



DAIANA DA SILVA CASTIGLIONI

**Biologia reprodutiva do lagostim *Parastacus varicosus*
Faxon, 1898 (Decapoda: Parastacidae)
da Bacia do Rio Gravataí, Rio Grande do Sul**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal,
Instituto de Biociências da Universidade Federal do Rio Grande do Sul,
como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Biologia Animal.

Área de Concentração: Biologia e Comportamento Animal

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Georgina Bond Backup

Co-orientadora: Prof^a. Dr^a. Guendalina Turcato de Oliveira

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

Porto Alegre

2006

Biologia reprodutiva do lagostim *Parastacus varicosus*
Faxon, 1898 (Decapoda: Parastacidae)
da Bacia do Rio Gravataí, Rio Grande do Sul

Daiana da Silva Castiglioni

Dissertação aprovada em _____

Prof^ª. Dr^ª. Roselis Silveira Martins da Silva

Prof. Dr. Sandro Santos

Prof^ª. Dr^ª. Clarice Bernhardt Fialho

Agradecimentos

Agradeço:

A Prof^a. Dr^a. Georgina Bond Buckup que além de transmitir seus conhecimentos também me transmitiu sua experiência e entusiasmo pela vida acadêmica. Agradeço pela orientação, carinho, amizade e por fazer acreditar que tudo é possível basta ter persistência.

A Prof. Dr. Ludwig Buckup, meu grande amigo, por toda sua sabedoria, amizade, carinho e principalmente pela ajuda com o material fotográfico. Agradeço também pelos momentos descontraídos quando me chamava de “corujinha”.

A Prof^a. Dr^a. Laura López Greco, da Universidade de Bueno Aires, por toda atenção e ajuda na análise do artigo de descrição das gônadas.

Ao senhor Jorge Becker e esposa pela cedência das dependências para as amostragens e por todo auxílio. Obrigada por tudo!

A todos os meus colegas de laboratório que de uma maneira ou de outra sempre me ajudaram, principalmente ao “motora” Raoní. Agradeço do fundo do meu coração.

A Clarissa Noro por toda ajuda e atenção durante a realização do projeto. Muito obrigada!

As colegas e amigas Aline Quadros e Carolina Sokolowicz por todo apoio e incentivo durante a realização desta pesquisa.

Aos motoristas da Biociências que sempre me auxiliaram nas coletas.

Ao laboratório de Fisiologia Animal da PUCRS pela permissão da realização das análises bioquímicas.

A Bibiana Kaiser Dutra pela ajuda durante a análise bioquímica realizada no laboratório de Fisiologia Animal da PUCRS.

Ao PPG-Biologia Animal, especialmente a Comissão Coordenadora, por toda ajuda durante a realização do projeto.

À CNPq pela bolsa de mestrado.

Agradecimentos especiais

Agradeço:

A Deus, que mais importante que o lugar que ocupa em nós é a intensidade de sua presença em tudo o que fizemos.

Aos meus pais, que mesmo distante, compartilharam e alimentaram meus ideais; sou eternamente grata por todo apoio, incentivo, carinho e amizade. Eles são tudo em minha vida.

A minha mana, Daniela Castiglioni, que além de irmã é minha colega de trabalho, sempre me ajudou nas horas que mais precisei. Admiro sua determinação e talento. Muito obrigada por abrir o caminho à vida de carcinóloga.

A todos os meus familiares, que mesmo distante, estavam sempre torcendo pelo meu desempenho e sucesso. Muito obrigada!

A Daniela Barcelos, amiga, colega, companheira e, também uma “maninha”, agradeço por toda ajuda, carinho, amizade, respeito, cumplicidade e, por toda força nos momentos mais difíceis. Obrigada Danizita por fazer minha vida mais feliz.

As amigonas Andria Callegaro e Fátima López quero agradecer pelo apoio e incentivo. Obrigada por tudo e por entender a minha ausência em vários momentos.

“Lutar sempre...

Vencer talvez...

Desistir nunca...”

Considerações

A dissertação está composta na forma de três artigos científicos seguindo a resolução nº 4 do manual do Pós-Graduação em Biologia Animal da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

Os artigos estão formatados nas normas de cada revista, a qual serão submetidos após as sugestões da banca examinadora.

Sumário

1. Resumo.....	2
2. Introdução.....	3
3. Objetivos.....	13
4. Materiais e Métodos.....	14
5. Referências Bibliográficas.....	19
6. Artigo I: Caracterização do padrão sexual de <i>Parastacus varicosus</i> Faxon, 1898(Crustacea: Decapoda, Parastacidae): análise macroscópica e microscópica das gônadas	29
7. Artigo II: Dinâmica do desenvolvimento das gônadas de <i>Parastacus varicosus</i> Faxon, 1898 (Crustacea, Decapoda, Parastacidae)	51
8. Artigo III: Variações sazonais do metabolismo intermediário de <i>Parastacus varicosus</i> Faxon, 1898 (Crustacea, Decapoda, Parastacidae).....	72
9. Conclusão geral.....	108
10. Anexos.....	109

Resumo

Considerando à lacuna sobre as informações da biologia reprodutiva dos crustáceos de água doce no Brasil, principalmente dos lagostins, a presente pesquisa teve como objetivo caracterizar aspectos da dinâmica da reprodução, como a descrição e desenvolvimento das gônadas, e analisar as variações bioquímicas do metabolismo intermediário de *Parastacus varicosus* Faxon, 1898 para relacioná-las ao período reprodutivo. Os animais foram amostrados de junho de 2004 a maio de 2005 em um arroio pertencente à Bacia do Rio Gravataí, localidade Cova do Touro, Gravataí, Rio Grande do Sul. As fêmeas foram separadas em três estágios gonadais de acordo com a maturação. Todos animais apresentaram os dois pares de aberturas e dutos genitais. Foram identificados histologicamente 40 machos, 32 fêmeas e 6 espécimes transicionais. Os índices gonadossomático (IG) e hepatossomático (IH) foram determinados. Ocorreu um aumento do IG e uma diminuição no IH, no período de passagem da primavera para o verão, indicando uma maior atividade reprodutiva no verão e uma possível transferência das reservas do hepatopâncreas para a gônada nesse período. Nas análises bioquímicas da hemolinfa, hepatopâncreas, músculo e gônadas os níveis de glicose, glicogênio, proteínas totais, colesterol e lipídeos totais foram quantificados. As variações sazonais observadas mostraram estar relacionada com o período reprodutivo, mostrando uma transferência de parte das reservas energéticas do hepatopâncreas e do músculo para o desenvolvimento das gônadas durante período reprodutivo. Nessa pesquisa portanto foi observada uma correlação entre os resultados obtidos das investigações das gônadas e das análises bioquímicas indicando assim uma conexão entre essas pesquisas e contribuindo para um melhor entendimento da biologia reprodutiva de *P. varicosus*.

Introdução

Os lagostins de água doce estão reunidos na infraordem Astacidea, a qual inclui três superfamílias, Nephropoidea Dana, 1852 com representantes marinhos; Astacoidea De Haan, 1841, com as famílias Astacidae e Cambaridae, que reúnem os lagostins do hemisfério norte; e Parastacoidea Huxley, 1879 representada pela família Parastacidae Huxley, 1879. A família Parastacidae compreende 14 gêneros e 129 espécies distribuídos pela Austrália, Tasmânia, Nova Zelândia, Madagascar e América do Sul, sendo que a maior parte das espécies ocorre na região australiana (BUCKUP 1999).

A família Parastacidae, que reúne os lagostins do hemisfério sul, é representada na América do Sul pelos gêneros *Parastacus* Huxley, 1879, *Samastacus* Riek, 1971 e *Virilastacus* Hobbs, 1991. No Brasil há registro apenas para o gênero *Parastacus* o qual pode ser encontrado em ambientes límnicos das planícies, preferencialmente em áreas pantanosas e em águas lóxicas de pequeno volume e correnteza fraca (BUCKUP & ROSSI 1980, FRIES 1980; FONTOURA & BUCKUP 1989a,b).

A maioria das espécies constrói habitações subterrâneas em forma de túneis simples ou ramificados que se ligam ao nível do lençol freático e apresentam uma ou mais aberturas na superfície do solo. Possuem hábitos noturnos, deixando suas habitações subterrâneas em busca de alimento no interior da água ou nos ambientes mais próximos; alimentam-se de matéria orgânica, viva ou morta, tanto de origem vegetal como animal (FRIES 1980, FONTOURA & BUCKUP 1989b, BUCKUP 1999).

Algumas pesquisas foram desenvolvidas com os parastacídeos no Brasil como BUCKUP & ROSSI (1980) que realizaram uma revisão taxonômica do gênero *Parastacus*.

Aspectos biológicos e ecológicos das espécies de *Parastacus* no Rio Grande do Sul foram destacados em BUCKUP (1999) e alguns aspectos da biologia populacional e reprodutiva de *Parastacus brasiliensis* (von Martens, 1869) foram analisados por FRIES (1980) e FONTOURA & BUCKUP (1989 a,b).

A posição filogenética dos lagostins de água doce sul americanos com relação aos gêneros australianos foi investigada por CRANDAL *et al.* (2000). Esses autores verificaram que os gêneros da América do Sul formam um grupo monofilético e estão relacionados com os gêneros australianos *Paranephrops* e *Parastacoides*.

Com relação à biologia de *Parastacus varicosus* Faxon, 1898, objeto da presente investigação, não há nenhuma pesquisa desenvolvida no Brasil. Entretanto, algumas informações foram obtidas com esta espécie no Uruguai por AMESTOY (1983), onde verificou o número de ovos, sobrevivência e cuidado parental. AMESTOY & ISASMENDI (1984) analisaram o crescimento e a mortalidade desta mesma população.

O lagostim *P. varicosus* é encontrado nos ambientes límnicos, em águas lênticas e lóticas de pequeno volume e correnteza fraca, ocultando-se sob detritos nos remansos dos arroios ou entre as raízes da vegetação ciliar, construindo suas galerias nas margens ou no fundo do leito dos cursos d'água. Esta espécie ocorre no Uruguai, Argentina e Brasil, sendo que nesse último com uma ocorrência restrita a determinadas localidades nos estados de Santa Catarina e Rio Grande do Sul (BUCKUP 1999).

Biologia reprodutiva

Nos lagostins do hemisfério norte, representado pelas famílias Astacidae e Cambaridea, o principal caráter do dimorfismo sexual externo é a forma dos pleópodos, pois apresentam os pleópodos do primeiro somito abdominal, os quais são vestigiais nas fêmeas e modificados em órgãos copulatórios nos machos. Esses animais possuem dois pares de aberturas genitais, o par feminino localizado no coxopodito do pereiópodo 3 e o par masculino localizado no pereiópodo 5 (HOLDICH & REEVE 1988). Ao contrário dos lagostins das famílias Astacidae e Cambaridae, os lagostins do hemisfério sul, representado pela família Parastacidae, tanto machos como fêmeas não apresentam pleópodos no primeiro somito abdominal, nem mesmo vestigiais (HOLWITZ 1988).

Os lagostins do gênero *Parastacus* também apresentam, em ambos os sexos, uma abertura genital masculina no coxopodito do pereiópodo 5 e uma abertura genital feminina no coxopodito do pereiópodo 3 mesmo indivíduo. Segundo ALMEIDA & BUCKUP (1999) indivíduos com aberturas anteriores totalmente obstruídas podem ser fêmeas imaturas enquanto que indivíduos com as mesmas aberturas parcialmente ou totalmente desobstruídas, fêmeas sexualmente maduras. Portanto o sexo somente é confirmado pela análise histológica das gônadas. Esses animais apresentam também os dois pares de dutos genitais, o par de oviduto conectado a abertura genital feminina e o par de vaso deferente conectado a abertura genital masculina.

A diferenciação sexual nos lagostins como nas demais espécies dos crustáceos malacostracos é controlada pela presença ou ausência do hormônio androgênico, que atua no aparelho sexual masculino e no surgimento dos caracteres sexuais secundários. No entanto, nas fêmeas não ocorre o desenvolvimento da glândula androgênica, então na

ausência do hormônio androgênico o aparelho reprodutor feminino se diferencia espontaneamente (HASEGAWA *et al.* 1993). Estudos revelam que os genes determinantes do sexo masculino controlam o desenvolvimento das glândulas androgênicas e os genes determinantes do sexo feminino são responsáveis pelo não desenvolvimento destas glândulas (CHARNIAUX-COTTON & PAYEN 1985).

A intersexualidade é um fenômeno caracterizado pela presença de características masculinas e femininas em um mesmo indivíduo de uma espécie gonocórica, protândrica ou protogênica. Essas características podem estar limitadas à morfologia externa ou podem se estender à diferenciação das gônadas (SAGI *et al.* 1996, KHALAILA & SAGI 1997).

A intersexualidade foi observada por VON MARTENS (1869) em *Parastacus brasiliensis* e *Parastacus pilimanus* (von Martens, 1869); por FAXON (1898) em *Parastacus varicosus*, *Parastacus saffordi* Faxon, 1898 e *Parastacus defossus* Faxon, 1898; e em *Parastacus pugnax* (Poepfig, 1835) por LONÑBERG (1898). Esse fenômeno tem sido documentado em outros parastacídeos como em espécies dos gêneros australianos *Cherax* Erichson, 1846 (SOKOL 1988, MEDLEY & ROUSE 1993, SAGI *et al.* 1996, KHALAILA & SAGI 1997) *Engaeus* Erichson, 1846 e *Engaewa* Riek, 1967 (HORWITZ 1988) e no gênero chileno *Samastacus* (RUDOLPH 1995a, 1999, 2002).

A intersexualidade pode estar associada ao hermafroditismo, o qual é caracterizado como a capacidade de um conjunto de genes de proporcionar a formação de gametas de ambos os sexos. O hermafroditismo pode ser simultâneo, o qual se caracteriza pela presença de gônadas de ambos os sexos no mesmo indivíduo simultaneamente ou pode ser seqüencial, sendo caracterizado pela presença de gônadas de ambos os sexos no mesmo indivíduo em diferentes momentos de sua vida, podendo ser de dois tipos: a protândria e a protoginia. Quando o primeiro sexo é o feminino a condição é chamada de protoginia e

quando o primeiro sexo é o masculino a condição denomina-se protandria (GHISELIN 1969, WARNER 1975).

O hermafroditismo seqüencial protândrico pode ser “completo” quando todos os membros de uma população, em algumas espécies, se reproduzem primeiramente como machos e, com o aumento da idade e tamanho se tornam fêmeas; em outras espécies, nem todos os indivíduos são mutantes de sexo, uma variável proporção da população é constituída por fêmeas primárias, que não apresentam caracteres masculinos e se reproduzem somente como fêmeas. No hermafroditismo protândrico “parcial” quando alguns machos trocam de sexo, porém outros se reproduzem como machos durante toda a sua vida, sendo chamados de machos primários; também pode ocorrer a presença de fêmeas primárias nas populações (BAUER 1986).

Para caracterizar a evolução do hermafroditismo nos animais GHISELIN (1969) propôs três modelos teóricos: *low density model*, *size advantage model* e *gene dispersal model*. O *low density model* vem sendo aplicado na caracterização da evolução do hermafroditismo simultâneo. Em um animal que apresenta características que reduzam suas oportunidades de cópula, a probabilidade de encontrar um membro conspecífico que não seja do sexo oposto é muito alta, portanto nessas espécies o hermafroditismo simultâneo garantiria a possibilidade de cópula a cada encontro.

O *size advantage model* e o *gene dispersal model* são utilizados na caracterização da evolução do hermafroditismo seqüencial. O primeiro está relacionado ao sucesso reprodutivo alcançado por animais de um determinado tamanho e o *gene dispersal model* está baseado nas implicações que a dispersão possa causar com alterações na estrutura populacional de uma determinada espécie.

O hermafroditismo simultâneo é comum em crustáceos, como nos cefalocarídeos, nas formas sésseis, como as cracas e lepas (CHARNIAUX-COTOON & PAYEN 1985) e, tendo sido observado em camarões do gênero *Lysmata*. Enquanto o hermafroditismo seqüencial foi constatado em isópodos, tanaidáceos, cracas, anfípodos, camarões, lagostins, talassinídeos e tatuíras (BROOK 1994).

Dentre as pesquisas realizadas sobre a biologia reprodutiva das espécies de *Parastacus* destacam-se as desenvolvidas por RUDOLPH (1995b), no Chile, com *P. nicoteli*, o qual observou a presença de fêmeas primárias e hermafroditas protândricos. No entanto, em uma população de *P. pugnax*, do Chile, RUDOLPH (1997) verificou apenas a presença de indivíduos intersexuados. O mesmo foi observado em uma população de *P. varicosus*, no Uruguai (RUDOLPH *et al.* 2001).

No Brasil, quanto à biologia reprodutiva dos lagostins, somente duas espécies foram pesquisadas *P. brasiliensis* e *P. defossus* por ALMEIDA & BUCKUP (1997, 1999, 2000). Em *P. brasiliensis* foi documentada a ocorrência de hermafroditismo protândrico, pois foram encontrados espécimes com células femininas e masculinas no mesmo indivíduo. Em *P. defossus*, foi observado apenas um espécime portador de células femininas e masculinas.

Aspectos do metabolismo intermediário

As pesquisas do metabolismo intermediário em crustáceos têm demonstrado grande variabilidade inter e intra-específica, o que torna difícil a determinação de um perfil metabólico padrão. A variabilidade pode ser atribuída a vários fatores, podendo se destacar o habitat (terrestre, marinho, estuarino ou de água doce), estágio do ciclo de muda, maturidade sexual (especialmente em fêmeas), alimentação, dieta oferecida e sazonalidade de parâmetros abióticos visto que estes determinam um padrão diferencial de resposta

metabólica que se manifestará em mudanças fisiológicas, ecológicas e comportamentais (CHANG & O'CONNOR 1983, KUCHARSKI & DA SILVA 1991, ROSA & NUNES 2003b; OLIVEIRA *et al.* 2003).

Algumas modificações bioquímicas observadas na dinâmica e nos níveis de lipídios totais durante o ciclo reprodutivo principalmente, no tecido das gônadas e hepatossomático foram analisadas em algumas espécies de crustáceos braquiúros (PILLAY & NAIR, 1973) e em camarões (READ & CAULTON 1980, CASTILLE & LAWRENCE 1989, ROSA & NUNES 2003a). GIBSON & BARKER (1979) verificaram em Decapoda, um aumento do índice gonadossomático e uma diminuição no índice hepatossomático ao longo do ano. ROSA & NUNES (2003a) analisaram em duas espécies de camarões e uma espécie de lagosta que as reservas orgânicas do hepatopâncreas seriam mobilizadas para o desenvolvimento do ovário.

O índice gonadossomático tem sido utilizado para determinar a sazonalidade dos ciclos reprodutivos das espécies (GRANT & TYLER 1983) e padronizar o peso das gônadas para avaliar seus estágios de desenvolvimento. O índice hepatossomático vem sendo aplicado para verificar a relação de transferências das reservas do hepatopâncreas para a gônada durante o período de maturação, pois segundo GIBSON & BARKER (1979) o hepatopâncreas é identificado como o maior centro de reservas orgânicas e inorgânicas em crustáceos decápodos. Esses índices, em investigações da biologia reprodutiva, constituem uma importante ferramenta na interpretação de mudanças biológicas durante o ciclo reprodutivo e vem sendo aplicados em pesquisas bioquímicas do metabolismo intermediário.

Em crustáceos as concentrações de lipídios são bastante elevadas, apesar de não existir um tecido adiposo diferenciado, os principais locais de armazenamento de lipídios

são o músculo e o hepatopâncreas (O'CONNOR & GILBERT 1968, CHANG & O'CONNOR 1983, HERREID & FULL 1988, KUCHARSKI & DA SILVA 1991a). HERREID & FULL (1988) verificaram que os níveis de lipídios no hepatopâncreas de braquiúros excediam em dez vezes os níveis de glicogênio. Diversos estudos têm demonstrado que durante períodos de grande demanda energética, como a muda e a gametogênese, ocorre uma marcante mobilização de lipídios, principalmente aqueles presentes no hepatopâncreas. No caranguejo *Chasmagnathus granulata*, foi evidenciada uma variação sazonal dos níveis de lipídios musculares, sendo estes mais elevados no verão, porém os níveis de lipídios totais no hepatopâncreas somente diminuem no período reprodutivo (KUCHARSKI & DA SILVA 1991a).

ROSA & NUNES (2003b) estudando *Aristeus antennatus* (Risso, 1816), *Parapenaeus longirostris* (Lucas, 1846) e *Nephrops norvegicus* (Linnaeus, 1758), da costa de Portugal, verificaram um aumento marcante dos níveis de lipídios totais e de colesterol no tecido das gônadas, estando este aumento correlacionado com o grau de maturação dos ovários. Neste mesmo estudo, os autores constataram, através da determinação do índice hepatossomático e gonadossomático, que o aumento do conteúdo de lipídios totais e de colesterol nos ovários não estava correlacionado a uma diminuição da reserva de gordura no tecido hepatossomático, sugerindo assim a dieta como fonte de lipídios e o tecido muscular como fonte de colesterol para o desenvolvimento ovariano.

O músculo parece ser a principal fonte de proteínas nos crustáceos e, em decápodos os níveis de aminoácidos livres nos tecidos atingem valores dez vezes superiores que aqueles encontrados em vertebrados. Diversos trabalhos sugerem que estes aminoácidos estariam envolvidos nos processos de osmorregulação, estando principalmente ligados ao controle do volume celular (GILLES 1982, CHANG & O'CONNOR 1983). Alguns estudos

mostram uma variação no conteúdo de proteínas durante o desenvolvimento ovariano de crustáceos, podendo resultar de um aumento na biossíntese de várias proteínas incluindo, hormônios, enzimas e lipoproteínas envolvidas com a maturação das gônadas (ROSA & NUNES 2003a, YEHEZKEL *et al.* 2000).

Os principais tecidos de reserva de glicogênio em crustáceos são o músculo, o hepatopâncreas, as brânquias e os hemócitos, porém o local de armazenamento deste polissacarídeo varia conforme a espécie (JOHNSTON & DAVIES, 1972, HERREID & FULL 1988, PARVATHY 1971). O glicogênio armazenado é utilizado nos processos de muda, hipóxia e/ou anoxia, osmorregulação, crescimento, diferentes estágios de reprodução e durante períodos de jejum (CHANG & O'CONNOR 1983, KUCHARSKI & DA SILVA 1991a, KUCHARSKI & DA SILVA 1991b, ROSA & NUNES 2003a, OLIVEIRA *et al.* 2001 2004).

A ausência de um depósito central de glicogênio parece ser, segundo HOCHACHKA & SOMERO (1984), uma adaptação de várias classes de animais a mudanças nos fatores ambientais. NERY & SANTOS (1993) sugerem que esta independência em relação aos depósitos centrais de glicose seria muito importante em animais de circulação aberta, já que seu fluxo sanguíneo é lento e se dá sob baixa pressão, o que conduziria a uma distribuição menos efetiva da glicose para os tecidos.

O metabolismo intermediário, em crustáceos de água doce é pouco estudado, onde se destacam as pesquisas desenvolvidas com eglídeos no Brasil por OLIVEIRA *et al.* (2003) onde observaram as variações circadianas e sazonais no metabolismo de carboidratos em *Aegla ligulata* Bond-Buckup & Buckup (1994) e verificaram um aumento na concentração de glicose na hemolinfa, especialmente na primavera, com diferenças circadianas entre machos e fêmeas, relacionadas com o período reprodutivo da espécie.

O perfil metabólico de *Aegla platensis* Schmitt, 1942 submetidas a dietas ricas em carboidratos ou proteínas foi pesquisada por FERREIRA *et al.* (2005) onde concluíram que o aporte regular de alimento, bem como o tipo de dieta administrado determinou um perfil diferenciado de resposta metabólica entre os sexos e o período de realização dos experimentos (inverno e verão). O efeito de diferentes níveis de lipídeos em dietas artificiais oferecidas ao lagostim Parastacidae *Cherax quadricarinatus* von Martens, 1868 foi pesquisado por HERNANDEZ *et al.* (2003). Esses autores concluíram que machos investem as reservas de lipídeos no crescimento, enquanto a utilização das reservas das fêmeas concentram-se no desenvolvimento das gônadas e na vitelogênese.

Constata-se que as espécies do gênero *Parastacus* são pouco investigadas permanecendo uma lacuna sobre a biologia reprodutiva, principalmente sobre aspectos histológicos e bioquímicos. Pretende-se, portanto, com a descrição e as observações sobre a dinâmica do desenvolvimento das gônadas, juntamente com as análises bioquímicas do metabolismo intermediário de *Parastacus varicosus* fornecer subsídios para o entendimento da biologia reprodutiva dessa espécie.

