada transformando-se em vitelina que é acumulada no citoplasma destas células causando um grande aumento de seu diâmetro (Kroll *et al.*, 1992). Estes ovócitos, ainda, acumulam lipídios, carboidratos, água e sais minerais que também constituíram o vitelo (Adiyodi & Subramoniam, 1983). Deste modo, a vitelogênese proporciona a produção de ovos ricos em vitelo (Serrano-Pinto *et al.*, 2003; Müller *et al.*, 2007), garantindo a nutrição do embrião num período de incubação de aproximadamente 14 dias (Simões-Costa *et al.*, 2005) .

Assim, qualquer alteração ambiental, como uma maior incidência da radiação UVB, pode comprometer a dinâmica reprodutiva e populacional do camarão *M. olfersi*. Além do mais, há poucos estudos acerca dos efeitos da radiação UVB sobre os organismos aquáticos, principalmente, invertebrados.

2-OBJETIVOS

2.1-GERAL

Avaliar os efeitos da radiação UVB nos ovários de fêmeas adultas de *Macrobrachium olfersi* nos estágios intermediário e avançado de maturação ovariana.

2.2-ESPECÍFICO

- Analisar, macroscopicamente, *in vivo*, os efeitos da radiação UVB nos ovários, usando como parâmetro as variações na coloração, textura e tamanho destes órgãos;
- Obter o índice gonadossomático;
- Padronização da técnica histológica que melhor preservar a estrutura dos ovários;
- Observar a estrutura morfológica, em microscopia de luz, das gônadas de fêmeas do grupo controle e do grupo irradiado (submetidas à radiação UVB);
- Analisar, através de morfometria e estereologia, as células germinativas. A fim de investigar os possíveis danos causados pela radiação no processo de maturação gonadal;
- Investigar, através de técnicas histoquímicas, se a radiação UVB causa alterações na composição e quantidade de vitelo das células germinativas, principalmente nos ovócitos vitelogênicos.

3- MATERIAIS E MÉTODOS

Fêmeas de *Macrobrachium olfersi* foram coletadas no Parque Municipal da Lagoa do Peri (Autorização nº 157/DIFAP/IBAMA), nos períodos de Janeiro a março, sendo feita uma segunda coleta no período de julho a agosto. As coletas foram realizadas com o auxílio de um puçá de malha fina. O transporte dos animais até o laboratório de Desenvolvimento e Reprodução Animal foi realizado através de aquários portáteis preenchidos parcialmente com água do próprio ambiente, além de plantas aquáticas para a proteção dos animais. No laboratório, os animais foram aclimatados em aquários de 30 litros a 24°C (± 1), fotoperíodo natural, aeração constante e alimentação diária. Todos os animais coletados seguiram-se o mesmo procedimento de aclimação por, no mínimo, quatro dias. Após este período, as fêmeas foram divididas em dois grupos, o **controle** e o **irradiado**. Cada um destes grupos posteriormente foi dividido em subgrupos de acordo com o estágio de maturação ovariana, usando-se como parâmetro a coloração e tamanho dos ovários, observados por transparência da carapaça do cefalotórax.

Após o período de aclimação, as fêmeas do grupo controle foram anestesiadas a 4°C, sacrificadas e dissecadas; já as fêmeas do grupo irradiado foram primeiramente expostas à radiação UVB por 30 minutos com lâmpada (Vilber Loumart 6W).

Para todos os grupos os procedimentos de sacrifício, dissecação, mensuração do comprimento e peso dos ovários e métodos histoquímicos serão os mesmos.

3.1-CARACTERIZAÇÃO DOS GRUPOS EXPERIMENTAIS

GRUPO CONTROLE

O grupo controle foi dividido em dois subgrupos de acordo com o estágio de maturação dos ovários das fêmeas de *M. olfersi* no momento da dissecação:

-SUBGRUPO CONTROLE INTERMEDIÁRIO (SCI): fêmeas que apresentaram ovários em estágio intermediário de maturação.

-SUBGRUPO CONTROLE AVANÇADO (SCA): fêmeas com ovários em estágio de maturação avançado.

GRUPO IRRADIADO

As fêmeas de *M. olfersi* foram observadas diariamente, por cerca de 4 dias, para que fossem identificados os estágios de maturação ovariana. De acordo com o estágio observado, os animais foram divididos em dois subgrupos antes da irradiação:

-SUBGRUPO IRRADIADO INTERMEDIÁRIO (SII): fêmeas com ovários em estágio intermediário de maturação.

-SUBGRUPO IRRADIADO AVANÇADO (SIA): fêmeas com ovários em estágio de maturação avançada.

Após a identificação do estágio ovariano, os animais foram irradiados por 30 minutos em aquários vedados, sem qualquer abrigo, permitindo uma maior absorção da irradiação. Posteriormente, os animais foram transferidos para um aquário escuro, evitando a ativação das enzimas de fotorreparo, dependentes de luz visível, que podem reverter ligações covalentes prejudiciais de bases nitrogenadas (Lewin, 2001). Após quatro dias, as fêmeas foram sacrificadas e dissecadas seguindo a mesma metodologia descrita anteriormente para o grupo controle.

3.2-OBSERVAÇÃO MACROSCÓPICA DOS OVÁRIOS

Para a análise macroscópica dos ovários foram utilizadas um total de 15 fêmeas para o grupo controle e 9 fêmeas para o grupo irradiado.

3.3-BIOMETRIA E DISSECAÇÃO

Inicialmente, as fêmeas foram anestesiadas pelo frio, à 4°C, e pesadas para a obtenção do peso corporal com o auxílio de uma balança de precisão (0,0001g). Em seguida, os animais foram dissecados, abrindo-se primeiramente a carapaça para permitir que seus ovários fossem medidos com paquímetro em seu eixo longitudinal e transversal. Logo após, os ovários foram retirados e pesados em balança de precisão para a obtenção do **Índice Gonadossomático (IGS)** = (Peso do ovário/peso total da fêmea)x100 (Rodríguez *et al.*, 2005).

3.4-TÉCNICAS HISTOLÓGICAS

3.4.1-FIXAÇÃO

Foram utilizadas diferentes soluções fixadoras (Bouin alcoólico, Bouin aquoso, Zamboni e Davidson (Santana, 2005) para se escolher a que melhor mantém a estrutura histológica dos ovários.

3.4.2-INCLUSÃO

-PARAFINA

As peças foram submetidas à desidratação em série etanólica crescente, diafanizadas em xilol e incluídas em parafina a 58°C. Após a inclusão, o material foi emblocado, seccionado em micrótomo rotativo e coletado em lâminas histológicas (5µm).

-PARAPLAST

Os ovários foram submetidos à desidratação em série etanólica crescente, diafanizados em xilol, incluídos em paraplast e cortes de 5µm foram coletados em lâminas histológicas.

-HISTORESINA

Após a fixação, os ovários foram desidratados em álcool e incluídos em historesina. Posteriormente, o material foi emblocado em cápsulas de gelatina ou formas de silicone. A microtomia foi realizada em micrótomo Leica, RM2135, e cortes de 4µm foram obtidos.

3.4.3 – COLORAÇÃO & HISTOQUÍMICA

As preparações histológicas do material incluído em historesina apresentaram qualidade muito superior às do material incluído em parafina e paraplast. Portanto, a inclusão em parafina e paraplast foram abandonadas, e passou-se a utilizar somente a inclusão em historesina.

-HEMATOXILINA & EOSINA

A coloração H&E (Hematoxilina & eosina) foi utilizada para observação do estado de preservação do órgão, esta coloração foi utilizada para realizar o estagiamento microscópico dos ovários. Foram utilizadas a hematoxilina de Harris e a eosina aquosa (1%), segundo Beçak & Paulete (1976).