Objetivo geral

O objetivo da pesquisa foi investigar os aspectos da biologia reprodutiva do lagostim de água doce *Parastacus varicosus* amostrados na Bacia do rio Gravataí, localidade Cova do Touro, Gravataí, Rio Grande do Sul, Brasil (29°52'34''S e 51°0'52''W).

Objetivos específicos

1. Caracterizar o padrão sexual de *P. varicosus* com a descrição das gônadas;
2. Caracterizar o desenvolvimento das gônadas;
3. Analisar as variações bioquímicas na hemolinfa, hepatopâncreas, músculo e gônadas;
4. Correlacionar os resultados das análises bioquímicas com os dados obtidos da histologia e índices gonadossomático e hepatossomático;

Materiais e Métodos

Amostras mensais de *Parastacus varicosus* foram realizadas no período de junho de 2004 a maio de 2005, em uma propriedade particular na localidade Cova do Touro, município de Gravataí, Rio Grande do Sul (29°52'34''S e 51°0'52''W). Nesse local há tanques para criação de peixes e no fundo do terreno da propriedade há um arroio pertencente à bacia do rio Gravataí.

Os espécimes foram coletados com armadilhas com iscas de fígado, com puçá e, ainda com uma bomba de sucção (Figura 1). As armadilhas foram colocadas nos tanques e no arroio e retiradas após dois dias. Em campo as amostras de hemolinfa foram obtidas, com seringas contendo oxalato de potássio a 10% (anticoagulante), das articulações dos pereiópodos dos animais sendo acondicionadas em caixa de isopor com gelo. Os animais foram então, transportados em banho de gelo até o Laboratório de Carcinologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

Em laboratório os animais foram analisados em relação à aparência dos poros genitais para verificar o sexo, segundo sugerido por ALMEIDA & BUCKUP (1999). Os animais foram pesados em uma balança eletrônica (BEL SSR600/ precisão de 0,001g) e mensurados com um paquímetro digital (precisão de 0,01 mm) quanto ao comprimento do cefalotórax (Figura 2).

O hepatopâncreas, os músculos do abdômen e as gônadas foram retirados. Parte do tecido das gônadas foi destinada para análise histológica, sendo que o restante das gônadas, o hepatopâncreas, os músculos e as amostras de hemolinfa foram congelados a temperatura

de -80°C para análise bioquímica. Somente as gônadas das fêmeas foram utilizadas para a análise fisiológica.

Com a finalidade de caracterizar o habitat do lagostim e possível variação sazonal, foram registrados alguns parâmetros como temperatura da água, pH e teor de oxigênio dissolvido. A temperatura da água foi obtida com termômetro de escala interna ($0-100^{\circ}\text{C}$), o pH com um medidor portátil (Quimis/400H) e o oxigênio dissolvido com auxílio de um termo-oxímetro portátil (OXI 330/SET-WTW).

Análise das gônadas

As gônadas foram extraídas dos animais, pesadas em balança eletrônica (BEL SSR600/ precisão de 0,001g) e analisadas macroscopicamente, quanto à coloração.

O índice gonadossomático (IG) foi calculado para cada animal pela seguinte equação (GRANT & TYLER 1983, VAZZOLER 1996):

$$\text{IG} = (\text{PG}/\text{PA}) \times 100$$

onde,

PG = peso da gônada

PA = peso do animal.

O índice hepatossomático (IH) foi calculado, da mesma forma que o índice gonadossomático, porém usando o peso do hepatopâncreas ao invés do peso da gônada:

$$\text{IH} = (\text{PH}/\text{PA}) \times 100$$

onde,

PH = peso do hepatopâncreas

PA = peso do animal.

Histologia das gônadas

As gônadas foram extraídas e fixadas em Bouin ou Dubosq durante 4 horas para que a morfologia e composição dos tecidos fossem preservadas. Em seguida foram desidratadas em etanol 70%, 80%, 90%, 95% e 100%, por um período de 30 minutos em cada concentração, sendo que a última desidratação, em álcool 100%, foi realizada duas vezes.

As gônadas foram diafanizadas em xilol, por 15 minutos e impregnadas em parafina onde foram realizados dois banhos de 1 hora e um último para a inclusão. Após esses procedimentos foram realizados cortes no material de 7 µm no micrótomo manual LEICA RM 214S.

As lâminas foram mantidas na estufa a 60°C por, aproximadamente, 72 horas e, em seguida foram coradas em hematoxilina e eosina (modificado de BEHMER *et al.*, 1976). No processo de coloração seguiram-se as seguintes etapas: xilol (8 minutos), série alcoólica de 100%, 95%, 90%, 80% e 70% (1 minuto em cada concentração), água destilada (5 minutos), hematoxilina (2 minutos), água corrente (20 minutos), eosina (2 minutos) e duas vezes no xilol (4 minutos). Após a coloração as lâminas foram analisadas ao microscópio óptico (ver tabela I).

Análises Bioquímicas

Os métodos utilizados nas análises bioquímicas apoiaram-se em métodos espectrofotométricos já padronizados para outros crustáceos no laboratório de Fisiologia Animal da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul.

Determinações na hemolinfa

Os níveis de glicose foram quantificados através do método da glicose oxidase com emprego do kit da Bioclin (glicose GOD-CLIN). Os resultados foram expressos em mg/dl.

As proteínas totais foram quantificadas segundo método descrito por LOWRY (1951) com a albumina bovina como padrão, os resultados foram expressos em mg/ml.

Os lipídeos totais foram quantificados através do kit do método da sulfosfovalina, com os resultados sendo expressos em mg/dl.

O colesterol foi quantificado através do kit da Lab test (liquiform- Cat. 76.2), com os resultados sendo expressos em mg/dl.

Determinações teciduais (hepatopâncreas, gônadas e músculos)

O glicogênio nos diferentes tecidos foi extraído segundo VAN HANDEL (1965) e quantificado como glicose, após hidrólise ácida (HCl) e neutralização com carbonato de sódio, utilizando-se o kit da Bioclin (glicose GOD-CLIN) (glicose oxidase). Os resultados foram expressos em mg/g.

As proteínas totais foram quantificadas segundo método descrito por LOWRY (1951) com a albumina bovina como padrão, os resultados foram expressos em mg/ml.

Os lipídios totais foram extraídos pelo método do clorofórmio: metanol (2:1) (FOLCH *et al.*, 1957) e determinados por uso do método da sulfosfovalina (FRINGS & DUNN, 1970), com os resultados sendo expressos em mg/g.

O colesterol foi quantificado através do kit da Lab test (liquiform- Cat. 76.2), utilizando-se o método de extração de FOLCH *et al.* (1957), com os resultados expressos em mg/g.

Análises estatísticas

Para os resultados dos índices e das análises bioquímicas da hemolinfa e dos tecidos foi aplicado o teste de análise de variância a um critério (one-way ANOVA). Os testes de Tuckey e Bonferroni foram utilizados quando observado uma diferença significativa entre as médias amostrais.

Na comparação entre os índices gonadossomáticos e hepatossomáticos e entre as análises bioquímicas de machos e fêmeas foi utilizado o teste de análise de variância a dois critérios (two-way ANOVA). O nível de significância adotado foi de 5%, e todas as análises estatísticas foram realizadas com o programa SPSS (Statistical Package for the Social Sciences), versão 11.5, para Windows.

Referências Bibliográficas

- ALMEIDA, A.O. & L. BUCKUP. 1997. Aspectos anatômicos e funcionais do aparelho reprodutor de *Parastacus brasiliensis* (von Martens) (Crustacea, Decapoda, Parastacidae). **Revista Brasileira de Zoologia**, Curitiba, **14** (2): 497-509.
- ALMEIDA, A.O. & L. BUCKUP. 1999. Caracteres sexuais primários e secundários do lagostim *Parastacus defossus* Faxon, 1898 (Crustacea, Parastacidae). **Nauplius**, São Paulo, **7**: 113-126.
- ALMEIDA, A.O. & L. BUCKUP. 2000. Occurrence of protandric hermaphroditism in a population of the neotropical freshwater crayfish *Parastacus brasiliensis* (Parastacidae). **Journal of Crustacean Biology**, Lawrence, **20** (2): 224-230.
- AMESTOY, F.J. 1983. Reproducción de los especies del genero *Parastacus* (Crustacea; Decapoda), bajo condiciones controladas y su evaluación como potencial para la acuicultura. **Contribuciones Departamento de Oceanografía Facultad de Humanidades y Ciencias Universidad de la Republica**, Montevideo, **1** (1): 1-13.
- AMESTOY, F.J. & O.D.P. ISASMENDI. 1984. Datos preliminares sobre crecimiento y mortalidad de *Parastacus varicosus* y *Parastacus pilimanus* (Crustacea; Decapoda; Parastacidae) en laboratorio. **Contribuciones Departamento de Oceanografía Facultad de Humanidades y Ciencias Universidad de la Republica**, Montevideo, **1** (5): 1-14.
- BAUER, R.T. 1986. Sex change and life history pattern in the shrimp *Thor manningi* (Decapoda: Caridea): a novel case of partial protandric hermaphroditism. **Biology Bulletin**, Leiden, **170**: 11-31.

- BEHMER, O.A.; E.M.C. TOLOSA & G.A. FREITAS NETO. 1976. **Manual de técnicas para histologia normal e patológica**. EDART-São Paulo, Livraria editora Ltda. Editora da Universidade de São Paulo, 241p.
- BROOK, J.H.; A.T. RAEINGS & W.R. DAVIES. 1994. Protogynous sex change in the intertidal isopod *Gnorimosphaeroma oregonense* (Crustacea: Isopoda). **Biology Bulletin**, Taichung, **187**: 99-111.
- BUCKUP, L. & A. ROSSI. 1980. O gênero *Parastacus* no Brasil (Crustacea, Decapoda, Parastacidae). **Revista Brasileira de Biologia**, Rio de Janeiro, **40** (4): 663-681.
- BUCKUP, L. 1999. Família Parastacidae. *In*: L. Buckup & G. Bond-Buckup (eds). **Os Crustáceos Do Rio Grande Do Sul**. Ed. Universidade/UFRGS, Porto Alegre, Pp 319-327.
- CASTILLE, F.L. & A.L. LAWRENCE 1989. Relationship between maturation and biochemical composition of the shrimps *Penaeus aztecus* and *Penaeus setiferus* (L.) **Journal of Crustacean Biology**, Lawrence, **9**: 202-211.
- CHANG, E. & J.D. O'CONNOR. 1983. Metabolism and transport of carbohydrates and lipids. Pp. 263-287. *In*: L. H. MANTELL (Ed.). **The biology of Crustacea, vol 5**. Internal anatomy and physiological regulation. New York., Academic Press:
- CHARNIAUX-COTTON, H. & G. PAYEN. 1985. Sexual differentiation, p. 217-299. *In*: D. E. BLISS (Ed.) **The Biology of Crustacea, vol. 9**. New York, Academic Press, X + 550p.
- CRANDALL, K.A.; J.W. FETZNER; C.G. JARA. & L. BUCKUP. 2000. On the phylogenetic positioning of the South American freshwater crayfish genera (Decapoda: Parastacidae). **Journal of Crustacean Biology**, Lawrence, **20** (3): 530-540.
- FAXON, W. 1898. Observations on the Astacidae in the United States National Museum and in the Museum of Comparative Zoology, with descriptions of new species. **Proceedings of the Unites States National Museum**, Washington, **20**: 643-694.

- FERREIRA, B.D.P.; C. HACK; G.T. OLIVEIRA & G. BOND-BUCKUP. 2005. Perfil metabólico de *Aegla platensis* Schmitt (Crustacea, Anomura, Aeglidae) submetida a dietas ricas em carboidratos ou proteínas. **Revista Brasileira de Zoologia**, Curitiba, **22** (1): 161-168.
- FOLCH, J., LEES, M. & G. H. SLOANE-STANLEY. 1957. A simple method for isolation and purification of total lipides from animal tissues. **Journal Biological Chemistry**, New York, **226**: 497-509.
- FONTOURA, N.F. & L. BUCKUP. 1989a. O crescimento de *Parastacus brasiliensis* (von Martens, 1869) (Crustacea, Decapoda, Parastacidae). **Revista Brasileira de Biologia**, Rio de Janeiro, **49** (4): 897-909.
- FONTOURA, N.F. & L. BUCKUP. 1989b. Dinâmica populacional e reprodução em *Parastacus brasiliensis* (von Martens, 1869) (Crustacea, Decapoda, Parastacidae). **Revista Brasileira de Biologia**, Rio de Janeiro, **49** (4): 911-92.
- FRIES, B.G. 1980. Observações sobre o lagostim de água doce *Parastacus brasiliensis* (von Martens, 1869) em condições de cultivo experimental em laboratório (Crustacea, Decapoda, Parastacidae). **Revista Brasileira de Biologia**, Rio de Janeiro, **44** (4): 409-416.
- FRINGS, C.S. & R.T. DUNN. 1970. A colorimetric method for determination of total serum lipids based on the sulfophosphanillin reaction. **American Journal Clinical Pathology**, **53**: 89-91.
- GHISELIN, M.T. 1969. The evolution of hermaphroditism among animals. **Quarterly review of Biology**, New York, **44**: 189-208.
- GIBSON, R. & P.L. BARKER. 1979. The decapod hepatopancreas. **Oceanography and Marine Biology**, Aberdeen, **17**: 285-346.
- GILLES, R. 1982. Osmoregulatory processes in molluscs and crustacean from media with fluctuating salinity regime. **Boletim de Fisiologia Animal**, São Paulo, **6**: 1-36.

GRANT, A. & P.A. TYLER. 1983. The analysis of data in studies of invertebrate reproduction. I. Introduction and statistical analysis of gonad indices and maturity indices. *International Journal of Invertebrate Reproduction*, Amsterdam, **6**: 259-269.

HASEGAWA, Y.; E. HIROSE; & Y. KATAKURA. 1993. Hormonal control of sexual differentiation and reproduction in Crustacea. *American Zoologist*, Thousand Oaks, **33**: 403-411.

HERREID, C.F. & R.J. FULL. 1988. Energetics and locomotion. Pp. 337-377. *In*: W.W. BURGGREN AND B. R. MCMAHON (Eds), **Biology of the land crabs**. Cambridge, Cambridge University Press.

HERNANDEZ-VERGARA, M.P.; D.B. ROUSE; M.A. OLVERA-NOVOA & D.A. DAVIES. 2003. Effects of dietary lipid level and source on growth and proximate composition of juvenile redclaw (*Cherax quadricarinatus*) reared under semi-intensive culture conditions. *Aquaculture*, Amsterdam, **223**: 107-115.

HOCHACHKA, P.W. & G.N. SOMERO. 1984. **Biochemical adaptation: mechanism and process in physiological evolution**. Princeton, Princeton University Press, 466p.

HOLDICH, D.M. & REEVE, I.D. 1988. Functional morphology and anatomy, p. 11-51. *In*. D.M. HOLDICH E R. S. LOWERY (Eds.). **Freshwater crayfish: biology, management and exploitation**. Portland, Timber Press, VIII+498p.

HORWITZ, P. 1988. Secondary sexual characteristics of females of the freshwater crayfish genus *Engaeus* (Decapoda, Parastacidae). *Crustaceana*, Leiden, **54** (1): 25-32.

JOHNSTON, M.A. & P.S. DAVIES. 1972. Carbohydrates of the hepatopancreas and blood tissues of *Carcinus*. *Comparative Biochemistry and Physiology*, New York, **41B**: 433-443.

KHALAILA, I. & A. SAGI. 1997. Intersexuality and its control by the androgenic gland in the crayfish *Cherax quadricarinatus*. *Journal of Reproduction Development*, Tokyo, **43**: 69-70.

- KUCHARSKI, L.C.R. & R.S.M. DA SILVA. 1991a. Effect of diet composition on the carbohydrate and lipid metabolism in an estuarine crab, *Chasmagnathus granulata* (Dana, 1851). **Comparative Biochemistry and Physiology**, New York, **99A**: 215-218.
- KUCHARSKI, L.C.R. & R.S.M. DA SILVA, 1991b. Seasonal variation on the energy metabolism in an estuarine *Chasmagnathus granulata* (Dana, 1851). **Comparative Biochemistry and Physiology**, New York. **100A** (3): 599-602.
- LONNBERG, E. 1898. Some biological and anatomical facts concerning *Parastacus*. – **Zoologischer Anzeiger**, Jena, **21**: 345-352.
- LOWRY, O. H.; N.J.ROSENBOUGH; A.L. FAU & R.J. RANDAL. 1951. Protein measurements with the folin phenol reagent. **Journal Biological Chemistry**, New York. 183: 265-275.
- MEDLEY, P.B. & D.B. ROUSE. 1993. Intersex australian red claw crayfish (*Cherax quadricarinatus*). **Journal of Shellfish Research**, New York, **12** (1): 93-94.
- NERY, L.E.M. & E. A. SANTOS. 1993. Carbohydrate metabolism during osmoregulation in *Chasmagnathus granulata* Dana, 1851 (Crustacea, Decapoda). **Comparative Biochemistry and Physiology**, New York, **106B** (3): 747-753.
- O'CONNOR, J.D. & L.I. GILBERT. 1968. Aspects of lipid metabolism in Crustaceans. **American Zoologist**, Chicago, **8**: 529-539.
- OLIVEIRA, G.T.; I.C. ROSSI & R.S. M. DA SILVA. 2001. Carbohydrate metabolism during anoxia and post-anoxia recovery in *Chasmagnathus granulata* crabs maintained on high-protein or carbohydrate-rich diets. **Marine Biology**, Berlin, 139: 335-342.
- OLIVEIRA, G.T., FERNANDES, F.A., BOND-BUCKUP, G., BUENO, A.A. & SILVA, R.S.M. 2003. Circadian and seasonal variations in the metabolism of carbohydrates in *Aegla ligulata* (Crustacea: Anomura: Aeglididae). **Memoirs of Museum Victoria**, Victoria, **60** (1): 59-62.

- OLIVEIRA, G.T., ROSSI, I.C., KUCHARSKI, L.C. & DA SILVA, S.M. 2004. Hepatopancreas gluconeogenesis and glycogen content during fasting in crabs previously maintained on a high-protein or carbohydrate-rich di. **Comparative and Biochemistry and Physiology A**, **137** (2): 383-390.
- PARVATHY, K. 1971. Glycogen storage in relation to the moult cycle in two crustaceans *Emerita asiatica* and *Ligia exotica*. **Marine Biology**, Berlin, **10**: 82–86.
- PILLAY, K.K. & N.B. NAIR. 1973. Observations on the biochemical changes in gonads and other organs of *Uca annulipes*, *Portunus pelagicus* and *Metapenaeus affinis* (Decapoda: Crustacea) during the reproductive cycle. **Marine Biology**, Berlin, **18**: 167-198.
- READ, G.H.I. & M.S. CAULTON. 1980. Changes in mass and chemical composition during the moult cycle and ovarian development in immature and mature *Penaeus indicus* Milne Edwards. **Comparative Biochemistry and Physiology**, New York, **66A**: 431-437.
- ROSA, R.A. & M.L. NUNES. 2003a. Biochemical composition of deep-sea decapod crustaceans with two different benthic life strategies off the Portuguese south coast. **Deep-Sea Research I**, Orlando, **50**: 119-130.
- ROSA, R.A. & M. L. NUNES. 2003b. Changes in organ indices and lipid dynamics during the reproductive cycle of *Aristeus antennatus*, *Parapenaeus longirostris* and *Nephrops norvegicus* (Crustacea: Decapoda) females from the south Portuguese coast. **Crustaceana**, Leiden, **75** (9): 1095-1105.
- RUDOLPH, E.H. 1995a. A case of gynandromorphism in the freshwater crayfish *Samastacus spinifrons* (Philippi, 1882) (Decapoda: Parastacidae). **Crustaceana**, Leiden, **68** (6): 705-711.

- RUDOLPH, E.H. 1995B. Partial protandric hermaphroditism in the burrowing crayfish *Parastacus nicoleti* (Philippi, 1882) (Decapoda, Parastacidae). **Journal of Crustacean Biology**, Lawrence, **15**: 720-732.
- RUDOLPH, E. H. 1997. Intersexualidad en el camarón excavador *Parastacus pugnax* (Poeppig, 1835) (Decapoda, Parastacidae). **Investigaciones Marinas**, Valparaíso, **25**: 7-18.
- RUDOLPH, E.H. 1999. Intersexuality in the freshwater crayfish *Samastacus spinifrons* (Philippi, 1882) (Decapoda, Parastacidae). **Crustaceana**, Leiden, **72**: 325-337.
- RUDOLPH, E.H.; VERDI, A.; TAPIA, J. 2001. Intersexuality in the burrowing crayfish *Parastacus VARICOSUS* FAXON, 1898 (DECAPODA, PARASTACIDAE). **CRUSTACEANA**, LEIDEN, **74** (1): 27-37.
- RUDOLPH, E.H. 2002. New records of intersexuality in the freshwater crayfish *Samastacus spinifrons* (Decapoda: Parastacidae). **Journal of Crustacean Biology**, Lawrence, **22** (2): 377-389.
- SAGI, A.; I. KHALAILA; A BARKI; G. HULATA & I. KARPLUS. 1996. Intersex Red claw crayfish, *Cherax quadricarinatus* (von Martens): functional males with pre-vitellogenic ovaries. **Biology Bulletin**, Taichung, **190**: 16-23.
- SOKOL, A. 1988. The Australian Yabby. Pp. 401-424. *In* D.M. HOLDICH & R.S. LOWERY (Eds.). **Freshwater crayfish: biology, management and exploitation**. Portland, Timber Press, VIII + 498p.
- VAN HANDEL, E. 1965. Estimation of glycogen in small amount soft tissue. **Analistical Biochemistry**, Maryland, **11**: 256-265.
- VAZZOLER, A.E.A. DE M. 1996. **Biologia da Reprodução de Peixes Teleósteos: Teoria e Prática**. CNPq e Nupelia (UEM), São Paulo, pp. 169.

- VON MARTENS, E. 1869. Südbrasilianische Süss und Brackwasser crustaceen nach den Sammlungen des Dr. Reinh. Hensel. **Archiv Fur Naturgeschichte**, Berlin, **35** (1): 1-37.
- YEHEZKEL, G.; R. CHAYOTH; U. ABDU; I. KHALAILA. & A SAGI. 2000. High-density lipoprotein associated with secondary vitellogenesis in the hemolymph of the crayfish *Cherax quadricarinatus*. **Comparative Biochemistry and Physiology**, New York, **127B**: 411-421.
- WARNER, R.R. 1975. The adaptive significance of sequential hermaphroditism in animals. **American Naturalist**, Chicago, **109**: 61-82.

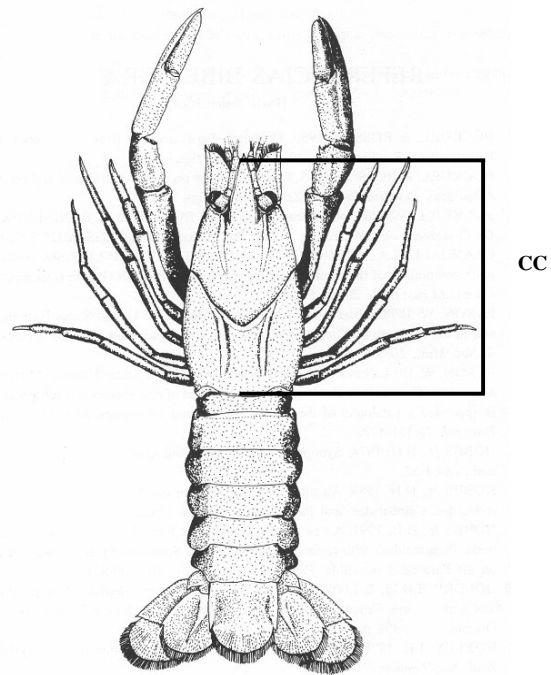


Figura 2: *Parastacus varicosus*. CC = comprimento do cefalotórax (cedida por BUCKUP, 1999).