-ALCIAN BLUE pH 2,5

Esta coloração foi utilizada para verificação da ocorrência de mucosubstâncias ácidas, tendo como reação positiva a coloração azul (Santos *et al.*,2009). Foram testados diversos tempos, o que apresentou melhor resultado foi o tempo de 1 minuto.

-AZUL DE TOLUIDINA 0,5%

Esta coloração foi utilizada para a identificação de polissacarídeos ácidos, através da reação de metacromasia, o tempo utilizado foi de 2 minutos (Moura, 2001).

- P.A.S. (PERIODIC ACID SCHIFF)

Foi realizada a histoquímica P.A.S., segundo Beçak & Paulete (1976) para mucopolissacarídeos neutros um dos constituintes do vitelo (Fyhn & Costlow, 1977). Foram testados inúmeros tempos tanto para o ácido periódico quanto para o Reativo de Schiff.

- TRICRÔMICO DE MALLORY

Esta técnica é amplamente utilizada para observação das diferentes etapas do desenvolvimento das células germinativas, em *M. olfersi* esta coloração destaca claramente as ovogônias, ovócitos pré-vitelogênicos e ovócitos vitelogênicos (Pacheco, 1997).

- V.O.F. (VERDE LUZ, ORANGE G E FUCSINA BÁSICA)

A técnica de Verde Luz, Orange G e Fucsina (V.F.O.), corante ácido/básico é utilizada para o estudo dos ovários, por destacarem as diferentes células que o compõem. A reação positiva pode ser observada quando as células germinativas apresentam coloração violeta

(Pacheco, 1997). Para a coloração de V.O.F. foi utilizado um tempo de 5 minutos e contra corando com Hematoxilina, modificado de Fagundes (1992).

3.5-ANÁLISES MORFOMÉTRICA E ESTEREOLÓGICA

Foram mensuradas as células do ovário das lâminas coradas com H&E com ocular micrométrica 40X para as ovogônias e 10X para as demais células germinativas.

As células germinativas foram quantificadas através do método de contagem de campos. Para tal, foram tiradas fotos (**Figura 5**) com aumento de 4X, das regiões cortical e medular dos ovários. Posteriormente, foram escolhidos, aleatoriamente, cinco campos para cada região do ovário e contadas todas as células que estavam contidas inteiramente, ou pelo menos mais da metade, dentro do campo.

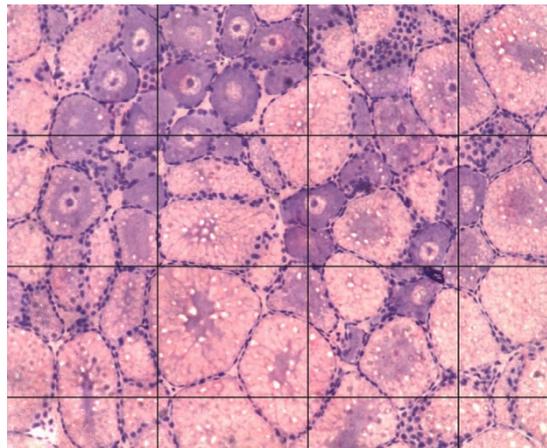


Figura 5: Corte de um ovário controle em estágio intermediário de maturação, aumento 10X, coloração H&E.

3.6-ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados referentes à morfometria foram submetidos ao teste estatístico ANOVA one-way, seguida do teste de Tukey (Statistica 6.0).

4-RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1-PADRONIZAÇÃO DA METODOLOGIA

-FIXAÇÃO

Entre os fixadores utilizados, a solução de Bouin alcoólica apresentou melhores resultados com o tempo de 18 horas de fixação.

-INCLUSÃO

As preparações histológicas do material incluído em historesina apresentaram qualidade muito superior as do material incluído em parafina e parplast, já que a historesina penetrou melhor nos ovócitos vitelogênicos, mantendo sua estrutura.

-COLORAÇÕES

As colorações de V.O.F., Tricrômico de Mallory e o P.A.S. não apresentaram resultados positivos nos grupos analisados (**Figura 6A, B, C e D**).

Os ovários apresentaram reação satisfatória quando corados com as técnicas de HE, Alcian Blue e Azul de Toluidina (**Figura 7A e 7C**).

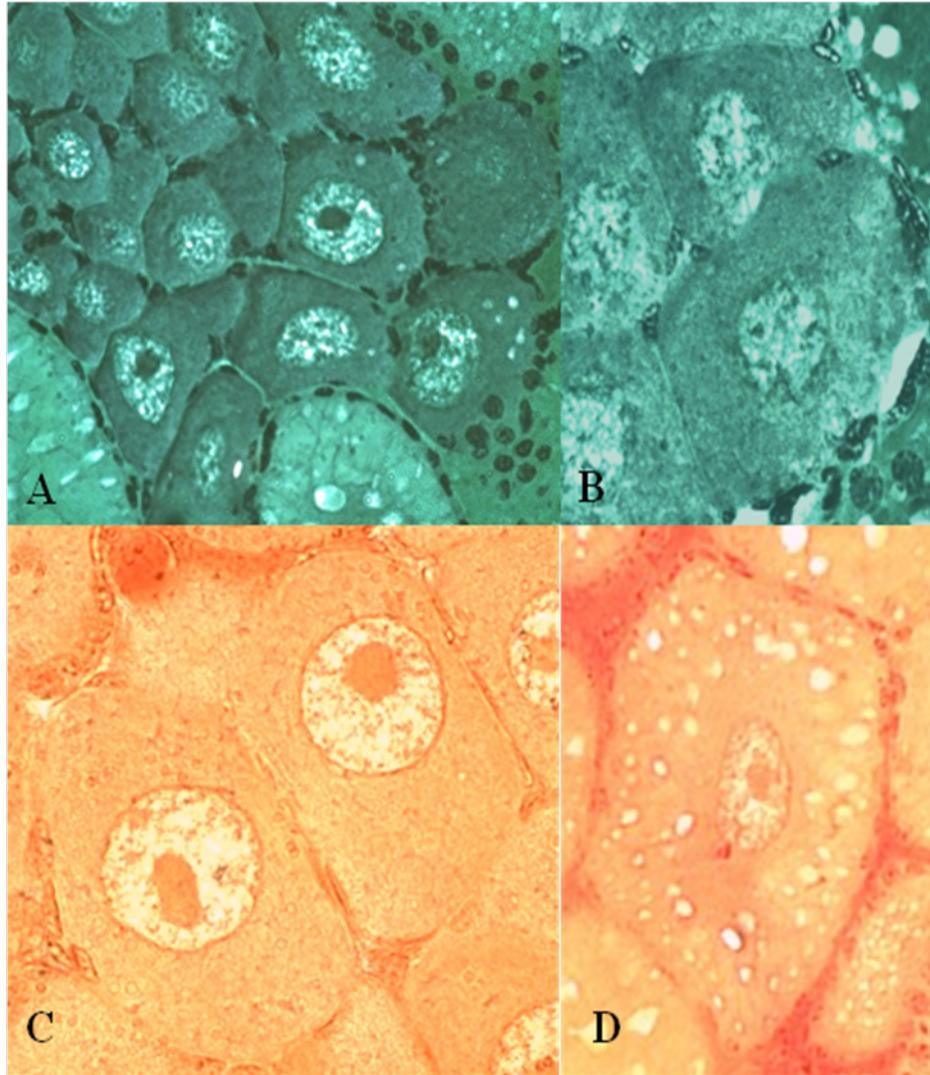


Figura 6: Resultados negativos para as colorações V. O. F. figuras A (controle) e B (Irradiado), e Tricrômico de Mallory figuras C (controle) e D (Irradiado).

Grupo controle

Os ovários do SCI e SCA apresentaram resultados positivos para as técnicas de Azul de Toluidina e Alcian Blue (**Tabela 1**).

Tabela 1: Resultados das colorações e histoquímicas em historesina nas células foliculares e germinativas dos ovários controle em ambos os estágios de maturação ovariana.

Células	Regiões celulares	Corantes histológicos					
		H&E	V.O.F.	Tricrômico de Mallory	P.A.S.	Azul de Toluidina	Alcian Blue
Células foliculares	Núcleo	(+++) Hematoxilina	Negativo	Negativo	Negativo	(+++)	(+++)
	Citoplasma	(+++) Hematoxilina	Negativo	Negativo	Negativo	(+++)	(+++)
Ovogônia	Núcleo	(+++) Hematoxilina	Negativo	Negativo	Negativo	(+++)	(+++)
	Citoplasma	(+++) Hematoxilina	Negativo	Negativo	Negativo	(+++)	(+++)
Ovócito pré-vitelogênico	Núcleo	(+++) Hematoxilina	Negativo	Negativo	Negativo	(+++)	(+++)
	Citoplasma	(++) Hematoxilina	Negativo	Negativo	Negativo	(+++)	(+++)
Ovócito vitelogênico	Núcleo	(++) Hematoxilina	Negativo	Negativo	Negativo	(++)	(++)
	Citoplasma	(+++) Eosina	Negativo	Negativo	Negativo	(++)	(++)

Negativo-ausência de coloração

+→ Pouca intensidade de coloração

++→ Média intensidade de coloração

+++→ Grande intensidade de coloração

Grupo irradiado

O citoplasma dos ovócitos vitelogênicos dos ovários do SII e do SIA apresentaram menor intensidade de coloração com eosina, quando comparados com os ovários do grupo controle (**Tabela 2**).

As colorações de Azul de Toluidina e Alcian Blue mostraram resultados semelhantes aos dos grupos controle (**Tabela 2**). Embora, os ovócitos pré-vitelogênicos dos grupos irradiados corados com Azul de Toluidina apresentaram mais intensidade na coloração quando comparados aos dos grupos controle (**Figura 6B e 6D**).

Tabela 2: Resultados das colorações e histoquímicas em historesina nas células foliculares e germinativas dos ovários irradiado em ambos os estágios de maturação ovariana.

Células	Regiões celulares	Corantes histológicos					
		H&E	V.O.F.	Tricrômico de Mallory	P.A.S.	Azul de toluidina	Alcian blue
Células foliculares	Núcleo	(++) Hematoxilina	Negativo	Negativo	Negativo	(+++)	(+++)
	Citoplasma	(+++) Hematoxilina	Negativo	Negativo	Negativo	(+++)	(+++)
Ovogônia	Núcleo	(+++) Hematoxilina	Negativo	Negativo	Negativo	(+++)	(+++)
	Citoplasma	(++) Hematoxilina	Negativo	Negativo	Negativo	(+++)	(+++)
Ovócito pré-vitelogênico	Núcleo	(+++) Hematoxilina	Negativo	Negativo	Negativo	(++++)	(+++)
	Citoplasma	(++) Hematoxilina	Negativo	Negativo	Negativo	(++++)	(+++)
Ovócito vitelogênico	Núcleo	(++) Hematoxilina	Negativo	Negativo	Negativo	(++)	(++)
	Citoplasma	(++) Eosina	Negativo	Negativo	Negativo	(++)	(++)

Negativo-ausência de coloração

+→ Pouca intensidade de coloração

++→ Média intensidade de coloração

+++→ Grande intensidade de coloração

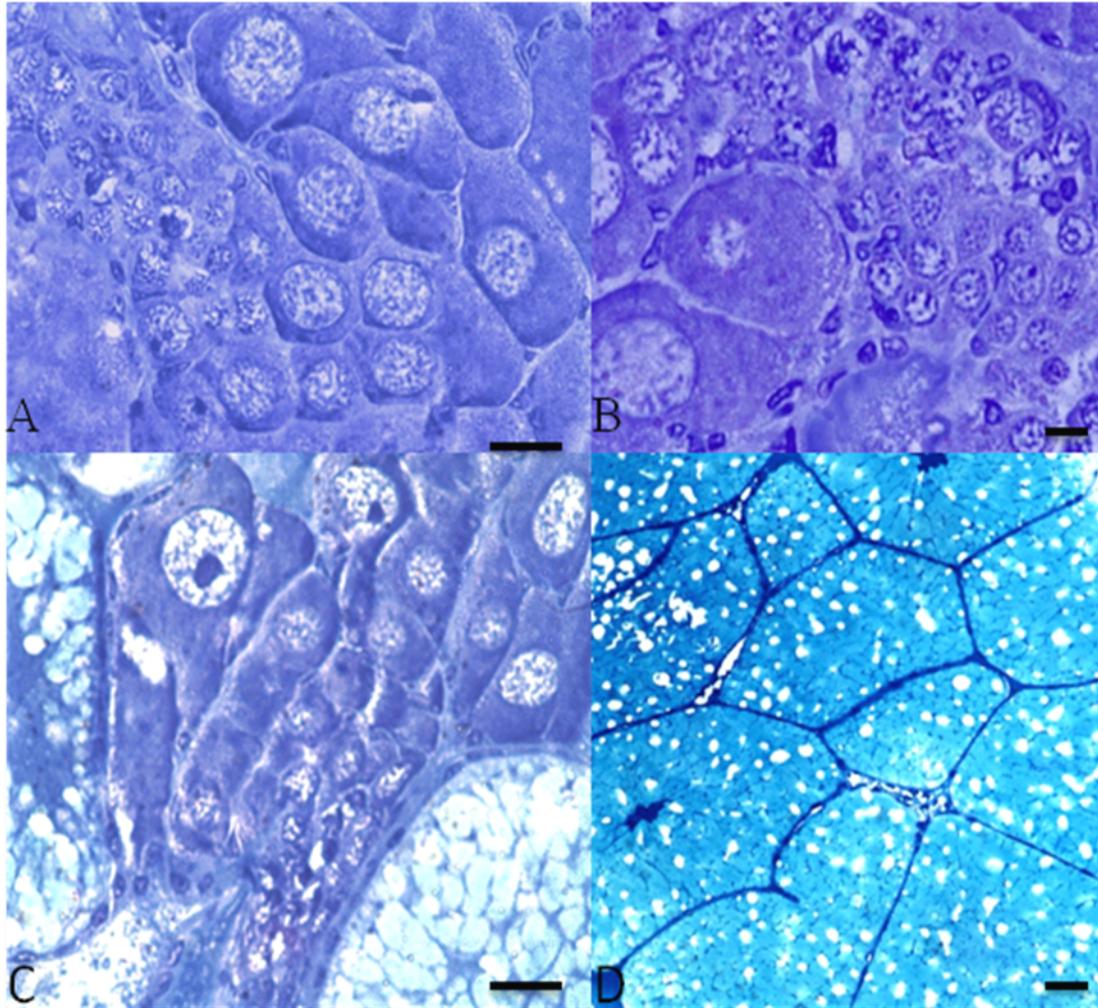


Figura 7: Células que compõem o **ovário controle (A e C)** e **irradiado (B e D)** em estágio intermediário de maturação ovariana. Em 10A e 10B Azul de Toluidina e 10C e 10D Alcian Blue. Barra=0,01mm

4.2-ANÁLISE MACROSCÓPICA DOS OVÁRIOS

Não foram observadas alterações na textura (apresentando granulosidade semelhante em todos os grupos analisados), bem como na sua cor e forma dos grupos controle e irradiado. Nota-se, ainda, que nenhum ovário pertencente ao subgrupo intermediário irradiado (**SI**) chegou ao estágio avançado de maturação ovariana, após os quatro dias seguintes à irradiação. Já 30% das fêmeas do subgrupo controle intermediário (**SCI**) apresentaram ovários em estágio avançado de maturação no final de quatro dias. Estes resultados indicam que a radiação UVB não alterou as características de textura e cor dos ovários.