Tabela I. Metodologia utilizada nas análises:

Material examinado		Tipo de análise	
Gônadas	índice gonadosomático*	análise histológica	análise bioquímica*
Hemolinfa			análise bioquímica
Hepatopâncreas	índice hepatossomático		análise bioquímica
Músculo			análise bioquímica

* análise realizada somente nas fêmeas

ARTIGO I

Caracterização do padrão sexual de *Parastacus varicosus* Faxon, 1898 (Crustacea: Decapoda: Parastacidae): análise macroscópica e microscópica das gônadas

Silva-Castiglioni, D.¹, López Greco, L.², Oliveira, G.T.³ & Bond-Buckup, G.¹

¹Departamento de Zoologia e PPG Biologia Animal, Instituto de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Brasil. ²Departamento de Biodiversidade e Biologia Experimental, FCEyN, Universidade de Buenos Aires, Buenos Aires, Argentina. ³ Departamento de Ciências Fisiológica, Faculdade de Biociências, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Brasil. (e-mail: daicastiglioni@yahoo.com.br)

Artigo formatado nas normas do Journal of Crustacean Biology (Qualis A)

Resumo: Caracterização do padrão sexual de *Parastacus varicosus* Faxon, 1898 (Crustacea: Decapoda: Parastacidae): análise macroscópica e microscópica das gônadas. Os lagostins de água doce do gênero *Parastacus* são intersexuados, ou seja, apresentam características de ambos os sexos no mesmo indivíduo. A presença de intersexualidade tem sido documentada em espécies hermafroditas. O objetivo da pesquisa foi analisar as gônadas de *Parastacus varicosus* caracterizando seu padrão sexual. Os animais foram amostrados na localidade Cova do Touro, Gravataí, RS, Brasil. Foram observados através das análises histológicas das gônadas 40 machos, 32 fêmeas e 6 espécimes transicionais. Em todos os espécimes analisados foi observada a presença de dois pares de aberturas e dutos genitais. Nas fêmeas os ovidutos apresentam um diâmetro mais largo e nos machos os vasos deferentes são mais desenvolvidos. As gônadas estão localizadas no cefalotórax sendo compostas por duas estruturas paralelas. Nas fêmeas as gônadas foram classificadas em três estágios. A presença de espécimes transicionais mostra uma mudança de sexo nesses animais, evidenciando a ocorrência de hermafroditismo, como já observado em outras espécies de *Parastacus*. Nessa pesquisa, o padrão sexual de *Parastacus varicosus* foi caracterizado, contudo para um melhor entendimento da evolução do hermafroditismo nesse grupo de crustáceos são necessários novos estudos sobre a dinâmica desse padrão.

Introdução

Os lagostins do gênero *Paratacus* Huxley, 1879 apresentam em ambos os sexos, uma abertura genital masculina no coxopodito do pereiópodo 5 e uma abertura genital feminina no coxopodito do pereiópodo 3. Os dois pares de dutos genitais também estão presentes nesses animais, o par de oviduto conectado a abertura genital feminina e o par de vaso deferente conectado a abertura genital masculina. Indivíduos com as aberturas anteriores totalmente obstruídas podem ser fêmeas imaturas enquanto que indivíduos com as mesmas aberturas parcialmente ou totalmente desobstruídas, são fêmeas sexualmente maduras (Almeida e Buckup, 1999).

A presença de características masculinas e femininas no mesmo indivíduo é conhecida como intersexualidade e vem sendo investigada nos lagostins de água doce do gênero *Parastacus* (Rudolph, 1997, 2001) e em alguns gêneros australianos como *Cherax* Erichson, 1846 (Sokol, 1988; Medley e Rouse, 1993; Sagi *et al.*, 1996); *Engaeus* Erichson, 1846 e *Engaewa* Riek, 1867 (Horwitz, 1988). Esse fenômeno pode se limitar à morfologia externa ou se estender à diferenciação gonadal (Khalaila e Sagi, 1997) ou ocorrer em espécies gonocorísticas com origem genética, endocrinológica ou epigenética ou em situações de hermafroditismo, podendo ser uma característica normal na vida de um indivíduo hermafrodita (Charniaux-Cotton e Payen, 1985; Ginsburger-Vogel, 1991).

O hermafroditismo é determinado por um conjunto de genes capaz de proporcionar a formação de gametas de ambos os sexos, podendo ser de caráter simultâneo ou seqüencial. O hermafroditismo simultâneo é caracterizado pela presença de gônadas de ambos os sexos no mesmo indivíduo simultaneamente. Entretanto o seqüencial é

caracterizado pela presença de gônadas de ambos os sexos no mesmo indivíduo em diferentes momentos de sua vida, podendo ser protândrico, quando o primeiro sexo é o masculino e protogênico, quando o primeiro sexo é o feminino (Ghiselin, 1969; Warner, 1975).

O hermafroditismo protândrico foi documentado nos lagostins, *Parastacus nicoleti* (Philippi, 1882) e *Parastacus brasiliensis* (von Martens, 1869) (Rudolph, 1995; Almeida e Buckup, 2000, respectivamente). Em *Parastacus pugnax* (Poeppig, 1835) e *Parastacus varicosus* Faxon, 1898, não foi observada nenhuma evidência de hermafroditismo, apenas a ocorrência de intersexualidade (Rudolph 1997, 2001). Essas pesquisas foram desenvolvidas através de observações macro e microscópicas das gônadas.

As análises das gônadas são importantes para a descrever a estrutura das gônadas e, servem para caracterizar o padrão sexual de uma determinada espécie. Entretanto para os lagostins Parastacoidea essas pesquisas são escassas, podendo se destacar as desenvolvidas com os lagostins australianos, *Cherax quadricarinatus* von Martens, 1868 (Sagi *et al.*, 1996; Abdu *et al.*, 2000) e *Cherax quinquecarinatus* Gray, 1845 (Beatty *et al.*, 2005). Em *Procambarus clarkii* (Girard, 1852) foi observado os estágios das gônadas e a estrutura do ovário por Kulkarni *et al.* (1991) e Ando & Makioka (1998), respectivamente.

Os lagostins do gênero *Parastacus* além de apresentar uma ocorrência no Brasil, restrita aos estados de Santa Catarina e Rio Grande do Sul poucas pesquisas foram realizadas sob o aspecto da dinâmica da reprodução. Visando contribuir com informações sobre a biologia reprodutiva dessas espécies, a pesquisa tem como objetivo descrever macro e microscopicamente as gônadas de *Parastacus varicosus* caracterizando o seu padrão sexual.

Materiais e Métodos

Espécimes de *Parastacus varicosus* foram amostrados mensalmente, no período de junho de 2004 a maio de 2005, em um arroio e tanques de criação de peixes na localidade Cova do Touro, município de Gravataí, Rio Grande do Sul, Brasil (29°52'33,9"S e 51°0'51,7"W). Os animais foram coletados com armadilhas com iscas (fígado de boi), colocadas no arroio e retiradas após dois dias. Utilizaram-se também puçás e uma bomba de sucção.

Os animais foram analisados quanto à aparência dos poros genitais pois apresentam, em ambos os sexos, uma abertura genital masculina no coxopodito do pereiópodo 5 e uma abertura genital feminina no coxopodito do pereiópodo 3. Portanto o sexo somente foi confirmado, adicionalmente pela análise histológica das gônadas.

As gônadas foram extraídas, pesadas em balança eletrônica (BEL SSR600/ precisão de 0,001g) e analisadas, macroscopicamente, quanto ao estágio de desenvolvimento dos oócitos, classificadas segundo critérios de tamanho e cor. A seguir utilizou-se os métodos rotineiros em técnicas histológicas: fixação, desidratação, diafanização, impregnação em banhos de parafina, inclusão e cortes de 7 µm no micrótomo. O material foi fixado na lâmina com albumina e, por último realizado a coloração em hematoxilina e eosina (modificado de Behmer *et al.* 1976).

O material foi analisado ao microscópio óptico para a descrição das gônadas e realizaram-se medições dos oócitos, em cinco lâminas de cada estágio, para observar o tamanho com relação ao desenvolvimento. Somente os oócitos com núcleo foram medidos, realizando uma média do maior e menor diâmetro.

Resultados

A gônada masculina e feminina de *Parastacus varicosus* é formada por estruturas pareadas e paralelas, localizadas no cefalotórax (Figura 1). A região anterior está localizada posteriormente ao estômago e circundada pela porção anterior do hepatopâncreas e a região posterior está situada sob o coração e intestino.

Todos os animais apresentaram dois pares de aberturas genitais ou gonóporos. O par feminino está localizado no coxopodito do terceiro par de pereiópodo (Figura 2a) e o par masculino no coxopodito do quinto par de pereiópodo (Figura 2b).

Os animais apresentaram também dois pares de dutos genitais, um par de oviduto e um par de vaso deferente. O oviduto, par anterior, estende-se na direção das aberturas genitais femininas e o vaso deferente, par posterior, estende-se na direção das aberturas genitais masculinas (Figura 3).

Na população de *P. varicosus* foi observado três formas sexuais, 32 fêmeas intersexuadas, 40 machos intersexuados e 6 espécimes transicionais, ou seja, com gônadas apresentando células masculinas e femininas.

Fêmeas intersexuadas

As gônadas femininas foram observadas em animais com 12,55 a 37,22 mm de comprimento de cefalotórax (CC), sendo registrado apenas duas fêmeas com tamanho inferior a 17 mm. Através da análise histológica foram observadas células femininas em um animal com 8,9 mm de CC.

Na maioria das fêmeas, as aberturas genitais anteriores estavam parcialmente ou totalmente obstruídas enquanto as aberturas genitais do quinto par de pereiópodo desobstruídas. Com relação aos dutos genitais nas fêmeas, encontram-se ligados ao par de ovário e apresentam o par de oviduto mais desenvolvido do que o par de vaso deferente.

As gônadas foram classificadas pelo estágio de desenvolvimento, quanto à análise macro e microscópica, em três estágios gonadais. Através das medições das oogônias e oócitos foi observada uma variação no tamanho das células (tabela I).

O estágio I, considerado como imaturo, representado pela gônada branca é caracterizado por numerosas oogônias e oócitos primários, sendo que a maioria apresenta um grande espaço intercelular e estão envoltos por células foliculares. Nesse estágio, os oócitos apresentam um citoplasma homogêneo e um núcleo central, mas foi observado em alguns oócitos alguns grânulos de vitelo na periferia indicando assim um início de vitelogênese (Figuras 4a,b).

O estágio II, estágio em desenvolvimento, representado por uma gônada amarela, com oócitos primários maiores do que no estágio I. Foi observado um maior número de oócitos com grânulos de vitelo e uma maior concentração desses grânulos do que no estágio I (Figura 4c).

O estágio em que as gônadas encontram-se desenvolvidas foi identificado como estágio III. Nesse estágio a gônada apresenta uma coloração verde oliva e é constituído por um menor número de oogônias e oócitos primários. Observam-se numerosos oócitos secundários com grânulos e plaquetas de vitelo dominando o citoplasma. A maioria das oogônias e dos oócitos primários está localizada próxima à região central enquanto que os oócitos mais desenvolvidos estão localizados na periferia. (Figura 4d).

O grau de desenvolvimento do ovário relacionado à coloração foi corroborado pelos resultados das análises histológicas. Apesar de algumas gônadas com coloração branca (estágio I) apresentarem oócitos no início da vitelogênese, o número desses oócitos e a concentração de vitelo foi menor. No entanto, ocorre um aumento no tamanho dos oócitos à medida que o desenvolvimento das gônadas avança, devido ao maior acúmulo de vitelo no seu interior e conseqüentemente ocorre um aumento no peso das gônadas (Tabela I).

Machos intersexuados

Com relação à gônada masculina de *P. varicosus*, foi observada em animais com 8,25 a 39,85 mm de comprimento de cefalotórax. Apresentam uma coloração esbranquiçada e são formadas por duas estruturas paralelas (Figura 3).

Todos os machos observados apresentaram os dois pares de aberturas e dutos genitais. Ao contrário das fêmeas, os machos apresentaram o par de vaso deferente mais desenvolvido e observou-se a glândula androgênica. Os dois pares de dutos genitais são retos e apresentam uma coloração esbranquiçada, semelhante à cor do testículo (Figura 3).

Os testículos são constituídos de ácinos testiculares e túbulos coletores (Figura 5 a,b). No interior dos ácinos ocorre a diferenciação celular, espermatogônias, espermatócitos, espermatídes e espermatozóides. Esses estágios não foram tão evidentes nos juvenis de *P. varicosus* mas nos adultos foi observado a presença de espermatídes ou espermatozóides. O túbulo coletor é revestido por tecido epitelial e encontram-se células maduras no interior, espermatídes ou espermatozóides (Figura 5c).

A diferenciação celular nas gônadas masculinas não foi muito evidente como nas fêmeas, portanto não foram determinados estágios gonadais nos machos. Entretanto foi possível observar que as espermatogônias apresentam um citoplasma escasso quando

comparadas ao citoplasma dos espermatócitos e as espermátides apresentam um núcleo menor do que os espermatócitos.

Na análise histológica do vaso deferente dos machos observou-se uma camada externa de tecido muscular e uma camada interna de tecido epitelial (Figura 5d). No interior do vaso deferente foi observado espermatóforo.

Indivíduos Transicionais

Na análise histológica foram observados 6 espécimes transicionais de *P. varicosus* (tabela II), pois ocorreu a presença de células femininas e masculinas na gônada do mesmo indivíduo. Esse padrão sexual indica uma mudança de sexo nesses crustáceos.

Através da análise macroscópica não se constatou a presença diferenciada da gônada masculina e feminina (ovotestículo) nesses espécimes. Entretanto, quatro animais indicaram ser fêmea pela presença do ovário e dois indicaram ser macho pela observação do testículo.

Os dois pares de dutos e aberturas genitais (gonóporos) também foram observados nesses espécimes. As aberturas genitais localizadas no terceiro par de pereiópodo encontravam-se total ou parcialmente obstruídas, enquanto as aberturas do quinto par totalmente obstruídas.

Quanto à análise microscópica os animais apresentaram oogônias e oócitos primários na região feminina. Na região masculina observou-se ácidos testiculares e em três espécimes constatou-se o túbulo coletor (Figura 6).

Discussão

O lagostim de água doce *Parastacus varicosus* como as demais espécies desse gênero (Rudolph, 1995, 1997; Almeida e Buckup, 1997, 1999), apresenta gônadas torácicas e pareadas. Entretanto diferem dos lagostins das famílias Astacidae e Cambaridae, as quais apresentam gônadas trilobadas (Stephens, 1952; Word e Hobbs 1958; Wielgus 1973; Wielgus-Serafinska, 1976; Holdich & Reeve, 1988), mostrando um par de ovários anterior e um ovário posterior, em forma de “Y”, em *Procambarus clarkii* (Ando e Makioka, 1998). Essa diferença na estrutura das gônadas, entre as famílias, pode indicar uma relação com o padrão sexual das espécies, sendo necessário no entanto investigações sob este aspecto.

A presença de diferentes colorações nos ovários de *P. varicosus* está relacionada ao grau de desenvolvimento, confirmado pelos resultados das análises histológicas. À medida que a gônada torna-se mais escura ocorre uma maturação dos oócitos. O mesmo foi observado nos lagostins *P. clarkii*, *C. quadricarinatus* e *C. quinquecarinatus* (Kulkarni *et al.*, 1991; Abdu *et al.*, 2000; Beatty *et al.*, 2005, respectivamente), onde a mudança na coloração se refere à transição para a fase seguinte do desenvolvimento das gônadas (Arculeo *et al.*, 1995).

A vitelogênese é caracterizada por uma rápida deposição de vitelo e outras proteínas nos oócitos, os quais resultam em um aumento no diâmetro (Eastman-Reks e Fingerman, 1985). Esse fato foi verificado na presente pesquisa, onde se observou que o peso dos ovários no estágio mais desenvolvido, representado pela gônada madura, aumentou em relação aos outros estágios e à medida que a vitelogênese avançava ocorreu um aumento no diâmetro dos oócitos.

A ocorrência de um maior número de oogônias e oócitos primários na região mediana das gônadas maduras de *P. varicosus* e a ocorrência de um maior número de oócitos secundários na periferia já vem sendo observado há longo tempo, desde King (1948) o qual argumenta que a multiplicação rápida das células germinativas centrais desloca os oócitos primeiramente formados para as regiões periféricas dos lobos ovarianos, o que explica a disposição dos oócitos em maior desenvolvimento nestas regiões. O mesmo foi constatado, em várias espécies de crustáceos, como no caranguejo *Carcinus maenas* (Linnaeus, 1758) e no camarão de água doce *Macrobrachium acanthurus* (Wiegman, 1836) (Krol *et al.*, 1992). A mesma disposição também foi verificada no camarão *Penaeus penicillatus* (Alcock, 1905) (Oliveira *et al.*, 1999) e recentemente no anomura *Aegla platensis* Schmitt, 1942 (Sokolowicz *et al.* 2006).

A ocorrência de hermafroditismo também foi verificada em uma população de *P. nicoleti* no Chile (Rudolph, 1995). Entretanto em uma população de *P. pugnax* no Chile e *P. varicosus* no Uruguai foram encontrados apenas indivíduos intersexuados, sem qualquer evidência de hermafroditismo (Rudolph, 1997; Rudolph *et al.*, 2001, respectivamente) (ver tabela III). Esse fato pode estar relacionado ao local ou o período de amostragem, uma vez que a população de *P. varicosus* pesquisada no Uruguai foi amostrada apenas em maio.

Nossos resultados sugerem que *P. varicosus* provavelmente constitui um caso de hermafroditismo protândrico, onde os indivíduos atuam primeiro como macho. Esse fato foi corroborado pela ocorrência de um maior número de machos com menor comprimento de cefalotórax do que as fêmeas. No entanto também foram observados machos com tamanhos maiores, sugerindo assim, a existência de machos primários, que nunca mudam de sexo, como observado em *P. nicoleti* e *P. brasiliensis* (Rudolph, 1995 e Almeida & Backup, 2000, respectivamente). A existência de machos primários é conhecida como

protandria parcial, fenômeno que foi descrito pela primeira vez por Bauer (1986) com o camarão carídeo *Thor manningi* Chace, 1972.

Pesquisas desenvolvidas com outros parastacídeos mostraram a ocorrência de intersexualidade nos gêneros australianos *Engaewa* e *Engaeus* analisados por Horwitz (1988, 1990) onde observou uma alta proporção de indivíduos com a presença de gonóporos de ambos os sexos. Em populações de *Cherax quadricarinatus* foram registradas frequências de 1,2 a 17% de indivíduos intersexuados (Medley e Rouse, 1993; Sagi *et al.*, 1996; Vazquez e López-Greco, 2005).

A maioria das fêmeas de *P. varicosus* apresentou os gonóporos femininos, parcialmente ou totalmente obstruídos. O mesmo foi verificado por Rudolph *et al.* (2001) com uma população de *P. varicosus* no Uruguai, onde verificaram que de 142 animais, 133 apresentaram as aberturas do terceiro par de pereiópodos calcificados e apenas 9 animais com a membrana parcialmente ou não calcificada indicando serem fêmeas, mas pela análise das gônadas foi observada a ocorrência de 83 fêmeas e 59 machos. Nossos resultados indicaram que pela observação das aberturas genitais não foi possível determinar o sexo em *P. varicosus*, sendo necessário uma análise histológica das gônadas.

A obstrução dos gonóporos femininos em *P. varicosus* não mostrou uma relação com a época do ano, ao contrário de *P. brasiliensis*, onde Almeida e Buckup (1997) observaram uma desobstrução nesses gonóporos durante o período reprodutivo apresentando, portanto capacidade de oviposição. A desobstrução, segundo os pesquisadores, é adquirida após a muda pré-parturial, ocorrendo um gradual enrijecimento das aberturas femininas quando perdem a capacidade de oviposição. Portanto, como não foi observada essa desobstrução na maioria das fêmeas de *P. varicosus* no período reprodutivo (verão), sugere-se que a desobstrução ocorra em um período de tempo muito rápido anterior à cópula.

A coexistência dos dois pares de dutos genitais em ambos os sexos, como observado nesta pesquisa, pode ser uma característica da fase de transição entre um sexo e outro de muitas espécies protândricas (Boddeke *et al.*, 1991). A ocorrência do par de oviduto nos machos pode ser explicada pelo desenvolvimento atrasado da glândula androgênica, a qual é responsável pela diferenciação sexual nesses animais (Hasegawa *et al.*, 1993). Quando o hormônio androgênico começa a atuar, é possível que o período de sensibilidade dos ovidutos ao hormônio tenha passado, permanecendo nos machos. Esse fato explicaria a presença de ovidutos nos machos, mas não a ocorrência dos vasos deferentes nas fêmeas. Restaria investigar, futuramente, a diferenciação sexual nesses crustáceos para entender a presença dos dois pares de dutos genitais.

A presença de fêmeas de menor comprimento de cefalotórax em uma população sugere que essas nunca mudam para o sexo masculino sendo, portanto fêmeas intersexuadas primárias (Almeida e Buckup, 2000). Nessa pesquisa foram observados apenas duas fêmeas com tamanho inferior a 17 mm de comprimento de cefalotórax sendo necessário uma análise histológica das gônadas de um maior número de animais com menor tamanho para verificar uma maior ocorrência na população dessas fêmeas primárias.

Segundo Rudolph (1995) os modelos *size advantage model* e o *gene dispersal model* podem ser usados para explicar a evolução da sexualidade em *P. nicoleti*. Esta espécie, como as demais espécies do gênero, constrói habitações subterrâneas apresentando assim algumas características morfológicas relacionadas com seu modo de vida, como a redução no tamanho do abdômen, a ausência de larvas e a presença de barreiras que reduzem a possibilidade de dispersão, criando restrições ao fluxo interpopulacional de genes e reduzindo, conseqüentemente, a variabilidade genética, fatores que seriam responsáveis pela evolução do hermafroditismo nesta espécie. Estes aspectos podem ser inferidos para *P.*

varicosus assim como para as demais espécies do gênero, porém faltam pesquisas para entender a dinâmica do hermafroditismo.

Sob o aspecto das relações de filogenia dos parastacídeos, caracterizados por Crandall *et al.* (2000), analisando os dois subclados de *Parastacus*, por um lado representados por *P. pugnax*, *P. defossus*, *P. brasiliensis* e *P. pilimanus* e, por outro lado por *P. nicoleti*, mostram a intersexualidade presente em todas as espécies e o hermafroditismo observado em algumas delas. No entanto, são necessários estudos mais detalhados que revelem o padrão de sexualidade entre os grupos das espécies sul-americanas e australianas, mostrando os mecanismos responsáveis pela mudança de sexo nestes lagostins de água doce.

Referências bibliográficas

- Abdu, U., G. Yehezkel, and A. Sagi. 2000. Oocyte development and polypeptide dynamics during ovarian maturation in the red-claw crayfish *Cherax quadricarinatus*. *Invertebrate Reproduction and Development* 37 (1): 75-83.
- Almeida, A. O., e L. Buckup. 1997. Aspectos anatômicos e funcionais do aparelho reprodutor de *Parastacus brasiliensis* (von Martens) (Crustacea, Decapoda, Parastacidae). *Revista Brasileira de Zoologia* 14 (2): 497-509.
- _____, e L. Buckup. 1999. Caracteres sexuais primários e secundários do lagostim *Parastacus defossus* Faxon, 1898 (Crustacea, Parastacidae). *Nauplius* 7: 113-126.
- _____, and L. Buckup. 2000. Occurrence of protandric hermaphroditism in a population of the neotropical freshwater crayfish *Parastacus brasiliensis* (Parastacidae). *Journal of Crustacean Biology* 20 (2): 224-230.
- Ando, H., and T. Makioka, 1998. Structure of the ovary and mode of oogenesis in a freshwater crayfish, *Procambarus clarkii* (Girard). *Zoological Science* 15: 893-901.
- Arculeo, M., G. Payen, A. Cuttitta, G. Galioto, and S. Roggio. 1995. A survey of ovarian maturation in a population of *Aristeus antennatus* (Crustacea: Decapoda). *Animal Biology* 4: 13-18.
- Bauer, R.T. 1986. Sex change and life history pattern in the shrimp *Thor manningi* (Decapoda: Caridea): a novel case of partial protandric hermaphroditism. *Biology Bulletin* 170: 11-31.
- Beatty, S.J., D. L. Morgan, and H. S. Gill. 2005. Life history and reproductive biology of the gligie, *Cherax quinquecarinatus*, a freshwater crayfish endemic to southwestern Australia. *Journal of Crustacean Biology* 25 (2): 251-262.

- Behmer, O.A., E.M.C. Tolosa, e G.A. Freitas Neto. 1976. Manual de técnicas para histologia normal e patológica. EDART-São Paulo, Livraria editora Ltda. Editora da Universidade de São Paulo, 241p.
- Boddeke, R. 1968. Sexual cycle and growth of the brown shrimp (*Crangon crangon* L.) Netherlands Journal of Zoology 18: 427.
- Buckup, L., e A. Rossi. 1980. O gênero *Parastacus* no Brasil (Crustacea, Decapoda, Parastacidae). Revista Brasileira de Biologia 40 (4): 663-681.
- Charniaux-Cotton, H., and G. Payen. 1985. Sexual differentiation, pp. 217-299. In: Bliss, D.E. (Ed.) The Biology of Crustacea, vol. 9. New York.
- Eastman-Reks, S., and M. Fingerman. 1985. In vitro synthesis of vitelline by the ovary of the fiddler crab, *Uca pugilator*. Journal of Experimental Zoology 233: 111-116.
- Ghiselin, M.T. 1969. The evolution of hermaphroditism among animals. Quarterly Review of Biology 44: 189-208.
- Ginsburger-Vogel. T. 1991. Intersexuality in *Orchestia mediterranea* Costa, 1853, and *Orchestia aestuarensis* Wildish, 1987 (Amphipoda): a consequence of hybridization or parasitic infestation? Journal of Crustacean Biology 11 (4): 530-539.
- Hasegawa, Y., E. Hirose, and Y. Katakura. 1993. Hormonal control of sexual differentiation and reproduction in Crustacea. American Zoologist 33: 403-411.
- Holdich, D.M., and I. D. Reeve. 1988. Functional morphology and anatomy, p.11-51. In: D.M. Holdich & R.S. Lowery (Eds). Freshwater crayfish: biology, management and exploitation. Timber Press, Portland.
- Horwitz, P. 1988. Secondary sexual characteristics of females of the freshwater crayfish genus *Engaeus* (Decapoda, Parastacidae). Crustaceana 54 (1): 25-32.