Vários autores utilizam as características morfológicas de textura e cor dos ovários, observadas através da transparência da carapaça, como um dos métodos empregados para a

determinação do grau de maturação ovariana (Brown *et al.*, 1974; Tan-Fermin *et al.*, 1989; Quintero & Gracia, 1998; Santos *et al.*, 2008). Outros estudos realizados em camarões, submetidos a diferentes condições, como a mudança do fotoperíodo (Souza, 2005), ou a ablação do pedúnculo óptico (Purificação, 2006), também não apresentaram alterações nas características macroscópicas dos ovários.

4.2.1-BIOMETRIA DOS OVÁRIOS

Os resultados obtidos estão apresentados na **tabela 3**. Nos ovários do subgrupo irradiado avançado (SIA), observa-se um aumento acentuado nos eixos longitudinal e transversal em relação ao subgrupo controle avançado (SCA).

Tabela 3: Dados biométricos dos eixos Longitudinal e Transversal dos ovários de fêmeas de *M. olfersi* dos grupos controle e irradiado.

Estágio de maturação ovariana	Biometria dos ovários			
	Controle		Irradiado	
	Longitudinal	Transversal	Longitudinal	Transversal
Intermediário	6,0mm	5,0mm	5,5mm	4,25mm
Avançado	7,33mm	5,0mm	8,83mm	6,0mm

O tamanho dos ovários, obtido pela mensuração de seu eixo longitudinal e transversal, é um parâmetro utilizado para analisar, macroscopicamente, a maturação ovariana em diferentes grupos (Santos *et al.*, 2009). Segundo Dumont & D'Incao (2004) e Poprawa (2005), a classificação macroscópica dos ovários, baseada no tamanho de seus eixos, está intimamente relacionada ao desenvolvimento e à organização das células deste órgão, indicando uma relação direta entre o aumento dos ovócitos e o aumento dos ovários. Além disso, o aumento dos ovários também é consequência da proliferação das células germinativas e do acúmulo de substâncias, principalmente, nos ovócitos vitelogênicos (Barreto *et al.*, 2008a). Nossos resultados mostram que, em *M. olfersi*, os ovários do subgrupo irradiado avançado (SIA) apresentaram valores maiores de seus eixos do que o observado no subgrupo controle avançado (SGA), indicando que a radiação UVB pode está interferindo no tamanho dos ovários.

4.2.2-ÍNDICE GONADOSSOMÁTICO

Os valores do índice gonadossomático, obtidos através do peso dos ovários em relação ao peso das fêmeas, podem ser observados na **tabela 4**.

Nota-se uma diminuição no índice gonadossomático do subgrupo irradiado intermediário (**SII**), quando comparado com ovários do subgrupo controle intermediário (**SCI**). Entretanto, os ovários do subgrupo irradiado avançado (**SIA**) possuem um expressivo aumento no índice gonadossomático em relação ao subgrupo controle avançado (**SCA**).

Durante o período reprodutivo dos crustáceos, os ovários passam por variações morfológicas acentuadas, tais como aumento do comprimento, da largura e do peso deste órgão (Branco *et al.*, 1992). O índice gonadossomático (**IGS**) mostra a porcentagem do peso do ovário em relação ao peso total da fêmea, relacionando o aumento do peso do ovário com o estágio de maturação ovariana (Juchno & Chybowski, 2003; Jayawardane *et al.*, 2003).

Em *M. olfersi* os valores obtidos do **IGS**, tanto no grupo controle quanto no irradiado, confirmam o aumento do peso do ovário com a mudança do estágio intermediário para o avançado. Nos animais irradiados, o índice gonadossomático do subgrupo irradiado avançado (**SIA**) apresenta um aumento acentuado quando comparado com o do subgrupo controle avançado (**SCA**). Neste caso, a radiação UVB pode estar estimulando um aumento no peso dos ovários. Purificação (2006), em seu trabalho com *M. Olfersi* relata que a ablação do pedúnculo óptico também causa um aumento do índice gonadossomático em fêmeas com ovários em estágio avançado de maturação.

Tabela 4: Dados reprodutivos de avaliação do índice gonadossomático de fêmeas de *M. olfersi* dos grupos controle e irradiado.

Estágio de maturação ovariana	IGS (Índice gonadossomático)	
	Controle	Irradiado
Intermediário	0,402	0,389
Avançado	1,05	2,737

4.3-ANÁLISE MICROSCÓPICA DOS OVÁRIOS

Grupo controle

Os ovários do grupo controle, tanto o **SCI** quanto o **SCA**, apresentam duas regiões bem definidas: a medular, com ovogônias e ovócitos pré-vitelogênicos, e a cortical, com a presença de ovócitos pré-vitelogênicos e ovócitos vitelogênicos. Sendo que, a periferia do córtex possui apenas ovócitos vitelogênicos (**Figura 8A**).

Quanto às características histológicas das células deste grupo, observa-se que as ovogônias apresentam núcleos arredondados e pouco citoplasma (**Figura 9A**); os ovócitos pré-vitelogênicos possuem forma arredondada e algumas gotículas lipídicas em seu citoplasma (**Figura 9B**); os ovócitos vitelogênicos possuem forma poliédrica, citoplasma preenchido com grandes gotículas de lipídios e núcleos com aspecto de fragmentação da carioteca (**Figura 9C**). Já as células foliculares possuem formato pavimentoso, pouco citoplasma e núcleo bastante evidente (**Figura 9C**).

Resultados similares foram descritos em trabalhos realizados com *Macrobrachium borellii* (Verdi, 1995), *Farfantepenaeus paulensis* (Nazari *et al.*, 2007) e *Macrobrachium rosenbergii* (Meeratana & Sobhon, 2007), mostrando as características histológicas das células germinativas ao longo do seu desenvolvimento até chegar a ovócito vitelogênico.

Grupo irradiado

Os ovários deste grupo apresentam distribuição das células, nas regiões cortical e medular, semelhante à do grupo controle, contudo, observam-se ovócitos pré-vitelogênicos na periferia da região cortical (**Figura 8B**).

As ovogônias e as células foliculares (**Figura 9D e 9F**) possuem as mesmas características histológicas, quando comparadas aos ovários controle. Porém, os ovócitos pré-vitelogênicos apresentam forma alongada e maior acúmulo de substâncias na periferia de seu citoplasma (**Figura 9E**). Os ovócitos vitelogênicos possuem gotículas de lipídio não homogêneas em relação à forma, tamanho e distribuição em seu citoplasma quando comparados ao grupo controle (**Figura 9F**).

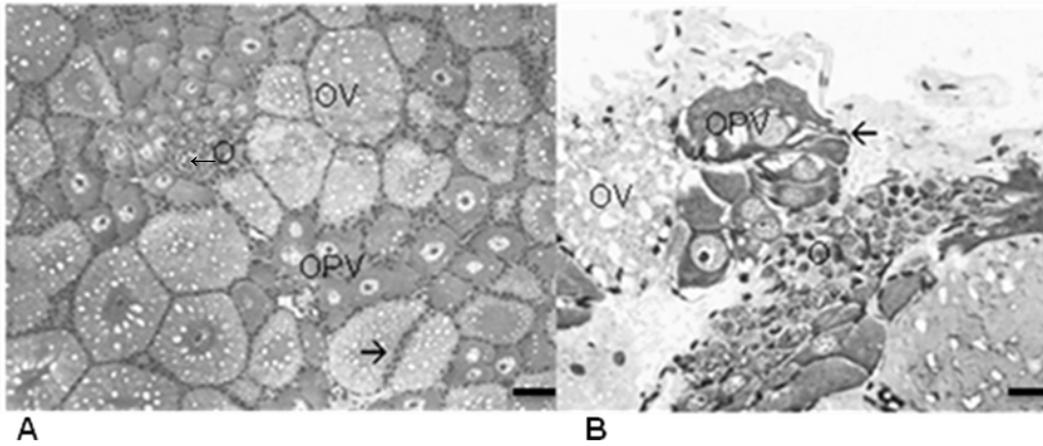


Figura 8: Cortes de ovário de *M. olfersi* em estágio intermediário de maturação ovariana. Vista geral da estrutura dos ovários: em (A) ovário controle e (B) ovário irradiado. Ovogônias (O), ovócitos pré-vitelogênicos (OPV), ovócitos vitelogênicos (OV) e células foliculares (→). Barra=0,1mm.

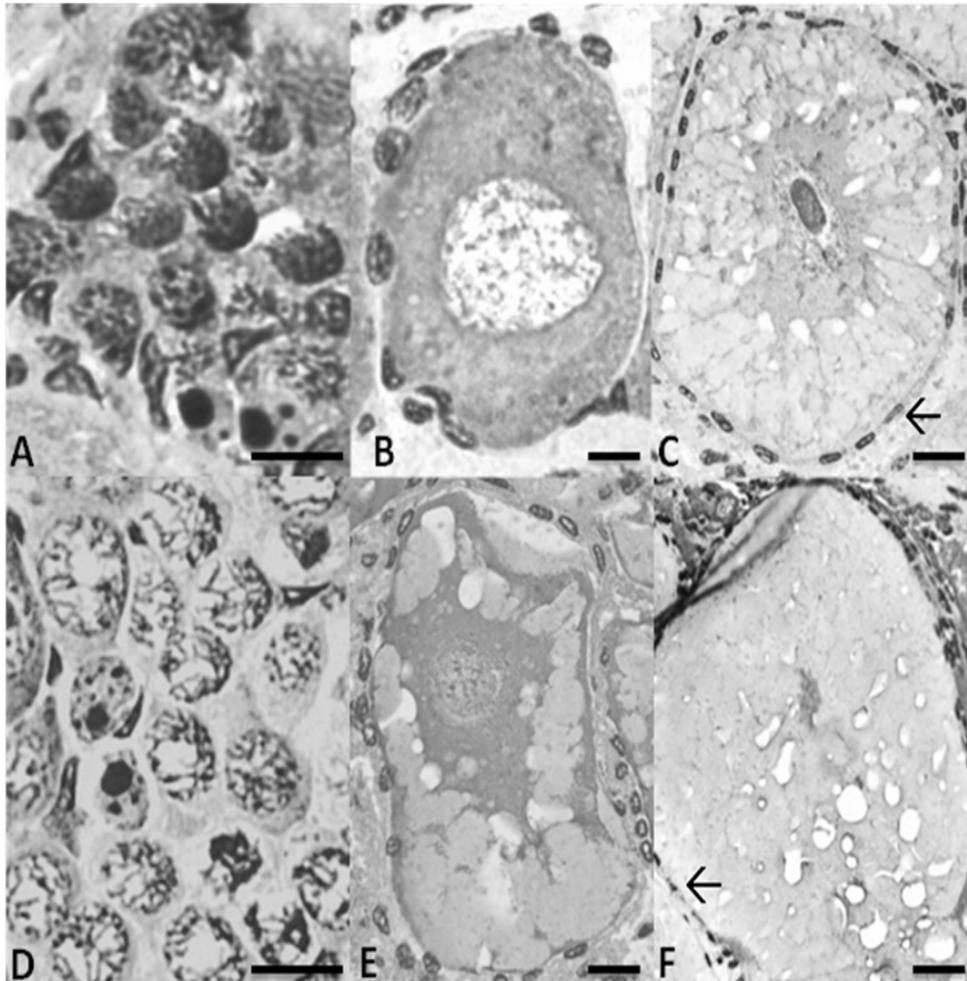


Figura 9: Células que compõem o ovário controle (A, B e C) e irradiado (D, E e F) ambos em estágio intermediário de maturação ovariana. Em (A e D) ovogônias, (B e E) ovócito pré-vitelogênico e (C e F) ovócito vitelogênico. Células foliculares (→). Cortes corados com H&E. Barra: na figura (A e D)=0,01mm e figura (B, C, E e F)=0,1mm.

4.4-ESTEREOLOGIA E MORFOMETRIA

Estereologia

Os resultados obtidos com a análise estereológica estão apresentados nas **tabelas 5 e 6**.

Na região medular dos ovários, observa-se um maior número de ovócitos pré-vitelogênicos no subgrupo irradiado intermediário (**SII**), quando comparado com o subgrupo controle intermediário (**SCI**), assim como o subgrupo irradiado avançado (**SIA**) apresenta maior número de ovogônias por campo, quando comparado com o subgrupo controle avançado (**SCA**) (**Tabela 5**).

Tabela 5: Estereologia das células germinativas da **região medular** dos ovários controle e irradiado, em estágio intermediário e avançado de maturação ovariana em fêmeas de *M. olfersi*.

Estágio de maturação ovariana	Região medular dos ovários	
	Células germinativas	
	Ovogônia	Ovócito pré-vitelogênico
SCI (Subgrupo Controle Intermediário)	4,47	10,87
SCA (Subgrupo Controle Avançado)	1,67	22,4
SII (Subgrupo Irradiado Intermediário)	2,53	29,73
SIA (Subgrupo Irradiado Avançado)	13,8	28,73

Na região cortical dos ovários, nota-se um aumento acentuado de ovócitos pré-vitelogênicos nos ovários do subgrupo irradiado intermediário (**SII**). Já os ovócitos vitelogênicos dos grupos analisados não apresentaram um aumento expressivo (**Tabela 6**).

Tabela 6: Estereologia das células germinativas da **região cortical** dos ovários controle e irradiado, em estágio intermediário e avançado de maturação ovariana em fêmeas de *M. olfersi*.

Estágio de maturação ovariana	Região cortical dos ovários	
	Células germinativas	
	Ovócito pré-vitelogênico	Ovócito vitelogênico
SCI (Subgrupo Controle Intermediário)	0	5,47
SCA (Subgrupo Controle Avançado)	0,73	8,2
SII (Subgrupo Irradiado Intermediário)	6,73	7,6
SIA (Subgrupo Irradiado Avançado)	0	6,07

Morfometria

- Ovários intermediários

Os diâmetros das ovogônias e dos ovócitos vitelogênicos dos ovários subgrupo irradiado intermediário (**SII**) apresentaram aumento significativo ($P < 0,05$), quando comparados com ovários do subgrupo controle intermediário (**SCI**) (**Gráfico 1**). Os ovócitos pré-vitelogênicos tiveram um aumento representativo no **SII**, porém não foi significativo ($P > 0,05$) (**Gráfico 1**).