- Khalaila, I., and A. Sagi. 1997. Intersexuality and its control by the androgenic gland in the crayfish *Cherax quadricarinatus*. *Invertebrate Reproduction and Development* 43: 69-70.
- King, J.E., 1948. A study of the reproductive organs of the common marine shrimp, *Penaeus setiferus* (Linnaeus). *Biology Bulletin* 94: 224-262.
- Krol, R.M., W. E. Hawkins, and R. M. Overstreet. 1992. Reproductive Components. pp. 295-343. In: H. W. Harrison (ed.): *Microscopic Anatomy of Invertebrates, Decapod Crustacea*. vol. 10. Willy-Lizz, Inc.
- Kulkarni, G.K.; Glade, L., and M. Fingerman. 1991. Oogenesis and effects of neuroendocrine tissues on in vitro synthesis of protein by the ovary of the red swamp crayfish *Procambarus clarkii* (Girard). *Journal of Crustaceana Biology* 11 (4): 513-522.
- Medley, P. B., and D. B. Rouse. 1993. Intersex australian red claw crayfish (*Cherax quadricarinatus*). *Journal of Shellfishery Research* 12 (1): 93-94.
- Oliveira O.S.P., G. V. Santos, e A. M. A. Correa. 1999. O desenvolvimento ovocitário em *Penaeus penicillatus* (Alcock, 1905), submetidos a monoablação do pedúnculo ocular. *Nauplius* 7: 53-64.
- Rudolph, E. H. 1995a. A case of gynandromorphism in the freshwater crayfish *Samastacus spinifrons* (Philippi, 1882) (Decapoda: Parastacidae). *Crustaceana* 68 (6): 705-711.
- _____, 1995b. Partial protandric hermaphroditism in the burrowing crayfish *Parastacus nicoleti* (Philippi, 1882) (Decapoda, Parastacidae). *Journal of Crustacean Biology* 15: 720-732.
- _____, 1997. Intersexualidad en el camarón excavador *Parastacus pugnax* (Poeppig, 1835) (Decapoda, Parastacidae). *Investigaciones Marinas* 25: 7-18.
- _____, A. Verdi, and J. Tapia. 2001. Intersexuality in the burrowing crayfish *Parastacus varicosus* Faxon, 1898 (Decapoda, Parastacidae). *Crustaceana* 74 (1): 27-37.

- Sagi, A., I. Khalaila, A. Barki, G. Hulata, and I. Karplus. 1996a. Intersex red claw crayfish *Cherax quadricarinatus* (von Martens): functional males with previtellogenic ovaries. *Biology Bulletin* 190: 16-23.
- _____, R. Shoukrun, I. Khalaila, and M. Rise. 1996b. Gonad maturation, morphological and physiological changes during the first reproductive cycle of the crayfish *Cherax quadricarinatus* female. *Invertebrate Reproduction and Development* 29: 235-242.
- Sokol, A. 1988. The Australian Yabby, pp. 404-424 In D.M.Holdich and R.S. Lowery. (Eds). *Freshwater crayfish: biology, management and exploitation*. Timber Press, Portland.
- Sokolowicz, C.C., L. S. López-Greco, R. S. Gonçalves, and G. Bond-Buckup. 2005. The gonads of *Aegla platensis* Schmitt, through a macroscopic and histological perspective (Decapoda, Anomura, Aeglidae). (Submetido a *Acta Zoologica*).
- Stephens, G.J. 1952. Mechanisms regulating the reproductive cycle in the crayfish, *Cambarus*.
I. The female cycle. *Physiological Zoology* 75: 70-84.
- Vazquez, F.J., and L.S. López Greco 2005. Intersexos hembras en la lagosta de agua doce *Cherax quadricarinatus* (Decapoda, Parastacidae). *Proceedings of XI Congreso Latinoamericano de Ciencias del Mar*, Chile.
- Warner, R.R. 1975. The adaptative significance of sequential hermaphroditism in animals. *American Naturalist* 109: 61-82.
- Wielgus, E. 1973. Structures of the testes in indigenous crayfishes. *Folia morph.* 32 (1): 115-124.
- Wielgus-Serafinska, E. 1976. Morphological and histological changes in the male gonad of the american crayfish *Orconectes limosus* (Rafinesque) in the annual cycle. *Acta boil. Cracov.*, Series Zoologia, 19: 87-105.

Word, B.H. Jr., and H. H. Hobbs Jr. 1958. Observations on the testis of the crayfish *Cambarus montanus acuminatus* Faxon. Transactions of the American Microscopical Society 77 (4): 435-450.

Tabela I. Caracterização macro e microscópica dos estágios das gônadas das fêmeas de *Parastacus varicosus* amostradas na localidade Cova do Touro, município de Gravataí, RS, Brasil.

Características	Estágio I (n = 18)	Estágio II (n = 8)	Estágio III (n = 24)
Cor da gônada	branca	amarela	verde oliva
Peso da gônada (g) (Média ± EP)	0,019 ± 0,003	0,021 ± 0,007	0,153 ± 0,021
Variação do CC (mm)	12,55 a 35,08	22,97 a 34,19	24,10 a 37,06
CC médio ± EP (mm)	25,27 ± 1,43	28,06 ± 1,35	31,19 ± 0,95
Tamanho das Oogônias (µm) (Média ± EP)	10,69 ± 0,58	12,92 ± 0,69	10,14 ± 1,49
Tamanho dos Oócitos Primários (µm) (Média ± EP)	242,58 ± 40,92	168,33 ± 19,22	154,86 ± 17,10
Tamanho dos Oócitos em Vitelogênese Inicial (µm) (Média ± EP)	345,42 ± 4,59	461,67 ± 21,03	ausência
Tamanho dos Oócitos Secundários (µm) (Média ± EP)	ausência	ausência	532,24 ± 37,98

Tabela II. Caracterização dos espécimes transicionais de *Parastacus varicosus* amostrados na localidade Cova do Touro, município de Gravataí, RS, Brasil (CC = comprimento do cefalotórax).

Período de amostragem	CC (mm)	Gonóporos (3° par)	Gônada (caracterização macroscópica)	Região feminina (histologia)	Região masculina (histologia)
primavera	36,82	Obstruídos	Ovário (estágio III)	Oogônias e oócitos primários	Ácino testicular
primavera	35,84	Obstruídos	Testículo	Oogônias e oócitos primários	Ácino testicular e túbulo coletor
primavera	30,02	Obstruídos	Ovário (estágio I)	Oogônias e oócitos primários	Ácinos testiculares
verão	34,05	Obstruídos	Testículo	Oogônias e oócitos primários	Ácino testicular e túbulo coletor
outono	36,65	Obstruídos	Ovário (estágio III)	Oogônias e oócitos primários	Ácino e túbulo Coletor
outono	24,55	Obstruídos	Ovário (estágio II)	Oogônias e oócitos primários	Ácinos testiculares

Tabela III. Padrões sexuais das 10 espécies sul-americanas da família Parastacidae. (I: Intersexualidade; H: Hermafroditismo; G: Gonocorismo)

	I	H	G	
<i>Samastacus spinifrons</i>	X	X	X	RUDOLPH (1995a, 1999,2002)
<i>Virilastacus araucanius</i>			X	RUDOLPH & ALMEIDA (2000)
<i>Parastacus saffordi</i>	X	X		TURNER (1935)
<i>Parastacus nicoleti</i>	X	X		RUDOLPH (1995b)
<i>Parastacus pugnax</i>	X			RUDOLPH (1997)
<i>Parastacus defossus</i>	X	X *		ALMEIDA & BUCKUP (1999) * Noro & Buckup (com. pessoal)
<i>Parastacus brasiliensis</i>	X	X		ALMEIDA & BUCKUP (1997, 2000) RUDOLPH <i>et al.</i> (2001)
<i>Parastacus varicosus</i>	X	X *		* presente pesquisa
<i>Parastacus pilimanus</i>	X			THOMPSON (1982) RUDOLPH & ALMEIDA (2000)
<i>Parastacus laevigatus</i>	X			RUDOLPH & ALMEIDA (2000)

ARTIGO II

Dinâmica do desenvolvimento das gônadas de *Parastacus varicosus* Faxon, 1898

(Crustacea, Decapoda, Parastacidae)

Silva-Castiglioni, D.¹, Oliveira, G.T.² & Bond-Buckup, G.¹

¹ Departamento de Zoologia e PPG Biologia Animal, Instituto de Biociências, UFRGS, BR.

² Faculdade de Biociências; Departamento de Ciências Biológicas, PUCRS, BR.

(daicastiglioni@yahoo.com.br)

Resumo: Dinâmica do desenvolvimento das gônadas de *Parastacus varicosus* Faxon, 1898 (Crustacea, Decapoda, Parastacidae). O desenvolvimento das gônadas de uma espécie pode ser avaliado pela determinação do índice gonadossomático e hepatossomático. O hepatopâncreas é o maior centro de reservas em decápodos e, essas reservas podem ser transferidas para as gônadas durante o seu desenvolvimento. O objetivo desta pesquisa foi avaliar, no lagostim *Parastacus varicosus*, o desenvolvimento das gônadas, através de observações macro e microscópicas e, determinar a variação dos índices gonadossomático e hepatossomático. Os animais foram amostrados na bacia hidrográfica do rio Gravataí, localidade Cova do Touro, Rio Grande do Sul. As gônadas das fêmeas foram pesadas para a determinação do índice gonadossomático e para análise histológica. O peso do hepatopâncreas também foi obtido para a determinação do índice hepatossomático. Os resultados dos índices mostraram uma diminuição do índice hepatossomático e um aumento do índice gonadossomático das fêmeas, no período de passagem da primavera para o verão, o que sugere uma possível transferência das reservas do hepatopâncreas para a gônada no período reprodutivo. No entanto essa diminuição não foi significativa ($p > 0,05$), sugerindo uma atuação de outros tecidos como a hemolinfa e de nutrientes oriundos da dieta.

Palavras-chave: crustáceos, estágios, índice gonadossomático, lagostim, maturação.

Introdução

O desenvolvimento das gônadas, em crustáceos decápodos, pode ser acompanhado pelas modificações que ocorrem nos ovários durante o ciclo reprodutivo, onde há multiplicação de células gonadais e crescimento dos gametas para a maturação, ovulação e oviposição (GRASSÉ 1994). Durante essas fases a gônada feminina sofre modificações, como alteração da cor e tamanho, enquanto a gônada masculina, as modificações morfológicas não são tão evidentes (CAVALLI *et al.* 2001, KROL *et al.* 1992).

O desenvolvimento das gônadas pode ser acompanhado para determinar o período e o tamanho em que o animal atinge a maturidade sexual sendo caracterizada como o conjunto de transformações morfológicas e fisiológicas mediante as quais os juvenis ou imaturos alcançam a capacidade de produzir gametas, que podem fecundar ou ser fecundados (MANTELATTO 1997). Para os crustáceos, nem sempre existem características externas como cor e tamanho que, de maneira direta e inequívoca, informam sobre o momento exato em que os indivíduos alcançam a maturidade sexual.

A maturidade sexual fisiológica pode ser determinada pela análise histológica das gônadas e ductos genitais. Essa análise revela um desenvolvimento heterogêneo das células caracterizando uma sucessão celular, passando por vários estágios de diferenciação durante o desenvolvimento (MANTELATTO & FRANZOZO 1997). A maturidade sexual foi investigada em várias espécies de decápodos, que ocorrem no Brasil, podendo se destacar algumas pesquisas como de PINHEIRO & FRANZOZO (1998), LÓPEZ-GRECO & RODRÍGUEZ (1999), REIGADA & NEGREIROS-FRANZOZO (1999), CASTIGLIONI & SANTOS (2001), COBO & FRANZOZO (2005), MURA *et al.* (2005) e BAPTISTA-METRI *et al.* (2005).

O índice gonadossomático vem sendo utilizado como um método qualitativo na determinação do período reprodutivo de uma espécie avaliando os estágios de desenvolvimento. Esse índice expressa a porcentagem que as gônadas representam no peso total do corpo dos indivíduos (GRANT & TYLER 1983, HAEFNER & SPAARGAREN 1993; VAZZOLER 1996, LÓPEZ-GRECO & RODRÍGUEZ 1999).

O índice gonadossomático foi avaliado, em algumas espécies de decápodos, como no caranguejo *Chasmagnathus granulata* Dana, 1851 (LÓPEZ-GRECO & RODRÍGUEZ 1999, respectivamente), nos camarões *Crangon crangon* (Linnaeus, 1758), *Metapenaeus joyneri* (Miers, 1880) e *Exopalaemon modestus* (Heller, 1862) (HAEFNER & SPAARGAREN 1993; CHU 1995, OH *et al.* 2002 respectivamente), e nos lagostins *Procambarus clarkii* (Girard), *Cherax quadricarinatus* (von Martens) e *Cherax quinquecarinatus* Gray, 1845 (KULKARNI *et al.* 1991, SAGI *et al.* 1996, BETTY *et al.* 2005, respectivamente). Recentemente SOKOLOWICS *et al.* (2006) acompanhou o desenvolvimento das gônadas no anomuro *Aegla platensis* Schmitt, 1942 com a aplicação desse índice.

A sazonalidade do desenvolvimento das gônadas está associada com o armazenamento de reservas orgânicas e minerais nos tecidos somáticos, que são transferidas para a gônada durante a gametogênese (LAWRENCE 1976). Portanto, como o hepatopâncreas dos crustáceos é o maior centro de reservas orgânicas e inorgânicas em decápodos (GIBSON & BARKER 1979) é esperado que ocorra uma mobilização dessas reservas energéticas para a maturação das gônadas, mostrando assim, valores dos índices gonadossomáticos e hepatossomáticos antagônicos, como vem sendo observado em crustáceos decápodos (PILLAY & NAIR 1973, KYOMO 1988, HAEFNER & SPAARGAREN 1993, CHU 1995, LÓPEZ-GRECO & RODRÍGUEZ 1999).

A maioria das pesquisas realizadas no Brasil sobre a biologia reprodutiva das espécies de crustáceos vem sendo desenvolvida com crustáceos marinhos, permanecendo, portanto uma grande lacuna no conhecimento sobre este tema com as espécies de água doce, principalmente dos lagostins parastacídeos. Visando contribuir com informações referentes à biologia reprodutiva dos lagostins a presente pesquisa teve como objetivo avaliar o desenvolvimento das gônadas em *Parastacus varicosus* Faxon 1898.

Materiais e Métodos

As amostragens de *Parastacus varicosus* foram realizadas mensalmente no período de junho de 2004 a maio de 2005 em um arroio e tanques de criação de peixes, em uma propriedade particular na localidade Cova do Touro pertencente à bacia hidrográfica de Gravataí, Rio Grande do Sul, Brasil (29°52'33,9"S e 51°0'51,7"W).

Os animais foram amostrados com armadilhas com iscas de fígado de boi, puçás e uma bomba de sucção. As armadilhas foram colocadas nos locais e retiradas após dois dias.

Em laboratório os animais foram medidos quanto ao comprimento do cefalotórax (mm) com um paquímetro digital (Moore & Wright) e pesados em uma balança eletrônica (BEL SSR600/ precisão de 0,001g). As gônadas foram observadas quanto à coloração. Para as fêmeas registrou-se o peso do ovário e o peso do hepatopâncreas, enquanto para os machos foi registrado apenas o peso do hepatopâncreas.

Os estágios de desenvolvimento dos ovários foram separados de acordo com o grau de desenvolvimento. O estágio I foi representado pelo ovário imaturo e com uma coloração branca, o estágio II representado pelo ovário em desenvolvimento e coloração amarela e o estágio III, pelo ovário desenvolvido e com uma coloração verde oliva.

Para estimar o tamanho em que os animais atingem a maturidade sexual, as gônadas foram analisadas microscopicamente, onde seguiram as etapas de rotina em preparação histológica. O material foi observado quanto à presença de oócitos em vitelogênese secundária nas fêmeas, enquanto nos machos foi observada a presença de espermátides e/ou espermatozoides.

O índice gonadossômático (IG) e hepatossômático (IH) foram determinados segundo GRANT & TYLER (1983) e VAZZOLER (1996) pelas seguintes equações, $IG = (PG/PA) \times 100$ e $IH = (PH/PA) \times 100$, onde PG é o peso da gônada, PA é o peso do animal e PH é o peso do hepatopâncreas.

Para os resultados dos índices foi aplicado o teste de análise de variância a um critério (one-way ANOVA), sendo utilizado o teste de Tuckey, quando observado uma diferença entre as médias amostrais. Na comparação entre os índices gonadossômáticos e hepatossômáticos foi aplicado o teste de análise de variância a dois critérios (two-way ANOVA).

O nível de significância adotado foi de 5% e as análises estatísticas foram realizadas no programa SPSS (Statistical Package for the Social Sciences), versão 11.5, para Windows.

Resultados

O desenvolvimento das gônadas de *Parastacus varicosus* foi avaliado em machos (n= 40) com um comprimento de cefalotórax (CC) que variou de 8,25 a 39,85 mm ($26,81 \pm 0,736$) com peso médio de 6,70 gramas e nas fêmeas (n= 50) o CC variou de 12,55 a 37,06 mm ($28,26 \pm 0,842$) com peso médio de 7,24. Nenhuma fêmea ovígera foi observada.

A amplitude do CC foi maior nas fêmeas com gônadas imaturas, sendo que as fêmeas com gônadas em desenvolvimento e desenvolvidas apresentaram, praticamente, a mesma variação (tabela I). A ocorrência de gônadas imaturas em fêmeas de a partir de 12,55 até 35,08 mm sugere a ocorrência de sucessivas desovas.

Quanto ao peso dos ovários ocorreu um aumento significativo no estágio III diferindo dos estágios I e II ($p < 0,05$) (Figura 1), enquanto que o peso no estágio I não diferiu do estágio II ($p > 0,05$).

Nos ovários examinados (n = 50) observou-se uma maior predominância do estágio III, correspondendo a 48 %, seguido pelo estágio I com 36%, e o estágio II com a menor frequência, 16%. Esse fato pode ser observado na figura 2, onde é possível verificar, a presença do estágio III no período do inverno até o verão.

O menor valor do índice gonadosomático (IG) foi observado no período do outono (0,317) e o maior valor no verão (3,16). O menor valor do índice hepatossomático (IH) foi observado, também, no outono (6,16) e o maior valor na primavera (7,29) (Figura 3).

Com relação aos estágios dos ovários (Figura 4), observou-se um aumento do IG no estágio mais desenvolvido, estágio III ($p < 0,05$). Enquanto que nos estágios I e II não foi

verificada uma diferença significativa ($p > 0,05$). O IH não variou ($p > 0,05$) à medida que a gônada se desenvolve.

Os resultados do IG, das fêmeas, mostraram um aumento significativo no verão ($p < 0,05$), indicando assim que esta espécie apresenta uma maior atividade reprodutiva nesse período. Enquanto os valores do IH não apresentaram variação durante o período amostral ($p > 0,05$), embora tenha sido observada uma diminuição no período da primavera para o verão ($p > 0,05$) (Figura 3).

Comparando o IH entre machos e fêmeas (Figura 5) não foi observado uma variação significativa durante as amostragens ($p > 0,05$). Nas fêmeas o maior valor foi na primavera (7,3) e o menor no outono (6,16), enquanto nos machos o maior valor foi observado no verão (6,71) e o menor na primavera (5,86).

Na análise histológica das gônadas foi observada a presença de oócitos em vitelogênese secundária nas fêmeas a partir de 24 mm (CC) indicando assim, uma maturidade. Em 5 fêmeas, menores que 24 mm, constatou-se a presença de oócitos em vitelogênese inicial. Enquanto nas gônadas masculinas foi verificado a presença de espermatídes ou espermatozóides em animais acima de 23 mm (CC).

Discussão

O desenvolvimento das gônadas pode ser avaliado analisando os diferentes órgãos que podem atuar como fonte de armazenamento e de transferência de reservas orgânicas para o processo de maturação gonadal no período reprodutivo. O início da reprodução é um evento crítico na história de vida dos animais e está associado com o esforço reprodutivo, definido como a proporção de energia do corpo transferido para a reprodução (LÓPEZ GRECO & RODRIGUEZ 1999).

Em crustáceos decápodos, em geral, há armazenamento de reservas orgânicas no hepatopâncreas e utilização durante o desenvolvimento ovariano (PILLAY & NAIR 1973, IBSON & BARKER, 1979, SHYAMASUNDARI & ERRI BABU 1984, KYOMO, 1988, SPAARGAREN & HAEFNER 1994, LÓPEZ GRECO & RODRIGUEZ 1999, CHU 1999, YAMAGUCHI, 2001). Essa transferência de reservas para o período de maturação das gônadas também foi observada no lagostim de água doce *Cherax quinquecarinatus* por LINDQVIST *et al.* (1999) e BEATTY *et al.* (2005).

A utilização das reservas do hepatopâncreas durante o desenvolvimento das gônadas foi observada em *Aegla platensis* tanto nos machos como nas fêmeas (SOKOLOWICS *et al.*, 2006) Entretanto em três espécies de decápodos, *Aristeus antennatus* (Risso, 1816), *Parapenaeus longirostris* (Lucas, 1846) e *Nephrops norvegicus* (Linnaeus, 1758) não foi observado uma transferência das reservas do hepatopâncreas durante o desenvolvimento ovariano (ROSA & NUNES 2003). Esses autores sugerem que os recursos do hepatopâncreas não são esgotados e, parecem ser compensados diretamente pela alimentação.

Em *P. varicosus*, embora o índice hepatossomático não tenha apresentado variação significativa durante o período amostral foi observada uma diminuição no período do verão, com o aumento do índice gonadossomático, mostrando assim uma transferência parcial de reservas do hepatopâncreas para as gônadas durante o período reprodutivo. Esse fato foi corroborado através das análises bioquímicas observadas por SILVA-CASTIGLIONI *et al.* (em preparação) onde verificaram uma mobilização das reservas de lipídeos e proteínas. Entretanto, o hepatopâncreas não contribui, de forma significativa, com a transferência de reservas de colesterol, glicogênio e proteínas para o desenvolvimento das gônadas, durante o período reprodutivo, sugerindo assim, uma atuação do tecido muscular e, também uma atuação do aporte de nutrientes oriundos da dieta.

O aumento do índice gonadossomático no verão pode estar relacionado à amostragem somente de fêmeas com gônadas desenvolvidas. Esse fato deve-se à dificuldade de amostragem no verão influenciada pela baixa precipitação nesse período. A média histórica da precipitação esperada para os meses do verão (dezembro a fevereiro) para a região seria de 99,63 mm, entretanto a média de precipitação nesse trimestre foi de apenas 25,83 mm (EMBRAPA 2005). Com o déficit na precipitação, os animais aprofundaram as tocas na procura de água, o que dificultou a captura dos lagostins.

Através de observações em lagostins do gênero *Procambarus* HUNER (1988) e GUTIÉRREZ-YURRUTA & MONTES (1999) verificaram que a redução na atividade locomotora das fêmeas ovígeras, associada com a diminuição na atividade metabólica, pode explicar a menor amostragem quando comparado com as fêmeas não ovígeras, as quais apresentam altas taxas metabólicas e maior atividade de forrageio. Segundo BEATTY *et al.* (2005), esse argumento aliado ao grande número de tocas ocupadas pelas fêmeas ovígeras do lagostim *C. quinquecarinatus* sugere uma possível explicação para a redução na captura

dessas fêmeas. A não ocorrência de fêmeas ovígeras em todas as amostragens de *P. varicosus* e o uso das reservas de carboidratos e a diminuição intensa da glicemia no outono observado por SILVA-CASTIGLIONI *et al.* (em preparação) corrobora com essas observações; já que o outono parece ser a estação subsequente à reprodução.

O período reprodutivo, em algumas espécies de decápodos, é restrito a determinadas épocas do ano como os caranguejos braquiúros *Chasmagnathus granulata* Dana, 1851, *Cancer magister* Dana, 1852 e *Uca lactea* (de Haan, 1835) (LÓPEZ-GRECO & RODRÍGUEZ 1999; SWINEY & SHIRLEY 2001, YAMAGUCHI 2001, respectivamente) e, entre várias espécies de caranguejos de água doce podemos destacar *Aegla rostrata* Jara, 1977 e *Aegla leptodactyla* Buckup & Rossi, 1977 (JARA 1977, NORO & BUCKUP 2002, respectivamente). Entretanto algumas espécies, como *A. platensis* foi observada a presença de fêmeas ovígeras durante todo ano (BUENO & BOND-BUCKUP 2000), mas segundo SOKOLOWICZ *et al.* (2006) há um pico do desenvolvimento das gônadas nos meses do outono.

Embora tenha sido observado, em um mesmo período, fêmeas em diferentes estágios de desenvolvimento das gônadas e a presença de fêmeas com gônadas maduras no período do inverno ao verão, *Parastacus varicosus* mostrou uma maior atividade reprodutiva no verão, indicando o seu início na primavera. Em *Parastacus brasiliensis* (von Martens, 1869) foi observado um período reprodutivo da primavera ao verão (FONTOURA & BUCKUP 1989).

Concluindo, esses resultados sugerem que *P. varicosus* apresenta uma estratégia comportamental e de utilização das reservas de nutrientes muito peculiar. No entanto pesquisas da dinâmica populacional devem-se ser implementadas com vista ao melhor entendimento das estratégias de vida dessa espécie.

Referências Bibliográficas

- BAPTISTA-METRI, C.; M.A.A. PINHEIRO; A BLANKENSTEYN. & C.A. BORZONE 2005. Biologia populacional e reprodutiva de *Callinectes danae* Smith (Crustacea, Portunidae), no Balneário Shangrilá, Pontal do Paraná, Paraná, Brasil. **Revista Brasileira de Zoologia**, Curitiba, **17** (1): 43-49.
- BEATTY, S.J.; D.L. MORGAN & H.S. GILL. 2005. Life history and reproductive biology of the gligie, *Cherax quinquecarinatus*, a freshwater crayfish endemic to southwestern Australia. **Journal Of Crustacean Biology**, Lawrence, **25** (2): 251-262.
- BUENO, A.A.P. & G. BOND-BUCKUP. 2000. Dinâmica populacional de *Aegla platensis* Schmitt (Crustacea, Decapoda, Aeglidae). **Revista Brasileira de Zoologia**, Curitiba, **17** (1): 43-49.
- CASTIGLIONI, D.S. & S. SANTOS. 2001. Reproductive aspects of *Cyrtograpsus angulatus* Dana, 1851 (Brachyura, Grapsidae) in the Lagoa do peixe, Rio Grande do Sul State, Brazil. **Nauplius**, Botucatu, **9** (1): 11-20.
- CAVALLI, R.O.; M. TAMTIN; P. LAVENS & P. SORGELOOS. 2001. Variations in lipids classes and fatty acid content in tissues of wild *Macrobrachium rosenbergii* (de Man) females during maturation. **Aquaculture**, Amsterdam, **193**: 311-324.
- CHU, K.H. 1995. Aspects of reproductive biology of the shrimp *Metapenaeus joyneri* from the Zhujiang Estuary, China. **Journal of Crustacean Biology**, Lawrence, **15** (2): 214-219.
- COBO, V.J. & A. FRANSOZO. 2005. Physiological maturity and relationships of growth and reproductive in the red mangrove crab *Goniopsis cruentata* (Latreille) (Brachyura,

- Grapsidae) on the coast of São Paulo, Brazil. **Revista Brasileira de Zoologia**, Curitiba, **22** (1): 219-223.
- EMBRAPA 2005. Sistema de Monitoramento Agrometeorológico. www.agritempo.com.br
- FONTOURA, N.F. & L. BUCKUP. 1989. Dinâmica populacional e reprodução em *Parastacus brasiliensis* (von Martens, 1869) (Crustacea, Decapoda, Parastacidae). **Revista Brasileira de Biologia**, Rio de Janeiro, **49** (4): 911-92
- GIBSON, R. & P.L. BARKER. 1979. The decapod hepatopancreas. **Oceanography Marine Biology: an annual Review**, Aberdeen, **17**: 285-346.
- GRANT, A. & P.A. TYLER. 1983. The analysis of data in studies of invertebrate reproduction. I. Introduction and statistical analysis of gonad indices and maturity indices. **International Journal of Invertebrate Reproduction**, Amsterdam, **6**: 259-269.
- GRASSÉ, P.P. 1994. **Traité de Zoologie: Anatomie, Systématique, Biologie**. Tome VII. Crustacés; fascicule I: Morphologie, Physiologie, Reproduction, Systématique. Pp. 917; Masson.
- GUTIÉRREZ-YURRUTA, P.J. & C. MONTES. 1999. Bioenergetics and phenology of reproduction of the introduced red swamp crayfish, *Procambarus clarkii*, in Donana National Park, Spain, and implications for species management. – **Freshwater Biology**, Oxford, **42**: 561-574.
- HAEFNER, P.A. & D.H. SPAARGAREN 1993. Interactions of ovary and hepatopancreas during the reproductive cycle of *Crangon crangon* (L.). I Weight and volume relationships. **Journal of Crustacean Biology**, Lawrence, **13** (3): 523-531.
- HUNER, J.V. 1988. *Procambarus* in North America and elsewhere. Pp. 239-261. In HOLDICH, D. M. and LOWERY, R.S. (eds). **Freshwater Crayfish: Biology, management and Exploitation**. Chapman and Hall, London.

- JARA, C. 1977. *Aegla rostrata* n. sp., (Decapoda, Aegliidae), nuevo crustáceo dulceacuícola del sur de Chile. **Studies on Neotropical Fauna Environment**, **12**: 165-176.
- KYOMO, J. 1988. Analysis of the relationship between gonads and hepatopancreas in males and females of the crab *Sesarma intermedia*, with reference to resource use and reproduction. **Marine Biology**, Berlin, **97**: 87-93.
- KROL, R.M.; W.H. HAWKINS & R.M. OVERSTREET. 1992. Reproductive Components. *In*: HARRISON, F.W. (ed.): **Microscopic Anatomy of Invertebrates**, vol. 10, Decapod Crustacea. Willy-Lizz, Inc.
- KULKARNI, G.K.; L. GLADE & M. FINGERMAN. 1991. Oogenesis and effects of neuroendocrine tissues on in vitro synthesis of protein by the ovary of the red swamp crayfish *Procambarus clarkii* (Girard). **Journal of Crustaceana Biology**, Lawrence, **11**(4): 513-522.
- LAWRENCE, J.M. 1976. Patterns of lipid storage in post-metamorphic marine invertebrates. **American Zoologist**, Chicago, **16**: 747-762.
- LINDQVIST, O.V., J.V. HUNER; P. HENTTONEN & H. KONONEN. 1999. A comparison of life history strategies and energy reserves of crayfishes occupying permanent and temporary water bodies. – *Freshw. Biol.* **12**: 449-461.
- LÓPEZ-GRECO, L.S. & E.M. RODRÍGUEZ. 1999. Annual reproduction and growth of adult crabs *Chasmagnathus granulata* (Crustacea, Brachyura, Grapsidae). **Cahiers De Biologie Marine**, Paris, **40**: 155-164.
- MANTELATTO, F.L.M. & A. FRANZOZO. 1997. Fecundity of the crab *Callinectes ornatus* Ordway, 1863 (Decapoda, Brachyura, Portunidae) from the Ubatuba Region, São Paulo, Brazil, **Crustaceana**, Leiden, **70** (2): 214-225.

- MURA, M., ORRÚ, F. & A. CAU. 2005. Size at sexual maturity of the spider crab *Anamathia rissoana* (Decapoda: Majoidea) from the Sardinian Sea. **Journal Crustacean Biology**, Lawrence, **25** (1): 110-115.
- NORO, C.K. & L. BUCKUP. 2003. O crescimento de *Aegla leptodactyla* Buckup & Rossi (Crustacea, Anomura, Aeglidae). **Revista Brasileira de Zoologia**, Curitiba, **20** (2): 191-198.
- OH, C. W.; H. L. SUH; K. Y. PARK; C. W. MA & H. S. LIM. 2002. Growth and reproductive biology of the freshwater shrimp *Exopalaemon modestus* (Decapoda: Palaemonidae) in a lake of Korea. **Journal of Crustacean Biology**, Lawrence, **22** (2): 357-366.
- PILLAY, K.K. & N.B. NAIR. 1973. Observations on the biochemical changes in gonads and other organs of *Uca annulipes*, *Portunus pelagicus* and *Metapenaeus affinis* (Decapoda: Crustacea) during the reproductive cycle. **Marine Biology**, Berlin, **18**: 167-198.
- PINHEIRO, M.A.A. & A. FRANZOZO. 1998. Sexual maturity, reproductive output, and seasonal reproduction of *Philocheirus trispinosus* (Decapoda) in Port Erin Bay, Isle of Man. **Journal of Crustacean Biology**, Lawrence, **19** (2): 252-259.
- REIGADA, A.L.D. & M.L. NEGREIROS-FRANZOZO. 1999. Maturidade sexual em *Hepatus pudibundus* (Decapoda, Brachyura, Portunidae), in Ubatuba littoral, São Paulo State, Brazil. **Crustaceana**, Leiden, **71** (4): 434-452.
- ROSA, R.A. & M.L. NUNES. 2003. Changes in organ indices and lipid dynamics during the reproductive cycle of *Aristeus antennatus*, *Parapenaeus longirostris* and *Nephrops norvegicus* (Crustacea: Decapoda) females from the south Portuguese coast. **Crustaceana**, Leiden, **75** (9): 1095-1105.
- SAGI, A., I. KHALAILA, A. BARKI, G. HULATA & I. KARPLUS. 1996. Intersex red claw crayfish *Cherax quadricarinatus* (von Martens): functional males with previtellogenic ovaries. **Biology Bulletin**, Taichung, **190**: 16-23.

- SILVA-CASTIGLIONI, D.; DUTRA, B.K.; OLIVEIRA, G.T. & BOND-BUCKUP, G. Variações sazonais do metabolismo intermediário de *Parastacus varicosus* Faxon, 1898 (Crustacea, Decapoda, Parastacidae). (artigo em preparação).
- SHYAMASUNDARI, K. & D. ERRI BADU. 1984. Studies on the female reproductive system of *mennipe rumphii* (Fabricius) (Crustacea, Brachyura): some histochemical and biochemical changes during growth of the ovary. **Proceedings. of the Academy of Natural Sciences**, Calcutta,. 50: 266-276.
- SOKOLOWICZ, C.C. & G. BOND-BUCKUP & L. BUCKUP. 2005. Dynamics of gonadal development of *Aegla platensis* (Decapoda, Anomura, Aeglidae). (Submetido a Journal of Crustacean Biology).
- SPAARGAREN, D.H. & O.A. HAEFNER JR. 1994. Interactions of ovary and hepatopancreas during the reproductive cycle of *Crangon crangon* (L.). II. Biochemical relationships. **Journal of Crustacean Biology**, Lawrence, **14**: 6-19.
- SWINEY, K.M. & T. SHIRLEY. 2001. Gonad development of southeastern Alaskan Dungeness crab, *Cancer magister*, under laboratory conditions. **Journal of Crustacean Biology**, Lawrence, **21** (4): 897-904.
- VAZZOLER, A.E.A. DE M. 1996. **Biologia da Reprodução de Peixes Teleósteos: Teoria e Prática**. CNPq e Nupelia (UEM), São Paulo, pp. 169.
- YAMAGUCHI, T. 2001. Seasonal change of the hepatopancreas index in the males of the fiddler crab, *Uca lactea*. **Crustaceana**, Leiden, **74** (7): 627-634.

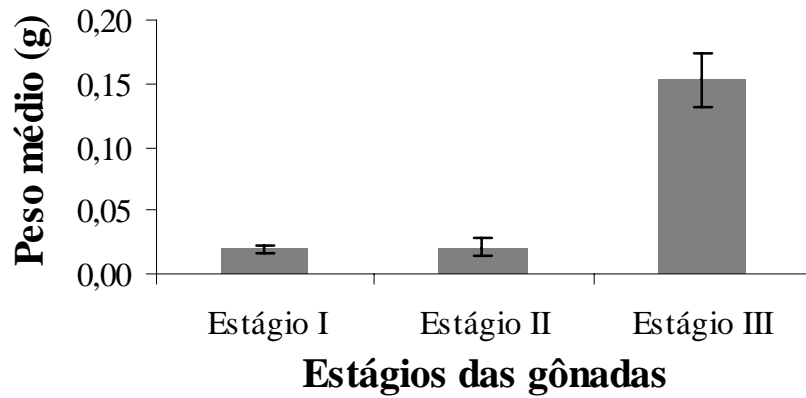


Figura 1. Peso médio dos ovários de *Parastacus varicosus* nos três estágios de desenvolvimento. As colunas representam a média e as barras verticais o erro padrão da média. As letras diferentes apontam diferença significativa ($p < 0,05$).

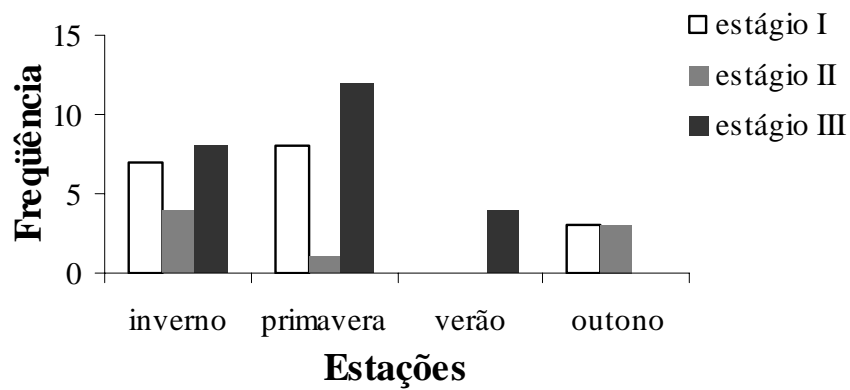


Figura 2. Frequência dos estágios dos ovários de *Parastacus varicosus* durante o período amostral.

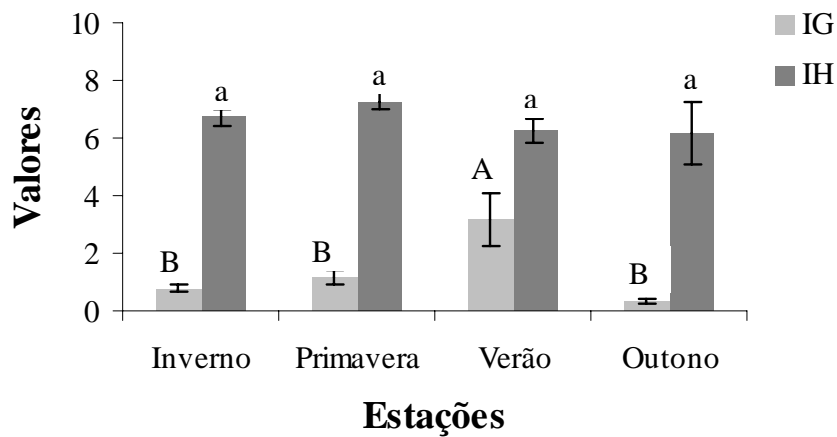


Figura 3. Índice gonadosomático (IG) e hepatossomático (IH) sazonal de fêmeas de *Parastacus varicosus* amostradas na localidade Cova do Touro, município de Gravataí, RS, Brasil. As colunas representam a média e as barras verticais o erro padrão da média. As letras diferentes apontam diferença significativa ($p < 0,05$); letras maiúsculas referentes ao IG e letras minúsculas referentes ao IH.

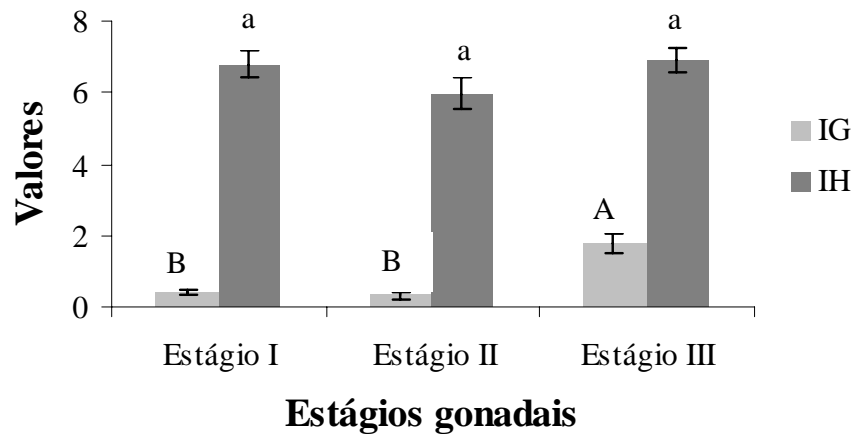


Figura 4. Índice gonadosomático (IG) e índice hepatossomático (IH) nos estágios de desenvolvimento dos ovários de *Parastacus varicosus* amostradas na localidade Cova do Touro, município de Gravataí, RS, Brasil. As colunas representam a média e as barras verticais o erro padrão da média. As letras diferentes apontam diferença significativa ($p < 0,05$); letras maiúsculas referentes ao IG e letras minúsculas referentes ao IH.

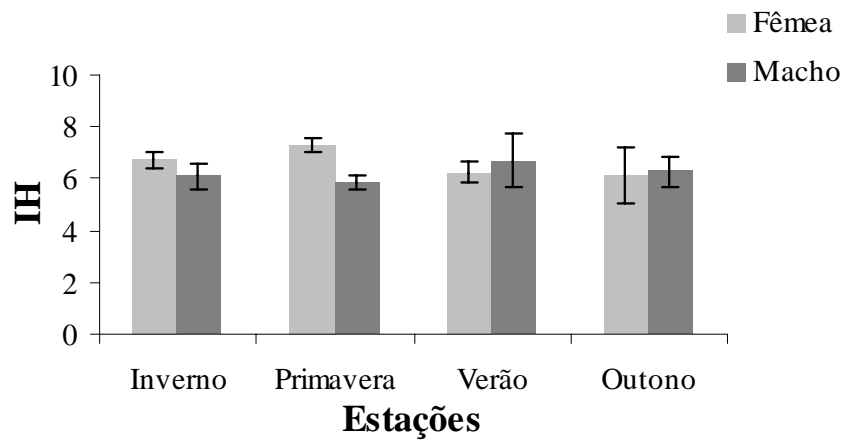


Figura 5. Índice hepatossomático (IH) dos machos e das fêmeas de *Parastacus varicosus* nas estações do ano, amostrados na localidade Cova do Touro, município de Gravataí, RS, Brasil. As colunas representam a média e as barras verticais o erro padrão da média.

Tabela I. Estágios de desenvolvimento dos ovários de *Parastacus varicosus* amostrados na localidade Cova do Touro, município de Gravataí, RS, Brasil.

	Estágio I (n= 18)	Estágio II (n= 8)	Estágio III (n= 24)
Coloração	Branca	Amarela	Verde oliva
Peso médio (g) ± EP	0,019 ± 0,003	0,021 ± 0,007	0,153 ± 0,021
Varição do CC (mm)	12,55 a 35,08	22,97 a 34,19	24,10 a 37,06
Média do CC ± EP (mm)	25,73 ± 1,43	28,38 ± 1,70	31,05 ± 0,93

* CC: comprimento do cefalotórax (mm) dos animais.

ARTIGO III

Variações sazonais do metabolismo intermediário de *Parastacus varicosus* Faxon, 1898

(Crustacea, Decapoda, Parastacidae)

Silva-Castiglioni, D.¹; Dutra, B.K.²; Oliveira, G.T.² & Bond-Buckup, G.¹

¹ Departamento de Zoologia e PPG Biologia Animal, Instituto de Biociências, UFRGS, BR.

² Faculdade de Biociências; Departamento de Ciências Biológicas, PUCRS, BR.

(daicastiglioni@yahoo.com.br)

Artigo formatado nas normas da Journal of Comparative Physiology B

Resumo: Variações sazonais do metabolismo intermediário de *Parastacus varicosus* Faxon, 1898 (Crustacea, Decapoda, Parastacidae). O objetivo da pesquisa foi analisar as variações sazonais no metabolismo de *Parastacus varicosus* e, verificar as possíveis relações com o período reprodutivo. Os animais foram amostrados de junho de 2004 a julho de 2005 na bacia hidrográfica do rio Gravataí, localidade Cova do Touro, RS, Brasil. Amostras de hemolinfa, hepatopâncreas, músculos e gônadas foram obtidas para a análise de glicose, glicogênio, proteínas totais, colesterol e lipídeos totais. Os índices gonadossomático (IG) e hepatossomático (IH) foram determinados para verificar uma possível transferência das reservas energéticas durante o período reprodutivo. Embora tenha se observado uma diminuição do IH com o aumento do IG, no período de passagem da primavera para o verão, essa diminuição não foi significativa ($p < 0,05$), o que sugere que o aporte nutricional seja importante fonte de substrato energético para o desenvolvimento das gônadas. Foi observada uma variação sazonal nos níveis dos metabólitos analisados na hemolinfa e nos diferentes tecidos. Entre os sexos não ocorreu um padrão diferencial nas análises dos diferentes metabólitos nos tecidos hepatossomático e muscular ($p > 0,05$), sendo que na hemolinfa observou-se uma variação nos níveis de colesterol e lipídeos totais ($p < 0,05$). Os resultados sugerem que a variabilidade do metabolismo de *P. varicosus* parece estar relacionada com o período de maturação das gônadas, porém outros fatores também podem estar atuando como a disponibilidade de alimento, o padrão de exploração ambiental e as condições ambientais, como observado para outros crustáceos.

Palavras-chave: Crustacea, Parastacidae, metabolismo, sazonalidade.

Introdução

O lagostim *Parastacus varicosus* Faxon, 1898 tem uma distribuição no Brasil, Uruguai e Argentina, sendo que no Brasil como as demais espécies do gênero estão restritas aos estados de Santa Catarina e Rio Grande do Sul. Esse crustáceo de água doce é encontrado em águas lênticas e lóticicas de pequeno volume e correnteza fraca, ocultando-se sob detritos nos remansos dos arroios ou entre as raízes da vegetação ciliar, construindo suas galerias nas margens ou no fundo do leito dos cursos d'água (Buckup, 1999).

Pesquisas com o gênero *Parastacus* são escassas, principalmente sobre a biologia reprodutiva, onde podemos destacar as desenvolvidas no Brasil com *Parastacus defossus* Faxon, 1898 (Almeida e Buckup, 1999) e *Parastacus brasiliensis* (von Martens, 1869) (Fontoura e Buckup, 1989b; Almeida e Buckup, 1997, 2000). Até o momento nenhuma pesquisa com *P. varicosus* foi desenvolvida sobre a reprodução com populações do espaço meridional brasileiro.

Segundo López-Greco e Rodríguez (1999) o início da reprodução é um evento crítico na história de vida dos animais e está associado com o esforço reprodutivo, definido como a proporção de energia do corpo transferida para a reprodução. Entre os vários parâmetros fundamentais para entender a biologia reprodutiva está a análise das variações bioquímicas do metabolismo intermediário visto que diferentes órgãos podem estar atuando como fonte de armazenamento e de transferência de reservas orgânicas para o processo de maturação gonadal no período reprodutivo, assim como a própria dieta do animal (Pillay e Nair, 1973; Rosa e Nunes, 2003a)

Algumas pesquisas mostraram que respostas biológicas às variações sazonais determinam uma variação na composição bioquímica dos organismos. Portanto modificações bioquímicas observadas na dinâmica e nos níveis de lipídios totais durante o ciclo reprodutivo, principalmente no tecido gonadal e hepatossomático, foram analisadas em algumas espécies de decápodos (Pillay e Nair, 1973; Adiyodi e Adiyodi, 1979; Read e Caulton, 1980; Teshima e Kanazawa, 1983; Castille e Lawrence, 1989; Rosa e Nunes, 2003a).

Em crustáceos as concentrações de lipídios são bastante elevadas, apesar de não existir um tecido adiposo diferenciado, os principais locais de armazenamento de lipídios são o músculo e o hepatopâncreas (O'connor e Gilbert, 1968; Chang e O'connor, 1983; Herreid e Full, 1988; Kucharski e Da Silva, 1991a). Diversas pesquisas têm demonstrado que durante períodos de grande demanda energética como a muda e a gametogênese ocorre uma marcante mobilização de lipídios, principalmente aqueles presentes no hepatopâncreas (Kucharski e Da Silva, 1991a, Rosa e Nunes, 2003b).

Os principais tecidos de reserva de glicogênio em crustáceos são o músculo, o hepatopâncreas, as brânquias e os hemócitos, porém o local de armazenamento varia segundo a espécie (Johnston e Davies, 1972; Herreid e Full, 1988; Parvathy, 1971). O glicogênio armazenado é utilizado nos processos de muda, hipóxia e/ou anoxia, osmorregulação, crescimento, diferentes estágios de reprodução e durante períodos de jejum (Chang e O'connor, 1983; Kucharski e Da Silva, 1991a; Kucharski e Da Silva, 1991b; Oliveira *et al.*, 2001, 2004; Rosa e Nunes, 2003a).