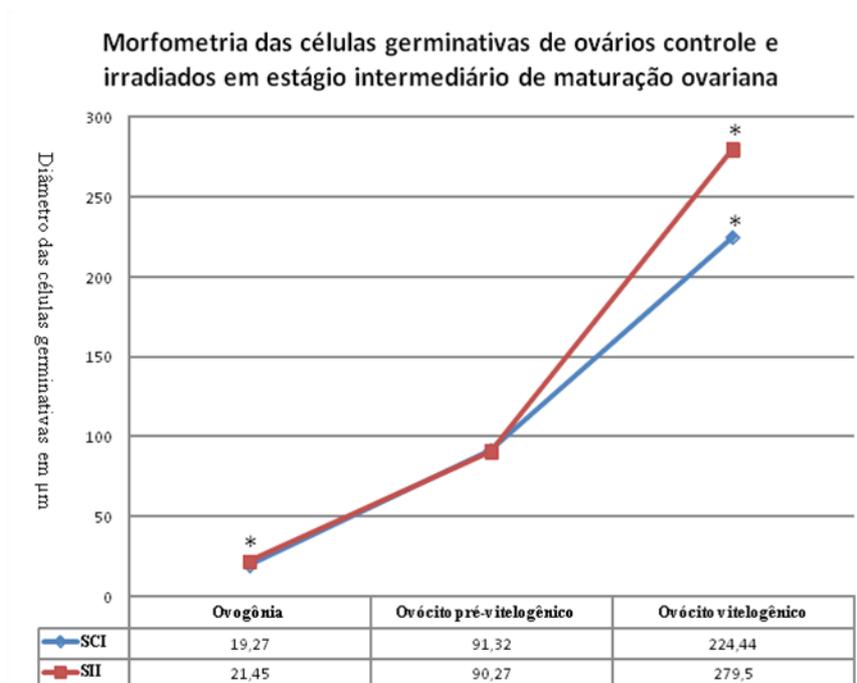


Gráfico 1: Morfometria do diâmetro das células germinativas de ovários controle e irradiado em estágio intermediário de maturação ovariana. (*) valores significantes ($P < 0,05$). **SCI** (Subgrupo Controle Intermediário) e **SII** (Subgrupo Irradiado Intermediário).

- Ovários avançados

Os ovócitos pré-vitelogênicos e vitelogênicos dos ovários do subgrupo irradiado avançado (SIA) possuem diâmetro significativamente maior ($P < 0,05$), quando comparados com os ovócitos pré-vitelogênicos e vitelogênicos dos ovários SCA (Gráfico 2).

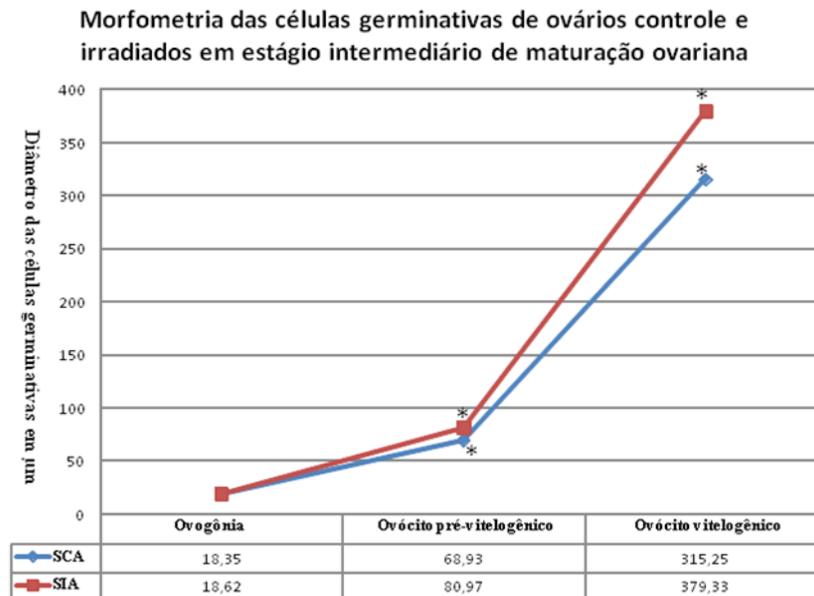


Gráfico 2: Morfometria do diâmetro das células germinativas de ovários controle e irradiados em estágio avançado de maturação ovariana. (*) valores significantes ($P < 0,05$). SCA(Subgrupo Controle Avançado) e SIA (Subgrupo Irradiado Avançado).

Segundo Kazemiyani (2008) e Barreto *et al.* (2008a), o aumento do peso dos ovários coincide com o aumento do número e do diâmetro das células germinativas, as ovogônias, os ovócitos pré-vitelogênicos e, principalmente, os ovócitos vitelogênicos.

Conforme descrito acima, as ovogônias são as menores células germinativas dos ovários. Estas células apresentaram um aumento de diâmetro significativo nos ovários irradiados em estágio intermediário de maturação (SII).

Os ovócitos pré-vitelogênicos do subgrupo irradiado avançado (SIA) mostraram um aumento significativo do seu diâmetro em relação ao subgrupo controle avançado (SCA). Os ovócitos vitelogênicos dos ovários irradiados, tanto em estágio intermediário quanto no avançado, também aumentaram de diâmetro, significativamente, quando comparado com o grupo controle.

No ovário de *M. olfersi*, durante o desenvolvimento das células germinativas, ocorre proliferação e aumento gradativo de tamanho de todas estas células (Souza, 2005). As ovogônias são as menores células germinativas, os ovócitos pré-vitelogênicos apresentam tamanho

intermediário, quando comparado com as ovogônias, e os ovócitos vitelogênicos são as maiores células (Kulkarni, 1991; Najmudeen, 2008). O aumento de tamanho celular, que ocorre na transição entre ovogônia e ovócito pré-vitelogênico, é consequência do aumento do citoplasma em decorrência da maior quantidade e atividade das organelas e com o início da vitelogênese (Ribeiro, 2006). O expressivo aumento de diâmetro celular que ocorre na passagem dos ovócitos pré-vitelogênicos para vitelogênicos é devido ao grande acúmulo de vitelo, com a continuação do processo de vitelogênese, nos ovócitos vitelogênicos (Juchno & Chybowski, 2003; Santana, 2005).

Nos ovários irradiados, tanto em estágio intermediário quanto no avançado de maturação, o aumento significativo do diâmetro dos ovócitos vitelogênicos, o aumento do acúmulo de substâncias nos ovócitos pré-vitelogênicos e do número destes ovócitos podem explicar o aumento do índice gonadosomático, mesmo tendo uma diminuição no número de ovócitos vitelogênicos.

Deste modo, como podemos constatar ao longo deste trabalho, o tamanho dos ovários, o índice gonadosomático, a estereologia e a morfometria das células germinativas foram alterados em decorrência da radiação UVB, indicando assim que o processo de maturação ovariana, principalmente a vitelogênese, pode ser afetado por uma maior incidência ambiental de radiação UVB.

Apesar do aumento da radiação ultravioleta, nos últimos anos, ainda há poucos trabalhos na literatura que avaliem os efeitos desta radiação, principalmente, na morfologia macro e microscópica de organismos aquáticos como *M. olfersi*.

6-CONCLUSÃO

→O acompanhamento diário dos ovários das fêmeas dos grupos controle e irradiado é adequado para a avaliação macroscópica das alterações causadas pela radiação UVB.

→ A irradiação com luz UVB por 30 minutos causa alterações nos ovários:

→A radiação UVB afetou os processos de oogenêese e vitelogenêese, alterando a quantidade de substâncias acumuladas tanto nos ovócitos pré-vitelogênicos quanto nos ovócitos vitelogênicos.

→A radiação UVB interfere também na distribuição dos ovócitos pré-vitelogênicos na região cortical, assim como, na quantidade das demais células germinativas.

→O aumento do diâmetro dos ovócitos vitelogênicos certamente afetará os processos reprodutivos uma vez que os embriões têm seu tempo de desenvolvimento diretamente relacionado com a quantidade de vitelo.

→As colorações de H&E, Azul de Toluidina e Alcian Blue são adequadas para o estudo dos ovários.