Algumas pesquisas mostram uma variação no conteúdo de proteínas durante o desenvolvimento ovariano em crustáceos. Estas variações poderiam resultar de um aumento

na biossíntese de várias proteínas incluindo, hormônios, enzimas e lipoproteínas envolvidas com a maturação gonadal (Rosa e Nunes, 2003a; Yehezkel *et al.*, 2000).

O metabolismo intermediário, em crustáceos de água doce, foi analisado somente nos eglideos *Aegla ligulata* Bond-Buckup & Buckup, 1994 (Oliveira *et al.*, 2003) e *Aegla platensis* Schmitt, 1942 (Ferreira *et al.*, 2005, Fernandes *et al.*, 2006). Em *A. ligulata* observou-se as variações circadianas e sazonais do metabolismo de carboidratos e, em *A. platensis*, foi observado o perfil metabólico de animais submetidos a dietas ricas em carboidratos e proteínas, como também a variação sazonal deste polissacarídeo.

Devido à lacuna de investigações do metabolismo intermediário nos crustáceos de água doce e também a escassez de informações sobre a biologia reprodutiva dos lagostins, o objetivo da presente pesquisa foi avaliar as variações sazonais no metabolismo intermediário de *Parastacus varicosus* e relacionar essas variações com os eventos reprodutivos e alguns parâmetros ambientais.

Materiais e Métodos

Amostras mensais de *Parastacus varicosus* foram coletadas no período de junho de 2004 a maio de 2005, em um arroio e em tanques de criação de peixes na localidade Cova do Touro, município de Gravataí, Rio Grande do Sul (29°52'33,9"S e 51°0'51,7"W). Foram utilizadas armadilhas com iscas (fígado de boi), um puçá e uma bomba de sucção.

Com a finalidade de caracterizar o habitat do lagostim e suas possíveis variações sazonais foram registrados alguns parâmetros como temperatura da água, pH e teor de oxigênio dissolvido. A temperatura da água foi obtida com termômetro de escala interna, o pH com um medidor portátil (Quimis/400H) e o oxigênio dissolvido com auxílio de um termo-oxímetro portátil (OXI 330/SET-WTW). Esses parâmetros amostrados mensalmente foram agrupados por estação do ano, onde foram calculadas médias sazonais.

Em campo foram retiradas amostras de hemolinfa das articulações dos pereiópodos, com seringas contendo oxalato de potássio (10%), um anticoagulante, sendo congeladas imediatamente. Os animais foram transportados em banho de gelo até o Laboratório de Carcinologia da UFRGS, onde foram sexados. A confirmação do sexo foi realizada pela observação da gônada sob microscópio óptico, pois esses animais não apresentam dimorfismo sexual, apresentando os dois pares de aberturas genitais, o par feminino e o par masculino.

Os animais foram pesados em uma balança eletrônica (precisão de 0,001g) e os diferentes tecidos, músculo do abdômen, o hepatopâncreas e as gônadas foram removidos. Esses tecidos foram pesados e armazenados no freezer a uma temperatura de -80° C para uma posterior análise bioquímica.

Para verificar possíveis relações das análises bioquímicas com o período reprodutivo da espécie foram determinados os índices gonadossomático e hepatossomático pelas seguintes equações: $IG = PG/PA \times 100$, onde PG é o peso da gônada e o PA é o peso do animal e multiplica-se por 100 para obter a porcentagem e $IH = PH/PA \times 100$, onde PH é o peso do hepatopâncreas (Grant e Tyler, 1983; Vazzoler, 1996).

Os resultados dos índices foram analisados pela aplicação do teste de análise de variância de uma via, com nível de significância de 5%. O teste de Tuckey foi utilizado, quando observado uma diferença entre as médias amostrais. Na comparação entre as variações anuais dos índices gonadossomáticos e hepatossomáticos de machos e fêmeas, durante o período de amostragem, utilizou-se o teste de análise de variância de duas vias, com nível de significância de 5%. As análises estatísticas foram realizadas no programa SPSS (Statistical Package for the Social Sciences), versão 11.5, para Windows.

Análises Bioquímicas

Os métodos utilizados nas análises bioquímicas da hemolinfa e de alguns tecidos de *Parastacaus varicosus* apoiaram-se em métodos espectrofotométricos padronizadas para outros crustáceos no laboratório de Fisiologia Animal da PUCRS (Oliveira *et al.* 2001, 2003; Fernandes *et al.* 2005).

1- Determinações na hemolinfa

- a. Os níveis de glicose foram quantificadas através do método da glicose oxidase com emprego do kit da Bioclin (glicose GOD-CLIN) . Os resultados foram expressos em mg/dl.

- b. As proteínas totais foram quantificadas segundo método descrito por Lowry (1951) com a albumina bovina como padrão, sendo os resultados expressos em mg/ml.
- c. Os lipídeos totais foram quantificados através do método da sulfofosfovalina, com os resultados sendo expressos em mg/dl.
- d. O colesterol total foi quantificado através do kit da Lab test (liquiform- Cat. 76.2), com os resultados sendo expressos em mg/dl.

2- Determinações nos tecidos (hepatopâncreas, gônadas e músculos)

- a. O glicogênio nos diferentes tecidos foi extraído segundo Van Handel (1965) e quantificado como glicose, após hidrólise ácida (HCl) e neutralização (carbonato de sódio), utilizando-se o kit da Bioclin (glicose GOD-CLIN) (glicose oxidase). Os resultados foram expressos em mg/g.
- b. As proteínas foram quantificadas segundo método descrito por Lowry (1951) com a albumina bovina como padrão, os resultados foram expressos em mg/ml
- c. Os lipídios totais foram extraídos pelo método do clorofórmio: metanol (2:1) (Folch *et al.*, 1957) e determinados por uso do método da sulfofosfovalina (Frings, 1970), com os resultados sendo expressos em mg/g.
- d. O colesterol foi quantificado através do kit da Lab test (liquiform- Cat. 76.2), utilizando-se o método de extração de Folch *et al.* (1957), com os resultados sendo expressos em mg/g.

Para as análises bioquímicas, durante o período amostral, foi aplicado o teste de análise de variância de uma via, seguido do teste de comparação de Bonferroni. Na comparação das curvas obtidas de machos e fêmeas foi utilizada a análise de variância de

duas vias. O nível de significância adotados foi de 5% e, as análises estatísticas foram realizadas com o programa SPSS (Statistical Package for the Social Sciences), versão 11.5, para Windows.

Resultados

As análises bioquímicas foram realizadas sazonalmente, onde foram utilizados 98 animais, 62 machos e 36 fêmeas para as determinações na hemolinfa e, amostras de 103 animais, 65 machos e 38 fêmeas para as determinações nos tecidos hepatossomático e muscular (tabela I). O tecido das gônadas foi analisado em 21 gônadas de fêmeas.

Determinações na hemolinfa

Nas fêmeas observou-se um nível elevado de glicose na hemolinfa nos meses do verão, seguida de uma diminuição intensa deste carboidrato no outono. No entanto as reservas de proteínas totais apresentaram, para ambos os sexos, valores reduzidos durante a primavera e verão em relação aos meses de inverno e outono (Figura 1). Com relação às concentrações de lipídeos totais e colesterol na hemolinfa dos machos e das fêmeas foi observado um aumento nesses níveis durante o período do verão ($p < 0,05$) (Figura 2).

Ao compararmos as concentrações dos diferentes metabólitos na hemolinfa, entre machos e fêmeas, verificou-se uma resposta diferencial apenas para os níveis de lipídeos totais e colesterol ($p < 0,05$). As fêmeas mostraram uma maior concentração das reservas de lipídeo e colesterol do que os machos, ao longo do período de estudo, apenas no período do outono observam-se níveis mais baixos de colesterol nas fêmeas. Nas análises sazonais da glicose e das proteínas totais não foi observada uma resposta diferencial entre os sexos ($p > 0,05$).

Determinações no tecido hepatossomático

No tecido hepatossomático observou-se uma variação sazonal em todos os metabólitos analisados. Na figura 3 observa-se um incremento nos níveis de glicogênio, dos machos, no inverno e no verão ($p < 0,05$) e, valores reduzidos na primavera e no outono. As fêmeas, no entanto, apresentaram uma diminuição significativa deste polissacarídeo no período do outono, com seus níveis aumentando gradualmente até atingirem um aumento de concentração no verão.

As concentrações de proteínas totais do tecido hepatossomático dos machos diminuíram nos meses do outono ($p < 0,05$) em relação aos meses do verão. As proteínas totais nas fêmeas estiveram elevadas durante o inverno, diminuindo gradualmente até atingirem níveis mais baixos no outono ($p < 0,05$) (Figura 3).

Na figura 4 pode-se observar uma elevação nos níveis de lipídeos totais no período do inverno para os machos e, no outono para as fêmeas ($p < 0,05$). A partir desse período foi observada uma diminuição na concentração dos lipídeos totais.

O colesterol do hepatopâncreas apresentou uma maior concentração no inverno nos machos ($p < 0,05$) e uma diminuição nas estações seguintes, atingindo o menor valor durante os meses de outono. Já no tecido hepatossomático das fêmeas não foi observada uma variação sazonal significativa nos níveis de colesterol (Figura 4)

Em todos os parâmetros metabólicos analisados no hepatopâncreas, não foi observada uma resposta diferencial entre os sexos ($p > 0,05$).

Determinações no tecido muscular

Na figura 5 podem-se verificar as variações nas concentrações de glicogênio no tecido muscular de *P. varicosus*, observando-se um aumento significativo durante o inverno no tecido dos machos, com valores significativamente reduzidos nas estações subsequentes. Oscilações, nesses níveis, foram verificadas no tecido muscular das fêmeas onde os valores de glicogênio foram maiores na primavera e no outono ($p < 0,05$).

As proteínas totais do músculo apresentaram níveis elevados durante os meses de verão, em ambos os sexos ($p < 0,05$) com esses níveis diminuindo cerca de 3 vezes no período do outono (Figura 5).

Nos experimentos do tecido muscular, mostrados na figura 6, observa-se uma diminuição nos níveis de lipídeos totais durante a primavera e o verão, para ambos os sexos e um aumento durante o outono, atingindo um valor máximo no inverno ($p < 0,05$). Com relação aos níveis de colesterol no tecido muscular foi constatada diminuição significativa na primavera, para ambos os sexos. No verão não foi possível quantificar os níveis de colesterol, pois não se obteve quantidade suficiente de tecido para esta dosagem (Figura 6).

Nas análises realizadas no tecido muscular não foi verificada uma resposta diferencial entre os sexos ($p > 0,05$) para os diferentes metabólitos analisados ao longo do ano.

Determinações no tecido das gônadas

Na figura 7 observa-se um aumento das reservas de glicogênio do tecido das gônadas durante os meses de primavera e outono, mas uma diferença significativa foi verificada somente no período do outono; também, sendo observada uma diminuição desses níveis no inverno.

As concentrações de proteínas totais mostraram-se elevadas durante o inverno e verão com uma diminuição na primavera e no outono ($p < 0,05$) (Figura 7).

Durante o período da primavera e verão foi observado um aumento nos níveis de lipídeos totais no tecido das gônadas, mas esse aumento não foi significativo ($p > 0,05$). Com relação ao conteúdo total de colesterol verificou-se uma concentração elevada nos meses de primavera seguida de uma intensa redução no outono (Figura 7).

Determinação dos Índices

Na determinação sazonal dos índices gonadossomáticos e hepatossomáticos (IG e IH) das fêmeas de *P. varicosus* verificou-se que, no período de passagem da primavera para o verão ocorreu um incremento do índice gonadossomático ($p < 0,05$) acompanhado por uma diminuição do índice hepatossomático; contudo, tal diminuição não foi significativa (Figura 8).

Nos meses de outono observou-se o menor valor do IG (0,317) e o maior valor nos meses de verão (3,16). Com relação ao menor valor do IH foi no outono (6,16) e o maior na primavera (7,29).

Parâmetros ambientais

A média sazonal obtida dos parâmetros ambientais, como a temperatura da água, oxigênio dissolvido e pH constam na tabela II. Os valores do pH apresentaram variação de 6,3 a 7,0. Conforme o esperado, a temperatura da água elevou-se no período do verão (30°C) com relação ao inverno (17,2 °C). O oxigênio dissolvido ficou em torno de 6 mg/L, com exceção do verão o qual observou-se um valor inferior.

Discussão

Nessa pesquisa, os resultados das análises do metabolismo intermediário de *P. varicosus* mostraram que grande parte das variações sazonais parece estar relacionada com a maturação das gônadas. O período reprodutivo de *P. varicosus* foi determinado pelo índice gonadossomático, onde foi verificado um aumento deste índice no período do verão, acompanhado por uma diminuição do índice hepatossomático. Embora essa diminuição não tenha sido significativa, o hepatopâncreas mostrou contribuir com a transferência de reservas energéticas para o desenvolvimento da estrutura das gônadas, mas provavelmente outros tecidos e os nutrientes da dieta parecem contribuir neste processo. Cabe ressaltar que o aumento do índice gonadossomático coincide com um aumento das reservas de proteínas e lipídeos neste tecido e com uma concomitante diminuição dessas reservas no tecido hepatossomático.

A glicose é o principal monossacarídeo na hemolinfa dos crustáceos (Chang e O'connor, 1983) sendo utilizado na síntese de quitina, de glicogênio, de mucopolissacarídeos, de ribose, de piruvato, de NADPH. Segundo Hu (1958) a glicose é um dos principais substratos energéticos para os processos metabólicos gerais em crustáceos. Níveis glicêmicos estáveis são importantes para manterem as funções regulares de certos tecidos e órgãos, como o sistema nervoso central e o muscular (Verri, *et al.* 2001), sendo controlados por fatores hormonais, nutricionais e ambientais (Ferreira *et al.* 2005).

Nas fêmeas de *P. varicosus* observou-se uma variação sazonal nos níveis de glicose na hemolinfa, ocorrendo um aumento no período do verão apenas nas fêmeas. Uma variação sazonal desse monossacarídeo também foi observada em *Aegla ligulata* e em *A.*

platensis (Oliveira *et al.*, 2003; Fernandes *et al.*, 2005, respectivamente). Em *A. platensis* o nível de glicose não está relacionada com as variações sazonais do grau de repleção do estômago visto que Bueno e Bond-Buckup (2004) observaram estômagos cheios durante todo o ano. Nessa pesquisa os espécimes de *P. varicosus* não foram estudados quanto ao conteúdo estomacal mas o aumento nos níveis de glicose durante o verão somente nas fêmeas, parece estar relacionado com a utilização das reservas de glicogênio do tecido muscular e gonadal durante o período reprodutivo, considerando que foi observada uma diminuição nesses níveis durante o verão.

Tanto em machos como em fêmeas observa-se uma diminuição do glicogênio nos meses do outono sugerindo um aumento do uso deste polissacarídeo para a síntese de ATP em um período subsequente a diminuição dos níveis de oxigênio ambiental e de elevação da temperatura. Desta forma os níveis de glicogênio no hepatopâncreas das fêmeas de *P. varicosus* parecem não mostrar uma relação com o período reprodutivo. Esse fato foi observado também em *Aristeus antennatus* (Risso, 1816), *Parapenaeus longirostris* (Lucas, 1846) e *Nephrops norvegicus* (Linnaeus, 1758) (Rosa e Nunes, 2003a). Ao contrário de *A. platensis* onde Fernandes *et al.* (2005) sugeriram que esta espécie armazena glicogênio no hepatopâncreas, especialmente nos meses do outono, utilizando essas reservas durante o período reprodutivo.

No tecido hepatossomático dos machos verifica-se uma diminuição deste polissacarídeo no período que antecede a reprodução (primavera) o que pode sugerir que esta reserva energética esteja sendo depletada para sustentar o aumento da exploração ambiental em procura das fêmeas, assim como de comportamentos reprodutivos. Perfil de resposta semelhante foi verificado por Fernandes *et al.* (2005) estudando machos de *A. platensis*.

A diminuição de glicogênio no tecido das gônadas nos meses do inverno parece sugerir um aumento da mobilização deste polissacarídeo possivelmente para a síntese de gametas e produção de ATP para a vitelogênese, o que é corroborado pela diminuição intensa de lipídeos e colesterol na hemolinfa nos meses de outono. As fêmeas mostraram um aumento da glicemia no verão podendo ser resultado da depleção do glicogênio muscular nos meses de verão, já a diminuição deste carboidrato na hemolinfa pode correlacionar-se com o aumento de glicogênio nas gônadas sugerindo um aumento da captação de glicose e síntese de glicogênio na estrutura das gônadas nos meses do outono.

As reservas de glicogênio são utilizadas nos processos de muda, hipóxia e/ou anoxia, osmorregulação, crescimento, diferentes estágios de reprodução e durante períodos de jejum (Chang e O'connor, 1983; Kucharski e Da Silva, 1991a; Kucharski e Da Silva, 1991b; Oliveira *et al.*, 2001, 2004; Rosa e Nunes, 2003a). Entre os tecidos analisados, nesta pesquisa, o glicogênio foi armazenado principalmente na gônada, enquanto nos resultados obtidos por Rosa e Nunes (2003a) no hepatopâncreas e em menor extensão no músculo. Segundo Baden *et al.* (1994) em *N. norvegicus* a ocorrência de depleção deste polissacarídeo nos músculos, durante hipóxia e inanição, sugere que o músculo tem um estoque de glicogênio, mais facilmente acessível durante este tipo de estresse. Isto poderia explicar a variação sazonal de glicogênio nos músculos.

Os carboidratos, além de estarem envolvidos na produção de ácidos nucléicos, são precursores de metabólitos intermediários na produção de energia e, são também componentes de pigmentos ovarianos (Harrison, 1990). Entretanto, no tecido dos ovários de *P. varicosus* não foi observado um aumento de glicogênio no período reprodutivo (verão), sendo observado um aumento nos níveis de glicogênio após esse período, no outono.

No verão foi observada uma diminuição nos níveis de proteínas na hemolinfa, em ambos os sexos. Esse fato pode estar relacionado à transferência dessas reservas para o desenvolvimento das gônadas, visto que ocorreu um aumento das proteínas totais nesse tecido no verão. Fernandes *et al* (2005) verificaram em *A. platensis* uma diminuição nos níveis de proteínas nos meses do outono e sugeriram estar relacionada com a vitelogenese e também como um investimento energético na gametogenese e no comportamento dos machos.

A variação sazonal do conteúdo de proteínas relacionada com o desenvolvimento ovariano pode resultar em um aumento na biossíntese de várias proteínas incluindo hormônios, enzimas e lipoproteínas envolvidas com a maturação das gônadas (Yehezkel, *et al.*, 2000; Rosa e Nunes, 2003a). As proteínas além de serem componentes estruturais dos tecidos embrionários, podem também ser usada como combustível nos estágios finais de desenvolvimento como observado no desenvolvimento embrionário de *Cherax quadricarinatus* por García-Guerrero *et al.* (2004) os quais verificaram que as proteínas são os principais componentes dos ovos. Segundo Sastry (1983) a oogênese envolve uma intensa síntese bioquímica com a mobilização de lipídeos e proteínas para o desenvolvimento dos ovos.

No tecido muscular observou-se uma maior quantidade de proteínas em relação aos outros tecidos analisados. A variação sazonal das reservas de proteínas, no tecido muscular, pode estar relacionada com mudanças na atividade alimentar, ocorrendo uma diminuição das reservas protéicas durante os períodos de inanição (Rosa e Nunes, 2003a). Segundo Barclay *et al.* (1983) a maior contribuição dessas reservas é para a manutenção do animal para o metabolismo durante períodos de inanição, onde pequenas mudanças nos níveis de proteínas nos músculos abdominais são suficientes. No tecido muscular de *P. varicosus* foi

observado um aumento de proteínas no verão e uma subsequente diminuição no outono, onde essas reservas provavelmente contribuíram para a manutenção e sobrevivência desses lagostins durante a escassez alimentar.

O metabolismo de lipídeos em crustáceos tem demonstrado, que durante períodos de grande demanda energética como a muda e a gametogênese, ocorre uma mobilização dos lipídeos, principalmente do hepatopâncreas para a gônada (Pillay e Nair, 1973, Shyamasundari e Erri Babu, 1984; Millamena e Pascual, 1990; Mourente e Rodríguez, 1991; Kucharski e Da Silva, 1991^a; Palácios *et al.*, 2000). O mesmo foi observado nos camarões *Penaeus duorarum* (Gehring 1974) e *Penaeus japonicus* (Bate, 1888) (Guary *et al.*, 1974; Teshima e Kanazawa, 1983; Teshima *et al.*, 1989).

A transferência de reservas lipídicas do hepatopâncreas para o desenvolvimento das gônadas parece ocorrer nas fêmeas de *P. varicosus*, onde a diminuição das reservas lipídicas do hepatopâncreas durante o período reprodutivo foi acompanhada pelo aumento dessas reservas nas gônadas, mas essa diminuição não foi tão evidente como nas espécies citadas anteriormente. No entanto, a mobilização dessas reservas não foi observada para algumas espécies de decápodos (Castille e Lawrence, 1989; Cavalli *et al.*, 2001; Rosa e Nunes, 2003b), pois o requerimento das reservas lipídicas para o desenvolvimento ovariano parece ser mais dependente dos nutrientes da dieta do que das reservas do hepatopâncreas nestes animais.

O hepatopâncreas em *P. varicosus* parece ser a principal fonte de armazenamento de lipídeos. Diversas pesquisas mostram que o hepatopâncreas e o músculo são os principais locais de estocagem de lipídeos em crustáceos (O'Connor e Gilbert, 1968; Chang e O'Connor, 1983; Herreid e Full, 1988). Segundo Jones e Obst (2000) os lipídeos são as principais reservas do hepatopâncreas do lagostim australiano *Cherax destructor* e, esse

órgão pode agir como fonte de nutrientes para mobilização quando a alimentação é escassa e também durante a maturação gonadal. Padrão de resposta semelhante foi observado na presente pesquisa. Sou tão sincera contigo gostaria q vc fosse também

O colesterol na hemolinfa foi depletado no período do outono, este fato pode estar relacionado com a síntese de hormônios sexuais, visto que ambos os sexos apresentaram uma resposta semelhante. Segundo Kanazawa e Teshima (1971) o colesterol é um componente estrutural das membranas celulares e precursor dos hormônios sexuais envolvidos no controle reprodutivo dos crustáceos.

Não foi observada uma reposta diferencial nas reservas de colesterol no tecido hepatossomático das fêmeas. Entretanto no tecido muscular ocorreu uma variação dessas reservas mostrando uma diminuição significativa na primavera, podendo, novamente, estar relacionada com o período reprodutivo, pois se observou um incremento nos níveis de colesterol nesse período no ovário, período que antecede a reprodução. Perfil de resposta semelhante foi verificado por Rosa e Nunes (2003a) pesquisando espécies de decápodos da costa portuguesa.

Os resultados das análises bioquímicas aliadas à facilidade de coleta nos meses de inverno sugerem um aumento da atividade exploratória nessa estação com o uso das reservas lipídicas. Já nos meses de verão há possivelmente um incremento da atividade reprodutiva e o uso preferencial das reservas de carboidratos e proteínas. Huner (1988) e Gutiérrez-Yurruta e Montes (1999) verificaram em *Procambarus* que a redução na atividade locomotora das fêmeas ovígeras associada com a diminuição na taxa metabólica, pode explicar a menor amostragem quando comparado com as fêmeas não ovígeras. A não ocorrência de fêmeas ovígeras em todas as amostragens aliado ao uso intenso das reservas

de carboidratos e proteínas nos meses de verão e outono corrobora com a determinação da maior atividade reprodutiva no verão.

Nos meses do verão ocorreu um déficit na precipitação dificultando a captura dos animais, que vivem em tocas que tendem a ser mais profundas com a falta d' água concomitante com uma diminuição nos níveis de oxigênio. A média histórica da precipitação para os meses de dezembro de 2004 a fevereiro de 2005 é 99,63 mm, entretanto a média observada nesse trimestre foi de apenas 25,83 mm (EMBRAPA, 2005). Portanto, neste período é necessário obter uma maior amostra para confirmar esses resultados.

Nessa pesquisa, a variabilidade do metabolismo intermediário em *P. varicosus* mostrou estar relacionada com o período de maturação das gônadas, mas vários outros fatores também podem estar influenciando, como as condições do ambiente, temperatura, fotoperíodo, estágio do ciclo de muda e alimentação. Portanto, a realização de pesquisas relacionando todos esses parâmetros pode contribuir de forma relevante para o conhecimento da biologia e para a conservação de uma determinada espécie, uma vez que, podem determinar um padrão diferencial de resposta metabólica, que se manifestará em mudanças fisiológicas, ecológicas e comportamentais.