→Diante dos resultados obtidos neste trabalho abre-se um leque de questionamentos acerca dos efeitos da radiação UVB sobre a maturação dos ovários. Um próximo passo pode ser a investigação das alterações nas organelas citoplasmáticas através de microscopia eletrônica de transmissão e a caracterização das substâncias que estão sendo acumuladas por meio de imunohistoquímica.

7-FONTES DE PESQUISA

Adiyodi, R.G.; Subramoniam, T.; Arthropoda-Crustacea. In: Reproductive Biology of Invertebrate. (ed). Wiley; p. 443-481; 1983.

Alves, M. I. M. & Tomé, G. S.; Estudo sobre as gônadas da lagosta *Panilurus laevicauda* (Lart.); Arg. Est. Mar.; p.01-09; 1966.

Ammar, D.; Müller, Y. M. R.; Nazari, E. M.; Biologia reprodutiva de *Macrobrachium olfersi* (Wiegman) (Crustacea, Decapoda, Palaemonidae) coletados na ilha de Santa Catarina, Brasil. Revta Bras. Zool.; Vol. 18(2); p.529-537; 2001.

André, I. R. N.; Ferreira, N. J.; Conforte, J. C.; Análise do comportamento do ozônio estratosférico na América do sul e vizinhanças utilizando-se imagens do satélite nimbus7/toms; Anais XI SBSR; Belo Horizonte, Brasil; p. 1117-1124; 2003.

Bancroft Betsy A.; Baker Nick J.; Blaustein Andrew R.; Effects of UVB radiation on marine and freshwater organisms: a synthesis through meta-analysis; Ecology Letters; Vol. 10; p. 332-345; 2007.

Barreto, A. V.; Silva, J. R. F.; Katsuragawa, M.; Raposo, M. C. F.; Desenvolvimento dos ovários da lagosta *Panulirus echinatus* (Crustacea; Palinuridae) baseados nas análises macroscópica, microscópica e relação gonadossomática (RGS); Bras. Zool.; Vol. 25(4); p. 689-695; 2008a.

Barreto, L. V.; Silva, J.; Freitas, A. C. S.; Ferraz, J. V. B.; A camada de ozônio e as substâncias que a destroem; Centro Científico Conhecer; Goiânia; Enciclopédia Biosfera; Vol.6; p. 1-18; 2008.

Beçak, W. & Poullete, J.; Técnicas de citologia e histologia; Vol. 1; Editora S. A.;1976.

Brown, A. & Patlan, D.; Color changes in the ovaries of Penaeid shrimp as a determinant of their maturity; Marine Fisheries Review; Vol. 36; p.23-26; 1974.

Castiglioni, D. S.; Negreiros-Fransozo, M. L.; Greco, L. S. L.; Silveira, A. F.; Oliveira G.; Gonad development in females of fiddler crab *Uca rapax* (Crustacea, Brachyura, Ocypodidae) using macro and microscopic techniques; *Iheringia, Ser. Zool.*; Vol. 97; p. 505-510; 2007.

Castiglioni, D. S.; Oliveira, G. T.; Bond-Buckp, G.; Dinâmica do desenvolvimento das gônadas de *Parastacus varicosus* (Crustacea, Decapoda, Parastacidae); *Iheringia, Ser. Zool.*; Vol. 94; p.413-417; 2006.

Cunha, C. H.; A influência da ablação unilateral do pedúnculo ocular e da reprodução do camarão de água-doce *Macrobrachium achanturus* (Wiegmann, 1836) em cativeiro; Tese de mestrado apresentada ao programa de pós graduaçãoemZootecnia da UFRRJ; 2008.

Diffey, B.L.; Solar ultraviolet radiation effects on biological systems; *Rev. Phys. Med. Biol.*; 36(3); 299-328; 1991.

Diffey, B.L.; What is light? *Photoderm. Photoimmunol. Photomed.*; Vol. 18; 68-74; 2002.

Dumont, L. F. C. & D’Incao, F.; Estágios de desenvolvimento gonadal de fêmeas do camarão-barbaruça (*Artemesia longinaris* - Decapoda: Penaeidae); *Iheringia, Ser. Zool.*; Vol. 94; p. 389-393; 2004.

Fagundes, S.; Estudo dos aspectos estruturais da gônada masculinas nos diferentes etádios de desenvolvimento de *Macrobrachium potiuna* CRSUTACEA, DECAPODA, PALAEMONIDAE (MÜLLER, 1880). Trabalho apresentado no Centro de Ciências Biológicas- UFSC, para obtenção do título de especialista; 1992.

Favaro, L. F. & Chaves, P. T. C.; Aspectos morfológicos e citoquímicos da ovogênese de *Hypostomus of. Tietensis* (Loricariidae) do Lago Igapó I (Lonfrina, PR, rasil); *Acta Biol. Par.*; Vol. 28; p. 125-139; 1999.

Fyhn Unni E. H.; Costlow John D.; Histology and histochemistry of the ovary and oogenesis in *Balanus amphitrite* L. and *B.eburneus* gould (cirripedia, crustacea); *Biol. Bull.*; 152; 1977.

Häder, D.P.; Kumar, H.D.; Smith, R.C.; Worrest, R.C; Aquatic ecosystems: effects of solar ultraviolet radiation and interactions with other climatic change factors. *Photochem. Photobiol. Sci.*; 2: 39-50; 2003.

Jayawardane, P.A.T.; Mclusky, D.S.; Tytler, P.; Reproductive Biology of *Metapenaeus dobsoni* (Miers, 1878) from the Western Coastal Waters of Sri Lanka; *Asian Fisheries Science*; Vol. 16; p. 91-106; 2003.

Juchno, D. & Chybowski, L.; Histology analyses of gonad development in female spiny-cheek crayfish *Orchonectes limosus* Raf; *Arch. Pol. Fish.*; Vol. 11(1); p. 69-78; 2003.

Kao, H. C.; Chan, T. Y.; Yu, H. P.; Ovary Development of the Deep-water Shrimp *Aristaeomorpha foliacea* (Risso, 1826) (Crustacea: Decapoda: Aristeidae) from Taiwan; *Zoological Studies*; Vol. 38(4); p. 373-378; 1999.

Kazemiyan, M.; Histology Assesment of Ghost Crab's Ovary (*Ocypode saratan*) in Chabahar Bay; *Pakistan Journal of Biological Sciences*; Vol. 11(3); p. 404-409; 2008.

Kirchhoff, V. W. J. H.; Echer, E.; Leme, N. P.; Silva, A. A.; A Variação Sazonal da Radiação Ultravioleta Solar Biologicamente Ativa; *Brazilian Journal of Geophysics*, Vol. 18(1); p. 63-74; 2000.

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

Kulkarni, G. K.; Glade, L.; Fingerman, M.; Oogenesis and effects of neuroendocrine tissues on in vitro synthesis of protein by the ovary of the red swamp crayfish *Procambarus clarkia* (girard); *Journal of crustacean biology*; Vol. 11(4); p. 513-532; 1991.

Lewin, B.; genes VII; Porto Alegre; Artmed; p. 301; 2001.

Martins, J.; Ribeiro, K.; Ranguel-Figueiredo, T.; Coimbra, J.; Reproductive cycle, ovarian development, and vertebrate-type steroids profile in the freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii*; *Journal of crustacean biology*; Vol. 27(2); p. 220–228; 2007.

Martinz, L. C.; Rosa, R. D.; Rivero, L. D.; Nazari, E. M.; Müller, Y. M R.; Ação do detergente doméstico na biologia reprodutiva do camarão de água doce *Macrobrachium olfersi*; J. Bras.Soc. Ecotoxicol; Vol. 1; p.79-82; 2006.

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

Mossolin, E. C. & Bueno, S. L. S.; Reproductive biology of *Macrobrachium olfersi* (Decapoda, Palaemonidae) in São Sebastião, Brasil; Journal of crustacean biology; Vol. 22; p. 367-376; 2002.

Moura, K. R. S.; Estudo morfofuncional da glândula salivar de *Bionphalaria straminea* (Mollusca, Planorbidae). Tese de Doutorado apresentada ao Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo-USP; 2001.

Mouret, S.; Charveron, M.; Farvier, A.; Cadet J.; Douki, T.; Differential repair of UVB-induced cyclobutane pyrimidine dimers in cultured human skin cells and whole human skin. DNA repair 7; 2008.

Müller, Y. M. R.; Pacheco, C.; Simões-Costa, M. S.; Ammar, D.; Nazari, E. M.; Morphology and cronology of embryonic development in *Macrobrachium acanthurus* (Crustacea, Decapoda). Invertebrate Reproduction and Development; Vol. 50; p. 67-74; 2007.

Najmudeen, T. M.; Ultrastructural studies of oogenesis in the variable abalone *Haliotis varia* (Vetigastropoda: Haliotidae); Aquat Biol; Vol.2; p. 143–151; 2008.

Nazari, E. M.; Bainy, C. D.; Ammar, D.; Müller, Y. M. R.; Ovarian staging in eyestalk ablated females of *Farfantepenaeus paulensis*: A histology, morphometric, and Biochemical analysis; Journal of crustacean biology; Vol. 27 (2); p.296-303; 2007.

Okuno, E. & Vilela, M. A. C.; Radiação ultravioleta: Características e efeitos; (ed.) livraria da física; p. 36; 2005.

Othomi, J.; Yamamoto, S.; Koshio, S.; Ovarian maturation and spawning of the deep-water mud shrimp *Solenocera melantho* de man, 1907 (Decapoda, Penaeoidea, Solenoceridae) in Kagoshima Bay, Southern Japan; Crustaceana; Vol. 67; p. 673-685; 1998.

Pacheco, C.; Estudo das gônadas femininas do camarão água-doce *Macrobrachium olfersi* (Decapoda, Palaemonidae); Trabalho de conclusão de curso apresentada ao Centro de Ciências Biológicas na UFSC; 1997.

Pauhraj, A.; Peixoto, S.; Vasmmathi, C.; Altaff, K.; Ovarian histology of stunted pond-reared *Macrobrachium rosebergii* females; Aquaculture Research; Vol. 39; p. 64-69; 2008.

Peixoto, S.; Cavalli, R. O.; D'Incao, F.; Milach, Â. M.; Wasieleski, W.; Ovarian of wild *Farfantepenaeus paulensis* in relation to histology and visual changes; Aquaculture; Vol. 34; p. 1255-1260; 2003.

Poprawa, I.; The ovary structure, previtellogenic and vitellogenic stages in parthenogenetic species *Dactylobiotus dispar* (Murray, 1907) (Tardigrada: Eutardigrada); Tissue and Cell; Vol. 37, p. 385–392; 2005.

Pradeille-Rouquette, M.; Étude de la fonction de reproduction chez les femelles du crab, *Pachygrapsus marmoratus* (F.) et de différents facteurs qui lui sont liés; Cah. Biol. Mar.; 17: 387-403; 1976.

Purificação, M.; Ação da ablação do pedúnculo óptico sobre a reprodução de *Macrobrachium olfersi* (Wiegmann, 1836) (Decapoda, Palaemonidae); Trabalho de conclusão de curso apresentada ao Centro de Ciências Biológicas na UFSC; 2006.

Quintero, M. E. S. & Gracia, A.; Stages of gonadal development in the spotted Pink shrimp *Peneaus brasiliensis*; Journal of crustacean biology; Vol. 18; p.680-685; 1998.

Ribeiro, K.; Aspectos estruturais do hepatopâncreas, desenvolvimento ovocitário e caracterização hormonal de fêmeas de *Macrobrachium amazonicum* durante as fases de maturação gonadal; Tese de Doutorado apresentada ao Centro de Aquicultura da UNESP; 2006.

Rodriguez, L. P. & Querol, E.; Braccini, M. C.; Descrição morfo-histológica do ovário de *Acestrorhynchus pantaneiro* (Menezes, 1992) (Teleostei, Characidae) em seus diferentes estágios de desenvolvimento, na Bacia do rio Uruguai médio Uruguiaia, Rs; Biodiversidade Pampeana, PUCRS, Uruguiaiana; Vol. 3; p.11-18; 2005.

Sampaio, C. M. S.; Silva, R. R.; Santos, J. A.; Sales S. P.; Reproductive cycle of *Macrobrachium amazonicum* females (Crustacea, Palaemonidae); Braz. J. Biol.; Vol. 67; p. 551-559; 2007.

Santana, I. C. H.; Estudo Morfológico do Sistema Reprodutor Feminino do Camarão *Farfantepenaeus subtilis* (Pérez-Farfante, 1967), do Litoral Cearense; Tese de mestrado apresentada ao Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo – USP; 2005.

Santos, C. M.; Lima, G. V.; Nascimento, A. A.; Sales, A.; Oshiro, L. M. Y.; Histological and histoquimical analysis of the gonadal development of males and females of *Armases rubripes* (Rathbun1897) (Crustacea, rachyura, Sesarmidae); Braz. J. Biol.; Vol. 69(1); p. 161-169; 2009.

Santos, J. L.; Severino-Rodrigues, E.; Vaz-dos-Santos, A.; Estrutura populacional do Camarão-Branco *Litopenaeus schmitti* nas regiões estuarina e marinha da Baixada Santista, São Paulo Brasil; B. Inst. Pesca; Vol. 34(3); p. 375 – 389; 2008.

Schuld, M.; El ovário de *Palaemonetes argentinus* Nobili, 1901 (Crustacea Palaemonidae). Su corpotamiento entre puesta y puesta. Un enfoque estereometrico; Limnobios; Vol. 2; p. 155-162; 1980.

Schuld, M.; Evolucion de la celula sexual feminina de *Palaemonetes argentinus* nobili, 1991 (Crustacea, Palaemonidae) durante la oogenesis. Limnobios; Vol. 1; p. 461-469; 1980a.

Serrano-Pinto, V.; Vazquez-Boucard, C.; Villarreal-Colmenares, H.; Yolk proteins during ovary and egg development of mature female freshwater crayfish (*Cherax quadricarinatus*); Comparative Biochemistry and Physiology Part A; Vol. 134; p. 33-43; 2003.

Simões-Costa M.S.; Pacheco C.; Nazari E.M.; Müller Y.M.R.; Ammar D. Estagiamento de embriões de *Macrobrachium olfersi* (Wiegman) (Crustacea, Palaemonidae) através de critérios morfológicos nos dias embrionários. Bras Zool; Vol. 22; p. 501-508; 2005.

Souza, T. M.; Efeito da exposição prolongada á luz sobre a reprodução do camarão de água doce *Macrobrachium olfersi* (Wiegmann, 1836) (Decapoda, Palaemonidae). Trabalho de conclusão de curso apresentada ao Centro de Ciências Biológicas na UFSC; 2005.

Tan-Fermin, J. D. & Pundera, R. A.; Ovarian maturation stages of the wild giant Tiger prawn, *Penaeus monodon* Fabricius; Aquaculture; Vol. 77; p. 229-242; 1989.

Tsilimigaki, S. I.; Messini-Nikolaki, N.; Kanariou, M.; Piperakis, S. M.; A study on the effects of seasonal solar radiation on exposed populations, Mutagenesis; Vol. 18 (2); p.139-143; 2003.

Verdi, A. C.; Estrutura ovárica de *Macrobrachium borellii* (NOBILI, 1896) (Crustacea, Caridea, Palaemonidae); Ver. Brasil. Biol.; Vol. 55(2); p. 193-199; 1995.