Referências Bibliográficas

- Adiyodi R.G., Adiyodi C.A. (1979). Lipid metabolism in relation to reproduction and moulting in the crab, *Paatelphusa hydrodomus* (Herbst): cholesterol and unsaturated acids. Indian J. Exp. Biol. 9: 514-515.
- Almeida A.O., Buckup L. (1997). Aspectos anatômicos e funcionais do aparelho reprodutor de *Parastacus brasiliensis* (von Martens) (Crustacea, Decapoda, Parastacidae). Rev. Bras. Zool.14 (2): 497-509.
- Almeida A.O., Buckup L. (1999). Caracteres sexuais primários e secundários do lagostim *Parastacus defossus* Faxon, 1898 (Crustacea, Parastacidae). Nauplius 7: 113-126.
- Almeida A.O., Buckup L. (2000). Occurrence of protandric hermaphroditism in a population of the neotropical freshwater crayfish *Parastacus brasiliensis* (Parastacidae). J.Crustac. Biol. 20 (2): 224-230.
- Baden S.P., Depledge M.H., Hagerman L. (1994). Glycogen depletion and altered copper and manganese handling in *Nephrops norvegicus* following starvation and exposure to hypoxia. Mar. Ecol. Prog. Ser. 103: 65-72.
- Barclay M.C., Dall W., Smith D.M. (1983). Changes in lipid and protein during starvation and the moulting cycle in the tiger prawn, *Penaeus esculentus* Haswell. J. Exp. Mar. Biol. Ecol. 68: 229-244.
- Buckup L. (1999). Família Parastacidae. In: Buckup, L. & Bond-Buckup, G. (eds). Os Crustáceos do Rio Grande do Sul. Ed. Universidade/UFRGS, Porto Alegre, pp 319-327.

- Bueno A.A.P., Bond-Buckup G. (2004). Natural diet of *Aegla platensis* Schmitt and *Aegla ligulata* Bond-Buckup e Buckup (Crustacea, Decapoda, Aeglidae) from Brazil. Acta Limn.Bras. 16: 115-127.
- Castille F.L., Lawrence A.L. (1989). Relationship between maturation and biochemical composition of the shrimps *Penaeus aztecus* and *Penaeus setiferus* (L.) J. Crustac. Biol. 9: 202-211.
- Cavalli R. O., Tamtin M., Lavens P. E Sorgeloos P. (2001). Variations in lipids classes and fatty acid content in tissues of wild *Macrobrachium rosenbergii* (de Man) females during maturation. Aquaculture 193: 311-324.
- Chang E., O'Connor J.D. (1983). Metabolism and transport of carbohydrates and lipids. Pp. 263-287. In: Mantell, L.H. (ed.), The biology of Crustacea, vol 5. Internal anatomy and physiological regulation .Academic Press: New York.
- EMBRAPA 2005. Sistema de Monitoramento Agrometeorológico. www.agritempo.com.br
- Fernandes F.A., Bueno A.A.P, Bond-Buckup G., Oliveira G.T. (2005). Circadian and seasonal variations in the intermediate metabolism of *Aegla platensis* (Crustacea, Aeglidae) (submetido a Comp.Biochem.Phisiol.).
- Ferreira B.D.P., Hack C., Oliveira G.T., Bond-Buckup G. (2005). Perfil metabólico de *Aegla platensis* Schmitt (Crustacea, Anomura, Aeglidae) submetida a dietas ricas em carboidratos ou proteínas. Rev. Bras. Zool. 22 (1): 161-168.
- Folch J., Lees M. & Sloane-Stanley G.H. (1957). A simple method for isolation and purification of total lipides from animal tissues. J. Biol.Chem.226: 497-509.
- Fontoura N.F., Buckup L. (1989). Dinâmica populacional e reprodução em *Parastacus brasiliensis* (von Martens, 1869) (Crustacea, Decapoda, Parastacidae). Rev. Bras. Zool. 49 (4): 911-92.

- Frings C.S., Dunn R.T. (1970). A colorimetric method for determination of total serum lipids based on the sulfophosphovanillin reaction. *Amer. J. Clin. Pathol.* 53: 89-91.
- Garcia G., Racotta L.S; Villarreal H. 2003. Variation in lipid, protein, and carbohydrate content during the embryonic development of the crayfish *Cherax quadricarinatus* (Decapoda: *Parastacidae*). *J. Crustac. Biol.* 23 (1): 1-6 J.
- Gehring W.R. (1974). Maturational changes in the ovarian lipid spectrum of the pink shrimp, *Penaeus duorarum* Burkenroad. *Comp. Biochem. Physiol.* 49A: 511-524.
- Grant A., Tyler P.A. (1983). The analysis of data in studies of invertebrate reproduction. I. Introduction and statistical analysis of gonad indices and maturity indices. *International. J. Inv. Reprod.* 6: 259-269.
- Guary J., Kayama M., Murakami Y. (1974). Lipid class distribution and fatty acid composition of prawn, *Penaeus japonicus* Bate. *Bull. Jap.Soc. Sci. Fish.* 40: 1027-1032.
- Gutiérrez-Yurruta P.J., Montes C. (1999). Bioenergetics and phenology of reproduction of the introduced red swamp crayfish, *Procambarus clarkii*, in Donana National Park, Spain, and implications for species management. – *Freshw. Biol.* 42: 561-574.
- Harrison K.E. (1990). The role of nutrition in maturation, reproduction and embryonic development of decapod crustaceans: a review. *J. Shellfish Res.* 9, 1–28.
- Herreid C.F. & Full R.J. (1988). Energetics and locomotion. Pp. 337-377. In: Burggren, W.W., and McMahon, B.R. (eds), *Biology of the land crabs*. Cambridge University Press: Cambridge.
- Hu A.S.L. (1958). Glucose metabolism in the crab, *Hemigrapsus nudus*. *Archs.Biophys.* 75, 387-395.
- To indo coletar acho q pelas 16 hs estarei de volta qualquer coisa conversamos mais tarde

- Huner J.V. (1988). *Procambarus* in North America and elsewhere. Pp. 239-261 in D.M. Holdich and R.S. Lowery, eds, Freshwater Crayfish: Biology, management and Exploitation. Chapman and Hall, London.
- Johnston M.A., Davies P.S. (1972). Carbohydrates of the hepatopancreas and blood tissues of *Carcinus*. Comp. Biochem. Physiol. 41B: 433-443.
- Jones P.L., Obst J.H. (2000). Effects of starvation and subsequent refeeding on the size and nutrient content of the hepatopancreas of *Cherax destructor* (Decapoda: Parastacidae). J. Crustac. Biol. 20 (3): 431-441.
- Kanazawa, A. & Teshima, S.-I. (1971). In vivo conversion of cholesterol to steroid hormones in the spiny lobster, *Panulirus japonicus*. Bull. Jap. Soc. Sci. Fish. 37 891-897.
- Kucharski L.C.R., Da Silva R.S.M. (1991a). Effect of diet composition on the carbohydrate and lipid metabolism in an estuarine crab, *Chasmagnathus granulata* (Dana, 1851). Comp. Biochem. Physiol. 99A: 215-218.
- Kucharski L.C.R., Da Silva R.S.M. 1991b. Seasonal variation on the energy metabolism in an estuarine *Chasmagnathus granulata* (Dana, 1851). Comp. Biochem. Physiol. 100A (3): 599-602.
- López-Greco L.S., Rodríguez E.M. (1999). Annual reproduction and growth of adult crabs *Chasmagnathus granulata* (Crustacea, Brachyura, Grapsidae). Cah. Biol. Mar. 40: 155-164.
- Lowry O. H., Rosenbrough Fau N.J., Randal.R.G. (1951). Protein measurements with the folin phenol reagent. J. Biol.Chem. 183: 265-275.

- Millamena, O.M. & Pascual, F.P. (1990). Tissue lipid content and fatty acid composition of *Penaeus monodon* Fabricius broodstock from the wild. *Journ. World Aquacult. Soc.* 21: 116-121.
- Mourente, G. & Rodriguez, A. (1991). Variation in the lipid content of wild-caught females of marine shrimp *Penaeus kerathurus* during sexual maturation. *Mar. Biol.* 110, 21-28.
- O'Connor, J.D. & Gilbert, L.I. (1968). Aspects of lipid metabolism in Crustaceans. *Am. Zool.* 8: 529-539
- Oliveira, G.T. Rossi, I.C. & Silva, R.S.M. (2001). Carbohydrate metabolism during anoxia and post-anoxia recovery in *Chasmagnathus granulata* crabs maintained on high-protein or carbohydrate-rich diets. *Mar. Biol.* 139: 335-342.
- Oliveira, G.T., Fernandes, F.A., Bond-Buckup, G., Bueno, A.A. & Silva, R.S.M. (2003). Circadian and seasonal variations in the metabolism of carbohydrates in *Aegla ligulata* (Crustacea: Anomura: Aeglididae). *Mem. Mus. Vict.* 60 (1): 59-62.
- Oliveira, G.T., Rossi, I.C., Kucharski, L.C. & Da Silva, S.M. (2004). Hepatopancreas gluconeogenesis and glycogen content during fasting in crabs previously maintained on a high-protein or carbohydrate-rich diet. *Comp. Biochem. Physiol.* 137 (2): 383-390.
- Palacios, E.; Ibarra, A. M. & Racotta, I. S. (2000). Tissue biochemical composition in relation to multiple spawning in wild and pond-reared *Penaeus vannamei* broodstock. *Aquaculture* 185: 353-371.
- Parvathy, K. (1971). Glycogen storage in relation to the moult cycle in two crustaceans *Emerita asiatica* and *Ligia exotica*. *Mar. Biol.* 10: 82-86.
- Pillay, K.K. & Nair, N.B. (1973). Observations on the biochemical changes in gonads and other organs of *Uca annulipes*, *Portunus pelagicus* and *Metapenaeus affinis* (Decapoda: Crustacea) during the reproductive cycle. *Mar. Biol.* 18: 167-198.

- Read, G.H.I. & Caulton, M.S. (1980). Changes in mass and chemical composition during the molt cycle and ovarian development in immature and mature *Penaeus indicus* Milne Edwards. *Comp. Biochem. Physiol.* 66A: 431-437.
- Rosa, R.A. & Nunes, M.L. (2003a). Biochemical composition of deep-sea decapod crustaceans with two different benthic life strategies off the Portuguese south coast. *Deep-Sea Research I* 50: 119-130.
- Rosa, R.A. & Nunes, M.L. (2003b). Changes in organ indices and lipid dynamics during the reproductive cycle of *Aristeus antennatus*, *Parapenaeus longirostris* and *Nephrops norvegicus* (Crustacea: Decapoda) females from the south Portuguese coast. *Crustaceana* 75 (9): 1095-1105.
- Sastry, A. N. (1983). Ecological aspects of reproduction. Pp. 179-217. In Bliss, D.E. (ed.) *The Biology of Crustacea: Environmental Adaptation*. Vol. 8, Academic Press, New York.
- Shyamasundari, K. & Erri Badu, D. (1984). Studies on the female reproductive system of *mennipe rumphii* (Fabricius) (Crustacea, Brachyura): some histochemical and biochemical changes during growth of the ovary. *Proc. Indian natn. Sci. Acad. (B)* 50: 266-276.
- Spaargaren, D. H. E Haefner, Jr., P. A. (1994). Interactions of ovary and hepatopancreas during the reproductive cycle of *Crangon crangon* (L.). II. Biochemical relationships. *J. Crustac.Biol.*14: 6-19.
- Teshima, S. & Kanazawa, A. (1983). Variation in lipid composition during the ovarian maturation of the prawn. *Bull. Jap.Soc. Sci. Fish.* 49 (6): 957-962.

- Teshima, S.; Kanazawa, A.; Koshio, S. & Horinouchi, K. (1989). Lipid metabolism of the prawn *P. japonicus* during maturation: variation in lipid profiles of the ovariy and hepatopancreas. *Comp. Biochem. Physiol.* 92b(1): 45-49.
- Van Handel, E. (1965). Estimation of glycogen in small amount soft tissue. *Analist. Biochem.* 11: 256-265.
- Vazzoler, A.E.A. De M. (1996). *Biologia da Reprodução de Peixes Teleósteos: Teoria e Prática*. CNPq e Nupelia (UEM), São Paulo, pp. 169.
- Verri, T., Mandal, A., Zilli, L. Bossa, D., Mandal, P.K., Ingrosso, L. Zonno, V. Vitella, S., Ahearn, G.A. & Storelli, C. (2001). D-Glucose transport in decapod crustacean hepatopancreas. *Comp. Biochem. Physiol. A* 130: 585-606.
- Yehezkel , G., Chayoth, R., Abdu, U. Khalaila, I. & Sagi, A. (2000). High-density lipoprotein associated with secondary vitellogenesis in the hemolymph of the crayfish *Cherax quadricarinatus*. *Comp. Bioch. Physiol.* 127B: 411-421.

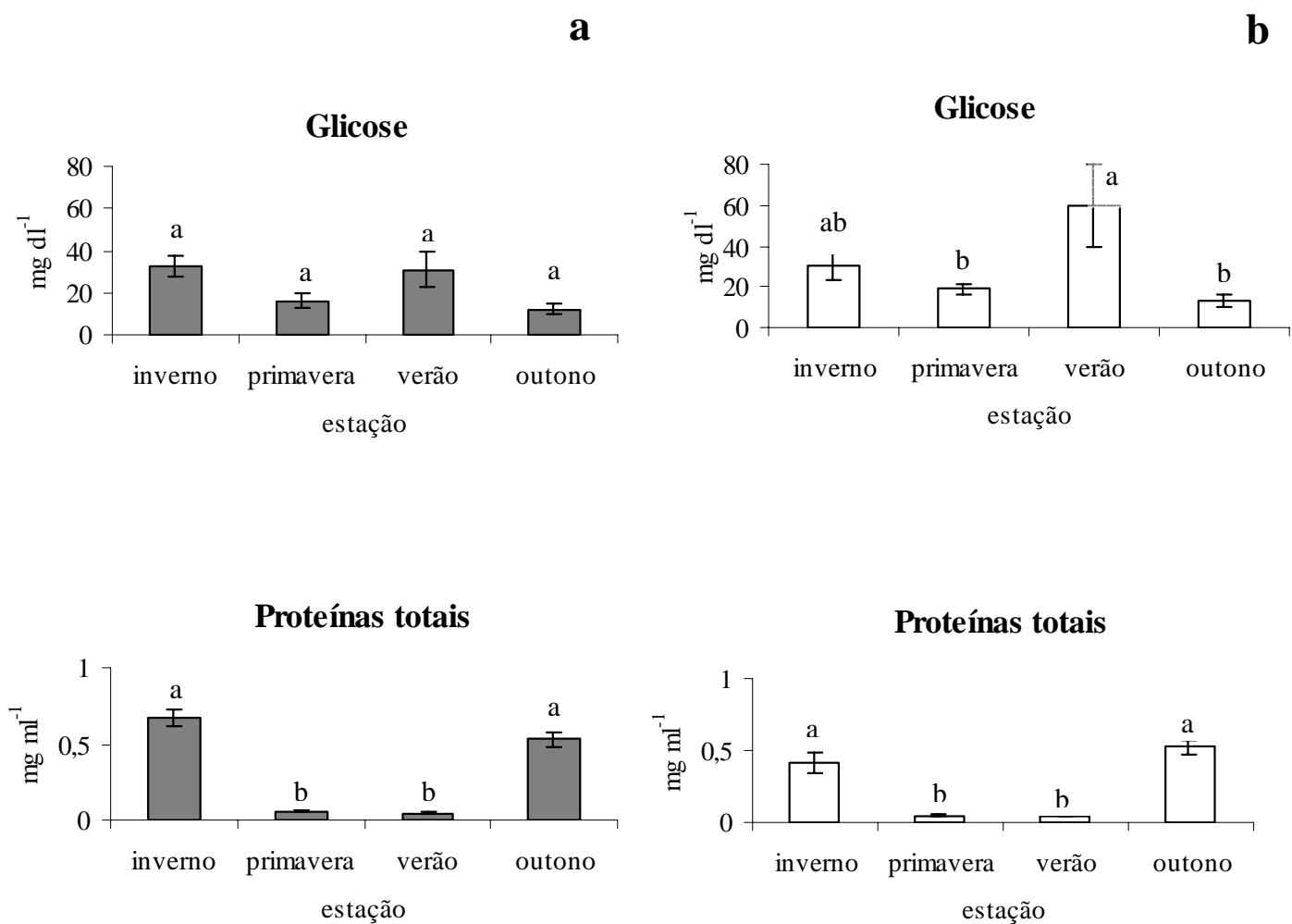


Figura 1. Concentração sazonal de diferentes metabólitos na hemolinfa de machos e fêmeas de *Parastacus varicosus* Faxon, 1898. a) machos; b) fêmeas. As colunas representam a média e as barras verticais o erro padrão da média. As letras diferentes indicam diferença significativa ($p < 0,05$).

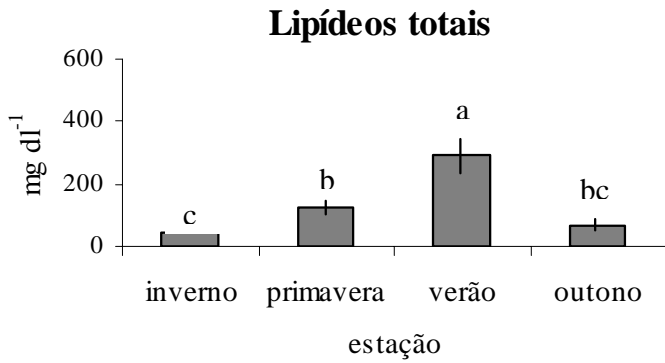
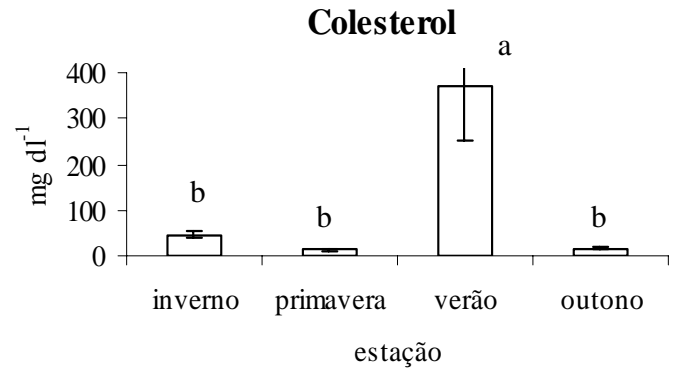
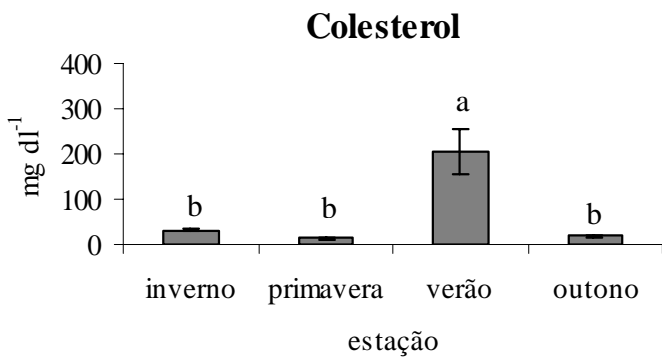
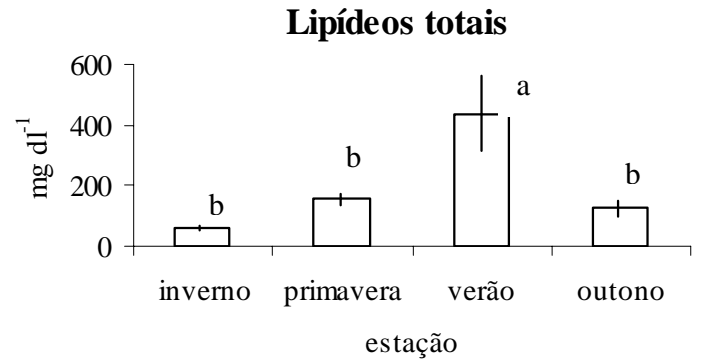
a**b**

Figura 2. Concentração sazonal de diferentes metabólitos na hemolinfa de machos e fêmeas de *Parastacus varicosus* Faxon, 1898. a) machos; b) fêmeas. As colunas representam a média e as barras verticais o erro padrão da média. As letras diferentes indicam diferença significativa ($p < 0,05$).

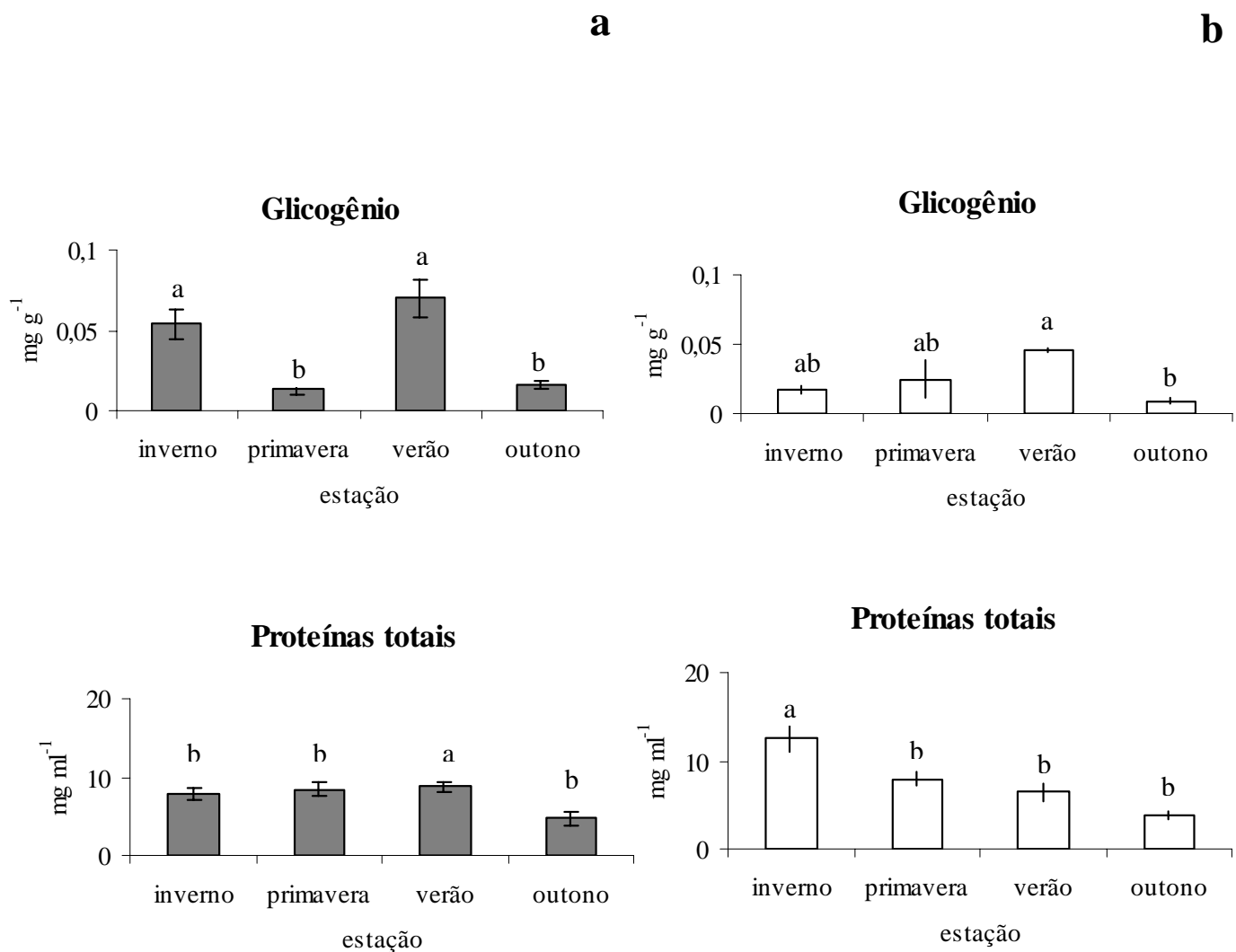


Figura 3. Concentração sazonal de diferentes metabólitos do hepatopâncreas de machos e fêmeas de *Parastacus varicosus* Faxon, 1898. a) machos; b) fêmeas. As colunas representam a média e as barras verticais o erro padrão da média. As letras diferentes indicam diferença significativa ($p < 0,05$).

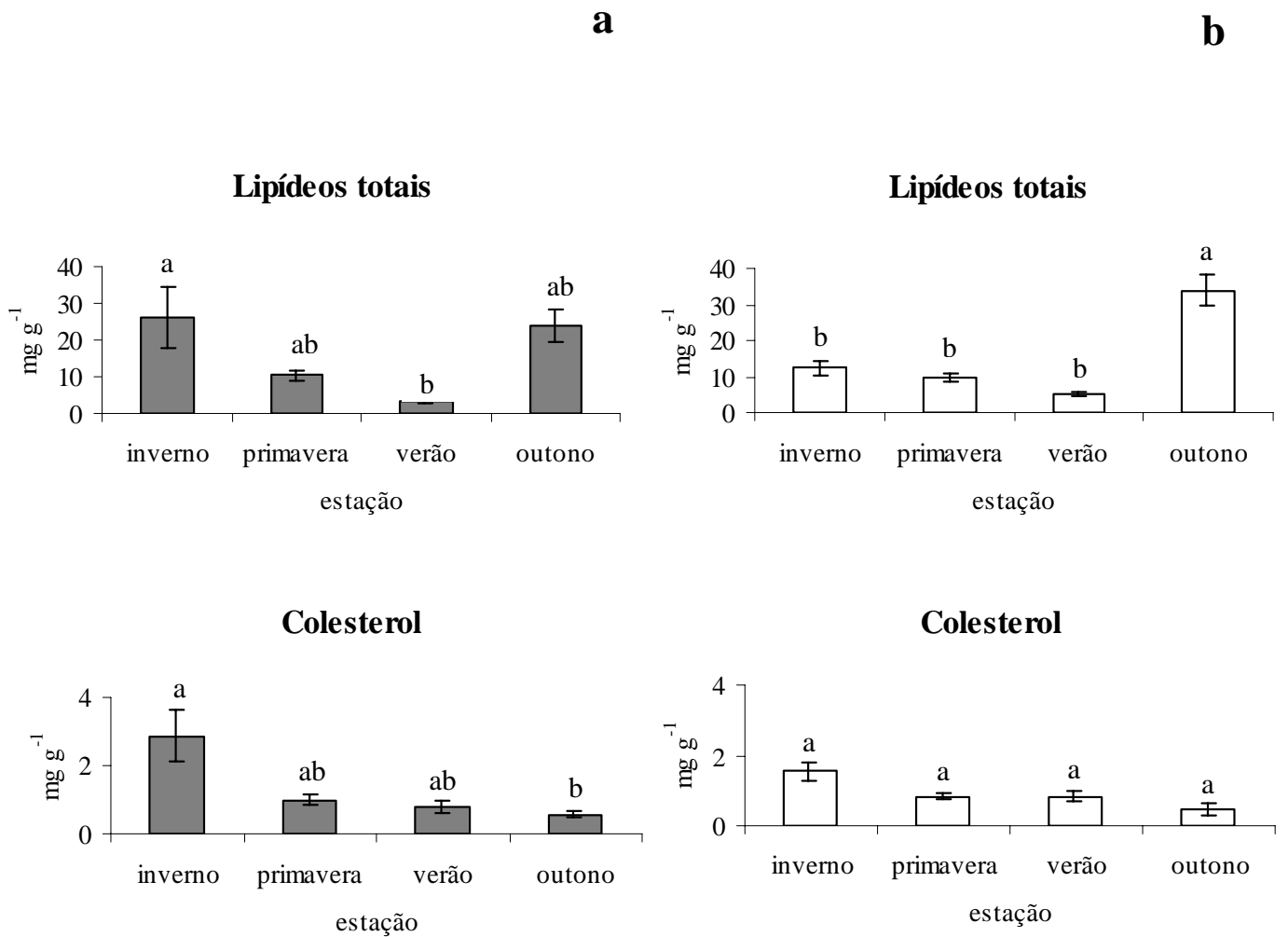


Figura 4. Concentração sazonal de diferentes metabólitos do hepatopâncreas de machos e fêmeas de *Parastacus varicosus* Faxon, 1898. a) machos; b) fêmeas. As colunas representam a média e as barras verticais o erro padrão da média. As letras diferentes indicam diferença significativa ($p < 0,05$).

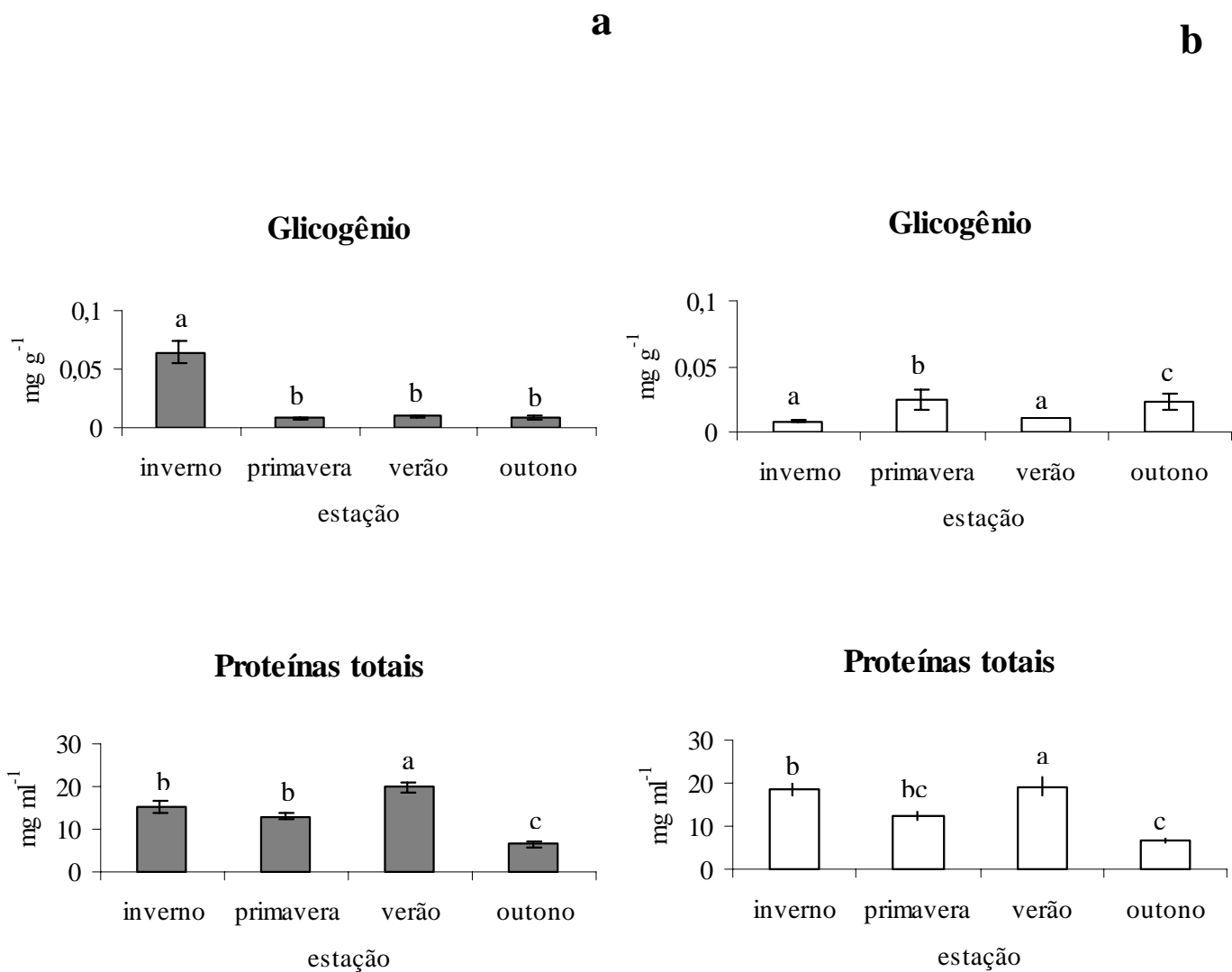


Figura 5. Concentração sazonal de diferentes metabólitos do tecido muscular de machos e fêmeas de *Parastacus varicosus* Faxon, 1898. a) machos; b) fêmeas. As colunas representam a média e as barras verticais o erro padrão da média. As letras diferentes indicam diferença significativa ($p < 0,05$).

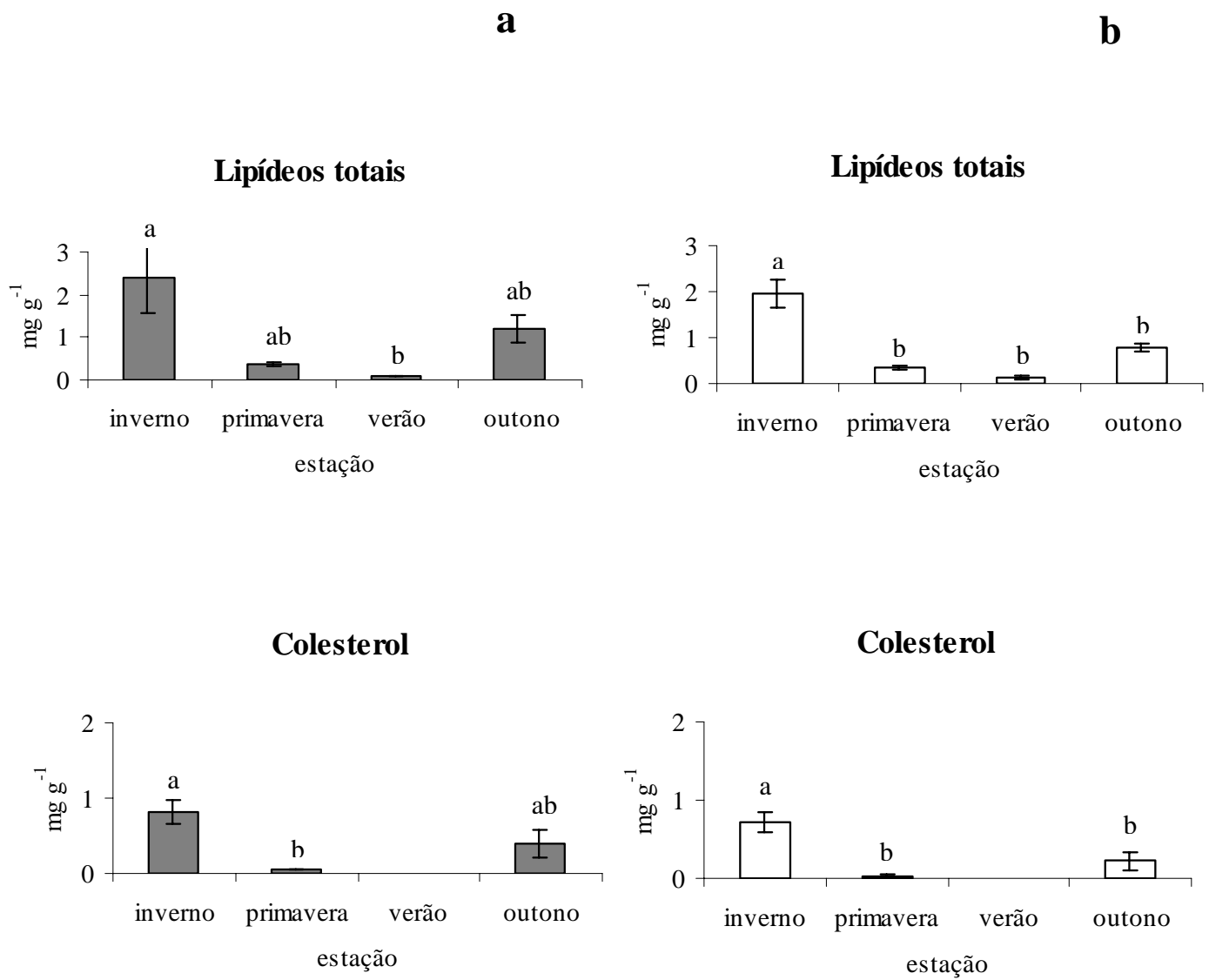


Figura 6. Concentração sazonal de diferentes metabólitos do tecido muscular de machos e fêmeas de *Parastacus varicosus* Faxon, 1898. a) machos; b) fêmeas. As colunas representam a média e as barras verticais o erro padrão da média. As letras diferentes indicam diferença significativa ($p < 0,05$).

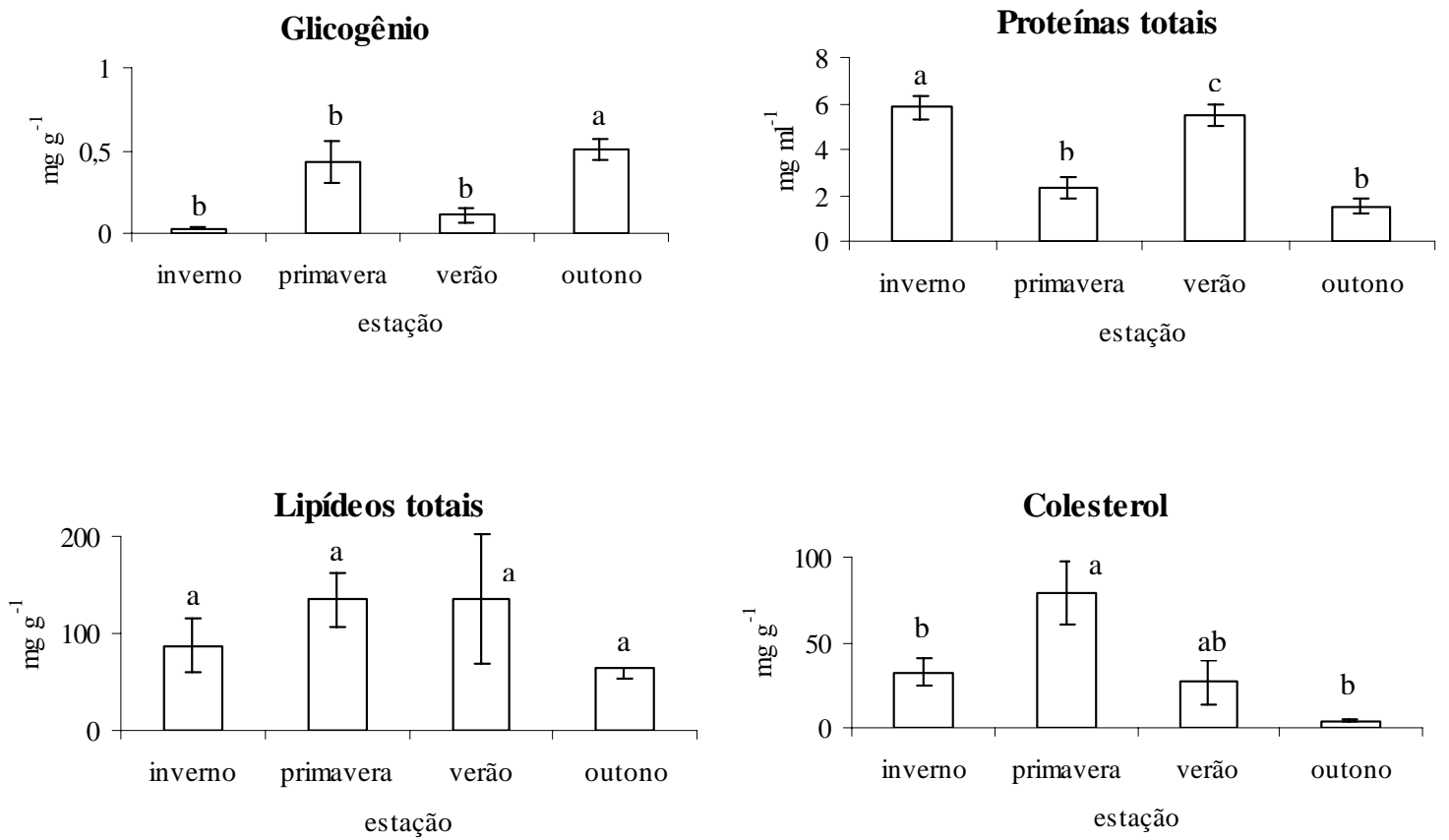


Figura 7. Concentração sazonal de diferentes metabólitos das gônadas em fêmeas de *Parastacus varicosus*, 1898. As colunas representam a média e as barras verticais o erro padrão da média. As letras diferentes indicam diferença significativa ($p < 0,05$).

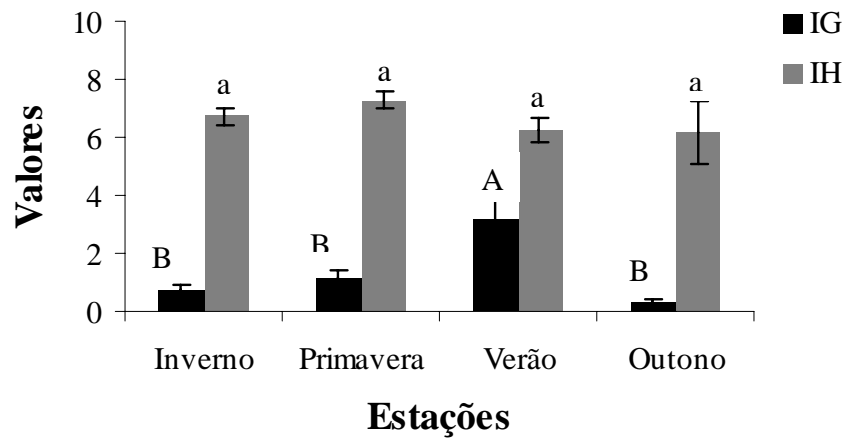


Figura 8. Índice gonadosomático (IG) e índice hepatossomático (IH) sazonal de fêmeas de *Parastacus varicosus*. As colunas representam a média e as barras verticais o erro padrão da média. As letras diferentes apontam diferença significativa ($p < 0,05$); letras maiúsculas referentes ao IG e letras minúsculas referentes ao IH.

Tabela I. Relação do número de animais amostrados para as determinações na hemolinfa e nos tecidos hepatossomático e muscular.

	Hemolinfa		Tecidos	
	Machos	Fêmeas	Machos	Fêmeas
Inverno	22	14	25	14
Primavera	22	14	22	15
Verão	7	4	7	4
Outono	11	4	11	5

Tabela II. Observações sazonais dos parâmetros ambientais do local de amostragem de *Parastacus varicosus* na localidade Cova do Touro, Gravataí, RS, no período de junho de 2004 a julho de 2005.

	Inverno	Primavera	Verão	Outono
Oxigênio dissolvido (mg/L)	5,9	6,0	4,0	6,2
pH	7,0	6,8	6,3	6,6
Temperatura da água (°C)	17,0	22,0	30,0	19,0

Conclusão geral

Os resultados dessa pesquisa mostraram que a determinação do sexo, em *Parastacus varicosus*, pode ser confirmada somente por observações microscópicas das gônadas, onde foi possível constatar a ocorrência do hermafroditismo. No entanto, para entender a dinâmica do hermafroditismo será necessário dar continuidade às investigações com essa e com as demais espécies do gênero, para que se possa compreender a evolução da sexualidade nestes animais.

Através das análises do desenvolvimento das gônadas foi revelado que parte das reservas energéticas do hepatopâncreas são mobilizadas para a gônada durante o período reprodutivo. Esse fato foi corroborado pelos resultados das análises bioquímicas, onde a variabilidade do metabolismo intermediário em *P. varicosus* mostrou estar relacionada com o período de maturação das gônadas. Verificou-se que, além do hepatopâncreas, o tecido

muscular e a hemolinfa mostraram uma atuação na transferência das reservas energéticas durante a maturação das gônadas.

Os resultados das análises bioquímicas mostraram uma correlação com os resultados obtidos nas investigações macro e microscópica das gônadas. Esse fato indica uma conexão entre essas áreas de pesquisas e contribui de forma significativa para um melhor entendimento da biologia reprodutiva, cujos aspectos nunca foram abordados de uma forma integrada neste grupo de crustáceos.

Anexos

Anexo 1. Concentração de glicogênio (mg g^{-1}) nos tecidos de *Parastacus varicosus*. Os resultados representam a média \pm erro padrão. O nível de significância foi de $p < 0,05$.

		Hepatopâncreas	Músculo	Gônada
Machos	Inverno	0,054 \pm 0,009	0,064 \pm 0,009	
B	Primavera	0,013 \pm 0,003	0,0081 \pm 0,001	
	Verão	0,070 \pm 0,012	0,0097 \pm 0,0004	
	Outono	0,016 \pm 0,022	0,0084 \pm 0,0012	
Fêmeas	Inverno	0,017 \pm 0,003	0,0082 \pm 0,0008	0,031 \pm 0,005
	Primavera	0,025 \pm 0,013	0,0247 \pm 0,0075	0,431 \pm 0,126
	Verão	0,046 \pm 0,001	0,0112 \pm 0,0008	0,108 \pm 0,042
	Outono	0,009 \pm 0,001	0,0232 \pm 0,006	0,511 \pm 0,062

Anexo 2. Concentração de proteínas totais (mg ml^{-1}) nos tecidos de *Parastacus varicosus*. Os resultados representam a média \pm erro padrão. O nível de significância foi de $p < 0,05$.

		Hepatopâncreas	Músculo	Gônada
Machos	Inverno	$7,87 \pm 0,86$	$15,22 \pm 1,45$	
	Primavera	$8,47 \pm 0,93$	$13,05 \pm 0,87$	
	Verão	$8,74 \pm 0,60$	$19,77 \pm 1,02$	
	Outono	$4,72 \pm 0,87$	$6,51 \pm 0,60$	
Fêmeas	Inverno	$12,55 \pm 1,50$	$18,52 \pm 1,56$	$5,82 \pm 0,56$
	Primavera	$7,93 \pm 0,82$	$12,31 \pm 0,82$	$2,33 \pm 0,45$
	Verão	$6,43 \pm 0,98$	$19,12 \pm 2,07$	$5,50 \pm 0,47$
	Outono	$3,77 \pm 0,423$	$6,60 \pm 0,65$	$1,52 \pm 0,35$

Anexo 3. Concentração de colesterol (mg dl^{-1}) nos tecidos de *Parastacus varicosus*. Os resultados representam a média \pm erro padrão. O nível de significância foi de $p < 0,05$.

		Hepatopâncreas	Músculo	Gônada
Machos	Inverno	$2,87 \pm 0,77$	$0,81 \pm 0,17$	
	Primavera	$0,98 \pm 0,16$	$0,05 \pm 0,009$	
	Verão	$0,77 \pm 0,19$	$0,773 \pm 0,14$	
	Outono	$0,56 \pm 0,10$	$0,40 \pm 0,18$	
Fêmeas	inverno	$1,54 \pm 0,27$	$0,72 \pm 0,12$	$32,38 \pm 8,20$
	Primavera	$0,83 \pm 0,11$	$0,03 \pm 0,01$	$79,08 \pm 18,15$
	Verão	$0,83 \pm 0,12$	$0,704 \pm 0,08$	$26,75 \pm 12,70$
	Outono	$0,47 \pm 0,16$	$0,22 \pm 0,11$	$4,09 \pm 0,70$

Anexo 4. Concentração de lipídeos totais (mg dl^{-1}) nos tecidos de *Parastacus varicosus*. Os resultados representam a média \pm erro padrão. O nível de significância foi de $p < 0,05$.

		Hepatopâncreas	Músculo	Gônada
Machos	Inverno	26,1 \pm 8,38	2,38 \pm 0,79	
	Primavera	0,44 \pm 1,28	0,56 \pm 0,05	
	Verão	3,38 \pm 0,34	0,10 \pm 0,01	
	Outono	23,99 \pm 4,53	1,21 \pm 0,32	
Fêmeas	inverno	12,44 \pm 1,89	1,95 \pm 0,29	87,73 \pm 27,21
	Primavera	9,83 \pm 1,16	0,62 \pm 0,03	134,65 \pm 28,12
	Verão	4,92 \pm 0,56	0,13 \pm 0,03	135,17 \pm 67,00
	Outono	33,89 \pm 4,21	0,79 \pm 0,087	63,99 \pm 10,31

Anexo 5. Concentração dos metabólitos na hemolinfa de *Parastacus varicosus*. Os resultados representam a média \pm erro padrão. O nível de significância foi de $p < 0,05$.

		Glicose (mg dl⁻¹)	Proteínas totais (mg ml⁻¹)	Colesterol (mg dl⁻¹)	Lipídeos totais (mg dl⁻¹)
Machos	Inverno	32,21 \pm 4,98	0,670 \pm 0,059	31,2 \pm 2,43	46,26 \pm 3,93
	Primavera	16,15 \pm 3,33	0,059 \pm 0,007	14,45 \pm 2,00	123,21 \pm 22,46
	Verão	31,09 \pm 8,27	0,045 \pm 0,004	205,98 \pm 48,65	290,37 \pm 53,67
	Outono	12,29 \pm 2,68	0,529 \pm 0,050	19,18 \pm 2,24	67,68 \pm 18,00
Fêmeas	Inverno	29,91 \pm 6,68	0,420 \pm 0,072	45,86 \pm 7,40	61,97 \pm 6,72
	Primavera	18,83 \pm 2,29	0,049 \pm 0,003	14,46 \pm 2,20	155,83 \pm 19,14
	Verão	59,66 \pm 19,96	0,050 \pm 0,003	370,83 \pm 117,51	438,28 \pm 122,66
	Outono	12,37 \pm 3,14	0,527 \pm 0,049	15,30 \pm 2,25	123,79 \pm 26,48

